

Zellphysiologische Charakterisierung von Zellkulturen in der Influenza-Impfstoffproduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

von: Diplom Biotechnologe Josef Schulze-Horsel
geb. am: 27. November 1978
in: Beckum / Westfalen

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
 Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
 Dr. rer. nat. Holger Lübben

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

eingereicht am: 28. September 2010
Promotionskolloquium am 22. Februar 2011

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

Band 30

Josef Schulze-Horsel

**Zellphysiologische Charakterisierung von
Zellkulturen in der Influenza-Impfstoffproduktion**

Shaker Verlag
Aachen 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.: Magdeburg, Univ., Diss., 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 978-3-8440-0250-8

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

Zusammenfassung

Jährlich erkranken weltweit etwa 500 Millionen Menschen an einer Influenza-Virusinfektion (WHO 2003). Zum Schutz vor den schwerwiegenden Folgen der Infektion werden Impfstoffe eingesetzt. Diese werden momentan hauptsächlich in embryonierten Hühnereiern produziert. Neue Verfahren verwenden stattdessen Säugetier-Zellkulturen, die in modernen biotechnologischen Prozessen hergestellt werden. Maßgeblich für die Produktivität der Produktionsverfahren in Zellkulturen ist neben der Optimierung der Zellexpansion die Wechselwirkung des Virus-Wirtszellsystems.

Ausgehend von einem Modellprozess zur Influenza-Virusproduktion in Microcarrierkulturen von Madin Darby Hunde-Nierenzellen (MDCK) wurden im Zusammenhang mit der Virusvermehrung die zellbiologischen Mechanismen Zellzyklus und Apoptose (programmierter Zelltod) untersucht. Im Gegensatz zu zellbiologisch oder virologisch motivierten Arbeiten der Grundlagenforschung, bei denen typischerweise unregelmäßige Bedingungen in statischer Kultur vorliegen, war es in Bioreaktoren möglich, die Zellphysiologie unter kontrollierten Prozessbedingungen zu untersuchen. Speziell die zeitliche Aufschlüsselung des Verlaufes der virusinduzierten Apoptose stellt dabei ein Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Arbeit dar.

Die Analyse der Virusinfektion, des Zellzyklusses und der Apoptose erfolgten im Wesentlichen mittels Durchflusscytometrie. Die Methode ermöglichte die Korrelation der Influenza-Virusinfektion mit der Apoptose auf Einzelzellebene. Darüber hinaus konnten die bei der Infektionsdetektion gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten über eine Kalibration der Fluoreszenz in Moleküläquivalente von gelöstem Fluorescein transformiert werden, was zur Abschätzung der Kopien des viralen Nukleoproteins pro Zelle genutzt werden konnte.

Die Induktion der Apoptose während der Virusvermehrung in statischen Zellkulturen konnte auch für das Modellsystem der Virusproduktion im Bioreaktor bestätigt werden. Dabei wurde Apoptose fast ausschließlich bei infizierten Zellen nachgewiesen, die Fraktion der nicht-infizierten apoptotischen Zellen war vernachlässigbar klein. Dies wurde auch in scheininfizierten Kultivierungen bestätigt. Die getrennte Analyse von Zellen auf Microcarriern und abgelösten Zellen im Überstand zeigte deutliche Unterschiede im Nukleoprotein-Gehalt und dem Anteil apoptotischer Zellen auf. Adhärenente Zellen zeichneten sich dabei durch einen höheren Nukleoprotein-Gehalt, aber einem minimalen Anteil von apoptotischen Zellen aus, während die abgelösten Zellen im Überstand zu einem hohen Anteil apoptotisch

waren, jedoch vergleichsweise wenig Nukleoprotein-Kopien pro Zelle aufwiesen. Zusammen mit der Analyse der Virusakkumulation im Kulturüberstand wurde aus den Daten ein mechanistisches Schema für den Ablauf von Virusinfektion und Apoptose in Microcarrier-Kulturen abgeleitet. Demnach geht der Hauptteil der Virusausbeute auf die adhärenen Zellen zurück. Dabei sind die Virus-Replikationsrate und die Überlebensdauer einer infizierten Zelle bis zur Exekution der Apoptose und der resultierenden Ablösung vom Microcarrier die entscheidenden Kriterien für die Virusausbeute von MDCK-Zellen.

Die Analyse des Zellzyklusses von MDCK-Zellen auf Microcarriern lieferte zusätzliche Informationen über das Kulturverhalten während der Zellexpansion im Bioreaktor. Untersuchungen zur gezielten Veränderung der Virusausbeute durch (bio-) chemische Mediumszusätze in statischen Screeningsystemen und in Bioreaktoren zeigten massive Ausbeuteverringerungen als Folge der Apoptoseinduktion. Basierend auf dem etablierten Screeningsystem in Sechs-Well-Platten können weitere Substanzen getestet werden.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnissen wurden stochastische und populationsbasierende Modelle zur Virusinfektion in Bioreaktoren entwickelt.

Abstract

Influenza virus infections are a major cause of morbidity and mortality. Today, human Influenza vaccines are mainly produced in embryonated hen's eggs. In addition, mammalian cell cultures can be used as host system for virus propagation. Next to effective cell expansion, optimization of virus-host cell interaction is a key driver for productivity increase in cell culture-derived vaccine manufacturing.

Based on a model process for Influenza virus propagation in microcarrier cultures of Madin Darby canine kidney cells (MDCK) both cell cycle and apoptosis (programmed cell death) were analyzed. In contrast to previous publications focussing on cell biology and virology in static culture, cultivations in bioreactors allowed for controlled culture conditions. The collection of time-series of cell cycle progression, viral infection and apoptosis induction are a unique feature of the work presented here.

Flow cytometry was used to measure the cell cycle progression, spread of cell infection and apoptosis. Thus, it was possible to correlate cell infection and apoptosis on a single cell level. Also, relative fluorescence intensities measured during the quantification of infected cells could be calibrated against molecule equivalents of soluble fluorescein in order to estimate the number of viral nucleoprotein copies per cell.

In accordance to fundamental research publications the induction of apoptosis by influenza virus was also observed in microcarrier cultivations of MDCK and Vero cells. The induction of apoptotic cell death was only found in infected cells. The proportion of uninfected apoptotic cells was negligible. This was also confirmed in mock-infected microcarrier cultures. Separate analysis of adherent cells on microcarriers from detached cells in the culture supernatant showed major differences in nucleoprotein content and apoptosis induction. More nucleoprotein copies were detected in adherent cells. However, only a minor fraction of the adherent cells were apoptotic. In contrast, cells in the supernatant were apoptotic to a greater extent but contained less nucleoprotein copies. Together with the quantification of released virions, these observations were concluded to form a mechanistic scheme of virus production and apoptosis induction in MDCK cells in microcarrier culture. Hence, most of the virus particles are produced by adherent cells. Virus replication rate and the average lifetime of infected cells were identified as the main factors for virus yield in MDCK cells.

Further insights on cell propagation were produced during investigation of the cell cycle of MDCK cells in microcarrier cultures. The chemical manipulation of virus propagation in a

screening system and bioreactor culture resulted in massive yield reduction by apoptosis induction.

Based on the comprehensive cytometric data and the according conclusions presented here, cell cycle progression and virus propagation could be described using stochastic and population balance modelling approaches.

Danksagung

Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die guten Forschungsbedingungen und die Anregungen bei der Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper und Dr. rer. nat. Holger Lübben danke ich dafür, dass sie trotz vieler anderer Verpflichtungen das Koreferat übernommen haben.

Frau Dr. rer. nat. habil. Yvonne Genzel danke ich für die Betreuung der Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. rer. nat. Timo Frensing möchte ich für seine Korrekturen der Arbeit und die guten Gespräche danken.

Besonders danken möchte ich Mareike Schulze, Dana Pupke und Georgios Agalaridis, deren Diplom-, Studien- bzw. Bachelorarbeit ich betreut habe. Die durch ihren großen Einsatz entstandenen Ergebnisse sind ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei den TAs der Gruppe Bioprozesstechnik, Claudia Best, Nancy Wynserski, Ilona Behrendt, Susanne König und Felicitas Hasewinkel bedanken, die immer eine helfende Hand frei hatten. Danke auch für das sehr gute Arbeitsklima im Labor.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Doktoranden, die mit mir auf den verschlungen Pfaden zur Promotion unterwegs waren, ganz besonders Andreas Bock, Bernd Kalbfuß-Zimmermann, Joachim Ritter, Christian Riedele, Diana Vester, Sascha Rollié, Christian Kessler, Felix Czaplá, Boris Hundt, Verena Lohr und Jana Schwarzer. Danke für die fachlichen Diskussionen, die Scherze, den Sarkasmus und die schönen Feierabende. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mit Euch zusammen war es trotz aller Höhen und Tiefen eine schöne Zeit.

Carola möchte ich für Ihre Geduld und Unterstützung danken.

Mein besonders großer Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation der Arbeit	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Das Influenza-Virus	4
2.2	Die Produktion von Influenza-Impfstoffen	8
2.2.1	Herstellung in Hühnereiern	9
2.2.2	Herstellung in Zellkulturen	9
2.2.3	Modellprozesse zur Influenza-Virusproduktion in Zellkulturen	10
2.3	Kultivierung von Säugetierzellen	12
2.3.1	Madin-Darby Hunde-Nierenzellen (MDCK)	12
2.3.2	Vero-Zellen	13
2.3.3	Zellwachstum und Produktbildung	14
2.3.4	Der Zellzyklus	17
2.3.5	Die Kultivierung adhärenter Zelllinien	22
2.3.6	Der Stoffwechsel von Zellkulturen	24
2.4	Durchfluscytometrie	26
2.4.1	Grundlagen der Durchfluscytometrie	27
2.4.2	Fluoreszenzkalibration und -quantifizierung	30
2.4.3	Kriterien für die Probenvorbereitung	31
2.5	Apoptose	32
2.5.1	Bedeutung der Apoptose in Physiologie, Pathologie und Biotechnologie	33
2.5.2	Induktion und Verlauf der Apoptose	34
2.6	Influenza-Virusinfektion und Apoptose	37
2.7	Die Quantifizierung der Influenza-Virusinfektion	40
2.8	Abschätzung der Anzahl von Virusproteinen pro Zelle	42

3	Material und Methoden	46
3.1	Verwendete Lösungen für Zellkultur und Analytik	46
3.2	Zellkulturführung	47
3.3	Influenza-Virusinfektion und Scheininfektion	48
3.4	Bioreaktorkultivierungen	50
3.5	Probennahme für die Durchflusscytometrie	52
3.6	Analytische Methoden	53
3.6.1	Bestimmung der Zellkonzentration und -vitalität	53
3.6.2	Hämagglutinationstest	55
3.6.3	Immunotitration infektiöser Influenza-Viren	56
3.6.4	Metabolitquantifizierung	56
3.6.5	Fluoreszenzspektrophotometrie	57
3.7	Durchflusscytometrische Methoden	58
3.7.1	Überprüfung der cytometrischen Messpräzision mit Mikropartikeln	58
3.7.2	Fluoreszenzkalibration von cytometrischen Fluoreszein-Messungen	58
3.7.3	DNA-Gehaltsbestimmung zur Analyse von Zellzyklus und Apoptose	59
3.7.4	Apoptose-Quantifizierung über Pancaspase-Aktivität (FLICA-Assay)	62
3.7.5	Apoptose-Quantifizierung über DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay)	64
3.7.6	Influenza-Infektionsdetektion in Zellen durch Antikörperfärbung	66
4	Ergebnisse und Diskussion	68
4.1	Zellzyklus von MDCK-Zellen	68
4.1.1	Zellzyklus adhärenter MDCK-Zellen in Microcarrierkultur	68
4.1.2	Einfluss des Zellzykluszustandes auf die Virusausbeute	71
4.1.3	Kapitelzusammenfassung und –diskussion	73
4.2	Durchflusscytometrische Infektionsquantifizierung	75
4.2.1	Durchflusscytometrische Fluoreszenzquantifizierung	75
4.2.2	Gemisch aus monoklonalen anti-NP- und anti-M1-Antikörpern	77

4.2.3	Bestimmung des Infektionsgrades mittels Einzelantikörpern und Antikörpergemisch	81
4.2.4	Abschätzung der Nukleoprotein-Kopienzahl pro Zelle aus Fluoreszenzfärbungen mit anti-NP-Antikörpern	83
4.2.5	Kapitelzusammenfassung und -diskussion	87
4.3	Auswahl der Methoden zur Apoptosequantifizierung	90
4.4	Infektion und Apoptose im Bioreaktor	94
4.4.1	Scheininfection von MDCK-Zellen	94
4.4.2	Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC) (Modellprozess)	99
4.4.3	Infektion mit Influenza A-Virus PR/8/34 H1N1 (RKI)	110
4.4.4	Infektion mit Influenza A-Virus WSN/67/05 hgr H3N2	112
4.4.5	Infektion von Vero-Zellen mit Influenza A-Virus WSN/67/05 hgr H3N2	114
4.4.6	Kapitelzusammenfassung und -diskussion	116
4.5	Chemische Manipulation von MDCK-Zellen während der Infektion	126
4.5.1	Apoptose-Induktoren	127
4.5.2	Apoptose-Inhibitoren	128
4.5.3	Manipulation in Sechs-Well-Platten	129
4.5.4	Manipulation im 1,2 L-Bioreaktor	133
4.5.5	Kapitelzusammenfassung und -diskussion	135
5	Zusammenfassung	142
6	Ausblick	146
7	Verzeichnisse	147
7.1	Abbildungsverzeichnis	147
7.2	Tabellenverzeichnis	151
7.3	Literaturverzeichnis	152

8	Anhang	179
8.1	Geräte	179
8.2	Chemikalien	181
8.3	Methoden mit bestehender Arbeitsanweisung	182
8.3.1	Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium	182
8.3.2	Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen Teillösungen	183
8.3.3	Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium	184
8.3.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Lebendzellzahl (Vitalität) in einer trypsinierten Kultur	187
8.3.5	Zellzahlbestimmung	189
8.3.6	Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR	191
8.3.7	Hämagglutinationstest	194
8.3.8	Hämagglutinationstest mit erhöhter Präzision	196
8.3.9	Bestimmung des TCID ₅₀	204
8.4	Übersicht der Bioreaktorkultivierungen	208
8.5	Liste der Veröffentlichungen	209
8.6	Lebenslauf	212

Lateinische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
a	Fluoreszenzausbeute (I/c bzw. $I/n \cdot p$)	A.U./(mol/mL), A.U./(mol/Partikel)
b	Hintergrundsignal, Leerwert	A.U.
c	Stoffkonzentration	mol/mL
c_{IVP}	Konzentration infektiöser Viruspartikel	1/mL
c_{RBC}	Erythrozytenkonzentration	1/mL
c_{VP}	Gesamtviruskonzentration	1/mL
d_m	mittlerer Durchmesser	μm
F	Stoffmenge Fluorochrom	mol
HA	Gesamtvirustiter	log HAU/100 μL
I	Fluoreszenzintensität	A.U.
K	Monod-Geschwindigkeitskonstante	mmol/mL
k_{iapo}	spezifische Absterberate von infizierten Zellen durch Apoptose	1/h
N	Anzahl (Zellen bzw. Partikel)	-
n_{AK}	spezifisch detektierte Antigendichte pro Zelle	1/Partikel
n'_{AK}	partikelbezogene Teilchendichte	1/Partikel
P	Stoffmenge Protein	mol
r_p	Produktbildungsrate	mmol/Tag, Viren/Tag
S	Substratkonzentration	mmol/mL
t	Zeit	h
V	Volumen	mL
X	volumenbezogene Zellkonzentration	1/mL
X_A	flächenbezogene Zellkonzentration	1/cm ²
X_{FC}	Zellkonzentration einer cytometrischen Subpopulation	1/mL
$Y_{P/X}$	biomassespezifischer Produktausbeutefaktor	-
$Y_{VP/X}$	spezifische Virusausbeute	Viren/Zelle

Griechische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
α	wachstumsabhängiger Produktbildungskoeffizient	-
β	zellkonzentrationsabhängiger Produktbildungskoeffizient	-
μ	spezifische Wachstumsrate	1/Tag
μ_{vd}	spezifische Produktionsrate für nicht-infektiöse Viruspartikel	1/h
μ_{vi}	spezifische Produktionsrate für infektiöse Viruspartikel	1/h
τ_1	Zeit zwischen Zellinfektion und Apoptoseinduktion	h

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK	Antikörper
AU	arbiträre Einheit (arbitrary unit)
AI	Apoptose-Index
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
APAF	apoptotic protease activating factor
BEA	2-Bromethylamin-Hydrobromid
CAD	Caspase-aktivierte DNase
DD	Todesdomäne (death domain)
DoE	Experimentelles Design
CHO	Hamster-Nierenzellen (Chinese hamster ovary)
DISC	death-inducing signalling complex (Apoptose-induzierender Komplex)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EMA	European Medicines Agency
EtOH	Ethanol
FAK	fokale Adhäsionskinase
FALS	forward-angle light scatter (Signal der Lichtbrechung um 0,5°)
FC	Durchflusscytometrie (flow cytometry)
FCS	fötales Kälberserum (foetal calf serum)
FDA	US Food and Drug Administration
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLICA	Fluoreszenz-markierte Caspase-Inhibitoren
fmk	Fluoromethylketon
FSC	forward scatter (Signal der Lichtbrechung um 0,5°)
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HA	Hämagglutinin
HAU	Hämagglutinin-Units
hgr	high growth reassortant
Lac	Laktat
LMD	List Mode-Datei
M	Matrixprotein
mAK	monoklonaler Antikörper
MDCK	Madin Darby Hundenierenzellen (Madin-Darby canine kidney)
MEFL	Molekülanzahl der äquivalenten Menge von gelöstem Fluoreszein
MeOH	Methanol

Abkürzung	Bedeutung
MESF	Molekülanzahl der äquivalenten Menge des gelösten Farbstoffs
MOI	Infektionsverhältnis (multiplicity of infection)
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control, GB
NIST	National Institute of Standards and Technology, USA
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
P	Protein, Produkt
PARP	Polyadenylribose-Polymerase
PAT	Process Analytical Technology Initiative
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photonenfalle (photomultiplier tube)
p.i.	nach Infektion bzw. Scheininfektion (post infectionem)
PI	Propidiumiodid
PR	Puerto Rico
NA	Neuraminidase
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RSD	relative Standardabweichung (relative standard deviation)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SSC	side scatter (Signal der Lichtbrechung um 90°)
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TMR	Tetramethylrhodamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labelling
v	viral
VK	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)
VP	Viruspartikel
vRNP	viralen Ribonukleoprotein-Komplex
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WSN	Wisconsin

1 Einleitung und Motivation der Arbeit

Eine Vielzahl der biotechnologisch produzierten Arzneimittel wird in Säugetier-Zellkulturen hergestellt. Säugetier-Zellkulturen werden dabei im Wesentlichen für die Produktion von rekombinanten Proteinen, Antikörpern und Impfstoffen eingesetzt.

Für die Prozessentwicklung gibt es in der Bioprozesstechnik unterschiedliche Ansätze, die historisch aufeinander folgten. Zunächst wurden verfahrenstechnische Parameter für die Kultivierung von Zellen optimiert. Daneben zeichnete sich die Eignung spezieller Zelllinien zur Produktion von rekombinanten Proteinen und monoklonalen Antikörpern ab (Chu und Robinson 2001; Petriccioni 1999). Später wurden die Kulturbedingungen durch die Optimierung der Kulturmedien verbessert, mit dem Ziel, maximale Produktausbeuten in chemisch definierten Medien ohne Zusatzstoffe tierischen Ursprungs zu erreichen (Bjare 1992; Higuchi 1973; Merten und Litwin 1991). Darauffolgend wurde die Molekular- und Zellbiologie von Säugetierzellen in der Protein- und Antikörperproduktion untersucht (Nielsen 1998; Simonsen und McGrogan 1994). Die gewonnenen Erkenntnisse bildeten die Voraussetzung für die genetische Veränderung der Zelllinien, was zu einer enormen Steigerung der Produktivität führte (Betenbaugh und Dhurjati 1990; Geisse und Fux 2009). Richtungsweisend waren dabei unter anderem Arbeiten zur Apoptoseinhibition (Arden und Betenbaugh 2004; Figueroa et al. 2005), z.B. durch Überexpression von Bcl-2 in CHO-Zellen (Al-Rubeai und Singh 1998; Mastrangelo und Betenbaugh 1998).

Zur Analyse der Molekular- und Zellbiologie von kultivierten Zellen wird häufig die Durchflusscytometrie eingesetzt. Diese in der medizinischen Diagnostik und Grundlagenforschung etablierte Methode wurde beispielsweise zur Analyse des Zellzyklus und der Apoptose in biotechnologischen Produktionsprozessen verwendet (Lloyd et al. 2000; Singh und Al-Rubeai 1998). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden sowohl zur Verbesserung der Kultivierungsbedingungen als auch zur Identifizierung von Targets für die genetische Manipulation der Zelllinien umgesetzt. Mittels Durchflusscytometrie von Zellsuspensionen können zehntausende von Zellen in einer Probe statistisch sicher mit hochaufgelösten Fluoreszenz- und Lichtbrechungsmessungen analysiert werden (Shapiro 2003). Dabei können durch Multiparameter-Analyse mehrere fluoreszenzmarkierte Targets parallel erfasst und so korreliert werden. Neben der Anwendung in der Grundlagenforschung und der Prozessentwicklung kann die Durchflusscytometrie auch zur Überwachung von Produktionsprozessen in Säugetier-Zellkulturen genutzt werden (Rieseberg et al. 2001). Im Rahmen der Process

Analytical Technology-Initiative (PAT) der US Food and Drug Administration (FDA) wird der Einsatz neuer Analytikmethoden zur Inprozesskontrolle während der Arzneimittelherstellung (insbesondere Biologika) forciert (United States Department of Health and Human Services 2004).

Impfstoffe stellen historisch gesehen die älteste Anwendung von tierischen Zellkulturen in der pharmazeutischen Produktion dar, die in den letzten Jahren eine Renaissance erlebt (Frazzatti-Gallina et al. 2004; Montagnon 1989; van Wezel 1967). Eine besondere Rolle spielt dabei zum Beispiel der Wechsel der Influenza-Impfstoffproduktion von Hühnereiern zu Zellkulturen als Wirtssystem (Bardiya und Bae 2005; Tree et al. 2001). Hühnereier sind ein preisgünstiges Produktionssystem, welches jedoch verschiedene Nachteile besitzt. Daher wird intensiv an der Entwicklung von Zellkultur-basierten Impfstoffen gearbeitet. Verschiedene Zelllinien haben sich dabei als für die Produktion geeignet erwiesen (Genzel und Reichl 2009). Basierend auf den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ändert sich entsprechend der antizipierten Prävalenz der Influenza-Virusstämme die empfohlene Zusammensetzung der typischerweise trivalenten Impfstoffe. Da sich Influenza-Virusstämme gravierend in ihren Eigenschaften unterscheiden können, müssen die Produktionsprozesse entsprechend adaptiert werden, um die maximale Produktivität zu erreichen. Aktueller Stand der Technik sind dabei die empirische Reassortierung von Saatviren und die Optimierung kritischer Parameter mittels Experimentellem Design (DoE).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle die grundlegenden zellbiologischen Mechanismen Zellzyklus und Apoptose bei der Influenza-Virusproduktion in Zellkulturen spielen. Eine umfassende Analyse dieser Merkmale in biotechnologischen Prozessen, wie z.B. von Singh und Al-Rubeai für die Produktion von rekombinanten Proteinen und monoklonalen Antikörpern gezeigt (Singh und Al-Rubeai 1998), wurde für die Produktion von Influenza-Viren in Zellkulturen bisher nicht durchgeführt. Speziell die Bedeutung der Apoptose in diesem Zusammenhang ist noch unbekannt. Die Induktion der Apoptose während der Influenza-Virusinfektion ist aus virologischen Publikationen bekannt (Fesq et al. 1994; Hinshaw et al. 1994; Takizawa et al. 1993). In virologischen Veröffentlichungen finden sich für einzelne an der Apoptose beteiligte Zell- und Virusbestandteile sowohl provirale als auch antivirale Funktionen (Ludwig et al. 1999; Wurzer et al. 2004). Eine zusammenfassende Betrachtung der Auswirkung der Apoptose auf

die Virusproduktion in Zellkulturen zur Impfstoffgewinnung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im Gegensatz zu publizierten Arbeiten der virologischen Grundlagenforschung sollten in der vorliegenden Arbeit auch dynamische Verläufe und Modellprozesse für die industrielle Produktion betrachtet werden. Als Modellprozess diente dabei die Kultivierung von adhärennten MDCK-Zellen auf Cytodex 1-Microcarriern in Rührkesselreaktoren. Als Voraussetzung für die Untersuchung der Zellmerkmale Infektion, Apoptose und Zellzyklusverteilung war es erforderlich, durchflusscytometrische Analytikmethoden zu etablieren. Die Durchflusscytometrie eignet sich sehr gut zur Identifizierung von eigenschaftsverteilter Subpopulationen. Neben der Unterscheidung von vitalen und apoptotischen Zellen sollte auch untersucht werden, wie sich unterschiedliche Infektionsbedingungen auf die Ausbreitung der Infektion in der Zellkultur auswirken. Dazu war es notwendig, die Infektion in den kultivierten Zellen zu quantifizieren. Darüber hinaus sollte das Fortschreiten der Infektion in infizierten Zellen über die Akkumulation von Virusbestandteilen charakterisiert werden.

Anhand der zu etablierenden Methoden sollte eine differenzierte Analyse der dynamischen Veränderungen der untersuchten Zellmerkmale erfolgen. Ziel dieser Analysen war es, die zellphysiologischen Einflüsse auf die Virusvermehrung zu charakterisieren. Ausgehend von der detaillierten Charakterisierung sollten ausbeutekritische Einflussgrößen identifiziert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Bioprozesstechnik Anwendung finden.

Zusammenfassend lässt sich das Ziel der Arbeit mit dem Leitbild der Max Planck-Gesellschaft beschreiben: „Dem Anwenden muß das Erkennen vorausgehen.“ (Max Planck, 1919).

2 Theoretische Grundlagen

Zur Erläuterung und als Diskussionsgrundlage sind nachfolgend die Bedeutung von Influenza-Impfstoffen, die Funktionen und Wechselwirkungen der untersuchten biologischen Systeme (Influenza-Virus und Wirtszelle) sowie das Prinzip der für die Analytik verwendeten Durchfluscytometrie ausführlich beschrieben.

2.1 Das Influenza-Virus

Das Influenza-Virus ist der Erreger der sogenannten echten Grippe oder Virusgrippe. Folge der Infektion mit dem Influenza-Virus ist beim Menschen zunächst eine schwere Infektion der oberen Atemwege, die im späteren Verlauf den gesamten Organismus betreffen kann. Häufig kommt es aufgrund der Zerstörung mucosiliarer Funktionen infolge einer Influenza-Infektion zu bakteriellen Sekundärinfektionen (Schwarzmann et al. 1971). Jährlich erkranken weltweit etwa 500 Millionen Menschen an einer Influenza-Virusinfektion (WHO 2003). Insbesondere bei älteren oder geschwächten Menschen und Kindern verursacht die Infektion häufig stärkere Symptome und kann tödlich verlaufen (Ghendon 1992; Kuiken und Taubenberger 2008; Monto 2008; Pschyrembel und Hildebrandt 1998). Durch krankheitsbedingte Ausfälle wird jährlich ein großer wirtschaftlicher Schaden verursacht (Ghendon 1992; Keech und Beardsworth 2008). Influenza-Virusinfektionen treten in der Regel jährlich in den gemäßigten Klimazonen mit saisonaler Ausprägung auf (Krug 1989). In der Vergangenheit kam es im Abstand von etwa 12 bis 24 Jahren zu Influenza-Pandemien, bei denen die Ausbreitung der Influenza-Virusinfektion kontinentübergreifend erfolgte. Zuletzt war dies in den Jahren 1918/19, 1957 und 1968 der Fall (Modrow et al. 2002). Nach zunächst lokaler Ausbreitung wurde 2009 die Influenza H1N1-Virusinfektion („Nordamerikanische Grippe“) von der WHO als Pandemie eingestuft. Die epidemiologische Überwachung und öffentliche Information erfolgt auf nationaler Ebene durch das Robert-Koch-Institut (RKI 2009), auf europäischer Ebene durch das European Center for Disease Prevention and Control (ECDC 2009) und international durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO 2009).

Das Influenza-Virus gehört zu den *Orthomyxoviridae* und besitzt ein RNA-Genom. Es wird anhand des Matrixproteins in die Typen A, B und C unterteilt (Cheung und Poon 2007; Krug 1989; Pschyrembel und Hildebrandt 1998). Die Influenza-Virustypen B und C führen bei

infizierten Menschen zu weniger gravierenden Symptomen als Influenza-A-Viren (Modrow et al. 2002). Das Influenza-A-Virus wird anhand der Oberflächenproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) serologisch in Subtypen klassifiziert. Die antigenen Eigenschaften der verschiedenen Virus-Subtypen ändern sich. Ursache dafür sind zwei unterschiedliche Mechanismen: antigenic drift und antigenic shift (Bouvier und Palese 2008). Dabei zeichnet sich der antigenic drift durch die kleinschrittige Veränderung als Folge von Punktmutationen im Virusgenom aus. Im Gegensatz dazu ist der antigenic shift durch den Austausch von Genomanteilen verschiedener Influenza-Virusstämme während gleichzeitiger Infektion eines Wirtes gekennzeichnet. Die daraus hervorgehenden Virusstämme (Reassortanten) sind häufig Auslöser von Pandemien (Fislova und Kostolansky 2005; Scholtissek 1994). Durch phylogenetische Analyse des Influenza-Virus vom Subtyp H1N1, Erreger der Nordamerikanischen Grippe, konnten Gensequenzen sowohl von humanen und aviären Influenza-Viren als auch von eurasischen und nordamerikanischen Schweineinfluenza-Virusstämmen nachgewiesen werden (Ding et al. 2009; Smith et al. 2009). Der pandemische Influenza-Virusstamm ist folglich durch mehrere Reassortierungen entstanden.

Reassortierungen werden auch dazu genutzt, um für die Impfstoffherstellung Saatviren zu produzieren, die hohe Virusausbeuten liefern (high growth reassortants). Dazu werden die Wildtypviren aus Patientenisolaten in Zellkulturen mehrfach hintereinander mit einem guten Produktionsstamm gekreuzt. Ziel ist es dabei, mit Ausnahme der Sequenzen für Hämagglutinin und Neuraminidase sämtliche Gensequenzen des Wildtyps durch Sequenzen des Produktionsstammes (Backbone) auszutauschen. In der Regel handelt es sich bei dem Produktionsstamm um Influenza A Puerto Rico/8/34 H1N1 (Wood und Robertson 2007).

Die Struktur und der Replikationszyklus des Influenza-Virus wurden intensiv untersucht und sind umfassend beschrieben (Bouvier und Palese 2008; Cheung und Poon 2007; Clancy 2008; Krug 1989; Lamb und Krug 2001; Nayak et al. 2004; Nicholson et al. 2003), daher wird an dieser Stelle nur kurz darauf eingegangen. Eine eingehende Beschreibung der biochemischen Wechselwirkung des Influenza-Virus mit der infizierten Wirtszelle erfolgt in Kapitel 2.6.

Das Influenza-Virus ist mit einer Lipidmembran umhüllt, aus der die Membranproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) als Spikes herausragen (Abbildung 2-1). Eine Untereinheit des HA-Proteins (HA₁) dient zur Adsorption der Viruspartikel an Rezeptoren auf Wirtszellen, während die zweite Untereinheit (HA₂) die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran vermittelt. Die Neuraminidase des Influenza-Virus spaltet nach Infektion

die endständigen Neuraminsäuren von den neuraminsäurehaltigen Glykosiden der Wirtszelloberfläche und ermöglicht dadurch die Freisetzung der Viruspartikel.

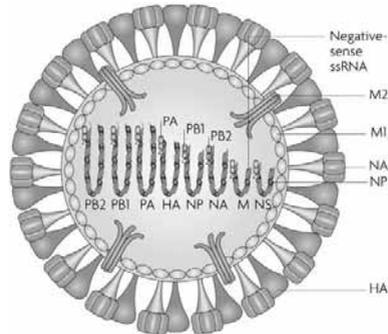


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Influenza A-Virus (Horimoto und Kawaoka 2005, modifiziert)

Dargestellt sind die Virusproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), die Matrixproteine M1 und M2, die Polymerasen PB1, PB2 und PA sowie das Nichtstrukturprotein (NS). Die negativ orientierte Einzelstrang-RNA-Moleküle (Negative-sense ssRNA) sind der Größe nach sortiert und mit den codierten Proteinen bezeichnet.

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Bindung von Influenza-Viruspartikeln an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und der anschließenden Endocytose der Partikel (Abbildung 2-2). In den Endosomen löst sich das virale Capsid auf, die Virusmembran verschmilzt mit der Membran der Endosomen und die virale RNA (vRNA) wird ins Cytoplasma freigesetzt. Die Nukleoprotein-assoziierte vRNA wird zusammen mit den viralen Polymerasen in den Zellkern transferiert und dort zu viraler mRNA transkribiert. Diese wird im Cytoplasma zur Bildung von viralen Proteinen translatiert. Die viralen Proteine Nukleoprotein (NP), Matrixprotein 1 und 2 (M1 und M2), die viralen Polymerasen sowie die Nichtstruktur-Proteine (NS1 und NS2) akkumulieren dabei im Cytoplasma. Im Gegensatz dazu werden die Membranproteine HA, NA und Matrixprotein 2 (M2) in das Endoplasmatische Retikulum translatiert und über Golgi-Vesikel zur Zellmembran transportiert. Dort lagern sie sich in die Membran ein. Die Nukleoproteine und Polymerasen werden in den Nukleus importiert und bilden mit den dort gebildeten Kopien der vRNA die Ribonukleoprotein-Komplexe (vRNP), die anschließend exportiert werden. Im Cytoplasma bilden die vRNPs Komplexe mit M1-Molekülen und werden mit den membranassoziierten Proteinen zu neuen Viruspartikeln verpackt, die sich durch Knospung von der Wirtszelle lösen (Abbildung 2-2). Während der Influenza-Virusreplikation werden sowohl infektiöse als

2.2 Die Produktion von Influenza-Impfstoffen

Ziel der Verwendung von Influenza-Impfstoffen ist die Immunisierung von Menschen, aber auch von Nutztieren, um diese vor einer Influenza-Infektion zu schützen. Zusätzlich zum individualmedizinischen Aspekt soll durch eine möglichst hohe Impfquote in der Population die Ausbreitung von Influenza-Infektionen eingedämmt werden. In diesem Kontext wird in einigen Staaten sogar eine Impfpflicht diskutiert (Tilburt et al. 2008). Neben den Risikogruppen ist auch die Immunisierung von Personen, die im Gesundheitswesen tätig sind empfohlen, um sowohl das Risiko der Verbreitung der Infektion in ihrem Umfeld zu verringern als auch im Fall von Epidemien und Pandemien die Stabilität der medizinischen Versorgung zu sichern (Ghendon 1992). Neben der Verwendung von Impfstoffen zur Prävention von saisonalen Influenza-Epidemien werden sie auch zunehmend zum Schutz vor potentiellen Pandemien eingesetzt, wobei sich die Impfstoffe in ihrer Zusammensetzung unterscheiden.

Pandemische und präpandemische Impfstoffe enthalten in der Regel Antigene (Hämagglutinin und Neuraminidase) von einem oder mehreren Influenza-Virusstämmen, die von der WHO als mögliche Pandemie-Auslöser identifiziert wurden (Eichelberger et al. 2008; WHO 2005). Aktuell handelt es sich dabei um aviäre Influenza-Virusstämme des Subtyps H5N1 (Chutinimitkul et al. 2006) und humane Influenza-Virusstämme des Subtyps H1N1, der sogenannten Nordamerikanischen Grippe, die ihren Ursprung in Schweinen hat (Shinde et al. 2009; Trifonov et al. 2009). Präpandemische Impfstoffe enthalten die Oberflächenantigene eines oder mehrerer antizipierter pandemischer Virusstämme. Um die Chancen der Wirksamkeit gegen tatsächliche Pandemie-Virusstämme zu verbessern, wird an heterosubtypischen Impfstoffen geforscht (Roose et al. 2009). Dabei können beispielsweise neben den Oberflächenantigenen Hämagglutinin und Neuraminidase auch konservierte Antigene wie das Nukleoprotein oder das Matrixprotein 2 eingesetzt werden, die Immunität gegen verschiedene Virussubtypen vermitteln können.

Saisonale Influenza-Impfstoffe setzen sich in der Regel aus den Antigenen von drei Influenza-Subtypen (jeweils HA und NA von zwei Influenza A-Stämmen und einem Influenza B-Stamm) zusammen. Die Hersteller folgen dabei den Vorgaben der für die Arzneimittelherstellung zuständigen Behörden des Bestimmungslandes (USA: Food and Drug Administration (FDA), Europäische Union: European Medicines Agency (EMA), Deutschland: EMA und Paul-Ehrlich-Institut (PEI)). Grundlage der Vorgaben sind die von der WHO empfohlenen Virusstämme. Entsprechend den jahreszeitlichen Unterschieden und

den epidemiologischen Folgen für die Ausbreitung von Influenza-Viren werden für die nördliche und südliche Hemisphäre getrennte Empfehlungen gemacht (WHO 2008).

2.2.1 Herstellung in Hühnereiern

Seit über 50 Jahren werden Influenza-Impfstoffe in Hühnereiern produziert. Dabei werden befruchtete Hühnereier mit infektiösem Saatvirus infiziert. Während der Virusernte wird die Allantoisflüssigkeit der Eier mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Virusfraktion gewonnen (Bardiya und Bae 2005; Tree et al. 2001). Im Fall einer aviären Influenza-Pandemie stellt diese Art der Impfstoffherstellung ein erhebliches Risiko für die Impfstoffversorgung dar (Cox 2007). Aufgrund der Pathogenität des Virus sind die Produktausbeuten in Hühnereiern häufig sehr gering (Takada et al. 1999). Die für die Bereitstellung der Eier erforderlichen Hühnerbestände sind direkt von der Infektion mit aviärer Influenza bedroht, zusätzlich beinhalten die zu ergreifenden Maßnahmen zur Pandemieeindämmung bei aviärer Influenza das Keulen von Nutzgeflügelbeständen sowie Transportverbote für Geflügel und Geflügelprodukte.

Ein weiterer Nachteil der Produktion in Hühnereiern ist die lange Vorlaufzeit bis zur Verfügbarkeit der Eier. Dadurch ist die Flexibilität in Bezug auf die Verringerung oder Erhöhung der Produktion gering (Schmitt et al. 2010). Für Personen mit Hühnereiweiß-Allergie sind in Eiern produzierte Influenza-Impfstoffe nicht geeignet. Aufgrund der jahrzehntelangen Erfahrung mit der Produktion mit Hühnereiern sind die Prozesse stark optimiert und sehr robust. Außerdem sind die Herstellungskosten von eibasierten Influenza-Impfstoffen relativ gering.

2.2.2 Herstellung in Zellkulturen

Eine Alternative für die Impfstoffproduktion in Hühnereiern ist die Virusvermehrung in Zellkulturen. Dazu können Influenzavirus-permissive Zellkulturen genutzt werden, die im großen Maßstab expandiert werden können. Von der WHO wurden mehrere Zelllinien als Substrate für die Influenza-Virusreplikation zur Impfstoffherstellung identifiziert (Patriarca 2007; WHO 1995). Dazu zählen im Wesentlichen Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze (Vero, Govorkova 1996; Kistner et al. 1998), Nierenepithelzellen des Cocker Spaniels (Madin-Darby canine kidney (MDCK), Brands et al. 1999; Voeten et al. 1999) und humane embryonale Retinazellen (PER.C6, Pau et al. 2001). Insbesondere Vero- und MDCK-Zellen

wurden mehrfach miteinander verglichen, wobei für MDCK-Zellen höhere Virusausbeuten nachgewiesen wurden (Audsley 2005; Govorkova et al. 1999; Merten et al. 1996; Youil et al. 2004). Neben den von der WHO identifizierten Zelllinien gibt es auch weitere, die momentan noch nicht für die Produktion von Humanimpfstoffen zugelassen sind: embryonale Enten-Retinazellen (AGE1.CR, Lohr et al. 2009; Sandig und Jordan 2005), Lungenepithelzellen vom Schwein (SJPL, Seo et al. 2001), sowie pflanzliche (Chichester et al. 2009; Shoji et al. 2008) und virale Expressionssysteme (Kreijtz et al. 2007; Rimmelzwaan und Sutter 2009).

In vergleichenden Untersuchungen von Zellkultur-basierten mit Ei-basierten Influenza-Impfstoffen wurde für Zellkultur-basierte Impfstoffe eine vergleichbare oder sogar bessere immunologische Verträglichkeit und Wirksamkeit beschrieben (Brühl et al. 2000; Doroshenko und Halperin 2009; Govorkova et al. 1999; Mabrouk und Ellis 2002; Palache et al. 1997). Die Verwendung von Vero-Zellen zur Produktion von inaktiviertem Komplettvirus-Impfstoff führte in klinischen Studien jedoch zu vereinzelt Fällen von erhöhtem Fieber und wurde lediglich für die Produktion von pandemischen Impfstoffen zugelassen (Patriarca 2007). Neben Zellkultur-basierten Impfstoffen mit Antigenen von inaktivierten Influenza-Viren, die intramuskulär verabreicht werden, gibt es auch Ansätze zur Verwendung von Nasensprays, die attenuierte Viren enthalten (Belshe et al. 2004).

2.2.3 Modellprozesse zur Influenza-Virusproduktion in Zellkulturen

Im Rahmen von virologischen und zellbiologischen Arbeiten werden in der Regel statische Zellkultursysteme wie Zellkulturschalen, Multiwell-Platten oder T-Flaschen mit geringen Kulturvolumina bzw. Wachstumsflächen von wenigen Quadratzentimetern eingesetzt. Ein Vorteil dieser Systeme liegt in der leichten Durchführung von parallelen Ansätzen und der einfachen Handhabung. Für die Beprobung zu wenigen diskreten Zeitpunkten und für Analysemethoden mit geringem Materialbedarf sind die Systeme gut geeignet. Werden jedoch zu häufigen Zeitpunkten Methoden mit hohem Materialbedarf eingesetzt, sind Kultursysteme im Klein- und Kleinstmaßstab ungeeignet. Außerdem kann im Rahmen von Zeitreihenversuchen die Variabilität zwischen verschiedenen parallelen Ansätzen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgebrochen und beprobt werden, zu zusätzlich erhöhter Variabilität der Ergebnisse führen.

Für die Verfolgung von Messgrößen über einen längeren Zeitraum sind Kultursysteme, die die Beprobung derselben Kultur zu häufigen Zeitpunkten ohne Beeinflussung des Kulturverhaltens ermöglichen, ideal. Insbesondere im Hinblick auf den hohen

Probenmaterialbedarf der zellbasierten Durchfluscytometrie sind daher für Zeitreihenversuche mit adhärennten Zellen in der Regel Bioreaktor-Kultivierungen statischen Kultursystemen vorzuziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zellphysiologische Aspekte bei der Zellexpansion und Influenza-Virusproduktion überwiegend anhand von Modellsystemen im Labormaßstab beschrieben.

Im Hinblick auf den Zielsetzungsaspekt der Arbeit, die Zellphysiologie während der Gewinnung von Influenza-Viren bei der Impfstoffproduktion zu untersuchen, stellen die eingesetzten Rührkessel-Bioreaktoren näherungsweise ein Scale-down-Modell für den industriellen Produktionsmaßstab dar. In den eingesetzten 1,2 L- und 5,0 L-Bioreaktorkultivierungen sind die Versuchsbedingungen wesentlich besser an die Bedingungen im Bezugssystem angepasst als dies bei statischen Kleinsystemen der Fall ist. Eine Ausnahme davon stellen Rollerflaschen dar. In der industriellen Produktion wird hier in der Regel eine Maßstabsvergrößerung lediglich durch die Vergrößerung der Flaschenanzahl und nicht durch die Vergrößerung der Flaschen selbst erreicht. Bei Rollerflaschen sind folglich Labor- und Produktionssystem identisch. Die Kultivierung von adhärennten Zellen in Rollerflaschen im industriellen Maßstab ist mit Nachteilen beim Handling und einem erhöhten Sterilitätsrisiko verbunden. Dadurch bedingt werden vermehrt Rührkessel-Bioreaktoren und Einweg-Reaktorsysteme zur Produktion eingesetzt (Chu und Robinson 2001).

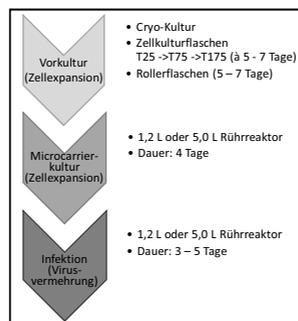


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Basisprozesses zur Kultivierung von MDCK-Zellen auf Microcarriern zur Virusproduktion (Upstream Processing)

Die durchgeführten Bioreaktorkultivierungen beruhen auf einem mehrphasigen Basisprozess (Abbildung 2-3, Genzel et al. 2004a; Nayak et al. 2005). Dabei wird eine enzymatisch

abgelöste MDCK-Zellkultur aus Roller- bzw. T-Zellkulturflaschen in einen Rührkesselreaktor mit Cytodex 1-Microcarriern in Serum-haltigem Zellkulturmedium inokuliert. Nach Abschluss der Zellexpansion wird das stark proteinhaltige Zellkulturmedium abgezogen und Medienreste durch Ausverdünnen mit Puffer entfernt. Anschließend wird die Zellkultur in Serum-freiem Virusproduktionsmedium mit Trypsin und infektiösem Saatvirus weiterkultiviert. Nach Abschluss der Virusvermehrungsphase kann die Klärung der Fermenterernte durch Filtration oder Zentrifugation erfolgen. Die geklärte Fermenterernte kann dann als Ausgangsmaterial für die Produktaufarbeitung verwendet werden (Kalbfuss et al. 2007b; Nayak et al. 2005).

Ausgehend von dem beschriebenen Basisprozess wird in der Fachgruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme und am Lehrstuhl Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg in folgenden Bereichen geforscht: Zellkultur-Fermentation (Genzel et al. 2006a; Genzel et al. 2005; Schulze-Horsel et al. 2009), Produktaufarbeitung (Kalbfuss et al. 2007a; Kalbfuss et al. 2007b; Opitz et al. 2007; Opitz et al. 2008), prozessbegleitende Analytik (Ritter et al. 2008; Schulze-Horsel et al. 2008; Schwarzer et al. 2009), Molekularbiologie (Seitz et al. 2010; Vester et al. 2010) und mathematische Prozessmodellierung (Bock et al. 2009; Möhler et al. 2008; Mueller et al. 2008; Sidorenko et al. 2008a; Wahl et al. 2008).

2.3 Kultivierung von Säugetierzellen

Im Folgenden werden die verwendeten Zelllinien charakterisiert. Außerdem werden die Voraussetzungen und der Verlauf des Wachstums von Säugetier-Zellkulturen im Allgemeinen erläutert.

2.3.1 Madin-Darby Hunde-Nierenzellen (MDCK)

MDCK-Zellen wurden erstmalig 1959 von Madin und Darby aus dem Nierenepithel eines Cocker Spaniels isoliert und als kontinuierliche Zelllinie vermehrt. Sie wachsen als adhärenente Monolayer mit epithelialer Morphologie (Rindler et al. 1979). Mikroskopische Aufnahmen von MDCK-Zellen sind in Abbildung 2-4 dargestellt. Die Zelllinie ist permissiv für die Infektion mit Influenza-Viren und eignet sich sehr gut für die Virusvermehrung in Zellkulturen (Gaush et al. 1966; Gaush und Smith 1968; Merten et al. 1996). MDCK-Zellen

werden sehr häufig als Modellsystem in der Virologie und der Nephrologie verwendet. Sie wurden von der WHO als Kandidat für die Influenza-Impfstoffproduktion in Zellkultur beschrieben (WHO 1995). In Studien zur Arzneimittelsicherheit konnten bei MDCK-basierten Grippeimpfstoffen keine erhöhten Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Daher gelten MDCK-Zellen als medizinisch unbedenkliches Substrat und werden von mehreren Impfstoffproduzenten als Produktionssystem für Influenza-Vakzine verwendet (Belshe et al. 2004; Brands et al. 1999; Doroshenko und Halperin 2009; Palache et al. 1997).

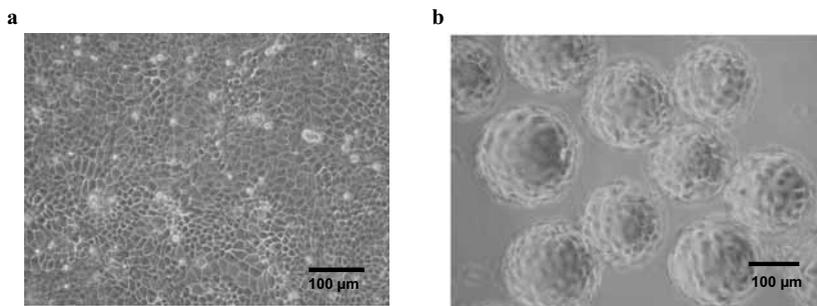


Abbildung 2-4: Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von adhärennten MDCK-Zellen
a: statische Zellkultur in einer T-Flasche (Wachstum auf Polystyrol-Oberfläche), **b:** Kultivierung auf Cytodex 1-Microcarriern (Wachstum auf Dextran-Oberfläche:).

2.3.2 Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden 1962 aus der Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze (African Green Monkey) isoliert und als kontinuierliche Zelllinie vermehrt (Ito et al. 1964). Vero-Zellen besitzen eine fibroblastenartige Morphologie und wachsen als adhärennte Monolayer (Hopps et al. 1963). Nach Erreichen der Konfluenz kann es auch zur Ausbildung von Multilayern kommen. Aufgrund ihrer Permissivität für verschiedene Viren werden Vero-Zellen zur industriellen Produktion von Impfstoffen gegen Tollwut (Frazzatti-Gallina et al. 2004; Yokomizo et al. 2004) und Poliomyelitis (Meignier 2001; Montagnon 1989; Montagnon et al. 1999) eingesetzt. Die Eignung von Vero-Zellen zur Vermehrung von Influenza-Viren zur Impfstoffproduktion wurde von Merten et al. 1996 und Kistner et al. 1998 beschrieben. Verwendet werden Vero-Zellen zur Produktion von präpandemischen (Howard et al. 2008) und pandemischen (Kistner et al. 2010) Influenza-Impfstoffen.

2.3.3 Zellwachstum und Produktbildung

Zellwachstum

Voraussetzung für die Nutzung von Zellkulturen zu Produktionszwecken ist die Proliferation, d.h. die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung. Im Kontext der Bioprozesstechnik werden für Proliferation auch synonym die Begriffe Zellexpansion und Zellwachstum verwendet. Wenn sich der Begriff Zellwachstum auf das Wachstum des Zellvolumens bezieht, ist dies nachfolgend entsprechend verdeutlicht. Ebenfalls synonym werden die Begriffe Wachstumsgeschwindigkeit und Wachstumsrate verwendet (siehe Schlee und Kleber 1991).

Das Zellwachstum wird vor allem beeinflusst durch die Wahl der optimalen Werte für pH, Temperatur, Sauerstoffversorgung und Nährmedienzusammensetzung. Bei dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Basisprozess handelt es sich um eine satzweise Kultivierung (Batch-Prozess). Satz-Kulturen von Suspensionszellen weisen in der Regel einen charakteristischen Verlauf der Wachstumsphasen auf, der in Abbildung 2-5 dargestellt ist. Bei adhärennten Zellen geht das Wachstum vom logarithmischen Wachstum über eine ausgeprägte Übergangsphase mit linearem Zellwachstum (Verzögerungsphase) in die stationäre Phase über (nicht dargestellt).

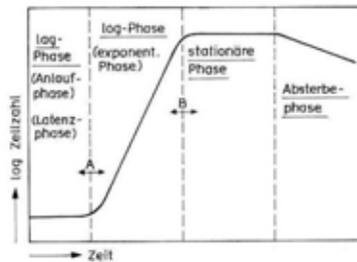


Abbildung 2-5: Verlauf der Wachstumsphasen einer Satzkultur von Suspensionszellen in halblogarithmischer Auftragung (Weide 1979)

A: Beschleunigungsphase, B: Verzögerungsphase

Die spezifische Wachstumsrate μ , mit der die Zellkonzentration X zunimmt, wird durch Gleichung (2-1) beschrieben.

Zu Beginn der Kultivierung findet die Adaptation der Zellen an die Prozessparameter statt (lag-Phase, $\mu=0$). Danach steigt die spezifische Wachstumsrate durch beginnende Zellteilung (Beschleunigungsphase, $\mu>0$). Die Dauer der lag-Phase ist abhängig vom Zellzykluszustand der Vorkultur (Kapitel 2.3.4) und den Unterschieden der Umweltbedingungen zwischen Vor-

und Satzkultur. Bei unlimitiertem Wachstum in der exponentiellen Phase erreicht die Wachstumsrate den Maximalwert ($\mu=\mu_{\max}$) und bleibt bis zum Erreichen der Verzögerungsphase konstant (Wachstumslimitierung). In der stationären Phase bleibt die Zellzahl relativ konstant, die Teilungsrate und die Absterbegeschwindigkeit k_d sind gleich groß ($\mu=k_d$). Während der Absterbephase nimmt die Zellzahl ab. Ursachen für die Wachstumslimitierung können Substratlimitierung, zu hohe Zelldichte (Kontakthinderung, Transportlimitierungen) oder die Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte sein. Basierend auf der Monod-Kinetik lässt sich der Einfluss der Konzentrationen von Substraten S und wachstumshemmenden Stoffwechselprodukten P auf die spezifische Wachstumsrate vereinfachend durch Gleichung (2-2) beschreiben (Wolf 1991).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2-1)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \quad (2-2)$$

mit:

μ	spezifische Wachstumsrate	[1/Tag]
K	Monod-Geschwindigkeitskonstante	[mmol/mL]
P	Konzentration inhibierender Stoffwechselprodukte	[mmol/mL]
S	Substratkonzentration	[mmol/mL]
t	Zeit	[Tage]
X	Zellkonzentration	[Zellen/mL]

Indices:

max	Maximalwert
P	Stoffwechselprodukt
S	Substrat

Alternativ zur Monod-Kinetik lässt sich das Wachstum erster Ordnung bezogen auf das limitierende Substrat auch mit einem logistischen Modell beschreiben. Dabei wird die maximal erreichbare Biomassekonzentration X_{\max} als Parameter verwendet. Die Substratkonzentration wird nicht berücksichtigt.

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (2-3)$$

mit:

μ	spezifische Wachstumsrate	[1/Tag]
X	Zellkonzentration	[Zellen/mL]

Index:

max	Maximalwert
-----	-------------

Gleichung (2-3) eignet sich besonders zur Beschreibung experimentell bestimmter Wachstumskurven, jedoch nicht zur Prognose von Wachstumsverläufen, da X_{\max} in der Regel keine universelle Konstante ist, sondern von vielen Faktoren abhängt. Für den in dieser Arbeit betrachteten Fall des adhärenen Zellwachstums mit der Wachstumsoberfläche als limitierendem Substrat für die maximale Zellkonzentration X_{\max} lässt sich diese experimentell bestimmen (Kapitel 4.1.1). Für vergleichbare Kultivierungsbedingungen wurde bei einer Microcarrierkonzentration von 2 g/L Cytodex 1 eine maximale MDCK-Zell-dichte von etwa $1,8 \times 10^6$ Zellen/mL beschrieben (Bock et al. 2009).

Produktbildung

Für die quantitative Beschreibung der Produktbildung während eines Prozesses kann vereinfachend die Produktkonzentration betrachtet werden. Im vorliegenden Fall der Influenza-Virusproduktion entspricht diese dem Hämagglutinationswert bzw. der daraus berechneten Influenza-Partikelkonzentration. Für den Vergleich von mehreren Kultivierungen ist es jedoch erforderlich die Zellkonzentration einzubeziehen, da sich durch unterschiedliche Zellkonzentrationen der Kultivierungen Unterschiede in der Produktkonzentration ergeben können. Dies wird bei der Berechnung des spezifischen Produktausbeutekoeffizienten $Y_{VP/X}$ gemäß Gleichung (2-4) berücksichtigt. Die Berechnung des Ausbeutekoeffizienten erfolgt anhand der Zellkonzentration zum Zeitpunkt der Infektion (X_0).

$$Y_{VP/X} = \frac{dc_{VP}}{dX} = \frac{c_{VP} - c_{VP0}}{X - X_0} \quad (2-4)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \frac{dX}{dt} + \beta \cdot X \quad (2-5)$$

mit:

α	wachstumsabhängiger Produktbildungskoeffizient	[-]
β	zellkonzentrationsabhängiger Produktbildungskoeffizient	[-]
c_{VP}	Virus-Partikelkonzentration	[Viren/mL]
P	Produktkonzentration	[Viren/mL]
r_P	Produktbildungsrate	[mmol/Tag] bzw. [Viren/Tag]
t	Zeit	[Tage]
X	Zellkonzentration	[Zellen/mL]

Die G_1 -Phase (G_1) ist gekennzeichnet durch Größenwachstum der Zellen. Dabei werden die Zellorganellen vermehrt und die DNA-Replikation durch die Transkription von mRNA für die Bildung von Histonen und DNA-Polymerasen vorbereitet. Außerdem steigt der intrazelluläre Pool an Desoxyribonukleosid-Triphosphaten. In der G_1 -Phase besitzen Zellen in der Regel ein diploides Genom. Die Dauer der G_1 -Phase ist bei Zellkulturen abhängig von der Substratversorgung, interzellulären Proliferationssignalen und der Zelldichte. Zu hohe Zelldichten und die Akkumulation von Inhibitoren verlängern die G_1 -Phase und können zum Stillstand des Wachstums einer Zellkultur führen. Ein Mangel an Wachstumsfaktoren, z.B. durch Serumentzug, kann ebenfalls zum Wachstumsstillstand und schließlich zur Apoptose der Zellen führen (Howard et al. 1993). Mit einer Dauer von durchschnittlich 10 h bei unlimitiertem Wachstum ist die G_1 -Phase die längste Phase im Zellzyklus (Stein 1999). Direkt nach der Teilung weisen Zellen in der G_1 -Phase das geringste Volumen auf. Wenn Zellen am G_1 -Kontrollpunkt (Checkpoint) die erforderliche Zellgröße erreicht haben und ausreichend günstige Wachstumsbedingungen vorliegen, gehen sie in die Synthese-Phase (S-Phase) über (Hartwell und Weinert 1989).

In der Synthese-Phase (S) findet die Reduplikation (Replikation) der DNA statt. Während dieser Phase nimmt der DNA-Gehalt der Zelle zu. Nach Abschluss der Replikation besitzt die Zelle ein tetraploides Genom und wechselt in die G_2 -Phase. Die Dauer der Synthese-Phase ist relativ konstant und beträgt abhängig vom Zelltyp und der Größe des Genoms etwa 6 bis 9 Stunden (Baserga 1985).

In der G_2 -Phase (G_2) findet erneut ein Wachstum der Zellen statt. Es werden verstärkt RNA-Moleküle und zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert, um die nachfolgende Mitose vorzubereiten. Vor dem Übergang in die Mitose findet die Kontrolle der replizierten DNA auf Vollständigkeit und Replikationsfehler statt. Bei irreparablen Fehlern wird die Apoptose der betroffenen Zelle induziert (Abbildung 2-7). Bei antiproliferativer Stimulation von G_2 -Zellen kann die Zellzyklusprogression gestoppt werden (G_2 -Arrest). In der G_2 -Phase besitzen Zellen in der Regel ein tetraploides Genom und weisen das größte Zellvolumen auf.

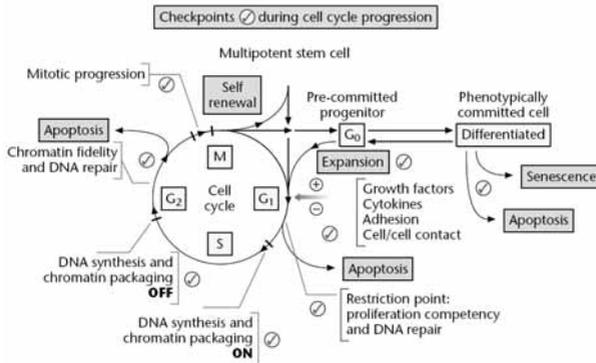


Abbildung 2-7: Der Zellzyklus: vereinfachte schematische Darstellung der Kontrollpunkte und Regulatoren (Stein et al. 2002, modifiziert)

In der Mitose-Phase (M-Phase) findet die Teilung der Chromosomen, des Zellkerns (Karyokinese) und der Zelle (Cytokinese) statt. Adhärenzte Zellen lösen die Zellanheftung und beginnen sich abzurunden (Schorl und Sedivy 2007). Die M-Phase ist in die Phasen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt. Am Ende der Mitose findet die Cytokinese, die eigentliche Zellteilung in zwei Tochterzellen, statt. Der Verlauf der M-Phase stellt einen Mechanismus von Abläufen dar, dessen Dauer von etwa einer Stunde annähernd konstant ist (Stein 1999). Bis zum Abschluss der Cytokinese sind Zellen in der M-Phase tetraploid.

Die Gap₀-Phase (G₀) stellt eine Ruhephase dar, in der undifferenzierte Zellen ausdifferenzieren können (Abbildung 2-7). In Zellkulturen wird der Übergang in die G₀-Phase häufig durch antiproliferative Stimuli wie zu hohe Zelldichten oder Substratmangel induziert. Zellen können aus der G₀-Phase wieder in den aktiven Zellzyklus eintreten, wenn die Voraussetzungen für die Zellzyklusprogression gegeben sind (Substratversorgung, Wachstumsfaktoren).

Auf Populationsebene entspricht die Dauer des Zellzyklus einer Zellkultur ihrer Verdopplungszeit (Schlegel 1992). In der exponentiellen Wachstumsphase einer Zellkultur weisen die Zellen die minimale Verdopplungszeit und damit die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) auf (Kapitel 2.3.3). Für Säugetier-Zellkulturen wurden minimale Verdopplungszeiten von 18 bis 24 Stunden angegeben (Pollard und Earnshaw 2002). Für MDCK-Zellen auf Microcarriern in GMEM-Medium wurden minimale Verdopplungszeiten von 15,5 bis 21 h beschrieben (Bock et al. 2009).

Die Regulation der Zellzyklusprogression beruht auf der Interaktion einer Vielzahl von biochemischen Einflussgrößen. In der vorliegenden Arbeit wird von der biochemischen Ebene abstrahiert, da diese nicht im Fokus der biotechnologisch motivierten Arbeit steht. Die untersuchten Zellkulturen werden lediglich anhand ihrer Zellzyklusphasen-Verteilung charakterisiert. Die Unterscheidung der Zellzyklusphasen erfolgt dabei anhand des zellulären DNA-Gehalts durch Cytometrie von stöchiometrischen Fluoreszenzfärbungen (Krishan 1975; Schorl und Sedivy 2007, Kapitel 3.7.3). Dabei nimmt die Fluoreszenz der gefärbten Zellen relativ zu ihrem DNA-Gehalt zu. Diese Betrachtungsweise führt zu Limitationen in der Interpretation der Ergebnisse, da sich die G_0 und die G_1 -Phase ($N=2$), sowie die G_2 - und die Mitose-Phase ($N=4$) nicht anhand des DNA-Gehalts unterscheiden lassen. Dementsprechend können diese Phasen nur zusammengefasst betrachtet werden (Kapitel 4.1).

Untersuchungen des Zellzyklus in Bioreaktorkultivierungen wurden bisher überwiegend für Suspensionszellen durchgeführt. Zellzyklusphasen-Verläufe für adhärenente Zellen auf Microcarriern wurden für Vero-Zellen beschrieben (Hawboldt 1994a; Hawboldt 1994b). Zellzyklusverteilung von adhärenenten MDCK-Zellen wurden bisher im Rahmen von Apoptoseinduktionsexperimenten mit Prednisolon (Jeon et al. 2005) und durch Entzug der Adhäsionsoberfläche (Frisch und Francis 1994) gemessen. Jedoch wurden diese nur bei Jeon et al. 2005 quantitativ ausgewertet. Untersuchungen zum Verlauf der Zellzyklusphasen von adhärenenten MDCK-Zellen auf Microcarriern in Bioreaktorkultivierungen wurden bisher nur im Rahmen der hier präsentierten Arbeiten veröffentlicht (Schulze-Horsel et al. 2005). Weitere Beschreibungen des Zellzyklus von MDCK-Zellen in Microcarrier-Kulturen sind nicht bekannt.

Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheiden sich im Allgemeinen nicht nur anhand ihres DNA-Gehalts. Weitere Charakteristika sind das Zellvolumen, die Anzahl der Mitochondrien und Ribosomen, sowie die Größe der Biosynthese-Precursorpools und der regulatorische Zustand der Zelle. Entsprechend unterscheiden sich die Zellzyklusphasen in der Regel in ihrem Biosynthesepotential. Allerdings hängen das Zellvolumen, die Anzahl der Mitochondrien und Ribosomen sowie der Biosynthese-Precursorpool auch von anderen Einflussfaktoren ab und sind nicht zwangsläufig mit dem Zellzykluszustand korreliert.

Bei der Entwicklung von biotechnologischen Prozessen wird häufig zunächst durch die Medienoptimierung das Zellwachstum optimiert, um die für den angestrebten Produktionsmaßstab (Scale-up) erforderliche Zellzahl zu erreichen. Aufbauend auf dem optimierten

Wachstum wird dann die spezifische Produktausbeute ($Y_{p/x}$) optimiert. Diese kann Zellzyklus-abhängig sein.

Die Optimierung der spezifischen Produktausbeute durch die gezielte Beeinflussung der Zellzyklusverteilung der kultivierten Zelllinien wurde für eine Vielzahl von Produkten beschrieben. Führend auf diesem Gebiet sind Arbeiten von Al-Rubeai et al., in denen die Zellzyklusabhängigkeit der Produktbildung für rekombinante Proteine (Leelavatcharamas et al. 1999), monoklonale Antikörper (Ibarra et al. 2003) und retrovirale Vektoren (McTaggart und Al-Rubeai 2001) beschrieben und für die Steigerung der Produktbildung genutzt wurde. Ramirez und Mutharasan 1990 zeigten eine Korrelation der Zellzyklusphasen mit der Zellgröße und der Produktivität von Hybridoma-Zellen. Dabei wiesen G_1 -Zellen die größte Produktivität von monoklonalen Antikörpern auf. Bei Insekten-Zellen (NS0) konnte durch Zellzyklus-Arrest in der G_1 -Phase die Antikörperproduktion gesteigert werden (Ibarra et al. 2003). Im Gegensatz dazu wurde für CHO-Zellen eine zunehmende spezifische Ausbeute mit der Zellgröße und der Zellzyklusverteilung korreliert (Lloyd et al. 2000). Dabei nahm die spezifische Produktausbeute von CHO-Zellen von der G_1 -Phase über die S-Phase zur G_2/M -Phase zu.

Für humane retrovirale Vektor-Produktionszellen konnte jedoch keine Zellzyklusphasen-Abhängigkeit der Produktausbeute festgestellt werden (McTaggart und Al-Rubeai 2001).

Im Gegensatz hatte bei CHO-Zellen die Population der Zellen in der G_2/M -Phase die geringste spezifische Ausbeute, gefolgt von Zellen in der S-Phase (Lloyd et al. 2000). Außerdem wurde dabei gezeigt, dass bei allen untersuchten CHO-Zelllinien die Zellgröße in stärkerem Maß ausbeutebestimmend war als die Zellzyklusverteilung.

Bei der Impfstoffproduktion stellen in der Regel die Viruspartikel das Rohprodukt dar. Für DNA-Viren, wie z.B. Parvoviren ist bekannt, dass die Virusvermehrung an die S-Phase der Wirtszellen gekoppelt ist. Es wird vermutet, dass die Parvoviren über keine eigene DNA-Polymerase verfügen, sondern an die DNA-Polymerase der Wirtszelle gebunden sind (Truyen und Parrish 1992). Beim Nerz-Enteritis-Virus (MEV) ist die Virusreplikation an die S-Phase der Wirtszellen geknüpft, da das Virus keine eigene DNA-Polymerase besitzt (Vihinen-Ranta et al. 2004, Hundt et al. 2007).

