



Atmungsaktivität von Säugerzellen

Kontinuierliche Onlineermittlung im Schüttelkolben

Die Kenntnis von Atmungsaktivitäten ist eine wichtige Voraussetzung bei der Analyse von Stoffwechselfvorgängen und der Optimierung von stoffwechselabhängigen Prozessparametern.

Extrem niedrige Atmungsraten, wie sie bei Säugerzellen vorliegen, können im Schüttelkolben mit dem RAMOS-System zuverlässig gemessen werden.

Die qualitative und quantitative Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse konnten im 2l Fermenter nachgewiesen werden.

Einführung

Die Kultivierung von Säugerzellen und die damit verbundene Gewinnung von glykosylierten Proteinen hat in den letzten Jahren beträchtlich an Bedeutung gewonnen.

So werden rekombinante Pharmaproteine und verschiedene therapeutische Antikörper mittels Zellkulturfermentation hergestellt.

Zellkulturen stellen für die pharmazeutische Industrie ein unentbehrliches Expressionssystem dar. Nur diese können die für eine volle pharmakologische Wirksamkeit der Proteine richtige Glykosylierung bewerkstelligen.

Durch die ständige Weiterentwicklung und Neugestaltung der Zelllinien sind Screenings der Kultivierungsparameter sowie Optimierungen von Medien oder

Produktausbeuten von sehr großer Bedeutung.

Das von J. Büchs und T. Anderlei für die Mikrobiologie entwickelte Messprinzip zur Bestimmung der Atmungsaktivität [1] wurde von HiTec Zang, Herzogenrath, zum labortauglichen, kommerziell verfügbaren Respiratory Activity Monitoring System (RAMOS) weiterentwickelt. RAMOS ist durch seine einfache Handhabung und den einfachen Aufbau zur unkomplizierten und schnellen Durchführung von Screenings geeignet.

Es bietet die Möglichkeit, in mehrfach parallelen Ansätzen Atmungsaktivitäten auf der Basis von Sauerstofftransferaten (OTR) in Schüttelkolben zu bestimmen und somit einen Einblick in die Stoffwechselaktivität der zu untersuchenden Organismen zu erlangen.

Das Messprinzip beruht auf der Messung von Partialdruckänderungen von Sauerstoff in der Gasphase des Kultivierungssystems.

Stoffwechselphänomene, Sauerstoff- und Substratlimitierungen können sofort erkannt und die gewonnenen Daten zur Optimierung von Fermentationsbedingungen verwendet werden.

Vergleich mit anderen Screeningssystemen

Die meisten Screeningssysteme bieten die Möglichkeit, in kleinen gerührten Systemen, pH-, pO₂- und Temperaturscreenings durchzuführen. Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung dieser Systeme ist die Reinigung, Kalibrierung und Wartung der Elektroden, die im Ver-