Da Influenza-Viren ein RNA-Genom besitzen und ihre Replikation über eine eigene virale Polymerase steuern können (Mikulasova et al. 2000), scheint eine direkte Abhängigkeit der Replikation von der S-Phase eher unwahrscheinlich. Stattdessen ist die vRNA-Replikation des Influenza-Virus abhängig von der Verfügbarkeit von cRNA mit CAP-Struktur. Die

Synthese der vRNA wird durch das sogenannte Cap-Snatching begünstigt (Engelhardt und Fodor 2006). Entsprechend ist ein Zusammenhang zwischen erhöhter Virusreplikation und Zellzyklusphasen mit hoher Transkriptionsaktivität, wie der G₁- und S-Phase, denkbar. Die Untersuchung des Zusammenhangs der spezifischen Virusproduktion mit der Zellzyklusverteilung von Zellen wird in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

2.3.5 Die Kultivierung adhärenter Zelllinien

Adhärentes Zellwachstum

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adhärenente MDCK- und Vero-Zellen untersucht. Die Zellzyklusprogression adhärenter Zellen ist abhängig von der Adhäsion an eine Wachstumsoberfläche (Kapitel 2.3.4). Diese stellt ein Substrat dar, welches im Zuge des Zellwachstums einer Monolayer-Kultur limitierend wirkt. Die Zellexpansion erfolgt durch die Passagierung der Zellen in Kulturen mit größerer Wachstumsoberfläche. Steht nach der Einsaat der suspendierten Inokulumzellen über längere Zeit keine Wachstumsoberfläche zur Verfügung, wird in den Zellen die Anoikis, die durch fehlende Adhäsionsmatrix ausgelöste Apoptose, induziert (Emoto 2008; Frisch und Screaton 2001).

Als Adhäsionsoberflächen werden häufig Glas, Kunststoffe (z.B. Polystyrol und Polypropylen) und Biopolymere (z.B. Dextran und Agarose) verwendet (Freshney 2005; Pharmacia 2005). Die Zelladhäsion wird durch verschiedene Oberflächeneigenschaften begünstigt, z.B. Makroporösität (Kim et al. 1991), Beschichtung (beispielsweise mit Lysin oder Collagen (Yashiki et al. 2001)) oder positive Oberflächenladung (Varani et al. 1998). Die Oberflächenladung wird auch durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst und muss daher ebenfalls optimiert werden (Ng et al. 1996). Außerdem enthalten Zellkulturmedien häufig Adhärenzfaktoren wie z.B. Fibronectin, Vitronectin oder Laminin, die die Adhäsion fördern. Bei Serum-haltigen Medien werden diese durch das Serum bereitgestellt, bei Serum-freien Medien müssen sie ggfs. zugesetzt werden (Merten und Litwin 1991; Varani et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde Serum-haltiges Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen aus Polystyrol, Polypropylen-Rollerflaschen und auf Dextran-Microcarriern (Cytodex 1).

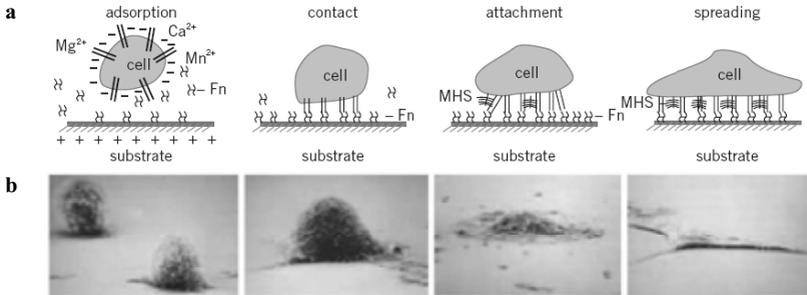


Abbildung 2-8: Anheftung tierischer Zellen an Oberflächen in vier Stadien (Pharmacia 2005)
a: Schematische Darstellung, **b:** entsprechende mikroskopische Aufnahmen von tierischen Zellen; FN: Fibronektin, MHS: multivalentes Heparinsulfat

Die Adhäsion von tierischen Zellen ist charakterisiert durch eine zunehmend feste Bindung an die Wachstumsoberfläche (Abbildung 2-8). Zunächst findet eine biochemische oder elektrostatische Adsorption statt. Anschließend wird durch die Bildung einer extrazellulären Matrix eine feste kovalente Bindung zwischen den Zellen und der Oberfläche erzeugt. Im Zuge der Zellteilung wird diese Bindung teilweise wieder gelöst, um die Zellabschnürung während der Cytokinese zu ermöglichen (Kapitel 2.3.4).

Nach Erreichen einer konfluenten adhären Zellenkultur ist ein weiteres Wachstum nur durch die Ablösung der Zellen und eine Passagierung in eine Kultur mit größerer Wachstumsfläche (Scale-up) möglich (Kapitel 3.2). Ausnahmen davon bilden Zelllinien mit der Fähigkeit zur Carrier-Carrier-Migration oder Multilayerbildung. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche erfolgt durch den Einsatz von Proteasen (Trypsin, Collagenase, Accutase) und Chelatbildnern (z.B. EDTA). Häufig werden Proteasen und Chelatbildner gemeinsam eingesetzt (Merten 2000). Aufgrund der Zellmotilität trotz Adhäsion können sich die kultivierten MDCK- und Vero-Zellen auf zweidimensionalen Wachstumsflächen (T- und Rollerflaschen) verteilen.

Der Wachstumsverlauf und die Zellzyklusverteilung der adhären Zellen sind abhängig von der Einsaatdichte pro Partikel. Die minimale Einsaatdichte von suspendierten Zellen beträgt 8 Zellen pro Microcarrier. Dies wurde für Vero-Zellen (Mendonca 1999) und MRC-5-Zellen (Ng et al. 1996) beschrieben und mittels eines Automaten-Modells rekonstruiert (Hawboldt 1994a; Hawboldt 1994b). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Microcarrier-Kultur bei einer Einsaatdichte von etwa 30 Zellen pro Microcarrier. Der Verlauf des Zellwachstums von MDCK-Zellen auf Microcarriern wurde durch mehrere Modelle beschrieben (Bock et al. 2009; Möhler et al. 2005). Dabei wurden für eine Microcarrierkonzentration von 2 g/L (ca.

8000 Microcarrier/mL) maximale Zelldichten von $1,8 \times 10^6$ Zellen/mL erreicht (ca. 220 Zellen/Microcarrier).

2.3.6 Der Stoffwechsel von Zellkulturen

Glukose-Laktat-Stoffwechsel

Bei der Entstehung von kontinuierlichen Zelllinien kommt es durch spontane Transformation zu genetischen Veränderungen. Als Folge davon zeigen die Zelllinien häufig einen veränderten Metabolismus.

In der Glykolyse wird normalerweise 1 mol Glukose in 2 mol Pyruvat umgewandelt und anschließend über Acetyl-CoA zum größten Teil im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt. Bei kontinuierlichen Zellkulturen findet häufig kein kompletter Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA statt. Stattdessen wird durch einen sogenannten Overflow-Metabolismus ein Großteil des Pyruvats zu Laktat hydriert und in das Zellkulturmedium sekretiert. Die Bildungsrate von Laktat aus Glukose ist dabei oft abhängig von der Glukosekonzentration im Medium. Laktat wirkt inhibierend auf das Zellwachstum. Durch die Anwendung des Limited Feeding mit Glukose-haltigem Medium im Fed-Batch kann die Laktatbildungsrate reduziert werden.

Das energiereiche Acetyl-CoA wird im Tricarbonsäurezyklus unter Abspaltung von CO_2 in Redox- und Energieäquivalente umgewandelt. Durch den aeroben Abbau von Glukose über die Glykolyse, Tricarbonsäurezyklus und Atmungskette werden pro mol Glukose 38 mol ATP gebildet. Der Anteil der Glukose, der in den Tricarbonsäurezyklus überführt wird, liegt bei Zellkulturen im Bereich von 0,2 bis 0,6 % (Neermann und Wagner 1996; Petch und Butler 1994). Für MDCK-Zellen wurde ein Anteil von 10 % beschrieben (Genzel et al. 2004a). Durch den unvollständigen Glukoseabbau zu Laktat wird folglich der Großteil der potentiellen Energie von den Zellen nicht genutzt.

Glutamin-Glutamat-Stoffwechsel

Neben der Glykolyse ist die Glutaminolyse ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg zur Energiegewinnung. Glutamin wird in den Mitochondrien unter Freisetzung von Ammonium zu Glutamat desaminiert. Die weitere Verstoffwechslung kann über den Transaminase-Weg oder den Glutamatdehydrogenase-Weg erfolgen. In beiden Fällen entsteht α -Ketoglutarat,

welches zu Laktat umgewandelt oder im Tricarbonsäurezyklus vollständig oxidiert werden kann. Der Transaminase-Weg ist stöchiometrisch an die Transaminierung von Pyruvat oder Oxalacetat zu Alanin bzw. Aspartat gekoppelt (Häggström 2000). Im Glutamatdehydrogenase-Weg wird ein weiteres Ammonium-Ion freigesetzt. Das in beiden Stoffwechselwegen gebildete Ammonium wird aktiv aus der Zelle transportiert, ist in hohen Konzentrationen cytotoxisch und wirkt inhibitorisch auf das Zellwachstum (Ozturk 1999). MDCK-Zellen bilden aus Glutamin etwa die äquimolare Menge Ammonium (Genzel et al. 2004a).

Glutamin ist nicht thermostabil, d.h. es zerfällt in Abhängigkeit von der Medientemperatur (Kinetik 1. Ordnung). Weitere Einflussgrößen auf den Glutaminzerfall sind der pH-Wert und die Serumkonzentration. Abhängig von den vorliegenden Bedingungen wurden Glutamin-Halbwertszeiten von 7 bis 12 Tagen beschrieben (Ozturk und Palsson 1990). Dementsprechend kann der Glutaminverlust während der Medienvorlage im Bioreaktor (< 24 Stunden) vernachlässigt werden.

Tabelle 2-1: Literaturwerte für Monod- bzw. Inhibitionskonstanten der zentralen Metabolite

Größe	Wert	Einheit	Zelllinie	Quelle
K_S (Glukose)	0,4	mmol/L	BHK	Cruz 1999
K_S (Glutamin)	0,15	mmol/L	MDCK	Glacken et al. 1986
K_P (Laktat)	50	mmol/L	MDCK	Glacken et al. 1988; Omasa et al. 1992
K_P (Ammonium)	10	mmol/L	MDCK	Glacken et al. 1986

In der Literatur sind Monod-Konstanten von Glukose und Glutamin sowie die Inhibitionskonstanten für Laktat und Ammonium beschrieben (Tabelle 2-1). Da für die Monod-Konstante von Glukose kein Literaturwert vorhanden ist, wurde ein entsprechender Wert, der mit BHK-Zellen bestimmt wurde, verwendet (Möhler 2006). Entsprechend den Literaturwerten von Glacken et al. 1988 wurde angenommen, dass Laktatkonzentrationen >50 mmol/L und Ammoniumkonzentrationen >10 mmol/L als wachstumshinhibierend auf MDCK-Zellen wirken.

Sauerstoff

Sauerstoff hat bei der Energiegewinnung von Zellen in Zellkultur eine entscheidende Funktion. Ein Großteil der Energie wird durch die Substratphosphorylierung in der Atmungskette gewonnen. Diese erfordert eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor.

Die betrachteten Kultursysteme unterscheiden sich in ihrem Stofftransport von Sauerstoff in das Kulturmedium. Die verwendeten T-Zellkulturflaschen waren mit Membrandeckeln ausgestattet, die einen Gasaustausch mit der Umgebungsluft im Brutschrank (5 % CO₂-Anteil) gewährleisten. Die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff war dabei abhängig von der Diffusionsstrecke von der Gasphase zur Zellschicht, bestimmt durch die Füllhöhe in den Flaschen. Aufgrund der im Rahmen der Arbeit bestimmten hohen Wachstumsraten kann davon ausgegangen werden, dass in den Zellkulturflaschen in der Regel keine Sauerstofflimitierung vorlag. Bei den eingesetzten Rollerflaschen wurde durch die kontinuierliche axiale Drehung einerseits eine Durchmischung des Kulturmediums mit der Gasphase erreicht, desweiteren wurde durch das ablaufende Medium für die Zellen, die sich gerade nicht im unteren Bereich der Rollerflasche befinden, die Schichtdicke der Diffusionsschicht minimiert. Dies führte zu einem verbesserten Stoffübergang im Vergleich zu T-Zellkulturflaschen (konstante Mediumsüberlagerung). In den verwendeten Bioreaktorsystemen wurde der Sauerstoffpartialdruck durch kontinuierliche bzw. diskontinuierliche Submersbegasung mit Luft oder Sauerstoff geregelt, sodass eine Sauerstofflimitierung ausgeschlossen werden kann.

Es wird davon ausgegangen, dass in den Kultivierungssystemen weder Über- noch Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff vorlag. Entsprechend sei bezüglich theoretischer Beschreibungen der Sauerstofflöslichkeit, des Stoffübergangs und des Sauerstoffverbrauchs auf die entsprechenden Standardwerke der Bioprozesstechnik verwiesen (Bailey und Ollis 1986; Chmiel 1991a; Chmiel 1991b; Storhas 1994).

2.4 Durchfluscytometrie

Die Durchfluscytometrie wird zu Lichtstreuungs- und Fluoreszenzmessungen von Partikeln in Suspension verwendet. In der Regel handelt es sich bei den gemessenen Partikeln um Einzelzellen in Suspension. Die Hauptanwendungsgebiete der Durchfluscytometrie sind die medizinische Diagnostik und zellbasierte Analytik in der Forschung. Durch die Analyse von mehreren tausend Zellen aus einer Probe wird dabei eine hohe statistische Sicherheit der Messung erlangt. Im Folgenden wird zunächst das Messprinzip der Durchfluscytometrie beschrieben, danach werden die speziellen Anforderungen für die Probenvorbereitung und die Fluoreszenzquantifizierung erläutert.

2.4.1 Grundlagen der Durchfluscytometrie

Grundlage für die durchfluscytometrische Messung ist ein Probenstrom von Partikeln bzw. Einzelzellen (Abbildung 2-9). Dazu wird der Probenstrom, in der Regel mittels eines laminaren Puffer-Hüllstroms (sheath fluid) oder einer Düse (jet in air) fokussiert, um in der Messzelle einen Kapillarstrom (Durchmesser etwa 5 – 20 μm) zu erzeugen, in dem die Partikel nacheinander eine Lichtquelle passieren. Der Durchmesser des Probenstroms ist abhängig von dessen Flussgeschwindigkeit. Eine geringe Probenflussgeschwindigkeit führt zu einer stärkeren Fokussierung des Probenstroms und damit zu einer gleichmäßigeren Illumination der Partikel. Entsprechend wird für eine maximale Messpräzision die Probenflussgeschwindigkeit minimiert. Als Lichtquelle werden in der Regel Laser oder UV-Lampen eingesetzt. Das einfallende Licht wird mittels Bandpassfiltern auf einen engen Wellenlängenbereich eingegrenzt (monochromatisches Licht) und zu einem elliptischen Lichtstrahl gebündelt, dessen mittlerer Durchmesser etwa 60 μm beträgt (Givan 2001; Raffael et al. 1994). Je nach Anwendungsbereich werden auch Cytometer mit mehreren Lichtquellen eingesetzt. Dadurch können zusätzliche Fluoreszenzfarbstoffe mit anderen Anregungswellenlängen detektiert werden (Shapiro 2003).

Das auf die gemessenen Partikel einfallende Licht wird zum Teil gebrochen oder reflektiert. Das gebrochene Licht der gleichen Wellenlänge des einfallenden Lichts wird in einem kleinen Winkel und im rechten Winkel zum durchgehenden Licht mittels Photomultiplier (Photonenfälle, PMT) detektiert. Im Gegensatz zur dynamischen Lichtstreuung sind die Detektionswinkel in der Durchfluscytometrie konstant. Die Lichtbrechung der Partikel, die in einem Winkel von etwa $0,5^\circ$ analysiert wird, wird als Forward Scatter (FSC) oder Forward-Angle Light Scatter (FALS) bezeichnet. Das FSC-Signal ist abhängig von der Größe und dem Brechungsindex im Inneren der gemessenen Partikel. Die häufig angenommene direkte Korrelation der FSC-Signalstärke mit der Partikelgröße ist stark fehlerbehaftet (Givan 2001; Raffael et al. 1994; Shapiro 2003), da auch andere Lichtbrechungseigenschaften in das FSC-Signal eingehen. Das senkrecht (90°) zum einfallenden Lichtstrahl gemessene Lichtbrechungssignal wird als Side Scatter (SSC) bezeichnet und dient als abstraktes Maß für die Granularität der gemessenen Partikel. Analog zum FSC wird das Signal aber auch von anderen Eigenschaften der Partikel (Oberflächenstruktur, Größe und Form) beeinflusst. Daher ist auch die Korrelation von Granularität und Signalstärke fehlerbehaftet (Givan 2001; Shapiro 2003). Trotz der Einschränkungen können physikalisch unterschiedliche Partikel über den Forward Scatter oder den Side Scatter unterschieden werden. Dies wird insbesondere bei der Differenzierung von Blutzellen genutzt. Sehr häufig werden die zu analysierenden Zellen

über die zweidimensionale Auftragung von FSC und SSC (Dot plot) von Zellbruchstücken und Aggregaten unterschieden (Shapiro 2003).

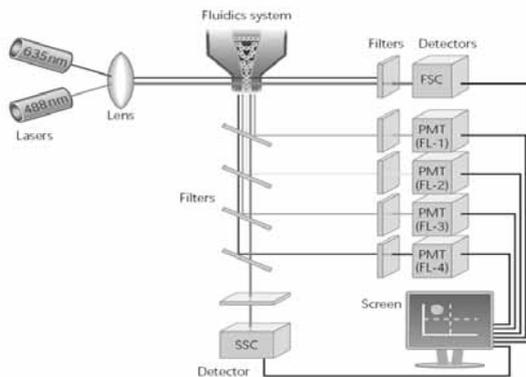


Abbildung 2-9: Vereinfachter schematischer Aufbau eines Durchflussscytometers (Rahman 2006, modifiziert)

Abkürzungen: Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC), Photomultiplier-Röhre (PMT), Fluoreszenzkanäle (FL-1 bis FL-4)

Neben der Messung der Lichtbrechung von Partikeln wird die Durchflussscytometrie zur Messung von Fluoreszenzmarkierungen genutzt. Die spezifische Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Unterscheidung von markierten und nicht-markierten Partikeln. Durch den Einsatz von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden die Anwendungsmöglichkeiten der Durchflussscytometrie potenziert. Insbesondere in der klinischen Diagnostik ist die Durchflussscytometrie als Routinemethode etabliert.

Die Fluoreszenzdetektion beruht auf der Anregung Partikel-gebundener Fluorochrome durch kurzwelliges Licht. Die angeregten Fluorochrome emittieren entsprechend ihrer Spektraleigenschaften längerwelliges Licht (Stokes' shift, vgl. Shapiro 2003). Durch den Einsatz von Filtern wird das emittierte Licht in die zu analysierenden Lichtwellenlängen aufgetrennt. Die Detektion der einzelnen Fluoreszenzwellenlängen erfolgt über getrennte Photomultiplier (Abbildung 2-9).

Die bei der Lichtbrechung und Fluoreszenzemission emittierten Photonen werden über Photomultiplier in elektrische Spannung umgewandelt. Dabei wird durch eine Kaskade von Dynoden ein starkes elektrisches Feld erzeugt und durch die Freisetzung von Sekundärelektronen die Zahl der übertragenen Elektronen vervielfacht (Abbildung 2-10a). Im Gegensatz zu Photodioden ist es dadurch möglich, auch schwache Lichtsignale zu erfassen.

Durch die Wahl der Elektroden-Vorspannung der Photomultiplier wird die Messsensitivität beeinflusst.

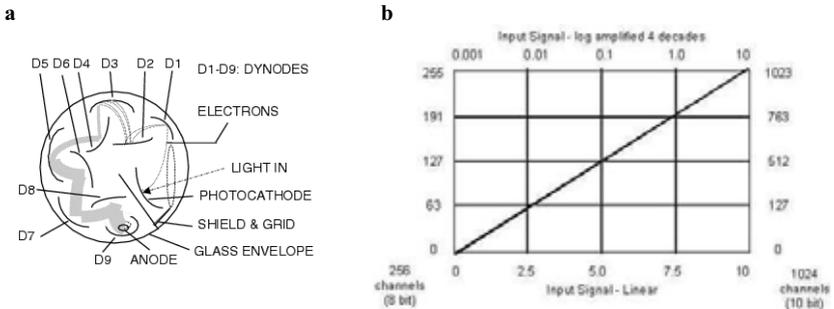


Abbildung 2-10: Durchflusszytometrische Messtechnik: Signalumwandlung und -verstärkung
a: Schematischer Aufbau einer Photonenfalle (Shapiro 2003, modifiziert): einfallende Photonen werden in elektrische Spannung umgewandelt, die von der Kathode über eine Dynodenkaskade bis zur Anode verstärkt wird, **b**: lineare und logarithmische Signalverstärkung (Fisher und Pepper 2009): je nach Verstärkungsart werden den Fluoreszenzintensitäten 256 bzw. 1024 Fluoreszenzkanäle zugewiesen.

Die Verstärkung der gemessenen Lichtintensitäten kann linear oder logarithmisch erfolgen. Dadurch ist es möglich, die Größe und Auflösung des Messbereiches anzupassen. Für die Messung steht ein Spannungsbereich von 0 bis 10 Volt zur Verfügung. Dieser Spannungsbereich wird durch einen Analog/Digital-Wandler linear oder logarithmisch verteilt in 256 (8 Bit), 1024 (10 Bit) bzw. 4096 Klassen (12 Bit) unterteilt (Abbildung 2-10b). Die Wahl der Verstärkung richtet sich nach dem erwarteten Unterschied zwischen sehr schwachen und sehr starken Signalintensitäten (Schmid et al. 1988). Die lineare Verstärkung der Messsignale wird für die Auflösung von geringen Fluoreszenzunterschieden in einem engen Messbereich eingesetzt, z.B. für die stöchiometrische DNA-Färbung in Zellen (Kapitel 3.7.3). Für die Detektion über einen weiten Signalbereich hinweg (z.B. für die Detektion von zellulären Antigenen) wird hingegen die logarithmische Verstärkung über 3 bis 4 Dekaden gewählt. Dadurch werden schwache Signalintensitäten in den unteren Dekaden gespreizt, während starke Signalintensitäten (in den oberen Dekaden) gestaucht werden (Raffael et al. 1994; Shapiro 2003).

Da die Partikel im Probenstrom die Messzelle zeitversetzt passieren, kann jedem Partikel ein Vektor der erfassten Messwerte aller Detektoren (für FSC, SSC und verschiedene Fluoreszenzwellenlängen) zugeordnet werden. Die Vektoren werden zu einer Matrix zusammengefasst, die die Messwerte aller gemessenen Partikel enthält. Diese Matrix wird in Geräte-unabhängigen List Mode-Dateien (LMD) gespeichert (Seamer et al. 1997). Die Dateien können dann nach der Messung mit einer Cytometrie- oder Tabellenkalkulations-

software eingelesen und ausgewertet werden. Die Datenstruktur ermöglicht eine Darstellung und statistische Auswertung der Daten aller Messparameter einzeln (Histogramm) oder in Relation zueinander (zwei- oder dreidimensionale Darstellung).

Die cytometrisch gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Einzelpartikel können unterschiedlich gemittelt werden. Abhängig von der Art der Verteilung der Einzelwerte sind die Mittelwertberechnungen unterschiedlich gut geeignet. Zusätzlich ist die Mittelwertberechnung insbesondere für die Auswertung bimodaler Verteilungen ungeeignet. Die Verwendung des Modalwertes führt zu einer vergleichsweise hohen Varianz der Mittelwerte, während durch das arithmetische Mittel einzelne Extremwerte überbewertet werden. Im Gegensatz dazu ist der Median robust gegenüber extremen Werten und besitzt eine geringe Varianz (Givan 2001; Shapiro 2003). Dementsprechend wurde für die Mittelwertbildung cytometrischer Fluoreszenzintensitäten der Medianwert berechnet.

2.4.2 Fluoreszenzkalibration und -quantifizierung

Bei der Durchflusscytometrie wird die durch die Probe emittierte Fluoreszenz zunächst durch Photomultiplier in eine elektrische Spannung umgewandelt, die mittels eines Analog/Digital-Wandlers in ein digitales Messsignal umgeformt wird (Kapitel 2.4.1). Die Signalintensität ist dabei abhängig von der frei wählbaren PMT-Spannung sowie der Verstärkung und folglich arbiträr. Aufgrund von Änderungen des Messgeräts, beispielsweise durch Alterung der Lichtquelle oder der Photomultiplier sowie Veränderungen in der Geräteoptik, sind die Messergebnisse auch bei gleichbleibenden Messeinstellungen Änderungen unterworfen. Um trotz dieser Änderungen Messergebnisse miteinander zu vergleichen, werden die arbiträren Fluoreszenzintensitäten in einer standardisierten Einheit als Anzahl gelöster Moleküle des verwendeten Fluorochroms (molecules of equivalent soluble fluorochrome, MESF) kalibriert (CLSI 2004; Schwartz et al. 2004). Dabei ist die gemessene Fluoreszenz von Fluorochromtragenden Partikeln gleich der Fluoreszenz einer bekannten Konzentration des Fluorochroms in Lösung. Als Referenzsystem zur Durchflusscytometrie wird dabei die Fluoreszenzspektrophotometrie eingesetzt, um die Fluoreszenzintensitäten der Partikel mit den gelösten Farbstoffen zu korrelieren (Gaigalas et al. 2005). Neben der Vergleichbarkeit von Messergebnissen des gleichen Gerätes kann die MESF-Kalibration auch zum Vergleich verschiedener Geräte genutzt werden, was insbesondere für den Ergebnisvergleich zwischen Laboratorien von Bedeutung ist (Purvis und Stelzer 1998). Bei der Verwendung von Fluoreszein als Fluorochrom, welches konjugiert als Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)

vorliegt, wird die MESF-Fluoreszenz als MEFL (molecules of equivalent soluble fluorescein) bezeichnet. Die mit kalibrierten Einstellungen gemessenen Fluoreszenzen können für die quantitative Analyse der Messdaten verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden MEFL-Fluoreszenzkalibrierungen eingesetzt, um die Antikörperbindung an Influenza-Virusproteine zwischen Messreihen vergleichen zu können. Die Durchführung der Fluoreszenzkalibration ist in Kapitel 3.7.2 beschrieben. Die Grundlagen für die in Kapitel 4.2.4 beschriebene Quantifizierung von Influenza-Virusproteinen sind in Kapitel 2.8 ausführlich erläutert.

2.4.3 Kriterien für die Probenvorbereitung

Die Anwendung der Durchflusscytometrie zur Analyse von Bioreaktorkultivierungen unterliegt besonderen Anforderungen, insbesondere bei dem betrachteten Prozess mit Influenza-Virusinfektion. Die zu untersuchenden Zellmerkmale Virusinfektion und Apoptose schränken die Wahl der Nachweismethoden und der Probenvorbereitung zusätzlich ein.

Ein wesentlicher Aspekt bei der Arbeit mit infektiösen Influenza-Viren ist die biologische Sicherheit. Zur Erhöhung von Arbeits- und Umweltschutz sollten die infektiösen Bioreaktorproben zum frühestmöglichen Zeitpunkt nach der Probennahme inaktiviert werden. Zusätzlich wird durch die Inaktivierung der Viren die Probenvorbereitung für die Durchflusscytometrie wesentlich erleichtert. Häufig verwendete Methoden für die Inaktivierung von Influenza-Viren sind UV-Bestrahlung (Budowsky et al. 1981), Säurebehandlung (Campbell et al. 2004; Lombardi et al. 2008), thermische Inaktivierung (>63 °C, Gaush und Smith 1968; Isbarn et al. 2007) sowie chemische Inaktivierung mit Formalin bzw. Paraformaldehyd (King 1991; Kistner et al. 1998), 2-Bromethylamin-Hydrobromid (Bahnemann 1990; Nayak et al. 2005), β -Propiolacton (Budowsky et al. 1991; Budowsky et al. 1993; McKinney et al. 2003) sowie Ethanol (Roberts und Lloyd 2007). Aufgrund ihrer starken Toxizität eignen sich 2-Bromethylamin-Hydrobromid und β -Propiolacton wenig für die Routineanwendung zur Inaktivierung von Kleinmengen. Zusätzlich wurde für β -Propiolacton die Fragmentierung von DNA beschrieben (Morgeaux et al. 1993). Diese Fragmentierung könnte zu Artefakten beim Apoptosenachweis über DNA-Strangbrüche in der Wirtszell-DNA (TUNEL-Assay) führen (Kapitel 4.3).

Die für die thermische Inaktivierung notwendige Temperatur (>60 °C) führt zu einer Denaturierung der intrazellulären Virusproteine. Dies hätte negativen Einfluss auf die

Antikörperbindung für den Infektionsnachweis. Der Einfluss der thermischen Inaktivierung auf das HA-Protein von Influenza wurde von Luykx et al. 2004 beschrieben.

Ethanol, Methanol, Paraformaldehyd und Formaldehyd werden routinemäßig zur Zellfixierung in der Durchflussscytometrie eingesetzt (Schimenti und Jacobberger 1992; Shapiro 2003; Van Ewijk et al. 1984). Insbesondere bei klinischen Proben ist dabei auch die Inaktivierung von Pathogenen von Vorteil. Die Wahl des Fixierungsmittels hängt dabei von den untersuchten Merkmalen ab (Schimenti und Jacobberger 1992). Die Eignung von Paraformaldehyd zur Virusinaktivierung bei gleichzeitiger Konservierung der Antigene wurde beispielsweise für Vaccinia-Virus beschrieben (Hulskotte et al. 1997).

Neben der Virusinaktivierung ist die Konservierung des untersuchten Zellzustands durch chemische Fixierung von entscheidendem Vorteil für die Durchflussscytometrie von Bioreaktorkultivierungen. Dadurch ist es möglich, Zeitreihen von Proben während der Kultivierung zu sammeln und im Anschluss an die Kultivierung die Probenvorbereitung für alle gesammelten Proben zusammen durchzuführen. Das verringert Schwankungen innerhalb von Proben einer Kultivierung aufgrund von verschiedenen Färbungsreihen (batch-to-batch-Variation der Färbung). Zusätzlich wird die Probenvorbereitungszeit minimiert.

Für die Langzeitkonservierung von Zellen für die DNA-Analytik, aber auch von Proteinen für Immunfärbungen können Zellen mit Ethanol fixiert werden (Darzynkiewicz und Juan 1997; Schimenti und Jacobberger 1992). Die Nutzung der Quervernetzung von kleineren DNA-Bruchstücken durch Paraformaldehydfixierung und die anschließende Langzeitkonservierung der Zellen mit Ethanol für die spätere Apoptosequantifizierung über den TUNEL-Assay wurde von Pozarowski et al. 2003 beschrieben.

Um die genannten Vorteile für die experimentelle Durchführung zu nutzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Paraformaldehyd-Ethanol-Fixierung für die Quantifizierung der Influenza-Virusinfektion und der Apoptose durch den TUNEL-Assay verwendet (Kapitel 3.5).

2.5 Apoptose

Als Apoptose wird das biochemische Programm von Säugetierzellen bezeichnet, mit dem einzelne Zellen in einem Zellverband ihre Auflösung einleiten und durch fortschreitende Degradation der Zellbestandteile absterben. Die Bezeichnung Apoptose wurde bei ihrer ersten Beschreibung durch Kerr et al. 1972 als Analogie der morphologischen Zellveränderungen

zum Abfallen verwelkter Blütenblätter geprägt. Die Existenz des sogenannten programmierten Zelltodes wurde allerdings schon früher postuliert (Lockshin und Williams 1965).

Im Folgenden wird auf die Funktion, den Verlauf sowie die Nachweismethoden der Apoptose eingegangen. Wesentlich für die vorliegende Arbeit sind der Zusammenhang der Apoptose mit Influenza-Virusinfektionen sowie die Beeinflussung der Apoptose durch Medienzusätze.

2.5.1 Bedeutung der Apoptose in Physiologie, Pathologie und Biotechnologie

Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, der sowohl in der Entwicklung von vielzelligen Organismen als auch bei deren Erhaltung essentiell ist. So werden im Zuge der Morphogenese nicht mehr benötigte Gewebe durch apoptotischen Gewebeabbau entfernt. Beispiele dafür sind die Häute zwischen den Fingern von Säugetieren (Interdigitalhäute), die während der Embryogenese zurückgehen (Zuzarte-Luis und Hurlle 2005) sowie der Abbau des Schwanzgewebes von Kaulquappen im Verlauf der Metamorphose (Nakajima et al. 2005). Das physiologische Auftreten der Apoptose wird, im Gegensatz zum pathologischen Auftreten, auch als programmierter Zelltod bezeichnet (Creighton 1999).

Die Vermehrung von Zellen mit irreparablen genetischen Defekten wird durch deren Apoptose verhindert (Ishikawa et al. 2006). Bereits das Einwirken der Auslöser von genetischen Defekten wie ultraviolette Strahlung, Radikale oder chemische Agenzien löst Apoptose aus. In ausgewachsenen Organismen regelt das Gleichgewicht von Zellteilung und Apoptose die für den Erhalt des Organismus wichtige Homöostase (Hallstrom und Nevins 2009). Autoreaktive Immunzellen werden durch Apoptose entfernt, was das Risiko von Autoimmunreaktionen verringert (Rathmell und Thompson 2002). Bei virusinfizierten Zellen dient die Apoptose meist zur Eindämmung der Infektion (Barber 2001; McLean et al. 2008). Der Zusammenhang der Apoptose mit Influenza-Virusinfektionen wird in Kapitel 2.6 ausführlich dargelegt.

Fehlfunktionen und Fehlregulationen der Apoptose sind verbunden mit einer Vielzahl pathologischer Folgen für den betroffenen Organismus. Fehlende Apoptose kann zur Entstehung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen, Diabetes und der Ausbreitung viraler Infektionen führen. Im Gegensatz dazu können neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Parkinson), AIDS und Ischämie die Folge von übermäßigem Zelltod durch Apoptose sein (Fadeel und Orrenius 2005; McKenna und Cotter 1997).

Bei der Kultivierung von Zellen zur Produktion von Biologika führt die Induktion der Apoptose zur Verringerung der Lebensdauer der Zellen. Dies führt zu einer verkürzten Produktbildungsphase der Zellen und folglich zu einer geringen Produktausbeute. Eine Steigerung der Produktausbeute von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Proteinen durch die Inhibition der Apoptose wurde mehrfach beschrieben (Arden und Betenbaugh 2004; Figueroa et al. 2007; Mastrangelo und Betenbaugh 1998; Singh und Al-Rubeai 1998). Folglich ist für diese Produkte das Verständnis der Ursachen und Auswirkungen der Apoptoseinduktion auch aus wirtschaftlichen Gründen von großem Interesse.

2.5.2 Induktion und Verlauf der Apoptose

Die Apoptose kann morphologisch von der Nekrose (akutes Absterben von Zellen) unterschieden werden. Im Verlauf der Apoptose schrumpft die Zellgröße, Chromatin und Cytoplasma werden kondensiert. Sind adhärente Zellen betroffen, lösen sie sich aus dem Zellverband (Rosenblatt et al. 2001). Die Zellorganellen bleiben zunächst intakt, während die Zellmembran sich ausstülpert (Blebbing) und schließlich apoptotische Vesikel abgeschnürt werden (Abbildung 2-11). Im Gegensatz dazu schwellen nekrotische Zellen zunächst an, die Mitochondrien verändern ihre innere Membranstruktur und die Zellen lysieren (Kerr et al. 1972; Raff 1998; Ueda und Shah 1994). Das Auflösen von apoptotischen Zellen erfolgt durch Phagozytose oder sekundäre Nekrose (Creighton 1999; Darzynkiewicz et al. 1997; Spier 2000).

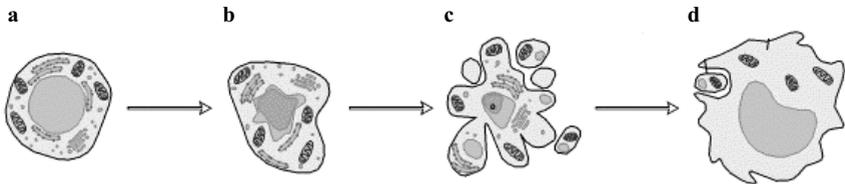


Abbildung 2-11: Schematischer Verlauf der Apoptose (Lodish 2000, modifiziert)

a: vitale, nicht-apoptotische Zelle; **b:** frühe Phase der Apoptose, leichte Verformung, Chromatinkondensation, Cytoplasmakondensation; **c:** späte Phase der Apoptose, Zellkernfragmentierung, Membranausstülpung (Blebbing), Zellfragmentierung in apoptotische Vesikel; **d:** Eliminierung der apoptotischen Zelle durch Phagozytose oder alternativ Zerfall der apoptotischen Vesikel durch sekundäre Nekrose

Der biochemische Verlauf der Apoptose beruht auf komplexen und stark quervernetzten Signaltransduktionskaskaden (auszugsweise dargestellt in Abbildung 2-12). Ohne Einwirkung

eines Induktors bestimmt das Übergewicht von antiapoptotischen Signalen (Survivalfaktoren) das Überleben einer Zelle. Wirken Induktoren auf die Zelle ein, kann es zu einer Verschiebung des Signalgleichgewichts kommen, sodass proapoptotische Signale überwiegen (Entscheidungsphase). Ist dies der Fall, wird die Apoptose induziert (frühe Phase) und durch Signaltransduktion die Zelldegradation (späte Phase) ausgelöst (Creighton 1999). Je nach Induktor und primärem Signaltransduktionsweg werden der intrinsische (mitochondriale) und extrinsische (Rezeptor-vermittelte) Weg der Apoptose unterschieden. Beide Wege können sich durch Quervernetzung gegenseitig aktivieren (Lee und Kim 2007) und münden in der späten Phase (Effektorphase). Die Induktion der Apoptose durch Bcl-2-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde beschrieben (Oyadomari et al. 2002; Zong et al. 2003). Allerdings ist die Bedeutung dieses Induktionsweges in Bezug auf die Zellbiologie und die Influenza-Virusreplikation noch nicht ausreichend untersucht.

Induktoren der intrinsischen Apoptose sind Mangel an Wachstumsfaktoren (z.B. durch Serumentzug), Hormone, Chemikalien (Kapitel 4.5), Stress (Radikale, starke pH-Änderungen) sowie mikrobielle und virale Infektionen (Barber 2001; Creighton 1999; Howard et al. 1993; Krakauer und Payne 1997; Kroemer 2003; Young et al. 1997). Durch UV-Strahlung werden irreparable DNA-Schäden verursacht, die den intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion aktivieren können (Kulms und Schwarz 2000).

Die intrinsische Apoptose wird durch die Inaktivierung des Bcl-2/Bcl-x_L-Komplexes initiiert. Daraus folgt die Öffnung der Mitochondrienporen, was nicht nur den Verlust des Transmembranpotentials (Zusammenbruch der Atmungskette), sondern auch den Ausfluss von Calcium-Ionen, Sauerstoffradikalen, Cytochrom C, Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) und Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) ins Cytoplasma zur Folge hat (Abbildung 2-12). AIF führt im Zellkern zur DNA-Fragmentierung, während Smac und Cytochrom C an der Aktivierung des Apoptosom-Komplexes (aus Cytochrom C, ATP, Procaspase 9 und apoptotic protease activating factor (APAF-1) beteiligt sind. Durch die Aktivierung der Effektorcaspase 3 durch die Initiatorcaspase 9 wird die Caspasekaskade gestartet. Die Aktivierung der Caspasen (Proteasen) stellt den Punkt dar, ab dem der Verlauf der Apoptose bis zum Zelltod unumkehrbar ist (Nicholson und Thornberry 1997; Thornberry und Lazebnik 1998). Die Effektorcaspasen, insbesondere Caspase 3, stellen die Knotenpunkte des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges dar (Earnshaw et al. 1999; Nicholson und Thornberry 1997).

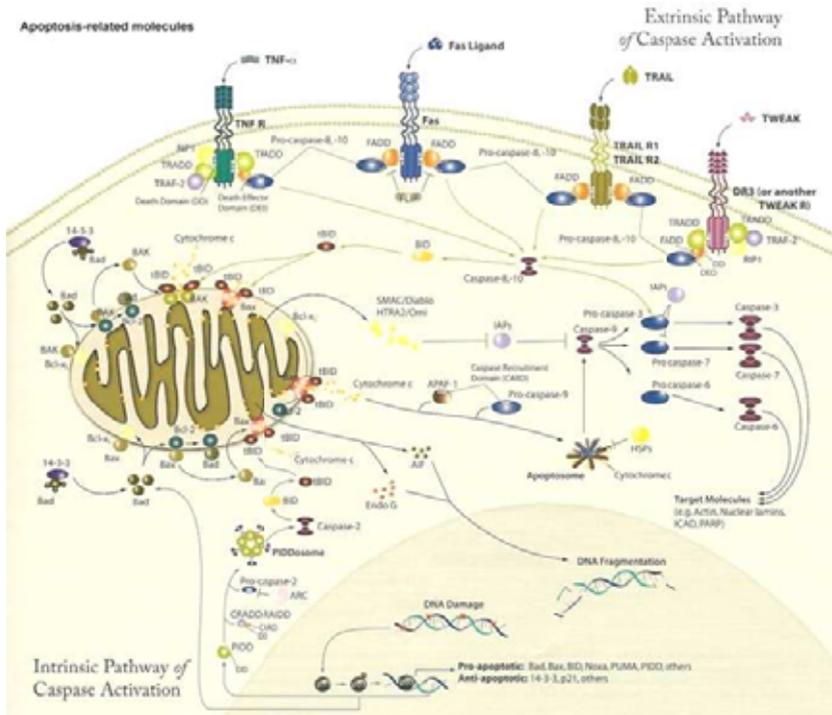


Abbildung 2-12: Vereinfachte schematische Übersicht der Apoptose in Zellkulturen (Qiu 2010)

Die extrinsische Apoptose wird mittels Bindung von Cytokinen an Oberflächenrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie (Fas (CD95), TRAIL) sowie mittels Rezeptor-vermitteltem Granzym B-Transport in die Zelle induziert (Creighton 1999; Spier 2000). Auslöser der Cytokinfreisetzung können mikrobielle und virale Infektionen sein (Mogensen und Paludan 2001; Naumann 2001; Young et al. 1997). Die membrangebundenen Rezeptoren der TNF-Familie sind Bestandteil des DISC (death inducing signalling complex) und besitzen eine Todesdomäne (death domain, DD), deren Aktivierung zur Aktivierung der Procaspase 8 führt. Caspase 8 gehört zu den Initiatorcaspasen, die die Aktivierung der sogenannten Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) vermitteln. Die Effektorcaspasen spalten die sogenannten Todessubstrate (Strukturproteine, Kinasen, DNA-Reparationsenzyme, Transkriptionsfaktoren), durch deren Proteolyse die Zellintegrität direkt oder indirekt zerstört wird. Zu den Todessubstraten zählen insbesondere Lamine, Polyadenylribose-Polymerase (PARP), fokale

Adhäsionskinasen (FAK), die Caspase-aktivierte DNase (CAD) und der Inhibitor von Nucleofaktor kappa B $I_{\text{kappa}B}$ (Earnshaw et al. 1999; Nicholson und Thornberry 1997; Thornberry und Lazebnik 1998). Während der Apoptose treten DNA-Strangbrüche auf, insbesondere die Spaltung zwischen Histonkomplexen (DNA-Laddering) ist dabei charakteristisch für apoptotische Zellen (Bortner et al. 1995). Die Zerstörung möglicherweise fehlerhafter DNA erfolgt durch Endonucleasen (Darzynkiewicz und Traganos 1998; Gong et al. 1994). Durch die Apoptose wird folglich nicht nur eine geschädigte Zelle, sondern auch ihr geschädigtes Erbgut eliminiert.

2.6 Influenza-Virusinfektion und Apoptose

Eine Vielzahl von Viren induziert durch die Infektion Apoptose (Barber 2001; Young et al. 1997), so zum Beispiel das Hepatitis C-Virus (Bantel und Schulze-Osthoff 2003), Rotaviren (Chaïbi et al. 2005) und Polioviren (Blondel et al. 2009).

Die Apoptoseinduktion durch Influenza-Viren wurde erstmalig 1993 veröffentlicht (Takizawa et al. 1993). Dabei konnten in MDCK und HeLa-Zellen die Apoptosemerkmale Chromatin-kondensation und DNA-Fragmentierung als Folge der Influenza A-Virusinfektion nachgewiesen werden. Die Induktion von Apoptosemerkmalen wie DNA-Fragmentierung und Caspase-Aktivität wurde für eine Reihe humaner und equiner Influenza-Virusstämme gezeigt (Kurokawa et al. 1999; Lin et al. 2002; Takizawa et al. 1999b; Wurzer et al. 2003; Zhimov et al. 1999), darunter auch Influenza B-Stämme (Hinshaw et al. 1994; Mersich et al. 2004) und Influenza C-Stämme (Hechtfisher et al. 1997). Dabei unterscheiden sich die Stämme hinsichtlich des Ausmaßes der Apoptoseinduktion und ihrer Cytotoxizität in statischen Zellkulturen (Hornickova 1997; Mersich et al. 2004; Price et al. 1997). Im Vergleich zu N1-Stämmen zeigten N2-Stämme eine stärkere Apoptoseinduktion (Mohsin et al. 2002).

Das Influenza-Virus nutzt zur Apoptose sowohl extrinsische als auch intrinsische Induktionsmechanismen (Lowy 2003; Ludwig et al. 1999). Für folgende Viruskomponenten ist eine proapoptotische Funktion beschrieben: doppelsträngige RNA (Takizawa et al. 1999a), NS1 (Schultz-Cherry et al. 2001), das Polymeraseprotein PB1-F2 (Coleman 2007), NA (Morris et al. 2002; Schultz-Cherry und Hinshaw 1996), HA (Ohyama et al. 2003) und M-Protein (Morris et al. 2002). Ein Teil der Signalwege ist in Abbildung 2-13 dargestellt.

Durch die Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza-Viren wird die Expression von vielen verschiedenen Wirtszellproteinen reguliert (Vester et al. 2009). Neben der Apoptoseinduktion

führt die Influenza-Virusinfektion von Zellkulturen zu Interferon-vermittelter Signaltransduktion, wodurch auch in nicht-infizierten Nachbarzellen eine antivirale Antwort ausgelöst werden kann, die in der Apoptoseinduktion münden kann (Kim et al. 2002; Koerner et al. 2007; Ludwig et al. 2006; Marcus et al. 2005). Für MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Menge des produzierten Interferons als auch die damit verbundene Regulation des Mx1-Proteins (myxovirus resistance protein 1) abhängig vom eingesetzten Virusstamm ist (Seitz et al. 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass beide Faktoren nur einen sehr geringen oder keinen Einfluss auf die Virusausbeute haben. Ursache dafür ist vermutlich eine fehlende Inhibition der Influenza-Replikation durch das von den MDCK-Zellen gebildete Mx1-Protein (Seitz et al. 2010). Die geringe Interferon-Suszeptibilität von MDCK-Zellen könnte ein Grund für die gute Eignung der Zelllinie zur Influenza-Virusvermehrung sein.

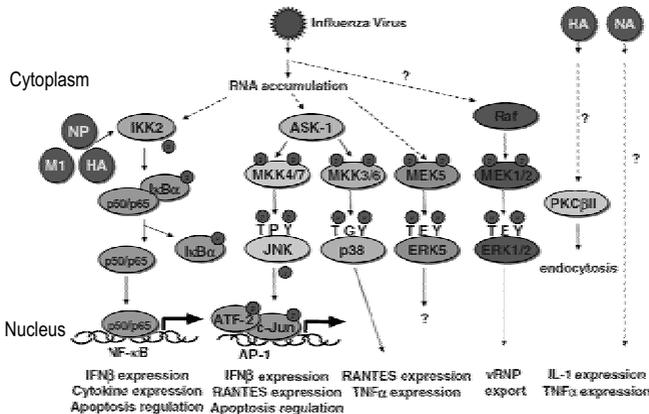


Abbildung 2-13: Schematische Darstellung der Aktivierung intrazellulärer Signalwege in einer Influenza-virusinfizierten Zelle (Ludwig et al. 2006, modifiziert)

Die Induktion der Apoptose in den Wirtszellen hat einen ambivalenten Charakter. Die ausgelösten Signalwege haben hauptsächlich eine antivirale Funktion (Ludwig et al. 2006; Samuel 2001). Jedoch interagiert das Influenza-Virus mit den antiviralen zellulären Mechanismen und nutzt diese zur Virusreplikation, sodass primär antivirale Mechanismen auch provirale Funktionen übernehmen können (Ludwig et al. 1999). So wird beispielsweise die im Rahmen der Apoptose erhöhte NFκB-Aktivität zwar viral supprimiert, die Restaktivität scheint sich jedoch positiv auf die Virusreplikation auszuwirken (Lowy 2003; Wurzer et al. 2004). Außerdem konnte in MDCK-Zellen eine Beschleunigung des vRNP-Transportes aus dem Zellkern durch erhöhte apoptotische Caspase 3-Aktivität gezeigt werden (Wurzer et al.

2003). Die Virus-Wirtszellinteraktion ist also nicht nur geprägt von antiviralen Schutzmechanismen der Zelle, sondern auch von der viralen Nutzung dieser Mechanismen zur Replikation (Basler und Garcia-Sastre 2002; Ehrhardt et al. 2006; Garcia-Sastre 2001; Kash et al. 2006; McLean et al. 2008). Zeitlich betrachtet ist der Vorgang der initialen Virusreplikation und Freisetzung wesentlich schneller als die Exekution der Apoptose (Kurokawa et al. 1999).

Die hier zitierten grundlegenden Zusammenhänge von Influenza-Virusinfektion und Apoptose wurden in statischen Zellkulturen, unter anderem von MDCK-Zellen untersucht. Mit Ausnahme von im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichten Beiträgen finden sich in der Fachliteratur keine Hinweise auf Untersuchungen zur Influenzavirus-induzierten Apoptose in Zellkulturen im Bioreaktormaßstab.

Für die Produktion von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten Proteinen wurde durch genetische Veränderung der Apoptose eine Ausbeutesteigerung erreicht (Al-Rubeai und Singh 1998). Basierend auf mathematischen Modellen zur HIV-Replikation wurde postuliert, dass die Verlängerung der Lebensdauer einer infizierten Zelle wesentlich für die Effizienz der viralen Replikation ist (Gilchrist et al. 2004). Analog dazu könnte eine Verlängerung der Lebensdauer der Zellen auch im Fall der Influenza-Virusproduktion zu einer Ausbeutesteigerung führen (Möhler et al. 2005). Zusätzlich ist es sehr wahrscheinlich, dass durch eine Verringerung der Zelllyse als Folge der Apoptose auch die Kontamination mit Wirtszellproteinen und –DNA in geklärten Fermenterernten verringert werden könnte. Dies würde sowohl die Produktaufreinigung (Downstream-Processing), als auch die Einhaltung der in den Pharmakopöen geforderten Grenzwerte für Verunreinigungen in Influenza-Impfstoffen erleichtern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zur Analyse des Zusammenhangs von Apoptose und Influenza-Virusinfektion in Zellkulturen im Bioreaktor die gewonnenen Erkenntnisse für Ansätze zur Virusausbeutesteigerung genutzt. Dazu wurde die Virus-Wirtszell-Interaktion gezielt durch Apoptoseinduktion bzw. –inhibition gestört. Im Rahmen der chemisch induzierten bzw. inhibierten Apoptose sollte der Frage nachgegangen werden, ob es mit verhältnismäßig einfachen Ansätzen möglich ist, die Virusreplikation in Microcarrierkulturen zu beeinflussen (Kapitel 4.5).

2.7 Die Quantifizierung der Influenza-Virusinfektion

Die Influenza-Virusinfektion von Zellkulturen wird häufig über die Freisetzung von Viruspartikeln in das Medium nachgewiesen und quantifiziert. Aufgrund der großen Bandbreite der auftretenden Virustiter beruhen die klassischen Methoden meist auf Verdünnungsreihen. Dazu zählen neben dem Hämagglutinationstest (siehe Kapitel 3.6.2) der Radialimmunodiffusionstest (SRID, Williams 1993), der Plaquetest (Gaush und Smith 1968; Huprikar und Rabinowitz 1980; Tobita et al. 1975) und die Immunitration zur Bestimmung infektiöser Viruspartikel (siehe Kapitel 3.6.3). Neuere Methoden zur Gesamtvirusquantifizierung nutzen spezielle Einzelpartikel-Messgeräte (Ferris et al. 2002) bzw. Immunbindung an Mikropartikel (Yan et al. 2005). Eine weitere Technik der Influenza-Virusquantifizierung und -diagnostik basiert auf der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und wird sowohl für klinische Proben als auch für Zellkulturen eingesetzt (Di Trani et al. 2006; Lee und Suarez 2004; Magnard et al. 1999; van Elden et al. 2001; Youil et al. 2004). Alternativ kann zum Nachweis der intrazellulären Virusreplikation die RNA-Hybridisierung eingesetzt werden (Rimmelzwaan et al. 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Infektion von MDCK-Zellen mit verschiedenen Influenza A-Virusstämmen mittels Durchfluscytometrie zu quantifizieren. Die Eignung der Methode für eine möglichst große Bandbreite von Influenza A-Virusstämmen war dabei von besonderem Interesse. Zusätzlich dazu wäre die Eignung der Infektionsdetektion zur Prozesscharakterisierung entsprechend der Process Analytical Technology-Initiative (PAT, United States Department of Health and Human Services 2004) vorteilhaft. Dabei erfordern die wechselnden Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Influenza-Impfstoffzusammensetzung (Gerdil 2003) eine möglichst universelle Eignung der Methode.

Auf der Ebene zellbasierter Methoden kann die Translation viraler Proteine mit Antikörpern detektiert werden. Monoklonale Antikörper sind im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern hochspezifisch, da sie nur ein Epitop erkennen. Der Vorteil der verringerten Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Bindungen der Paratope von monoklonalen Antikörpern ist jedoch mit dem Nachteil einer hohen Empfindlichkeit bezüglich Variationen des Epitops verbunden (Macey 2007). Die Detektion von Antikörper-vermittelten Fluoreszenzfärbungen kann mikroskopisch oder durchfluscytometrisch erfolgen.

Durchfluscytometrische Quantifizierungen infizierter Zellen wurden für Rotavirus (Barardi et al. 1998; Chaibi et al. 2005) sowie Herpes simplex Virus Typ 1 und Influenza C-Virus (Steele-Mortimer et al. 1990) beschrieben. Die mikroskopische Quantifizierung von mit

Influenzavirus-infizierten MDCK-Zellen mit polyklonalen Antikörpern wurde für equines Influenza A-Virus beschrieben (Möhler et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde auch ein monoklonaler Antikörper gegen Influenza-Nukleoprotein (anti-NP-mAK) zur mikroskopischen Detektion der Human-Influenza-Virusinfektion in MDCK-Zellen (Price et al. 1997; Rimmelzwaan et al. 1998) und Schweinelungen-Epithelzellen (Seo et al. 2001) verwendet. Der direkte Vergleich der mikroskopischen Färbung mit einem NP-spezifischen Antikörper mit der RNA-Hybridisierung zeigte eine vergleichbare Sensitivität, die über der Empfindlichkeit des Hämagglutinationstests lag (Rimmelzwaan et al. 1998). Der gleiche Antikörper wurde auch für die indirekte durchfluscytometrische Quantifizierung infektiöser Viruspartikel über die Quantifizierung infizierter Zellen verwendet (Lonsdale et al. 2003). Der Antikörper wurde mehrfach auch mit FITC konjugiert zur direkten Immunfärbung eingesetzt (Lonsdale et al. 2003; Price et al. 1997; Rimmelzwaan et al. 1998).

Der anti-NP-mAK wurde nach Infektion mit humanem Influenza A Puerto Rico/8/34 (H1N1) gebildet (Walls et al. 1986a) und zeigte Spezifität gegen das Nukleoprotein einer größeren Anzahl von Humaninfluenza-Stämmen (Lonsdale et al. 2003; Rimmelzwaan et al. 1998; Walls et al. 1986a). Parallel zum anti-NP-mAK wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Matrixprotein (M1) von humanem Influenza A Puerto Rico/8/34 (H1N1) isoliert und auf Spezifität gegen die gleichen Humaninfluenza-Virusstämme getestet. Die größte Spezifitätsbandbreite gegen verschiedene humane Influenza A-Virusstämme zeigte dabei die Kombination der Antikörper gegen NP und M1 (Walls et al. 1986a). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Antikörperkombination zur mikroskopischen Detektion von Influenza A-Virusinfektionen in klinischen Proben und Zellkulturen etabliert (Walls et al. 1986b) und kommerziell vertrieben (IMAGEN Influenza Virus A and B Kit Reagent A, DakoCytomation, Nr. K6105).

Im Folgenden wird sowohl für das Gemisch der Antikörper (Kapitel 4.2.1) als auch jeweils die einzelnen Antikörper (Kapitel 4.2.3) die Eignung zur durchfluscytometrischen Quantifizierung der Influenza A-Virusinfektion mit verschiedenen Virusstämmen gezeigt. Ergebnisse für die parallele Quantifizierung infizierter und apoptotischer Zellen während Bioreaktorkultivierungen zur Virusproduktion sind in Kapitel 4.4 beschrieben. Teile der Ergebnisse der Methodenentwicklung zur Infektionsdetektion wurden veröffentlicht (Schulze-Horsel et al. 2008).

2.8 Abschätzung der Anzahl von Virusproteinen pro Zelle

Ein Ziel der Arbeit war zusätzlich zur Quantifizierung von infizierten Zellen die Abschätzung der Anzahl der Virusproteine pro Zelle. Als Grundlage dafür diente die Detektion von viralem Nukleoprotein in den Zellen mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper (Kapitel 2.7). Die Messdaten der Nukleoprotein-Antikörperfärbung können zusätzlich zur Bestimmung des Anteils infizierter Zellen in den gemessenen Zellpopulationen weitergehend ausgewertet werden. Voraussetzung für die quantitative Analyse ist zunächst die Kalibrierung der gemessenen Fluoreszeinisothiocyant (FITC)-Fluoreszenzintensitäten mit MESF-Standardpartikeln (vgl. Kapitel 2.4.2, 3.7.2 und 4.2).

Die Quantenausbeute von Fluoreszeinein, d.h. das Verhältnis von emittierten Quanten pro absorbiertem Quantum, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Neben dem pH-Wert und der Temperatur der Umgebung (Sjoberg et al. 1995) wird die Quantenausbeute maßgeblich durch die Konjugation an Partikel bzw. Proteine beeinflusst (Abbasi et al. 2002; Zuk et al. 1979). Im untersuchten experimentellen System lag Fluoreszeinein als FITC gebunden an MESF-Kalibrationspartikel und an monoklonale Antikörper (gegen Influenza A-Virus Nukleoprotein bzw. M1-Protein) vor. Über die Definition der FITC-Beladung der Kalibrationspartikel als MESF pro Partikel durch den Hersteller wird der Unterschied der Quantenausbeute des konjugierten FITC zum gelösten FITC kompensiert (Schwartz et al. 2004). Aufgrund der geringen Größe der Antikörpermoleküle im Vergleich zum Durchmesser des Laserstrahls kann die Quantenausbeute von Antikörper-konjugiertem FITC nicht durchflusscytometrisch bestimmt werden. Stattdessen werden Fluoreszenzspektrophotometer als Referenz-Messsystem verwendet, in dem sowohl die Fluoreszenz von Antikörper-konjugiertem als auch von Partikel-gebundenem Fluoreszeinein bestimmt werden kann. Um die Fluoreszenzausbeute pro FITC-Molekül gebunden an Kalibrationspartikel und gebunden an Antikörper vergleichen zu können, ist es nötig, die Fluoreszenz beider Analyten im gleichen Messsystem, also im Fluoreszenzspektrophotometer, zu quantifizieren (CLSI 2004). Dabei werden für das Durchflusscytometer und das Spektrophotometer die gleichen Anregungs- und Emissionswellenlängen verwendet, um die Vergleichbarkeit der Messungen beider Geräte zu verbessern. Zur Überprüfung der Linearität der Durchflusscytometermessungen können die MESF-Kalibrationsmessungen verwendet werden (Kapitel 3.7.2 und 4.2). Die Linearität der Spektrophotometermessungen kann durch das Messen von freiem Fluoreszeinein in unterschiedlichen bekannten Konzentrationen bestimmt werden (CLSI 2004).

Im linearen Messbereich des Fluoreszenzspektrophotometers (Sp) ist die gemessene Fluoreszenzintensität (I) abhängig von der molaren Fluoreszenzausbeute (a), der Konzentration von freiem Fluoreszein bzw. konjugiertem FITC (c) und der Hintergrundfluoreszenz (Leerwert) des Lösungsmittels ohne Fluorochrom (b) (Formel (2-6)). Durch die Bestimmung eines Leerwertes, d.h. des Lösungsmittels ohne Antikörper bzw. mit unkonjugierten Kalibrationspartikeln, lässt sich b bestimmen (Formel (2-8)). Im linearen Messbereich verhalten sich Durchfluscytometer (FC) analog zu Fluoreszenzspektrophotometern. Allerdings wird hier das in der Probe enthaltene FITC nicht in einer volumenbezogenen Konzentration sondern als partikelbezogene Teilchendichte (n') erfasst (Formel (2-7)). Durch das Messen von Antikörperlösungen und Partikelsuspensionen mit verschiedenen, bekannten FITC-Konzentrationen lassen sich durch lineare Regression die Werte von a_{Sp} für beide FITC-Konjugate bestimmen. Durchfluscytometrisch ist dies nur für die Kalibrationspartikel möglich. Die Antikörper können aufgrund der Größendifferenz der Moleküle (ca. 20 nm, Alberts et al. 1995) im Vergleich zum Durchmesser des Messstrahls (ca. 20 μ m, Givan 2001) nicht als Einzelpartikel erfasst werden. Die unterschiedliche Fluoreszenzausbeute von FITC in Abhängigkeit von der Konjugation an Antikörper (AK-FITC) bzw. Partikel (Bead-FITC) ist unabhängig von der Analysetechnik, da die Analyten physikalisch unverändert bleiben. Folglich wird angenommen, dass das Verhältnis der beiden Fluoreszenzausbeuten bei fluoreszenzspektrophotometrischen und durchfluscytometrischen Messungen gleich ist (Formel (2-8)). Entsprechend kann die nicht experimentell bestimmbare durchfluscytometrische Fluoreszenzausbeute von Antikörper-konjugiertem FITC ($a_{FC\ AK-FITC}$) durch die Bestimmung der übrigen Fluoreszenzausbeuten berechnet werden (Formel (2-9)). Darauf aufbauend berechnet sich die Teilchendichte von über Antikörper an Zellen oder Partikel gebundenem FITC ($n'_{AK-FITC}$) nach Formel (2-10).

$$I_{Sp} = a_{Sp} * c + b_{Sp} \quad (2-6)$$

$$I_{FC} = a_{FC} * n' + b_{FC} \quad (2-7)$$

$$\frac{a_{FC\ AK-FITC}}{a_{FC\ Bead-FITC}} = \frac{a_{Sp\ AK-FITC}}{a_{Sp\ Bead-FITC}} \quad (2-8)$$

$$a_{FC\ AK-FITC} = \frac{a_{Sp\ AK-FITC}}{a_{Sp\ Bead-FITC}} * a_{FC\ Bead-FITC} \quad (2-9)$$

$$n'_{AK-FITC} = \frac{I_{FC\ AK-FITC} - b_{FC\ AK-FITC}}{a_{FC\ AK-FITC}} \quad (2-10)$$

$$n'_{AK} = \frac{n'_{AK-FITC}}{\frac{F}{P}} \quad (2-11)$$

$$n_{AK} = n'_{AK} - n'_{AK \text{ Negativkontrolle}} \quad (2-12)$$

mit:

a	Fluoreszenzausbeute (I/c bzw. I/n'p)	[A.U./(mol/mL)] bzw. [A.U./(mol/Partikel)]
b	Hintergrundsignal, Leerwert	[A.U.]
c	Stoffkonzentration	[mol/mL]
F	Stoffmenge Fluorochrom	[mol]
I	Fluoreszenzintensität	[A.U.]
n_{AK}	spezifisch detektierte Antigendichte pro Zelle	[1/Partikel]
n'_{AK}	partikelbezogene Teilchendichte	[1/Partikel]
P	Stoffmenge Protein	[mol]

Indices:

AK	monoklonaler Antikörper
AK-FITC	FITC konjugiert an monoklonale Antikörper
Bead-FITC	FITC konjugiert an Kalibrationspartikel
FC	durchfluscytometrisch bestimmt
Sp	spektrophotometrisch bestimmt

Bei bekanntem Fluorochrom- zu Protein-Verhältnis (F/P) lässt sich die Teilchendichte der gebundenen Antikörpermoleküle pro Zelle oder Partikel (n'_{AK}) berechnen (Formel (2-11)). Die Anzahl *spezifisch* an Zellen oder Partikel gebundener Antikörper (n_{AK}) ergibt sich aus dem n'_{AK} einer gemessenen Probe abzüglich der n'_{AK} einer entsprechenden Negativkontrolle, bei der nur unspezifische Antikörperbindung auftritt (Formel (2-12)). Monoklonale Antikörper zeichnen sich durch hohe Epitopspezifität aus. Für den Fall eines Proteins, das weder repetitive Aminosäuresequenzen aufweist, noch aus homologen Untereinheiten aufgebaut ist, wird daher angenommen, dass unter Sättigungsbedingungen maximal ein Molekül des für dieses Protein spezifischen Antikörpers pro Antigen bindet. Das Bindungsverhältnis von Antikörper- zu Antigenmolekülen kann jedoch beispielsweise aufgrund ungünstiger Proteinkonformationen oder anderen sterischen Hindernissen für die Antikörperbindung verringert werden. Im vorliegenden Fall des Influenza-Nukleoprotein und -Matrixproteins wird ein ideales Bindungsverhältnis von einem Antikörpermolekül pro Antigen angenommen, um eine Überschätzung der Antigenanzahl pro infizierter Zelle auszuschließen. Aufgrund der getroffenen Annahmen ist also eine genauere Bestimmung der zellulären Virusproteinkopienzahl aus Durchfluscytometrie-Messungen nicht möglich. Die berechneten Werte stellen eine Abschätzung dar. Die Abschätzung der detektierten Kopienzahl von Virusproteinen liefert jedoch Einblicke in den Verlauf der Virusreplikation, die die

Information, die aus Virustitern in Kulturüberstand und dem Infektionsgrad der Kultur gewonnen werden kann, ergänzt. Dadurch ist es zumindest teilweise möglich, die Informationslücke zwischen der Infektion der Zelle (cytometrisch quantifiziert) und dem Virusbudding (Titerbestimmung im Überstand) zu schließen.

3 Material und Methoden

Zählen und Messen sind die Grundlagen der fruchtbarsten, sichersten und genauesten wissenschaftlichen Methoden, die wir überhaupt kennen.

Hermann Ludwig Ferdinand von Helmholtz

In diesem Kapitel sind die für die Kulturführung der Zellen verwendeten Methoden und Kultursysteme zusammengefasst. Die analytischen Methoden werden erläutert, bei etablierten Standardmethoden wird zusätzlich auf die entsprechenden Arbeitsanweisungen im Anhang verwiesen (Kapitel 8.3). Details zu verwendeten Geräten und Chemikalien sind ebenfalls im Anhang aufgeführt (Kapitel 8.1 bzw. Kapitel 0).

3.1 Verwendete Lösungen für Zellkultur und Analytik

Für die Kultivierung von Zellen und die Analytik wurden verschiedene Lösungen verwendet, deren Zusammensetzungen in den nachfolgenden Tabellen sowie im Anhang (Kapitel 0 und Kapitel 8.3) aufgeführt sind.

Tabelle 3-1: Serumhaltiges Zellkulturmedium

Komponente	Konzentration / mL/L
GMEM Flüssigmedium (sterilfiltriert)	890
FCS	100
Lab-M-Pepton (Stammlösung 20 % in Reinstwasser, autoklaviert)	10

Die Komponenten wurden steril vereinigt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3-2: Serumfreies Viruskulturmedium

Komponente	Konzentration / mL/L
GMEM Flüssigmedium (sterilfiltriert)	990
Lab-M- Pepton (Stammlösung 20 % in Reinstwasser, autoklaviert)	10

Die Komponenten wurden steril vereinigt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3-3: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

Komponente	Konzentration / g/L
NaCl	8,00
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,15

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 3-4: Trypsin/EDTA-Lösung (10x) für die Zellkultur

Komponente	Menge
PBS	ad 100 mL
Trypsin	0,5 g
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	0,2 g

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. 1x-Trypsin-Lösung wurde durch Verdünnung mit PBS hergestellt.

Tabelle 3-5: Cytometriepuffer

Komponente	Menge
Reinstwasser	ad 1 L
Glycin	20 g
Bovines Serumalbumin	1 g

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.2 Zellkulturführung

Für die beschriebenen Versuche wurden hauptsächlich MDCK-Zellen (ECACC, Nr. 84121903) verwendet. Zusätzlich wurden auch Vero-Zellen (ECACC, Nr. 88020401) kultiviert. Die etablierten Zelllinien wurden aus Kryokulturen (working cell bank) angezogen und nur bis zur 20. Passage kultiviert, um genetische Veränderungen und Seneszenz zu vermeiden. Die Herstellung des verwendeten Zellkulturmediums (Tabelle 3-1) ist in den Arbeitsanweisungen M/02 (Kapitel 8.3.1) und M/03 (Kapitel 8.3.2) beschrieben.

Für die Passagierung der adhärenen Zelllinien wurde die Zelladhäsion durch Trypsin und EDTA (Tabelle 8-1) gelöst (Arbeitsanweisung Z/04, Kapitel 8.3.3). Um vorher Proteinbestandteile des Mediums abzureichern und so die Wirksamkeit der Zellablösung zu erhöhen, wurden die Zellen zuvor zweifach mit PBS gewaschen. Nach der Zellablösung bei 37 °C wurde die Ablösungsreaktion mit einem äquivalenten Volumen an vorgewärmtem Zellkulturmedium abgestoppt, um die Bildung von Zellaggregaten zu minimieren. Anschließend wurde die Zellsuspension mit frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium in anderen Kulturgefäßen weiterkultiviert. Entsprechend der Zellwachstumsfläche wurden die verwendeten Volumina an PBS, Trypsinlösung und Medium angepasst (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Verwendete Mengen an PBS, Trypsin und Z-Medium in Kulturflaschen

Kulturgefäß	Waschen mit PBS (mL)	Ablösen mit 1x-Trypsin- Lsg. (mL)	Z-Medium (mL)
25 cm ² -Flasche	5-10	1	15
75 cm ² -Flasche	10-15	2-3	50
175 cm ² -Flasche	15-20	5-6	100
850 cm ² -Rollerflasche	40-50	10-15	250

Die statische Kultivierung erfolgte im Brutschrank mit 5 % Kohlendioxid bei 37 °C. Die Rollerflaschen wurden luftdicht verschlossen und im Rollerflaschenschrank mit 0,66 U/min bei 37 °C kultiviert.

Die Kultivierung in Sechs-Well-Platten (10 cm²/Well) für Reihenversuche wurde standardisiert durchgeführt, um die biologische Varianz zu minimieren. Das Inokulum für die Sechs-Well-Platten wurde aus 7 Tage inkubierten 175 cm²-Flaschen bereitgestellt. Die Einsaat-Zelldichte betrug für die Vorkultur und die Sechs-Well-Platten 7,5 x 10⁴ Zellen/cm². Das Inokulum wurde entsprechend der benötigten Zellzahl von 7,5 x 10⁵ Zellen/Well und dem Kulturvolumen von 4 mL/Well mit Zellkulturmedium verdünnt und eingesät.

3.3 Influenza-Virusinfektion und Scheininfektion

Für die Infektion der kultivierten Zellen nach der Zellwachstumsphase wurden verschiedene an die jeweilige Zelllinie adaptierte Influenza A-Virusstämme verwendet (Tabelle 3-7).

Vor der Infektion wurde das serumhaltige Zellkulturmedium gegen serumfreies Virusmedium ausgetauscht. Zur möglichst starken Abreicherung von Serumbestandteilen sowie des

verbrauchten Zellkulturmediums wurden nach Entfernen des Zellkulturmediums sukzessiv mehrere Waschstufen mit PBS bis zu einem Verdünnungsfaktor > 1000 durchgeführt. Anschließend wurde das vorgewärmte Viruskulturmedium zugegeben. Zur Spaltung des viralen Hämagglutinins wurde dem Medium Trypsin in einer Konzentration von 10 mg/L bzw. etwa 2×10^{-6} Units/Zelle zugesetzt. Die Kulturbedingungen (Temperatur, pH, Begasung, Durchmischung) während der Viruskultivierung waren identisch zur Zellkultivierung.

Tabelle 3-7: Verwendete Influenza-Virusstämme

Stamm	Subtyp	Quelle
equin A Newmarket/1/93	H3N8	NIBSC
porcin A Bakum/1832/00	H1N2	Impfstoffwerke Dessau-Tornau
human A Puerto Rico/8/34	H1N1	NIBSC
human A Puerto Rico /8/34	H1N1	Robert-Koch-Institut
human A Wisconsin/67/05 hgr*	H3N2	NIBSC

*hgr: high growth reassortant

Das Volumen des zugegebenen Saatvirus $V_{\text{Saatvirus}}$ richtete sich nach der Konzentration infektiöser Viren im Saatvirus $c_{\text{IVP Saatvirus}}$ sowie dem gewünschten Infektionsverhältnis (Multiplicity of Infection (MOI), Gleichung (3-1)).

Für Scheininfektionen (mock-Infektionen) wurden die Zellen analog zur Virusinfektion vorbereitet. Anschließend wurden Virusmedium und Trypsin ohne Saatvirus zugegeben.

$$V_{\text{Saatvirus}} = \frac{N_{\text{gesamt}}}{c_{\text{IVP Saatvirus}}} \times \text{MOI} \quad (3-1)$$

mit

$V_{\text{Saatvirus}}$	Volumen des zugegebenen Saatvirus	[mL]
N_{gesamt}	Gesamtzellzahl (lebend)	[Zellen]
$c_{\text{IVP Saatvirus}}$	Konzentration infektiöser Viruspartikel	[Viren/mL]
MOI	Infektionsverhältnis	[Viren/Zelle]

In Sechs-Well-Platten erfolgte die Infektion nach 72 h Zellwachstum. Für die Berechnung von Kulturvolumen und Saatvirusvolumen wurden die Zellen einer Sechs-Well-Platte durch Trypsinieren suspendiert und sechsfach automatisch gezählt (Kapitel 3.6.1). Unter der Annahme, dass die adhärennten Zellen in den Wells zum Zeitpunkt der Trypsinierung vital waren und die gemessenen toten Zellen lediglich durch die Probenvorbereitung geschädigt wurden, wurde die Gesamtzellzahl als Berechnungsgrundlage für die MOI verwendet.

Während der Durchführung der Sechs-Well-Plattenversuche zeigte sich, dass in der Virusphase ein Teil der Flüssigkeit aus den Wells durch Verdunstung verloren geht. Bei den Sechs-Well-Platten handelt es sich um ein offenes System, wodurch Flüssigkeit aus dem System entweichen kann oder sich auch am Deckel niederschlägt. Zur Bestimmung der Verdunstung wurden die Platten direkt nach der Infektion und vor der Ernte gewogen. Aus der Differenz ließ sich der Volumenverlust je Well berechnen. Der durchschnittliche Volumenverlust betrug in vier Tagen 300 μl je Well, dies entsprach etwa 10 – 15 %. Durch die Verdunstung ändert sich die Zell- und Viruskonzentration in den Wells. Daher wurde der spezifische Ausbeutekoeffizient über die Gesamtviruszahl und die Gesamtzellzahl je Well berechnet. Dazu wurde die über den HA-Assay bestimmte Viruskonzentration mit dem Kulturvolumen verrechnet.

3.4 Bioreaktorkultivierungen

Die Kultivierung von Zellen im Bioreaktor erfolgte satzweise in Rührkesselreaktoren. Dabei wurden verschiedene Reaktoren mit vergleichbarem Aufbau eingesetzt (Abbildung 3-1). Die verwendeten Reaktoren unterschieden sich jedoch in ihren maximalen Arbeitsvolumina (Tabelle 3-8). Die Kultivierungsbedingungen waren weitestgehend identisch. Die Rührergeschwindigkeit wurde möglichst gering gehalten, um eine starke Scherbelastung der Zellen zu vermeiden, gleichzeitig jedoch das Absinken der Microcarrier auf den Reaktorboden zu verhindern.

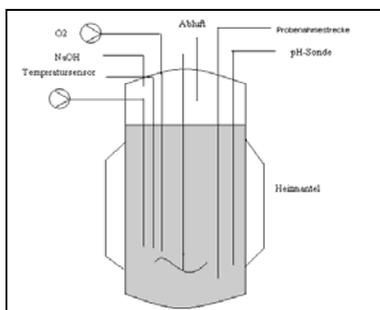


Abbildung 3-1: Vereinfachte schematische Darstellung der verwendeten Bioreaktoren (Schulze 2007)

Kultivierungsbedingungen: Begasung über Tauchrohr bzw. Fritte mit sterilfiltriertem O_2 , Regelung auf $\geq 40\%$ Luftsättigung; Kultivierungstemperatur $37\text{ }^\circ\text{C}$; pH-Regelung mit CO_2 und NaOH (1 mol/L) auf pH 7,2-7,3; Durchmischung mit Schrägblattrührer bei 50-60 U/min; sterile Probenahme über Probenahmeventil bzw. Tauchrohr

Als Wachstumsoberfläche für die kultivierten Zellen wurden Cytodex 1-Microcarrier (GE Healthcare, Nr. 17-0448-03) in einer Konzentration von 2 g/L bereitgestellt. Dies entspricht einer Partikelkonzentration von etwa 8000 Microcarriern/mL und einer Wachstumsoberfläche von ca. 9 cm²/mL (Bock 2003; Bock et al. 2009). Die Einsatzzellendichte betrug zwischen 2,0 und 3,0 x10⁵ Zellen/mL, was einem Einsaatverhältnis von 25 bis 38 Zellen/Microcarrier entspricht.

Für Fermentationen mit einem Volumen bis 1,2 L wurde eine sterile Stammlösung mit 40 g Microcarrier/L verwendet, für größere Volumina wurde die benötigte Microcarrier-Menge eigens für den jeweiligen Versuch vorbereitet. Die Vorbereitung der Microcarrier erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (GE Healthcare 2005).

Tabelle 3-8: Übersicht über die verwendeten Bioreaktoren

Hersteller	Reaktorsystem	Arbeitsvolumen	Regelungssoftware
BBraun	Biostat 5L	5 L	PCS7 (Siemens)
	Biostat 15L	15 L	MFC5 (BBraun)
DasGip	Cellferm Pro Simple Spinner*	1 L	Cellferm Pro (DasGip)
	Cellferm Pro Spinner BS 1600	1,2 L	Cellferm Pro (DasGip)
Infors	Sixfors	0,5 L	IRIS (Infors)

* ausgestattet mit Klöppel- statt Schrägblattrührer

Die Kulturbedingungen wurden aus Veröffentlichungen zur Kultur von MDCK-Zellen im Reaktormaßstab übernommen (Genzel et al. 2004a; Genzel et al. 2006a). Über integrierte Sonden wurden die Mediumstemperatur, das Hydroniumionenpotenzial (pH), und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) on-line gemessen und aufgezeichnet. Die Begasung der Bioreaktoren erfolgte über ein Tauchrohr bzw. eine Fritte pulsweise mit Sauerstoff. Der Sollwert für die Sauerstoffregelung betrug 40 % Luftsättigung. Zur pH-Regelung auf einen Sollwert von pH 7,2 bis 7,3 wurden Kohlenstoffdioxid und Natronlauge (1 mol/L) verwendet. Die Temperaturregelung auf 37 °C erfolgte über die Wassertemperatur im Doppelmantel (Biostat-Reaktoren) bzw. elektrische Heizmäntel (Sixfors, DasGip).

3.5 Probenahme für die Durchfluscytometrie

Für die durchfluscytometrische Analyse von Zellen ist das Vorliegen der Zellen als Einzelzellen erforderlich. Dementsprechend wurden die adhärenenten Zellen durch Trypsinierung vereinzelt (Schulze-Horsel et al. 2008). In Abbildung 3-2 ist der Ablauf der Probenahme von Bioreaktorproben mit Zellen auf Microcarriern dargestellt. Zellproben aus statischer Kultur und Rollerflaschen wurden wie in Kapitel 3.2 dargestellt abgelöst und anschließend analog zu Bioreaktorproben weiterbearbeitet.

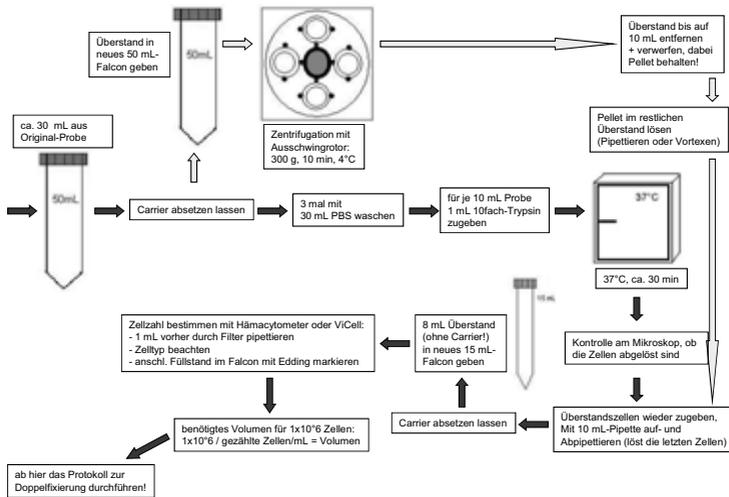


Abbildung 3-2 : Schematische Darstellung der Probenahme für die Durchfluscytometrie

Die Proben aus dem Bioreaktor wurden zunächst durch Sedimentation in Kulturüberstand mit Überstandszellen und Microcarrier mit adhärenenten Zellen getrennt. Das Sediment wurde dreimal mit PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen mit 10x konzentriertem Trypsin von den Microcarriern gelöst. Währenddessen wurden die Überstandszellen durch Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) und Einengen des Überstandes aufkonzentriert. Nach dem Ablösen der adhärenenten Zellen wurden diese mit den Überstandszellen vereinigt und die Zellkonzentration bestimmt. Alternativ wurden beide Zellsuspensionen getrennt weiterverarbeitet, um beide Zellpopulationen getrennt charakterisieren zu können. Nach der Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zellen entweder sofort gefärbt (vgl. Apoptosequantifizierung über die Pancaspase-Aktivität, Kapitel 3.7.4) oder für spätere Cytometermessungen fixiert.

Für die Bestimmung des zellulären DNA-Gehaltes (Kapitel 3.7.3) wurde zunächst die Zellkonzentration bestimmt, anschließend wurden die Zellen in Aliquote von 1×10^6 Zellen in Ethanol (70 %, -20 °C) fixiert und bei -20 °C gelagert.

Die Apoptosequantifizierung über DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay, Kapitel 3.7.5) erforderte die Quervernetzung der DNA-Bruchstücke mit Proteinen durch Fixierung mit 2 %iger Paraformaldehydlösung (Tabelle 3-9). Dazu wurde das gleiche Volumen an Paraformaldehydlösung zur Zellsuspension zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die zweite Fixierung der Zellsuspensionen aliquotiert in Ethanol (70 %, -20 °C). Die Zellen für die spätere Infektionsdetektion (Kapitel 3.7.6) konnten sowohl nur durch Ethanol als auch durch Paraformaldehyd und Ethanol fixiert werden (Schulze-Horsel et al. 2008).

Tabelle 3-9: 2 % ige Paraformaldehydlösung

Komponente	Menge
PBS	ad 500 mL
Paraformaldehyd	10 g
NaOH (5 mol/L)	variabel
HCl (5 mol/L)	variabel
HCl (1 mol/L)	variabel

Zu PBS und Paraformaldehyd wurde bis zur vollständigen Lösung des Paraformaldehyd NaOH zugegeben. Anschließend wurde mit HCl das pH auf 7,0 eingestellt.

3.6 Analytische Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten analytischen Methoden beschrieben. Bei Standardmethoden der Zell- und Viruskultur wird auf arbeitsgruppeninterne Arbeitsanweisungen verwiesen, die im Anhang detailliert aufgeführt sind.

3.6.1 Bestimmung der Zellkonzentration und -vitalität

Zellkonzentration adhärenter Zellen

Die Konzentration adhärenter Zellen wurde nach Variante 2 der Vorschrift Z/01.1 (Kapitel 8.3.4) bestimmt. Dazu wurden die Zellkonzentration und Microcarrier-Anzahl in Mikrotiterplatten-Vertiefungen bestimmt. Unter der Annahme, dass eine Microcarrierkonzentration von

2 g/L Cytodex 1 stets einer Partikelkonzentration von 8000 Microcarriern/mL entspricht, konnte die volumetrische Zellkonzentration näherungsweise bestimmt werden (Bock et al. 2009). Zur Steigerung der Präzision wurde die Konzentration der adhärennten Zellen dreifach bestimmt.

Manuelle Bestimmung der Überstandszellkonzentration

Die Konzentration von Überstandszellen wurde entsprechend der Arbeitsanweisung Z/01 (Kapitel 8.3.5) als Doppelbestimmung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammern manuell durchgeführt. Die manuelle Bestimmung der Überstandszellkonzentration war teilweise von der subjektiven Einschätzung der zählenden Person beeinflusst, insbesondere während der Viruskultivierungen, da hier mit zunehmender Infektionszeit die Abgrenzung von Zellen und Zelldebris erschwert war. Zur Minimierung dieser Fehlerquelle wurde die Anzahl der probenehmenden Personen pro Versuch auf ein Minimum reduziert. Durch diese Maßnahme wurden auch Unterschiede bei der Durchführung der Probennahmen minimiert.

Automatische Bestimmung der Überstandszellkonzentration

Alternativ zur manuellen Zellzählung wurde bei einem Teil der Versuche die Konzentration von Überstandszellen mit einem ViCell XR (Beckman Coulter) automatisch bestimmt (Arbeitsanweisung G/21, Kapitel 8.3.6). Dazu wurde anhand der mikroskopischen Bilder des Geräts der Zelltyp MDCK100 vordefiniert und in der Arbeitsanweisung dokumentiert. Zur Erhöhung der Präzision der Messungen, insbesondere im unteren Konzentrationsbereich, wurden pro Messung 100 Bilder einer Probe analysiert. Im validierten Arbeitsbereich von $9,6 \times 10^4$ bis $1,0 \times 10^7$ Zellen/mL lag die gewichtete mittlere Verfahrensstandardabweichung bei 9,0 %.

Bei der Zellkonzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen, die auch Microcarrier enthielten, war vor der Zellzählung die Filtration der Probe mit Aufsatzfiltern (Netzweite 100 μm , Partec Celltrics, Nr. 04-0042-2318) erforderlich, um eine Verstopfung der Flusskammer (100 μm Höhe) mit Microcarriern zu verhindern. Ein Einfluss der Filtration auf das Messergebnis wurde dabei nicht beobachtet.

Trypanblaufärbung zur Vitalitätsbestimmung

Vitale und tote Überstandszellen wurden sowohl bei der manuellen als auch der automatischen Bestimmung mittels Trypanblaufärbung voneinander unterschieden (Arbeitsanweisung Z/01, Kapitel 8.3.5 bzw. Arbeitsanweisung G/21, Kapitel 8.3.6). Der anionische Farbstoff Trypanblau kann nicht in vitale Zellen mit intakter Cytoplasmamembran eindringen, während tote Zellen aufgrund geschädigter Membranen blau gefärbt werden (Altman et al. 1993; Tennant 1964).

3.6.2 Hämagglutinationstest

Die Bindung des viralen Oberflächenproteins Hämagglutinin an N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) auf Hühnererythrozyten wurde zur indirekten Quantifizierung von Influenza-Viren genutzt (Hirst 1941; Kalbfuss et al. 2008; Mahy und Kangro 1996). Unabhängig von der Infektiösität tragen alle Viruspartikel mit HA-Aktivität zur Hämagglutination bei. Daher wird zwischen dem Gesamtvirustiter (bestimmt über die Hämagglutination) und dem Titer infektiöser Viren (bestimmt durch Immuntitration, vgl. Kapitel 3.6.3) unterschieden. Die Vernetzung der Erythrozyten (Hämagglutination) mit Viruspartikeln mit HA-Aktivität verhindert deren freie Sedimentation in Rundbodenkavitäten. Liegen in einem Gemisch von Erythrozyten und Viruspartikeln die Erythrozyten im Überschuss vor, entstehen nach Inkubation am tiefsten Punkt der Kavitäten Zellansammlungen, die makroskopisch als roter Punkt sichtbar sind. Im Fall eines Virusüberschusses bildet sich ein Netz von agglutinierten Erythrozyten, welches großflächig sedimentiert. Als HA-Titer wird die höchste Stufe einer Verdünnungsreihe bezeichnet, bei der noch Hämagglutination auftritt. Hier wurde davon ausgegangen, dass die Konzentration von Viruspartikeln und Erythrozyten gleich ist (Burluson F.G. 1992). Der Titer wird, je nach Darstellung, als HA-Aktivität (\log HAU/100 μ L) bzw. als Viruspartikel-Konzentration c_{VP} (Viruspartikel/mL) dargestellt. Dabei erfolgte die Umrechnung nach Gleichung (3-2).

$$c_{VP} = c_{RBC} \times 10^{HA} \quad (3-2)$$

mit

c_{VP}	Gesamtviruskonzentration	[Viren/mL]
c_{RBC}	Erythrozytenkonzentration	[Zellen/mL]
HA	Gesamtvirustiter	[\log HAU/100 μ L]

Das Prinzip der Hämagglutination wurde in zwei Methoden angewandt. Einige Messungen erfolgten nach Arbeitsanweisung V/0.1 (Kapitel 8.3.7) mit Verdünnungsreihen in 1:2-Schritten und manueller Auswertung (basierend auf Mahy und Kangro 1996) mit Modifikationen nach Genzel et al. 2004a. Diese Methode besitzt ein Detektionslimit von $2,0 \times 10^7$ Viren/mL und einem Standardfehler von $\pm 0,3 \log$ HAU/100 μ L.

Der größte Teil der Messungen erfolgte mit automatischer Auswertung von $1:2^{0,5}$ Verdünnungsschritten und photometrischer Messung entsprechend der Arbeitsanweisung HA Methoden-SOP (Kapitel 8.3.8). Bei Validierungsmessungen mit mehreren Experimentatoren lag das mittlere Vertrauensintervall (95 %) der HA-Aktivität (in HAU) bei +15 % und -13 % (Kalbfuss et al. 2008). Die Methode nach Kalbfuss wurde aufgrund der höheren Präzision bevorzugt.

3.6.3 Immunotitration infektiöser Influenza-Viren

Die Konzentration infektiöser Influenza-Viren, definiert als kulturinfektiöse Dosis (tissue-culture infectious dose, TCID₅₀), wurde durch Immuntitration bestimmt (Mahy und Kangro 1996, mit Modifikationen nach Genzel et al. 2006b). Die Durchführung erfolgte entsprechend der Arbeitsanweisung V/08 (Kapitel 8.3.9), die Berechnung der Titer entsprechend Kaerber 1931. Die untere Nachweisgrenze der Methode liegt bei $3,2 \times 10^2$ infektiösen Viren/mL und einem Standardfehler von $\pm 0,3 \log$ TCID₅₀.

3.6.4 Metabolitquantifizierung

In zellfreien Zellkulturüberständen wurden die wichtigsten Metabolite quantifiziert. Dazu wurde entweder ein YSI 7100 (Yellow Springs Instruments) oder ein Bioprofile 100 Plus (Nova Biomedical) verwendet. Für die Ammoniumquantifizierung wurde alternativ zum Bioprofile 100 Plus ein Vitros DT II (Ortho Clinical Diagnostics) verwendet. Die validierten Arbeitsbereiche der Geräte inklusive der relativen Verfahrensstandardabweichung sind in Tabelle 3-10 dargestellt. Beim Überschreiten des validierten Konzentrationsbereiches wurden die Proben entsprechend verdünnt.

Tabelle 3-10: Validierte Arbeitsbereiche YSI 7100 und Bioprofile 100 plus

Analyt	Arbeitsbereich [mmol/L] ± rel. Verfahrensstandardabweichung	
	YSI 7100	Bioprofile 100 Plus
Glukose	0,88 – 2,8 ± 0,6	3,9 – 41,0 ± 1,9
Laktat	1,35 – 23,3 ± 1,0	8,4 – 33,3 ± 6,4
Glutamin	0,23 – 2,6 ± 1,6	0,25 – 2,6 ± 3,9
Glutamat	0,15 – 1,6 ± 1,8	0,29 – 2,6 ± 2,1
Ammonium	*0,1 – 0,31 ± 5,3	0,15 – 5,2 ± 4,5

* mit Vitros DT II bestimmt

3.6.5 Fluoreszenzspektrophotometrie

Zur Korrektur der Fluoreszenzausbeutedifferenz von Fluoreszein in Abhängigkeit von der Konjugation an Polystyrolpartikel bzw. IgG-Antikörper wurden Messungen mit einem Spektrophotometer (Varian Cary Eclipse) durchgeführt. Die verwendeten Messeinstellungen sind in Tabelle 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-11: Messeinstellungen für Varian Cary Eclipse

Parameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	488 nm
Spaltbreite für Anregungsfilter	5 nm
Emissionswellenlänge	525 nm
Spaltbreite für Emissionsfilter	5 nm
Photomultiplier-Spannung	600 V (Medium)

Als Referenzsystem für den Vergleich der Fluoreszenzausbeuten von konjugiertem Fluoreszein wurde gelöstes Fluoreszein (50 µM, Invitrogen, F36915) mit PBS verdünnt. Die Fluoreszeinlösung entspricht den Vorgaben des National Institute of Standards and Technology (NIST) als Standardreferenzmaterial 1932 (NIST-Traceable Standard, Schwartz et al. 2002). Bei allen Messungen wurde der pH-Wert konstant gehalten (pH 7,5). Es wurden Quarzglas-Küvetten mit einem minimalen Füllvolumen von 2 mL verwendet. Der Leerwert der Küvetten wurde mit Fluoreszein-freiem PBS aufgenommen.

3.7 Durchflussscytometrische Methoden

Im Folgenden sind die durchflussscytometrischen Methoden aufgeführt. Dazu zählen neben analytischen Messmethoden zur Quantifizierung der Apoptose, Influenza-Virusinfektion und der Zellzyklusphasenverteilung auch Methoden zur Gerätecharakterisierung.

3.7.1 Überprüfung der cytometrischen Messpräzision mit Mikropartikeln

Allgemein werden zur Sicherstellung der gleichbleibenden Präzision von Cytometermessungen arbeitstäglich Optik und Flüssigkeitsstrecke durch die Messung von standardisierten Fluoreszenzpartikeln kontrolliert (Calvelli et al. 1993).

Dazu wurde routinemäßig nach Erreichen der Betriebstemperatur des Argon-Lasers des Beckman Coulter XL Cytometers bei gleichbleibenden Geräteeinstellungen eine Messung mit Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter, Nr. 6605359) durchgeführt. Dabei wurden als Qualitätskriterium die Messzeit bis zum Erreichen von 10.000 gemessenen Partikeln sowie die Variationskoeffizienten der Peakbreite auf halber Peakhöhe (half-peak coefficient of variation, HPCV) aller Messsignale herangezogen. Gerätestörungen wurden dabei nicht beobachtet.

3.7.2 Fluoreszenzkalibration von cytometrischen Fluoreszein-Messungen

Zur qualitativen Auswertung von durchflussscytometrischen Fluoreszenzmessungen wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten als Moleküläquivalente des gelösten Farbstoffs (molecules of equivalent soluble fluorochrome, MESF) kalibriert (vgl. Kapitel 2.4.2).

Für die Kalibration von Fluoreszenzsignal 1 zur Messung von Fluoreszein (FITC) wurden die Partikelstandard-Kits Sphero FITC Calibration Particle Kit (Spherotech, Nr. ECFP-F1-5K) und Quantum FITC MESF High Level (Bangs Laboratories, Nr. 825A) mit Einzelstandards mit jeweils bekannter Molekülbeladung pro Partikel verwendet. Für Messungen mit dem IMAGEN-Antikörpergemisch (Kapitel 3.7.6) wurde die Kalibration mit dem Sphero FITC Calibration Particle Kit durchgeführt, für Messungen mit Nukleoprotein-spezifischen Antikörpern (insbesondere Kapitel 4.2.4) wurde mit Quantum FITC MESF High Level kalibriert. Die Fluoreszenzemission von FITC wurde dabei jeweils bei 525 nm (FL1) im Durchflussscytometer detektiert.

Zur Kalibration wurde jeder Fluoreszenzstandard dreifach mit den anschließend für die Probenmessung verwendeten Einstellungen für PMT-Spannung und -Verstärkung bestimmt. Die Kalibrationsgleichung wurde durch lineare Regression über die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität und die Farbstoffbeladung der Partikel (Herstellerangaben) berechnet. Ein Beispiel für die Kalibration ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

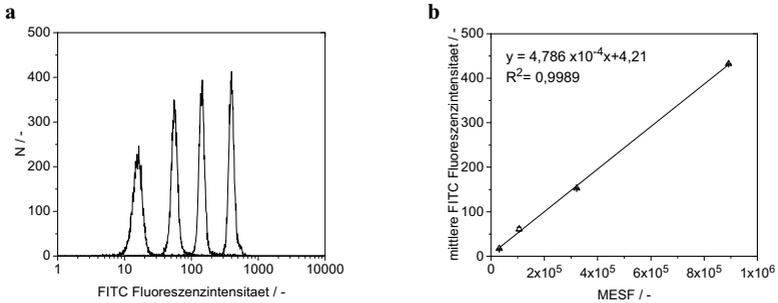


Abbildung 3-3: Beispiel der Kalibration von relativen FITC-Fluoreszenzintensitäten mit Quantum FITC MESF High Level Kalibrationspartikeln in PBS

a: Überlagerung der Fluoreszenz-Histogramme der einzelnen Partikelstandards von durchflusscytometrischen Messungen mit einem Beckman Coulter XL Cytometer

b: Regression der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Δ : Mittelwert \pm SD bei Dreifachbestimmung) über die MESF-Beladung der Kalibrationspartikel

3.7.3 DNA-Gehaltsbestimmung zur Analyse von Zellzyklus und Apoptose

Die durchflusscytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen kann zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung (Krishan 1975) und als qualitativer Apoptosenachweis (Nicoletti et al. 1991, Gong et al. 1994) verwendet werden. Grundlage dafür ist die stöchiometrische Färbung der zellulären DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen, sodass das resultierende Fluoreszenzsignal dem DNA-Gehalt entspricht (Abbildung 3-4). Zu diesem Zweck wurde die DNA in Ethanol-fixierten und mit Triton X100 (Sigma-Aldrich, Nr. T9284) permeabilisierten Zellen mit Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Nr. P4170) gefärbt (Basic Protocol 1, Darzynkiewicz und Juan 1997). Da Propidiumiodid sowohl an DNA als auch RNA bindet, wurde die zelluläre RNA durch RNase A (Sigma-Aldrich, Nr. R5125) abgebaut.

Tabelle 3-12: Färbungslösung zur DNA-Gehaltsbestimmung (für 10 Messungen)

Komponente	Volumen / μL
PBS	9000
RNase A-Lösung (2 mg/mL in PBS)*	1000
Propidiumiodid-Stammlösung (1 mg/mL in dH_2O)	200
Triton X100	10

* DNase-frei durch Erhitzen auf 100 °C für 5 min

Die Zellproben für die DNA-Gehaltsbestimmung wurden nach der Probennahme in Aliquote zu je 1×10^6 Zellen in 4,5 mL Ethanol (70 %, -20 °C) fixiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Probenvorbereitung wurden die gelagerten Proben zentrifugiert (20 min, 100 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Aliquote erneut zentrifugiert (30 min, 100 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellpellets in je 1 mL Färbungslösung (Tabelle 3-12) resuspendiert und für 40 min bei 37 °C auf einem Taumeltisch inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt in der Färbungslösung unverdünnt vermessen. Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung aus zwei unabhängig gefärbten Aliquoten. Die Fluoreszenzemission von Propidiumiodid wurde bei 620 nm (FL3) im Durchflusszytometer detektiert.

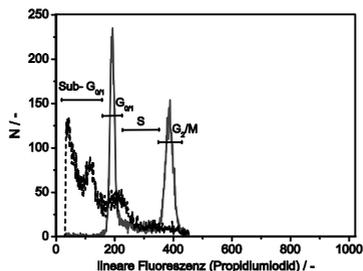


Abbildung 3-4: DNA-Gehaltsmessung von MDCK-Zellen nach Propidiumiodidfärbung Adhärenz Zellen auf Microcarriern (—) und Zellen im Kulturüberstand 14 h p.i. nach Infektion mit humanem Influenza A/PR/8/34 H1N1 NIBSC bei MOI 0,025; Marker (---): verringertes DNA-Gehalt durch Verlust kleiner DNA-Fragmente (Apoptose), vgl. Kapitel 2.5.2 (Sub- $G_{0/1}$), $G_{0/1}$ -Phase ($G_{0/1}$); DNA-Synthesephase (S); G_2 - und Metaphase (G_2/M)

Die in den Zellsuspensionen enthaltenen Einzelzellen wurden über Gating von Zellaggregaten unterschieden. Dazu wurde die Peakhöhe des Fluoreszenzsignals über der Peakfläche des Signals aufgetragen (Wersto et al. 2001). Die Auswertung der Zellzyklusverteilung aus der durchflusszytometrischen DNA-Gehaltsmessung erfolgte mit durch Gating vorausgewerteten Histogramm-Daten aus der Expo32-Analysesoftware (Beckman Coulter). Diese wurden mit der Software Cylchred (Universität Cardiff, Version 1.0.2) ausgewertet (Abbildung 3-5). Die

Software berechnet die Zellzyklusverteilung basierend auf Algorithmen von Watson et al. 1987 und Ormerod et al. 1987. Die Ergebnisse der Präzisionsbestimmung aus acht unabhängigen Messreihen mit Aliquoten der gleichen Proben sind in Tabelle 3-13 aufgeführt. Die Werte für das Verhältnis der relativen Fluoreszenzintensitäten des G_2/M -Peaks und des $G_{0/1}$ -Peaks ($I_{G_2/M}/I_{G_{0/1}}$) sind ein Maß für die Färbung mit Propidiumiodid im Überschuss. Der theoretische Idealwert von 2 wird dabei typischerweise nicht erreicht. Liegt Propidiumiodid nicht in ausreichender Konzentration vor, liegen die Werte weit unter 1,9. Zusätzlich wies die geringe Standardabweichung der Werte auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit hin. Dies wurde ebenfalls bei den gemessenen Zellzyklus-Phasenverteilungen beobachtet (Tabelle 3-13).

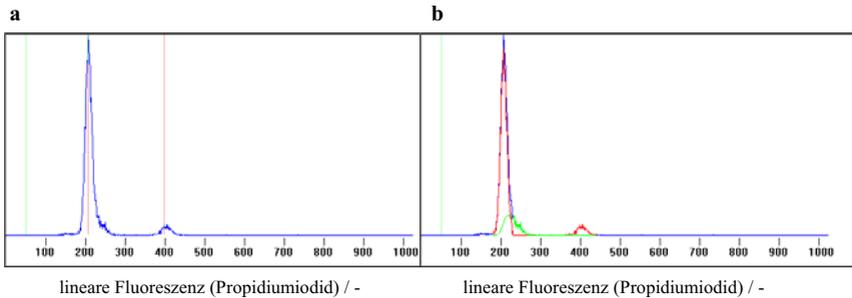


Abbildung 3-5: Auswertung von cytometrischen DNA-Gehaltshistogrammen mit Cylchred-Software

a: Automatische Erkennung der Peakposition (rote Balken) durch die Software; **b:** Anschliessende Dekonvolution der Zellzyklusphasen aus dem Histogramm: $G_{0/1}$ - und G_2/M -Phase (rote Kurve), Synthese-Phase (grüne Kurve)

Die im Laufe der Apoptose auftretende Endonuclease-Aktivität führt zur Fragmentierung der zellulären DNA in Oligonucleosomen (Kapitel 2.5.2). Wenn für die Fixierung von Zellen statt quervernetzenden Agentien (z.B. Formaldehyd) nicht-quervernetzende Agentien (z.B. Ethanol) verwendet werden, können kleinere Oligonucleosomen aus der Zelle austreten. Dadurch ist es möglich, die apoptotische DNA-Fragmentierung über den verringerten DNA-Gehalt (Sub- $G_{0/1}$ -DNA-Gehalt) in den betroffenen Zellen nachzuweisen (Darzynkiewicz und Juan 1997; Nicoletti et al. 1991). Ein Beispiel für typische DNA-Gehaltsmessungen von vitalen und apoptotischen MDCK-Zellen ist in Abbildung 3-4 vergleichend dargestellt. Aufgrund der relativ geringen Präzision der Bestimmung (siehe Tabelle 3-13) wurde die Methode nur zum qualitativen Apoptosenachweis verwendet.

Tabelle 3-13: Präzision der Bestimmung der Zellzyklusverteilung und der Apoptose über den DNA-Gehalt von MDCK-Zellen aus einer subkonfluenten statischen Kultur (N=8)

Messwert	Mittelwert	SD	RSD
G _{0/1} -Phase / %	37,11	1,76	4,74
CV des G _{0/1} -Peak / %	3,96	0,20	5,04
Synthese-Phase / %	33,54	2,21	6,58
G ₂ /M-Phase / %	29,38	1,96	6,66
CV des G ₂ /M-Phase-Peak / %	3,61	0,10	2,82
I _{G₂/M} /I _{G_{0/1}} / -	1,96	0,01	0,37
Sub-G _{0/1} (Apoptose) / %	0,62	0,12	19,76

CV: Variationskoeffizient der Peakbreite; I_{G₂/M}/I_{G_{0/1}}: Verhältnis der Fluoreszenzen der G₂/M-Peaks zu den G_{0/1}-Peaks

3.7.4 Apoptose-Quantifizierung über Pancaspase-Aktivität (FLICA-Assay)

Im Verlauf der Apoptose stellen die Caspasen einen zentralen Teil der Signaltransduktion und -ausführung dar (Kapitel 2.5.2). Eine Möglichkeit, die Aktivität von Caspasen intrazellulär nachzuweisen, ist die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Caspase-Inhibitoren (FLICA, Kapitel 4.3). Diese bestehen in der Regel aus einem Aminosäuretriplet, an welches C-terminal ein Fluoreszenzfarbstoff und N-terminal eine weitere Aminosäure bzw. eine funktionelle Gruppe gebunden ist. Um nicht nur eine Caspase, deren Aktivität während der Apoptose möglicherweise nur in einem sehr engen Zeitfenster auftritt, nachzuweisen, werden Pancaspase-Inhibitoren verwendet. Dabei handelt es sich bei dem verwendeten Aminosäuretriplet um eine Consensus-Sequenz der Caspase-Inhibitoren.

Zum Nachweis der Apoptose in MDCK-Zellen wurde der Pancaspase-Inhibitor Fluoreszein-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]-Fluoromethylketon (FITC-VAD-fmk, CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker, Promega, Nr. G7461) verwendet (Jayaraman 2003).

Dazu war eine Färbung von lebenden, d.h. nicht-fixierten Zellen in Suspension notwendig. Die Suspensionszellen wurden zunächst zu 1×10^6 Zellen aliquotiert und zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µL verdünnter FITC-VAD-fmk-Lösung (10 µmol/L FITC-VAD-fmk in PBS) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1000 µL PBS zugegeben und zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, 1800 µL PBS zugegeben und erneut zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C). Abschließend wurde der Überstand verworfen und 500 µL PBS zugegeben. Die anschließende Messung erfolgte als Doppelbestimmung aus zwei unabhängig gefärbten Aliquoten. Alternativ zur Messung direkt im Anschluss an die Färbung wurden die Proben für die Messung zu einem späteren Zeitpunkt fixiert. Dazu wurden die

Zellen 30 min in 1 %iger Formaldehyd-Lösung (Tabelle 3-9) auf Eis inkubiert und bei 4 °C gelagert.

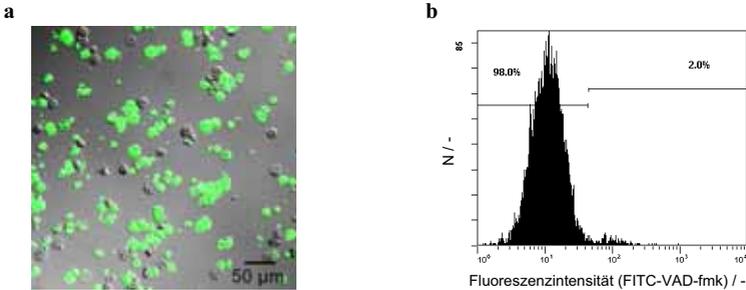


Abbildung 3-6: Mikroskopische und cytomertische Auswertung von Fluoreszenzfärbungen auf Pancaspase-Aktivität in MDCK-Zellen

a: Fluoreszenz- und Hellfeld-mikroskopische Aufnahme (LSM510, Zeiss: 400x, Anregung: 488 nm, Emission: 520–530 nm) nach Färbung von Überstandszellen aus einer Zellkulturflasche mit FITC-VAD-fmk: apoptotische Zellen werden grün gefärbt, vitale Zellen sind ungefärbt
b: Durchflussscytometrische Messungen von FITC-VAD-fmk-gefärbten adhärennten Zellen aus einer subkonfluenten Kultur

Als Negativkontrolle für die Pancaspase-Färbung wurden adhärennte MDCK-Zellen aus subkonfluenten T-Flaschen verwendet. Hier wurde davon ausgegangen, dass der Anteil der apoptotischen Zellen minimal ist, da apoptotische Zellen sich aus der adhärennten Zellschicht lösen und noch keine Inhibition durch fehlende Substrate und akkumulierte Metabolite vorlag. In der Literatur wurde ein basales Level an apoptotischen MDCK-Zellen bei Kultivierung in DMEM (mit 10 % FCS und Osmolalität von 500 mOsm) von 1 % der Gesamtzellzahl beschrieben (Horio et al. 2001). Bei dem in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik verwendeten GMEM mit 10 % FCS wurden auch bei pH-Ausgleich mit Natronlauge in Standardkultivierungen keine Osmolalitätswerte über 500 mOsm gemessen. Dementsprechend wurde der Literaturwert für den basalen Level an Apoptose übernommen. Die Fluoreszenzschwelle für die durchflussscytometrische Detektion von apoptotischen Zellen wurde zuzüglich zur Annahme von 1 % falsch-positiv gefärbten Zellen um 1 % basales Apoptoselevel erweitert (Abbildung 3-6b). Das basale Apoptoselevel konnte in T-Flaschen mittels TUNEL-Assay bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Detektion der Fluoreszenz-emission von FITC im Durchflussscytometer erfolgte bei 525 nm (FL1).

3.7.5 Apoptose-Quantifizierung über DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay)

Aufgrund von Endonuclease-Aktivität treten im Verlauf der Apoptose DNA-Strangbrüche auf. Durch den Einsatz von terminaler Desoxynucleotidyltransferase (TdT) werden die dabei entstehenden freien 3'OH-Enden Template-unabhängig mit Desoxyuridintriphosphat- (dUTP) Nucleotiden verlängert (Kapitel 4.3).

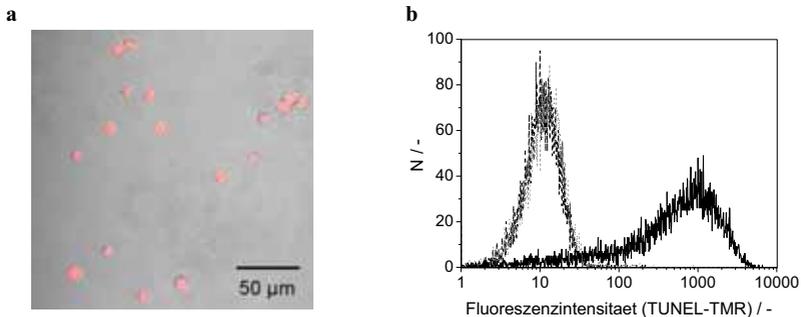


Abbildung 3-7: Mikroskopische und cytomertische Auswertung von Fluoreszenzfärbungen auf DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) in MDCK-Zellen

a: Fluoreszenz- und Hellfeld-mikroskopische Aufnahme (LSM510, Zeiss: 400x, Anregung: 488 nm, Emission: LP 560 nm) nach Färbung von scheininfizierten MDCK-Zellen mit TUNEL-Assay: apoptotische Zellen werden rot gefärbt, vitale Zellen sind ungefärbt; **b:** Durchflusscytometrische Messungen von TUNEL-TMR-gefärbten MDCK-Zellen: scheininfiziert ohne Zugabe von TdT bei der Färbung (- - -), scheininfiziert mit Zugabe von TdT bei der Färbung (· · · · ·), MDCK-Überstandszellen aus Rollerflaschen, 14,5 h p.i. mit humanem Influenza A/PR/8/34 H1N1 NIBSC (—)

DNA-Strangbrüche als Kennzeichen der Apoptose wurden mit dem *In Situ* Cell Death Detection Kit (TMR red, Roche Diagnostics, Nr. 12156792910) durch den Einsatz von Tetramethylrhodamin (TMR)-konjugiertem dUTP durchflusscytometrisch nachgewiesen.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Methodendurchführung bzw. zur Kompensation des Übersprechens bei Färbung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen wurden Positivkontrollen eingesetzt. In den entsprechenden Zellproben wurden mit der Endonuclease 1 Benzonase (Sigma-Aldrich, Nr. E1014-25KU) enzymatisch DNA-Strangbrüche eingeführt, die mit dem TUNEL-Assay nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3-7a). Als Negativkontrollen wurden Zellproben mit minimalem Anteil apoptotischer Zellen oder eine Färbung ohne Zugabe von TdT eingesetzt (Abbildung 3-7b).

Tabelle 3-14: Permeabilisierungspuffer für die Cytometrie

Komponente	Menge
Reinstwasser	10 mL
Natriumcitrat	10 mg
Triton X100	10 μ L

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert

Tabelle 3-15: Benzonaselösung für TUNEL-Positivkontrollen (für 1 Probe)

Komponente	Volumen / μL
HEPES mit 50 mM NaCl	98
MgCl ₂ -Stammlösung (2 mM in Reinstwasser)	1
Benzonase	1

Die Zellen für die Apoptosequantifizierung wurden zunächst mit Formaldehyd und anschließend mit Ethanol fixiert und bis zur Probenvorbereitung bei -20 °C gelagert (vgl. Kapitel 3.5). Bei der Probenvorbereitung wurden alle Zentrifugationsschritte für 10 min bei 300 g im Ausschwingrotor bei 4 °C durchgeführt. Die gelagerten Proben wurden zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde jeweils mit 5 mL Cytometriepuffer (Tabelle 3-5) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet jeweils in 2 mL Cytometriepuffer gelöst und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Für die Permeabilisierung wurden die Pellets in 100 μ L Permeabilisierungspuffer (Tabelle 3-14) gelöst und 2 min auf Eis inkubiert. An dieser Stelle wurde zu den späteren Positivkontrollen 100 μ L Benzonase-Lösung (Tabelle 3-15) pipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 500 μ L Cytometriepuffer und direkte Zentrifugation inklusive Verwerfen des Überstands wurde die Permeabilisierung bzw. die Benzonase-Reaktion gestoppt. Danach folgte ein Waschschritt mit 200 μ L Cytometriepuffer, Zentrifugation und Verwerfen des Überstands. Zur Färbung der DNA-Strangbrüche wurden die Zellpellets in 50 μ L TUNEL-Reaktionslösung (Nukleotidlösung mit TdT) gelöst und für eine Stunde bei 37 °C im Probenrotator inkubiert. Für die Herstellung von Negativkontrollen wurden vor der Inkubation nur 50 μ L Nukleotidlösung ohne TdT zugegeben. Nach der Inkubation wurden 200 μ L Cytometriepuffer zugegeben. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurde die Zugabe von 200 μ L wiederholt.

Für die anschließende Messung wurden 500 μ L Cytometriepuffer zugegeben und die Proben bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt. Für den Fall der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Influenza NP oder M1 wurde die zweite Färbung direkt im Anschluss durchgeführt.

Die Messung der Fluoreszenzemission von TMR im Durchflusscytometer erfolgte bei 620 nm (FL3).

3.7.6 Influenza-Infektionsdetektion in Zellen durch Antikörperfärbung

Die viralen Proteine Influenza A Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein 1 (M1) wurden mit FITC-konjugierten monoklonalen Mausantikörpern detektiert. Dazu wurde entweder ein gebrauchsfertiges Gemisch von Antikörpern gegen beide Proteine (IMAGEN) oder einzelne Antikörper gegen eines der beiden viralen Proteine verwendet. Die Herstellung und Charakterisierung der Antikörper wurde in der Literatur beschrieben (Walls et al. 1986a). Die Antikörper-Klonbezeichnungen des National Institute of Health der USA (NIH) sowie der Grad ihrer Fluoreszein-Konjugation (FITC/Protein-Verhältnis) sind in Tabelle 3-16 aufgeführt.

Tabelle 3-16: Verwendete Antikörper gegen Influenza A-Proteine

Antikörper	NIH-Klon-Nr.	FITC/Protein-Verhältnis
IMAGEN Kit, Reagent A (anti-Influenza A NP, anti Influenza A M1)	AA5H, GA2B	2,3 : 1
anti-Influenza A NP	AA5H	4,5 : 1
anti-Influenza A M1	GA2B	4,0 : 1

Die Einzelantikörper gegen das NP (Serotec, Nr. MCA400 (FX)) und M1 (Serotec, Nr. MCA401 (FX)) waren identisch mit den Antikörpern, die in dem IMAGEN Influenza Virus A and B Kit Reagent A (DakoCytomation, Nr. K6105) enthalten waren. Sie zeichneten sich jedoch durch höhere FITC/Protein-Verhältnisse aus, was die Verwendung für die Durchflusscytometrie begünstigte (Tabelle 3-16).

Die Färbung mit Antikörpern gegen Influenza A-Proteine wurde entweder als Einzelfärbung oder als Kombinationsfärbung nach der TUNEL-Färbung (Kapitel 3.7.5) durchgeführt. Um das Ausbleichen des Fluoreszeins während der Probenvorbereitung des TUNEL-Assays zu vermeiden, wurde die Antikörperfärbung stets direkt an die TUNEL-Färbung angeschlossen.

Bei der Probenvorbereitung wurden die gelagerten Zellproben (Ethanol- bzw. mit Paraformaldehyd- und Ethanol-fixiert, vgl. Kapitel 3.5) zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C), der Überstand verworfen und 5 mL Cytometriepuffer (Tabelle 3-5) zugegeben. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden jeweils in 2 mL

Cytometriepuffer gelöst und in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Dann wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.

Für die Färbung von Zellen wurde das Antikörpermischung unverdünnt in einer Konzentration von 25 µg/mL je Antikörper eingesetzt. Die Einzelantikörper wurden in der gleichen Konzentration verwendet. Dazu wurde die Antikörper-Stammlösung im Verhältnis 1:20 mit Cytometriepuffer verdünnt. Unabhängig vom verwendeten Antikörper wurden die Zellpellets in 25 µL-Antikörperlösung gelöst und im Probenrotator für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1,8 mL Cytometriepuffer zum Waschen zugegeben, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zum Abschluss wurden 0,5 mL Cytometriepuffer zugegeben und die Proben bis zur Messung abgedunkelt aufbewahrt. Die Detektion der Fluoreszenzemission von FITC im Durchflusscytometer erfolgte bei 525 nm (FL1). Pro Probe wurde eine Doppelbestimmung aus zwei Aliquoten durchgeführt.

Für die Antikörperfärbung wurden Zellen aus nicht-infizierten Kulturen bzw. scheininfizierte Zellen (vgl. Kapitel 3.3) als Negativkontrollen verwendet. Aufgrund der stärkeren Hintergrundfluoreszenz von scheininfizierten Zellen, wurden diese bevorzugt verwendet, um nur die spezifische Antigenbindung zu berücksichtigen. Für die Festlegung der Fluoreszenzgrenze zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen wurden Proben zum Zeitpunkt der Saatvirusinokulation verwendet, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Replikation der viralen Proteine stattgefunden haben konnte und durch die identischen Kulturbedingungen die unspezifische Antikörperbindung der zu späteren Zeitpunkten genommenen Proben optimal widergegeben wurde (Schulze-Horsel et al. 2008).

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeiten zunächst ausführlich dargestellt und ausgewertet. Anschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse anhand der Fachliteratur.

4.1 Zellzyklus von MDCK-Zellen

Für die Zellexpansionsphase des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modellprozesses wurde in der Vergangenheit hauptsächlich der Stoffwechsel der MDCK-Zellen untersucht (Genzel et al. 2004a; Genzel et al. 2004b). Des Weiteren wurde das Wachstum der Zellen auf den Microcarriern mit mathematischen Modellen analysiert (Bock et al. 2009; Möhler et al. 2008). Darüber hinaus konnten unter Einbeziehung der durchfluscytometrischen Zellzyklusmessung weitere Informationen zur Proliferation der Zellen gewonnen werden (Kapitel 4.1.1). Zusätzlich wurde die Auswirkung der Zellzyklusmodulation auf die Virusproduktion analysiert (Kapitel 4.1.2).

4.1.1 Zellzyklus adhärenter MDCK-Zellen in Microcarrierkultur

Im Wesentlichen wurden Zellzyklusverläufe von Säugetierzellen in Bioreaktoren bisher nur für Suspensionszellen beschrieben. Im Gegensatz zu Suspensionszellen ist das Wachstum von adhären Zellen zusätzlich noch durch die Wachstumsoberfläche als Substrat begrenzt. Um das Zellzyklusverhalten von adhären MDCK-Zellen zu untersuchen, wurden im 5,0 L-Maßstab Kultivierungen durchgeführt. Dadurch war es möglich, auch bei geringen Konzentrationen von adhären Zellen, insbesondere zu Beginn der Kultivierungen, ausreichend Probenmaterial für die Durchfluscytometrie zu gewinnen. Die Zellzyklusverteilungen wurden durch stöchiometrische DNA-Färbung erfasst (Kapitel 3.7.3). Die Verläufe der Zellkonzentrationen im Überstand und auf Microcarriern von zwei unabhängigen Kultivierungen sind in Abbildung 4-1a dargestellt. Deutlich wird dabei die Abnahme der Konzentration der Überstandszellen direkt nach Einsaat des trypsinierten Inokulums innerhalb der ersten 8 Stunden. Die Zunahme der adhären Zellkonzentration erfolgte antiproportional zur Abnahme der Überstandszellkonzentration. Während dieser Phase fand die Adhäsion der Zellen aus dem Überstand an die Microcarrier statt. Die Einsaatdichte des Inokulums betrug etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen/mL. Bei einer Microcarrierkonzentration

von 8000 Partikeln/mL entsprach dies einer mittleren Einsaatdichte von 31 Zellen/Microcarrier. Nach der Adhäsionsphase blieb die Zellkonzentration im Überstand unter $1,0 \times 10^5$ Zellen/mL. Die nach 4 Tagen erreichte maximale Zellkonzentration betrug 1,6 bzw. $1,7 \times 10^6$ Zellen/mL, was einer Zelldichte von 200 bzw. 213 Zellen/Microcarrier entsprach. Nach der Adhäsionsphase blieb die Zellkonzentration im Überstand unter $1,0 \times 10^5$ Zellen/mL.

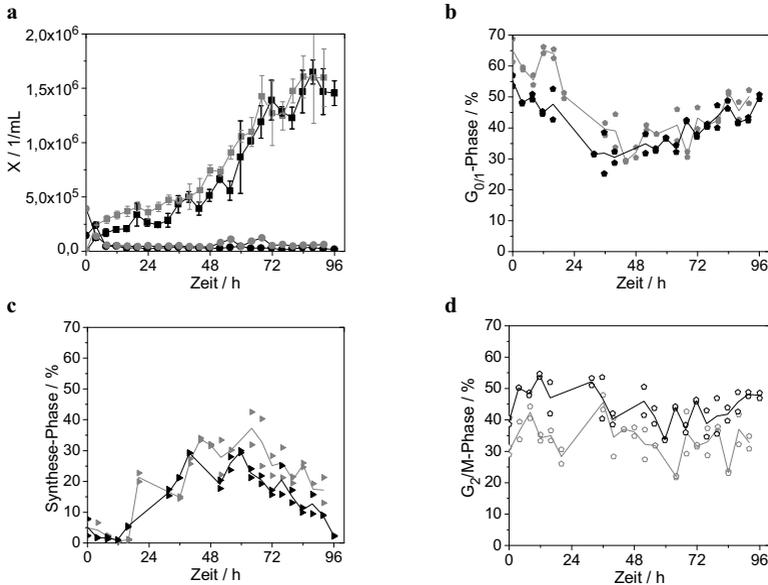


Abbildung 4-1: Verlauf der Zellkonzentrationen und Zellzyklusphasen von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor mit 2 g/L Cytodex 1

a: adhärennte Zellen auf MC (■, ▣), Zellen im Überstand: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen (●, ●); **b:** Anteil der adhärennten Zellen in der $G_{0/1}$ -Phase; **c:** Anteil der adhärennten Zellen in der Synthese-Phase; **d:** Anteil der adhärennten Zellen in der G_2/M -Phase

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); adhärennte Zellzahlen: Mittelwerte (Symbole) \pm SD ($n = 3$), Zellzyklusphasen: Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole)

Zusätzlich zur Quantifizierung der Zellkonzentrationen wurde auch die Zellzyklusverteilung im Verlauf der Kultivierungen analysiert (Abbildung 4-1b-d). Die erste Messung spiegelt dabei den Zustand des Inokulums im Überstand und nicht der adhärennten Zellen wider, da direkt nach der Einsaat noch keine adhärennten Zellen auf Microcarriern nachweisbar waren. Das Inokulum zeichnete sich dabei durch einen hohen Anteil an Zellen in der $G_{0/1}$ -Phase (55,3 bzw. 65,1 %) sowie der G_2/M -Phase (39,6 bzw. 30,1 %) aus, während der Anteil der Zellen in

der Synthese-Phase (S-Phase) nur 5,2 bzw. 2,3 % betrug. Folglich stammte das Inokulum aus einer stationären Vorkultur mit nur einem sehr geringen Anteil proliferierender Zellen. Nach einer anfänglich leichten Abnahme des S-Phasenanteils fand von etwa 12 h bis 40 h nach Zelleinsaat ein kontinuierlicher Anstieg des Anteils dieser Population statt. Ab etwa 60 Stunden Kultivierungsdauer bis zum Ende der Kultivierung war eine stetige Abnahme des Anteils von Zellen in der S-Phase zu beobachten. Im Gegensatz zum relativ parallelen Verlauf des S-Phasenanteils unterschieden sich die Verläufe der G_2/M -Phasenanteile beider Kultivierungen teilweise um bis zu 20 %. Analog zum leicht höheren S-Phasenanteil zeigte eine Kultivierung dabei einen geringeren G_2/M -Phasenanteil (graue Symbole). Der Vergleich der $G_{0/1}$ -Phasenverläufe zeigte nur 12 bis 16 h nach Zelleinsaat eine größere Diskrepanz zwischen den beiden Kulturen.

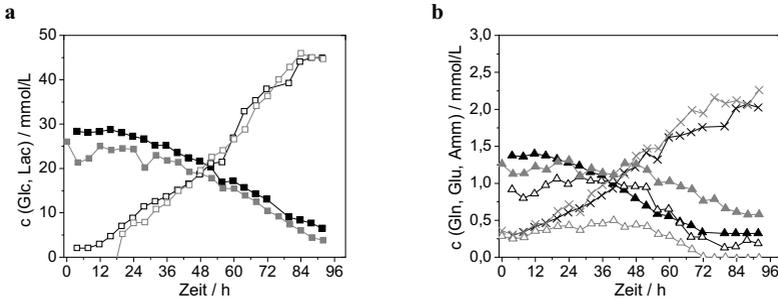


Abbildung 4-2: Verlauf der Metabolitkonzentrationen von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor mit 2 g/L Cytodex 1

a: Glukose (■, ▒) und Laktat (□, □); b: Glutamin (▲, ▲), Glutamat (△, △) und Ammonium (×, ×) Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau).

Die Verläufe der Konzentrationen der Hauptmetabolite sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Konzentrationen von Glukose und Laktat zeigten einen sehr vergleichbaren Verlauf (Abbildung 4-2a). Die Schwankungen in den Konzentrationen 4 h und 28 h nach Einsaat (graue Symbole) wurden bei allen Metaboliten gemessen. Dabei handelt es sich vermutlich um ein durch Kondensat in den Probenahmeflaschen verursachtes Artefakt. Die Probenahmestrecke wurde nach Anschluss der Probenahmeflaschen mit Heißdampf sterilisiert. Bei der Probennahme kann dann restliches Kondensat aus der Probenahmestrecke zusammen mit der Probe in die Flaschen gelangen.

Die Konzentrationen von Glutamin liefen bei beiden Kultivierungen in den ersten 40 Stunden parallel, danach zeigte eine Kultivierung einen typischen Verlauf (schwarze Symbole), während die andere eine geringere Glutaminabnahme aufwies (Abbildung 4-2b). Die

Startkonzentration von Glutamat unterschied sich stark. Sie lag bei einer Kultivierung bei 0,92 mmol/L, während die Konzentration bei der anderen Kultivierung lediglich 0,28 mmol/L betrug. Die Ammoniumkonzentrationen waren im Verlauf der Kultivierungen vergleichbar und erreichten eine Maximalkonzentration von 2,02 bzw. 2,26 mmol/L. Weder für Laktat noch für Ammonium wurden inhibierende Konzentrationen erreicht (vgl. Kapitel 2.3.6).

4.1.2 Einfluss des Zellzykluszustandes auf die Virusaussbeute

Die Zellzyklusverteilung von Zellkulturen steht in direktem Zusammenhang zu ihrem Zellwachstum. So zeichnen sich beispielsweise stark proliferierende Zellkulturen durch einen hohen Anteil an Zellen in der Synthesephase aus, da hier die Dauer der Zwischenphasen (G_0 , G_1 , G_2) minimal sind. Um zu überprüfen, ob unterschiedliche Zellzyklusverteilungen auch einen Einfluss auf die spezifische Virusaussbeute haben, wurden Sechs-Well-Platten so mit MDCK-Zellen eingesät, dass diese zum Zeitpunkt der Infektion zwar die gleiche Zelldichte, jedoch unterschiedliche Zellzyklusverteilungen aufwiesen (Tabelle 4-1).

Die Sechs-Well-Platten wurden bereits mit einem Inokulum mit hohem bzw. niedrigem Synthese-Phasenanteil eingesät. Um eine Zellkultur mit einem hohen Anteil an Zellen in der Synthese-Phase zum Zeitpunkt der Infektion zu erreichen, wurden Zellen 27 h nach Einsaat infiziert. Im Gegensatz dazu wurden Zellkulturen, die einen niedrigen Synthese-Phasenanteil aufweisen sollten, erst 96 h nach Einsaat infiziert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden je Ansatz 6 Wells trypsiniert und sowohl Zellkonzentration als auch Zelldurchmesser automatisch bestimmt (ViCell-Messungen, vgl. Kapitel 3.6.1). Die Zellkonzentrationen zum Zeitpunkt der Infektion (0 h p.i.) waren im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Dies gilt auch für 96 h p.i. gemessenen Zellkonzentrationen. Die Zellen wurden bei einer MOI von 0,025 mit dem Influenza A Virus PR/8/34 H1N1 (RKI) infiziert, die Trypsinkonzentration betrug 10 µg/mL. Die Anteile der Zellen in Synthesephase zum Zeitpunkt der Infektion sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1: Infektion von MDCK-Zellen mit unterschiedlichem Synthese-Phasenanteil mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (RKI), MOI 0,025 (Sechs-Well-Platten)

Wert	Einheit	Infektion mit niedrigem S-Phasenanteil	Infektion mit hohem S-Phasenanteil	Differenz / %
S-Phase (Vorkultur)	%	9,4 ± 0,8	35,9 ± 0,1	-
G _{0/1} -Phase, 0 h p.i.	%	66,6 ± 2,4	55,0 ± 3,3	-
G _{2/M} -Phase, 0 h p.i.	%	22,1 ± 1,9	21,1 ± 2,4	-
S-Phase, 0 h p.i.	%	10,3 ± 3,3	21,7 ± 1,5	-
X _A , 0 h p.i.	Zellen/cm ²	3,4 × 10 ⁵ ± 1,2 × 10 ⁴	3,3 × 10 ⁵ ± 1,4 × 10 ⁴	3,0
X _A , 96 h p.i.	Zellen/cm ²	1,7 × 10 ⁵ ± 2,0 × 10 ⁴	1,8 × 10 ⁵ ± 1,5 × 10 ⁴	3,4
Y _{VP/X} , 96 h p.i.	VP/Zelle	7100	11200	37,0
d _m	µm	13,4 ± 0,3	15,3 ± 0,3	12,3
V _{Zellen}	µL	1,0 × 10 ⁴ ± 6,1 × 10 ²	1,5 × 10 ⁴ ± 7,7 × 10 ²	33,3

Mittelwerte ±SD (n=6), VK: Vorkultur, VP: Viruspartikel

Ab 47 h p.i. wurden im Abstand von 24 Stunden Sechs-Well-Platten geerntet und die produzierte Virusmenge (HA-Aktivität) analysiert. Die Verläufe der Gesamtviruskonzentrationen basierend auf dem Hämagglutinationstest sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

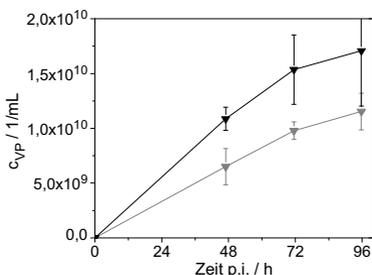


Abbildung 4-3: Verlauf der Gesamtvirusinfektion (c_{VP}) nach Infektion von Zellkulturen in Sechs-Well-Platten mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (RKI), MOI 0,025

Die Einsaat erfolgte mit 21,7 % (▼) bzw. 10,3 % S-Phasenanteil (▲). Dargestellt sind die Mittelwerte (Symbole) ± SD (n = 6)

Bei Infektion von Zellen mit einem mittleren S-Phasenanteil von 21,7 % wurden durchgängig höhere Virustiter gemessen als bei Zellen mit 10,3 % S-Phasenanteil. 96 h p.i. lag die mittlere spezifische Virusausbeute Y_{VP/X} für die Kultur mit 11200 Viren/Zelle etwa 37 % über der Ausbeute der Kultur mit geringerem S-Phasenanteil (7100 Viren/Zelle). Zu Beginn der Kultivierung war der mittlere Durchmesser d_m der Zellen aus Kultur mit höherem S-Phasenanteil um 12,3 % größer als der Durchmesser der Zellen mit niedrigerem S-Phasenanteil (Tabelle 4-1). Dies entspricht einem um ein Drittel größeren Zellvolumen.