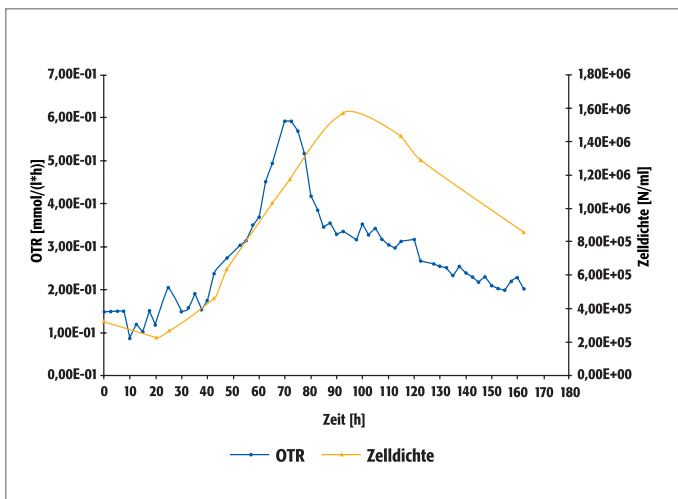


Abb. 1: OTR- und Zelldichteverlauf während einer Batch-Fermentation im RAMOS

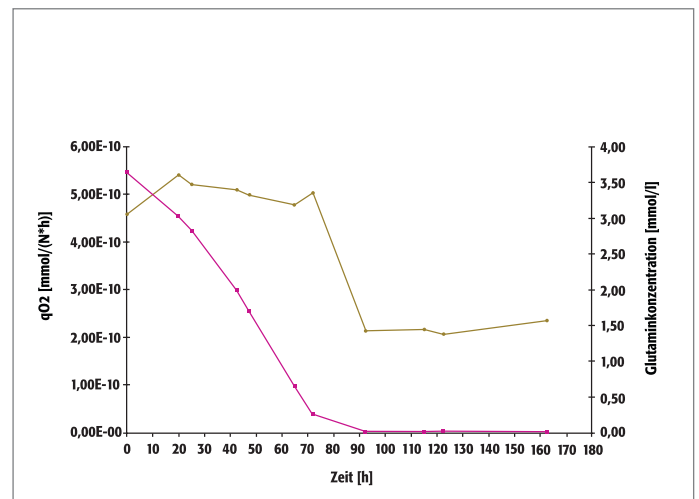


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf des qO₂ und des Glutamins

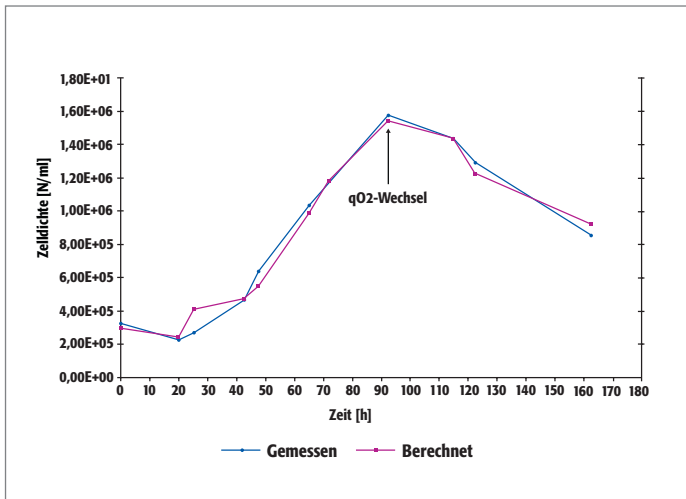


Abb. 3: Überprüfung des mathematischen Modells zur Bestimmung der vitalen Zelldichte

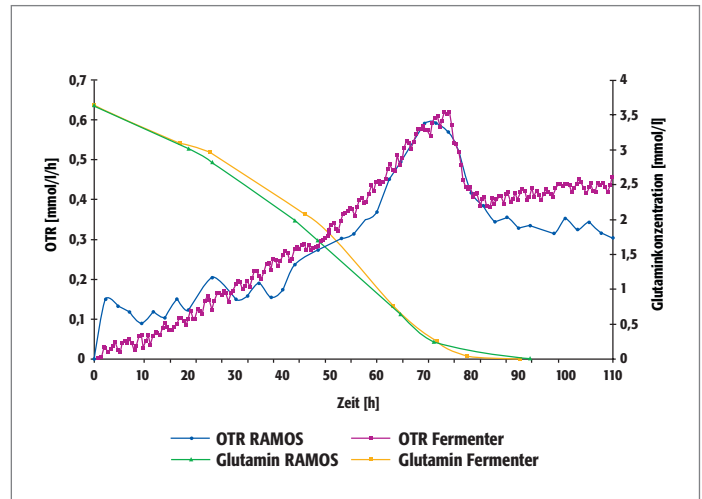


Abb. 4: Vergleich des OTR- und Glutaminverlaufs im RAMOS und im Fermenter

gleich zu zusätzlichen Kosten und zu einem erhöhten Zeitaufwand führt.

Eine effiziente Lösung bietet hier das RAMOS-System, das essentielle Parameter einer Fermentation ohne die Verwendung von invasiven Elektroden bestimmen kann.

Die verwendeten Schüttelkolben (250 ml Enghals-Erlenmeyerkolben) weisen sehr hohe und gleichzeitig sehr konstante $k_L a$ -Werte auf. Bei den für Zellkulturfermentationen relevanten Kulturvolumina, Schüttelfrequenzen und -radien werden $k_L a$ -Werte von bis zu 90 h^{-1} erreicht.

Aufgrund der niedrigen Atmungsaktivität von Säugerzellen und der hohen $k_L a$ -Werte fällt die gelöstsauerstoffkonzentration (c_L) im Kulturmedium auch im OTR-Maximum nur geringfügig unter die Sättigungskonzentration nach dem Henry'schen Gesetz.