4.1.3 Kapitelzusammenfassung und –diskussion

Für einen Modellprozess wurden die Verläufe der Zellzyklusverteilung mit den Verläufen der Zellkonzentrationen und der Hauptmetabolite verglichen (Kapitel 4.1.1). Die beiden Kultivierungen zeigten dabei ein sehr vergleichbares Adhäsionsverhalten der Überstandszellen an die Microcarrier. Die Zellexpansion lief über die gesamte Kultivierungsdauer parallel (Abbildung 4-1). Die Ergebnisse für das Zellwachstum waren vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen MDCK-Microcarrierkulturen (Bock et al. 2009). Sehr gut mit den Ergebnissen von 5,0 L-Bioreaktorkultivierungen vergleichbare Zellwachstums- und Zellzyklusverläufe wurden auch für adhärenz MDCK-Zellen in 0,5 L-Bioreaktorkultivierungen beobachtet (Schulze-Horsel et al. 2005). Die Zellzyklusverteilung des Inokulums der Kultivierungen entsprach Ergebnissen von Jeon et al. 2005, die bei Kontrollkulturen eine Zellzyklusverteilung von 53 % in $G_{0/1}$ -Phase, 10 % in S-Phase, 29 % in G_2/M -Phase und 6 % in sub- $G_{0/1}$ -Phase nachwies. Allerdings war bei den Zellzyklusmessungen in der vorliegenden Arbeit der Anteil von Zellen mit sub- $G_{0/1}$ -DNA-Gehalt vernachlässigbar klein. Der geringe Anteil von Zellen in der S-Phase weist darauf hin, dass die Vorkultur sich nicht mehr in der exponentiellen Wachstumsphase (erkennbar an einem sehr hohen Anteil an Zellen in der S-Phase) befand. Nach der Adhäsion der Zellen aus dem Inokulum an die Microcarrier, erkennbar an der abnehmenden Zellkonzentration im Überstand und der Zunahme der Konzentration adhärenz Zellen innerhalb der ersten 12 Stunden nach Zelleinsaat, fand die Zellzyklusprogression und Zellvermehrung auf den Microcarriern statt (Abbildung 4-1a). Während der Zellzyklusprogression sank der Anteil von Zellen in der $G_{0/1}$ -Phase, während der Anteil der Zellen in der Synthesephase deutlich zunahm (Abbildung 4-1b und c). Mit zunehmender Konzentration adhärenz Zellen nahm der Anteil sich nicht mehr aktiv teilender Zellen zu, der Anteil der Zellen in der Synthesephase nahm infolgedessen ab. Gleichzeitig wurde eine Verlangsamung des Zellwachstums beobachtet (Abbildung 4-1a). Als Ursache dafür könnte die von Bock et al. beschriebene zell-dichte-abhängige Wachstumsinhibition als Folge der Limitierung der Wachstumsoberfläche auf den Microcarriern angenommen werden (Bock et al. 2009). Dabei verringert sich die mittlere spezifische Wachstumsrate mit zunehmendem Bedeckungsgrad der Microcarrier, analog zum Verbrauch eines limitierenden Substrates. Es wurde gezeigt, dass die initiale Adhäsion von MDCK-Zellen aus dem Überstand nicht bei allen Microcarriern gleich ist, sondern annähernd eine Poisson-Verteilung darstellt (Bock et al. 2009). Dementsprechend waren nicht alle Microcarrier zur gleichen Zeit vollständig bewachsen, was zu einer kontinuierlichen Verringerung der über alle Microcarrier

gemittelten Wachstumsrate führt (Bock et al. 2009). Analog dazu sank nach Erreichen des S-Phase-Maximums der Anteil der Zellen in der Synthesephase kontinuierlich.

Verglichen mit MDCK-Kultivierungsdaten von Genzel et al. 2004a bei einer Microcarrierkonzentration von 1,7 g/L Cytodex 1 wurde bei einer Kultivierung mit 2 g/L Cytodex 1 (Abbildung 4-2, schwarze Symbole) ein vergleichbares metabolisches Profil beobachtet. Die Ursache für die Unterschiede zwischen den Glutaminkonzentrationen ab 40 h nach Zelleinsatz ist noch unklar. Die Unterschiede in den Glutamatprofilen wurden durch unterschiedliche Konzentrationen zu Kultivierungsbeginn bedingt. Diese könnten durch Unterschiede im Glutaminzerfall erklärt werden, jedoch wurden keine Unterschiede in den Glutamin-Startkonzentrationen beobachtet.

Informationen über den Verlauf der Zellexpansion und der Zellzyklusverteilungen von MDCK-Zellen in Sechs-Well-Platten (Schulze 2007) wurden dazu genutzt, den Einfluss des Zellzyklus auf die Virusreplikation zu untersuchen. Zellen mit gleicher Zellkonzentration, aber unterschiedlicher Zellzyklusverteilung zum Zeitpunkt der Infektion wurden infiziert (Kapitel 4.1.2). Bei einer Versuchsreihe mit hohem S-Phasenanteil betrug der S-Phasenanteil zum Zeitpunkt der Infektion 22 %, während der Anteil bei der Vergleichsreihe mit geringerem S-Phasenanteil 10 % betrug (Tabelle 2-1). Es konnte gezeigt werden, dass bei gleichen Zellkonzentrationen für die Kultur mit höherem S-Phasenanteil auch eine um 30 % höhere spezifische Virusausbeute erreicht wurde. Dabei wurde für die Zellen mit höherem S-Phasenanteil auch ein um 33 % größeres mittleres Zellvolumen festgestellt.

Für die Ausbeutesteigerung kommen im Wesentlichen zwei alternative Erklärungen in Frage: eine Zellzyklusphasen-Abhängigkeit der spezifischen Influenza A-Virusausbeute oder eine Korrelation der Virusausbeute mit dem Zellvolumen. Allerdings besteht auch zwischen der Zellzyklusverteilung und der mittleren Zellgröße eine Korrelation (Lloyd et al. 2000). Für Hybridoma-Zellen wurde die maximale spezifische Antikörperausbeute für G₁-Zellen beschrieben (Ramirez und Mutharasan 1990). Im Gegensatz dazu hatte diese Population bei in Suspension wachsenden CHO-Zellen die geringste spezifische Ausbeute, gefolgt von Zellen in der S-Phase (Lloyd et al. 2000). Außerdem wurde dabei gezeigt, dass bei allen untersuchten CHO-Zelllinien die Zellgröße in stärkerem Maß ausbeutebestimmend war als die Zellzyklusverteilung.

Zellen, die sich in der S-Phase befinden, verdoppeln ihren DNA-Gehalt. In dieser Phase liegen sowohl besonders viele dNTPs sowie NTPs in den Zellen vor (Pollard und Earnshaw

2002). Es wäre möglich, dass sich erhöhte Nukleotidpools in S-Phase-Zellen positiv auf die Influenza-Virusreplikation auswirken.

Anhand der vorliegenden Daten ist eine eindeutige Identifikation der Ursache für die Ausbeutesteigerung nicht möglich. Dazu sind weitere Untersuchungen, insbesondere mit extremeren Zellzyklusunterschieden erforderlich. Da das Zellvolumen und die Zellzyklusverteilung keine unabhängigen Größen sind, ist jedoch nicht eindeutig zu klären, ob es möglich ist, mit adhärenenten MDCK-Zellen in dem verwendeten System die Ursache der Ausbeutesteigerung zu identifizieren. Davon unberührt ist die Nutzung von Kulturen mit höherem S-Phasenanteil bzw. größerem Zellvolumen zum Zeitpunkt der Infektion zur Ausbeutesteigerung im Produktionsmaßstab geeignet.

4.2 Durchflusscytometrische Infektionsquantifizierung

Ziel der durchflusscytometrischen Analytik war einerseits die Quantifizierung von Influenza-virusinfizierten Zellen in einer gemischten Population, andererseits die Abschätzung von Influenza-Virusproteinkopien pro infizierter Zelle. Messtechnische Grundlage dafür war die Kalibration von arbiträren Fluoreszenzintensitäten (Kapitel 4.2.1). Zur spezifischen Detektion von Influenza wurden monoklonale Antikörper gegen einzelne Virusproteine eingesetzt.

Zur Quantifizierung der Virusinfektion in Zellen aus Bioreaktorproben wurde sowohl ein Gemisch von zwei monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A Nukleoprotein und Matrixprotein (Kapitel 4.2.2) als auch die beiden monoklonalen Antikörper jeweils einzeln getestet und miteinander verglichen (Kapitel 4.2.3). Basierend auf der Detektion mit dem monoklonalen Antikörper gegen Influenza A Nukleoprotein wird die Abschätzung von der NP-Kopienzahl pro infizierter Zelle anhand cytometrischer Messdaten beschrieben (Kapitel 4.2.4).

4.2.1 Durchflusscytometrische Fluoreszenzquantifizierung

Im Vorfeld der cytometrischen Fluoreszenzmessungen mit den FITC-konjugierten Antikörpern gegen NP und M1-Protein von Influenza-Virus A wurde die Genauigkeit und die Präzision der Fluoreszenzmessungen mit FITC-konjugierten MEFL-Kalibrationspartikeln bestimmt (Kapitel 3.7.2). Dazu wurden 6 Messreihen von jeweils 4 Partikelstandards (Dreifachbestimmung) herangezogen. Die höchste gemessene MEFL-Beladung betrug

$8,92 \times 10^5$ MEFL/Partikel. MEFL-Kalibrationspartikel mit einer höheren Beladungsdichte waren kommerziell nicht verfügbar. Die Messungen erfolgten mit den gleichen Messeinstellungen wie bei den Antikörperfärbungen (Kapitel 4.2.3). Für die statistische Analyse wurden jeweils die Medianwerte der Fluoreszenz der einzelnen Partikelstandards aus Dreifachbestimmung gemittelt. Durch die Verwendung des Medianwertes werden im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert Extremwerte der Fluoreszenz nicht überbewertet und die Streuung der Werte ist wesentlich geringer als bei der Verwendung des Modalwertes (Givan 2001). Die Validierung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mittels gewichteter Regression (Draper und Smith 1981). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-4 linear aufgetragen.

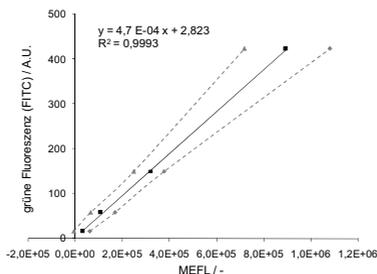


Abbildung 4-4: Durchflusscytometrisch quantifizierte Fluoreszenz von FITC-markierten MEFL-Kalibrationspartikeln

Dargestellt ist die gewichtete Regression (—) über die Medianwerte von vier dreifach bestimmten Messungen (■), sowie das Konfidenzintervall (95 %) (---)

Tabelle 4-2: Statistische Werte der gewichteten Regression von Fluoreszenzmessungen mit MEFL-Kalibrationspartikeln

Detektionslimit (MEFL)	$3,18 \times 10^4$
Quantifizierungslimit (MEFL)	$9,65 \times 10^4$
gewichtete Reststandardabweichung, $s_{y,w}$ (-)	$1,36 \times 10^4$
gewichtete Standardabweichung der Methode, $s_{x0,w}$ (MEFL)	$9,65 \times 10^3$
gewichtete relative Standardabweichung der Methode, $V_{x0,w}$ (%)	9,6

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der statistischen Analyse nach gewichteter Regression der Messwerte aufgeführt. Mit einem Quantifizierungslimit von $9,65 \times 10^4$ MEFL ist die cytomertische Fluoreszenzmessung bei den verwendeten PMT-Einstellungen verhältnismäßig sensitiv. Die relative Standardabweichung der Messungen betrug bei Dreifachbestimmung der Messwerte 9,6 %. Die Präzision der Methode ist dementsprechend nicht sehr hoch. Aufgrund

der Fehlerfortpflanzung sind folglich anhand der MEFL-Kalibration umgerechnete Werte fehlerbehaftet.

4.2.2 Gemisch aus monoklonalen anti-NP- und anti-M1-Antikörpern

Zum Nachweis von Influenza-Virusinfektionen und zur Differenzierung von Influenza A- und B-Viren in klinischen Proben und Zellkulturen wird unter anderem die mikroskopische Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen genutzt. So kann beispielsweise das IMAGEN Influenza Virus A und B Kit (DakoCytomation, Nr. K6105) zu diesem Zweck eingesetzt werden. Das in diesem Kit enthaltene Gemisch von monoklonalen Mausantikörpern gegen Humaninfluenza A/PR/8/34 (H1N1) Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein (M1) wurde für die durchflusscytometrische Detektion der Influenza A-Virusinfektion in MDCK-Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.7).

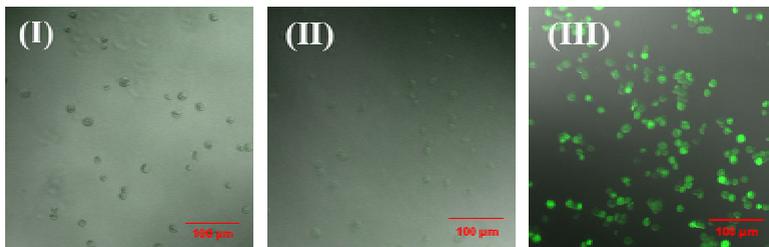
Zur Überprüfung der Färbung wurden MDCK-Zellen als Kontrollen vorbereitet, fixiert und gemessen. Nicht-infizierte Zellen wurden aus Zellkulturen in Zellkulturmedium gewonnen. Dazu wurden die adhärennten Zellen trypsiniert. Infizierte Zellen wurden durch Infektion mit MOI 1,0 mit den zu untersuchenden Virusstämmen infiziert und nach 18 bzw. 23 h p.i. geerntet. Dabei wurden die Zellen im Kulturüberstand zentrifugiert und zusammen mit den abgelösten adhärennten Zellen fixiert. Für die Bereitstellung von scheininfizierten (mock-infected) Zellen wurden die Zellen analog zur Infektion behandelt, jedoch wurde kein Saatvirus zugegeben (Kapitel 3.3). Nach 15 Minuten Inkubation im Viruskulturmedium mit Trypsin bei 37 °C erfolgte die Ernte der Zellen. Die Ethanolfixierung der Zellen ermöglichte die Lagerung der Proben bei -20 °C und anschließend die gleichzeitige Färbung der gelagerten Zellen. Neben der Aufwandsminimierung durch gleichzeitige Färbung, insbesondere bei Zeitreihenexperimenten, wurden die in den Proben enthaltenen infektiösen Influenza-Viren durch die Fixierung inaktiviert. Dies führte zu vereinfachter Handhabung der Proben im Hinblick auf die biologische Sicherheit.

Die Vorbehandlung und Färbung der Zellen ist in Kapitel 3.7.6 beschrieben. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch und durchflusscytometrisch analysiert (Abbildung 4-5). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden qualitativ ausgewertet. Der Vergleich von ungefärbten nicht-infizierten Zellen (I) und gefärbten nicht-infizierten Zellen (II) wies nur in der Durchflusscytometrie einen Unterschied in der Fluoreszenz auf. Mikroskopisch konnte kein Fluoreszenzunterschied festgestellt werden. Die Fluoreszenzzunahme zwischen diesen

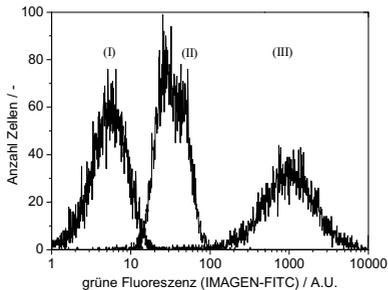
Kontrollen im Vergleich zu den Zellen aus mit equinem Influenza A/Newmarket/1/93 (H3N8) infizierter Kultur (III) konnte mikroskopisch und cytometrisch gezeigt werden.

Der Vergleich von gefärbten nicht-infizierten Zellen (IV) und gefärbten scheininfizierten Zellen (V) zeigte eine Verstärkung der unspezifischen Antikörperbindung, bedingt durch die Vorbereitung der Zellen auf die Infektion (Waschen mit PBS, Mediumswechsel, Trypsinzugabe) unabhängig von der Infektion mit Influenza-Virus. Zur Vermeidung einer Unterschätzung der unspezifischen Antikörperbindung wurden im folgenden scheininfizierte Zellen bzw. Zellen aus infizierter Kultur zum Zeitpunkt der Infektion (0 h p.i.) als Negativkontrolle für die Virusinfektionsdetektion eingesetzt.

a



b



c

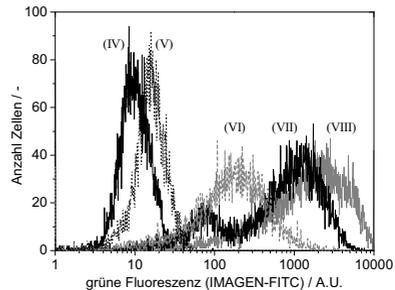


Abbildung 4-5: Nachweis der Influenza A-Virusinfektion in Ethanol-fixierten MDCK-Zellen mit IMAGEN-Antikörpergemisch gegen Influenza A NP und M1 (Schulze-Horsel et al. 2008, modifiziert)

a: Fluoreszenz- und Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen (LSM510, Zeiss: 400x, Anregung: 488 nm, Emission: 520–530 nm) von ungefärbten nicht-infizierten Zellen (I), gefärbten nicht-infizierten Zellen (II) und gefärbten Zellen aus einer mit equinem Influenza-Virus infizierter Kultur; **b:** Durchflusszytometrische Messungen der Proben (I) bis (III); **c:** Durchflusszytometrische Messungen von gefärbten Ethanol-fixierten Zellen: nicht-infiziert (IV), scheininfiziert (V) (geerntet 15 min nach Scheininfektion), infiziert mit equinem Influenza-Virus (VI), porcinem Influenza-Virus (VII) bzw. humanem Influenza-Virus (VIII)

Die Infektion der Zellen erfolgte in T-Flaschen bei MOI 1,0 mit equinem Influenza A Newmarket 1/93 (H3N8) (Ernte 18 h p.i.), porcinem Influenza A Bakum 1832/00 (H1N2) (Ernte 23 h p.i.) bzw. humanem Influenza A PR8/34 (H1N1) NIBSC (Ernte 18 h p.i.)

Im Vergleich zur scheininfizierten Kontrolle wurde eine spezifische Fluoreszenzzunahme auch bei Zellen gemessen, die mit porcinem Influenza-Virus A/Bakum/1832/00 (H1N2) (VII) und mit humanem Influenza-Virus A/PR/8/34 (H1N1) NIBSC infiziert wurden (VIII) (Abbildung 3-1c). Dementsprechend war das Antikörpergemisch dazu geeignet, die Infektion von MDCK-Zellen mit Virusstämmen unterschiedlicher Subtypen nachzuweisen. Die Bestimmung der Messpräzision der Methode für humanes Influenza-Virus A/PR/8/34 (H1N1) NIBSC ist in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

Die Anwendung der Methode zur Messung des Infektionsgrades wurde in einer Bioreaktorkultivierung mit Infektion mit equinem Influenza-Virus A/Newmarket/1/93 (H3N8) bei hoher MOI (3,0) demonstriert (Schulze-Horsel et al. 2008). Die gemessene relative Fluoreszenzintensität der Messungen wurde dabei in Form von FITC-Moleküläquivalenten (MEFL) kalibriert (Kapitel 3.7.2). Zur Bestimmung des Anteils der infizierten Zellen wurde die direkt nach der Infektion genommene Zellprobe verwendet, um den Fluoreszenzgrenzwert zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen festzulegen. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine intrazelluläre Vermehrung der Virusproteine stattgefunden haben. Außerdem war es so möglich, die durch den Prozess der Infektionsvorbereitung (Waschen, Zugabe von Virusmedium) veränderte unspezifische Antikörperbindung der Zellen optimal abzubilden (vgl. Abbildung 4-5c, (V)). Die zeitlichen Verläufe der Virusproduktion, der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen und des resultierenden Anteils infizierter Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen zum Zeitpunkt der Probennahme sind in Abbildung 4-6 dargestellt.

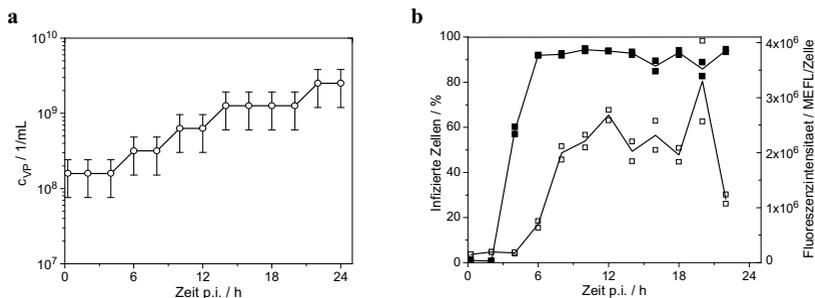


Abbildung 4-6: Infektionsverlauf von Influenza-infizierten MDCK-Zellen im 1,0 L-Bioreaktor nach Infektion mit equinem Influenza-Virus (MOI 3,0) und Färbung mit Antikörpergemisch gegen Influenza A NP und M1 (Schulze-Horsel et al. 2008, modifiziert)

a: Viruspartikelkonzentration basierend auf dem Hämagglutinationstest \pm Standardfehler der Methode; **b:** Durchflusszytometrische Messungen der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen (\square) und des resultierenden Anteils infizierter Zellen an der Gesamtpopulation (\blacksquare). Dargestellt sind die Einzelwerte einer Doppelbestimmung von zwei unabhängig gefärbten Aliquoten (Symbole) und deren Mittelwert (Linie)

Der früheste Zeitpunkt der Detektion der Infektion lag zwischen 2 und 4 h p.i., erkennbar am Anstieg der infizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 4-6b). Der Erwartungswert von etwa 100 % für den Anteil infizierter Zellen bei Infektion mit MOI 3,0 wurde 6 h p.i. erreicht. Daraus folgt, dass der früheste Zeitpunkt der Infektionsquantifizierung bei 6 h p.i. liegt. Die nach diesem Zeitpunkt gemessenen Werte für den Anteil infizierter Zellen waren weitgehend stabil (Mittelwert: 90,0 % \pm 4,9 %). Bereits vor dem Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität der Zellen (12 h p.i.), wurden die ersten Viren freigesetzt (Abbildung 4-6a). Folglich beruhte die gemessene Fluoreszenzintensität auf der Differenz von intrazellulärer Produktion von viralem Antigen und in Form von freigesetzten Viruspartikeln abgegebenen Antigenen zum Zeitpunkt der Probennahme.

Die Färbung mit einer Kombination von zwei Antikörpern ermöglicht keine Aufschlüsselung, welches Antigen die Antikörperbindung verursacht, da beide Antigene ein Summensignal bilden. Dementsprechend lassen sich im Einzelnen keine Aussagen bezüglich der Produktion von Nukleoprotein oder Matrixprotein treffen. Zur Untersuchung der Antikörperbindung wurden Versuche mit jeweils einem Antikörper gemacht und anschließend mit den Ergebnissen der Antikörperkombination verglichen (Kapitel 4.2.3).

4.2.3 Bestimmung des Infektionsgrades mittels Einzelantikörpern und Antikörpergemisch

Aufgrund der Nachteile der Verwendung des Antikörpergemisches im Hinblick auf Mehrfachfärbungen wurden die im Gemisch enthaltenen Antikörper gegen NP und M1 einzeln darauf getestet, ob sie sich zur Infektionsquantifizierung eignen. Dazu wurden die konjugierten Einzelantikörper mittels Durchflusszytometrie mit dem Gemisch verglichen.

Die Antikörperfärbungen wurden anhand von PFA/EtOH-fixierten Zellen quantitativ untersucht. Dazu wurden scheininfizierte Zellen (mock) und Überstandszellen aus mit humanem Influenza A PR/8/34 NIBSC infizierten Rollerflaschen (MOI = 0,5, Ernte nach 20 h p.i.) verwendet. Dabei wurde postuliert, dass sich MDCK-Zellen nach Infektion mit Influenza-Virus und Apoptoseinduktion von der Oberfläche ablösen. Es wurde also erwartet, dass in der abgelösten Zellpopulation eine annähernd vollständige Infektion der Zellen vorlag. Die Färbungen wurden sechsmal unabhängig voneinander als Doppelbestimmung durchgeführt. Jeweils wurden die Proben ungefärbt sowie mit dem Antikörpergemisch, M1-Antikörper bzw. NP-Antikörper gemessen. Anhand der scheininfizierten Proben wurde jeweils der Grenzwert für die Detektion infizierter (positiver) Zellen bestimmt (Abbildung 4-7a).

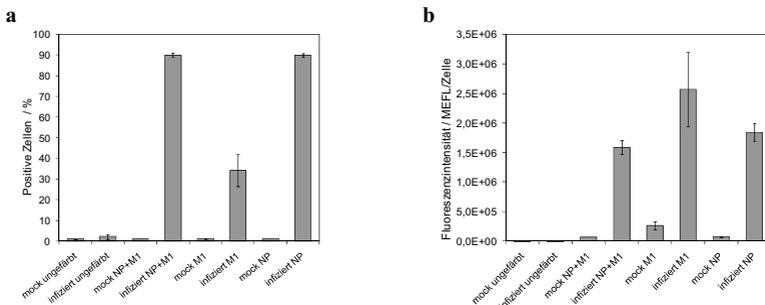


Abbildung 4-7: Cytometrische Messung von scheininfizierten und infizierten MDCK-Zellen (20 h p.i. mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,5) nach Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A NP, M1 und NP+M1 (Gemisch)

a: Anteil fluoreszenz-positiver Zellen im Vergleich zu 99 % der scheininfizierten gefärbten Zellen (mock); **b:** Fluoreszenzintensität der gemessenen Proben. Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen der Fluoreszenz-Medianwerte \pm SD

Die gemessenen arbiträren Fluoreszenzintensitäten wurden in Moleküläquivalente von gelöstem Fluoreszein (MEFL) umgerechnet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen (Abbildung 4-7b). Die Fluoreszenzgrenzwerte der Infektionsdetektion (Tabelle 4-3)

lagen dabei bei allen Antikörpern über dem für MEFL-Kalibrationspartikel bestimmten Quantifizierungslimit von $9,65 \times 10^4$ MEFL (Tabelle 4-2).

Bei der Färbung mit dem NP-Antikörper konnte annähernd der gleiche Anteil infizierter Zellen (89,7 %) mit sehr ähnlicher Präzision ($\pm 1,0$ % RSD) wie nach Färbung mit dem Antikörpergemisch (89,8 % $\pm 1,2$ % RSD) gemessen werden. Dagegen wurde durch die Färbung mit dem M1-Antikörper lediglich ein Anteil von 34,2 % $\pm 22,6$ % RSD detektiert.

Tabelle 4-3: Sensitivität der cytometrischen Fluoreszenzmessungen von scheininfizierten und infizierten MDCK-Zellen (20 h p.i. mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,5) nach Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A NP, M1 und NP+M1 (Gemisch)

	mAK-Gemisch (NP+M1)	anti-M1-mAK	anti-NP-mAK
mittlere FI scheininfizierter Zellen (MEFL)	$6,74 \times 10^4$	$2,63 \times 10^5$	$7,10 \times 10^4$
mittlerer Fluoreszenz-Grenzwert der Infektionsdetektion (MEFL)	$1,62 \times 10^5$	$9,60 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$
Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität infizierter und scheininfizierter MDCK-Zellen (MEFL)	$1,36 \times 10^4$	$8,34 \times 10^5$	$2,14 \times 10^4$
$FI_{\text{infizierte Zellen}}/FI_{\text{scheininfizierte Zellen}} (-)$	9,0	1,4	9,2

FI: Fluoreszenzintensität (Median)

Auffallend war bei der Färbung mit M1-Antikörper die um etwa Faktor 10 erhöhte Fluoreszenzintensität der scheininfizierten Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Ansätzen (Abbildung 4-7b und Tabelle 4-3). Die schlechte Differenzierung der infizierten Zellen von den nicht-infizierten Zellen mit dem M1-Antikörper ließ sich auch anhand des Verhältnisses der Medianwerte der Fluoreszenzintensität von Zellen aus scheininfizierter und infizierter Kultur bewerten. Das Verhältnis betrug beim M1-Antikörper lediglich 1,4, jedoch beim NP-Antikörper 9,2 und beim Gemisch der beiden Antikörper 9,0. Die große Abweichung vom Erwartungswert für den Infektionsgrad, die geringe Präzision der Messung, sowie die starke unspezifische Bindung sprachen für eine mangelnde Eignung des M1-Antikörpers zur Infektionsdetektion. Im Gegensatz dazu lieferte die Färbung mit dem NP-Antikörper vergleichbare Ergebnisse wie das Antikörpergemisch. Folglich wurde für die Korrelation der Humaninfluenza-Infektion der Zellen mit der Induktion von Apoptose der Infektionsgrad durch die Färbung mit NP-Antikörper durchgeführt.

4.2.4 Abschätzung der Nukleoprotein-Kopienzahl pro Zelle aus Fluoreszenzfärbungen mit anti-NP-Antikörpern

Cytometrische Fluoreszenzmessungen können zur Quantifizierung qualitativer Merkmale in Partikelpopulationen genutzt werden. So kann beispielsweise der Anteil infizierter und nichtinfizierter Zellen bestimmt werden. Darüber hinaus kann die Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale quantitativ ausgewertet werden. Insbesondere die Abschätzung der Anzahl der Antigene pro Zelle aus Fluoreszenzfärbungen kann dabei von Interesse sein. Für die Prozesscharakterisierung war die Abschätzung der Anzahl von Kopien des viralen Nukleoproteins pro Zelle wichtig, um das Replikationsverhalten infizierter Zellen genauer untersuchen zu können.

Durch Kalibrationsmessungen mit FITC-konjugierten Partikeln war es möglich, die arbiträren Fluoreszenzsignale des Durchflusscytometers in die standardisierte Form von Molekül-äquivalenten von gelöstem Fluoreszein zu überführen (Kapitel 2.4.2 und Kapitel 3.7.2). Die Fluoreszenzausbeute von FITC ist abhängig davon, ob der Farbstoff gelöst (Fluoreszein), an Antikörper konjugiert oder an Kalibrationspartikel konjugiert (FITC) vorliegt (Abbasi et al. 2002). Als Bezugsgröße für die Bestimmung der FITC-Beladung der Kalibrationspartikel wird vom Partikelhersteller gelöstes Fluoreszein (NIST-Standardreferenzmaterial Nr. 1932, Schwartz et al. 2002) verwendet. Folglich wird der Unterschied in der Fluoreszenzausbeute zwischen gelöstem Fluoreszein und an die Partikel gebundenem FITC kompensiert.

Ausgehend davon wurde die Fluoreszenzausbeute von Partikel- und Antikörper-gebundenem FITC mittels Fluoreszenzspektrophotometrie verglichen, um die mögliche Veränderung der FITC-Fluoreszenzausbeute durch Konjugation an die monoklonalen Antikörper zu berücksichtigen. Dazu wurde die Fluoreszenz von FITC, sowohl gelöst als auch gebunden an die Kalibrationspartikel und an den NP-Antikörper, jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen im Fluoreszenzspektrophotometer (Sp) gemessen. Die Durchflusscytometer-einstellungen der Anregungs- und Emissionswellenlänge für die Messung von FITC wurden auf das Fluoreszenzspektrophotometer übertragen. Als Lösungsmittel wurde Cytometriepuffer (Tabelle 3-5, pH 7,5) verwendet.

Zum Nachweis der Linearität der Spektrophotometermessungen über den Bereich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden Verdünnungen von gelöstem Fluoreszein analysiert, die den gesamten möglichen Messbereich abdeckten (Abbildung 4-8a). Die Regression wurde gewichtet durchgeführt, da der Messfehler proportional zur Höhe der Fluoreszenzintensität ist.

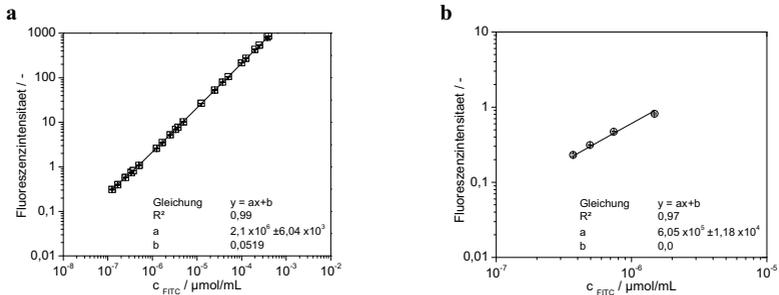


Abbildung 4-8: Gewichtete Regression spektrophotometrischer Fluoreszenzmessungen von Fluoreszein-Konzentrationsreihen

a: gelöstes Fluoreszein; **b:** Differenzen aus Messungen von FITC-konjugierten Partikeln und ungefärbten Partikeln

Fluoreszenz-Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (Symbole) \pm SD, Lineare Regression der Messwerte mit Wichtung proportional zur Fluoreszenzintensität (Linie und Geradengleichung mit Bestimmtheitsmaß)

Bei der Messung der Kalibrationspartikel wurden neben den fluoreszierenden Partikeln die gleichen Partikelkonzentrationen an Partikeln ohne FITC-Konjugation gemessen, um den Signalanteil der Lichtstreuung und der Hintergrundfluoreszenz der Partikel zu eliminieren (Mäntle 1998). Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten stellte das FITC-spezifische Signal dar (Abbildung 4-8b). Die FITC-Konzentration wurde aus der bekannten Partikelkonzentration und FITC-Teilchendichte pro Partikel ($n^{\text{Bead-FITC}} = 8,9 \times 10^5$ MESF/Partikel) berechnet. Analog wurde bei der Messung der Fluoreszenz der Antikörper die entsprechende FITC-Konzentration aus der bekannten Antikörperkonzentration und dem Konjugationsverhältnis (F/P) berechnet. Die Ergebnisse der Konzentrationsreihen von FITC konjugiert an den M1-Antikörper und den NP-Antikörper sind in Abbildung 4-9a bzw. Abbildung 4-9b dargestellt.

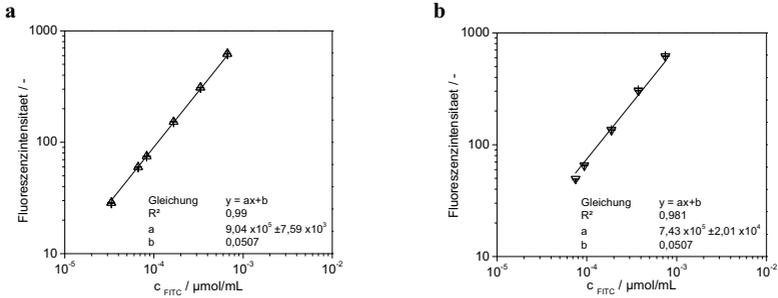


Abbildung 4-9: Gewichtete Regression spektrophotometrischer Fluoreszenzmessungen von FITC-Konzentrationsreihen (Antikörper-Antikörper-Konjugat)

a: FITC-anti-M1-mAK; **b:** FITC-anti-NP-mAK

Fluoreszenz-Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (Symbole) \pm SD, Lineare Regression der Messwerte mit Wichtung proportional zur Fluoreszenzintensität (Linie und Geradengleichung mit Bestimmtheitsmaß)

Die für die jeweiligen Analyten bestimmten Steigungen der Regressionsgeraden (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9) stellen die Fluoreszenzausbeute pro FITC-Molekül dar (a_{Sp}). Über das Verhältnis der Steigung des an die Antikörper konjugierten FITC zur Steigung des an Kalibrationspartikel konjugierten FITC ($a_{Sp \text{ AK-FITC}}/a_{Sp \text{ Bead-FITC}}$) konnten die Messwerte miteinander korreliert werden (Tabelle 4-4). Da sich die Eigenschaften der Analyten nicht änderten, wurde angenommen, dass bei durchflusscytometrischen Messungen das für die Fluoreszenzspektrophotometrie ermittelte Verhältnis der Fluoreszenzausbeuten gleich bleibt (Formel (2-8)).

Tabelle 4-4: Übersicht der aus den spektrophotometrischen und cytometrischen Daten berechneten Fluoreszenzausbeuten

	FITC	Kalibrationspartikel	M1-mAK	NP-mAK
Index	FITC	Bead-FITC	M1-FITC	NP-FITC
a_{Sp} [A.U./($\mu\text{mol/mL}$)]	$2,101 \times 10^6$	$0,605 \times 10^6$	$0,904 \times 10^6$	$0,743 \times 10^6$
Standardfehler von a_{Sp} [A.U./($\mu\text{mol/mL}$)]	$0,60 \times 10^4$	$1,18 \times 10^4$	$0,76 \times 10^4$	$2,01 \times 10^4$
R^2 [-]	0,999	0,972	0,950	0,981
$a_{Sp \text{ AK-FITC}}/a_{Sp \text{ Bead-FITC}}$	-	-	1,49	1,23

Durch die Bestimmung des konstanten Verhältnisses von $a_{Sp \text{ AK-FITC}}$ und $a_{Sp \text{ Bead-FITC}}$ für den M1- und NP- Antikörper und von $a_{FC \text{ Bead-FITC}}$ durch die routinemäßig durchgeführten Kalibrationen der cytometrischen Fluoreszenzintensitäten war es möglich, die experimentell nicht bestimmbar Werte für $a_{FC \text{ M1-FITC}}$ (Formel (4-1)) und $a_{FC \text{ NP-FITC}}$ (Formel (4-2)) zu

berechnen. Anhand der Herstellerangaben für das Fluorochrom-Protein-Verhältnis (NP: 4,0, M1: 4,5) ließen sich n'_{M1} (Formel (4-3)) und n'_{NP} (Formel (4-4)) bestimmen. Aufgrund der nicht messbaren cytometrischen Fluoreszenzintensität der nicht konjugierten Kalibrationspartikel ($I < 1$) konnte die cytometrische Hintergrundfluoreszenz vernachlässigt werden ($b_{FC\text{ Bead-FITC}} = 0$). Durch die Bestimmung der Anzahl unspezifisch gebundener Antikörper in einer Zellpopulation ohne Virusproteine ($n'_{AK\text{ Negativkontrolle}}$) war es so möglich, die Anzahl der spezifisch gebundenen Antikörper in der infizierten Zellpopulation zu bestimmen. Dadurch ist es möglich, die Anzahl der Virusproteine pro Zelle abzuschätzen (Formel (2-12)).

$$a_{FC\ M1-FITC} = 1,49 \times a_{FC\ \text{Bead-FITC}} \quad (4-1)$$

$$a_{FC\ NP-FITC} = 1,23 \times a_{FC\ \text{Bead-FITC}} \quad (4-2)$$

$$n'_{P\ M1} = \left(\frac{I_{FC} - b_{FC\ \text{Bead-FITC}}}{a_{FC\ \text{Bead-FITC}} \times 1,49} \right) / 4,0 \quad (4-3)$$

$$n'_{P\ NP} = \left(\frac{I_{FC} - b_{FC\ \text{Bead-FITC}}}{a_{FC\ \text{Bead-FITC}} \times 1,23} \right) / 4,5 \quad (4-4)$$

mit

a	Fluoreszenzausbeute (I/c bzw. I/n'p)	[A.U.]/(mol/mL)] bzw. [A.U.]/(mol/Partikel)]
b	Hintergrundsignal, Leerwert	[A.U.]
c	Stoffkonzentration	[mol/mL]
F	Stoffmenge Fluorochrom	[mol]
I	Fluoreszenzintensität	[A.U.]
n'_{AK}	partikelbezogene Teilchendichte	[1/Partikel]
P	Stoffmenge Protein	[mol]

Indices:

AK	monoklonaler Antikörper (anti-NP oder -M1)
AK-FITC	FITC konjugiert an monoklonalen Antikörper
Bead-FITC	FITC konjugiert an Kalibrationspartikel
FC	durchflusscytometrisch bestimmt
NP-FITC	FITC konjugiert an Influenza NP-mAK
M1-FITC	FITC konjugiert an Influenza M1-mAK
Sp	spektrophotometrisch bestimmt

Die Umrechnung von cytometrischen Fluoreszenzintensitäten in NP-Molekülkopien pro Zelle ist mit einer Vielzahl von Messfehlern behaftet (Spektrophotometermessung, cytometrische

Kalibrationsmessung, Messung der FITC-Fluoreszenz in den Proben). Zusätzlich beruht die äquimolare Bindung der Antikörper an die Antigene auf einer Annahme. Daraus folgt, dass die Umrechnung lediglich eine Abschätzung ermöglicht. Dennoch ermöglicht der Vergleich von verschiedenen Proben eine qualitative Interpretation bzgl. der Anzahl der Nukleoproteinkopien pro Zelle (Kapitel 4.4.2).

4.2.5 Kapitelzusammenfassung und -diskussion

Für die cytometrische Fluoreszenzmessung mit FITC-konjugierten MEFL-Kalibrationspartikeln konnte für die gleichen Messeinstellungen, die auch für Antikörperfärbungen benutzt wurden, ein Detektionslimit von $3,18 \times 10^4$ MEFL und ein Quantifizierungslimit von $9,65 \times 10^4$ MEFL bei einer relativen Standardabweichung der Methode von 9,6 % nachgewiesen werden (Tabelle 4-2). Durch eine Erhöhung der PMT-Spannung kann die Sensitivität von cytometrischen Messungen erhöht werden (Shapiro 2003). Um aber auch eine Quantifizierung sehr hoher Fluoreszenzintensitäten innerhalb des Messbereiches des Durchflusscytometers zu ermöglichen, wurde die hier verwendete PMT-Spannung nicht erhöht.

Der Einsatz der verwendeten Antikörper gegen Influenza A NP und M1 in Kombination und des Antikörpers gegen NP einzeln ermöglichte die Quantifizierung infizierter Zellen. Für die Antikörperkombination konnte zusätzlich zu humanem Influenza A-Virus H1N1 auch bei equinem Influenza A-Virus H3N8 und porcinem Influenza A-Virus H1N2 eine spezifische Antikörperbindung von mindestens einem Antikörper gezeigt werden. Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Färbung infizierter Zellen mit dem Antikörpergemisch für ein breiteres Spektrum an Influenza-Virusstämmen (insbesondere in Bezug auf den Subtyp und die Wirtsspezifität) geeignet ist, als bisher für den NP-Antikörper allein bekannt (Lonsdale et al. 2003). Die frühesten Zeitpunkte für Detektion (2 – 4 h p.i.) und Quantifizierung (4 – 6 h p.i.) entsprechen den Ergebnissen von Lonsdale et al. (Lonsdale et al. 2003) und Rimmelzwaan et al. (Rimmelzwaan et al. 1998).

Die Beobachtung von Fluoreszenz in den gesamten Zellen ging vermutlich darauf zurück, dass während der Infektion einer Zelle sowohl das Nukleoprotein als auch das Matrixprotein im Cytoplasma synthetisiert werden und in den Nukleus transferiert werden (Lamb und Krug 2001). Aufgrund des Fehlens von viralen Antigenen in nicht-infizierten Zellen beruhte der gemessene Fluoreszenzunterschied zwischen gefärbten und ungefärbten nicht-infizierten Zellen auf unspezifischer Antikörperbindung. Im Gegensatz dazu beruhte die Fluoreszenz-

zunahme zwischen gefärbten nicht-infizierten Zellen und gefärbten infizierten Zellen im Wesentlichen auf spezifischer Antikörperbindung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörperkombination geeignet ist, den Verlauf der Influenza-Infektion in Bioreaktorkultivierungen nachzuverfolgen (Abbildung 4-6). Dabei stellt das gemessene Fluoreszenzsignal lediglich das Nettosignal der gebildeten Virusproteine und der in Form von Viruspartikeln abgegebenen Proteine dar. Dies beruht vermutlich auf Unterschieden in der Proteinbildungs- und Virusfreisetzungskinetik (Lamb und Krug 2001; Lonsdale et al. 2003; Sidorenko und Reichl 2004).

Im Gegensatz zu früheren Publikationen (Steele-Mortimer et al. 1990) war es möglich, Proben aus Bioreaktorkultivierungen mit Ethanol zu fixieren und simultan zu färben. Dies führte neben der Erhöhung der Vergleichbarkeit innerhalb einer Messreihe zusätzlich zu erhöhter biologischer Sicherheit während der Probenvorbereitung. Die Kalibration der gemessenen arbiträren Fluoreszenzen als MEFL ermöglichte zusätzlich den Vergleich von verschiedenen Messreihen unabhängig von gerätespezifischen Einflüssen auf die Messung (Schwartz et al. 2004). Es wurden geringe Unterschiede in der Fluoreszenz von nicht-infizierten Zellen und scheininfizierten Zellen (mock-Infektion) festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Vorbereitung der Zellen auf die Infektion (Waschen, Mediumswechsel) einen Einfluss auf die Autofluoreszenz oder die unspezifische Antikörperbindung hat. Daher wurden im Folgenden scheininfizierte Zellen bzw. Zellen zum Zeitpunkt ca. 0 h p.i. als Negativkontrollen für die Virusinfektion verwendet.

Grundsätzlich kann durch die Verwendung des Antikörpergemisches die Influenza-Infektion in MDCK-Zellen durchflussscytometrisch quantifiziert werden. Die Methode wurde genutzt, um eine fundierte Datenbasis für stochastische und populationsbezogene Modellierungsansätze zur Beschreibung der Virusreplikation in Bioreaktoren zur Verfügung zu stellen (Müller et al. 2008; Sidorenko et al. 2008a; Sidorenko et al. 2008b).

Die Nutzung des Antikörpergemisches für die parallele Analyse unterschiedlicher Parameter durch Mehrfachfärbung der Zellen ist jedoch aufgrund des in der Antikörperlösung enthaltenen Evans Blau beschränkt. Der Farbstoff wird in der Mikroskopie eingesetzt, um die Permeabilisierung von Zellen nachzuweisen (Saria und Lundberg 1983) und so falsch negative intrazelluläre Färbungen zu vermeiden. Das Emissionsspektrum von Evans Blau überlagert das Emissionsspektrum von roten Fluoreszenzfarbstoffen, wie beispielsweise Tetramethylrhodamin und ist folglich für eine Kombinationsfärbung kaum geeignet.

Die Kombination von zwei Antikörpern ermöglichte keine Aufschlüsselung, welches Antigen die Antikörperbindung verursacht, da beide Antigene ein Summensignal bilden. Zur Untersuchung der Antikörperbindung wurden Versuche mit jeweils einem Antikörper gemacht und anschließend mit den Ergebnissen der Antikörperkombination verglichen (Kapitel 4.2.3). Dabei konnte gezeigt werden, dass für die Quantifizierung der Infektion mit humanem Influenza A H1N1 mit der Antikörperkombination und dem Antikörper gegen NP vergleichbar gute Ergebnisse erreicht werden konnten (Abbildung 4-7). Das Fluoreszenzverhältnis von infizierten zu scheininfizierten Zellen betrug beim M1-Antikörper lediglich 1,4, jedoch beim NP-Antikörper 9,2 und beim Gemisch der beiden Antikörper 9,0. Der Antikörper gegen Influenza A M1 erwies sich aufgrund von großer Abweichung vom Erwartungswert für den Infektionsgrad, geringer Messpräzision, sowie starker unspezifischer Bindung als ungeeignet zur Infektionsdetektion für den verwendeten Stamm.

Im Gegensatz zur Antikörperkombination enthielt der Antikörper gegen NP keinen zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoff und war daher für die Kombinationsfärbung mit anderen Farbstoffen geeignet. Folglich wurde für die Korrelation der Humaninfluenza-Infektion der Zellen mit der Induktion von Apoptose der Infektionsgrad durch die Färbung mit NP-Antikörper durchgeführt (Kapitel 4.4).

Um eine Abschätzung der detektierten Virusprotein-Kopienzahl zu ermöglichen, wurde die arbiträre cytomertische Fluoreszenz anhand von kalibrierten Fluoreszenzintensitäten mit Fluoreszenzintensitäten aus fluoreszenzspektrophotometrischen Messungen abgeglichen. Als Bezugsgröße für die Bestimmung der FITC-Beladung der Kalibrationspartikel wird gelöstes Fluoreszein verwendet (Schwartz et al. 2002). Der Unterschied in der Fluoreszenzausbeute zwischen gelöstem Fluoreszein und an die Partikel gebundenem FITC wird dabei kompensiert. Durch die Bestimmung des konstanten Verhältnisses von $a_{SP\ AK-FITC}$ und $a_{SP\ Bead-FITC}$ für den M1- und NP- Antikörper und von $a_{FC\ Bead-FITC}$ durch die routinemäßig durchgeführten Kalibrationen der cytomertischen Fluoreszenzintensitäten war es möglich, die experimentell nicht bestimmbar Werte für $a_{FC\ M1-FITC}$ (Formel (4-1)) und $a_{FC\ NP-FITC}$ (Formel (4-2)) zu berechnen. Durch die Bestimmung der Anzahl unspezifisch gebundener Antikörper in einer scheininfizierten Zellpopulation (ohne Virusproteine) war es so möglich, die Anzahl der spezifisch gebundenen Antikörper in der infizierten Zellpopulation zu bestimmen. Basierend auf der Annahme, dass an alle Antigene genau ein Antikörpermolekül bindet, kann aus der cytomertisch gemessenen Fluoreszenzintensität infizierter Zellen eine Abschätzung der vorhandenen NP-Kopienzahl getroffen werden. Eine vergleichbare Quantifizierungs-

methode von Antigenen mittels Durchflusscytometrie wird beispielsweise zur Analyse und Prognose der Malignität von Tumoren genutzt (Kusenda 2008).

Die Abschätzung der vorhandenen NP-Moleküle pro Zelle könnte für detaillierte Studien der Influenza-Virusreplikation genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode für den Vergleich des NP-Gehalts von adhärennten und abgelösten Zellen sowie apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen verwendet (Kapitel 4.4.2). Die Schlussfolgerungen daraus wurden für die Interpretation der Dynamik der Virusreplikation in MDCK-Zellen während der Virusproduktion hinzugezogen (Kapitel 4.4.6).

4.3 Auswahl der Methoden zur Apoptosequantifizierung

Neben der mikroskopischen Identifikation morphologischer Merkmale apoptotischer Zellen gibt es eine Vielzahl von qualitativen und quantitativen Analytikmethoden zum Nachweis der Apoptose in Zellkulturen (Darzynkiewicz und Traganos 1998). Ziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Analyse der Apoptose in Zellkulturproben mittels Durchflusscytometrie, nach Möglichkeit in Kombination mit dem gleichzeitigen Nachweis der Influenza-Virusinfektion in den Zellen. Dazu wurden Methoden ausgewählt, die unabhängig vom Induktionsweg (extrinsisch oder intrinsisch) sind, ein möglichst großes zeitliches Detektionsfenster im Verlauf der Apoptose haben und eine Konservierung der Zellen durch Fixierung ermöglichen (Kapitel 2.4.3). Eine Unterscheidung der Induktionswege war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen. Tatsächlich besteht das Risiko, durch die Verwendung einer Induktionsweg-spezifischen Methode nur die apoptotischen Zellen zu erfassen, die auf dem entsprechenden Weg induziert wurden. Dabei würden Zellen, die über einen alternativen Induktionsweg apoptotisch werden, nicht erfasst, was zu einer Unterschätzung des Anteils apoptotischer Zellen führen könnte. Dementsprechend wurden keine Induktionsweg-abhängigen Methoden eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellt die gezielte Auswahl von geeigneten Methoden zur Apoptosedetektion ein Ergebnis der anwendungsbezogenen Analyse von Literaturquellen dar und wird daher im Ergebnisteil beschrieben.

Aufgrund des zellbasierten Messprinzips und der hohen statistischen Präzision der Messungen wurde die Durchflusscytometrie gegenüber anderen Analysetechniken wie ELISA, SDS-PAGE oder Agarose-Gelelektrophorese bevorzugt. Eine Übersicht häufig verwendeter Methoden zur cytometrischen Quantifizierung apoptotischer Zellen ist in Tabelle 4-5

dargestellt. Die Methoden unterscheiden sich stark in ihrer Eignung hinsichtlich der genannten Anforderungen.

Tabelle 4-5: Methoden zur durchflusscytometrischen Quantifizierung der Apoptose

Methoden- Methode	Annexin V- Färbung	Caspase- Anti- körper	Caspase- Inhibitor (spezi- fisch)	Caspase- Inhibitor (unspezi- fisch)	Fas- Ligand- Anti- körper	Mitochon- drien- Membran- potential	PARP- Spaltung	Sub-G0- DNA- Gehalt	Cada- verin- Färbung	TUNEL- Färbung
Apoptose- merkmal	Phospho- tydylserin- Flipping	Aktivität einzelner Caspasen	Aktivität einzelner Caspasen	Aktivität vieler Caspasen	DISC- Aktivier- ung	Verlust des Membran- potentials durch Porenöff- nung	Spaltung von PARP durch aktive Caspasen	DNA- Fragment- ierung in Oligo- nucleo- somen	Nachweis von aktiver Transgluta- minase TG2	DNA- Strang- brüche
Literatur	van Engeland et al. 1998	Kaufmann et al. 2008	Bedner et al. 2000	Jayaraman 2003	Abrahams et al. 2003	Darzynkiewicz et al. 1982	Li und Darzynkiewicz 2000	Nicoletti et al. 1991	Grabarek et al. 2002	Darzynkiewicz et al. 1992
Induktionsweg unabhängig	ja	Caspase-3: ja	Caspase-3: ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja
Vitalfärbung erforderlich	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	nein
Fixierung vor Färbung möglich	nein	nein	nein	nein	nein	nein	PFA	EtOH	MeOH	PFA/EtOH

Während der Apoptose wird die enzymatisch aufrechterhaltene Asymmetrie der Cytoplasmamembran aufgehoben. Dadurch kann das auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht lokalisierte Phosphatidylserin durch extrazelluläre Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Methode ist unabhängig davon, ob die Apoptose in den Zellen intrinsisch oder extrinsisch induziert wird. Die Annexinfärbung ist jedoch anfällig für Artefakte. So können zum Beispiel Zellen, die während der Probenvorbereitung (Trypsinierung, Pipettieren) mechanisch geschädigt werden, als falschpositiv gemessen werden, da hier das Annexin in die Zellen diffundieren und die Membran von innen anfärben kann. Außerdem ist eine Färbung nach Fixierung der Zellen nicht möglich, da hierbei in der Regel die Cytoplasmamembran permeabilisiert wird.

Die Detektion der Aktivität einzelner Caspasen über monoklonale Antikörper oder fluoreszenzmarkierte Inhibitoren wird häufig eingesetzt, um die an der Induktion beteiligten Apoptosewege näher zu analysieren. Im Gegensatz dazu war es Ziel der Arbeit, alle apoptotischen Zellen unabhängig vom Induktionsweg zu erfassen. Dazu wurde ein fluoreszenzmarkierter Caspaseinhibitor mit einer Konsensussequenz eingesetzt (Pancaspase-Inhibitor, FITC-VAD-Fluoromethylketon, Kapitel 3.7.4), um möglichst viele aktive Caspasen erfassen zu können. Dies hat den Vorteil, dass unabhängig vom induzierenden Mechanismus die Apoptose über einen langen Zeitraum während der Apoptose nachweisbar ist (Jayaraman 2003). Die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) nach erfolgter Färbung ist möglich.

Die Detektion von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen über Bromodeoxyuridin-triphosphat (BrdU) bzw. fluoreszierende Deoxyuridintriphosphat-Nukleotide (TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL), Kapitel 3.7.5) wurde als Nachweis der Influenzavirus-induzierten Apoptose in MDCK-Zellen beschrieben, allerdings erfolgte hier die Fluoreszenzdetektion mikroskopisch (Lin et al. 2002). Die Kombination der durchflusscytometrischen Apoptosequantifizierung mit der Detektion viraler Antigene wurde für die Infektion von Caco 2-Zellen mit Rotaviren publiziert (Chaibi et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde ein analoger Ansatz für die kombinierte Quantifizierung von apoptotischen und virusinfizierten Zellen gewählt.

Zusätzlich zum TUNEL-Assay wurde der cytometrische Nachweis der Apoptose in MDCK-Zellen über den Sub-G₀-DNA-Gehalt beschrieben (Frisch und Francis 1994). Dabei wurden apoptotische DNA-Fragmente (Oligonucleosomen) durch Zellpermeabilisierung während der Ethanol-Fixierung entfernt. Aufgrund der relativ hohen Ungenauigkeit der Messungen (vgl.

Tabelle 3-13) wurde die Methode im Rahmen dieser Arbeit lediglich als qualitativer Apoptosenachweis eingesetzt (Kapitel 3.7.3).

4.4 Infektion und Apoptose im Bioreaktor

Im Hinblick auf das Ziel der Arbeit, die Zellphysiologie während der Replikation von Influenza-Viren zur Impfstoffproduktion zu untersuchen, stellen die eingesetzten Rührkessel-Bioreaktoren näherungsweise ein Small scale-Modell für den industriellen Produktionsmaßstab dar. Die adhärennten MDCK-Zellen wurden auf Microcarriern in Laborbioreaktoren mit 1,2 L bzw. 5 L Arbeitsvolumen kultiviert. Dadurch war es möglich, über längere Zeiträume ausreichend Probenmaterial für die verschiedenen verwendeten Analysemethoden zu gewinnen, ohne den Verlauf der Kultivierungen zu beeinflussen. Lediglich für die Untersuchung von sehr gering konzentrierten Zellpopulationen mittels Durchflussscytometrie reichte das Volumen der 1,2 L-Bioreaktoren nicht aus, um eine ausreichende Probenmenge bereitzustellen. Dementsprechend wurden hier die Versuche im größeren Maßstab durchgeführt. Im Vergleich zu den 5 L-Bioreaktoren waren bei den 1,2 L-Bioreaktoren die Rüstzeiten sowie der Bedarf an Verbrauchsmitteln (Medium, Microcarrier, Vorkultur) geringer, weshalb sie bevorzugt eingesetzt wurden.

4.4.1 Scheininfektion von MDCK-Zellen

Aus der Literatur sind viele verschiedene Auslöser der Apoptose bekannt (Kapitel 2.5.2). Um die Influenza-virusinduzierte Apoptose von der Apoptoseinduktion durch die Kultivierungsbedingungen und die Prozessführung unterscheiden zu können, wurden Scheininfektionen (mock-Infektionen) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte dabei exakt analog zu den Bioreaktorkultivierungen mit Virusinfektion (Kapitel 3.4). Der wesentliche Unterschied war das Fehlen des Saatvirus in der Virusphase der Kultivierungen. Infolgedessen waren auch potentielle Faktoren zur Apoptoseinduktion, wie zum Beispiel das Waschen der Microcarrier-suspension mit PBS sowie der Wechsel vom Zellkulturmedium zum serumfreien Viruskulturmedium mit Trypsin Bestandteil der Scheininfektion.

Influenza-Saativiren enthalten auch im industriellen Maßstab typischerweise neben den infektiösen Influenza-Viren auch nicht-infektiöse Viruspartikel. Folglich ist die potentielle Induktion von Apoptose durch nicht-infektiöse Partikel oder andere Saatvirusbestandteile

(freie Wirtszell-DNA, Signalmoleküle sowie virale RNA und Virusproteine aus geschädigten Viruspartikeln) indirekt eine Folge der Saatviruszugabe. Auf Scheininfektionen mit nicht-infektiösem Saatvirus (sham-Infektionen) wurde daher verzichtet. Stattdessen wurden Scheininfektionen durchgeführt, um die durch die Prozessführung bedingte Apoptose zu quantifizieren.

Die Konzentrationsverläufe der adhärenenten Zellen und Zellen im Überstand von zwei scheininfizierten Bioreaktorkultivierungen sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

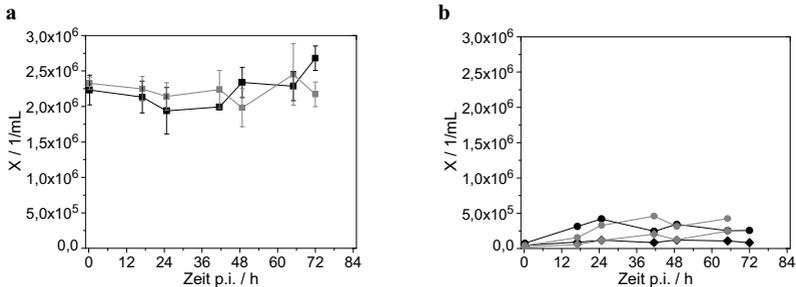


Abbildung 4-10: Verlauf der Konzentration von MDCK-Zellen nach Scheininfektion im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (schwarz, grau dargestellt): **a**: adhärenente Zellen auf Microcarriern (Mittelwerte (Symbole) \pm S), $n = 3$); **b**: abgelöste Zellen im Überstand: (●, ○: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen; ◆, ◇: Konzentration toter Zellen)

Die Konzentrationen der adhärenenten Zellen blieben nach Scheininfektion annähernd konstant bei etwa $2,2 \times 10^6$ Zellen/mL. Im Zuge des vorher durchgeführten Waschvorgangs wurden die während der Zellwachstumsphase von den Microcarriern abgelösten Überstandszellen entfernt. Der Anteil der Überstandszellen an der Gesamtzellkonzentration zum Zeitpunkt der Scheininfektion betrug dementsprechend ca. 3 %. Im Verlauf der Scheininfektion stieg der Anteil der Überstandszellen bis maximal 18 %. Die gemessenen Zellkonzentrationen wurden durch qualitative mikroskopische Beobachtungen bestätigt (Abbildung 4-11). Es wurde keine Zunahme des Bedeckungsgrades der Microcarrier beobachtet. Parallel dazu nahm die Konzentration von Zellen im Überstand nach der Scheininfektion geringfügig zu.

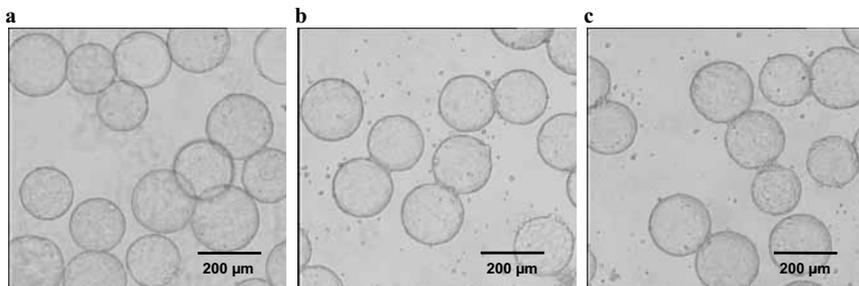


Abbildung 4-11: Mikroskopische Aufnahmen von MDCK-Zellen auf Microcarriern im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfection (100x Vergrößerung, mittlerer Durchmesser (d_m) der Cytodex I-Microcarrier: ca. 190 µm (Bock 2003))

a: 0,25 h p.i.; b: 24,75 h p.i.; c: 65,0 h p.i.

Analog zum minimalen Anteil von Überstandszellen an der Gesamtzellkonzentration wurde daher angenommen, dass zum Zeitpunkt der Scheininfection die Anteile der apoptotischen und infizierten Zellen an der Gesamtpopulation von adhärenenten und Überstandszellen minimal waren. Entsprechend wurden mit Proben von diesem Zeitpunkt die Fluoreszenzgrenzwerte für die cytometrische Detektion der Infektion (mit NP-mAK, Kapitel 3.7.5) und der apoptotischen DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay, Kapitel 3.7.6) gesetzt. Im Verlauf der Scheininfection konnte erwartungsgemäß keine Virusinfektion von Zellen detektiert werden (Abbildung 4-12).

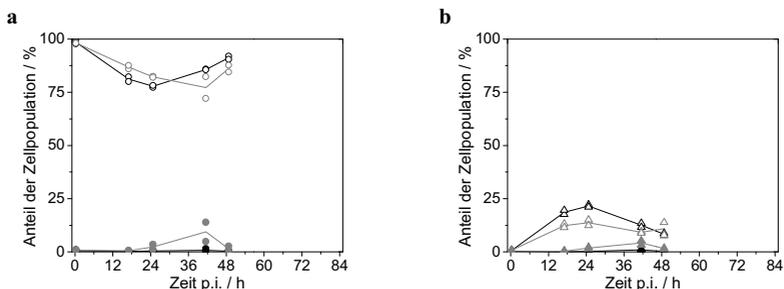


Abbildung 4-12: Verlauf der Infektion und Apoptose von MDCK-Zellen nach Scheininfection im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau) mit Mittelwerten aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); a: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (○,○), „infiziert“ (●,●); b: apoptotische Zellen: nicht infiziert (△,△), „infiziert“ (▲,▲)

Der erhöhte Messwert für „infizierte“ nicht-apoptotische Zellen bei 41,5 h p.i. beruht auf einer falschpositiven Einzelmessung (Abbildung 4-12a). Zu diesem Zeitpunkt wurden auch 4,2 % der Zellen falschpositiv als „infiziert“ und apoptotisch detektiert (Abbildung 4-12b).

Korrespondierend zur Abnahme des Anteils der nicht-infizierten nicht-apoptotischen Zellen nahmen der Anteil der nicht-infizierten apoptotischen Zellen im Verlauf der Scheininfektion zunächst zu und später wieder ab.

Apoptotische MDCK-Zellen lösen sich aus der Monolayer vitaler Zellen und können im Kulturüberstand wiedergefunden werden (Rosenblatt et al. 2001). Um zu überprüfen, ob dieses Verhalten auch während der Scheininfektion von MDCK-Zellen auf Microcarriern vorlag, wurde das Verhältnis des Anteils apoptotischer Zellen zum Anteil der Zellen im Überstand (Apoptose-Index, AI_{sus}) berechnet und über den Kultivierungszeitraum aufgetragen (Abbildung 4-13). Dieser Quotient bildet ein Maß für die Korrelation der Apoptose in der Gesamtpopulation mit dem Anteil der Überstandszellen. Für den Fall von $AI_{\text{sus}} = 1$ ist der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation gleich dem Anteil der Zellen im Überstand an der Gesamtpopulation. Analog wird das Verhältnis des Anteils apoptotischer Zellen zum Anteil adhärenter Zellen an der Gesamtzellpopulation im Bioreaktor als AI_{ad} bezeichnet. Die Berechnung von Apoptose-Indices ist insbesondere dann von Interesse, wenn für die Durchfluscytometrie das im Bioreaktor vorliegende Gemisch von adhärenenten Zellen und Zellen im Kulturüberstand zusammen und nicht als getrennte Zellpopulationen analysiert wurde. Im vorliegenden Fall wird deutlich, dass der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation eher mit dem Anteil der Suspensionzellen als dem Anteil der adhärenenten Zellen korreliert ($AI_{\text{sus}} \approx 1$, $AI_{\text{ad}} \ll 1$). Sowohl der Anteil der apoptotischen Zellen wie auch der Suspensionzellen im Vergleich zur adhärenenten Zellzahl waren relativ gering. Die Werte von $AI_{\text{sus}} > 1$ könnten daher durch die Summierung der Messungenauigkeiten bei der Zellzählung bzw. der Durchfluscytometrie bedingt sein.

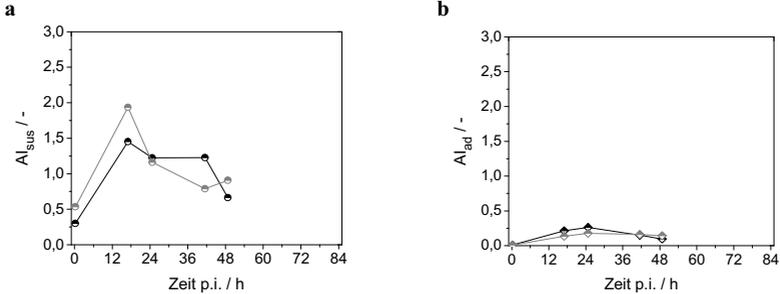


Abbildung 4-13: Verhältnis des Anteils apoptotischer Zellen zum Anteil der jeweils betrachteten Zellpopulation an der Gesamtzellpopulation (Apoptoseindex, AI) von MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfection

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: für den Anteil von Zellen im Überstand: $AI_{sus} (\circ, \circ)$; b: für den Anteil adhärenere Zellen: $AI_{ad} (\diamond, \diamond)$

Zusätzlich zur Quantifizierung der Zellkonzentrationen, des Infektionszustandes sowie der Apoptose wurde die Konzentration der wichtigsten Metabolite bestimmt, um einen Einfluss von Substratlimitierungen bzw. Inhibitionen durch Metabolite auszuschließen (Kapitel 2.3.6). Glukose war während der Scheininfectionen in nicht-limitierender Konzentration vorhanden, die Laktatfreisetzung erreichte erst gegen Ende der Kultivierungen möglicherweise inhibierende Konzentrationen (Abbildung 4-14a). Im Gegensatz zu Glutamat wurde Glutamin nicht vollständig verbraucht und stand in ausreichender Menge zur Verfügung (Abbildung 4-14b). Die erreichten Ammoniumkonzentrationen lagen deutlich unterhalb der Inhibitions-grenze ($> 10 \text{ mmol/L}$, vgl. Tabelle 2-1).

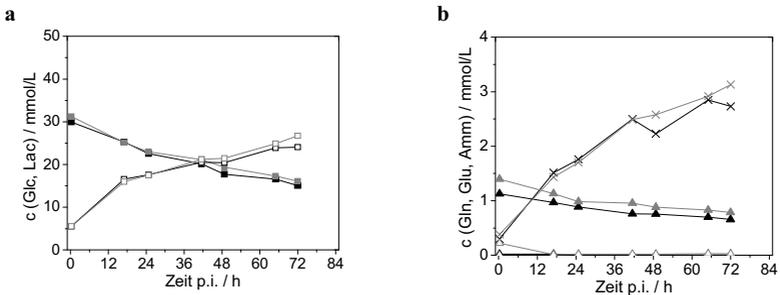


Abbildung 4-14: Verlauf der Metabolitkonzentrationen von MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfection

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: Glukose (Glc, ■, ■) und Laktat (Lac, □, □); b: Glutamin (Gln, ▲, ▲), Glutamat (Glu, △, △) und Ammonium (Amm, ×, ×)

4.4.2 Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC) (Modellprozess)

Der Verlauf der Influenza-Virusinfektion und der Apoptose wurde zunächst anhand des häufig verwendeten humanen Influenza-Virusstammes A PR/8/34 H1N1, bezogen vom NIBSC, untersucht. Vergleichbar mit den Scheininfektionen (Kapitel 4.4.1) und Infektionen mit equinem Influenza-Virus (Genzel et al. 2004a) wurde nach vier Tagen Zellwachstum ein Medienwechsel durchgeführt und mit einer MOI von 0,025 infiziert (vgl. Kapitel 3.4).

Kultivierungen in 1,2 L-Bioreaktoren

Die Kleinreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1,2 Litern (DasGip) ermöglichten die Durchführung von Kultivierungen mit ausreichendem Probenvolumen für die parallele Bestimmung der Zellkonzentrationen auf Microcarriern und im Überstand, der Virustiter, sowie der Metabolite. In der zellbasierten Analytik der Virusinfektion und der Apoptose mittels Durchflusszytometrie wurden adhärenente Zellen und Zellen aus dem Überstand zusammen gemessen. Im Vergleich zu Kultivierungen in den 5 Liter-Bioreaktoren (Sartorius BBI) konnte so der Aufwand an Verbrauchsmitteln (Medium, Microcarrier) sowie die Rüstzeiten verringert werden.

Im Verlauf der Infektionsphase wurde mikroskopisch die Zellablösung von den Microcarriern beobachtet. (Abbildung 4-15).

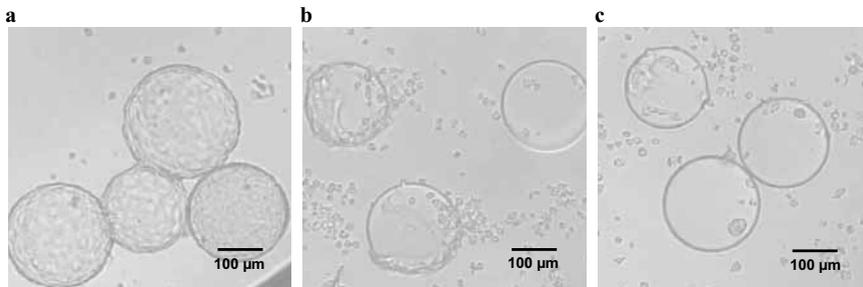


Abbildung 4-15: Mikroskopische Aufnahmen von MDCK-Zellen auf Microcarriern nach Infektion (human A PR8/34 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor

100x Vergrößerung, d_m der Cytodex I-Microcarrier: ca. 190 μm (Bock 2003); a: 0,25 h p.i.; b: 26 h p.i.; c: 49,5 h p.i.

Die Verläufe der Zellkonzentrationen und Virustiter nach der Infektion sind in Abbildung 4-16 dargestellt. Die Konzentrationen der adhärennten Zellen verliefen in beiden Kultivierungen sehr ähnlich, während die Konzentration der Überstandszellen einer Kultivierung (schwarze Symbole) zeitlich versetzt anstieg. Bei den hohen Messwerten für die Überstandszellkonzentrationen 50,5 h p.i. (Abbildung 4-16b, graue Symbole) handelte es sich vermutlich um einen Fehler bei der Zellzählung. Nach etwa 72 h p.i. betrug die Wiederfindung der Zellen auf Microcarriern noch 10 % bzw. 11 % von der maximalen adhärennten Zellkonzentration. Die maximale Wiederfindung der Zellen im Überstand betrug bei den Kultivierungen 60 % bzw. 66 %. Vermutlich wurde der Verlust der Zellen von 30 % bzw. 23 % durch Zellylyse verursacht.

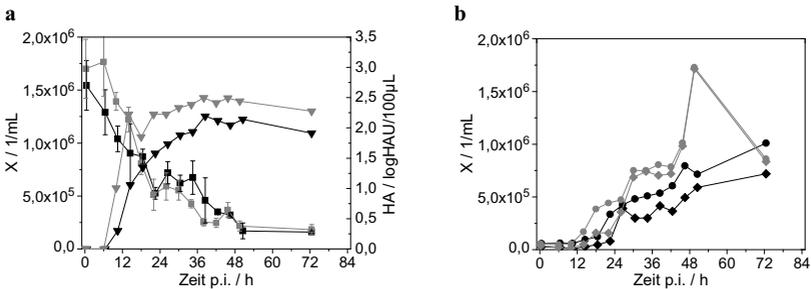


Abbildung 4-16: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); **a**: adhärennte Zellen auf MC (Mittelwerte (■, ■) ± SD (n = 3)), Viruskonzentration im Überstand (▼, ▼); **b**: Zellen im Überstand: (●, ●: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen; ◆, ◆: Konzentration toter Zellen)

Bei beiden Kultivierungen wurde die erste messbare Virusproduktion etwa 10 h p.i. detektiert (Abbildung 4-16a). Bei einem sehr ähnlichen Verlauf der Virusproduktion unterschieden sich jedoch die erreichten Virustiter. Die zellspezifischen Produktausbeutefaktoren $Y'_{P/X}$ der Kultivierungen betrugen etwa 1900 bzw. 3600 Viruspartikel pro Zelle, was einem Unterschied von 90 % entspricht. Der maximale Virustiter von 2,2 bzw. 2,5 log HAU/100 µL wurde bei beiden Kultivierungen nach etwa 38 h p.i. erreicht. Für die cytometrische Quantifizierung der Virusinfektion und der Apoptose wurden adhärennte Zellen und Überstandszellen zusammen fixiert und analysiert.

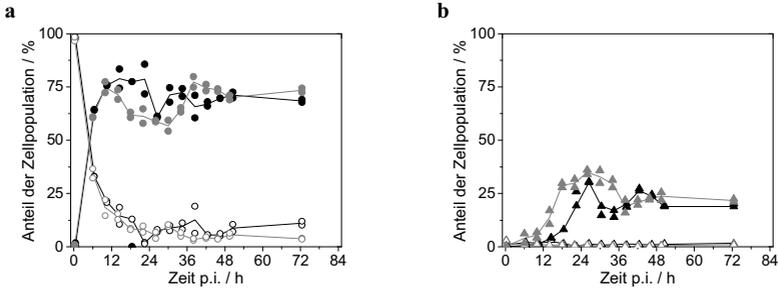


Abbildung 4-17: Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025)

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau) mit Mittelwerten aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); a: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (\circ, \circ), infiziert (\bullet, \bullet); b: apoptotische Zellen: nicht infiziert (\triangle, \triangle), infiziert ($\blacktriangle, \blacktriangle$)

Die Ausbreitung der Infektion in der Gesamtzellpopulation verlief in den beiden dargestellten Kultivierungen synchron, was sich aus der synchronen Abnahme der nicht-infierten nicht-apoptotischen Zellen und Zunahme der infizierten nicht-apoptotischen Zellen innerhalb der ersten 14 h p.i. ableitet (Abbildung 4-17a). Analog zur früheren Zellablösung (Abbildung 4-16b) stieg jedoch bei der Kultivierung mit höherer Produktausbeute (graue Symbole) der Anteil infizierter apoptotischer Zellen früher an (Abbildung 4-17b). Außerdem blieb bei dieser Kultivierung der Anteil von 18 h p.i. bis 34 h p.i. über 25 %, während bei der anderen Kultivierung (schwarze Symbole) nur kurzzeitig so hohe Werte erreicht wurden. Bei beiden Kultivierungen blieb der Anteil nicht-infierten apoptotischer Zellen an der Gesamtzellpopulation unter 2,5 %. Die Mittelwerte über die Kultivierungszeit betragen 1,3 % \pm 0,6 % bzw. 0,7 % \pm 0,4 % Standardabweichung.

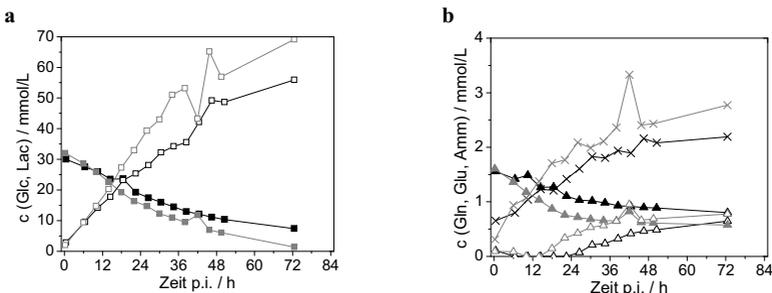


Abbildung 4-18: Verlauf der Metabolitkonzentrationen nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: Glukose ($\blacksquare, \blacksquare$) und Laktat (\square, \square); b: Glutamin ($\blacktriangle, \blacktriangle$), Glutamat (\triangle, \triangle) und Ammonium (\times, \times)

Zusätzlich zu den beobachteten Unterschieden der beiden Kultivierungen in Bezug auf die Virusproduktion und die Apoptose infizierter Zellen zeigte die Kultivierung mit höherer Virusausbeute auch höhere metabolische Aktivität (Abbildung 4-18). Diese war an höherem Glukose- und Glutaminverbrauch sowie höherer Laktat- und Ammoniumbildung zu erkennen. Die Schwankungen in den Metabolitkonzentrationen für die Kultivierung mit höherem Virustiter 38 h p.i. stellten ein Artefakt dar, da sie zu diesem Zeitpunkt bei allen Metaboliten auftraten. Im Vergleich zur Scheininfektion (Kapitel 4.4.1) wiesen die infizierten Kulturen einen höheren Glukoseverbrauch und entsprechend erhöhte Laktatbildung auf. Im späteren Verlauf der Infektionsphase (ab ca. 40 h p.i.) wurden Laktatkonzentrationen erreicht, die möglicherweise inhibierend auf das Zellwachstum wirken könnten (Kapitel 2.3.6). Zur gleichen Zeit wurde auch der maximale HA-Wert gemessen.

Kultivierungen in 5 L-Bioreaktoren

Die gemeinsame Messung von adhärennten Zellen und Zellen im Überstand ermöglichte die Gewinnung von ausreichend Zellen für die Durchflusszytometrie aus relativ kleinen Probenvolumina. Dadurch war es möglich, auch 1,2 L-Reaktoren ausreichend häufig zu beproben. Allerdings konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen aufgeschlüsselt werden, da zu Beginn der Virusphase nur geringe Konzentrationen an Überstandszellen und gegen Ende der Virusphase nur geringe Konzentrationen an adhärennten Zellen vorhanden waren (Abbildung 4-16). Aufgrund des limitierten Reaktorvolumens war es nicht möglich, die entsprechend benötigten Probenvolumina zu entnehmen. Dementsprechend wurden die Kultivierungen zur getrennten Analyse der adhärennten Zellen und Überstandszellen in Bioreaktoren mit 5 L Arbeitsvolumen durchgeführt. Dadurch war es möglich, aus der Gesamtpopulation der Zellen in Bioreaktor zum Zeitpunkt der Probennahmen acht Subpopulationen zu unterscheiden. Durch lokale Trennung konnten adhärennte Zellen auf Microcarriern von abgelösten Zellen im Kulturüberstand getrennt analysiert werden. Anhand der zweifachen Fluoreszenzfärbung auf die Merkmale Apoptose und Influenza-Virusinfektion (mit anti-NP-Antikörper) konnten die adhärennten Zellen und Zellen im Überstand weiter in die vier zytometrisch differenzierten Subpopulationen getrennt werden.

Die Verläufe der Zellkonzentrationen und Virustiter von zwei Kultivierungen unter identischen Bedingungen sind in Abbildung 4-19 dargestellt. Im Rahmen der Genauigkeit der Messungen verliefen die Konzentrationen der adhärennten Zellen gleich, während bei einer

Kultivierung die Virusfreisetzung leicht zeitlich versetzt erfolgte (Abbildung 4-19a). Die Verläufe der Überstandszellen zeigten Unterschiede im Verhältnis von lebenden zu toten Zellen sowie einen zeitlichen Versatz von etwa 12 Stunden bei der Akkumulation von Zellen im Überstand (Abbildung 4-19b).

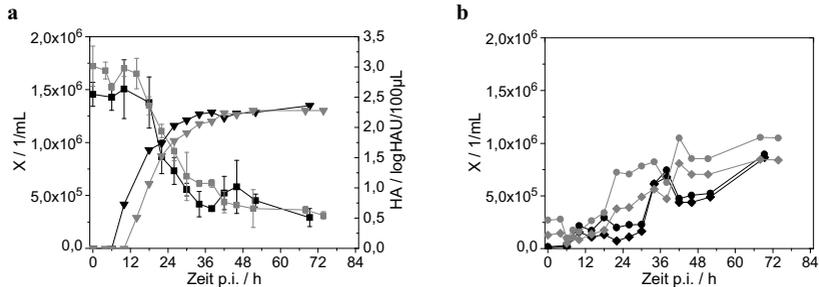


Abbildung 4-19: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: adhärenente Zellen auf MC (■, ■): Mittelwerte \pm SD (n = 4), Viruskonzentration im Überstand (▼, ▼); b: Zellen im Überstand: (●, ●: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen; ◆, ◆: Konzentration toter Zellen)

Die Ausbreitung der Virusinfektion in der adhärenente Zellpopulation erfolgte bei den Kultivierungen weitestgehend synchron (Abbildung 4-20a). Dabei fiel der Anteil der nicht-infizierten Zellen innerhalb der ersten 14 h p.i. unter 25 %. Eine Kultivierung wies einen geringfügig höheren Anteil infizierter apoptotischer Zellen auf Microcarriern auf (Abbildung 4-20b, graue Symbole). Verglichen mit dem Anteil der infizierten apoptotischen Zellen an der Gesamtzellpopulation (Abbildung 4-20b) war der Anteil der adhärenente Zellen mit den gleichen Merkmalen jedoch bei beiden Kultivierungen relativ gering. Der Anteil der nicht-infizierten apoptotischen Zellen auf Microcarriern war minimal (< 0,9 %).

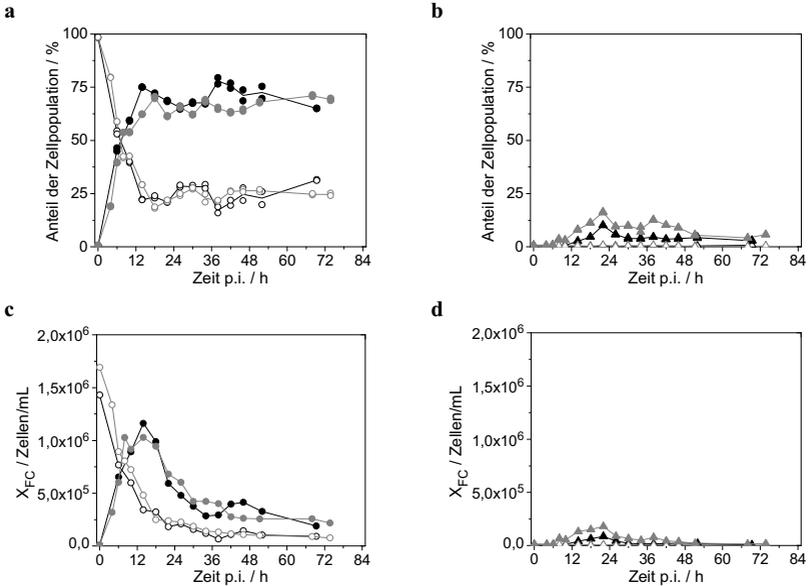


Abbildung 4-20: Verlauf der Infektion und Apoptose in *adhärennten* MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau) mit Mittelwerten aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); **a, b**: prozentualer Anteil der Populationen an den adhärennten Zellen auf Microcarriern; **c, d**: Zellkonzentration der Populationen; **a, c**: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (\circ, \ominus), infiziert ($\bullet, \omin�$); **b, d**: apoptotische Zellen: nicht infiziert (\triangle, \triangle), infiziert ($\blacktriangle, \blacktriangle$)

Der Verlauf von Infektion und Apoptose der Zellen im Überstand unterschied sich bei adhärennten Zellen und Zellen im Überstand wesentlich. Die Zellen im Überstand waren zu einem sehr viel höheren Anteil apoptotisch und infiziert. Auch in Bezug auf den zeitlichen Verlauf des Anteils der nicht-apoptotischen infizierten Zellen und der apoptotischen infizierten Zellen unterschieden sich die beiden Kultivierungen (Abbildung 4-21).

Verursacht wurden die Schwankungen bei einer Kultivierung (schwarze Symbole) durch eine Subpopulation, deren TUNEL-Fluoreszenz in der Nähe des Grenzwertes zwischen apoptotisch und nicht-apoptotisch lag. Dadurch wirkten sich geringfügige Fluoreszenzschwankungen sehr stark auf die Messwerte aus (Abbildung 4-21a und Abbildung 4-21b). Bei der zweiten Kultivierung (graue Symbole) war die gemessene Fluoreszenz dieser Population etwas höher, daher schwankte sie nicht um den Grenzwert, was zu einem konstanteren Verlauf der Messwerte führte. Basierend auf dieser Datenanalyse können die zunächst

beobachteten Unterschiede im Apoptoseverlauf infizierter und nicht-infizierter Überstandszellen relativiert werden, d.h. die Kulturen sind doch vergleichbar.

Die Überstandszellen zeichneten sich im Vergleich zu den adhärennten Zellen durch einen wesentlich höheren Anteil apoptotischer infizierter Zellen aus.

Unter Berücksichtigung der gemessenen Zellkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt wurden anhand der relativen Anteile der cytometrisch unterschiedenen Populationen die Konzentrationen dieser Populationen im Bioreaktor berechnet (Abbildung 4-20c, d Abbildung 4-21c, d). Dadurch ergab sich ein deutliches Bild der quantitativen Bedeutung der Populationen. So ist relativ betrachtet zwar zu Beginn der Kultivierungen der Anteil nicht-infizierter apoptotischer Zellen verhältnismäßig hoch (Abbildung 4-21a), da in der frühen Phase jedoch nur sehr wenig Zellen im Überstand vorlagen, waren absolut nur sehr wenig Zellen dieser Population zuzurechnen (Abbildung 4-21c).

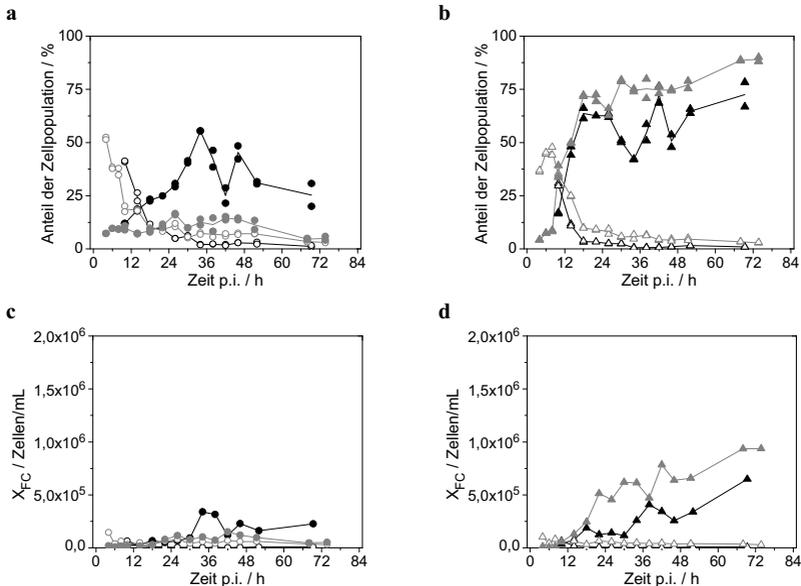


Abbildung 4-21: Verlauf der Infektion und Apoptose in *Überstandszellen* nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); **a**, **b**: prozentualer Anteil der jeweiligen Populationen an den Zellen im Überstand (Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole)); **c**, **d**: Zellkonzentration der Populationen; **a**, **c**: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (\circ, \circ), infiziert (\bullet, \bullet); **b**, **d**: apoptotische Zellen: nicht infiziert (Δ, Δ), infiziert ($\blacktriangle, \blacktriangle$)

Die bei der getrennten Messung von adhärennten Zellen und Überstandszellen bestimmten Fluoreszenzintensitäten der anti-NP-Antikörperfärbung apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen wurden wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben anhand von MESF-Kalibrationsmessungen umgerechnet. Dadurch war es möglich, die Anzahl der Nukleoprotein-Kopien/Zelle ($n'_{P\ NP}$) abzuschätzen. In Abbildung 4-22 sind die Werte für adhärennte Zellen und Zellen im Kulturüberstand vergleichend dargestellt. Bei der Berechnung der spezifisch gebundenen Antikörpermoleküle wurde die MESF-Fluoreszenz der Negativkontrolle (Probe < 0,5 h nach der Virusinokulation) von der Fluoreszenz der Proben abgezogen. Erwartungsgemäß war daher die Anzahl der NP-Moleküle/Zelle bei den nicht-infizierten Zellen (Abbildung 4-22a und Abbildung 4-22b) annähernd gleich 0. Die berechneten Werte schwankten dabei zwischen $-3,3 \times 10^3$ und $+2,5 \times 10^4$ NP-Kopien/Zelle. Im Vergleich zu den bei infizierten Zellen berechneten Maximalwerten von $1,8 \times 10^6$ bzw. $2,8 \times 10^6$ NP-Kopien/Zelle (Abbildung 4-22d) betragen diese Schwankungen weniger als 1,4 % vom Erwartungswert (0 Kopien/Zelle). Im Gegensatz zu den nicht-infizierten Zellen konnten bei den infizierten Zellen erhebliche Unterschiede in der Fluoreszenz und folglich im NP-Gehalt nachgewiesen werden: Nicht-apoptotische adhärennte Zellen wiesen ab 10 h p.i. deutlich mehr NP-Kopien/Zellen auf als nicht-apoptotische Zellen im Überstand (Abbildung 4-22c). Analog war auch bei infizierten apoptotischen Zellen die NP-Kopienzahl/Zelle bei adhärennten Zellen wesentlich höher als bei Überstandszellen zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 4-22d). Der maximale NP-Gehalt adhärennter Zellen nach Infektion wurde sowohl bei nicht-apoptotischen wie bei apoptotischen Zellen zwischen 6 und 14 h p.i. erreicht. In diesem Zeitraum wurde auch die initiale Virusfreisetzung beobachtet (Abbildung 4-19).

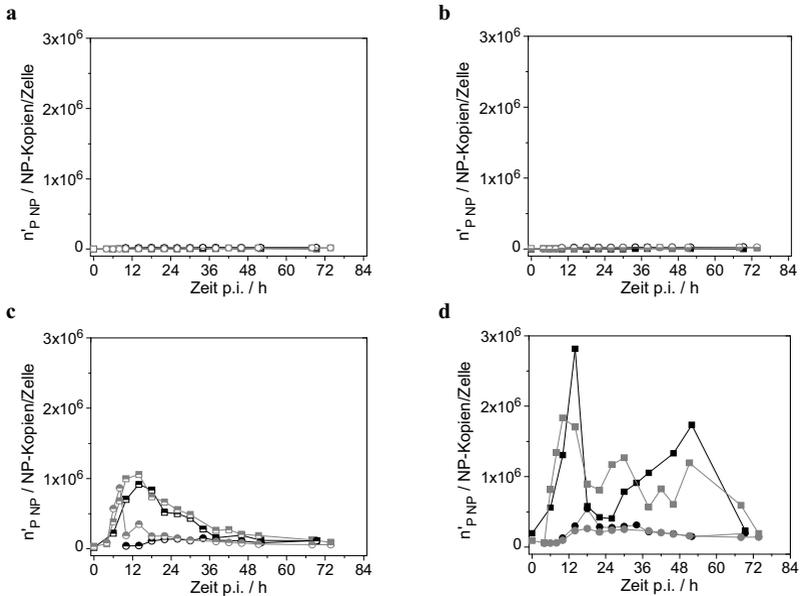


Abbildung 4-22: Abschätzung der Nukleoprotein-Kopien/Zelle nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor anhand von kalibrierten Cytometriemessungen

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); Gegenüberstellung adhärenter Zellen (quadratische Symbole) und Überstandszellen (runde Symbole); **a**: nicht infizierte nicht-apoptotische Zellen, **b**: nicht infizierte apoptotische Zellen, **c**: infizierte nicht-apoptotische Zellen, **d**: infizierte apoptotische Zellen

Das Fortschreiten der Apoptose wurde auch qualitativ durch cytometrische Messungen von stöchiometrischen DNA-Färbungen (Kapitel 3.7.3) nachgewiesen. Während im Verlauf der Infektion bei adhärenter Zellen nur sehr wenige Zellen einen Sub-G_{0/1}-DNA-Gehalt hatten, war dies bei den Zellen im Überstand in zunehmendem Maß der Fall (Abbildung 4-23). Eine vergleichbare Zunahme des Sub-G_{0/1}-DNA-Gehaltes wurde auch bei den gemeinsam gemessenen Zellpopulationen nach Infektion mit humanem Influenza A-Virus im 1,2 L-Maßstab beobachtet (Daten nicht gezeigt).

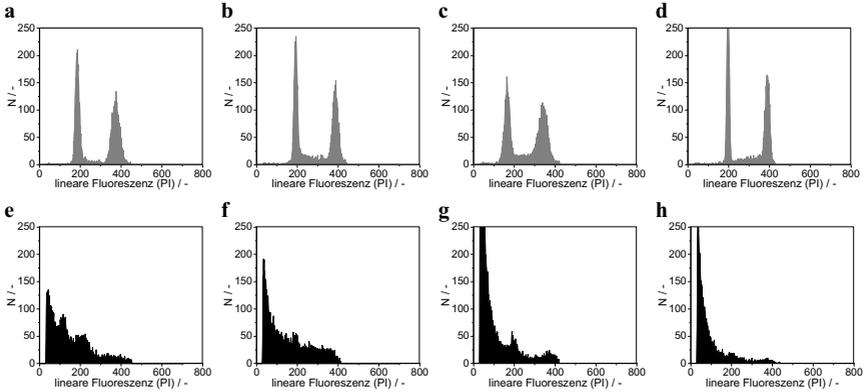


Abbildung 4-23: DNA-Gehalt von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025)

Durchflusszytometrische Messungen von stöchiometrischen DNA-Färbungen mit Propidiumiodid (PI), obere Reihe: adhärenz Zellen; untere Reihe: Überstandszellen; a, e: 14 h p.i.; b, f: 30 h p.i.; c, g: 46 h p.i.; d, h: 69,3 h p.i.

Apoptotische Zellen sind erkennbar an der sub- $G_{0/1}$ -Fluoreszenz (Fluoreszenz < 200). Die in Abbildung c dargestellte Probe ist leicht unterfärbt.

Die cytometrisch analysierten Zellproben wurden parallel auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden auch morphologische Charakteristika von apoptotischen Zellen wie Membranausstülpungen (Blebbing, Abbildung 4-24a) und Zelldeformation (Abbildung 4-24c) festgestellt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die NP-mAK-Fluoreszenz (grün) in infizierten Zellen unterschiedlich verteilt vorlag. Neben vollständig gefärbten Zellen wurden auch Zellen, die nur teilweise gefärbt waren, beobachtet. Die cytometrischen Ergebnisse in Bezug auf unterschiedliche Verteilung von Infektion und Apoptose in adhärenz Zellen und Zellen im Überstand konnten also qualitativ bestätigt werden.

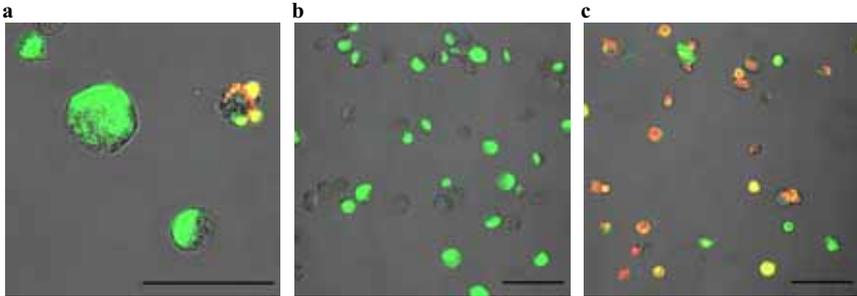


Abbildung 4-24: Fluoreszenzmikroskopie von trypsinierten MDCK-Zellen einer Microcarrierkultur nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor

Färbung: NP-FITC-mAK (grün), TUNEL-TMR (rot), 400x Vergrößerung (schwarzer Balken: 50 µm); a: adhärente Zellen (2,2-fach-Zoom), 26 h p.i.; b: adhärente Zellen, 34 h p.i.; c: Überstandszellen, 26 h p.i.

Zusätzlich zur Detektion der Apoptose durch TUNEL-Färbung, DNA-Färbung und Mikroskopie wurde auch die Caspase-Aktivierung in den Bioreaktorkultivierungen überprüft. Dabei wurden aktivierte Caspasen hauptsächlich in den Überstandszellen nachgewiesen (FLICA-Assay, Abbildung 4-25). Der Anteil apoptotischer Zellen lag dabei bei Überstandszellen etwas höher als beim TUNEL-Assay. In Übereinstimmung mit dem TUNEL-Assay lag der Anteil apoptotischer Zellen bei adhärenenten Zellen auch beim Caspase-Nachweis lediglich zwischen 2,6 und 3,3 %.

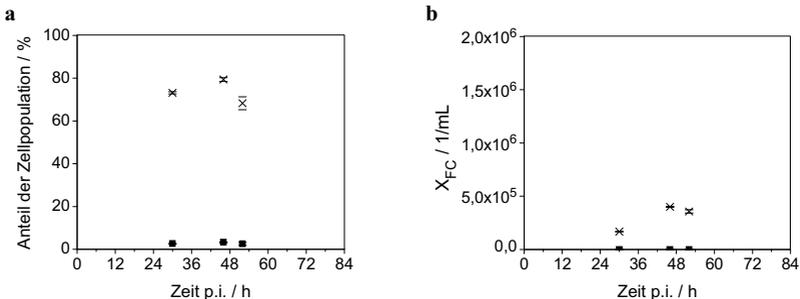


Abbildung 4-25: Quantifizierung der Caspase-Aktivierung (FLICA) in MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor

Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Symbole) und Streuung der Einzelwerte (-); apoptotische Zellen bei adhärenenten Zellen (■) und Zellen im Überstand (×); a: prozentualer Anteil der Zellen, b: Konzentrationen der apoptotischen Subpopulationen

Die Ergebnisse für adhärenente Zellkonzentrationen und Virustiter der 5 L-Kultivierungen waren weitgehend identisch mit den Ergebnissen aus 1,2 L-Kultivierungen (Kapitel 4.4.2).

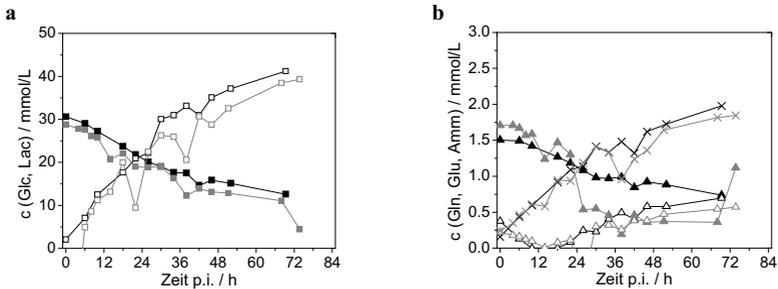


Abbildung 4-26: Verlauf der Metabolitkonzentrationen nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: Glukose (■, □) und Laktat (□, □); b: Glutamin (▲, ▲), Glutamat (△, △) und Ammonium (×, ×)

Analog zu Kultivierungen in 1,2 L-Bioreaktoren wurden auch bei Kultivierungen im 5,0 L-Maßstab die Verläufe der Metabolitkonzentrationen untersucht (Abbildung 4-26). Die geringeren Konzentrationen aller Metabolite für eine Kultivierung (Abbildung 4-26, graue Symbole) zum Zeitpunkt 38 h p.i. gehen vermutlich auf eine Probenverdünnung zurück. Aufgrund der in-situ Sterilisation der Probenahmestrecke mit Heißdampf wurde die Probe vermutlich mit restlichem Kondensat verdünnt. Dadurch lässt sich auch erklären, dass die zu diesem Zeitpunkt gezogene Probe eine geringfügig geringere Konzentration von Zellen im Überstand aufweist (Abbildung 4-19). Im 5,0 Liter-Maßstab wurde weniger Laktat und geringfügig weniger Ammonium gebildet als im 1,2 L-Maßstab (Abbildung 4-14). Dabei wurden jedoch weder Glukose noch Glutamin vollständig verbraucht. Ab 26 h p.i. wurde eine Zunahme der Glutamatkonzentration im Überstand festgestellt.

4.4.3 Infektion mit Influenza A-Virus PR/8/34 H1N1 (RKI)

Zum Vergleich mit dem humanen Influenza A PR/8/34 H1N1-Saatvirus vom NIBSC wurde ein Saatvirus des gleichen Stammes mit einer anderen Passagenhistorie eingesetzt. Das vom Robert Koch-Institut (RKI) bezogene Saatvirus hatte in Vorversuchen bereits höhere Virustiter produziert als das Saatvirus vom NIBSC. Dementsprechend wurde in einer Vergleichskultivierung mit gleichen Rahmenbedingungen geprüft, welche zusätzlichen Unterschiede der beiden Saatviren festgestellt werden können.

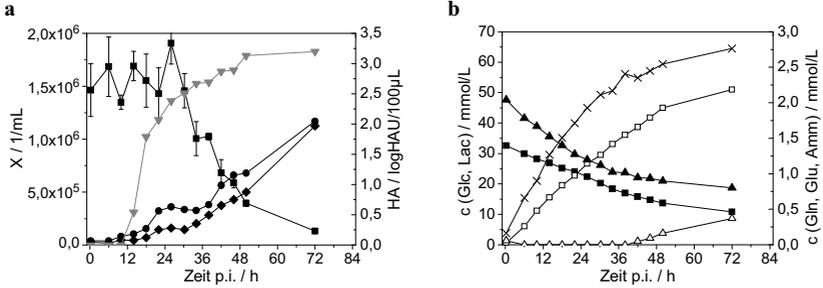


Abbildung 4-27: Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (RKT), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor

a: adhärenente Zellen auf MC Mittelwerte (■) \pm SD (n = 3), Zellen im Überstand: Gesamtanzahl lebender und toter Zellen (●); Konzentration toter Zellen (◆); Viruskonzentration im Überstand (▼); **b:** Glukose (■) und Laktat (□); **b:** Glutamin (▲), Glutamat (△) und Ammonium (×)

Verglichen mit den Ergebnissen von Kultivierungen des NIBSC-Saatvirus wurde eine messbare HA-Aktivität erst 2-4 Stunden später (14 h p.i.) festgestellt (Abbildung 4-27a). Allerdings erfolgte die Virusproduktion mit 3,1 HAU/100 µL wesentlich stärker als beim NIBSC-Virus (maximaler HA-Wert: 2,5 HAU/100 µL). Die Ablösung der adhärenente Zellen erfolgte später, am Ende der Kultivierung waren nur noch 10 % der Zellen adhärenent (NIBSC: 13,7 – 20 %). Der Verlust an Zellen durch Zelllyse betrug lediglich 13,5 % (NIBSC: >23 %). Die Menge an produziertem Laktat und Ammonium (Abbildung 4-27b) war vergleichbar mit den NIBSC-Kultivierungen. Die Zunahme der Glutamatkonzentration im Medium wurde jedoch erst ab 46 h p.i. festgestellt (NIBSC: ab 28 h p.i.).

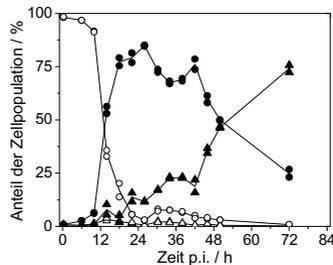


Abbildung 4-28: Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (RKT), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); **a:** nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (○), infiziert (●); apoptotische Zellen: nicht infiziert (△), infiziert (▲)

Die Ausbreitung der Influenza-Virusinfektion in der Zellpopulation erfolgte beim RKI-Virus wesentlich langsamer als beim NIBSC-Virus. Der Anteil der infizierten Zellen betrug 10 h p.i. noch weniger als 8 % (Abbildung 4-28), während beim NIBSC zu diesem Zeitpunkt schon etwa 80 % der Zellen infiziert waren. Ein entsprechender Anteil infizierter Zellen wurde beim RKI-Virus erst 18 h p.i. erreicht. Auch die Zahl der apoptotischen Zellen stieg bei Infektion mit dem RKI-Virus später an, erreichte jedoch zum Ende der Infektion mit mehr als 70 % einen wesentlich höheren Anteil (NIBSC: ca. 20 %). Der Anteil der apoptotischen Zellen, die nicht infiziert waren, blieb während der Kultivierung durchgängig unter 3,3 %.

4.4.4 Infektion mit Influenza A-Virus WSN/67/05 hgr H3N2

Um zusätzliche Informationen über das Replikationsverhalten und die Zellphysiologie zu erhalten, wurde ein weiterer humaner Influenza A-Virusstamm untersucht: Wisconsin/67/05 hgr H3N2. Dieser Stamm zeigte in Vorversuchen bei abnehmender MOI zunehmend hohe Virusausbeuten (Agalaridis 2007). Dementsprechend wurde statt der MOI von 0,025 eine MOI von 0,002 eingesetzt. Abbildung 4-29a zeigt die Verläufe der adhärennten Zellkonzentration sowie die Virusproduktion von zwei Bioreaktor-Kultivierungen mit 1,2 L Volumen. Die Verläufe der Zellkonzentrationen im Überstand sind in Abbildung 4-29b dargestellt. Obwohl eine der Kultivierungen (graue Symbole) eine etwas geringere adhärennte Zelldichte aufwies, waren bei der Virusreplikation sowie beim Infektionsverlauf und der Apoptose keine wesentlichen Unterschiede erkennbar. Resultierend aus der geringeren adhärennten Zellkonzentration wurden auch weniger Zellen im Überstand gemessen. Die Wiederfindungsrate der adhärennten Zellen im Überstand zwischen Start der Infektion und Ende betrug bei beiden Kultivierungen etwa 100 %, d.h. es wurde keine Zelllyse beobachtet, obwohl vergleichbar mit den Infektionen mit Influenza A-Virus PR/8/34 H1N1 die Vitalität der Überstandszellen sehr gering war (Abbildung 4-29b).

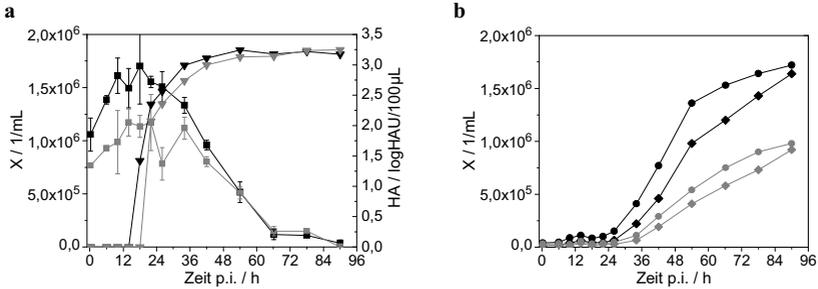


Abbildung 4-29: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002) im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); a: adhärenente Zellen auf MC: Mittelwerte (■, ■) ± SD (n = 3), Viruskonzentration im Überstand (▼, ▼); b: Zellen im Überstand: (●, ●: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen; ◆, ◆: Konzentration toter Zellen)

Auffällig bei den Kultivierungen war der rapide Anstieg der HA-Aktivität ab 14 h p.i.. Die Virusfreisetzung erfolgte dabei wesentlich schneller als bei Kultivierungen mit Influenza A PR/8/34 (NIBSC und RKI) beobachtet. Trotz geringerer MOI wurde der HA-Anstieg bei Infektion mit Influenza A WSN/67/05 etwa zeitgleich wie bei Influenza A PR/8/34 (RKI) beobachtet.

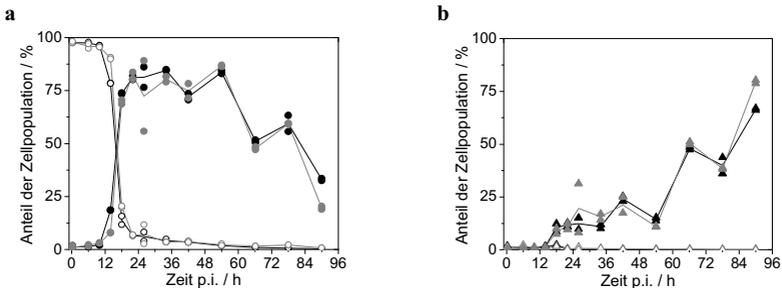


Abbildung 4-30: Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002)

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau) mit Mittelwerten aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); a: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (○, ○), infiziert (●, ●); b: apoptotische Zellen: nicht infiziert (△, △), infiziert (▲, ▲)

Adhärenente und Überstandszellen wurden gemeinsam analysiert. Die Ausbreitung der Infektion in der nicht-infizierten, nicht-apoptotischen Ausgangspopulation (Abbildung 4-30a) verlief trotz wesentlich geringerer MOI vergleichbar mit der Kultivierung von Influenza A PR/8/34 RKI (Abbildung 4-28a). Zwischen 14 und 54 h p.i. blieb der Anteil infizierter apoptotischer Zellen annähernd gleich (Abbildung 4-30b). Danach stieg der Anteil dieser

Population auf 67 bzw. 80 %. Während dieser Phase fand keine Zunahme der HA-Aktivität mehr statt (Abbildung 4-29a). Im Verlauf wurden annähernd 100 % der Zellen infiziert. Der Anteil nicht-infizierter apoptotischer Zellen blieb während der gesamten Kultivierung < 2 %.

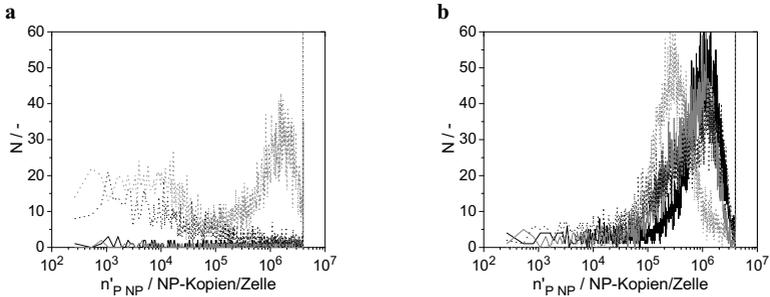


Abbildung 4-31: Abschätzung von NP-Kopienzahlen in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002)

Basierend auf kalibrierten Fluoreszenzmessungen nach Färbung mit anti-NP-Antikörper wurden die cytomtrischen Daten der infizierten Zellen umgerechnet und als Verteilung der NP-Kopienzahl in der infizierten Zellpopulation dargestellt. **a:** frühe Phase nach Infektion der Kultur: 6 h p.i. (—), 10 h p.i. (—), 14 h p.i. (···), 18 h p.i. (···); **b:** späte Phase nach Infektion der Kultur: 22 h p.i. (—), 34 h p.i. (—), 54 h p.i. (···), 78 h p.i. (···)

Zusätzlich zur Quantifizierung der infizierten und apoptotischen Zellen wurden die cytomtrischen Daten durch die Kalibration der arbiträren Fluoreszenzintensität weiter ausgewertet. Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben konnte dadurch die Fluoreszenzintensität zur Abschätzung der Kopienzahl von Nukleoprotein pro Zelle genutzt werden. Anstatt wie in Abbildung 4-22 den Verlauf der *mittleren* NP-Kopienzahl der jeweiligen Zellpopulationen darzustellen, wurde in Abbildung 4-31 die *Verteilung* der NP-Kopienzahl in der infizierten Zellpopulation dargestellt. Insbesondere in der frühen Phase der Infektion lässt sich feststellen, dass die Verteilung der NP-Kopien pro Zelle nicht unimodal ist (Abbildung 4-31a). Angesichts der niedrigen MOI war zu erwarten, dass lediglich 0,2 % der Gesamtpopulation durch das Saatvirus infiziert wurden. Erst nach 18 h p.i. zeichnen sich eine deutliche Population mit einer hohen NP-Kopienzahl ab. Insgesamt lagen die NP-Kopienzahlen bei Infektion mit WSN/67/05 in einer ähnlichen Größenordnung wie die bei Infektion mit PR/8/34 (NIBSC).

4.4.5 Infektion von Vero-Zellen mit Influenza A-Virus WSN/67/05 hgr H3N2

Neben MDCK-Zellen sind auch Vero-Zellen zur Influenza-Impfstoffproduktion geeignet (Govorkova 1996; Kistner et al. 1998). Um die Zellphysiologie dieser alternativen Wirtszell-

linie zu untersuchen, wurde analog zu den Versuchen mit MDCK-Zellen (Kapitel 4.4.4) eine Bioreaktor-Kultivierung im 5 Liter-Maßstab durchgeführt. Zur Infektion wurde ein an Vero-Zellen adaptiertes Saatvirus eingesetzt.

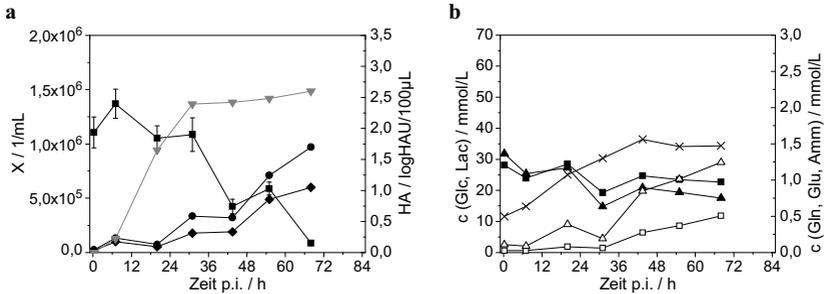


Abbildung 4-32: Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter von *Vero*-Zellen nach Infektion (human A WSN/65/05 hgr H3N2, MOI 0,001) im 5,0 L-Bioreaktor
a: adhärente Zellen auf MC: Mittelwerte (■) ± SD (n = 3), Zellen im Überstand: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen (●), Konzentration toter Zellen (♦); Viruskonzentration im Überstand (▼);
b: Glukose (■), Laktat (□), Glutamin (▲), Glutamat (△) und Ammonium (×)

In der Durchflusszytometrie wurden adhärenente und Überstandszellen gemeinsam gemessen. Vergleichbar mit den MDCK-Kulturen wurde auch bei Vero-Zellen beobachtet, dass sich adhärenente Zellen ablösen und im Überstand nachgewiesen werden können (Abbildung 4-32a). Der Anteil an Zellen im Überstand betrug 68 h p.i. 92 %. Die Wiederfindungsrate der Zellen am Ende der Kultivierung betrug 95 %. Unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit der Zellzahlbestimmung konnte folglich keine Zelllyse festgestellt werden. Ähnlich wie bei der Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza A PR/8/34 (NIBSC) erfolgte die gesamte Virusfreisetzung, trotz niedrigerer MOI, innerhalb der ersten 24 h p.i.. Die erreichten Virustiter lagen bei Infektion von Vero-Zellen mit Influenza A WSN/65/05 etwa doppelt so hoch wie bei den Infektionen von MDCK-Zellen mit Influenza A PR/8/34 (NIBSC), jedoch weit unter den für MDCK-Zellen nach Infektion mit Influenza A WSN/65/05 erreichten Titern (Tabelle 4-6).

Im Vergleich zu MDCK-Zellen produzierten die Vero-Zellen weniger Ammonium und wesentlich weniger Laktat (Abbildung 4-32b). Die Freisetzung von Glutamat erfolgte bereits 20 h p.i., zudem wurden größere Mengen an Glutamat freigesetzt, als bei Kultivierungen von MDCK-Zellen.

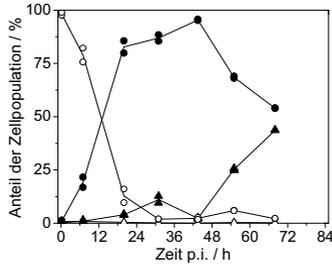


Abbildung 4-33: Verlauf der Infektion und Apoptose in *Vero*-Zellen nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,001) im 5,0 L-Bioreaktor

Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); a: nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (○), infiziert (●); apoptotische Zellen: nicht infiziert (△), infiziert (▲)

Die Infektion der *Vero*-Zellen breitete sich zu Beginn der Kultivierung etwas schneller aus als bei den MDCK-Kultivierungen mit dem gleichen Virus, ab 20 h p.i. waren die Anteile der nicht-infizierten, nicht-apoptotischen Zellen jedoch annähernd gleich (Abbildung 4-33). Der wesentliche Unterschied im Verlauf der Zellphysiologie lag darin, dass der Anteil der infizierten apoptotischen Zellen bei den *Vero*-Zellen wesentlich geringer war, als bei den MDCK-Zellen. Gegen Ende der Kultivierung lag der Anteil dieser Population bei den *Vero*-Zellen lediglich bei 44 %, während er bei unter gleichen Bedingungen infizierten MDCK-Zellen bei 67 bzw. 80 % lag (Abbildung 4-30b). Der Anteil nicht-infizierter aber dennoch apoptotischer Zellen betrug maximal 2,7 %.

4.4.6 Kapitelzusammenfassung und –diskussion

Zur Untersuchung der Virusinfektion und der Apoptose sowie der Virusreplikation wurden drei verschiedene Influenza A-Virusstämme (PR/8/34 H1N1 (NIBSC, RKI) und WSN/67/05 H3N2) in Microcarrierkulturen von MDCK-Zellen in Bioreaktoren vermehrt. Bei allen untersuchten Influenza-Viruskultivierungen konnten apoptotische DNA-Strangbrüche festgestellt werden. Trotz der Komplexität der Kultivierungen und der Analytik wurden reproduzierbare quantitative Datensätze erzeugt, anhand derer zahlreiche Rückschlüsse auf die Bedeutung der Apoptose für die Virusreplikation gezogen werden konnten.

Wie zu erwarten wurde bei scheininfizierten Kulturen eine wesentlich geringere Zellablösung als bei infizierten Kulturen festgestellt. Die Konzentration der apoptotischen Zellen entsprach dabei annähernd der Konzentration der Zellen im Überstand ($A_{Isus} \approx 1$, Abbildung 4-13a). In

der Literatur wurde für apoptotische MDCK-Zellen die Ablösung aus dem Monolayer beschrieben (Rosenblatt et al. 2001). Obwohl bei Scheininfektionen die adhären Zellen gemeinsam mit Zellen aus dem Überstand analysiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den apoptotischen Zellen zum Großteil um abgelöste Zellen im Überstand handelte. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch gestützt, dass bei getrennter Messung von adhären und Überstandszellen von infizierten Kulturen der Anteil apoptotischer adhären Zellen sehr gering war (Abbildung 4-20b). Als Ursache der Apoptose in der frühen Phase der Scheininfektion kommen im Wesentlichen die Vorbereitung der Zellen auf die Scheininfektion (Waschen der Microcarrier mit PBS, Mediumswechsel), die hohe Zelldichte oder der Serumentzug infrage. Die Induktion von Apoptose in MDCK-Zellen durch Serumentzug wurde beschrieben (Howard et al. 1993). Allerdings sind auch massive Änderungen der Medienzusammensetzung während der Waschschrte mit PBS vor der Infektion sowie die Limitierung der Wachstumsoberfläche als Substrat bei hohen Zelldichten mögliche Apoptoseinduktoren. Die während der Scheininfektion erreichten Zelldichten von bis zu $2,4 \times 10^6$ Zellen/mL (300 Zellen/Microcarrier) lagen 33 % über bei ähnlichen Bedingungen erreichten Zelldichten von $1,8 \times 10^6$ Zellen/mL (220 Zellen/Microcarrier) (Bock et al. 2009). Allerdings war die in der Literatur beschriebene Kulturdauer kürzer als in Kapitel 4.4.1 beschrieben und die Kultivierung erfolgte in Serum-haltigem GMEM. Für die durch das Fehlen der Wachstumsoberfläche als Substrat induzierte Apoptose wurde von Frisch und Francis 1994 der Begriff Anoikis geprägt (Frisch und Francis 1994). Im vorliegenden Fall ist es denkbar, dass Zellen wegen mangelnder Wachstumsoberfläche apoptotisch wurden und sich aus der Monolayer auf den Microcarriern lösten. Außerdem weisen die erreichten hohen Zelldichten und die zu diesen Zeitpunkten gemessenen niedrigen S-Phasenanteile (Daten nicht gezeigt) auf stationäre Kulturen hin (vgl. Abbildung 2-5). Eine andere Möglichkeit stellt das Abscheren von Zellen, die sich während der Teilung aus dem Zellverband lösen, dar. Des weiteren ist in stationären Kulturen die Apoptoseinduktion aufgrund von Zellzyklusarrest möglich (Hallstrom und Nevins 2009; Stein 1999).

Die verwendeten Virusstämme unterschieden sich in der Infektionsdynamik, dem Grad der Apoptoseinduktion und der Virusausbeute. Besonders deutlich zeigten sich die Unterschiede in der spezifischen Virusausbeute (Tabelle 4-6). Der Kultivierungsmaßstab hatte bei dem Stamm PR/8/34 (NIBSC) keinen signifikanten Einfluss auf die spezifische Virusausbeute. Die berechneten Unterschiede liegen innerhalb des Fehlerbereiches der Zellzahlbestimmung und des Hämagglutinationstests. Im Vergleich zum Stamm PR/8/34 (NIBSC) wurden für den

Stamm WSN/67/2005 zehnfach höhere Ausbeuten bestimmt. Bei dem Stamm PR/8/34 (RKI) lag die Ausbeute etwa 7-fach über der Ausbeute von PR/8/34 (NIBSC). Unter vergleichbaren Bedingungen war bei Influenza A WSN/67/2005 die spezifische Virusausbeute bei MDCK-Zellen etwa 4,4-mal höher als bei Vero-Zellen. In beiden Fällen wurden an die Wirtszelllinie adaptierte Saatviren eingesetzt. Vergleichende Untersuchungen von MDCK- und Vero-Zellen in der Virusproduktion zeigten ebenfalls geringere Ausbeuten für Vero-Zellen (Genzel et al. 2010).

Tabelle 4-6: Übersicht der mittleren spezifischen Virusausbeuten der untersuchten Infektionsbedingungen

Zelllinie	Virusstamm	MOI	$Y_{VP/X}$ / Viren/Zelle
MDCK	PR/8/34 H1N1 (NIBSC)	0,025	2800 (1,2 L); 2700 (5,0 L)
MDCK	PR/8/34 H1N1 (RKI)	0,025	19000 (1,2 L)
MDCK	WSN/67/2005 H3N2	0,002	30000 (1,2 L)
MDCK	WSN/67/2005 H3N2, 50 μ M Betain	0,002	7900 (1,2 L)
MDCK	WSN/67/2005 H3N2, 1 μ M Stauro. *	0,002	3100 (1,2 L)
Vero	WSN/67/2005 H3N2	0,001	6800 (1,2 L)

* siehe Kapitel 4.5.4

Trotz unterschiedlicher Infektionsbedingungen ähnelten sich die Stämme WSN/67/2005 und PR/8/34 H1N1 (RKI) sehr in Verlauf und Größenordnung der Virusfreisetzung sowohl von infektiösen wie nicht-infektiösen Viruspartikeln (Abbildung 4-34). Deutlich wird dabei auch die wesentlich geringere Virusfreisetzung von PR/8/34 H1N1 (NIBSC) im Vergleich zu diesen Stämmen. Die etwa zum Zeitpunkt 0 h p.i. gemessenen infektiösen Viruskonzentrationen stellen die Wiederfindung von noch nicht an Zellen adsorbierten Viruspartikeln aus dem Saatvirus dar (Abbildung 4-34a).

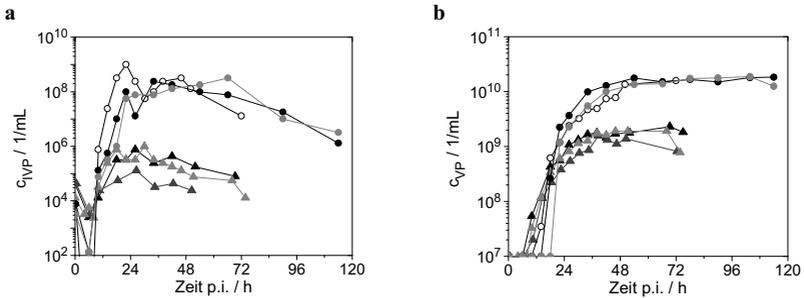


Abbildung 4-34: Vergleich der Viruskonzentration in MDCK-Fermentationsüberständen nach Infektion mit verschiedenen Influenza-Virusstämmen PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025 (▲, ▲, ▲); PR/8/34 H1N1 (RKI), MOI 0,025 (○); WSN/67/2005 hgr H3N2, MOI 0,002 (●, ●); **a**: Konzentration infektiöser Viruspartikel (c_{IVP}), bestimmt mit TCID₅₀-Assay; **b**: Konzentration von Viruspartikeln (c_{VP}), berechnet anhand Hämagglutinationstest mit erhöhter Präzision

Anhand der Ergebnisse der getrennten Analyse der adhärennten und der Zellen im Überstand konnten für den Virusstamm PR/8/34 H1N1 (NIBSC) interessante Unterschiede zwischen den Populationen identifiziert werden (Kapitel 4.4.2). Der Anteil der nicht-infizierten apoptotischen Zellen war sowohl bei adhärennten Zellen wie bei Überstandszellen minimal, während infizierte apoptotische Zellen fast ausschließlich im Überstand detektiert wurden (Abbildung 4-20-Abbildung 4-27). Zusätzlich zum TUNEL-Assay wurde die Apoptose dabei auch durch Caspase-Aktivität nachgewiesen. Bei Schein-infizierten Kulturen konnte im Gegensatz zur infizierten Kulturen kein vergleichbarer Anstieg des Sub-G_{0/1}-DNA-Gehaltes während der Kultivierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wurden für den Apoptosenachweis in infizierten MDCK-Zellen in der Regel qualitativ die DNA-Fragmentierung (DNA-Laddering, Hornickova 1997; Kurokawa et al. 1999; Lin et al. 2001; Mohsin et al. 2002; Takizawa et al. 1993) sowie Annexin V-Färbung und PARP-Spaltung (Wurzer et al. 2003) verwendet. Im Gegensatz dazu wurde die Quantifizierung der Apoptoseinduktion über den TUNEL-Assay gekoppelt mit der Antikörper-vermittelten Quantifizierung der Virusinfektion bisher nur für Rotaviren eingesetzt (Chaibi et al. 2005).

Die Virusproduktion von PR/8/34 (NIBSC) fand innerhalb der ersten 40 h p.i. statt, danach wurde kein weiterer Anstieg der Virusfreisetzung beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der Großteil der Zellen im Überstand. Die Überstandszellen wiesen einen deutlich geringeren NP-Gehalt auf als adhärennte Zellen (Abbildung 4-22). Daraus lässt sich schließen, dass die Überstandszellen nicht entscheidend zur Virusproduktion beitrugen. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für die Virusstämme PR/8/34 (RKI) und WSN/67/05 gemacht.

Der Anteil nicht-infizierter apoptotischer Zellen war bei allen Virusinfektionen minimal (< 3,3 %). Dies stimmt mit Ergebnissen von Horio et al. 2001 für den Anteil apoptotischer MDCK-Zellen in statischer Kultur ohne Infektion in einem vergleichbaren Medium (DMEM mit 10 % FCS, Osmolalität des Mediums: 600 mOsm) überein. Aufgrund der hohen Ausbreitungsgeschwindigkeit der Virusinfektion im Bioreaktor ist jedoch das Zeitfenster zur Detektion der Apoptose ohne Virusinfektion relativ kurz, da zuvor nicht-infizierte Zellen vermutlich auch nach der Apoptoseinduktion noch nachträglich infiziert werden. Der Geschwindigkeitsunterschied zwischen der schnellen Virusvermehrung einerseits und der relativ langsamen Apoptoseexekution andererseits wurde von Kurokawa et al. 1999 als Überlebensvorteil der Influenza-Viren beschrieben. Dadurch können sich die Viren vermehren, bevor die infizierte Zellen als Folge der Apoptose absterben. Eine alternative Erklärung für den geringen Anteil apoptotischer nicht-infizierter Zellen könnte eine möglicherweise geringe Sensitivität von MDCK-Zellen auf Interferon-Signalling sein (Seitz et al. 2010). Die Freisetzung von Interferon durch infizierte Zellen würde entsprechend nicht zu einer starken Apoptoseinduktion führen. Kultivierungsexperimente mit starker Interferonstimulation könnten zur Überprüfung dieser Vermutung genutzt werden.

Der Grad der Apoptoseinduktion in infizierten Zellen ist stark abhängig vom verwendeten Virusstamm. Der höchste Anteil apoptotischer infizierter Zellen an der Gesamtpopulation wurde bei Infektion mit WSN/67/05 H3N2 und PR/8/34 H1N1 (RKI) erreicht (ca. 74 %). Bei PR/8/34 H1N1 (NIBSC) lag der Anteil bei etwa 30 %. Innerhalb der ersten 18 h p.i. war der Anteil infizierter apoptotischer Zellen bei allen Virusstämmen etwa gleich. Allerdings wird der Vergleich der stammspezifischen Unterschiede in der Apoptoseinduktion dadurch verzerrt, dass auch die Lyse der MDCK-Zellen stammabhängig ist. So liegt die Wiederfindung am Ende der Kultivierungen mit WSN/67/05 H3N2 bei ca. 100 %, mit PR/8/34 H1N1 (RKI) bei 85 % und mit PR/8/34 H1N1 (NIBSC) lediglich bei 70 % der maximalen Zellkonzentration. Lysierte Zellen können nicht cytometrisch erfasst werden, sodass lediglich die zum Zeitpunkt der Probenahme vorhandenen Zellen analysiert wurden.

Während der Kultivierungen mit PR/8/34 H1N1 NIBSC und PR/8/34 H1N1 RKI wurde eine geringfügige Zunahme des Anteils der nicht-infizierten Zellen zum Zeitpunkt 26,5 bzw. 30,25 h p.i. beobachtet. Die Quantifizierung der Infektion beruht auf einem Fluoreszenzgrenzwert, der mit dem NP-Gehalt der Zellen korreliert (Kapitel 4.2.4). Folglich führt eine geringere anti-NP-Antikörperbindung zu einem geringeren Anteil infizierter Zellen. Da die Influenza-Virusinfektion irreversibel ist, kann die Abnahme des Anteils infizierter Zellen als Artefakt

bewertet werden. Mögliche Ursachen dafür können geringe NP-Expression, Abnahme des NP-Gehalts durch Virusfreisetzung oder proteolytische NP-Spaltung durch intrazelluläre Proteasen (Zhironov et al. 1999) sein.

Mit Ausnahme der Ergebnisse bei PR/8/34 H1N1 (RKI) entsprachen die unterschiedlichen Anteile infizierter apoptotischer Zellen gegen Kultivierungsende den Ergebnissen von Price et al. 1997 und Mohsin et al. 2002. Dort wurde für H3N2-Influenza-Virusstämme eine stärkere Apoptoseinduktion als für H1N1-Stämme beschrieben. Für H3N2-Stämme lag der gemessene Anteil apoptotischer Zellen zwischen 38,2 % und 94,1 %. Für H1N1-Stämme wurden zwischen 11,0 und 19,0 % apoptotischer Zellen gemessen. Allerdings wurden andere Stämme und Infektionsbedingungen als in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse begrenzt.

Im Gegensatz zu dem geringeren Anteil infizierter apoptotischer Zellen und der niedrigeren spezifischen Virusausbeute bei Infektion mit PR/8/34 H1N1 (NIBSC) wurden, trotz des gleichen Subtyps, bei Infektion mit PR/8/34 H1N1 (RKI) mehr infizierte apoptotische Zellen und eine höhere spezifische Virusausbeute nachgewiesen (Tabelle 4-6). Dabei wies die RKI-Variante von PR/8/34 H1N1 größere Ähnlichkeit mit dem WSN/67/05 H3N2-Stamm auf als mit der stärker verwandten PR/8/34-Variante von NIBSC. Erkennbar war dies auch an der langsameren Ausbreitung der Infektion bei PR/8/34 H1N1 (RKI) im Vergleich zu PR/8/34 H1N1 (NIBSC). Die Infektion mit der Variante PR/8/34 H1N1 (NIBSC) führte zu einer schnellen Abnahme der nicht-infizierten, nicht-apoptotischen Zellpopulation innerhalb von 6 h p.i. bei gleichzeitigem Anstieg der infizierten nicht apoptotischen Zellen (Abbildung 4-17). Im Gegensatz dazu wurde eine starke Ausbreitung der Infektion bei PR/8/34 H1N1 (RKI) erst nach 10 h p.i. beobachtet (Abbildung 4-28). Interessanterweise zeigte der Stamm WSN/67/05 H3N2 trotz niedrigerer MOI von 0,002 statt 0,025 eine vergleichbare Dynamik in der Ausbreitung der Virusinfektion (Abbildung 4-30).

Bei allen verwendeten Virusstämmen wurden im Verlauf der Infektionsphase zunehmende Glutamatkonzentrationen im Kulturüberstand festgestellt. Bei Schein-infizierten Kulturen wurde hingegen keine Glutamatfreisetzung beobachtet. Die Akkumulation von Glutamat und Aspartat im Kulturüberstand von Influenzavirus-infizierten MDCK-Zellen wurde bereits als mögliche Folge der Apoptoseinduktion beschrieben (Genzel et al. 2004a). Während der Apoptose können sich die Mitochondrien-Membranporen öffnen (vgl. Kapitel 2.5.2), was dazu führt, dass das in den Mitochondrien konzentrierte Glutamat zunächst in das Cytosol gelangt. Aufgrund von erhöhter Permeabilität der Zellen in der anschließenden Sekundär-

nekrose oder durch fortgeschrittenes Virusbudding könnte das Glutamat in den Kulturüberstand freigesetzt werden. Aus dem Zeitpunkt und der Höhe der Glutamat-Akkumulation ließen sich jedoch keine Rückschlüsse auf den Verlauf der Apoptose oder die Virusfreisetzung bei den eingesetzten Viren ziehen.

Basierend auf Daten aus Microcarrier-Kulturen der verwendeten Virusstämme wurde ein mathematisches Modell entwickelt (Schulze-Horsel et al. 2009). Mittels eines Satzes von nicht-linearen Differentialgleichungen mit Totzeitkonnten damit sowohl die Virusproduktion als auch die Ausbreitung der Infektion und die Apoptose-Induktion abgebildet werden. Folgende Parameter, deren Werte aus der Parameteroptimierung des Modells hervorgegangen sind, könnten die Interpretation der Unterschiede im Verhalten der Virusstämme unterstützen: die spezifische Produktionsgeschwindigkeit für infektiöse (μ_{vi}) und nicht-infektiöse (μ_{vd}) Viruspartikel, die Zeitspanne zwischen der Infektion und Apoptoseinduktion in einer Zelle (τ_1) sowie die spezifische Absterberate von infizierten Zellen durch Apoptose (k_{iapo}). Aus den Werten für μ_{vi} und μ_{vd} geht hervor, dass die Stämme PR/8/34 (RKI) und WSN/67/2005 eine relativ ähnliche Virusproduktionskinetik haben, während der Stamm PR/8/34 (NIBSC) infektiöse und nicht-infektiöse Viruspartikel mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit produziert (Tabelle 4-7). Zusammen mit der beschriebenen hohen Sterberate (k_{iapo}) und der frühen Apoptoseinduktion (τ_1) in mit PR/8/34 (NIBSC) infizierten Zellen scheint dieser Virusstamm verhältnismäßig ineffizient zu sein. In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen wurden am Beispiel von HIV die Replikationsrate und die Lebensdauer einer infizierten Zelle als kritische Größen für die effiziente Ausbreitung einer Virusinfektion beschrieben (Gilchrist et al. 2004).