So wird unter typischen Fermentationsbedingungen eine gelöstsauerstoffkonzentration von 60% Luftsättigung in der Regel nicht unterschritten. Eine Sauerstofflimitierung während der Fermentation im Schüttelkolben kann somit ausgeschlossen werden.

C_L kann basierend auf der gemessenen OTR und den bekannten $k_L a$ -Wert berechnet werden, so dass auf die Verwendung von pO_2 -Elektroden für den gelöstsauerstoff verzichtet werden kann.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einsatz der RAMOS-Technologie zur Prozessentwicklung und -optimierung in der Säurerzellfermentation aufgezeigt werden.

Atmungsaktivitäten bei Hybridomazellen

Zur Ermittlung der Atmungs- und Stoffwechselaktivität von Hybridomazellen (DSMZ, ACC 477, CF10-H5) während einer Batch-Fermentation wurden siebenfach parallele Ansätze mit gleichen Anfangs- und Kultivierungsbedingungen auf Wachstum, Atmungsaktivität und Substratverbrauch untersucht. Gleichzeitig konnten dadurch Aussagen zur Messgenauigkeit des RAMOS sowie zur Reproduzierbarkeit der Messdaten gemacht werden.

Während der gesamten Fermentationszeit weist die Hybridomazelllinie den klassischen Wachstumsverlauf auf (Abb. 1).

Nach einer Lag-Phase von ca. 20 Stunden folgt die exponentielle Vermehrung der Zellen bis hin zu einer Zelldichte von $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml. In der anschließenden Absterbephase nimmt die vitale Zelldichte über 80 Stunden fast linear ab.

Der OTR-Verlauf zeigt einen teilweise analogen Verlauf mit dem Wachstum der Zelllinie auf. So ist z.B. während der exponentiellen Phase des Zellwachstums eine exponentielle Zunahme der OTR zu erkennen. Während der Absterbephase verläuft die OTR proportional zur Zelldichte.

Zellspezifische Sauerstoffaufnahme

Der Zusammenhang zwischen der Sauerstoffaufnahme (OUR) von Organismen und der Biomassekonzentration (X) kann über die spezifische Sauerstoffaufnahme (qO_2) hergestellt werden.

Gleichung 1:

$$OUR = qO_2 \cdot X$$

$$[qO_2]: \frac{\text{mmol } O_2}{\text{N} \cdot \text{h}}$$

$$[X]: \frac{\text{N}}{\text{l}}$$

$$[OUR]: \frac{\text{mmol } O_2}{\text{l} \cdot \text{h}}$$

Aufgrund der geringen Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in einer Messphase entspricht die gemessene OTR weitgehend der OUR.

Daher kann über die Messung der OTR und der spezifischen Sauerstoffaufnahme eine direkte Aussage zur Biomassekonzentration und zur aktuellen Wachstumsphase gemacht werden.

Der qO_2 setzt sich aus der Summe der spezifischen Verbrauchsrate aller oxidativ verstoffwechselten Substrate (qS) und dem substratspezifischen Sauerstoffverbrauchscoeffizienten (k) zusammen.

Gleichung 2:

$$qO_2 = k_1 \cdot qS_1 + \dots + k_n \cdot qS_n$$

$$[qS]: \frac{\text{mmol Substrat}}{\text{N} \cdot \text{h}}$$

$$[k]: \frac{\text{mmol } O_2}{\text{mmol Substrat}}$$

Je höher der prozentuale Anteil eines Substrates, das im Zitratzyklus vollständig zu CO_2 und Wasser oxidiert wird, desto höher die spezifische Sauerstoffaufnahme. So werden zur vollständigen Oxidation von einem Mol Glukose sechs Mol Sauerstoff benötigt. Da aber bei kontinuierlichen Zelllinien lediglich



Dipl.-Ing. Michelangelo Canzoneri,
Wissenschaftlicher
Mitarbeiter / Doktorand
an der FH Aachen



Prof. Dr. rer. nat.
Manfred Biselli,
Professor an der FH
Aachen

0,21% der Glukose über den Zitratzyklus verstoffwechselt wird [2], hat die Verstoffwechslung dieses Substrates einen sehr geringen Einfluss auf die Höhe der spezifischen Sauerstoffaufnahme und damit auf die OTR.