Tabelle 4-7: Modellierungsparameter für die Virusproduktion und Apoptoseinduktion verschiedener Influenza-Viren in MDCK-Zellen (Schulze-Horsel et al. 2009)

Parameter	Einheit	PR/8/34 H1N1 (NIBSC)	PR/8/34 H1N1 (RKI)	WSN/67/2005 H3N2
μ_{vi}	1/h	0,03	237,76	15,97
μ_{vd}	1/h	126,19	576,22	666,13
k_{iapo}	1/h	0,56	0,03	0,03
τ_1	h	0,5	4,0	12,0

Für die RKI-Variante von PR/8/34 wurden höhere spezifische Virusproduktionsraten postuliert als für die NIBSC-Variante (Schulze-Horsel et al. 2009). Es wäre möglich, dass die Replikations- bzw. Freisetzungsgeschwindigkeit von neu gebildeten Viruspartikeln den

entscheidenden Beitrag für hohe spezifische Virusausbeuten darstellt. Ein positiver Einfluss von hohen Virusproduktionsgeschwindigkeiten auf die erreichten Virustiter wurde unter anderem für MDCK-Zellen damit begründet, dass so mehr Viren produziert werden können, bevor die Zellen in die Apoptose gehen (Kurokawa et al. 1999). Durch den Austausch einer Aminosäure der viralen Polymerase PB2 konnte für einen Influenza A PR/8/34-Stamm in Mäusen eine 1000-fache Titersteigerung erreicht werden (Grimm et al. 2007).

Aufgrund der eindeutigen Unterschiede in der spezifischen Virusausbeute wurde das Verhalten der beiden PR/8/34-Varianten auf verschiedenen zellbiologischen Ebenen weitergehend untersucht. So wurde für die NIBSC-Variante eine stärkere Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionskomponenten NF- κ B, IRF-3, Jak-Stat, Raf/MEK/ERK und PKR/eIF2 α beschrieben als für die RKI-Variante (Heynisch et al. 2010). Folglich könnte eine stärkere Aktivierung der antiviralen Komponenten des angeborenen Immunsystems eine Unterdrückung der Virusreplikation zur Folge haben. Außerdem wurde im Vergleich zur RKI-Variante für die NIBSC-Variante eine stärkere Veränderung des Expressionsprofils beschrieben. Insbesondere Proteine, die mit der Signaltransduktion, Stress-Antwort und Apoptose zusammenhängen, wurden unterschiedlich exprimiert (Vester et al. 2010).

Die Infektion von MDCK-Zellen mit der RKI-Variante führte zu einer stärkeren Interferon-Produktion als die Infektion mit der NIBSC-Variante. Als mögliche Ursache wurde betrachtet, dass sich die Aminosäuresequenzen der NS1-Proteine an zwei Stellen unterscheiden. An Position 55 und 101 besitzt die RKI-Variante Glutamin, während die RKI-Variante an Position 55 Lysin und an Position 101 Aspartat trägt. Für Influenza A PR/8/34-Stämme mit Glutamin an Position 101 wurde eine geringere Interferon-Produktion nachgewiesen (Murakami et al. 2008). Die beobachtete stärkere Interferon-Bildung nach Infektion von MDCK-Zellen mit PR/8/34 NIBSC im Vergleich zur RKI-Variante konnte jedoch als Einflussfaktor auf die Virusausbeute ausgeschlossen werden, da weder durch Inhibition noch durch Stimulation der Interferon-Produktion die erreichten Virustiter signifikant beeinflusst wurden (Seitz et al. 2010).

Die biologischen Grundlagen des unterschiedlichen Verhaltens der Influenza A PR/8/34 H1N1-Varianten (NIBSC und RKI) sind noch nicht ausreichend erklärt. Dieses Thema besitzt jedoch eine hohe Relevanz für die Optimierung von Saatviren in der Impfstoffproduktion. Durch die gezielte Optimierung könnte die spezifische Virusausbeute vervielfacht werden. Allerdings sind für die Produktion mögliche Änderungen in der Zusammensetzung der Ernten aus dem Upstream Processing zu beachten, da dies Auswirkungen auf Produktaufarbeitung haben kann (Kalbfuss et al. 2007b). Außerdem könnten die beobachteten Unterschiede in den

Glykosylierungsstrukturen der beiden Varianten (Schwarzer et al. 2009) zu Änderungen in der immunologischen Wirksamkeit führen, deren Einfluss möglicherweise in klinischen Studien zu bewerten ist.

Analog zu MDCK-Zellen konnte auch bei einer Kultivierung von Vero-Zellen die Induktion von apoptotischen DNA-Strangbrüchen durch Influenza-Virusinfektion nachgewiesen werden (Kapitel 4.4.5). Angesichts der bedeutenden Rolle von Interferon im Zusammenhang mit der Influenza-Virusinfektion (Katze et al. 2002; Kim et al. 2002; Koerner et al. 2007) war zu erwarten, dass der Verlauf der Infektion und der Apoptose sich zwischen Interferon-produzierenden MDCK-Zellen (Machida et al. 1980) und Interferon-defizienten Vero-Zellen (Desmyter et al. 1968; Diaz et al. 1988) stark unterscheidet. Bei der Ausbreitung der Virusinfektion konnte jedoch kein großer Unterschied festgestellt werden (Abbildung 4-33). Gegen Ende der Kultivierung hatten sich 92 % der Zellen von den Microcarriern gelöst (Abbildung 4-32a). Es wurde analog zur Infektion von MDCK-Zellen mit dem gleichen Virusstamm keine Zelllyse beobachtet. Wie auch MDCK-Zellen zeigten Vero-Zellen bei Kultivierung mit Influenza A WSN/67/05 nahezu keine Apoptoseinduktion ohne Virusinfektion der Zelle (Abbildung 4-33b). Allerdings war der Anteil infizierter apoptotischer Vero-Zellen während der gesamten Kultivierung geringer als bei MDCK-Zellen, die unter vergleichbaren Bedingungen infiziert wurden (Abbildung 4-30). Die spezifische Virusausbeute betrug trotz Verwendung von Vero-adaptiertem Saatvirus unter vergleichbaren Bedingungen lediglich 22 % der Virusausbeute von MDCK-Zellen. Um die beobachteten Unterschiede zwischen den Zelllinien zu erklären, sind jedoch weitere Arbeiten, z.B. auf dem Gebiet der Signaltransduktion oder auf Proteom-Ebene, erforderlich.

Basierend auf den beschriebenen experimentellen Ergebnissen und Informationen aus der Literatur wurde ein Verlaufsschema für die Apoptose und die Influenza-Virusinfektion von MDCK-Zellen in Microcarrierkulturen entwickelt (Abbildung 4-35). Die Apoptose kann in nicht-infizierten und nicht-apoptotischen Zellen ohne Influenza-Virusinfektion stattfinden. Ursachen dafür können I. Kultivierungsparameter (Singh und Al-Rubeai 1998), II. virale Komponenten im Kulturmedium (Schultz-Cherry und Hinshaw 1996) oder III. die Induktion durch extrazelluläre Signalling-Moleküle (Ludwig et al. 2006) sein. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Virusstämmen und Infektionsbedingungen spielte die Fraktion der nicht-infizierten apoptotischen Zellen aufgrund ihrer geringen Anzahl nur eine untergeordnete Rolle.

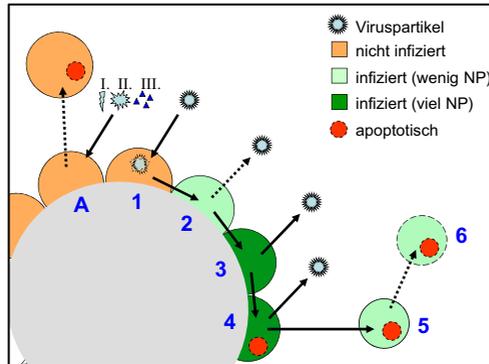


Abbildung 4-35: Schematische Darstellung der Infektion und Apoptose von MDCK-Zellen während der Influenza A-Virusvermehrung (Schulze-Horsel et al. 2009, modifiziert)

Basierend auf den experimentellen Ergebnissen wurde der Verlauf der Apoptose von MDCK-Zellen in Microcarrierkulturen schematisch dargestellt. A: Induktion der Apoptose in adhärennten nicht-infizierten Zellen, beispielsweise verursacht durch Prozessbedingungen (I.), Interaktion mit viralen Komponenten im Kulturmedium (II.) oder durch Signalling-Moleküle (III.). 1: Die Bindung und Internalisierung eines infektiösen Viruspartikels an eine nicht-apoptotische (vitale), nicht-infizierte Zelle führt zur Initiierung der Virusreplikation; 2: Produktion und intrazelluläre Akkumulation von Virusbestandteilen (z.B. NP) in der infizierten Zelle, erste Freisetzung von Viruspartikeln; 3: Akkumulation größerer Mengen an Virusbestandteilen in der infizierten Zelle; 4: Induktion der Apoptose in der infizierten Zelle; 5: Ablösung der apoptotischen infizierten Zelle vom Microcarrier, keine Freisetzung von Viruspartikeln mehr; 6: Zellyse aufgrund von sekundärer Nekrose.

Sobald ein infektiöser Viruspartikel an eine nicht-infizierte nicht-apoptotische Zelle bindet, wird der Partikel internalisiert (1) und der virale Replikationsmechanismus wird gestartet (Lamb und Krug 2001). Die infizierte Zelle beginnt, virale Precursormoleküle (u.a. NP) zu produzieren, die intrazellulär akkumulieren. Dabei werden bereits nach wenigen Stunden die ersten Viruspartikel durch Knospung freigesetzt (Schulze-Horsel et al. 2008). Im Verlauf der Infektion werden weiter Virusbestandteile akkumuliert und Viren freigesetzt (3). Dann erfolgt die Induktion der Apoptose (4) (Kurokawa et al. 1999). Im Verlauf der Apoptose lösen sich die Zellen von den Microcarriern (5) (Rosenblatt et al. 2001). Nach dem Durchlaufen der Apoptose können die Zellen im Überstand in die sekundäre Nekrose eintreten und lysieren (6) (Takizawa et al. 1993). Der Grad der Zellablösung und der Zellyse ist dabei abhängig von der Zelllinie, dem infizierenden Virusstamm und den Infektionsbedingungen (Kapitel 4.4). Der Hauptanteil der produzierten Influenza-Viren wird während der Phasen 2 – 4 freigesetzt.

4.5 Chemische Manipulation von MDCK-Zellen während der Infektion

Für die zellbiologische Grundlagenforschung ist die Induktion oder Inhibition der Apoptose von großem Interesse, um das Zusammenspiel der Signaltransduktionskaskaden und Apoptosewege gezielt zu beeinflussen und zu analysieren. In Bezug auf die biotechnologische Anwendung in der Impfstoffproduktion ist die Manipulation der Apoptose in den kultivierten Zellen von Interesse, um durch gezielte Eingriffe in die Zell- und Virusbiologie das Potential zur Ausbeutensteigerung zu untersuchen. Dieser Aspekt der Apoptosemanipulation wird in diesem Kapitel untersucht.

Im Gegensatz zur Steigerung der Produktion von monoklonalen Antikörpern durch Bcl-2-Überexprimierung (Al-Rubeai und Singh 1998) wurde bei einem analogen Ansatz eine Verringerung der Influenza-Virusproduktion gezeigt (Olsen et al. 1996). Aufgrund der Komplexität der Transfektion wurde auf die genetische Manipulation der Wirtszellen (Nencioni et al. 2009) verzichtet und stattdessen die Apoptosemanipulation mit (bio-)chemischen Induktoren und Inhibitoren angestrebt.

Anhand der aktuellen Literatur wurden dazu zunächst mögliche Kandidaten für ein Screening in statischer Kultur im Kleinmaßstab ausgewählt. Die Kandidaten stellen eine Auswahl aus einer Vielzahl möglicher Substanzen dar. Basierend auf den Ergebnissen des Screenings (Kapitel 4.5.3) wurden die aussichtsreichsten Kandidaten in Bioreaktorkultivierungen geprüft (Kapitel 4.5.4).

Der in Kapitel 2.2.3 beschriebene Prozess der Virusreplikation in MDCK-Zellen erfordert die Protease-vermittelte Spaltung des viralen Hämagglutinins. Dazu wird die Serinprotease Trypsin verwendet, die Polypeptide nach den Aminosäuren Lysin und/oder Arginin spaltet (Stryer 1996). Da Polypeptide, die zur Apoptosemanipulation geeignet wären, durch die Trypsinaktivität im Medium gespalten würden, wurde ihr Einsatz nicht in Erwägung gezogen. Dementsprechend konnten folgende Proteine, für die eine Funktion als extrinsischer Apoptoseinduktor in MDCK-Zellen beschrieben wurde, nicht eingesetzt werden: anti-Fas-Antikörper, TRAIL, Interferon alpha und beta (Wurzer et al. 2004). Stattdessen wurden die Apoptoseinduktoren Staurosporin, Gossypol und Valinomycin eingesetzt (Kapitel 4.5.1). Als Apoptoseinhibitoren wurden Betain, Zinksulfat und mehrere Caspaseinhibitoren getestet (Kapitel 4.5.2). Durch die Infektion mit Influenza-Viren wird in MDCK-Zellen über verschiedene Mechanismen Apoptose ausgelöst (Kapitel 2.6). Der Einsatz von Apoptose-Induktoren und -Inhibitoren ermöglicht die gezielte Manipulation des typischen Ablaufes der

Virus-Wirtszell-Interaktion. Durch das Screening der spezifischen Virusproduktion wurde das Potential der Agenzien zur Steigerung der Produktausbeute untersucht (Kapitel 4.5).

Für das Influenza-Virus wurde beschrieben, dass N2-Stämme ein höheres Apoptose-induzierendes Potential besitzen als beispielsweise N1-Stämme (Mohsin et al., 2001). Dies konnte experimentell bestätigt werden (Kapitel 4.4.6). Im Vergleich zu Influenza A-Virus PR/8/34 H1N1 (NIBSC und RKI) wurde bei Infektion mit Wisconsin/67/2005 H3N2 hgr eine höhere spezifische Virusausbeute erreicht (Tabelle 4-6). Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde daher dieser Stamm eingesetzt. Dabei sollte untersucht werden, ob mit den getesteten Kandidaten die Möglichkeit besteht, die Ausbeute eines guten Produktionsstammes weiter zu optimieren. Anhand der aktuellen Literatur wurden dazu zunächst mögliche Kandidaten für ein Screening in Sechs-Well-Platten ausgewählt. Für Wisconsin/67/2005 H3N2 hgr wurde eine MOI-Abhängigkeit der spezifischen Virusausbeute gezeigt (Agalaridis 2007). Die maximale Ausbeute von 16600 Viruspartikeln/Zelle in Sechs-Well-Platten wurde dabei mit einer MOI von 0,001 und einer Infektionsdauer von 120 h erreicht. Folglich wurden diese Infektionsbedingungen eingesetzt.

4.5.1 Apoptose-Induktoren

Die Auswahl der Apoptose-Induktoren wird häufig durch die zu erwartenden negativen Auswirkungen auf die Influenza-Virusreplikation begrenzt. Beispielsweise wurden Cycloheximid und Anisomycin nicht eingesetzt, da sie die Proteinbiosynthese hemmen (Jayaraman 2003; Shinohara und Oka 1994), mit entsprechenden möglichen Folgen für die intrazelluläre Produktion der Influenza-Virusproteine. Wegen der Inhibition der DNA- bzw. RNA-Synthese durch Mitomycin C bzw. Actinomycin D (Mischo et al. 2005; Mladenov et al. 2007) interferieren diese Substanzen sehr wahrscheinlich mit der Replikation von viralen Nucleinsäuren. Eine Steigerung der Virusreplikation ist daher nicht zu erwarten.

Das Antibiotikum Staurosporin ist ein Inhibitor von Phospholipid/ Ca^{2+} abhängigen Protease Kinasen (PKC, Tamaoki et al. 1986) und wird häufig für die Apoptoseinduktion verwendet (Araki et al. 2002; Figueroa et al. 2004; Jayaraman 2003). Die Induktion von Apoptose in MDCK-Zellen mit 1 μM Staurosporin nach 6 Stunden Inkubation wurde durch Agarosegelelektrophorese (DNA-Laddering) und erhöhte Caspase 3-Aktivität nachgewiesen (Araki et al. 2002).

Gossypol wirkt als PKC- und Bcl-2-Inhibitor Apoptose-induzierend. Nach Inkubation von HL-6-Zellen mit 50 μM Gossypol für 6 Stunden wurde Apoptose durch DNA-Laddering detektiert (Jarvis et al. 1994). Für humane Lymphozyten wurde die Induktion von Apoptose durch Gossypol-Konzentrationen von 25 bis 50 μM beschrieben (Yurtcu et al. 2003). Außerdem konnte in kolorektalen Tumorzelllinien eine erhöhte Aktivität der Caspasen 3, 6, 8 und 9 gezeigt werden (Ko et al. 2007).

Die Apoptose-induzierende Wirkung des Kaliumtransporters Valinomycin beruht auf der Störung des Mitochondrien-Membranpotentials. Ratten-Hepatomzellen zeigten nach 8 Stunden Inkubation mit 100 μM Valinomycin DNA-Fragmentierung, Kondensation des Nukleus und Caspase 3-Aktivität (Inai et al. 1997).

Ergebnisse der Verwendung von Staurosporin, Gossypol und Valinomycin im Zusammenhang mit der Influenza-Virusinfektion von Zellkulturen wurden bisher nicht veröffentlicht.

4.5.2 Apoptose-Inhibitoren

Um den Effekt der Apoptoseunterdrückung während der Influenza-Virusinfektion untersuchen zu können, wurden verschiedene Agenzien eingesetzt, die sich negativ auf die Apoptoseinduktion durch andere Agenzien auswirken: Betain, Zinksulfat und Caspase-Inhibitoren.

In MDCK-Zellen wirkt Betain inhibierend auf die Apoptose-Induktion durch hypertonen Stress. Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von Betain (1 mM, 2 mM, 5 mM) zum Medium die Apoptose in MDCK-Zellen nach 24 Stunden Inkubation signifikant verringert. Dies konnte über DNA-Fragmentierung (TUNEL-Assay) sowie die Aktivität der Caspasen 3, 8 und 9 nachgewiesen werden (Horio et al. 2001).

Zinksulfat wurde in der Literatur als Inhibitor der chemisch induzierten Apoptose in Jurkat-Zellen beschrieben (Ganju und Eastman 2003). Es wurde gezeigt, dass Zinksulfat sowohl die Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptoseweges hemmt. Die beiden Signalwege werden dabei auf unterschiedliche Weise gehemmt. Bei der Induktion des intrinsischen Signalwegs hemmt Zinksulfat (0,3 mM, 2 Stunden Inkubation) die proapoptischen Enzyme Bax und Bak und dadurch die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C. Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose konnte die Hemmung der Caspase 3-Aktivität und der DNA-Fragmentierung durch Zinksulfat (3 mM, 5 Stunden) gezeigt werden (Ganju und Eastman 2003). Takizawa et al. 1993 beobachteten jeweils die Inhibition der Influenza-virusinduzierten Apoptose in MDCK-Zellen durch Zinksulfat ($> 0,1$ mM) und

Cycloheximid. Der Einfluss der Apoptoseinhibition auf die Menge an produziertem Virus wurde jedoch nicht untersucht. Aufgrund der Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (Jayaraman 2003), wurde dieses zur Steigerung der Influenza-Virusausbeute im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt. Zusätzlich zur Apoptose-inhibierenden Funktion von Zinksulfat in niedrigen Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass Zinksulfat in hohen Konzentrationen die Apoptose in Caco-2-Zellen ($> 100 \mu\text{M}$) und humanen Retinazellen ($> 10 \text{ mM}$) induziert (Wood und Osborne 2001; Zodl et al. 2003).

Die Aktivität der Caspasen ist essentiell für den Ablauf der Apoptose (Earnshaw et al. 1999; Nicholson und Thornberry 1997). Die Aktivität von Caspasen kann durch spezifische und unspezifische (Pancaspase-) Inhibitoren gehemmt werden (McKenna und Cotter 2000). Die Caspase-Inhibitoren bestehen aus einer kurzen Peptidsequenz, an die ein Fluoromethylketon (fmk) gebunden ist. Dadurch sind die Inhibitoren membrangängig. In der Zelle bindet der Inhibitor über die Peptidsequenz an die korrespondierenden Caspasen, die auf diese Weise gehemmt werden. Takizawa et al. 1999b wiesen die dosisabhängige Hemmung der Influenza-virusinduzierten Apoptose in MDCK-Zellen durch den Einsatz spezifischer Caspase-Inhibitoren nach. Der Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk (z-Val-Ala-Asp-fmk) und der Caspase 8-Inhibitor z-IETD-fmk (z-Ile-Glu-Thr-Asp-fmk) zeichneten sich dabei durch effektive Inhibition der Influenza-virusinduzierten Apoptose aus, während der Caspase 9-Inhibitor z-LEHD-fmk (z-Leu-Glu-His-Asp-fmk) nur einen geringen inhibitorischen Einfluss zeigte. Ein signifikanter Einfluss der Caspaseinhibitoren auf die Virusreplikation wurde nicht beobachtet. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde die Infektion jedoch bei $34 \text{ }^\circ\text{C}$ und undefinierter MOI durchgeführt (Takizawa et al. 1999b). Dementsprechend wurden die Caspaseinhibitoren in Screeningversuchen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und definierter MOI getestet, um die Wirkung im untersuchten System zu analysieren.

4.5.3 Manipulation in Sechs-Well-Platten

Die Kultivierung in Sechs-Well-Platten (Wachstumsfläche: $10 \text{ cm}^2/\text{Well}$) für Reihenversuche wurde standardisiert durchgeführt, um die biologische Varianz zu minimieren. Die Einsaat-Zellichte betrug $7,5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 , die Infektion erfolgte nach 72 h Zellwachstum. Für die Berechnung von Kulturvolumen und Saatvirusvolumen wurden die Zellen einer Sechs-Well-Platte trypsiniert und sechsfach automatisch bestimmt. Durch entsprechende Volumen Anpassung wurde die volumetrische Zellkonzentration analog den Verhältnissen im Bioreaktor (2 g/L Cytodex 1 und $1,6 \times 10^6$ Zellen/mL bei Infektion) konstant gehalten. Bei

jeder Versuchsreihe wurde eine Standardinfektion (ohne Zugabe von Agenzien) mitgeführt. Die Apoptose-Induktoren und -Inhibitoren wurden stets zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben. Tabelle 4-8 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Substanzen. Aus den Reinsubstanzen wurden zunächst sterile, hochkonzentrierte Stammlösungen angesetzt, die dann entsprechend mit Virusmedium verdünnt wurden.

Tabelle 4-8: Übersicht der zur Apoptosemanipulation verwendeten Substanzen

Substanz	Lösungsmittel	getestete Konzentrationen (μM)
Betain	Wasser	5, 50, 500, 5 000, 50 000
Gossypol	DMSO	10, 100, 1 000
Staurosporin	DMSO	0,1 , 1, 10
Valinomycin	DMSO	1, 10, 100
Zinksulfat	Wasser	5, 25, 50, 500
z-IEDT-fmk	DMSO	5, 10, 30
z-LEHD-fmk	DMSO	5, 10, 30
z-VAD-fmk	DMSO	5, 10, 30

Für die Versuchsreihen wurde die Signifikanz einer Veränderung des spezifischen Ausbeutekoeffizienten im Vergleich zur Standard-Infektion berechnet. Die Signifikanz wurde über einen zweiseitigen t-Test bestimmt, als Signifikanzgrenze wurde ein P-Wert $< 0,01$ angenommen.

In der Literatur wurde für DMSO-Konzentrationen von 0,3 % eine Steigerung der infektiösen Influenza-Virustiter beschrieben (Pleschka et al. 2001). Dabei wurden jedoch sowohl eine andere MDCK-Zelllinie als auch ein anderer Influenza-Virusstamm eingesetzt.

Da ein Teil der verwendeten Substanzen in DMSO gelöst vorlag, wurde der Einfluss von DMSO untersucht, um einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse ausschließen zu können. Für DMSO, das dem Kulturmedium in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde, konnte kein Effekt auf die Virusausbeute von Influenza A WSN (H3N2) nachgewiesen werden (Abbildung 4-36a). Auch der Einsatz von Caspase-Inhibitoren zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die spezifische Virusausbeute (Abbildung 4-36b).

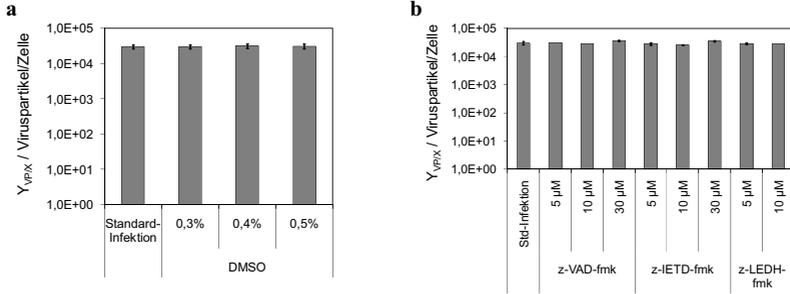


Abbildung 4-36: Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von DMSO bzw. Caspase-Inhibitoren und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten

a: Dimethylsulfoxid (DMSO), Mittelwerte (Balken) \pm SD ($n = 6$); **b:** Caspaseinhibitoren, z-VAD-fmk (Pancaspase-Inhibitor), z-IETD-fmk (Caspase 8-Inhibitor) und z-LEHD-fmk (Caspase 9-Inhibitor), Mittelwerte (Balken) \pm SD ($n = 2$)

Für Betain und Zinksulfat wurden antiapoptotische Effekte beschrieben (Kapitel 4.5.2). Beide Substanzen wurden in je zwei Versuchsreihen (hellgrau und dunkelgrau dargestellt) getestet (Abbildung 4-37). Dabei konnte für Betain in den Konzentrationen 50 bis 50000 μM zunächst eine signifikante Ausbeutesteigerung gezeigt werden, die in einer zweiten Versuchsreihe jedoch nicht reproduziert werden konnte. Stattdessen wurde für 500 μM Betain sogar ein signifikanter Ausbeuteverlust festgestellt. Bei der Verwendung von Zinksulfat konnte zunächst kein signifikanter Einfluss auf die Virusausbeute festgestellt werden. Allerdings wurde bei einer Konzentration von 500 μM die Virusreplikation auf 2 bzw. 6 % der Standardinfektion reduziert. Im Bereich von 5 – 50 μM wurde mit zunehmender Konzentration ein leichter Anstieg der Ausbeute verzeichnet, der bei einer Versuchsreihe mit geringerer Standardabweichung der Virusausbeute signifikant war (Abbildung 4-37b). Die signifikanten Ausbeutesteigerungen betragen dabei jedoch lediglich 10 bzw. 11 %.

Die Verwendung der Apoptose-Induktoren Gossypol, Valinomycin und Staurosporin wirkte sich wesentlich stärker aus, als die Verwendung der Apoptoseinhibitoren.

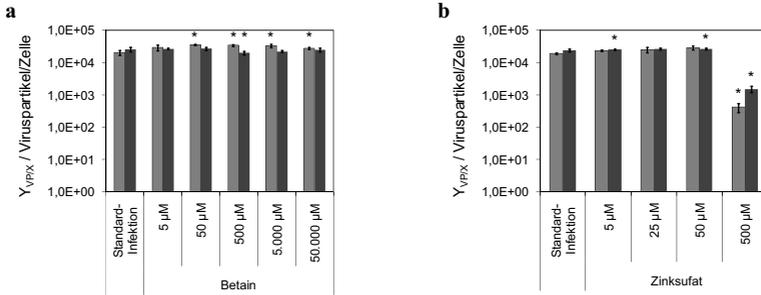


Abbildung 4-37: Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von Betain bzw. Zinksulfat und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten
a: Betain; **b:** Zinksulfat; Mittelwerte (Balken) \pm SD (n = 6)

* Signifikanter Unterschied zur Standard-Infektion (n = 6; P < 0,01)

Die Zugabe von Gossypol führte bei einer Konzentration von 10 μ M zu einer nicht signifikanten Steigerung der spezifischen Virusausbeute um 31 % (Abbildung 4-38). Bei einer Konzentration von 100 μ M Gossypol wurde die Virusreplikation vollständig inhibiert. Die spezifische Virusausbeute betrug bei 1000 μ M Gossypol lediglich 7 % der Ausbeute bei Standardinfektion. Eine massive Inhibition der Virusreplikation wurde auch bei Zugabe von Valinomycin erreicht (Abbildung 4-38b).

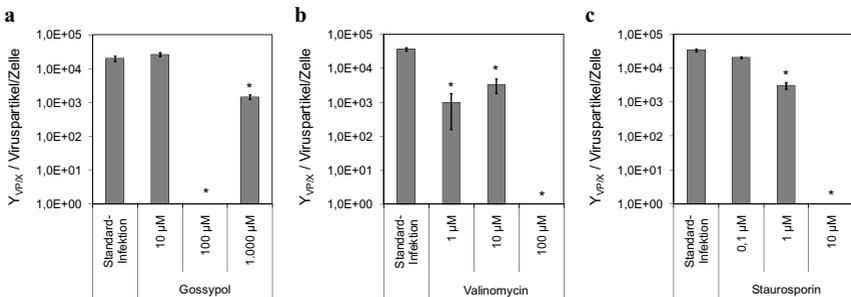


Abbildung 4-38: Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von Gossypol, Valinomycin bzw. Staurosporin und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten
a: Gossypol; **b:** Valinomycin; **c:** Staurosporin; Mittelwerte (Balken) \pm SD (n = 6)

* S Signifikanter Unterschied zur Standard-Infektion (n = 6; P < 0,01)

Im Vergleich zur Standardinfektion wurde durch Valinomycin die spezifische Virusausbeute auf 3 % (1 μ M) bzw. 9 % (10 μ M) reduziert. Bei 100 μ M konnte keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4-38c dargestellt, konnte für Staurosporin eine

dosisabhängige Verringerung der spezifischen Virusausbeute gezeigt werden. Dabei wurde die Ausbeute auf 60 % (0,1 μM), 9 % (1 μM) bzw. 0 % (10 μM) verringert.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Bioreaktormaßstab zu prüfen und zusätzlich zur Betrachtung der spezifischen Virusausbeute auch Einflüsse auf den Verlauf der Infektion und der Apoptose messbar zu machen, wurde je ein Apoptoseinhibitor und –induktor im 1,2 L-Maßstab getestet (Kapitel 4.5.4).

4.5.4 Manipulation im 1,2 L-Bioreaktor

Basierend auf den Ergebnissen der spezifischen Virusausbeute in Sechswell-Platten (Kapitel 4.5.3) wurden folgende Substanzen in Microcarrierkulturen mit 1,2 L Volumen getestet: Betain (50 μM) und Staurosporin (1 μM). Analog zu den Versuchen in Sechswell-Platten wurden die Agenzien jeweils zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben.

Die Verläufe der Zellkonzentrationen und Virustiter von zwei Kultivierungen mit 50 μM Betain sind in Abbildung 4-39 dargestellt.

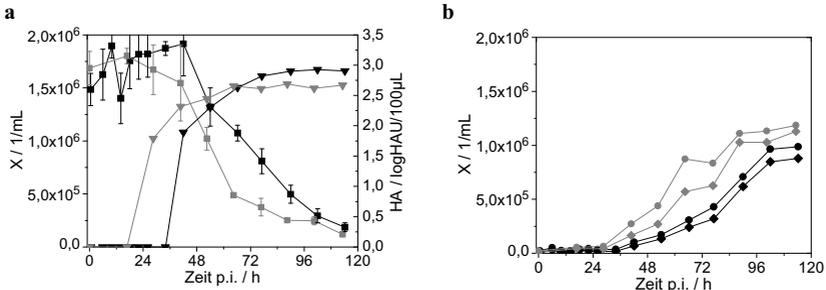


Abbildung 4-39: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Betain nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,002) im 1,2 L-Bioreaktor

Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente (schwarz, grau); adhärenente Zellzahlen: Mittelwerte (Symbole) \pm SD (n = 3), a: adhärenente Zellen auf MC, Viruskonzentration im Überstand ($\blacktriangledown, \blacktriangledown$); b: Zellen im Überstand: (\bullet, \bullet : Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen; $\blacklozenge, \blacklozenge$: Konzentration toter Zellen)

Die beiden Kultivierungen unterschieden sich durch einen verzögerten Anstieg der HA-Aktivität und damit korrelierend einer leicht verzögerten Ablösung der Zellen von den Microcarriern. Die gegen Ende der Kultivierungen erreichten HA-Aktivitäten unterschieden sich jedoch nur geringfügig voneinander. Verglichen mit Kultivierungen ohne Betainzugabe (Abbildung 4-29a) wurden 74 % weniger Viren freigesetzt.

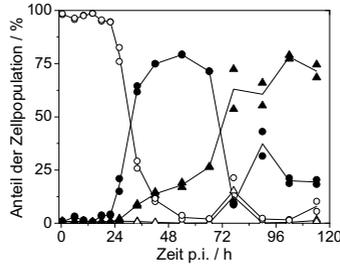


Abbildung 4-40: Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen mit $50 \mu\text{mol/L}$ Betain nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001) im 1,2 L-Bioreaktor. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmung (Linie) und Streuung der Einzelwerte (Symbole); Nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (\circ, \circ), infiziert (\bullet, \bullet); apoptotische Zellen: nicht infiziert (\triangle, \triangle), infiziert ($\blacktriangle, \blacktriangle$)

Im Vergleich zur Ausbreitung der Infektion bei Kultivierungen von Influenza A WSN ohne Betainzugabe (Abbildung 4-29) erfolgte die Ausbreitung bei $50 \mu\text{M}$ Betain etwa 16 h später (Abbildung 4-40). Im Gegensatz dazu war der Anteil der infizierten apoptotischen Zellen zwischen 54 und 90 h p.i. nach Zugabe von Betain höher als ohne Betainzugabe. Während dieser Phase fand auch noch eine Virusfreisetzung statt (Abbildung 4-39). Dies war bei Kultivierungen ohne Betainzugabe nicht der Fall (Abbildung 4-29a).

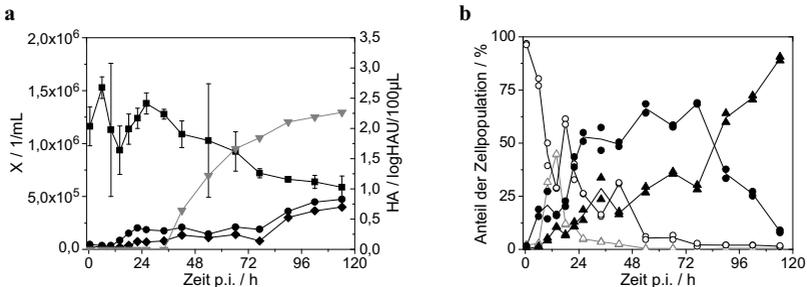


Abbildung 4-41: Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter von MDCK-Zellen mit $1 \mu\text{mol/L}$ Staurosporin nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001) im 1,2 L-Bioreaktor

a: adhärenente Zellen auf MC (\blacksquare), Zellen im Überstand: Gesamtkonzentration lebender und toter Zellen (\bullet), Konzentration toter Zellen (\blacklozenge), Viruskonzentration im Überstand (\blacktriangledown); **b:** nicht-apoptotische Zellen: nicht infiziert (\circ), infiziert (\bullet); apoptotische Zellen: nicht infiziert (\triangle), infiziert (\blacktriangle)

Adhärenente Zellzahlen: Mittelwerte (Symbole) \pm SD (n = 3)

Bei nicht manipulierten Kultivierungen (Kapitel 4.4.4) wurde eine starke Virusfreisetzung ab 18 h p.i. beobachtet. Bei einer Kultivierung mit $1 \mu\text{M}$ Staurosporin wurde eine messbare Virusfreisetzung erst 42 h p.i. festgestellt (Abbildung 4-41a). Die Virusfreisetzung erfolgte

bei der Kultur mit Staurosporin auch wesentlich langsamer, auch die maximale HA-Aktivität lag wesentlich niedriger (2,26 log HAU/100 μ L) als bei nicht manipulierten Kultivierungen (3,26 bzw. 3,27 log HAU/100 μ L). Ein Unterschied zwischen mit Staurosporin manipulierter Kultur und der nicht manipulierten Kultur war auch beim hohen Anteil nicht-infizierter apoptotischer Zellen innerhalb der ersten 24 h p.i. erkennbar (Abbildung 4-41b). Dieser Anteil betrug bei nicht manipulierten Kultivierungen weniger als 2 %, während durch die Zugabe von Staurosporin 14 h p.i. ein Maximalanteil von 44,6 % erreicht wurde. Gegen Ende der Kultivierung mit Staurosporin wurde auch ein sehr hoher Anteil infizierter apoptotischer Zellen festgestellt (90 %). Insgesamt wurde der Anteil apoptotischer Zellen, sowohl infiziert als auch nicht-infiziert, durch die Zugabe von Staurosporin wesentlich erhöht. Dies führte zu einer geringeren Virusproduktion. Außerdem wurde eine verlangsamte Ablösung der Zellen von den Microcarriern beobachtet. Die Wiederfindungsrate der Zellen betrug am Ende der Kultivierung 76,4 %, davon lagen 44,7 % als Überstandszellen vor. Die Vitalität der Überstandszellen betrug lediglich 15,6 %. Demgegenüber betrug die Wiederfindungsrate bei nicht manipulierten Kultivierungen 95 %, davon waren 92 % Überstandszellen, mit einer Vitalität von 10 %.

4.5.5 Kapitelzusammenfassung und -diskussion

Während der Influenza-Virusproduktion wurden MDCK-Zellen gezielt chemischen Agenzien mit bekannter Wirkung auf die Apoptose ausgesetzt. Dabei wurden sowohl Apoptose-induzierende wie -inhibierende Substanzen eingesetzt. Ziel der Untersuchungen war die Beeinflussung der Virus-Wirtszellinteraktion. Die chemischen Agenzien sollten dabei alternativ zu bekannten molekulargenetischen Zellveränderungen (Arden und Betenbaugh 2004; Singh und Al-Rubeai 1998) eingesetzt werden. Wegen des für die Virusvermehrung erforderlichen Trypsins im Virusmedium wurde auf Polypeptide zur Manipulation verzichtet. Für die Manipulationsversuche wurde der Influenza A-Virusstamm WSN/67/05 H3N2 verwendet, der bei MDCK-Zellen verhältnismäßig hohe Virustiter produziert (Tabelle 4-6). Denkbar wäre auch der umgekehrte Ansatz, einen Virusstamm mit geringer Ausbeute zu verwenden, da hier möglicherweise eine höhere Ausbeutesteigerung zu erwarten ist. Für die Screeningversuche in Sechs-Well-Platten wurden standardisierte Versuchsbedingungen verwendet. Die parallel zu den Manipulationen durchgeführten Standardinfektionen hatten eine mittlere spezifische Virusausbeute von 27000 Viren/Zelle (Standardab-

weichung: 6700 Viren/Zelle). Im Vergleich zu Bioreaktorkultivierungen (Tabelle 4-6) wurde also im Screeningsystem die gleiche spezifische Virusausbeute wie im Bezugssystem erreicht. Die Agenzien wurden zum Zeitpunkt der Infektion mit MOI 0,001 zugegeben, um eine ausreichende Wirkungsdauer vor der Infektion zu erzielen. Bei höherer MOI oder späterer Zugabe hätte die hohe Geschwindigkeit der Virusreplikation den Effekt der Agenzienzugabe möglicherweise kompensiert. Die Nutzung der hohen Replikationsrate zur Vermehrung trotz Apoptoseinduktion wurde für MDCK-Zellen beschrieben (Kurokawa et al. 1999). Die Dauer der Infektion von 120 h wurde gewählt, um auch bei Verzögerungen der Infektionsausbreitung die maximal mögliche Virusausbeute zu erreichen. Eine ggfs. geringe Abnahme der Hämagglutinationsaktivität durch Zerfall der Viruspartikel wurde dabei analog zu früheren Publikationen vernachlässigt (Möhler et al. 2005; Schulze-Horsel et al. 2009).

Für DMSO, das dem Kulturmedium in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde, konnte kein Effekt auf die Virusausbeute von Influenza A WSN/67/05 nachgewiesen werden (Abbildung 4-36a). Im Gegensatz dazu wurde eine leichte Steigerung der Produktion infektiöser Viren durch DMSO beschrieben (Wurzer et al. 2003). Aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen waren die Ergebnisse jedoch nicht vollständig vergleichbar. Es wurden unterschiedliche MDCK-Zelllinien, Influenza-Viren und Medien verwendet. Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse kann für die verwendeten Konzentrationen ein Einfluss von DMSO auf die spezifische Virusausbeute ausgeschlossen werden. Folglich kann auch ein unerwünschter Effekt bei der Verwendung von DMSO-gelösten Substanzen (vgl. Tabelle 4-8) ausgeschlossen werden.

Für den Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk (z-Val-Ala-Asp-fmk) und der Caspase 8-Inhibitor z-IETD-fmk (z-Ile-Glu-Thr-Asp-fmk) wurde die effektive Inhibition der Influenza-virusinduzierten Apoptose beschrieben, während der Caspase 9-Inhibitor z-LEHD-fmk (z-Leu-Glu-His-Asp-fmk) nur einen geringen inhibitorischen Einfluss zeigte (Takizawa et al. 1999b). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde die Infektion jedoch bei 34 °C und undefinierter MOI durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse stehen folglich nicht im Widerspruch zur Literatur. In Sechs-Well-Platten konnte durch den Einsatz der Caspase-Inhibitoren kein signifikanter Einfluss auf die spezifische Virusausbeute gezeigt werden (Abbildung 4-36b).

Für Betain wurde ein antiapoptotischer Effekt auf hyperosmotisch gestresste MDCK-Zellen beschrieben (Horio et al. 2001). In Sechs-Well-Platten konnte für Betain in den Konzen-

trationen 50 bis 50000 μM zunächst eine signifikante Ausbeutesteigerung gezeigt werden, die in der zweiten Versuchsreihe jedoch nicht reproduziert werden konnte. Stattdessen wurde für 500 μM Betain sogar ein signifikanter Ausbeuteverlust festgestellt. Der Einsatz von 50 μM Betain im Bioreaktor führte zu einer Verringerung der spezifischen Virusausbeute auf 26 % (entspricht 7900 Viren/Zelle) der bei Kultivierungen ohne Manipulation erreichten Ausbeuten. Im Gegensatz dazu wurden in Sechs-Well-Kulturen mit 50 μM Betain vergleichbare Ausbeuten (32000 Viren/Zelle \pm Standardabweichung 4900 Viren/Zelle) wie in nicht-manipulierten Bioreaktor-Kultivierungen (30000 Viren/Zelle) erreicht. In Betainhaltiger Kultur erfolgte die Ausbreitung der Infektion etwa 16 h später (Abbildung 4-40). Im Gegensatz dazu war der Anteil der infizierten apoptotischen Zellen zwischen 54 und 90 h p.i. nach Zugabe von Betain höher als ohne Betainzugabe. Während dieser Phase fand auch noch eine Virusfreisetzung statt (Abbildung 4-39). Dies war bei Kultivierungen ohne Betainzugabe nicht der Fall (Abbildung 4-29a). Im Fall von 50 μM Betain konnten die in Sechs-Well-Platten erreichten Virustiter im Bioreaktor nicht reproduziert werden. Stattdessen wirkte sich die Betainzugabe im Bioreaktor wesentlich stärker und negativ auf die Virusreplikation aus. Zunächst führte das Betain zu einer um 16 Stunden späteren Virusfreisetzung. Möglicherweise wurde durch die erhöhte Apoptose in infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-manipulierten Kulturen die Virusreplikation gestört. Der verzögerte Start der Virusreplikation könnte zu einer zeitlichen Überschneidung von Replikation und Apoptose geführt haben. Die erhöhte Apoptoseinduktion steht im Gegensatz zu Arbeiten von Horio et al, in denen eine Apoptoseverringerng durch Betainzugabe beschrieben wurde. Allerdings wurden dort hypertonsche Kulturmedien als Apoptoseinduktor eingesetzt (Horio et al. 2001).

Aufgrund der fortgeschrittenen Zelldegradation in der Apoptose – verbunden mit dem Verlust des Mitochondrienpotentials (Zusammenbruch der Atmungskette) und der erhöhten Aktivität intrazellulärer Proteasen (Caspasen) - könnte die Effizienz der Virusreplikation, insbesondere die Expression intakter Virusproteine, verringert worden sein. Diese Erklärung wird zusätzlich dadurch gestützt, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Virusinfektion und die Virusfreisetzung durch Betainzugabe massiv verringert wurden (Abbildung 4-39).

In der Literatur wurde gezeigt, dass Zinksulfat sowohl die Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptoseweges hemmt. Die beiden Signalwege werden dabei auf unterschiedliche Weise gehemmt. Bei der Induktion des intrinsischen Signalwegs hemmt Zinksulfat (0,3 mM, 2 Stunden Inkubation) die proapoptotischen Enzyme Bax und Bak und dadurch die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C. Bei der Rezeptor-vermittelten

Apoptose konnte die Hemmung der Caspase 3-Aktivität und der DNA-Fragmentierung durch Zinksulfat (3 mM, 5 Stunden) gezeigt werden (Ganju und Eastman 2003). Takizawa et al. 1993 beobachteten jeweils die Inhibition der Influenza-virusinduzierten Apoptose in MDCK-Zellen durch Zinksulfat ($> 0,1$ mM). Der Einfluss der Apoptoseinhibition auf die Menge an produziertem Virus wurde jedoch nicht untersucht. Bei der Verwendung von Zinksulfat konnte in Sechs-Well-Platten zunächst kein signifikanter Einfluss auf die Virusausbeute festgestellt werden. Allerdings wurde bei einer Konzentration von $500 \mu\text{M}$ die Virusreplikation auf 2 bzw. 6 % der Standardinfektion reduziert. Im Bereich von $5 - 50 \mu\text{M}$ wurde mit zunehmender Konzentration ein lediglich leichter Anstieg der Ausbeute verzeichnet (Abbildung 4-37b).

Die Apoptose-induzierende Wirkung des Kaliumtransporters Valinomycin beruht auf der Störung des Mitochondrien-Membranpotentials. Ratten-Hepatomzellen zeigten nach 8 Stunden Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ Valinomycin die Apoptosemerkmale DNA-Fragmentierung, Kondensation des Nukleus und Caspase 3-Aktivität (Inai et al. 1997). Für MDCK-Zellen wurde die Apoptoseinduktion mit Valinomycin noch nicht beschrieben. Im Vergleich zur Standardinfektion wurde die spezifische Virusausbeute in Sechs-Well-Platten durch Valinomycin auf 3 % ($1 \mu\text{M}$) bzw. 9 % ($10 \mu\text{M}$) reduziert (Abbildung 4-38b). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von $100 \mu\text{M}$ konnte keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden. Eine negative Beeinflussung des Mitochondrienpotentials könnte zur Apoptose und damit einerseits zum Verlust von Zellen als Produzenten und andererseits zu einem beschleunigten Absterben infizierter Zellen und somit zu einer verkürzten Virusreplikationsphase in diesen Zellen führen. Zur Klärung, welcher Mechanismus zum Einbruch der spezifischen Ausbeuten führt, könnten Kultivierungen im Bioreaktor mit paralleler Quantifizierung der Infektion und der Apoptose beitragen.

Die Verwendung von Staurosporin wird in der Literatur häufig beschrieben (Araki et al. 2002; Figueroa et al. 2004; Jayaraman 2003). In Sechs-Well-Platten wurde eine dosisabhängige Verringerung der spezifischen Virusausbeute beobachtet (Abbildung 4-38c). Dabei wurde die Ausbeute auf 60 % ($0,1 \mu\text{M}$ Staurosporin), 9 % ($1 \mu\text{M}$) bzw. 0 % ($10 \mu\text{M}$) verringert. Die Induktion von Apoptose in MDCK-Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Staurosporin nach 6 Stunden Inkubation wurde durch Agarosegelelektrophorese (DNA-Laddering) und erhöhte Caspase 3-Aktivität nachgewiesen (Araki et al. 2002). Basierend auf dieser Beobachtung und dem massiven Einbruch der Virusreplikation in Sechs-Well-Platten wurde diese Konzentration auch in einer

Bioreaktorkultivierung getestet. Bei Kultivierung mit 1 μM Staurosporin wurde eine messbare Virusfreisetzung erst 42 h p.i. festgestellt (Abbildung 4-41a), also etwa 28 Stunden später als in nicht-manipulierten Kultivierungen (Abbildung 4-29a). Die Virusfreisetzung erfolgte dabei auch wesentlich langsamer. Ein weiterer Unterschied zwischen mit Staurosporin manipulierter Kultur und nicht-manipulierten Kulturen war auch beim hohen Anteil nicht-infizierter apoptotischer Zellen innerhalb der ersten 24 h p.i. erkennbar (Abbildung 4-41b). Dieser Anteil betrug bei nicht-manipulierten Kultivierungen weniger als 2 %, während durch die Zugabe von Staurosporin 14 h p.i. ein Maximalanteil von 44,6 % erreicht wurde. Gegen Ende der Kultivierung mit Staurosporin wurde auch ein sehr hoher Anteil infizierter apoptotischer Zellen festgestellt (90 %). Insgesamt wurde durch die Zugabe von Staurosporin der Anteil apoptotischer Zellen (infiziert wie nicht-infiziert) wesentlich erhöht. Dies führte dazu, dass nur etwa 10 % der spezifischen Virusausbeute von nicht-manipulierten Kultivierungen erreicht wurden (Tabelle 4-6). Die Wiederfindungsrate der Zellen betrug am Ende der Kultivierung lediglich 76,4 %, während in nicht-manipulierten Kultivierungen von WSN/67/05 H3N2 keine Zellyse beobachtet wurde (Kapitel 4.4.4). Die in Sechs-Well-Platten erreichte spezifische Virusausbeute von 3100 Viruspartikeln pro Zelle konnte im Bioreaktor exakt reproduziert werden.

Staurosporin ist ein Inhibitor von Phospholipid/ Ca^{2+} abhängigen Protease Kinasen (PKC, Tamaoki et al. 1986). Für PKC-Inhibitoren wurde eine Influenza-virusinhibierende Wirkung beschrieben. Dabei konnte für verschiedene Substanzen, wie zum Beispiel Rottlerin, eine starke Verringerung der Virusausbeute in A549-Zellen gezeigt werden (Hoffmann et al. 2008). Auch bei MDCK-Zellen wird durch PKC-Inhibition die Influenza A-Virusreplikation beeinträchtigt (Sieczkarski et al. 2003). Aus den vorliegenden Ergebnissen und der Literatur lassen sich zwei antivirale Wirkungsmechanismen von Staurosporin folgern. Zum einen wird durch die Induktion der Apoptose ein Teil der Wirtszellen eliminiert, zum anderen wird durch die PKC-Inhibition die Virusfreisetzung aus den Endosomen unterdrückt. Beide Ereignisse können unabhängig voneinander zur Verringerung der spezifischen Virusausbeute führen.

Die Zugabe von Gossypol führte bei einer Konzentration von 10 μM in Sechs-Well-Platten zu einer nicht signifikanten Steigerung der spezifischen Virusausbeute um 31 % (Abbildung 4-38a). Bei einer Konzentration von 100 μM Gossypol wurde die Virusreplikation vollständig inhibiert. Die spezifische Virusausbeute betrug bei 1000 μM Gossypol lediglich 7 % der Ausbeute bei Standardinfektion. Gossypol fungiert als PKC- und Bcl-2-Inhibitor. Nach Inkubation von HL-6-Zellen mit 50 μM Gossypol für 6 Stunden konnte die Apoptose-

induktion durch DNA-Laddering nachgewiesen werden (Jarvis et al. 1994). In kolorektalen Tumorzelllinien wurde eine erhöhte Aktivität der Caspasen 3, 6, 8 und 9 gezeigt (Ko et al. 2007). Analog zu Staurosporin können aufgrund der doppelten Wirkung von Gossypol die Mechanismen Apoptoseinduktion und PKC-Inhibition nicht getrennt werden. Daher lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, welcher Mechanismus für die Ausbeuteverringering verantwortlich ist.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Screeningsystem eignete sich sehr gut für die Bestimmung der Virusausbeute nach chemischer Manipulation der Wirtszell-Virus-Wechselwirkung. Es konnte gezeigt werden, dass die in Sechs-Well-Platten erreichten Virusausbeuten auch auf das Bezugssystem, die Microcarrierkulturen, übertragbar waren. Basierend auf den Sechs-Well-Platten ist ein ausgedehnteres Screening weiterer Substanzen denkbar. Die Manipulationsversuche wurden mit einem Virusstamm durchgeführt, der bereits sehr hohe spezifische Ausbeuten hat. Insbesondere die Substanzen, die bei Infektion mit WSN/67/05 keinen starken Effekt auf die Virusausbeute gezeigt haben (Caspaseinhibitoren, Betain und Zinksulfat), könnten auf Virusstämme mit schwacher Replikation (z.B. PR/8/34 NIBSC) durchaus eine positive Wirkung zeigen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch aus Zeitgründen nicht untersucht. Zusätzlich könnten auch die Infektionsbedingungen und der Zeitpunkt der Agenzienzugabe variiert werden.

Erst nach der Konzeption und Durchführung der Manipulationsversuche wurden vergleichbare Studien zur Inhibition und Verstärkung der Influenza-Virusproduktion in 364-Well-Platten veröffentlicht (Hoffmann et al. 2008). Dabei wurde in Hochdurchsatz-Screenings der Einfluss von verschiedenen Inhibitoren bzw. Aktivatoren von PKC und von Natrium-Ionenkanälen auf die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von Influenza A- und B-Virusstämmen auf verschiedene Zelllinien, darunter auch MDCK-Zellen, untersucht. Bei den Untersuchungen wurde ebenfalls eine MOI von 0,001 eingesetzt. Für PKC-Inhibitoren und Natrium-Ionenkanal-Aktivatoren konnte eine Verringerung der Virusfreisetzung festgestellt werden. Umgekehrt konnten für PKC-Aktivatoren und Natrium-Ionenkanal-Inhibitoren signifikante Steigerungen der Produktion von infektiösen Influenza A- und Influenza B-Viren nachgewiesen werden. Die zellbiologischen Grundlagen für die Ausbeutesteigerungen konnten jedoch nicht vollständig geklärt werden. Es wurden lediglich infektiöse Virustiter bestimmt. Der Einfluss auf die gesamte Virusproduktion (infektiöse und nicht-infektiöse Viren) wurde nicht untersucht. Ob tatsächlich eine Steigerung der Gesamtvirusproduktion erreicht wurde, lässt sich folglich aus den Daten nicht schliessen.

Zusätzlich zur Messung der Virustiter wurde ebenfalls die Caspase 3-Aktivität als Apoptosemarker untersucht. Allerdings wurde keine verstärkte Apoptoseinduktion oder –inhibition festgestellt (Hoffmann et al. 2008). Für weiterführende Untersuchungen wäre der Einsatz der Substanzen mit positivem Einfluss auf die Freisetzung infektiöser Viren hochgradig interessant. Im Bioreaktormaßstab könnten insbesondere die Überprüfung des Einflusses auf die Gesamtvirusausbeute und der Einfluss auf zellbiologischer Ebene (Apoptose und Signaltransduktion) Möglichkeiten zur gezielten Ausbeutesteigerung aufzeigen.

5 Zusammenfassung

Ausgehend von einem Basisprozess zur Influenza-Virusproduktion in Microcarrierkulturen von MDCK-Zellen (Kapitel 2.2.3) wurden im Zusammenhang mit der Virusvermehrung die zellbiologischen Mechanismen Zellzyklus und Apoptose (programmierter Zelltod) untersucht. Dazu wurden im Vorfeld der Versuche die benötigten Analytikmethoden etabliert. Die etablierten Methoden sind unabhängig vom eingesetzten Zelltyp und können daher auch für den Vergleich von Zelllinien verwendet werden (Kapitel 3.7 und 4.2). Desweiteren wurde ein Screeningsystem in Sechswell-Platten etabliert und zur Analyse der Virusreplikation unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt (Kapitel 4.5.3). Dieses Screeningsystem kann beispielsweise zum direkten Vergleich von Virusstämmen, Reassortanten oder Infektionsbedingungen verwendet werden.

Die Verwendung von Bioreaktorkultivierungen als Small scale-Modell zur Untersuchung des Zellzyklus und der Apoptose im Produktionsmaßstab bot im Vergleich zu statischen Zellkulturen verschiedene Vorteile: Die Versuche fanden unter kontrollierten Bedingungen statt, die in gewissem Rahmen auch Rückschlüsse auf den industriellen Maßstab zulassen könnten. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu eher zellbiologisch oder virologisch motivierten Arbeiten der Grundlagenforschung dar, bei denen typischerweise unregelmäßige Bedingungen in statischer Kultur vorliegen. Durch die vergleichsweise hohe Biomasse in den Bioreaktorkultivierungen war es auch möglich, ausreichend Probenmaterial für Zeitreihen und die durchflusscytometrische Analyse von gering konzentrierten Zellkonzentrationen zu generieren. Speziell die zeitliche Aufschlüsselung des Verlaufes der Apoptose durch Influenza-Virusinfektion ermöglichte ein tieferes Verständnis der Abläufe als die Analyse weniger diskreter Messpunkte. Die gewonnenen Daten wurden auch für die mathematische Modellierung der Virusinfektion nutzbar.

Zur cytometrischen Quantifizierung des Anteils infizierter Zellen wurden zwei Methoden entwickelt, deren Applikation in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde. Die Verwendung eines Gemisches von Fluoreszein-markierten monoklonalen Antikörpern gegen das Nukleoprotein und das Matrixprotein1 von Influenza A ermöglichte für mehrere Virusstämme unterschiedlichen Subtyps eine robuste Quantifizierung von infizierten Zellen (Kapitel 4.2.2). Allerdings besitzt das Antikörpergemisch den Nachteil, dass lediglich ein Summensignal aus der Bindung beider Antikörper erfasst wird und eine Sekundärfärbung zur

Bestimmung anderer Zelleigenschaften, z. B. Apoptose, nicht möglich ist. Diese Nachteile konnten durch die Verwendung von nur einem Antikörper (gegen Influenza A Nukleoprotein) kompensiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Methode reproduzierbar den Nachweis der Infektion ermöglicht (Kapitel 4.2.3). Außerdem konnten erfolgreich Sekundärfärbungen zum Nachweis von apoptotischen DNA-Strangbrüchen durchgeführt werden (Kapitel 4.4). Darüber hinaus konnten die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten über eine Kalibration der Fluoreszenz in Moleküläquivalente von gelöstem Fluoreszein transformiert werden, was zur Abschätzung der NP-Kopien pro Zelle genutzt werden konnte (Kapitel 4.2.4).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse bilden die Grundlage für die Fortsetzung der Untersuchung des Zusammenhangs von Virusinfektion und Apoptose. Die etablierten Methoden zur Quantifizierung von Zellzyklus, Apoptose und Influenza-Virusinfektion sind unabhängig von der zu analysierenden Zelllinie. Sie werden daher im Rahmen weiterer laufender Projekte zur Charakterisierung von Designerzelllinien und anderen Virussystemen eingesetzt.

Bisher wurden bei durchflusscytometrischen Messungen basierend auf biologischen Kontrollen die Signale manuell kategorisiert und die einzelnen Populationen getrennt analysiert. Aufgrund der hohen Auflösung der gemessenen Fluoreszenzdaten und der hohen statistischen Sicherheit der Messungen bilden cytometrische Messungen außerdem eine sehr gute Datengrundlage für mathematische Modelle. Neben der Auswertung der Populationsanteile an der Gesamtzellpopulation wurden die Messdaten auch für die mathematische Modellierung der übergeordneten Mechanismen genutzt (Müller et al. 2008; Sidorenko et al. 2008a; Sidorenko et al. 2008b). Dabei wurden Histogramme der Infektionsfärbung von infizierten Kulturen verwendet, um sowohl den Anteil infizierter Zellen in der Kultur als auch über die Fluoreszenzintensität den Infektionsgrad der Zellen mathematisch abzubilden.

Die dynamischen Veränderungen der NP-Kopienzahl pro Zelle und der Apoptoseinduktion wurden allerdings bisher noch nicht durch mathematische Modelle abgebildet. Auch die Adaptation der Methode zur Messung anderer viraler Targetmoleküle, z.B. Hämagglutinin könnte Informationen zum Replikationsverhalten von Influenzaviren liefern. Außerdem wäre unabhängig von der Quadranteneinteilung der Signalintensitäten eine Cluster-Analyse der Daten denkbar. Dadurch könnten weitere Subpopulationen identifiziert und ausgewertet

werden, was die Ausschöpfung der in den Messdaten enthaltenen Informationen noch mehr erhöhen würde.

Die Analyse des Zellzyklus von adhärenen MDCK-Zellen in Microcarrier-Kulturen (Kapitel 4.1.1) ermöglicht ein verbessertes Verständnis der Vorgänge von der Besiedlung der Microcarrier bis zur Zelldichte-abhängigen Wachstumslimitierung. Weiterführend wurden die Ergebnisse und Erkenntnisse für die Modellierung des Zellwachstums auf Microcarriern genutzt (Bock et al. 2009). Die Analyse des Zusammenhangs von Zellzyklus und Virusreplikation (Kapitel 4.1.2) konnte jedoch noch nicht eindeutig klären, ob die beobachtete Steigerung der spezifischen Virusausbeute Folge der veränderten Zellzyklusverteilung oder des größeren Zellvolumens ist. Um diese Frage zu beantworten, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

In Microcarrier-Kulturen von MDCK-Zellen wurde der Zusammenhang der Influenza-Virusinfektion und -produktion mit der Apoptose analysiert (Kapitel 4.4). Die vielfach beschriebene Induktion der Apoptose während der Virusvermehrung in statischen Zellkulturen konnte auch für das Small scale-Modell der Virusproduktion in Bioreaktoren bestätigt werden. Dabei wurde Apoptose nahezu ausschließlich bei infizierten Zellen nachgewiesen, die Fraktion der nicht-infizierten apoptotischen Zellen war vernachlässigbar klein. Dies konnte auch in schein-infizierten Kultivierungen bestätigt werden. Die getrennte Analyse von Zellen auf Microcarriern und abgelösten Zellen im Überstand zeigte deutliche Unterschiede im NP-Gehalt und dem Anteil apoptotischer Zellen auf. Adhärenente Zellen zeichneten sich dabei durch einen höheren NP-Gehalt, aber einem minimalen Anteil von apoptotischen Zellen aus, während die abgelösten Zellen im Überstand zu einem hohen Anteil apoptotisch waren, jedoch vergleichsweise wenig Nukleoprotein-Kopien pro Zelle aufwiesen (Abbildung 4-22). Zusammen mit der Analyse der Virusakkumulation im Kulturüberstand wurde aus den Daten ein mechanistisches Schema für den Ablauf von Virusinfektion und Apoptose in Microcarrier-Kulturen abgeleitet (Abbildung 4-35). Demnach führt die Influenza-Virusinfektion zur Apoptose der adhärenente Zellen. Diese lösen sich im späten Verlauf von den Microcarriern und sind im Überstand nachweisbar. Der Hauptteil der Virusausbeute geht vermutlich auf die adhärenente Zellen zurück. Daher sind die Virusreplikationsrate und die Überlebensdauer einer infizierten Zelle bis zur Exekution der Apoptose und der resultierenden Ablösung vom Microcarrier möglicherweise die entscheidenden Kriterien für die Virusausbeute von MDCK-Zellen. Diese Vermutung konnte

durch den Vergleich verschiedener Virusstämme in Bezug auf die Zellablösung, den Grad der Apoptoseinduktion und die Höhe der Virusausbeuten gestützt werden (Kapitel 4.4.6). Auch für Vero-Zellen wurden Hinweise auf die Induktion der Apoptose durch Influenza-Virusinfektion gefunden (Kapitel 4.4.5). Die spezifische Virusausbeute von Vero-Zellen lag dabei deutlich unter der Ausbeute von MDCK-Zellen. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, inwieweit Unterschiede in der Apoptose bzw. Signaltransduktion der beiden Zelllinien Ursache der Ausbeuteunterschiede sein könnten.

Sechs-Well-Platten stellen ein gut geeignetes Screeningsystem dar, um gezielt mit relativ hoher statistischer Sicherheit eine Vielzahl von Versuchsbedingungen zu analysieren. Eine Ausbeutesteigerung durch den Einsatz von Apoptoseinhibitoren oder -induktoren konnte jedoch nicht erzielt werden (Kapitel 4.5.3). Allerdings könnten, beispielsweise basierend auf Ergebnissen von Hoffmann et al. 2008 weitere Substanzklassen im Sechs-Well-Maßstab und ggfs. in Bioreaktorkultivierungen auf das Potential zur Ausbeutesteigerung getestet werden. Zusätzlich könnten durch Screeningversuche in Sechs-Well-Platten die molekularbiologischen Ursachen der Ausbeuteunterschiede zwischen Influenzastämmen aufgeklärt werden. Dazu könnten insbesondere die Interferon-Antwort und die intrazellulären Signallingkaskaden untersucht werden. Diese Forschungsansätze könnten wichtige quantitative Informationen über die Virus-Wirtszell-Wechselwirkungen liefern.

6 Ausblick

Influenza-Virusstämme können sich erheblich in der spezifischen Virusausbeute und dadurch auch in ihrer Eignung zur Impfstoffproduktion unterscheiden. Die von der WHO für die Verwendung in Impfstoffen empfohlenen Virusstämme basieren im Wesentlichen auf der prognostizierten Prävalenz dieser Stämme. Um die Wirtschaftlichkeit der Produktion zu erhöhen, werden die jeweiligen Saatviren und die Infektionsbedingungen für jeden Stamm optimiert. Dieses Vorgehen ist jedoch rein empirisch. Optimierungsziele sind neben der spezifischen Virusausbeute auch die Minimierung der Freisetzung von Wirtszellproteinen und –DNA, um den Vorgaben für die Zusammensetzung von Influenza-Impfstoffen in der jeweiligen Pharmakopöe zu entsprechen.

Zur Zeit beruht die Optimierung von Saatviren für die Impfstoffproduktion hauptsächlich auf der Reassortierung und der Adaptation der Virusstämme an die Produktionszelllinien. Basierend auf dem in Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und Daten können weitergehende Untersuchungen zum Zusammenspiel von Wirtszellen und Influenzaviren erfolgen, wodurch das Verständnis der Bedingungen für starke und robuste Virusreplikation verbessert werden kann. Mathematische Modelle, die auf den gewonnenen Daten basieren, können die Interpretation und die systematische Datenauswertung verbessern. Ein generelles Verständnis der hohen Virusausbeuten zugrunde liegenden biologischen Mechanismen könnte zu einer gezielten Veränderung von Saatviren und Wirtszelllinien führen. So wurde beispielsweise die virale RNA-Polymerase mittels reverser Genetik von MDCK-Zellen durch eine humane Polymerase ersetzt, wodurch die Virusausbeute gesteigert werden konnte (Suphaphiphat et al. 2010). Basierend auf den Erkenntnissen zu Unterschieden zwischen Wildtypstämmen und Reassortanten könnten durch den gezielten Austausch von ausbeutekritischen Virusbestandteilen sowohl die saisonalen Ausbeuteschwankungen minimiert, als auch die Ausbeute des jeweiligen Virus-Wirtssystems optimiert werden.

Die konsequente Ausbeuteoptimierung ist eine essentielle Voraussetzung, um durch Senkung der Herstellungskosten die Vorteile der Zellkultur-basierten Influenza-Impfstoffproduktion gegenüber der Produktion in Hühnereiern voll auszuschöpfen. Dazu sind detaillierte Erkenntnisse zur Virus-Wirtszellinteraktion unerlässlich. Die im Rahmen einer solchen Optimierung gewonnenen Erkenntnisse können möglicherweise auf weitere Impfstoffe, die zur Zeit schon bzw. noch nicht in Zellkulturen produziert werden, übertragen werden.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Influenza A-Virus (Horimoto und Kawaoka 2005, modifiziert)	6
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Influenza-Virusreplikation (Sidorenko und Reichl 2004, modifiziert)	7
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des Basisprozesses zur Kultivierung von MDCK-Zellen auf Microcarriern zur Virusproduktion (Upstream Processing)	11
Abbildung 2-4: Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von adhärennten MDCK-Zellen	13
Abbildung 2-5: Verlauf der Wachstumsphasen einer Satzkultur von Suspensionszellen in halblogarithmischer Auftragung (Weide 1979)	14
Abbildung 2-6: Vereinfachte schematische Darstellung des DNA-Gehalts im Zellzyklus (Stein 1999, modifiziert)	17
Abbildung 2-7: Der Zellzyklus: vereinfachte schematische Darstellung der Kontrollpunkte und Regulatoren (Stein et al. 2002, modifiziert)	19
Abbildung 2-8: Anheftung tierischer Zellen an Oberflächen in vier Stadien (Pharmacia 2005)	23
Abbildung 2-9: Vereinfachter schematischer Aufbau eines Durchflussscytometers (Rahman 2006, modifiziert)	28
Abbildung 2-10: Durchflussscytometrische Messtechnik: Signalumwandlung und -verstärkung	29
Abbildung 2-11: Schematischer Verlauf der Apoptose (Lodish 2000, modifiziert)	34
Abbildung 2-12: Vereinfachte schematische Übersicht der Apoptose in Zellkulturen (Qiu 2010)	36
Abbildung 2-13: Schematische Darstellung der Aktivierung intrazellulärer Signalwege in einer Influenza-virusinfizierten Zelle (Ludwig et al. 2006, modifiziert)	38
Abbildung 3-1: Vereinfachte schematische Darstellung der verwendeten Bioreaktoren (Schulze 2007)	50
Abbildung 3-2 : Schematische Darstellung der Probenahme für die Durchflussscytometrie	52
Abbildung 3-3: Beispiel der Kalibration von relativen FITC-Fluoreszenzintensitäten mit Quantum FITC MESF High Level Kalibrationspartikeln in PBS	59

Abbildung 3-4: DNA-Gehaltsmessung von MDCK-Zellen nach Propidiumiodidfärbung	60
Abbildung 3-5: Auswertung von cytometrischen DNA-Gehaltshistogrammen mit Cylchred-Software	61
Abbildung 3-6: Mikroskopische und cytometrische Auswertung von Fluoreszenzfärbungen auf Pancaspase-Aktivität in MDCK-Zellen	63
Abbildung 3-7: Mikroskopische und cytometrische Auswertung von Fluoreszenzfärbungen auf DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) in MDCK-Zellen	64
Abbildung 4-1: Verlauf der Zellkonzentrationen und Zellzyklusphasen von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor mit 2 g/L Cytodex 1	69
Abbildung 4-2: Verlauf der Metabolitkonzentrationen von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor mit 2 g/L Cytodex 1	70
Abbildung 4-3: Verlauf der Gesamtvirusinfektion (c_{VP}) nach Infektion von Zellkulturen in Sechs-Well-Platten mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (RKI), MOI 0,025	72
Abbildung 4-4: Durchflusscytometrisch quantifizierte Fluoreszenz von FITC-markierten MEFL-Kalibrationspartikeln	76
Abbildung 4-5: Nachweis der Influenza A-Virusinfektion in Ethanol-fixierten MDCK-Zellen mit IMAGEN-Antikörpergemisch gegen Influenza A NP und M1 (Schulze-Horsel et al. 2008, modifiziert)	78
Abbildung 4-6: Infektionsverlauf von Influenza-infizierten MDCK-Zellen im 1,0 L-Bioreaktor nach Infektion mit equinem Influenza-Virus (MOI 3,0) und Färbung mit Antikörpergemisch gegen Influenza A NP und M1 (Schulze-Horsel et al. 2008, modifiziert)	80
Abbildung 4-7: Cytometrische Messung von scheininfizierten und infizierten MDCK-Zellen (20 h p.i. mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,5) nach Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A NP, M1 und NP+M1 (Gemisch)	81
Abbildung 4-8: Gewichtete Regression spektrophotometrischer Fluoreszenzmessungen von Fluoreszein-Konzentrationsreihen	84
Abbildung 4-9: Gewichtete Regression spektrophotometrischer Fluoreszenzmessungen von FITC-Konzentrationsreihen (Antikörper-Antikörper-Konjugat)	85
Abbildung 4-10: Verlauf der Konzentration von MDCK-Zellen nach Scheininfektion im 1,2 L-Bioreaktor	95
Abbildung 4-11: Mikroskopische Aufnahmen von MDCK-Zellen auf Microcarriern im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfektion (100x Vergrößerung, mittlerer Durchmesser (d_m) der Cytodex I-Microcarrier: ca. 190 μ m (Bock 2003))	96

Abbildung 4-12: Verlauf der Infektion und Apoptose von MDCK-Zellen nach Scheininfektion im 1,2 L-Bioreaktor	96
Abbildung 4-13: Verhältnis des Anteils apoptotischer Zellen zum Anteil der jeweils betrachteten Zellpopulation an der Gesamtzellpopulation (Apoptoseindex, AI) von MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfektion	98
Abbildung 4-14: Verlauf der Metabolitkonzentrationen von MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Scheininfektion	98
Abbildung 4-15: Mikroskopische Aufnahmen von MDCK-Zellen auf Microcarriern nach Infektion (human A PR/8/34 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor	99
Abbildung 4-16: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor	100
Abbildung 4-17: Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025)	101
Abbildung 4-18: Verlauf der Metabolitkonzentrationen nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor	101
Abbildung 4-19: Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	103
Abbildung 4-20: Verlauf der Infektion und Apoptose in <i>adhärenten</i> MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	104
Abbildung 4-21: Verlauf der Infektion und Apoptose in <i>Überstandszellen</i> nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	105
Abbildung 4-22: Abschätzung der Nukleoprotein-Kopien/Zelle nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor anhand von kalibrierten Cytometriemessungen	107
Abbildung 4-23: DNA-Gehalt von MDCK-Zellen im 5,0 L-Bioreaktor nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025)	108
Abbildung 4-24: Fluoreszenzmikroskopie von trypsinisierten MDCK-Zellen einer Microcarrierkultur nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	109
Abbildung 4-25: Quantifizierung der Caspase-Aktivierung (FLICA) in MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	109
Abbildung 4-26: Verlauf der Metabolitkonzentrationen nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,025) im 5,0 L-Bioreaktor	110

- Abbildung 4-27:** Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter nach Infektion von MDCK-Zellen (human A PR/8/34 H1N1 (*RKI*), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor 111
- Abbildung 4-28:** Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen nach Infektion (human A PR/8/34 H1N1 (*RKI*), MOI 0,025) im 1,2 L-Bioreaktor 111
- Abbildung 4-29:** Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002) im 1,2 L-Bioreaktor 113
- Abbildung 4-30:** Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002) 113
- Abbildung 4-31:** Abschätzung von NP-Kopienzahlen in MDCK-Zellen im 1,2 L-Bioreaktor nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,002) 114
- Abbildung 4-32:** Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter von *Vero*-Zellen nach Infektion (human A WSN/65/05 hgr H3N2, MOI 0,001) im 5,0 L-Bioreaktor 115
- Abbildung 4-33:** Verlauf der Infektion und Apoptose in *Vero*-Zellen nach Infektion (human A WSN/67/05 hgr H3N2, MOI 0,001) im 5,0 L-Bioreaktor 116
- Abbildung 4-34:** Vergleich der Viruskonzentration in MDCK-Fermentationsüberständen nach Infektion mit verschiedenen Influenza-Virusstämmen 119
- Abbildung 4-35:** Schematische Darstellung der Infektion und Apoptose von MDCK-Zellen während der Influenza A-Virusvermehrung (Schulze-Horsel et al. 2009, modifiziert) 125
- Abbildung 4-36:** Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von DMSO bzw. Caspase-Inhibitoren und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten 131
- Abbildung 4-37:** Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von Betain bzw. Zinksulfat und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten 132
- Abbildung 4-38:** Spezifische Virusausbeute nach Zugabe von Gossypol, Valinomycin bzw. Staurosporin und Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001, Ernte 120 h p.i.) in Sechs-Well-Platten 132
- Abbildung 4-39:** Verlauf der MDCK-Zellkonzentration und Virustiter mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Betain nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,002) im 1,2 L-Bioreaktor 133
- Abbildung 4-40:** Verlauf der Infektion und Apoptose in MDCK-Zellen mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Betain nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001) im 1,2 L-Bioreaktor 134

Abbildung 4-41: Verlauf der Zell- und Metabolitkonzentration sowie der Virustiter von MDCK-Zellen mit $1 \mu\text{mol/L}$ *Staurosporin* nach Infektion (human A WSN/67/05 H3N2, MOI 0,001) im 1,2 L-Bioreaktor 134

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Literaturwerte für Monod- bzw. Inhibitionskonstanten der zentralen Metabolite	25
Tabelle 3-1: Serumhaltiges Zellkulturmedium	46
Tabelle 3-2: Serumfreies Viruskulturmedium	46
Tabelle 3-3: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	47
Tabelle 3-4: Trypsin/EDTA-Lösung (10x) für die Zellkultur	47
Tabelle 3-5: Cytometrie-puffer	47
Tabelle 3-6: Verwendete Mengen an PBS, Trypsin und Z-Medium in Kulturflaschen	48
Tabelle 3-7: Verwendete Influenza-Virusstämme	49
Tabelle 3-8: Übersicht über die verwendeten Bioreaktoren	51
Tabelle 3-9: 2 % ige Paraformaldehydlösung	53
Tabelle 3-10: Validierte Arbeitsbereiche YSI 7100 und Bioprofile 100 plus	57
Tabelle 3-11: Messeinstellungen für Varian Cary Eclipse	57
Tabelle 3-12: Färbungslösung zur DNA-Gehaltsbestimmung (für 10 Messungen)	60
Tabelle 3-13: Präzision der Bestimmung der Zellzyklusverteilung und der Apoptose über den DNA-Gehalt von MDCK-Zellen aus einer subkonfluenten statischen Kultur (N=8)	62
Tabelle 3-14: Permeabilisierungspuffer für die Cytometrie	65
Tabelle 3-15: Benzonaselösung für TUNEL-Positivkontrollen (für 1 Probe)	65
Tabelle 3-16: Verwendete Antikörper gegen Influenza A-Proteine	66
Tabelle 4-1: Infektion von MDCK-Zellen mit unterschiedlichem Synthese-Phasenanteil mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (RKI), MOI 0,025 (Sechs-Well-Platten)	72
Tabelle 4-2: Statistische Werte der gewichteten Regression von Fluoreszenzmessungen mit MEFL-Kalibrationspartikeln	76
Tabelle 4-3: Sensitivität der cytometrischen Fluoreszenzmessungen von scheininfizierten und infizierten MDCK-Zellen (20 h p.i. mit Influenza A PR/8/34 H1N1 (NIBSC), MOI 0,5) nach Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen Influenza A NP, M1 und NP+M1 (Gemisch)82	

Tabelle 4-4: Übersicht der aus den spektrophotometrischen und cytometrischen Daten berechneten Fluoreszenzausbeuten	85
Tabelle 4-5: Methoden zur durchflusscytometrischen Quantifizierung der Apoptose	92
Tabelle 4-6: Übersicht der mittleren spezifischen Virusausbeuten der untersuchten Infektionsbedingungen	118
Tabelle 4-7: Modellierungsparameter für die Virusproduktion und Apoptoseinduktion verschiedener Influenza-Viren in MDCK-Zellen (Schulze-Horsel et al. 2009)	122
Tabelle 4-8: Übersicht der zur Apoptosemanipulation verwendeten Substanzen	130
Tabelle 8-1: Verwendete Geräte	179
Tabelle 8-2: Verwendete Chemikalien	181
Tabelle 8-3: Übersicht der Bioreaktorkultivierungen, Zuordnung interner Versuchsbezeichnungen	208

7.3 Literaturverzeichnis

- Abbasi F, Marti GE, Schwarz A, Vogt RF, Gaigalas AK, Wang L. 2002. Quantitating fluorescence intensity from fluorophores: Practical use of MESF values. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 107:339-353.
- Abrahams VM, Kamsteeg M, Mor G. 2003. The Fas/Fas ligand system and cancer: immune privilege and apoptosis. *Mol Biotechnol* 25(1):19-30.
- Agalaridis G. 2007. Produktion von Influenza-Virus in tierischen Zellkulturen: Einfluss der Apoptose auf die Virusausbeute [Bachelor Thesis].
- Al-Rubeai M, Singh RP. 1998. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 9(2):152-156.
- Alberts B, Bray D, Lewis JA, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1995. *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim: VCH.
- Altman SA, Randers L, Rao G. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 9(6):671-674.
- Araki T, Hayashi M, Watanabe N, Kanuka H, Yoshino J, Miura M, Saruta T. 2002. Down-regulation of Mcl-1 by inhibition of the P13-K/Akt pathway is required for cell shrinkage-dependent cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(4):1275-1281.

- Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 22(4):174-180.
- Audsley. 2005. The growth of attenuated influenza vaccine donor strains in continuous cell lines. *Journal of Virological Methods* 123:187-193.
- Bahnemann HG. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 8:299-303.
- Bailey JE, Ollis DF. 1986. *Biochemical engineering fundamentals*. New York: McGraw-Hill. xxi, 984 p. p.
- Bantel H, Schulze-Osthoff K. 2003. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 10 Suppl 1:S48-58.
- Barardi CR, Emslie KR, Vesey G, Williams KL. 1998. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *J Virol Methods* 74(1):31-38.
- Barber GN. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8(2):113-126.
- Bardiya N, Bae JH. 2005. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(3):299-305.
- Baserga R. 1985. *The biology cell reproduction*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- Basler CF, Garcia-Sastre A. 2002. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol* 21(4-5):305-337.
- Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. 2000. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 259(1):308-313.
- Belshe RB, Nichol KL, Black SB, Shinefield H, Cordova J, Walker R, Hessel C, Cho I, Mendelman PM. 2004. Safety, efficacy, and effectiveness of live, attenuated, cold-adapted influenza vaccine in an indicated population aged 5-49 years. *Clin Infect Dis* 39(7):920-927.
- Betenbaugh MJ, Dhurjati P. 1990. Effects of promoter induction and copy number amplification on cloned gene expression and growth of recombinant cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* 589:111-120.
- Bjare U. 1992. Serum-free cell culture. *Pharmacol Ther* 53(3):355-374.
- Blondel B, Autret A, Brisac C, Martin-Latil S, Mousson L, Pelletier I, Estaquier J, Colbere-Garapin F. 2009. Apoptotic signaling cascades operating in poliovirus-infected cells. *Front Biosci* 14:2181-2192.

- Bock A. 2003. Charakterisierung und Modellierung des Wachstums von adhären ten tierischen Zellen in Microcarriersystemen am Beispiel von Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK) [Diplomarbeit]: Universität Magdeburg.
- Bock A, Sann H, Schulze-Horsel J, Genzel Y, Reichl U, Mohler L, Reichl U. 2009. Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures. *Biotechnol Prog* 25(6):1717-1731.
- Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5(1):21-26.
- Bouvier NM, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
- Brands R, Visser J, Medema J, Palache AM, van Scharrenburg GJ. 1999. Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture-based influenza vaccine. *Dev Biol Stand* 98:93-100; discussion 111.
- Brühl P, Kerschbaum A, Kistner O, Barrett N, Dorner F, Gerencer M. 2000. Humoral and cell-mediated immunity to Vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine* 19(9-10):1149-1158.
- Budowsky EI, Bresler SE, Friedman EA, Zheleznova NV. 1981. Principles of selective inactivation of viral genome. I. UV-induced inactivation of influenza virus. *Arch Virol* 68(3-4):239-247.
- Budowsky EI, Friedman EA, Zheleznova NV, Noskov FS. 1991. Principles of selective inactivation of viral genome .6. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of beta-propiolactone. *Vaccine* 9(6):398-402.
- Budowsky EI, Smirnov YA, Shenderovich SF. 1993. Principles of selective inactivation of viral genome .8. The influence of beta-propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. *Vaccine* 11(3):343-348.
- Burleson F.G. CTM, Wiedbrauk D.L. 1992. *Virology - A Laboratory Manual*: Academic Press.
- Calvelli T, Denny TN, Paxton H, Gelman R, Kagan J. 1993. *Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping - a Report from the National-Institute-of-Allergy-and-Infectious-Diseases, Division of Aids*. *Cytometry* 14(7):702-715.
- Campbell JN, Epand RM, Russo PS. 2004. Structural changes and aggregation of human influenza virus. *Biomacromolecules* 5(5):1728-1735.
- Chaibi C, Cotte-Laffitte J, Sandre C, Esclatine A, Servin AL, Quero AM, Geniteau-Legendre M. 2005. Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology* 332(2):480-490.

- Cheung TKW, Poon LLM. 2007. Biology of influenza A virus. *Ann N Y Acad Sci* 1102:1-25.
- Chichester JA, Haaheim LR, Yusibov V. 2009. Using plant cells as influenza vaccine substrates. *Expert Rev Vaccines* 8(4):493-498.
- Chmiel H. 1991a. *Bioprosesstechnik 1*. Stuttgart: G. Fischer.
- Chmiel H. 1991b. *Bioprosesstechnik 2*. Stuttgart: G. Fischer.
- Chu L, Robinson DK. 2001. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 12(2):180-187.
- Chutinimitkul S, Payungporn S, Chieochansin T, Suwannakarn K, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2006. The spread of avian influenza H5N1 virus; a pandemic threat to mankind. *J Med Assoc Thai* 89 Suppl 3:218-233.
- Clancy S. 2008. Genetics of the influenza virus. *Nature Education* 1(1).
- CLSI. 2004. *Fluorescence Calibration and Quantitative Measurement of Fluorescence Intensity*. Approved Guideline. Volume 24 Number 26 ed: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coleman JR. 2007. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology* 4:9.
- Cox MM. 2007. Vaccines in development against avian influenza. *Minerva Med* 98(2):145-153.
- Creighton TE. 1999. *Encyclopedia of molecular biology*. New York: John Wiley. 4 v. (xix, 2856 p.) p.
- Cruz. 1999. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:579-585.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13(8):795-808.
- Darzynkiewicz Z, Juan G. 1997. Unit 7.5: DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Hibbs RA, Orfao A, Rabinovitch PS, Wheelless LL, editors. *Current protocols in cytometry*: Wiley & Sons.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27(1):1-20.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F. 1998. Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 62:33-73.

- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR. 1982. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 42(3):799-806.
- Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2(10):955-961.
- Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiappini B, De Marco MA, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G. 2006. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis* 6:87.
- Diaz MO, Ziemin S, Beau MML, Pitha P, Smith SD, Chilcote RR, Rowley JD. 1988. Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14):5259-5263.
- Ding N, Wu N, Xu Q, Chen K, Zhang C. 2009. Molecular evolution of novel swine-origin A/H1N1 influenza viruses among and before human. *Virus Genes* 39(3):293-300.
- Doroshenko A, Halperin SA. 2009. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines* 8(6):679-88.
- Draper NR, Smith H. 1981. Applied regression analysis. New York: Wiley. xiv, 709 p. p.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68:383-424.
- ECDC. 2009. European Center for Disease Control and Prevention. http://ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/influenza/ (04.04.2009)
- Ehrhardt C, Marjuki H, Wolff T, Nürnberg B, Planz O, Pleschka S, Ludwig S. 2006. Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol* 8(8):1336-1348.
- Eichelberger M, Golding H, Hess M, Weir J, Subbarao K, Luke CJ, Friede M, Wood D. 2008. FDA/NIH/WHO public workshop on immune correlates of protection against influenza A viruses in support of pandemic vaccine development, Bethesda, Maryland, US, December 10-11, 2007. *Vaccine* 26(34):4299-4303.
- Emoto Y. 2008. Cellular aggregation facilitates anoikis in MDCK cells. *J Physiol Sci* 58(6):371-380.
- Engelhardt OG, Fodor E. 2006. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol* 16(5):329-345.

- Fadeel B, Orrenius S. 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258(6):479-517.
- Ferris MM, McCabe MO, Doan LG, Rowlen KL. 2002. Rapid enumeration of respiratory viruses. *Anal Chem* 74(8):1849-1856.
- Fesq H, Bacher M, Nain M, Gemsa D. 1994. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. *Immunobiology* 190(1-2):175-182.
- Figueroa B, Ailor E, Osborne D, Hardwick JM, Reff M, Betenbaugh MJ. 2007. Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering* 97(4):877-892.
- Figueroa B, Ailor E, Reff M, Hardwick JM, Betenbaugh MJ. 2005. Enhanced cell culture performance using anti-apoptotic genes during the production of monoclonal antibodies. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 229:U242-U242.
- Figueroa B, Chen SL, Oyler GA, Hardwick JM, Betenbaugh MJ. 2004. Aven and Bcl-X-L enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 85(6):589-600.
- Fisher J, Pepper C. 2009. *Logarithmic Amplification. An Introduction to Flow Cytometry*: Cardiff University, School of Medicine.
- Fislova T, Kostolansky F. 2005. The factors of virulence of influenza a virus. *Acta Virologica* 49(3):147-157.
- Frazzatti-Gallina NM, Mourao-Fuches RM, Paoli RL, Silva MLN, Miyaki C, Valentini EJJ, Raw I, Higashi HG. 2004. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine* 23(4):511-517.
- Freshney RI. 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss. 642 p.
- Frisch SM, Francis H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* 124(4):619-626.
- Frisch SM, Screaton RA. 2001. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology* 13(5):555-562.
- Gaigalas AK, Wang LL, Schwartz A, Marti GE, Vogt RF. 2005. Quantitating fluorescence intensity from fluorophore: Assignment of MESF values. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 110(2):101-114.

- Ganju N, Eastman A. 2003. Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c release induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell Death Differ* 10(6):652-661.
- Garcia-Sastre A. 2001. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279(2):375-384.
- Gaush CR, Hard WL, Smith TF. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 122(3):931.
- Gaush CR, Smith TF. 1968. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* 16(4):588-594.
- Geisse S, Fux C. 2009. Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. *Methods Enzymol* 463:223-238.
- Genzel Y, Behrendt I, Koenig S, Sann H, Reichl U. 2004a. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 22(17-18):2202-2208.
- Genzel Y, Dietzsch C, Rapp E, Schwarzer J, Reichl U. 2010. MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(2):461-475.
- Genzel Y, Fischer M, Reichl U. 2006a. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 24(16):3261-3272.
- Genzel Y, König S, Reichl U. 2004b. Amino acid analysis in mammalian cell culture media containing serum and high glucose concentrations by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry* 335(1):119-125.
- Genzel Y, Olmer RM, Schaefer B, Reichl U. 2006b. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine* 24(35-36):6074-6087.
- Genzel Y, Reichl U. 2009. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Revies of Vaccines* 8(12):1681-1892.
- Genzel Y, Ritter JB, König S, Alt R, Reichl U. 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology Progress* 21(1):58-69.

- Gerdil C. 2003. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21(16):1776-1779.
- Ghendon Y. 1992. Influenza - its impact and control. *World Health Stat Q* 45(2-3):306-311.
- Gilchrist M, Coombs D, Perelson A. 2004. Optimizing within-host viral fitness: infected cell lifespan and virion production rate. *Journal of Theoretical Biology* 229(2):281-288.
- Givan AL. 2001. *Flow cytometry : first principles*. New York: Wiley. 273 p.
- Glacken MW, Adema E, Sinskey AJ. 1988. Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: I. Initial metabolic rates. *Biotechnol Bioeng* 32(4):491-506.
- Glacken MW, Fleischaker RJ, A.J S. 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control - Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotech Bioeng* 28:1376-1389.
- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 218(2):314-319.
- Govorkova. 1996. African Green Monkey Kidney (Vero) Cells Provide an Alternative Host Cell System for Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology*:5519-5524.
- Govorkova EA, Kodihalli S, Alyмова IV, Fanget B, Webster RG. 1999. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev Biol Stand* 98:39-51.
- Grabarek J, Ardelt B, Kunicki J, Darzynkiewicz Z. 2002. Detection of in situ activation of transglutaminase during apoptosis: correlation with the cell cycle phase by multiparameter flow and laser scanning cytometry. *Cytometry* 49(2):83-89.
- Grimm D, Staeheli P, Hufbauer M, Koerner I, Martinez-Sobrido L, Solirzano A, Garcia-Sastre A, Haller O, Kochs G. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16):6806-6811.
- Häggsström L. 2000. *Animal Cell Metabolism*. In: Spier RE, editor. *Encyclopedia of cell technology*: Wiley.
- Hallstrom TC, Nevins JR. 2009. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* 8(4):532-535.
- Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246(4930):629-634.
- Hawboldt. 1994a. Cell cycle dynamics of microcarrier cultures. *Journal of Biotechnology* 34:133-147.

- Hawboldt. 1994b. A Cellular Automaton Model for Microcarrier Cultures. *Biotech Bioeng* 43:90-100.
- Healthcare GE. 2005. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*.
- Hechtfisher A, Marschall M, Helten A, Boswald C, Meier-Ewert H. 1997. A highly cytopathogenic influenza C virus variant induces apoptosis in cell culture. *Journal of General Virology* 78:1327-1330.
- Heynisch B, Frensing T, Heinze K, Seitz C, Genzel Y, Reichl U. 2010. Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/PR/8/34 (H1N1) in MDCK cells. *Vaccine* [Epub ahead of print].
- Higuchi K. 1973. Cultivation of animal cells in chemically defined media, a review. *Adv Appl Microbiol* 16:111-136.
- Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D. 1994. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *Journal of Virology* 68(6):3667-3673.
- Hirst GK. 1941. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* 71(1):49-64.
- Hoffmann H, Palese P, ML S. 2008. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antiviral Research* 80(2):124-134.
- Hopps HE, Bernheim BC, Nisalak A, Tjio JH, Smadel JE. 1963. Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. *Journal of Immunology* 91:416-424.
- Horimoto T, Kawaoka Y. 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3(8):591-600.
- Horio M, Ito A, Matsuoka Y, Moriyama T, Orita Y, Takenaka M, Imai E. 2001. Apoptosis induced by hypertonicity in Madin Darley canine kidney cells: protective effect of betaine. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16(3):483-490.
- Hornickova Z. 1997. Different progress of MDCK cell death after infection by two different influenza virus isolates. *Cell Biochemistry and Function* 15(2):87-93.
- Howard M, Kistner O, Barrett P. 2008. Pre-clinical development of cell culture (Vero)-derived H5N1 pandemic vaccines. *Biological Chemistry* 389(5):569-577.
- Howard MK, Burke LC, Mailhos C, Pizzey A, Gilbert CS, Lawson WD, Collins MK, Thomas NS, Latchman DS. 1993. Cell cycle arrest of proliferating neuronal cells by serum deprivation can result in either apoptosis or differentiation. *J Neurochem* 60(5):1783-1791.

- Hulskotte EGJ, Dings MEM, Norley SG, Osterhaus ADME. 1997. Chemical inactivation of recombinant vaccinia viruses and the effects on antigenicity and immunogenicity of recombinant simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Vaccine* 15(17-18):1839-1845.
- Hundt B, Best C, Schlawin N, Kassner H, Genzel Y, Reichl U. 2007. Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave Bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale. *Vaccine* 25(20):3987-3995.
- Huprikar J, Rabinowitz S. 1980. A simplified plaque assay for influenza viruses in Madin-Darby kidney (MDCK) cells. *J Virol Methods* 1(2):117-120.
- Ibarra N, Watanabe S, Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. 2003. Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NS0 cells. *Biotechnol Prog* 19(1):224-228.
- Inai Y, Yabuki M, Kanno T, Akiyama J, Yasuda T, Utsumi K. 1997. Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential. *Cell Struct Funct* 22(5):555-563.
- Isbarn S, Buckow R, Himmelreich A, Lehmacher A, Heinz V. 2007. Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection* 70(3):667-673.
- Ishikawa K, Ishii H, Saito T. 2006. DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA Cell Biol* 25(7):406-411.
- Ito M, Ikegami M, Shiroki K, Tagaya I. 1964. Studies on the Multiplication of Simian Virus 40 (Vasculating Virus) by Means of Fluorescent Antibody Technique. *Jpn J Med Sci Biol* 17:179-193.
- Janda JM, Davis AR, Nayak DP, De BK. 1979. Diversity and generation of defective interfering influenza virus particles. *Virology* 95(1):48-58.
- Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF, Traylor RS, Grant S. 1994. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 54(7):1707-1714.
- Jayaraman S. 2003. Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry A* 56A(2):104-112.
- Jeon S, Piao Y, Choi K, Hong F, Baek H, Kang I, Ha J, Kim S, Chang S. 2005. Prednisolone suppresses cyclosporin A-induced apoptosis but not cell cycle arrest in MDCK cells. *Arch Biochem Biophys* 435(2):382-392.

- Kaerber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162:480-483.
- Kalbfuss B, Genzel G, Wolff MW, Zimmermann A, Morenweiser R, Reichl U. 2007a. Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines. *Biotechnology and Bioengineering* 97(1):73-85.
- Kalbfuss B, Knochlein A, Krober T, Reichl U. 2008. Monitoring influenza virus content in vaccine production: precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals* 36(3):145-161.
- Kalbfuss B, Wolff M, Morenweiser R, Reichl U. 2007b. Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 96(5):932-944.
- Kash JC, Goodman AG, Korth MJ, Katze MG. 2006. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Res* 119(1):111-120.
- Katze MG, He Y, Gale M. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2(9):675-687.
- Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. 2008. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* 44(3):262-272.
- Kaverin NV, Rudneva IA, Kolodkina VL, Smirnov Yu A. 1982. Autocomplementation of influenza virus defective interfering particles: cells at high multiplicity infected with defective interfering particles produce defective virions. *Acta Virol* 26(6):512-516.
- Keech M, Beardsworth P. 2008. The impact of influenza on working days lost: a review of the literature. *Pharmacoeconomics* 26(11):911-924.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis - basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4):239-257.
- Kim JH, Lim HS, Peshwa MV, Hu WS. Characterisation of cell growth and improvement of attachment kinetics on macroporus microcarrier. In: Murakami H, S. S, H. T, editors; 1991. Kluwer Academic Publishers. p 77-80.
- Kim M-J, Latham AG, Krug RM. 2002. Human influenza viruses activate an interferon-independent transcription of cellular antiviral genes: outcome with influenza A virus is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15):10096-10101.
- King DJ. 1991. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle-Disease virus and avian Influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases* 35(3):505-514.

- Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. 1998. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 16(9-10):960-968.
- Kistner O, Crowe B, Wodal W, Kerschbaum A, Savidis-Dacho H, Sabarth N, Falkner F, Mayerhofer I, Mundt W, Reiter M and others. 2010. A whole virus pandemic influenza H1N1 vaccine is highly immunogenic and protective in active immunization and passive protection mouse models. *PLoS One* 5(2).
- Ko CH, Shen SC, Yang LY, Lin CW, Chen YC. 2007. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 121(8):1670-1679.
- Koerner I, Kochs G, Kalinke U, Weiss S, Staeheli P. 2007. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J Virol* 81(4):2025-2030.
- Krakauer DC, Payne RJH. 1997. The evolution of virus-induced apoptosis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological sciences* 264(1389):1757-1762.
- Kreijtz JH, Suezzer Y, van Amerongen G, de Mutsert G, Schnierle BS, Wood JM, Kuiken T, Fouchier RA, Lower J, Osterhaus AD and others. 2007. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *J Infect Dis* 195(11):1598-1606.
- Krishan A. 1975. Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian-Cell Cycle by Propidium Iodide Staining. *Journal of Cell Biology* 66(1):188-193.
- Kroemer G. 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3):433-435.
- Krug M. 1989. The influenza viruses. M K, editor: Plenum Press, New York, London.
- Kuiken T, Taubenberger JK. 2008. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4:D59-66.
- Kulms D, Schwarz T. 2000. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16(5):195-201.
- Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A. 1999. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *International Journal of Molecular Medicine* 3(5):527-530.
- Kusenda J. 2008. Quantitative identification of blood cell markers in human hematopoietic malignancies with diagnostic and prognostic significance. *Neoplasma (Bratislava)* 55(5):381-386.
- Lamb RA, Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4 ed: Lippincott Williams & Wilkins.

- Lee CW, Suarez DL. 2004. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods* 119(2):151-158.
- Lee MS, Kim Y-J. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 76:447-480.
- Leelavatcharamas V, Emery AN, Al-Rubeai M. 1999. Use of cell cycle analysis to characterise growth and interferon-gamma production in perfusion culture of CHO cells. *Cytotechnology* 30(1-3):59-69.
- Li X, Darzynkiewicz Z. 2000. Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp Cell Res* 255(1):125-132.
- Lin C, Holland RE, Donofrio JC, McCoy MH, Tudor LR, Chambers TM. 2002. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Vet Microbiol* 84(4):357-365.
- Lin CB, Zimmer SG, Lu ZJ, Holland RE, Dong Q, Chambers TM. 2001. The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology* 287(1):202-213.
- Lloyd D, Holmes P, Jackson L, Emery A, Al-Rubeai M. 2000. Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* 34(1-2):59-70.
- Lockshin RA, Williams CM. 1965. Programmed Cell Death - I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11:123-133.
- Lodish HF. 2000. *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman.
- Lohr V, Rath A, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. 2009. New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: studies on growth, metabolism and virus propagation. *Vaccine* 27(36):4975-4982.
- Lombardi ME, Ladman BS, Alphin RL, Benson ER. 2008. Inactivation of avian influenza virus using common detergents and chemicals. *Avian Dis* 52(1):118-123.
- Lonsdale R, Pau MG, Oerlemans M, Ophorst C, Vooyes A, Havenga M, Goudsmit J, UytdeHaag F, Marzio G. 2003. A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry. *J Virol Methods* 110(1):67-71.
- Lowy RJ. 2003. Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *International Review of Immunology* 22(5-6):425-449.

- Ludwig S, Pleschka S, Planz O, Wolff T. 2006. Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol* 8(3):375-386.
- Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. 1999. A fatal relationship-influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunol* 12(3):175-196.
- Luyckx DMAM, Casteleijn MG, Jiskoot W, Westdijk J, Jongen PM. 2004. Physicochemical studies on the stability of influenza haemagglutinin in vaccine bulk material. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(1):65-75.
- Mabrouk T, Ellis RW. 2002. Influenza vaccine technologies and the use of the cell-culture process (cell-culture influenza vaccine). In: Brown F, Gust I, editors. *Orphan Vaccines - Bridging the gap: Dev Biol (Basel)*. p 125-134.
- Macey MG. 2007. *Flow cytometry : principles and applications*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Machida H, Kuninaka A, Yoshino H. 1980. Susceptibility of influenza viruses to interferon and to poly(I) . Poly(C) determined by the plaque reduction method. *Microbiol Immunol* 24(8):725-731.
- Magnard C, Valette M, Aymard M, Lina B. 1999. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 59(2):215-20.
- Mahy B, Kangro H. 1996. *Virology Methods Manual*: Academic Press.
- Mäntele W. 1998. *Spektroskopie*. In: Lottspeich F, Zorbas H, editors. *Bioanalytik*. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Marcus PI, Ngunjiri JM, Sekellick MJ. 2009. Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles. *J Virol* 83(16):8122-8130.
- Marcus PI, Rojek JM, Sekellick MJ. 2005. Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *J Virol* 79(5):2880-2890.
- Mastrangelo AJ, Betenbaugh MJ. 1998. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends in Biotechnology* 16(2):88-95.
- McKenna SL, Cotter TG. 1997. Functional aspects of apoptosis in hematopoiesis and consequences of failure. *Adv Cancer Res* 71:121-164.
- McKenna SL, Cotter TG. 2000. Inhibition of caspase activity delays apoptosis in a transfected NS/0 myeloma cell line. *Biotechnol Bioeng* 67(2):165-176.
- McKinney LC, Galliger SJ, Lowy RJ. 2003. Active and inactive influenza virus induction of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in J774.1 murine macrophages:

- modulation by interferon-gamma and failure to induce apoptosis. *Virus Res* 97(2):117-126.
- McLean JE, Ruck A, Shirazian A, Pooyaei-Mehr F, Zakeri ZF. 2008. Viral manipulation of cell death. *Curr Pharm Des* 14(3):198-220.
- McTaggart S, Al-Rubeai M. 2001. Relationship between cell proliferation, cell-cycle phase, and retroviral vector production in FLYRD18 human packaging cells. *Biotechnol Bioeng* 76(1):52-60.
- Meignier B. 2001. Industrial experience with live polio vaccine prepared on the Vero continuous cell line. *Dev Biol (Basel)* 106:341-342.
- Mendonca. 1999. Attachment, spreading and growth of Vero cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures. *Bioprocess Engineering* 20:565-571.
- Mersich SE, Baumeister EG, Riva D, Lewis AP, Cadario ME, Pontoriero AV, Savy VL. 2004. Influenza circulating strains in Argentina exhibit differential induction of cytotoxicity and caspase-3 in vitro. *J Clin Virol* 31(2):134-139.
- Merten OW. 2000. Cell Detachment. In: Spier RE, editor. New York, USA: John Wiley & Sons. p 351-365.
- Merten OW, Hannoun C, Manuguerra JC, Ventre F, Petres S. 1996. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Adv Exp Med Biol*:141-151.
- Merten OW, Litwin J. 1991. Serum-free medium for fermentor cultures of hybridomas. *Cytotechnology* 5(1):69-82.
- Mikulasova A, Vareckova E, Fodor E. 2000. Transcription and replication of the influenza A virus genome. *Acta Virol* 44(5):273-282.
- Mischo HE, Hemmerich P, Grosse F, Zhang S. 2005. Actinomycin D induces histone gamma-H2AX foci and complex formation of gamma-H2AX with Ku70 and nuclear DNA helicase II. *J Biol Chem* 280(10):9586-9594.
- Mladenov E, Tsaneva I, Anachkova B. 2007. Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *J Cell Physiol* 211(2):468-476.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. 2002. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 734 S. p.
- Mogensen TH, Paludan SR. 2001. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(1):131-150.
- Möhler L. 2006. Segregierte mathematische Modelle zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und zur Influenza Virus Replikation. Magdeburg: Otto-von-Guericke-Universität.

- Möhler L, Bock A, Reichl U. 2008. Segregated Mathematical Model for Growth of Anchorage-Dependent MDCK Cells in Microcarrier Culture. *Biotechnology Progress* 24(1):110-119.
- Möhler L, Flockerzi D, Sann H, Reichl U. 2005. Mathematical model of influenza A virus production in large-scale microcarrier culture. *Biotech Bioeng* 90(1):46-58.
- Mohsin MA, Morris SJ, Smith H, Sweet C. 2002. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations. *Virus Research* 85(2):123-131.
- Montagnon BJ. 1989. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev Biol Stand* 70:27-47.
- Montagnon BJ, Vincent-Falquet JC, Saluzzo JF. 1999. Experience with vero cells at Pasteur Merieux Connaught. *Dev Biol Stand* 98:137-40; discussion 167.
- Monto AS. 2008. Epidemiology of influenza. *Vaccine* 26 Suppl 4:D45-8.
- Morgeaux S, Tordo N, Gontier C, Perrin P. 1993. Beta-propiolactone treatment impairs the biological activity of residual DNA from BHK-21 cells infected with rabies virus. *Vaccine* 11(1):82-90.
- Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. 1995. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 11):2869-2873.
- Morris SJ, Smith H, Sweet C. 2002. Exploitation of the Herpes simplex virus translocating protein VP22 to carry influenza virus proteins into cells for studies of apoptosis: direct confirmation that neuraminidase induces apoptosis and indications that other proteins may have a role. *Arch Virol* 147(5):961-79.
- Müller T, Schulze-Horsel J, Sidorenko Y, Reichl U, Kienle A. Population balance modeling of influenza virus replication in MDCK cells during vaccine production. In: Braunschweig B, Joulia X, editors; 2008. Elsevier. p 133-138.
- Mueller T, Schulze-Horsel J, Sidorenko Y, Reichl U, Kienle A. Population balance modeling of influenza virus replication in MDCK cells during vaccine production. In: Bertrand Braunschweig XaJ, editor. *Computer-Aided Chemical Engineering*; 2008 jun; Amsterdam. Elsevier. p 133-138.
- Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M and others. 2008. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *Journal of Virology* 82(21):10502-10509.

- Mutzall K. 1993. Einführung in die Fermentationstechnik. Hamburg: Behr's Verlag.
- Nakajima K, Fujimoto K, Yaoita Y. 2005. Programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Semin Cell Dev Biol* 16(2):271-280.
- Naumann M. 2001. Host cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. *Int J Med Microbiol* 291(4):299-305.
- Nayak DP. 1980. Defective interfering influenza viruses. *Annu Rev Microbiol* 34:619-644.
- Nayak DP, Chambers TM, Akkina RK. 1985. Defective-interfering (DI) RNAs of influenza viruses: origin, structure, expression, and interference. *Curr Top Microbiol Immunol* 114:103-151.
- Nayak DP, Hui EK-W, Barman S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106(2):147-165.
- Nayak DP, Lehmann S, Reichl U. 2005. Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. *Journal of Chromatography B* 823(2):75-81.
- Neermann J, Wagner R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol* 166(1):152-169.
- Nencioni L, De Chiara G, Sgarbanti R, Amatore D, Aquilano K, Marocci ME, Serafino A, Torcia M, Cozzolino F, Ciriolo MR and others. 2009. Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication. *J Biol Chem* 284(23):16004-16015.
- Ng Y, Berry J, Butler M. 1996. Optimization of Physical Parameters for Cell Attachment and Growth on Macroporous Microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering* 50:627-635.
- Ngunjiri JM, Sekellick MJ, Marcus PI. 2008. Clonogenic assay of type a influenza viruses reveals noninfectious cell-killing (apoptosis-inducing) particles. *J Virol* 82(6):2673-2680.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 22(8):299-306.
- Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. 2003. Influenza. *Lancet* 362(9397):1733-45.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. 1991. A rapid and simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139(2):271-279.
- Nielsen J. 1998. Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotech Bioeng* 58(2-3):125-132.

- Ohyama K, Nishina M, Yuan B, Bessho T, Yamakawa T. 2003. Apoptosis induced by influenza virus-hemagglutinin stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26(2):141-147.
- Olsen CW, Kehren JC, DybdahlSissoko NR, Hinshaw VS. 1996. bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *Journal of Virology* 70(1):663-666.
- Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, Suga K. 1992. Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol Bioeng* 39(5):556-564.
- Opitz L, Salaklang J, Büttner H, Reichl U, Wolff MW. 2007. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. *Vaccine* 25:939-947.
- Opitz L, Zimmermann A, Lehmann S, Genzel Y, Lübben H, Reichl U, Wolff MW. 2008. Capture of cell culture-derived influenza virus by lectins: strain independent, but host cell dependent. *J Virol Methods* 154(1-2):61-68.
- Ormerod MG, Payne AW, Watson JV. 1987. Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry* 8(6):637-641.
- Oyadomari S, Araki E, Mori M. 2002. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7(4):335-345.
- Ozturk SS. 1999. Ammonia Toxicity, Animal Cells. In: Flickinger MC, editor. *Encyclopedia of bioprocess technology*. New York: Wiley. p 121-135.
- Ozturk SS, Palsson BO. 1990. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnol Prog* 6(2):121-128.
- Palache AM, Brands R, van Scharrenburg GJ. 1997. Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs. *J Infect Dis* 176 Suppl 1:S20-3.
- Patriarca P. 2007. Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines: An Appraisal of Technical, Manufacturing, and Regulatory Considerations. Geneva: WHO, Initiative for Vaccine Research. 1-12 p.
- Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. 2001. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 19(17-19):2716-2721.
- Petch D, Butler M. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J Cell Physiol* 161(1):71-76.

- Petricciani JC. 1999. Cell substrates: lessons learned and challenges remaining. *Dev Biol Stand* 100:57-63.
- Pharmacia. 2005. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*.
- Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, Ludwig S. 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology* 3(3):301-305.
- Pollard TD, Earnshaw WC. 2002. *Cell biology*. Philadelphia: Saunders. xiv, 805 p.
- Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z. 2003. Cytometry of apoptosis. Unit 7.19, Basic Protocol 7: DNA fragmentation: Detection of DNA strand breaks (TUNEL assay). In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Hibbs RA, Orfao A, Rabinovitch PS, Wheelless LL, editors. *Current protocols in cytometry*: Wiley & Sons.
- Price GE, Smith H, Sweet C. 1997. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence. *Journal of General Virology* 78:2821-2829.
- Pschyrembel W, Hildebrandt H. 1998. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Berlin: de Gruyter. 1745 S. p.
- Purvis N, Stelzer G. 1998. Multi-platform, multi-site instrumentation and reagent standardization. *Cytometry* 33(2):156-165.
- Qiu J. 2010. Apoptosis pathway. <http://www.hixonparvo.info/apoptosis.jpg> (06.07.2010)
- Raff M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* 396(6707):119-122.
- Raffael A, Nebe CT, Valet G. 1994. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G, editors. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer-Verlag.
- Rahman M. 2006. *Introduction to flow cytometry*. Oxford, U.K.: AbD Serotec.
- Ramirez OT, Mutharasan R. 1990. Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 36:839-848.
- Rathmell JC, Thompson CB. 2002. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl:S97-107.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 53(3-4):350-360.
- Rimmelzwaan GF, Baars M, Claas ECJ, Osterhaus ADME. 1998. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and

- immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J Virol Methods* 74(1):57-66.
- Rimmelzwaan GF, Sutter G. 2009. Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Expert Rev Vaccines* 8(4):447-454.
- Rindler MJ, Chuman LM, Shaffer L, Saier MH, Jr. 1979. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J Cell Biol* 81(3):635-648.
- Ritter JB, Genzel Y, Reichl U. 2008. Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design. *Anal Biochem* 373(2):349-369.
- RKI. 2009. Influenza, Pandemieplanung, Vogelgrippe. http://www.rki.de/cln_100/nn_196658/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/IPV__Node.html?__nnn=true (06.07.2010)
- Roberts PL, Lloyd D. 2007. Virus inactivation by protein denaturants used in affinity chromatography. *Biologicals* 35(4):343-347.
- Roose K, Fiers W, Saelens X. 2009. Pandemic preparedness: Toward a universal influenza vaccine. *Drug News Perspect* 22(2):80-92.
- Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. 2001. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Current Biology* 11(23):1847-1857.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14(4):778-809.
- Sandig V, Jordan I; 2005 30.11.2004. Immortalized avian cell lines for virus production. Germany (Patent).
- Saria A, Lundberg JM. 1983. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods* 8(1):41-49.
- Schimenti KJ, Jacobberger JW. 1992. Fixation of mammalian cells for flow cytometric evaluation of DNA content and nuclear immunofluorescence. *Cytometry* 13(1):48-59.
- Schlee D, Kleber H-P. 1991. *Biotechnologie*. Schlee D, Kleber H-P, editors. Jena: Gustav Fischer Verlag. 1096 p.
- Schlegel HG. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme. XIV, 634 S. p.
- Schmid I, Schmid P, Giorgi JV. 1988. Conversion of logarithmic channel numbers into relative linear fluorescence intensity. *Cytometry* 9(6):533-538.
- Schmitt H, Gregersen J, Trusheim H, Bröker M. 2010. Safety of cell culture-based influenza vaccines. *Med Monatsschr Pharm* 33(1):4-10.
- Scholtissek C. 1994. Source for influenza pandemics. *Eur J Epidemiol* 10(4):455-458.

- Schorl C, Sedivy JM. 2007. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods* 41(2):143-150.
- Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y, Hinshaw VS. 2001. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *Journal of Virology* 75(17):7875-7881.
- Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol* 70(12):8624-8629.
- Schulze-Horsel J, Genzel Y, Reichl U. Monitoring cell physiology in influenza vaccine production by flow cytometry. In: Smith R, editor. *Cell Technology Processes for Cell Products*; 2005; Harrogate, UK. Springer. p 531-533.
- Schulze-Horsel J, Genzel Y, Reichl U. 2008. Flow cytometric monitoring of influenza A virus infection in MDCK cells during vaccine production. *Biomedcentral Biotechnology* 8:45.
- Schulze-Horsel J, Schulze M, Agalaridis G, Genzel Y, Reichl U. 2009. Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling. *Vaccine* 27(20):2712-2722.
- Schulze M. 2007. *Influenza-Virusproduktion in tierischen Zellkulturen: Untersuchungen zur Zellphysiologie [Diplomarbeit]*: TU Berlin.
- Schwartz A, Gaigalas AK, Wang L, Marti GE, Vogt RF, Fernandez-Repollet E. 2004. Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytometry B Clin Cytom* 57(1):1-6.
- Schwartz A, Wang L, Early E, Gaigalas A, Zhang YZ, Marti GE, Vogt RF. 2002. Quantitating fluorescence intensity from fluorophore: The definition of MESF assignment. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 107(1):83-91.
- Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. 2009. Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* 27(32):4325-4336.
- Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ, Jr., Marine WM. 1971. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med* 127(6):1037-1041.
- Seamer LC, Bagwell CB, Barden L, Redelman D, Salzman GC, Wood JC, Murphy RF. 1997. Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0. *Cytometry* 28(2):118-122.

- Seitz C, Frensing T, Kochs G, Hoepfer D, Reichl U. 2010. High yields of Influenza A virus in MDCK cells are promoted by an insufficient IFN-induced antiviral state. *Journal of General Virology* 91:1754-1763.
- Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. 2001. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol* 75(19):9517-9525.
- Shapiro HM. 2003. *Practical flow cytometry*. New York: Wiley-Liss. 1, 681 p.
- Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, Lindstrom S, Gubareva LV, Deyde V, Garten RJ and others. 2009. Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 360(25):2616-2625.
- Shinohara K, Oka T. 1994. Protein synthesis inhibitor phase shifts vasopressin rhythms in long-term suprachiasmatic cultures. *Neuroreport* 5(16):2201-2204.
- Shoji Y, Chichester JA, Bi H, Musiychuk K, de la Rosa P, Goldschmidt L, Horsey A, Ugulava N, Palmer GA, Mett V and others. 2008. Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. *Vaccine* 26(23):2930-2934.
- Shidorenko Y, Reichl U. 2004. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotech Bioeng* 88(1):1-14.
- Shidorenko Y, Schulze-Horsel J, Voigt A, Reichl U, Kienle A. 2008a. Stochastic Population Balance Modeling of Influenza Virus Replication in Vaccine Production Processes. *Chemical Engineering Science* 63:157-169.
- Shidorenko Y, Voigt A, Schulze-Horsel J, Reichl U, Kienle A. 2008b. Stochastic Population Balance Modeling of Influenza Virus Replication in Vaccine Production Processes. II. Detailed Description of the Replication Mechanism. *Chemical Engineering Science* 63(8):2299-2304.
- Sieczkarski SB, Brown HA, Whittaker GR. 2003. Role of Protein Kinase C β II in Influenza virus entry via late endosomes. *Journal of Virology* 77(1):460-469.
- Simonsen CC, McGrogan M. 1994. The molecular biology of production cell lines. *Biologicals* 22(2):85-94.
- Singh R, Al-Rubeai M. 1998. Apoptosis and bioprocess technology. In: T S, editor. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*: Springer. p 167-184.
- Sjoberg R, Nygren J, Kubista M. 1995. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 51:L7-L21.

- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S and others. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459(7250):1122-1125.
- Spier R. 2000. *Encyclopedia of cell technology*. New York: John Wiley. 2 v., xix, 1249 p.
- Steele-Mortimer OA, Meier-Ewert H, Loser R, Hasmann MJ. 1990. Flow cytometric analysis of virus-infected cells and its potential use for screening antiviral agents. *J Virol Methods* 27(3):241-52.
- Stein G, van Wijnen A, Stein J, Lian J, Owen T. 2002. Cell cycle. *Encyclopedia of Life Sciences: Wiley & Sons*.
- Stein GS. 1999. *The molecular basis of cell cycle and growth control*. New York: Wiley-Liss. x, 389 p.
- Storhas W. 1994. *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen: ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender*. Braunschweig [u.a.]: Vieweg. XIX, 377 p.
- Stryer L. 1996. *Biochemie*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl. XXXV, 1125 p.
- Suphaphiphat P, Keiner B, Trusheim H, Crotta S, Tuccino A, Zhang P, Dormitzer P, Mason P, Franti M. 2010. Human RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus in canine cells. *Journal of Virology* 84(7):3721-3725.
- Takada A, Kuboki N, Okazaki K, Ninomiya A, Tanaka H, Ozaki H, Itamura S, Nishimura H, Enami M, Tashiro M and others. 1999. Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *Journal of Virology* 73(10):8303-8307.
- Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. 1993. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 11):2347-2355.
- Takizawa T, Tatematsu C, Nakanishi Y. 1999a. Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) fused to green fluorescent protein induces apoptosis of human embryonic kidney cells: possible role in the Fas signaling pathway. *J Biochem* 125(2):391-398.
- Takizawa T, Tatematsu C, Ohashi K, Nakanishi Y. 1999b. Recruitment of apoptotic cysteine proteases (caspases) in influenza virus-induced cell death. *Microbiology and Immunology* 43(3):245-252.
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135(2):397-402.

- Tennant JR. 1964. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation* 2:685-694.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312-1316.
- Tilburt JC, Mueller PS, Ottenberg AL, Poland GA, Kioenig BA. 2008. Facing the challenges of influenza in healthcare settings: the ethical rationale for mandatory seasonal influenza vaccination and its implications for future pandemics. *Vaccine* 26 Suppl 4:D27-30.
- Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M. 1975. Plaque Assay and Primary Isolation of Influenza A Viruses in an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK) in the Presence of Trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.*:9-14.
- Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. 2001. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 19(25-26):3444-3450.
- Trifonov V, Khiabani H, Greenbaum B, Rabadan R. 2009. The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill* 14(17).
- Truyen U, Parrish CR. 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 66(9):5399-5408.
- Ueda N, Shah SV. 1994. Apoptosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 124(2):169-177.
- United States Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research. 2004. Guidelines for industry: PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance.1-15.
- van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. 2001. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 39(1):196-200.
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31(1):1-9.
- Van Ewijk W, Van Soest PL, Verkerk A, Jongkind JF. 1984. Loss of antibody binding to prefixed cells: fixation parameters for immunocytochemistry. *Histochem J* 16(2):179-193.
- van Wezel AL. 1967. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature* 216(5110):64-65.

- Varani J, Inman DR, Fligiel SE, Hillegas WJ. 1993. Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. *Cytotechnology* 13(2):89-98.
- Varani J, Piel F, Josephs S, Beals TF, Hillegas WJ. 1998. Attachment and growth of anchorage-dependent cells on a novel, charged-surface microcarrier under serum-free conditions. *Cytotechnology* 28(1-3):101-109.
- Vester D, Rapp E, Gade D, Genzel Y, Reichl U. 2009. Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines. *Proteomics* 9(12):3316-3327.
- Vester D, Rapp E, Kluge S, Genzel Y, Reichl U. 2010. Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: A proteomic approach. *Journal of Proteomics Elektronische Vorabveröffentlichung*.
- Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish CR. 2004. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol* 78(13):6709-6714.
- Voeten JTM, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Claas ECJ. 1999. Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* 17(15-16):1942-1950.
- Wahl A, Sidorenko Y, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. 2008. Metabolic flux model for an anchorage-dependent MDCK cell line: characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution. *Biotechnol Bioeng* 101(1):135-152.
- Walls HH, Harmon MW, Slagle JJ, Stocksdales C, Kendal AP. 1986a. Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses. *J Clin Microbiol* 23(2):240-245.
- Walls HH, Johansson KH, Harmon MW, Halonen PE, Kendal AP. 1986b. Time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibodies for rapid diagnosis of influenza infections. *J Clin Microbiol* 24(6):907-912.
- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ. 1987. A Pragmatic Approach to the Analysis of DNA Histograms with a Definable G1 Peak. *Cytometry* 8(1):1-8.
- Weide H, Aurich H. 1979. *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Fischer.
- Wersto RP, Chrest FJ, Leary JF, Morris C, Stetler-Stevenson MA, Gabrielson E. 2001. Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Cytometry* 46(5):296-306.
- WHO. 1995. Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 73(4):431-435.

-
- WHO. 2003. Facts sheet Influenza. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/> (04.04.2008)
- WHO. 2005. Strengthening Pandemic Influenza Preparedness and Response - WHO Technical Briefing at the 58th World Health Assembly. Epidemic and Pandemic Alert and Response. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/briefing/en/index.html> (15.05.2005)
- WHO. 2008. Recommendations for influenza vaccines. Epidemic and Pandemic Alert and Response. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html> (10.04.2009).
- WHO. 2009. WHO Global Influenza Programme. World Health Organisation. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/> (04.04.2008)
- Williams MS. 1993. Single-radial-immunodiffusion as an in-vitro potency assay for human inactivated viral vaccines. *Veterinary Microbiology* 37(3-4):253-262.
- Wolf K. 1991. Kinetik in der Bioverfahrenstechnik. Hamburg: Behr's Verlag.
- Wood J, Robertson JS. 2007. Reference viruses for seasonal and pandemic influenza vaccine preparation. *Influenza and other respiratory viruses* 1(1):5-9.
- Wood JP, Osborne NN. 2001. The influence of zinc on caspase-3 and DNA breakdown in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 119(1):81-88.
- Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S. 2004. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* 279(30):30931-30937.
- Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S. 2003. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 22(11):2717-2728.
- Yan X, Zhong W, Tang A, Schielke EG, Hang W, Nolan JP. 2005. Multiplexed flow cytometric immunoassay for influenza virus detection and differentiation. *Anal Chem* 77(23):7673-7678.
- Yashiki S, Umegaki R, Kino-Oka M, Taya M. 2001. Evaluation of attachment and growth of anchorage-dependent cells on culture surfaces with type I collagen coating. *J Biosci Bioeng* 92(4):385-388.

- Yokomizo AY, Antoniazzi MM, Galdino PL, Jr NA, Jorge SAC, Pereira CA. 2004. Rabies Virus Production in High Vero Cell Density Cultures on Macroporous Microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering* 85(5):506-515.
- Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan WS, Rubin B, Petrukhin L, Kiseleva I, Shaw AR, DiStefano D. 2004. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* 120(1):23-31.
- Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. 1997. Viruses and apoptosis. *British Medical Bulletin* 53(3):509-521.
- Yurtcu E, Ergun M, Menevse A. 2003. Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes. *Cell Biology International Reports* 27:791-794.
- Zhirnov OP, Konakova TE, Garten W, Klenk HD. 1999. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *Journal of Virology* 73(12):10158-10163.
- Zodl B, Zeiner M, Sargazi M, Roberts NB, Marktl W, Steffan I, Ekmekcioglu C. 2003. Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J Inorg Biochem* 97(4):324-30.
- Zong W, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q, Yuan J, Thompson C. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *Journal of Cell Biology* 162(1):59-69.
- Zuk RF, Rowley GL, Ullman EF. 1979. Fluorescence protection immunoassay: a new homogeneous assay technique. *Clin Chem* 25(9):1554-60.
- Zuzarte-Luis V, Hurlle JM. 2005. Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin Cell Dev Biol* 16(2):261-269.

8 Anhang

8.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 8-1 aufgelistet.

Tabelle 8-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Autoklaven	Tuttnauer Systec	5075 ELVC
	HP	Varioklav 65T
pO ₂ -Sonden	Broadley James Corp.	Fermprobe
pH-Sonden	Mettler Toledo	InPro 6100 /120/T/N
	Broadley James Corp.	Oxyprobe D140 SN:50970
Metabolitanalysatoren:	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K85/200
	Nova Biomedical	Bioprofile 100 Plus
	Ortho-Clinical Diagnostics	Vitros DT II
	Yellow Springs Instruments	YSI 7100
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Heraeus	Heracell, T6060
Durchflussscytometer	Beckman Coulter	Beckman Coulter Epics XL Software: Expo 32
Einmal-Injektionskanülen	B Braun	Gr.1 d=0,90x40 mm
Einmalspritzen	B Braun	Omnifix 5 mL, 10 mL, 20 mL
Einmal-Spritzenfilter	neolab	0,2 µm, 0,45 µm
	Sartorius	Miniart 0,45 µm
Fluoreszenzspektrophotometer	Varian	Cary Eclipse
Glasflaschen	Schott	0,05 – 5,0 L
Hämocytometer	Assistent	Fuchs-Rosenthal
Lichtmikroskop	Carl Zeiss	Axioskop 2; Axiovert 25; Axiovert S100
Kamera	Sony	AVT Horn 3 CCD
Software	Mecha Cybernetics	Optimas 6.2
Konfokales Laser-Scan-Mikroskop	Carl Zeiss	Axiovert 100M mit LSM510
pH-Meter	WTW	Inolab
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q biocell A10
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Pipetus Accu

Gerät	Hersteller	Modell
Probenrotator	Stuart Scientific Bibby	Culture Tube Rotator SC1
Rollerflaschenschrank	Wheaton	
Schlauchpumpen	Ismatec	Typ ISM832A
	Watson-Marlow	Typ 101 U/R und 505 S
Thermoblock	Grant	QBT
Zellzählgerät	Beckman Coulter	Vi-Cell XR
Waagen	Mettler-Toledo	PG5002-S DeltaRange
Zentrifugen	Beckman Coulter	Avanti J 20
	Kendro Laboratory Products	Biofuge Primo R
Zellkultur-Einweggefäße	Greiner bio-one	Cellstar 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , Sechs-Well-Platten, Cellmaster 850 cm ²
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one	96-Well-Platten; Flachboden oder U-Boden

8.2 Chemikalien

Eine Liste der verwendeten (Bio-) Chemikalien ist in Tabelle 8-2 aufgeführt.

Tabelle 8-2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Kat. Nr.
Benzonase	Sigma-Aldrich	E1014-25KU
Betain	Sigma-Aldrich	B0300
Cytodex™ 1	GE Healthcare	17-0448-03
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Merck	6381-92-6
Fluoreszein, NIST-traceable Standard, 50 µM	Invitrogen	F36915
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco	10270-106
	PAN	3302P250922
GMEM-Pulvermedium	Gibco	22100-093
Gossypol, from cotton seeds	Sigma-Aldrich	G8761
Pufferan®, N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'- 2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	9105.3
IMAGEN™ Influenza virus A and B test	DakoCytomation	K6105
Lab M-Pepton	Idg (International Diagnostics Group)	LAB M™ MC33
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	1.05833.0250
Mouse anti Influenza A Matrixprotein (FITC-konjugiert)	Serotec	MCA401FX
Mouse anti Influenza A Nukleoprotein (FITC-konjugiert)	Serotec	MCA400FX
Natriumchlorid	Carl Roth	9265.1
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	neolab	4765.1000
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	1.06482.1000
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	30525-89-4
Ribonuklease A (RNase A)	Carl Roth	R5125-50M6
Staurosporin	Sigma-Aldrich	S6942, S5921
Trypanblau	Merck	ZC137932348
Trypsin	Gibco	1188797
Tryptose Phosphate Broth (TSB)	Gibco	18050-047
Valinomycin	Sigma-Aldrich	V3639
Zinksulfat (Monohydrat)	Sigma-Aldrich	307491
z-IETD-fmk, Ready to use	Axxora	ALX-260-144-R020
z-LEHD-fmk, Ready to use	Axxora	ALX-260-145-R020
z-VAD-fmk, Ready to use	Axxora	ALX-260-138-R020

8.3 Methoden mit bestehender Arbeitsanweisung

Im Folgenden ist die Durchführung von etablierten Methoden anhand der entsprechenden Standard-Arbeitsanweisungen (SOPs) beschrieben.

8.3.1 Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium

Arbeitsanweisung Nr. M/ 02

Datum: 13.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel

geändert: 23.11.2005 Autor: Susanne König

geändert: 11.09.2006 Autor: Nancy Schlawin

1.0 Ziel

Herstellung von Vollmedium zur Kultivierung von MDCK-Zellen, speziell als „back-up“. Alle Medienbestandteile sind bereits als Lösungen steril vorhanden und brauchen nur noch zusammenpipettiert zu werden.

2.0 Material

- fötales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco, Best.Nr. 10270-106): 500 mL-Flasche
- Glasgow-MEM (BHK-21-Medium, Fa. Gibco, Best.Nr. 22100-093): 500 mL-Flasche
- Tryptose Phosphate Broth (Fertigbouillon, c = 29,5 g/L, Fa. Gibco, Best.Nr. 18050-047) : 500 mL Flasche
- Pipetten
- sterile Flasche

3.0 Methode

- Die Flasche mit dem FCS wird über Nacht im Kühlschrank aufgetaut.
- Alle Teillösungen auf Zimmertemperatur erwärmen lassen und steril unter der Werkbank zusammengießen (auf der Waage abwiegen).
- Zusammensetzung des Vollmediums:
- Glasgow-MEM-Fertigmedium
- 10 % FCS
- 2 g/L Tryptosephosphat (= 68 mL der Fertigbouillon)
- 416 mL des Glasgow-MEM-Mediums aus der 500 mL-Flasche mit Glasgow-MEM-Medium in eine sterile Flasche geben bzw. sammeln um weitere Flaschen herzustellen (bei Dokumentation beachten, d.h. die fertige FM-Flaschennummer ins Datenblatt eintragen bzw. Restmedium der vorherigen Flasche).
- Zugabe von 50 mL FCS, sowie 34 mL Tryptosephosphat (c = 2 g/L) in die 500 mL-Flasche
- Angabe der jeweils verwendeten Chargen im Arbeitsblatt.
- Vollständige Beschriftung der Flaschen (MEM + 10% FCS + TPB, Datum).
- Von allen hergestellten Flaschen, sowie dem FCS und Tryptosephosphat 2 x 2 mL in Casobouillon geben.

- Bei negativer Bewertung nach 4 Wochen der Bouillons, kann das Medium genommen werden.

4.0 Verwendung

Wird als sogenanntes FM-Medium zur Kultivierung von MDCK-Zellen verwendet.

Da alle Medien steril gekauft werden dient es als Kontrollflasche, falls die selbsthergestellten Medien unsteril sein sollten.

5.0 Lagerung

- Das Vollmedium (GMEM) wird bei 4°C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- FCS ist aufgetaut 6 Monate bei 4 °C haltbar (Lagerung sonst bei -20 °C).
- Tryptose Phosphate Broth wird bei 4 °C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- Das fertige FM-Medium kann im Kühlschrank ca. 3 Monate aufbewahrt werden.

6.0 Arbeitsblätter

M/ 02.1

M/ 02.2

Z / 07

8.3.2 Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen Teillösungen

Arbeitsanweisung Nr. M/ 02

Datum: 13.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel

geändert: 23.11.2005 Autor: Susanne König

geändert: 11.09.2006 Autor: Nancy Schlawin

1.0 Ziel

Herstellung von Vollmedium zur Kultivierung von MDCK-Zellen, speziell als „back-up“. Alle Medienbestandteile sind bereits als Lösungen steril vorhanden und brauchen nur noch zusammenpipettiert zu werden.

2.0 Material

- fötales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco, Best.Nr. 10270-106): 500 mL-Flasche
- Glasgow-MEM (BHK-21-Medium, Fa. Gibco, Best.Nr. 21710-025): 500 mL-Flasche
- Tryptose Phosphate Broth (Fertigbouillon, c = 29,5 g/L, Fa. Gibco, Best.Nr. 18050-047) : 500 mL Flasche
- Pipetten
- sterile Flasche

3.0 Methode

- Die Flasche mit dem FCS wird über Nacht im Kühlschrank aufgetaut.
- Alle Teillösungen auf Zimmertemperatur erwärmen lassen und steril unter der Werkbank zusammengießen (auf der Waage abwägen).
- Zusammensetzung des Vollmediums:

- Glasgow-MEM-Fertigmedium
- 10% FCS
- 2 g/L Tryptosephosphat (= 68 mL der Fertigbouillon)
- 416 mL des Glasgow-MEM-Mediums aus der 500 mL-Flasche mit Glasgow-MEM-Medium in eine sterile Flasche geben bzw. sammeln um weitere Flaschen herzustellen (bei Dokumentation beachten, d.h. die fertige FM-Flaschennummer ins Datenblatt eintragen, bzw. Restmedium der vorherigen Flasche).
- Zugabe von 50 mL FCS, sowie 34 mL Tryptosephosphat (c = 2 g/L) in die 500 mL-Flasche
- Angabe der jeweils verwendeten Chargen im Arbeitsblatt.
- Vollständige Beschriftung der Flaschen (MEM + 10 % FCS + TPB, Datum).
- Von allen hergestellten Flaschen, sowie dem FCS und Tryptosephosphat 2 x 2 mL in Casobouillon geben.
- Bei negativer Bewertung nach 4 Wochen der Bouillons, kann das Medium genommen werden.

4.0 Verwendung

Wird als sogenanntes FM-Medium zur Kultivierung von MDCK-Zellen verwendet.

Da alle Medien steril gekauft werden dient es als Kontrollflasche, falls die selbsthergestellten Medien unsteril sein sollten.

5.0 Lagerung

- Das Vollmedium (GMEM) wird bei 4°C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- FCS ist aufgetaut 6 Monate bei 4 °C haltbar (Lagerung sonst bei -20 °C).
- Tryptose Phosphate Broth wird bei 4 °C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- Das fertige FM-Medium kann im Kühlschrank ca. 3 Monate aufbewahrt werden.