Das Fehlen einer Nährstoffquelle, die nahezu vollständig veratmet wird, wie z.B. Glutamin, führt dagegen zu einer erheblichen Senkung des qO_2 und somit zum Abfallen der OTR.

Dieser Effekt kann in Abbildung 2 beobachtet werden.

Man kann im Wesentlichen zwei Atmungsphasen unterscheiden. In der ersten Phase von ca. 70 Stunden wird ein erhöhter Sauerstoffverbrauch aufgrund der Verstoffwechslung von Glutamin gemessen ($qO_2 = 5 \cdot 10^{-10} \text{ mmol } O_2 / (N \cdot h)$). Die Abnahme des qO_2 auf $2 \cdot 10^{-10} \text{ mmol } O_2 / (N \cdot h)$ leitet gleichzeitig die zweite Atmungsphase ein. Im Vergleich wird hier durch die geringe oxidative Verstoffwechslung von Glucose und der kontinuierlich abnehmenden Zellvitalität weniger Sauerstoff pro Mol Substrat verbraucht.

Aus der OTR-Messung kann mit Hilfe der Gleichung 1 direkt auf die Biomassekonzentration geschlossen werden (Abb. 3).

Voraussetzung für eine korrekte Berechnung ist die Berücksichtigung des qO_2 -Wechsels bei der Substraterschöpfung.

Der OTR gibt somit Informationen über Lebendzellichte, Wachstumsverlauf, Substratlimitierungen und Zeitpunkte des vollständigen Verbrauchs von essentiellen Energiequellen wieder.

Reproduzierbarkeit von Messdaten

Der Vergleich der OTR-Messungen in sieben verschiedenen Kolben zeigt, dass die Messungen, bei gleichen Anfangs- und Kultivierungsbedingungen, nahezu identisch sind.

Die hohe Auflösung der Messsignale gewährleistet, dass die sehr niedrigen At-

mungsraten reproduzierbar erfasst werden können. Dies ermöglicht den direkten Vergleich zwischen den Ansätzen und eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse, die bei Screeningversuchen unabdingbar ist.

Übertragbarkeit von Messdaten

Eine Vergleichsfermentation im 2 l – Fermenter (Sartorius BBI Systems) zeigt, dass die im RAMOS generierten Daten auf größere Kultivierungssysteme übertragen werden können. Dazu wurden in beiden Kultivierungssystemen nahezu identische Bedingungen hergestellt und eine Batch-Fermentation durchgeführt. Die Sauerstofftransferraten im Fermenter wurden mittels Abgasanalytik (Servomex 4100) ermittelt. Die Gegenüberstellung der in den verschiedenen Kultivierungssystemen generierten Daten, zeigt eine gute Übereinstimmung (Abb. 4). So sind insbesondere der Zeitpunkt des OTR-Abfalls und des vollständigen Glutaminverbrauchs identisch. Die Übertragbarkeit auf größere Kultivierungssysteme ist somit gegeben. Damit ist die grundlegende Voraussetzung für ein effektives und scale-up taugliches Screeningsystem erfüllt.

Ausblick

Basierend auf der Erkenntnis, dass Limitierungen essentieller C- und Energiequellen in der OTR festzustellen sind und Biomassekonzentrationen sowie maximale Wachstumsraten bestimmt werden können, wurde ein Dosiersystem entwickelt, welches zur Zeit erprobt wird. Das System bietet die vollautomatische Bestimmung und Einstellung von optimalen Dosierzeitpunkten, -mengen und -raten. Dadurch wird die Durchführung von Fed-Batch Fermentationen wesentlich erleichtert und die Zeit zur Parameter- und Medienoptimierung erheblich verkürzt.

Referenzen

- [1] Anderlei T. und Zang W.: Biochemical Engineering Journal 17, 187–194 (2004)
- [2] Fitzpatrick L. und Jenkins H.: Applied Biochemistry and Biotechnology 43, 93–116 (1993)

Kontakt:

Dipl.-Ing. Michelangelo Canzoneri
Prof. Dr. rer. nat. Manfred Biselli
Prof. Dr. Ing. Werner Zang
Fachhochschule Aachen, Standort Jülich
Tel: 02461/99-3141
Fax: 02461/99-3199
canzoneri@fh-aachen.de
www.fh-juelich.de/canzoneri.html

Dipl. Biol. Rolf Krüger
HiTec Zang GmbH
Herzogenrath
rolf.krueger@hittec-zang.de