5.0 Arbeitsblätter

M/ 02.1

M/ 02.2

Z / 07

8.3.3 Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium

Arbeitsanweisung Nr. Z/ 04

Datum: 14.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel

geändert am: 09.07.2003 Autor: Ilona Behrendt

geändert am: 20.06.2006 Autor: Susanne König

geändert am: 11.09.2006 Autor: Nancy Schlawin

1.0 Ziel

Langzeitkultivierung und Vermehrung von Zellen, zur Beimpfung mit verschiedenen Virusarten und späteren Aufarbeitung.

2.0 Materialien

- Kultur mit konfluent gewachsenen Zellen (25-cm²-, 75-cm²-, 175-cm²-Flasche oder 850-cm²-Rollerflasche); MDCK-Zellen: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur
- Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA, 37 °C), 1:10-Verdünnung aus Stammlösung, siehe Arbeitsanweisung M/07
- Vollmedium (Glasgow MEM komplett gemischt mit 10% FCS und Tryptosephosphatboullion/Pepton), siehe Arbeitsanweisungen M/02 oder M/04
- PBS (Raumtemperatur) siehe Arbeitsanweisung M/01
- fötales Kälberserum (FCS) (auf Raumtemperatur vorwärmen) Firma: Gibco/Best.Nr.:10270106

3.0 Methode

- Kulturflaschen aus dem Brutschrank nehmen und desinfizieren, unter die Werkbank stellen
- Kulturflaschen aufschrauben, Deckel mit Öffnungen nach oben legen (Deckel nach hinten legen, so dass man nicht darüber fasst beim Arbeiten)
- altes Medium in eine sterile Abfallflasche abgießen (nicht den Rand berühren!)
- die Zellen mit PBS-Lösung 2x waschen (s. Volumentab., I), gebrauchtes PBS in die sterile Abfallflasche abgießen (dazwischen die T-Flaschen immer zuschrauben und schwenken)
- Trypsin/ EDTA-Lösung zupipettieren, ein dünner Flüssigkeitsfilm genügt (s. Volumentab., II), und die Zellen bei 37 °C für ca. 20 min inkubieren
- in der Zwischenzeit neue Kulturflasche mit entsprechender Menge Medium befüllen (s. Volumentab., IV)
- nach 10 min Trypsininkubation die Flasche zum ersten Mal leicht schütteln, dann Zellen weiterinkubieren (insgesamt ca. 20 bis 30 min.) bis sich die Zellen nach erneutem kräftigen Schütteln vom Boden ablösen (optische Kontrolle und/oder unterm Mikroskop angucken)
- zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion FCS (s. Volumentab., III) zu den abgelösten Zellen geben
- durch mehrmaliges (ca. 2-3x) Aufziehen des Inhaltes der Flasche in eine Pipette erfolgt eine Zellvereinzlung (um Schaum zu vermeiden, Pipetteninhalt am Flaschenboden oder an der Innenseite der Flasche auslaufen lassen!)
- von dieser Zellsuspension entnimmt man 1/3tel bis 1/6tel (bei Inkubation in Flaschen mit gleichem Volumen) und pipettiert dieses jeweils in eine der vorbereiteten Flaschen (Berechnung der Einsaatdichte siehe unter Punkt 5 oder 6).
- Beachte! Für Zellkultivierung Deckel mit Membran benutzen (CO₂-durchlässig), bei Arbeiten mit Virus in den T-Flaschen, geschlossenen Deckel (ohne Membran) nehmen.
- Flaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren

4.0 Volumentabelle

Kulturgefäß	PBS zum Waschen (I)	Trypsin/EDTA (II)	FCS (III)	Vollmedium (IV)
25-cm ² -Flasche	5 – 10 mL	1 mL	1 mL	15 - 20 mL
75-cm ² -Flasche	10 – 15 mL	3 mL	3 mL	50 mL
175-cm ² -Flasche	15 – 20 mL	5 mL	5 mL	100 - 125 mL
850-cm ² - Rollerflasche	40 – 50 mL	10 mL	10 mL	250 mL

5.0 „Faustregeln“ für die Anzucht von MDCK-Zellen

- Ausgangskultur: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur (zu alte Kulturen vermeiden)
- Weiterkultivierung der Zellen in einer Kulturflasche mit gleichem Volumen: 1/3tel bis 1/6tel der Zellen in die neue Flasche geben.
- Vermehrung der Zellen für den Fermenter: Ampulle – T75 – T175 – Rollerflasche: jeweils die gesamten Zellen in das nächstgrößere Kulturgefäß überführen (Ampulle mit 2 – 5 x 10⁶ Zellen/mL; wenn weniger Zellen oder alte Zellen: Zwischenstufe über T25)
- Zellen nicht untereinander austauschen (bei Kontaminationsgefahr nicht mehr genau nachvollziehbar, woher diese stammt)
- für eine Reaktorkultivierung Zellen aus einer Passagierung kleiner 20 verwenden
- stets eine T 75 Flasche parallel zur Fermentation als back-up laufen lassen

6.0 Einsaat

6.1 Ermittlung des Einsaatvolumens

- ermittelte Zellzahl der trypsinierten Flasche Z (z. B. 1,2 x 10⁶ Zellen/mL)
- Tage, in denen die Zellen bis zur Konfluenz wachsen sollen T (z. B. 4 d)
- empirisch ermittelte Einsaadichte E, bei der die Zellen nach T Tagen in dem verwendeten Kulturgefäß konfluent sind (z. B. 0,8 x 10⁷ Zellen pro 175 cm² werden benötigt, um in 4 Tagen eine konfluente Kultur in einer 175-cm²-Flasche zu erhalten)
- Rechnung: $E : Z = \text{Volumen [mL]}$
Bsp: (0,8 x 10⁷ Zellen) : (1,2 x 10⁶ Zellen/mL) = 6,7 mL
- In eine 175-cm²-Flasche müssen 6,7 mL einer Zellsuspension, die 1,2 x 10⁶ Zellen/mL enthält, pipettiert werden, um nach 4 Tagen eine konfluente Kultur zu erhalten.

6.2 Bestimmung der Einsaat

- Einsaat = Zellen pro cm²
= (Einsaatvolumen x Zellzahl) : Oberfläche
Bsp.: (6,7 mL x 1,2 x 10⁶ Zellen/mL) : 175 cm² = 4,6 x 10⁴ Zellen/cm²
6,7 mL der Zellsuspension (mit 1,2 x 10⁶ Zellen/mL) ergeben in einer 175-cm²-Flasche eine Einsaat von 4,6 x 10⁴ Zellen/cm².
- Was ist ein guter Richtwert pro cm²?
z.B.: 3,3 x 10⁴ Zellen/cm² für Bioreaktor (≈ 3,0 x 10⁵ Zellen/mL)
2,9 x 10⁴ Zellen/cm² für Rollerflaschen in 4 Tagen oder
1,5 x 10⁴ Zellen/cm² für Rollerflaschen in 7 Tagen

7,6 x 10⁴ Zellen/cm² für T 175 (1:6 gesplittet)
 4,3 x 10⁴ Zellen/cm² für T175 (5 ml) in Rollerflasche (850 cm²)

7.0 Lagerung

Zellen wachsen in:

- T-Flaschen bei 37 °C im CO₂-Brutschrank im N1.06
- Rollerflaschen im 37 °C Rollerflaschenschrank in N1.06 oder im 37 °C-Brutraum auf dem Rollerflaschengestell
- Spinner bei 37 °C im Brutraum auf einen Rührer

Die eingefrorenen Zellen werden im Flüssigstickstoffbehälter im N1.12 gelagert.

Die Dokumentation erfolgt über Tabellen mit den jeweiligen Farbcode und Kennnummern die in einem Ordner im Raum N1.06 abgeheftet sind.

8.0 Arbeitsblätter

M / 01

M / 02

M / 04

M / 07

Z / 07

8.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Lebendzellzahl (Vitalität) in einer trypsinierten Kultur

Arbeitsanweisung Nr.: Z/ 01.1

Erstellt am: 15.11.2004 A. Bock

Überarbeitet am: 07.03.2005 A. Bock

1.0 Ziel

Bestimmung der Gesamtzellzahl bzw. Lebendzellzahl (Vitalität) in einer trypsinierten Kultur.

2.0 Material

- Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kammertiefe 0,2 mm, 16 Großquadrate je 1 mm², 16 Kleinquadrate pro Großquadrat
- Aliquot einer Kultur
- unsterile Reaktionsgefäße 1,5 mL, 15 mL
- Mikroliterpipette (1000 µL & 100 µL), blaue und gelbe Spitzen
- Mikroskop mit 10-fach Objektiv (Phasenkontrast)
- 96-well Platte, ebener Boden, unsteril

3.0 Methode

3.1 Zellzahlbestimmung

Bei der Kultivierung von adhärennten tierischen Zellen auf Microcarriern ist die volumenbezogene Zellkonzentration (1/mL) eine Funktion der Microcarrierkonzentration im Bioreaktor bzw. in der Probe. Im Falle von Konzentrationsunterschieden der Microcarrier

zwischen Bioreaktor und Probe treten starke Schwankungen in den Ergebnissen der Zellzahlen auf. Durch Konzentrationsbestimmung der Microcarrier in der Probe kann eine genauere Zellzahlbestimmung erfolgen. Nachfolgend sind 2 Varianten zur Zellzahlbestimmung in Microcarrier-Systemen beschrieben.

1 g Microcarrier (Cytodex 1) entsprechen rund 4×10^6 Partikel. In einer Lösung mit 1 g/L Microcarrier befinden sich also 4000 Partikel je 1 mL!

Anmerkungen:

Variante 1 ist einfach durchzuführen, birgt aber durch die Verdünnungsschritte mit den Microcarriern eine weitere Fehlerquelle!

Variante 2 ist die genauere, aber sie ist schwieriger in der Handhabung! Zu Beginn einer Kultivierung kann es aufgrund geringer Zellanzahl auf den Microcarriern zu Problemen bei der Anzahlbestimmung unter der Zählkammer führen.

1. Variante

- 1 mL einer homogenen Probe in ein 15-ml-Falkonröhrchen überführen
- Probe 3-mal mit PBS waschen: 9 mL hinzugeben und wieder 9 mL als Überstand entnehmen! Am Ende liegt wieder 1 mL gewaschene Probe vor!
- 1 mL Trypsin (10 mg/mL) zugeben und 20 min inkubieren (Erfolgskontrolle unter dem Mikroskop → leere Microcarrier!)
- 1 mL Trypanblau und 7 mL PBS zugeben; dies entspricht einer 1:10 Verdünnung der Originalprobe
- Zellzahlbestimmung der verdünnten Probe unter der Zählkammer (2 x 5 Großquadrate)
- Anschließend wird die bereits verdünnte Probe 1:2 mit PBS verdünnt (Faustregel: MC-Konzentration = Verdünnungsfaktor)
- von dieser Lösung 100 µL in die Vertiefung einer 96-well Platte pipettieren
- Anzahlbestimmung der Microcarrier unter dem Mikroskop

Rechenvorschrift fuer die 1. Variante

$N_{\text{kor}} = N_{\text{Zählkammer}} * (4 \times 10^3 * 1.77) / (N_{\text{MC}} * 200)$	
N_{kor}	korrigierte Zellzahl = Zielgröße (1/mL)
$N_{\text{Zählkammer}}$	bestimmte Zellzahl in der Zählkammer (1/mL)
4×10^3	massenbezogene Partikelanzahl der Microcarrier (MC/g)
1,77	Microcarrierkonzentration im Bioreaktor (g/L)
N_{MC}	in der 96well Platte bestimmte Microcarrieranzahl (MC/100µL)
200	Verdünnungsfaktor (1:10)*(1:2)*(100 µL:1000 µL) (-)

2. Variante

- 1 mL einer homogenen Probe in ein 15-ml-Falkonröhrchen überführen
- Probe 3-mal mit PBS waschen: 9 mL hinzugeben und wieder 9 mL als Überstand entnehmen! Am Ende liegt wieder 1 mL gewaschene Probe vor!
- Für die automatische Auszählung der MC wird eine Anzahl in der 96-well Platte von etwa 100 MC/100µL bzw. 1000MC/mL angestrebt. Somit kann die notwendige Verdünnung der Originalprobe berechnet werden nach:

$$\text{z.B.: } \frac{4000(MC / mg)}{1000(MC / mL)} 2.0(mg / mL) = 8; \text{ Verdünnung: gerundet } 1 : 10!$$

- Eine Lösung mit ausgerechneter Verdünnung der Originalprobe herstellen!
- davon 100 μL + 100 μL PBS + 200 μL Trypsin (10 mg/mL) in die Vertiefung einer 96-well Platte pipettieren
- Anzahlbestimmung der Microcarrier unter dem Mikroskop (MC absetzen lassen, Bild aufnehmen!)
- 20 min inkubieren (Erfolgskontrolle unter dem Mikroskop \rightarrow leere Microcarrier!); \rightarrow Gesamtvolumen = 400 μL
- Zellzahlbestimmung des Überstandes unter der Zählkammer

Rechenvorschrift für die 2. Variante

$$N_{\text{korr}} = V_{\text{Überstand}} * N_{\text{Zählkammer}} / (N_{\text{MC}})$$

N_{korr}	Zellzahl	(1/MC)
$N_{\text{Zählkammer}}$	bestimmte Zellzahl in der Zählkammer	(1/ μL)
N_{MC}	in der 96-well Platte bestimmte Microcarrieranzahl	(MC)
$V_{\text{Überstand}}$	Volumen (Probe + Trypsin) der 96-well Platte	(μL)

Mit der im Bioreaktor vorgegebenen Microcarrierkonzentration kann dann auch die volumetrische Zellkonzentration berechnet werden.

z.B.: mit $N_{\text{korr}} = 100$

$$N = N_{\text{korr}} * 4000 \text{ MC/mg} * c_{\text{MC}} = 100 * 4000 * 2,0 = 8 \times 10^5 \text{ 1/mL}$$

8.3.5 Zellzahlbestimmung

Arbeitsanweisung Nr. Z/ 01

Datum: 14.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel

geändert am: 09.07.2003 Autor: Ilona Behrendt

geändert am: 10.11.2005 Autor: Susanne König

1.0 Ziel

Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl (Vitalität) in einer trypsinierten Zellkultur oder in Suspensionskulturen, um z.B. die Einsaatdichte der Nachfolgekultur berechnen zu können.

Der Farbstoff Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen. Lebende Zellen sind ungefärbt und heben sich deutlich vom blau-grauen Hintergrund ab.

2.0 Material

- Aliquot einer trypsinierten Kultur oder Suspensionskultur
- 1,5 mL-Reaktionsgefäße, steril
- 15 mL Falcon, unsteril
- Mikroliterpipette (100 μL und 1000 μL) und Spitzen
- PBS

- Trypanblaulösung 0,5 %, filtriert; Firma: Merck; Best.Nr.: 1.11732.0025 Vorsicht giftig! Schutzhandschuhe tragen!
- Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Kammertiefe 0,2 mm, 16 Großquadrate je 1 mm², 16 Kleinquadrate pro Großquadrat)
- Mikroskop mit 10-fach Objektiv (Phasenkontrast)

3.0 Methode

3.1 Herstellung der Trypanblaulösung

- 18 g NaCl; Firma: Merck; Best.Nr.: 1.06400.5000 und 10 g Trypanblau auf 1000 mL mit Milli-Q-Wasser auffüllen und über einen großen Faltenfilter filtrieren
- Gebrauchslösung: 1:2-Verdünnung der Stammlösung mit deionisierten Wasser
- Trypanblau ist bei 5-30°C haltbar, Reste werden als Sondermüll vom Chemikalienbeauftragten entsorgt
- laut Applichem ist Trypanblau „mehrere“ Monate (6 Monate) haltbar
- nach Bildung von Aggregaten reduziert sich die Konzentration des Farbstoffes, die Lösung sollte danach nicht mehr verwendet werden

3.2 Vorbereitung der Zellen

- Zellen nach der Trypsinierung mit FCS abstoppen (bei serumfreien Kulturen in PBS aufnehmen)
- ein Aliquot aus der abtrypsinisierten Kultur oder aus der Suspensionskultur steril entnehmen (z. B. 1 mL) und in ein 15mL-Falkonröhrchen überführen.

3.3 Zellzahlbestimmung

- Oberfläche der Zählkammer und Deckglas mit 70 %igem Ethanol reinigen
- Zählkammer leicht anhauchen (zur Befeuchtung) und das Deckglas fest auflegen, evtl. Deckglas leicht hin und her bewegen, bis die sog. Newtonringe zu erkennen sind („Regenbogen“)
- Zellaliquot 1:10 mit Trypanblaulösung verdünnen (1 mL Zellsuspension + 9 mL Trypanblaulösung), vorsichtig mischen
- mit einer 100 µL Mikroliterpipette die Zählkammer füllen, das geschieht durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer, wobei die Kapillarkräfte die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugen
- Kammer unter das Mikroskop legen
- die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer besteht aus 16 Großquadraten mit einer Fläche von je 1 mm², dies ergibt bei einer Tiefe von 0,2 mm ein Volumen von 0,2 µL.
- es werden 5 Quadrate von den 16 ausgezählt (Zellen auf den Linien nicht doppelt zählen, es werden jeweils nur die Zellen auf 2 Linien des jeweiligen Quadrates gezählt z.B. auf der linken und unteren Kante; Zellhaufen entspricht 2 Zellen) und die Summe gebildet → Beispiel: siehe Abbildung:

X			X
		X	
X			X

- genauer wird die Bestimmung, wenn beide Zählkammern (über und unter dem Steg) ausgezählt werden und der Mittelwert gebildet wird
- Zellkonzentration/mL = Mittelwert der Summen $\times 10^4$
- Gesamtzellzahl = Zellkonzentration/mL \times Volumen der Zellsuspension
- % lebende Zellen = ungefärbte (lebende) Zellen : (ungefärbte Zellen + gefärbte Zellen) $\times 100$
- ist die Zellzahl zu hoch, sollte eine Verdünnung 1:100 hergestellt werden: dazu gibt man 100 μ L der Zellsuspension, 900 mL PBS und 9 mL Trypanblaulösung in ein 15 mL Falconröhrchen und zählt wie oben beschrieben in der Zählkammer aus
Berechnung: Zellkonzentration/mL = Mittelwert der Summen $\times 10^5$
- Sollte die Zellzählung wiederholt werden, muss der Testansatz neu gemischt werden, da Trypanblau toxisch für die Zellen ist und mit zunehmender Inkubationsdauer ein Anstieg der toten Zellen zu beobachten
- Verdünnung der Kultur mit Wachstumsmedium auf die gewünschte Einsaatdichte und das gewünschte Volumen (s. Arbeitsanweisung Z/ 04), wenn die Zellen eingefroren werden sollen: s. Arbeitsanweisung Z/ 06)

3.4. Beispiel zur Zellzahlbestimmung

- 40 mL Zellvolumen
- 1 mL der Zellen werden entnommen und mit 9 ml Trypanblaulösung
- Gesamtzellzahl = $8,5 \times 10^5 \times 40 \text{ mL} = 3,4 \times 10^7$ (Zellen in 40 mL Volumen)

4.0 Lagerung

- die filtrierte 0,5%-ige Trypanblaulösung ist bei Raumtemperatur ca. 6 Monate haltbar, bei zu langer Lagerung kann die Lösung aggregieren, so daß die Konzentration des Farbstoffes nicht mehr stimmt

8.3.6 Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR

Version 1.5

Erstellt am: 29.03.2006

Aktualisiert am 08.08.2008

Autor: J. Schulze-Horsel

1. Im Vorfeld zu beachten

Das Gerät darf nur nach Einweisung durch die dafür zuständige Person bzw. nach Absprache durch eine andere eingewiesene Person benutzt werden.

Die zu messende Probe darf auf keinen Fall Microcarrier enthalten, da sonst das Gerät verstopft wird!

Validierter Messbereich (für Zelltyp „MDCK 100“: 9.6×10^4 bis $1,0 \times 10^7$ Zellen/mL (Gesamtzellzahl)

2. Material

Originalprodukte von Beckman Coulter:

Nr. 383260 Single Pack 250 Messungen, Reagenzien plus Probengefäße (ca. 240 Euro)

Nr. 383194 Quad Pack 1000 Messungen (4x Single Pack = ca. 845 Euro)

Nr. Probengefäße (ViCell Cups)

Die Probengefäße können gespült und mehrmals verwendet werden.

Die Komponenten des Reagenzienpacks sind entweder bereits vorhanden oder können selbst hergestellt werden:

- Trypanblaulösung: 0,4 % w/v Trypanblau und 0,15 mol/L Natriumchlorid in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) mit Papierfilter vorfiltriert, anschließend $0,45 \mu\text{m}$ filtriert
- Desinfektionsmittel: Isopropanol (2-Propanol), 90 %
- Reinigungsmittel: Beckman Coulter Clenz (Nr. 8448222, 5 Liter)
- Pufferlösung dH_2O , z.B. MilliQ-Wasser

Das benötigte Reagenzienvolumen pro 250 Messungen ist:

- Trypanblaulösung ca. 110 mL
- von allen anderen Reagenzien ca. 220 mL benötigt

Auffüllen der Reagenzien:

Wenn das aktuelle Reagenzienpack leer ist, im Menü „Instrument“, „Replace reagent pack“ auswählen und den schrittweisen Anweisungen folgen.

Anstelle eines neuen Reagenzienpacks werden die Flaschen des vorhandenen Packs mit dem entsprechend benötigten Volumen (110 bzw. 220 mL) aufgefüllt.

Die Abfallflasche wird in eine Schottflasche umgegossen, autoklaviert und anschließend in den Trypanblau-Abfall entsorgt.

3. Einschalten und Ausschalten der Geräte

Einschalten:

- ViCell einschalten (Schalter auf der Rückseite)
- Computer einschalten
- Software „ViCELL XR 2.03“ starten

Ausschalten:

- Software schließen
- Rechner herunterfahren
- ViCell ausschalten

4. Zellzählung

Anforderungen an die Zellsuspension:

- Probenvolumen: minimal 0,5 mL, maximal 1,5 mL im Probengefäß
- Konzentrationsbereich (Herstellerangaben): $1,0 \times 10^4$ bis $1,0 \times 10^7$ Zellen/mL
- Proben mit einer Konzentration $> 1,0 \times 10^7$ Zellen/mL müssen vorverdünnt werden
- Proben, die Carrier enthalten können, müssen filtriert werden ($< 100 \mu\text{m}$), z.B. mit:
 - Partec Celltrics 100 μm , Nr. 04-0042-2318)
 - Becton Dickinson Bioscience Discovery Labware, Cell strainer, 70 μm , Nr. 352235

5. Messung

5.1. Probe in Original-Probengefäß pipettieren und in das Probenkarussell stellen

5.2. „Log in sample“ auswählen, dann im Untermenü eingeben:

- Probenposition im Karussell angeben
- falls nötig: Probenbezeichnung eingeben
- Zelltyp auswählen (Standard: MDCK 50)
- „Dilution factor“ überprüfen: für unverdünnte Proben: 1.0
- für sehr wichtige Proben: „Save images“ auswählen (Speicher: 1 MB/Bild)
- Speichern der Ergebnisse als eigene Excel-Datei oder als Zeile in „Multi-run file“: „bpt_datensammlung.xls“ als Standarddatei auswählen
- zum Messen: „OK“ oder nächste Probe eingeben („Next sample“)

5.3. Start der Messung: „Start queue“, Dauer einer Messung: 3 Minuten

5.4. Gerät reinigt sich selbständig, Probengefäß wird ausgeworfen

5.5. Das Karussell wird nach weiteren Proben durchsucht, die dann mit fortlaufender Nummerierung gemessen werden (sofern nicht anders eingeloggt)

5.6. Speicherort für gezählte Proben (in Excel-Dateien): lokal und im Netzwerk

c:\daten\ViCell\Excell\

h:\bio\daten\vicellxr\Excell\

Wenn auf der lokalen Festplatte (c:\) kein Speicherplatz mehr vorhanden ist, müssen die lokalen Dateien in den gleichen Ordner auf dem Laufwerk (h:\) kopiert werden. Nach der Sicherung können die lokalen Dateien gelöscht werden. Die Ordner dürfen nicht gelöscht oder umbenannt werden.

Bei Problemen mit dem Speichern auf Spiegellaufwerk Software neu starten.

6. Aufzeichnung von Bioprocessen

Um Zellzählungen verschiedener Proben einer Zeitreihe zusammen zu speichern und auszuwerten, ist es sinnvoll diese als „Bioprocess“ zu sammeln und in einer Datei abzulegen.

- „File“ => „New Bioprocess“
- Bezeichnung für den Prozess vergeben, z.B. Fermentation100
- Zelltyp auswählen
- Speicherdatei auswählen, Daten werden im Unterordner \data\ abgelegt
- in der linken Menüleiste wird ein Icon hinzugefügt (Symbol: Erlenmeyerkolben)
- Messen der Proben des Prozesses: Icon anwählen und Probe eingeben („Log in sample“)

7. Messen von infizierten Zellproben

Mit dem ViCell können auch Zellzählungen von infizierten Kulturen gemacht werden. Dabei sind folgende Besonderheiten zu beachten:

- Vor dem Messen: die Schale mit gebrauchten Probengefäßen (innen) sowie die Abfallflasche entleeren
- Probengefäße unter der Virusbank befüllen
- Nach dem Messen: Schale in den Probengefäß-Virusabfall entleeren und desinfizieren, Inhalt der Abfallflasche in flüssigen Virusabfall geben

8. Entfernung von Microcarriern aus der Flusskammer

Die Flusskammer hat eine Höhe von ca. 100 µm. Daher können sich Microcarrier, die sich in den Proben befinden, in der Kammer festsetzen. Das kann zu veränderten Messwerten führen. Um Microcarrier aus der Kammer zu entfernen folgende Prozedur durchführen:

- Probengefäß mit 2,5 mL verdünnter Natriumhypochlorid-Lösung (10 %, Sigma) füllen und in die erste Position des Probentellers stellen (1:10 verdünnen: 0,250 mL Natriumhypochlorid-Lösung + 2,25 mL Wasser)
- Befehl „Decontaminate“ im Menü „Instrument“ ausführen, dabei Anweisungen befolgen
- Die Reinigung dauert ca. 13 Minuten.
- Anschließend kontrollieren, ob die Flusskammer frei ist („Instrument“ -> „Live-Image“)
- Die Option „Live-Image“ wieder deaktivieren

8.3.7 Hämagglutinationstest

Arbeitsanweisung Nr. V/ 01

Datum: 8.06.2000	Autor: Dr. Annett Kiesel
14.06.2001	I. Behrendt
08.11.2005	Claudia Best
26.04.2006	Claudia Best
13.09.2006	Claudia Best

1.0 Ziel

Nachweis von Influenza-Viren. Influenza-Viren tragen auf ihrer Oberfläche das Hämagglutinin, das an Erythrocyten bindet und diese verklumpt.

Hämagglutination = Aggregation (Zusammenschluss) von roten Blutkörperchen durch das Hämagglutinin der vorhandenen Virenpartikel. Durch die Aggregation können die Blutkörperchen nicht absinken.

Bei dieser Bestimmungsmethode kann sowohl aktiver als auch inaktiver Virus verwendet werden, aber bei den Messergebnissen kann man sie nicht voneinander unterscheiden.

2.0 Material

- Virus (z. B. Zellüberstand infizierter MDCK-Zellen)
- Standard (= Kontrollvirus, z. B. inaktiviertes Influenza-Virus mit definiertem HA-Titer, gelagert bei -70 °C)
- PBS (autoklaviert, für die Zellkultur; es wird aber nicht unter der Sterilbank gearbeitet)

- Frisches Hühnerblut -> daraus hergestellte Erythrocytengebrauchslösung (2,0 x10⁷ Erythrocyten/mL)
- 96-Vertiefung-Mikrotiterplatte, U-Boden, (un-) steril, (Greiner Bestellnr.: 650 160)
- Mikroliterpipette (100 µl, Eppendorf Research) und gelbe Pipettenspitzen (100 µL, Eppendorf/ Gaudig)
- Multipipette, Handdispenser und 10 oder 5 mL-Dispensertips, von Eppendorf
- Mehrkanalpipette (10-100 µL, Eppendorf) + 100 µL Pipettenspitzen (Eppendorf, Brandt)
- Arbeitsschutzkleidung = Kittel + Schutzhandschuhe (Nitril, Größe: S, M, L, XL)

3.0 Durchführung des Hämagglutinationstestes

Die Mikrotiterplatte wird wie folgt aufgeteilt:

- 1. Reihe: Vertiefungen 1 bis 3 Negativkontrolle
- 2. Reihe: In den Vertiefungen 1-12 wird die Titerbestimmung des Standards durchgeführt (Positivkontrolle).
- 3.–8. Reihe: In den Vertiefungen 1-12 wird die Titerbestimmung der Proben durchgeführt.

Titerbestimmung:

- In die 2. bis 12. Vertiefung je 100 µL PBS vorlegen (mit Multipipette), Aliquot PBS in 50 mL-Falcon abfüllen.
- In die 1. Vertiefung der Reihe 100 µL Virussuspension pipettieren (unverdünntes Virus).
- In die 2. Vertiefung 100 µL Virussuspension pipettieren, mit der Pipette Puffer und Viruslg. durch 2- bis 3 maliges Auf- und Abpipettieren mischen. Dann 100 µL aus der 2. Vertiefung in die 3. Vertiefung pipettieren. In der 2. Vertiefung verbleiben 100 µL (Verdünnung 1:2). Puffer und Suspension in der 3. Vertiefung wie-derum durchmischen und 100 µL in die 4. Vertiefung pipettieren. Diese 1:2-Verdünnungsreihe weiterführen und die 100 µL aus der 12. Vertiefung verwerfen.
- Bei Titern größer als HA 3,3 weitere Vertiefungen für Verdünnungsreihe nutzen und nach letzter Verdünnung 100 µL verwerfen (s. Arbeitsblatt V/ 01.4).
- In jede Vertiefung 100 µL Erythrocytengebrauchslösung pipettieren (mit Multipipette).
- man fängt bei der größten Verdünnung (Reihe 12) zu pipettieren an, geht dann bis zum Konzentrat der Viruslg. (Reihe 1), und fängt dann wieder hinten bei Reihe 12 an.

Risiko der Verschleppung ist somit gering!!!

- Negativkontrolle: In die erste Reihe werden in 3 Vertiefungen je 100 µL PBS und je 100 µL Erythrocytengebrauchslösung pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird bei Raumtemperatur 30 bis 60 min inkubiert und danach der Titer ausgewertet.

4.0 Titerauswertung

Ist ausreichend Virus in einer Vertiefung vorhanden, werden die Erythrocyten durch das Virus vernetzt und die Vertiefung schimmert rötlich. Es bildet sich kein Knopf. „Hohle“ oder teilweise vorhandene Knöpfe werden als positiv (Virus vorhanden) gewertet. Ist kein Virus bzw. nicht ausreichend Virus in einer Vertiefung vorhanden, sinken die Erythrocyten auf den

V-förmigen Boden der Vertiefung ab. Es entsteht ein „Erythrocytenknopf“ mit glatter Oberfläche.

Ist in den Vertiefungen 1-7 noch kein Erythrocytenknopf zu erkennen, hat der Zellüberstand den HA-Wert 1,8 bzw. den Titer 64. Auf dem Arbeitsblatt V/ 01.4 sind weitere Beispiele angegeben.

Der Titer des Standards ist auf dieses angegeben und sollte höchstens um eine Titerstufe über oder unterschritten werden. Ansonsten muss der Test wiederholt werden.

Weicht der ermittelte HA-Wert des Standards um eine Titerstufe vom festgelegten HA-Wert ab, so müssen alle ermittelten Titer um diesen Wert korrigiert werden (Spalte HA korr. auf dem Arbeitsblatt V/ 01.4).

8.3.8 Hämagglutinationstest mit erhöhter Präzision

HA Assay Standard Operating Procedure

Author: Bernd Kalbfuß

Version: 2.1 (04.12.06)

1 Introduction

Attachment of influenza virions to host cells upon infection is mediated by the surface protein hemagglutinin (HA). Hemagglutinin is a receptor protein that binds to specific glycosilation patterns on proteins embedded in the outer membrane of cells. If samples containing influenza virus are incubated in the presence of erythrocytes, cross-linking occurs due the presence of multiple hemagglutinin proteins in the virus envelope (around 500 molecules per virion). As a result, carpet-like instead of point-like sedimentation of erythrocytes can be observed in round bottom and V-bottom wells or tubes (if the virus is present in sufficient amounts). By titrating the virus containing sample, a critical dilution can be determined at which the transition from carpet to point-like sedimentation occurs. The negative logarithm of this dilution (to the base of 10) has been defined as the logarithmic HA titer (or simply log-titer). It is a measure for the concentration of influenza virions in the sample. The inverse of the dilution has been termed HA activity with units HAU ($100 \mu\text{l}^{-1}$). It is supposed to be proportional to the number concentration of virions in solution.

The assay procedure described in this SOP is a variant of the standard HA assay (low resolution assay) described by [1]. To achieve higher precision, the dilution step width was reduced to $\Delta \log d = 0.15$ by shifting the serial dilutions of the original assay. Further, the titration result is evaluated photometrically using an automated procedure to minimize subjectivity (dependence on the experimenter). If executed with the necessary care, a precision up to $\pm 15\%$ ($\alpha=0.05$) can be achieved by this assay.

2 Preparation of Internal Standards

As a matter of fact the assay suffers from varying quality of erythrocyte preparations. The expectation value for the activity of a sample has been shown to change significantly from batch to batch of erythrocytes. In order to maintain comparability between measurements conducted with different erythrocyte batches, all measurements have to be corrected against

an internal standard. The preparation of these standards and the quantitation of their activity (that is the assignment of a nominal activity) is described in the following.

2.1 Points to Consider

- Preparation of internal standards is equivalent to the preparation of cell culture supernatant prior to downstream processing [2]. Cell culture supernatant is clarified by depth filtration, inactivated chemically and clarified again by membrane filtration. Follow instructions of the corresponding SOPs.
- Conditions for the preparation of internal standards have been formulated stringently to avoid the risk of inconsistent assay results. Most parameters can be expected non-critical (e.g. the virus strain or the cultivation system). Still, they should not be changed without any reason.
- Absolute quantitation of internal standards is required after preparation, i.e. the regular assay procedure is applied without correction against an internal standard. Please note, that absolute quantitation is sensitive to the batch of erythrocytes used. It is therefore recommended to use at least four independent batches of erythrocytes for reliable determination.
- In addition to absolute quantitation, comparison with at least one other internal standard (usually the previous one) is required. The deviation of the measured difference between activities and the nominal difference is recorded in a correction matrix. This matrix can be later used to reduce bias when comparing samples measured against different internal standards.

2.2 Preparation

1. Propagate influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) in mammalian cell culture. Use MDCK cells as a host and GMEM medium plus additives for cell growth and virus propagation. Either roller bottles or a stirred tank reactor operated under standard cultivation conditions should be used. Follow instructions of the corresponding SOPs. The required volume of supernatant very much depends on the number of people in the lab and the throughput of HA assays. A volume of 2 L was found sufficient to provide internal standard for the downstream processing group (5 people) for about one year. More than 500 assay runs have been conducted during that time.
2. Harvest supernatant at the end of the virus propagation phase and filter immediately through a 0.65 µm depth filter (polypropylene mesh, FAP96 type, GE Infrastructure). Inactivate clarified supernatant by the addition of b-propiolactone. Filter inactivated supernatant through a 0.45 µm membrane filter (PS membrane, MMP94 type, GE Infrastructure).
3. Aliquot clarified and inactivated supernatant into vials of 1 to 2 ml. Continuously stir supernatant while withdrawing liquid. Mark every tube uniquely (dash code) for later identification and label sample boxes thoroughly. Freeze vials at -70 °C for long term storage. It is recommended to use the naming pattern “DSP-HA-Std #<No>” for standards of the downstream processing group and “USP-HA-Std #<No>” for standards of the upstream processing group.

2.3 Quantitation

1. Carry out absolute quantitation and standard comparison by a group of at least two people (four people recommended). The previous standard should be used for comparison. Every person should analyze at least four replicates of every standard (corresponds to two assay plates). Follow the regular assay procedure. Independent sample tubes of standards and erythrocyte tubes should be used by every person. Conduct measurements over at least four independent batches of erythrocytes for absolute quantitation (typically requires 2months) and two batches in the case of standard comparison.

2. Summarize the results from absolute quantitation in the evaluation template “HA Assay – Standard Quantitation.xls” and save a copy in the folder “<flu_dir>/chemical analysis/data/HA/standards” using the label of the standard (e.g. “DSP-HA-Std #1”). The mean result of all measurements will be referred to as the nominal titer. It is used for correction in regular assay runs.

3. Summarize the results from standard comparison in file “<flu_dir>/chemical analysis/data/HA/standards/HA Assay – Standard Comparison.xls”. The mean deviation of the measured difference from the nominal difference of activities will be referred to as the correction term. It is used for translating activities measured against one internal standard to activities measured against another internal standard.

4. Add standard to the list of internal standards in the data evaluation template “HA-Assay – Data Evaluation Template.xls” and release the standard for routine use.

3 Preparation of Erythrocytes

3.1 Points to Consider

- The assay is very sensitive to the concentration of erythrocytes. In order to yield reproducible results it is therefore important to fill homogeneous aliquots (i.e. identical in quality and concentration).
- Erythrocyte suspensions can be stored up to two weeks at 4 °C. The condition of erythrocytes will deteriorate, however. Include negative controls in assay runs if in doubt. As soon as incomplete sedimentation occurs or the content of wells appears to be blurred, fresh erythrocytes need to be prepared.
- Erythrocytes in aliquots will sediment over time and constitute firm pellets. These pellets need to be homogenized thoroughly prior to withdrawing liquid for measurements. Incomplete resuspension will lead to changed erythrocyte concentrations and introduce bias into the measurements.

3.2 Materials

- 15 ml sterile centrifuge tubes (e.g. Greiner Bio-One, Cat. No. 188261)
- 50 ml conical centrifuge tubes (e.g. Greiner Bio-One, Cat. No. 227261)
- 1 L bottle top sterile filter (e.g. Nalgene, Cat. No. 161-0020)
- Lab centrifuge for 50 ml conical tubes (e.g. Heraeus Biofuge Primo R, Kendro; equipped with rotor #7590 and adapters for conical 50 ml tubes)
- 5 kg precision balance (e.g. PG5002-S DeltRange, Mettler Toledo)
- Magnetic stirrer + 8 cm stir bar
- Vi-Cell XR cell counter (Beckman Coulter) or Fuchs-Rosenthal cytometer and light

microscope

- Pipetting aid + 50 ml disposable pipette strips
- 2 L and 1 L beaker

In addition, Alsevers solution and phosphate-buffered saline are required. Prepare Alsevers solution according to recipe in Table 1. The pH at room temperature should be around 6.1 (± 0.1 pH units acceptable). Sterile-filter solution using a bottle top filter and aliquot into 15 ml sterile centrifuge tubes under a hood (5 ml per aliquot recommended). Document preparation using the record sheet “AB-Elseverslsg.doc” and file the sheet in folder “Arbeitsblätter” in room N1.07. Sterile-filtered Alsevers solution can be stored up to one year. A sufficient amount of aliquots needs to be available the site of slaughtering. About 2 to 3 tubes are typically required for the preparation of one batch.

Table 1: Alsevers Solution

Compound	Conc.	Amount
Glucose · H ₂ O, 198.17 g mol ⁻¹	103 mM	20.5
Na ₂ -Citrate · 2 H ₂ O, 294.10 g mol ⁻¹	27.2 mM	8.0
Citric Acid, 192.12 g mol ⁻¹	2.86 mM	0.55
NaCl, 58.44 g mol ⁻¹	7.19 mM	4.20
H ₂ O		ad 1 L

Prepare phosphate buffered saline (PBS) according to the recipe in Table 2. The pH at room temperature should be around 7.5 (± 0.1 pH units acceptable). Document preparation using the record sheet “AB-PBS.doc” and file the sheet in folder “Arbeitsblätter” in room N1.07. About 3 L of phosphate are required for the preparation of one batch.

Table 2: Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Compound	Conc.	Amount
NaCl, 58.44 g mol ⁻¹	137 mM	8.00 g
KCl, 74.55 g mol ⁻¹	2.68 mM	0.20 g
KH ₂ PO ₄ , 130.09 g mol ⁻¹	1.54 mM	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ , 141.96 g mol ⁻¹	8.10 mM	1.15 g
H ₂ O		ad 1 L

3.3 Procedure

1. Stabilize crude blood immediately after slaughtering by adding 5 ml to an equal volume of cold (4 °C) and sterile Alsevers solution (previously aliquoted into 15 ml centrifuge tubes). Fill as many tubes as required. Keep tubes at 4 °C during storage and transport. Process the stabilized blood as fast as possible but in any case the same day. Currently, about 20 to 30 ml of stabilized blood (2 to 3 tubes) are required to meet the demand of the group. This amount roughly corresponds to 1.6 L of final erythrocyte suspension which is sufficient for the preparation of 160 assay plates.
2. Dispense 3 to 4 ml of stabilized blood into 50 ml centrifuge tubes. Add 40 ml of cold (4 °C) PBS and mix well by inversion of the tubes. Spin down erythrocytes at 500 g for 5 min (4 °C, break set to 4). Decant supernatant carefully and resuspend pellets in 40 ml of cold PBS. Repeat twice.
3. Pool resuspended erythrocytes in a 2 L beaker. Determine the liquid weight on a balance and record reading (weigh the empty beaker first and subtract beaker mass). Put the beaker on a magnetic stirrer and keep erythrocyte suspension stirred all the time.

4. Determine erythrocyte concentration using the Vi-Cell XR cell counter. Prepare a 1:10 dilution by adding 1 ml of erythrocyte suspension to 9 ml of PBS. Withdraw the sample from the middle of the beaker. Use cell type “Erythrocyten 100” for counting. Alternatively, dilute the sample of the erythrocyte suspension 1:1000 (three subsequent 1:10 dilutions) and determine erythrocyte suspension manually using a Fuchs-Rosenthal cytometer. Count at least 5 squares on both sides of the cytometer. Automated cell counting using the Vi-Cell XR is preferred as it is more precise and less dependent on the person. Be alert with respect to sample homogeneity or the resulting cell concentration may not be representative!
5. Adjust the concentration of erythrocytes to 2.00×10^7 cells ml^{-1} by adding PBS. The volume required can be calculated according to the formula

$$V_{\text{PBS}} = \frac{m_{\text{Ery}}}{1 \text{ g ml}^{-1}} \left(\frac{X_{\text{meas}}}{2.0 \cdot 10^7 \text{ cells ml}^{-1}} - 1 \right)$$

V_{PBS} Volume of PBS (ml)

m_{Ery} Mass of erythrocyte suspension (g)

X_{meas} Measured concentration of erythrocytes (cells ml^{-1})

6. Check the concentration of erythrocytes after adjustment as described in step 5. The sample should be measured undiluted, however, in the case of the Vi-Cell XR or diluted 1:100 if counted manually. The measured concentration has to be within 1.9 to 2.1×10^7 cells ml^{-1} (5 % tolerance acceptable). If the suspension is too concentrated repeat dilution according to step 5. If the suspension is too dilute erythrocytes need to be concentrated again by centrifugation as described in step 2.
7. Fill aliquots of approximately 42 ml into 50 ml centrifuge tubes and store at 4 °C. Mark every tube uniquely for later identification (dash code) and label tube racks used for storage. Erythrocytes can typically be used up to two weeks after preparation.
8. Fill in the form “HA Assay – Record sheet for the preparation of erythrocytes” and file the sheet in folder “Arbeitsblätter” in room N1.07.
9. Check the quality of erythrocytes by conducting an assay run with internal standard (including negative controls). Negative controls should result in firm dots and the activity of the standard should not deviate more than 0.3 log units from the previously determined value. Release the batch for routine use.

4 Assay Procedure

4.1 Points to Consider

- The assay procedure was developed for the quantitation of hemagglutination activity in downstream-processing of influenza virus. Feel free to adapt the procedure to your needs whenever this is necessary. But be aware, that the validation of this assay applies only to the procedure described in this document.
- Automated sample evaluation is only applicable to samples with titers ≥ 1.0 units on the log-scale. The assay can still be used for samples with lower titers. Evaluation, however, is restricted to the manual procedure. Results obtained should be at least as precise as with the low resolution assay.

- The assay is very sensitive to pipetting inaccuracy and therefore strongly depends on the experimenter. Make sure you are sufficiently trained (e.g. by measuring standard samples many times) before you start with serious analyses.
- Do not freeze virus samples in phosphate buffer. Store samples at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ if freezing cannot be avoided. Like any biological activity HA activity may suffer depending on sample treatment and storage conditions.
- Samples containing active virus need to be handled under a safety hood in the S2 area. In addition, microtiter plates have to be sealed with an appropriate lid before they are scanned. Keep disinfectant or citric acid ready in case of accidental spillage.

4.2 Materials

- Internal standard (as described before)
 - Erythrocyte suspension (as described before)
 - Phosphate-buffered saline (as described before)
 - Transparent 96-well round bottom microtiter plates (e.g. Greiner Bio-One, Cat. No. 650160)
 - 100 μl micropipette + disposable tips
 - 8 x 100 μl or 8 x 300 μl multi-channel micropipette + reservoir
 - Multipette + 5 ml disposable tips
 - Plate photometer (e.g. Tecan Spectra, Tecan Instruments)
- If active samples are to be measured the following items are required in addition:
- Transparent disposable lids for 96-well plates (e.g. Greiner Bio-One, Cat. No. xxx)
 - Parafilm or Scotch tape

4.3 Procedure

4.3.1 Titration

1. Fill in the header fields of your assay run protocol and write down the order of the samples. The measurement of at least one internal standard sample per assay run is required - two are, however, recommended. No more than four plates (14 samples) are supported per assay run. Start a separate run if more samples need to be analyzed.
2. Pre-dilute samples which are known to be highly concentrated in PBS. Typically, a 1:10 pre-dilution is sufficient. Samples from regular cell culture do not require pre-dilution. If the titer is high enough pre-dilution may be also used to save sample volume. This is not recommended, however, and should only be used if inevitable.
3. Transfer the samples to their designated wells as indicated in the scheme below. Two rows are required for each sample. The first two wells of every second row contain a 1:20.5 predilution of the sample in PBS. Use a 100 μl pipette for the transfer and the pre-dilutions.

	1	2	
A	100 µl HA-Std	100 µl HA-Std	...
B	70.7 µl HA-Std 29.3 µl PBS	70.7 µl HA-Std 29.3 µl PBS	...
C	100 µl Sample-1	100 µl Sample-1	...
D	70.7 µl Sample-1 29.3 µl PBS	70.7 µl Sample-1 29.3 µl PBS	...

4. Use a 100 µl or 300 µl multi-channel pipette to fill the remaining wells with 100 µl of PBS. Start a serial 1:2 dilution of all samples by transferring 100 µl of PBS into the second well of each row. Mix well and transfer 100 µl of the mixture to the next well on the right. Empty the pipette tips completely once before the transfer. Mix again and continue until the end of the plate. Dispose the last 100 µl. After you finished every well should contain no more than 100 µl. Some solutions require very slow pipetting, especially if they contain surfactants or are highly viscous.

5. Add 100 µl of erythrocyte suspension into each well using a 5 ml multipipette (mix well before). Add erythrocytes sample by sample always starting with the highest dilution. Wipe the pipette tip with a paper towel before proceeding to the next sample.

6. Mark any wells on the plate and in the run protocol that suffer from erroneous pipetting. Extinction values from these wells need to be eliminated during assay evaluation (see below).

7. Incubate the plates at room temperature for 1 to 2 hours (required incubation time can be looked up in the documentation of the erythrocyte preparation). Alternatively, incubate plates over night.

8. Evaluate the results of the assay manually. Mark the corresponding fields in the run protocol with a ● for every perfect erythrocyte dot and a ○ for every imperfect dot. Assign the log-dilution of the well with the last imperfect dot as the titer of the sample. Compare the measured titer of the analyzed standard sample with its nominal titer. Calculate the difference (nominal – measured) and add the result to each titer. If two or more standard samples were analyzed use the mean difference.

9. Evaluate the results of the assay photometrically as described in the next sections.

Cover plates containing samples with active virus using appropriate lids!

Fix the lids with scotch tape or similar to prevent accidental spillage.

4.3.2 Measurement of Extinction

1. Make sure the Tecan photometer is switched on, then open the photometer application „easyWin basic“. Click the button „Messparameter definieren“ in the tool bar and change to the settings in the table below.

Meßfilter	700 nm
Referenzfilter	ncne
Temp.	0.0 °C
Schüttelmodus	ncne

2. Click the button „Messung starten“. You will be asked for a name first and then to put your plate onto the tray. The measurement will be carried out immediately afterwards. It is of utmost importance to remove any condensed water from the lid or the bottom of a microtiter plate before scanning.

3. Export the data as ASCII-file by selecting the item „Exportieren“ in menu „Datei“. Make sure that values are separated by TAB and a decimal point (not a German comma) is used under „Optionen“.

Measurements of the downstream processing group are saved in folder “<flu_dir>/dsp/chemical analysis/data/HA” using the file name pattern “<Number>-<Plate>_<Date>_<Experimenter>.asc” (e.g. “001-1_02-04-04_Bernd Kalbfuss.asc”).

Measurements of the upstream processing group are saved in folder “<flu_dir>/usp/Labor/HA neu/data” using the same name pattern. Serial numbers, however, are independent!

4. Repeat steps 2 and 3 for each plate of the assay run.

4.3.3 Evaluation of Experimental Data

A data evaluation template has been prepared using Microsoft Excel. The evaluation procedure is described in the following. You have to use a Windows XP virtual machine and enable macros for the sheet to work properly!

1. Open the data evaluation template (“<flu_dir>/dsp/templates/HA Assay – Data Evaluation Template.xls”) and save a copy in the appropriate data folder. Assays of the downstream processing group are saved in folder “<flu_dir>/dsp/chemical analysis/data/HA” using the file name pattern “<Number>_<Date>_<Experimenter>.xls” (e.g. “001_02-04-04_Bernd Kalbfuss.xls”). Assays of the upstream processing group are saved in folder “<flu_dir>/usp/Labor/HA neu/data”.

2. Import your extinction data into Excel. Copy all values and paste them into the “Data” sheet using “Edit->Paste Special” with “Values” only checked. Eliminate (that is delete) extinction values of all wells that suffered from erroneous pipetting. As long as affected wells are not within the zone of transition, the assay result will remain unaffected (Check after curve fit!)

3. Adjust the sample names and dilutions in the “Report” sheet. Fill all empty header fields and transfer the remarks from the run protocol. Specify the standard used and the positions of the standard samples (normally positions 1 and 9). Specify the same position twice if only one standard sample was measured.

4. Click the button “Evaluate” to start sample evaluation. Check the fitted curves in the “Evaluation” sheet. Compare with the results obtained by the manual evaluation procedure. The discrepancy should be less than 0.3 units on the log scale.

5. Save the document and make at least one hardcopy of the “Report” and “Evaluation” sheets. Documents are collected in a folder located in room N 0.13 regarding assays of the downstream processing group or room N 1.07 regarding assays of the upstream processing group.

8.3.9 Bestimmung des TCID₅₀

Arbeitsanweisung Nr. V / 08

Datum: 2.06.08

Autor: Ilona Behrendt

1.0 Ziel

Bestimmung der Virusverdünnung, bei der 50% der adhärennten Zellen infiziert werden.

2.0 Material

2.1. Zellanzucht und Virusvermehrung

- 4- 8Tage alte konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen (T175 oder RF)
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- Trypsin 10000 BAEE/mL in Milli-Q-Wasser, sterilfiltriert (Trypsin, Sigma, Bestell-Nr. T-7409) Lagerung bei -70 °C für Virusinfektion
- Zellkulturmedium (GMEM + 1 % Lab-M-Pepton + 10 % FCS) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Virusmedium (GMEM + 1 % Lab-M-Pepton) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Gentamicin 10 mg / mL (Invitrogen, Bestell-Nr. 11130-036) Lagerung: Raumtemperatur
- 96-Wellplatten 400 µL Inhalt steril mit flachem Boden mit Deckel (für Zellkultur) (Cellstar, Greiner bio-one, Bestell-Nr. 655180) (für jede Probe wird eine Wellplatte benötigt)
- Reaktionsgefäße 1,5 mL, sterilisiert für Verdünnungsreihen
- sterile Pipetten, Pipettierhilfe
- 100 µL Pipette
- Elektronische Einkanalpipette 1 mL (Eppendorf)
- Elektronische Mehrkanalpipette 1250 µL (Eppendorf)
- Pipettenspitzen 100 µL (Plastibrand, steril)
- Pipettenspitzen 1250µL (Eppendorf, steril)
- Multipette mit Combitips 10 ml (Eppendorf, Combitips plus biopure)
- 1 sterile Schottflaschen (250 oder 500 mL)
- 4 Pipettierbehälter, sterilisiert
- 2 kleine Laborschalen, sterilisiert
- Warnhinweisaufkleber: Biogefährdend

2.2. Fixierung und Färbung

- 80 %ige Acetonlsg. in Wasser (Aceton, p.A.)
- Primärantikörper entsprechend dem zu testenden Virus, z.B.
 - (Equine Influenza A Ziegenserum , final bleed, goat 613, vom 2.08.01, nano Tools) (1:100 mit PBS verdünnt)
 - Influenza Anti A/Wisconsin/67/2005 H3N2 (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti B/Malaysia/2506/2004 (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti A/PR/8/34 H1N1 (HA Serum sheep) von NIBSC
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- konfluent bewachsene Zellkulturflaschen (T75 oder RF)
- Sekundärantikörper (Invitrogen, Bestellnr.: A-11015)

- 100 µL 8-Kanal-Pipette mit Pipettenspitzen
- Laborschale
- 3 Pipettierbehälter
- Entsorgungsbehälter Aceton

3.0 Methode

3.1 Zellanzucht und Virusvermehrung

A) Zellanzucht

- konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen 3-mal mit PBS waschen und mit der vorgeschriebenen Menge Trypsin (1 mg/mL) 20 min bei 37 °C abtrypsinieren, mit Z-Medium abstoppen (siehe Arbeitsanweisung Nr. Z/04)
- Zellkulturmedium mit Gentamicin vermischen (100 mL Zellkulturmedium mit 1 mL Gentamicin)
- abtrypsinisierte Zellen mit angesetztem Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $4 \cdot 10^5$ Zellen/mL verdünnen (siehe Arbeitsanweisung Zellzahlbestimmung)
- 10 mL der Zellsuspension werden ca. für eine Zellkulturplatte benötigt
- je 100 µL der Zellsuspension werden mit der Elektronischen 8-Kanalpipette in jedes Well der Zellkulturplatte pipettiert
- die Zellen 1 - 2 Tage bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren (mikroskopische Beurteilung der Konfluenz der Zellen -> müssen dicht bewachsen sein – wenn dies nicht der Fall sein sollte, ist der Versuch hier abzubrechen)

B) Herstellen der Virusverdünnung

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamicin versetzen, 100 mL Medium + 20 µL Trypsin + 1,0 mL Gentamicin (100 mL VM reichen für ca. 10 Verdünnungsreihen)
- Je 900 µL des Virusmediums in 8 –10 Eppendorfcups (je nach benötigter Verdünnungsstufe) pipettieren. Virusverdünnung nach dem folgenden Schema in Eppendorfcups herstellen: mit einer Eppendorfpipette 100 µL aus der zu bestimmenden Probe oder dem Standard entnehmen und in das erste Eppendorfcup geben, 5 mal durch auf- und abpipettieren mischen, mit einer neuen Pipettenspitze 100 µL in das nächste Eppendorfcup geben, fortfahren bis zum Ende.

C) Virusvermehrung

- die Zellkulturplatten 2 mal mit je 100 µL PBS je Well mit der Elektronischen 8-Kanalpipette waschen (entleeren: in Laborschale ausschütten)
- mit einer Eppendorfpipette je 100 µL der Virusverdünnung auf je 8 Wells der Zellkulturplatte geben (mit der höchsten Verdünnungsstufe beginnen)
- in die Reihen 1, 2, 11 und 12 werden nur je 100 µL Virusmedium (mit Trypsin + Gentamicin) je Well gegeben (diese Wells dienen als Nullkontrolle, Randeffekte können dann ausgeschlossen werden)
- einzusetzende Verdünnungsstufen:
 - bei einem HA über 2,7: $10^3 - 10^{10}$
 - bei einem HA von 2,1 bis 2,7 (Standard, Saatvirus für Fermentationen) : $10^1 - 10^8$
 - bei einem HA unter 2,1: $10^0 - 10^7$

- die Platten mit Virus mit einem Warnhinweis versehen und 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

D) Trypsinzugabe

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamicin versetzen (100 mL Medium + 40 µL Trypsin + 1 mL Gentamicin)
- Je 100 µL dieses Mediums in jedes Well pipettieren – Elektronische 8-Kanalpipette, darauf achten dass kein Virus verschleppt wird (von rechts nach links – von der höchsten Verdünnungsstufe zur niedrigsten pipettieren, Reihe für Reihe) nach jeder Platte die Pipettenspitzen werfen
- die Virusplatten nochmals 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

3.2 Fixierung und Färbung

A) Vorbereitung des Primäntikörpers (nur bei dem Equine Influenza A Ziegenserum notwendig, wenn kein gereinigter Antikörper mehr vorhanden ist)

- der Primäntikörper für Equine Influenza A Ziegenserum ist ein polyklonaler Antikörper gegen den Pferdeinfluenza-Virus, aber auch gegen Zellbestandteile, deshalb müssen die Antikörper gegen die Zellen vorher absorbiert werden, sonst überdecken sie die Fluoreszenz der mit Viren infizierten Zellen
- 1 – 2 Tage alte konfluent bewachsene Zellkulturflasche dreimal mit PBS waschen
- auf eine T25 – Flasche 1 mL , auf eine T75 – Flasche 3 mL des verdünnten Primäntikörpers geben und 30 min bei 37 °C inkubieren (1 mL 1:100 verdünntes Serum reicht für eine Zellkulturplatte – dementsprechende Menge inkubieren)
- der gereinigte Primäntikörper kann bei –20 °C eingefroren werden

B) Fixierung

- Medium in Laborschale mit vorgelegter 2 %iger Essigsäure in der Sterilbank abgießen und virusgerecht entsorgen
- auf jedes Well 100 µL eiskalte 80 %ige Acetonlösung pipettieren (Acetonlsg. in Eisbehälter stellen – nicht in den Kühlschrank (Kühlschränke sind nicht Ex geschützt))
- die Zellkulturplatten 30 min zum fixieren auf Eis oder in den Kühlraum stellen ->Virus inaktiviert (die weiteren Schritte können außerhalb der Sterilbank durchgeführt werden)
- Zellkulturplatten 2 mal mit PBS spülen – (Aceton-PBS-Gemisch in Abfallbehälter sammeln- zur Entsorgung –Herrn Schäfer geben)

C) Färbung

- gereinigten Primäntikörper für Equine Influenza A Ziegenserum 1 : 100 mit PBS verdünnen, alle anderen Primäntikörper werden 1 : 200 verdünnt
- je 50 µL davon auf jedes Well mit Elektronischer 8-Kanalpipetten geben und 60 min bei 37 °C inkubieren
- nach dieser Zeit 2-mal mit PBS waschen
- den Sekundäntikörper 1 :500 mit PBS verdünnen
- wieder je 50 µL davon auf jedes Well pipettieren und 60 min bei 37 °C inkubieren

- 2 mal mit PBS waschen, nach dem letzten Waschschritt 100 μ L PBS auf jedes Well geben

4.0 Auswertung und Berechnung

- die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop
- jedes Well in dem Virus gefunden wird (fluoreszierende Zellen) wird als positiv gewertet (1), jedes Well ohne fluoreszierende Zellen als negativ (0) und in das Arbeitsblatt eingetragen
- die Berechnung erfolgt nach der Gleichung von Spearman und Kärber:

$$(\log \text{ Virus } 100\%) + (0,5) - \frac{\text{kumulativ } 100 \%}{\text{Anzahl Tests (pro Verdünnung)}} = \log \text{ Virus} / 100 \mu\text{L}$$

Beispiel:

$$\begin{aligned} (-5) + (0,5) - \frac{19}{8} &= -6,875 = 10^{6,88} \text{ Viren} / 100 \mu\text{L} = 10^{7,88} \text{ Viren} / \text{mL} \\ &= 7,58 \times 10^7 \text{ Viren} / \text{mL} \end{aligned}$$

5.0 Validierung

Eine Validierung wird für jeden neu hergestellten Standard durchgeführt. Es wird von mindestens 2 Personen je zweimal eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Daraus wird der Mittelwert für den jeweiligen Standard berechnet.

8.4 Übersicht der Bioreaktorkultivierungen

Im Tabelle 8-3 sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bioreaktorkultivierungen aufgeführt. Anhand der internen Versuchsbezeichnung können die Rohdaten zurückverfolgt werden.

Tabelle 8-3: Übersicht der Bioreaktorkultivierungen, Zuordnung interner Versuchsbezeichnungen

Kapitel	Zelllinie	Kulturvolumen	Influenza Virusstamm	MOI	interne Versuchsbezeichnung
4.2.2	MDCK	1,2 L	equine A/Newmarket/1/93 (H3N8)	3,0	DG1
4.1.1	MDCK	5,0 L		n.a.	F107, F117
4.4.1	MDCK	1,2 L	Scheininjektion ohne Virus	n.a.	DG14, DG15
4.4.2	MDCK	1,2 L 5,0 L	human A/PR/8/34 (H1N1) NIBSC	0,025	DG3, DG 4 F107, F117
4.4.3	MDCK	1,2 L	human A/PR/8/34 (H1N1) RKI	0,025	DG5
4.4.4	MDCK	1,2 L	human A/WSN/67/05 (H3N2)	0,002	DG6, DG7
4.4.5	Vero	5,0 L	human A/WSN/67/05 (H3N2)	0,001	F118
4.5.4	MDCK + 50 µM Betain	1,2 L	human A/WSN/67/05 (H3N2)	0,001	DG8, DG11
4.5.4	MDCK + 1 µM Staurosporin	1,2 L	human A/WSN/67/05 (H3N2)	0,001	DG9

8.5 Liste der Veröffentlichungen

Paper

Bock, A., Schulze-Horsel, J., Schwarzer, J., Rapp, E., Genzel, Y., Reichl, U. (2011) High-density cell cultures for influenza virus production, *Biotechnology Progress* 27 (1), 241-250

Isken, B., Schulze-Horsel, J., Bock, A., Genzel, Y., Reich, U. (2009) Monitoring of host-cell infection and virus-induced apoptosis in influenza vaccine production, in: Cellular Solutions for Clinical Challenges: Proceedings of the 21th ESACT Meeting, eingereicht

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Agalaridis, G., Genzel, Y., Reichl, U. (2009) Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production – flow cytometry and mathematical modeling, *Vaccine* 27 (20), 2712-2722

Bock, A., Sann, H., Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., Moehler, L., Reichl, U. (2009) Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures, *Biotechnology Progress* 25 (6), 1717-1731

Sidorenko, Y., Antoniukas, L., Schulze-Horsel, J., Kremling, A., Reichl, U. (2008), Mathematical model of growth and heterologous hantavirus protein production of the recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Engineering in Life Science* 8 (4), 399-414

Mueller, T., Schulze-Horsel, J., Sidorenko, Y., Reichl, U., Kienle, A. (2008), Population balance modeling of influenza virus replication in MDCK cells during vaccine production, in: Braunschweig, B. und Joulia, X. (2008): Computer-Aided Chemical Engineering 25: 18th European Symposium On Computer Aided Process Engineering, Elsevier, 133-138

Sidorenko, Y., Voigt, A., Schulze-Horsel, J., Reichl, U., Kienle, A. (2008), Stochastic population balance modeling of Influenza virus replication in vaccine production processes. II: Detailed description of replication mechanism, *Chemical Engineering Science*, 63 (8), 2299-2304

Sidorenko, Y., Schulze-Horsel, J., Voigt, A., Reichl, U., Kienle, A. (2008), Stochastic population balance modeling of Influenza virus replication in vaccine production processes, *Chemical Engineering Science* 63 (1), 157-169

Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., Reichl, U. (2007), Quantification of intracellular accumulation of M1 and NP of influenza A virus - monitoring of infection status of production cells during vaccine production by flow cytometry, *BMC Biotechnology*, 8:45

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Genzel, Y., Reichl, U. (2007), Single-cell approach in influenza vaccine production: apoptosis and virus protein production, in: Cells and Culture: Proceedings of the 20th ESACT Meeting, eingereicht

Genzel, Y., Schulze-Horsel, J., Möhler, L., Sidorenko, I., Reichl, U. (2005), Influenza vaccines: Challenges in mammalian cell culture technology, in: Smith, R. (2005): Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Springer, 503-508

Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., Reichl, U. (2005), Monitoring of cell physiology in Influenza vaccine production by flow cytometry, in: Smith, R. (2005): Cell technology for cell products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Springer, 531-533

Vortrag

Schulze-Horsel, J., Bock, A., Genzel, Y., Reichl, U. (2006), Mammalian cell culture for influenza vaccine production: physiology during cell growth and virus propagation phase, 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden

Poster

Schulze-Horsel, J., Isken, B., Bock, A., Genzel, Y., Reichl, U. (2009), Monitoring of host-cell infection and apoptosis in influenza vaccine production, Cellular Solutions for Clinical Challenges: 21th meeting of ESACT, Dublin, Irland

Bock, A., Schulze-Horsel, J., Schwarzer, J., Genzel, Y., Reichl, U. (2008), The influence of elevated oxygen partial pressure on specific virus productivities in an influenza vaccine process, Vaccine Technology II, Albufeira, Portugal

Genzel, Y., Vester, D., Schulze-Horsel, J., Bock, A., Reichl, U. (2007), Analytical platform for bioprocesses with adherent mammalian cells, MPG-CNRS Joint Workshop on Systems Biology, Berlin

Rudolph, G., Schulze-Horsel, J., Bock, A., Lindner, P., Hitzmann, B., Reichl, U., Scheper, T. (2007), Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with *in-situ* microscopy, BioPerspectives 2007, Köln

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Genzel, Y., Reichl, U. (2007), Influenza vaccine production: flow cytometric monitoring of apoptosis and virus protein production in mammalian cell culture, Vaccine Congress, Amsterdam, Niederlande

Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Genzel, Y., Reichl, U. (2007), Single-cell approach in influenza vaccine production: apoptosis and virus protein production, Cells & Culture: 20th meeting of ESACT, Dresden

Bock, A., Schulze-Horsel, J., Reichl, U. (2006), Correlation of specific oxygen uptake rates and cell cycle duration of adherent mammalian cells in a large-scale microcarrier system, 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES), Salzburg, Austria

Schulze-Horsel, J., Sann, H., Genzel, Y., Reichl, U. (2005), Monitoring of cell physiology in Influenza vaccine production by flow cytometry, 19th meeting of ESACT, Harrogate, Großbritannien

Schulze-Horsel, J., Sann, H., Genzel, Y., Reichl, U. (2005), Monitoring of host cell infection in Influenza vaccine production, BioPerspectives 2005, Wiesbaden

Schulze-Horsel, J., Voß, C., Flaschel, E. (2003), Kultivierung von *Escherichia coli* unter anaeroben Bedingungen, BioPerspectives 2003, München

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Josef Schulze-Horsel
Geburtsdatum	27. November 1978 in Beckum/Westfalen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985 - 1989	Grundschule St. Barbara, Ahlen/Westfalen
1989 - 1998	Gymnasium St. Michael, Ahlen/Westfalen Allgemeine Hochschulreife 1998

Studium

10/1998 - 03/1999	Studium Biochemie, Universität Bielefeld
04/1999 - 06/2003	Studium Molekulare Biotechnologie, Universität Bielefeld Abschluss: Diplom-Biotechnologe
12/2002 - 06/2003	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Prof. Dr. E. Flaschel, Universität Bielefeld Thema: Anwendung der mikrobiellen Nitratatmung in anaeroben Fermentationsprozessen

Berufliche Tätigkeiten

09/2003 – 12/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fachgruppe Bioprozesstechnik, Prof. Dr.-Ing. U. Reichl, Max Planck-Institut für die Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg Thema: Physiologische Charakterisierung von Zellkulturen in der Impfstoffherstellung
02/2009 – 02/2010	Prozessexperte, Influenza-Antigenproduktion in Zellkultur, Novartis Vaccines & Diagnostics, Marburg
seit 03/2010	Prozessmanager, Influenza-Antigenproduktion in Zellkultur, Novartis Vaccines & Diagnostics, Marburg