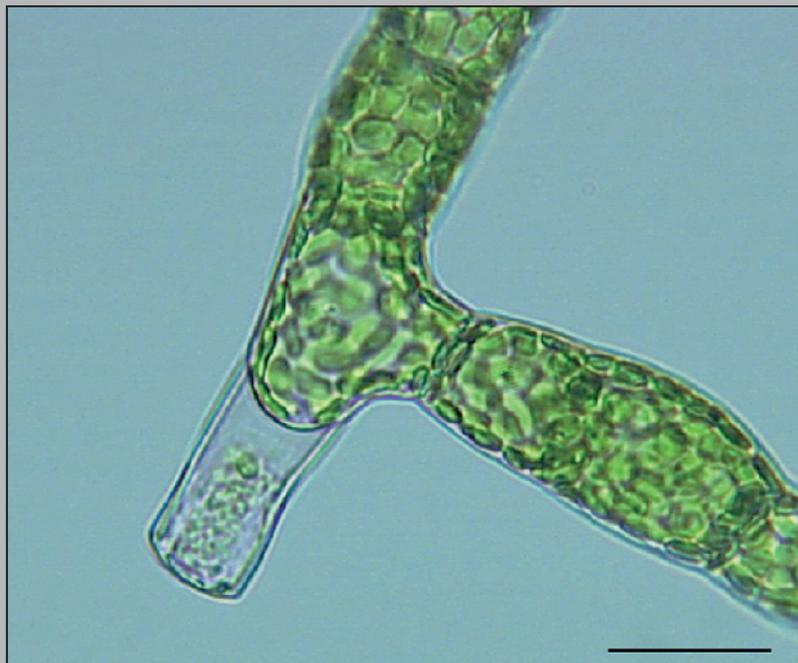

Saulo Alexander Lucumi Hernandez

**Prozesstechnische Optimierung des
Molecular Farming glykosylierter
Proteine in Photo-Bioreaktoren mit
dem Moos *Physcomitrella patens***



Saulo Alexander Lucumi Hernandez

**Prozesstechnische Optimierung des *Molecular Farming*
glykosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit
dem Moos *Physcomitrella patens***

Prozesstechnische Optimierung des *Molecular Farming* glykosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit dem Moos *Physcomitrella patens*

von
Saulo Alexander Lucumi Hernandez



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2007

Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe
c/o Universitätsbibliothek
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2008
Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-216-0

**Prozesstechnische Optimierung des *Molecular Farming*
glykosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit dem
Moos *Physcomitrella patens***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik
der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
genehmigte

Dissertation

von

Saulo Alexander Lucumi Hernandez

aus Bogota

Tag des Kolloquiums: 9. Oktober 2007
Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich III: Bioverfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH) in den Jahren 2002 bis 2006.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die Chance, dieses Forschungsprojekt bearbeiten zu können, sowie für das Vertrauen, das er von Beginn der Promotionszeit an in mich gesetzt hat. Ihr kompetenter und menschlicher Führungsstil hat mir stets erlaubt, neue Ziele zu setzen und weitere Herausforderungen zu finden.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei den Studentinnen und Studenten Belen Arancibia, Felipe Coron, Rafael Costa, Eva Engelhard, Christina Haunß, Nataliya Hauber, Jeannine Kern, Lorena Martinez, Tina Oberacker, Catherine Rolvering, Matthias Rother und Diego Sanchez möchte ich mich gerne bedanken. Ohne ihren wertvollen Beitrag wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Firma greenovation GmbH und dem Institut für Biologie II der Alberts-Ludwig-Universität Freiburg danke ich für ihre umfassende Unterstützung während der verschiedenen Phasen der Verbundprojekte. Hier gilt mein Dank Prof. Dr. Ralf Reski und PD Dr. Eva Decker. Ein besonderer Dank an die tolle greenovation-Crew: Dr. Gilbert Gorr und Dr. Armin Baur.

Bei Prof. Dr. Marie-Noelle Pons bedanke ich mich für den Erfahrungsaustausch, die Gastfreundlichkeit und die Unterstützung bei der Bildverarbeitung.

Meinen Kollegen möchte ich für die produktive Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Institutes danken.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung, der Max-Buchner-Stiftung, dem BMBF im Rahmen des Förderprogramms BioChance und Procope danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meiner Familie danke ich, dass sie explizit oder implizit immer dabei war.

Dir danke ich ständig, Du weisst es genau. Besonders da ich in dieser Zeit meinen Engel endlich wieder gefunden habe und ein Neuer entstanden ist.

Alexander Lucumi

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Ausgangssituation	4
1.2 Aufbau der Arbeit und Zielsetzung	5
2 Grundlagen und Stand der Technik	7
2.1 <i>Molecular farming</i>	7
2.1.1 Pflanzliche Expressionssysteme	8
2.2 Protein N-Glycosylierung	11
2.3 Ökonomische Aspekte	12
2.4 Moose	12
2.4.1 Lebenszyklus der Bryophyta	13
2.4.2 Zellwachstum und Differenzierung der Bryophyta. Fall <i>Physcomitrella patens</i>	15
2.5 <i>Physcomitrella patens</i> als Expressionssystem	20
2.5.1 Biologische Vorteile von <i>Physcomitrella patens</i>	20
2.5.2 Verfahrenstechnische Vorteile eines Expressionssystems mit <i>Physcomitrella patens</i>	21
2.5.3 <i>Physcomitrella patens</i> als Zellfabrik für rekombinante Proteine	21
2.5.4 Photobioreaktoren für die <i>in vitro</i> Kultivierung von <i>Physcomitrella patens</i>	22
3 Material und Methoden	26
3.1 Stämme und Medien	26
3.2 Reaktoren	26
3.2.1 Modell-Photo-Bioreaktor	26
3.2.2 Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor	28
3.3 Analytische Methoden	29
3.3.1 Steriltest	30
3.3.2 Mikroskopie	30
3.3.3 Optische Dichte	30
3.3.4 Biotrockenmassekonzentration	31
3.3.5 Bestimmung des Pigmentgehaltes	31
3.3.6 Mineralienverbrauch	32
3.3.7 Bestimmung der gesamten Proteine	32
3.3.8 Bestimmung von Proteasen	34
3.3.9 Bestimmung von VEGF	34
3.3.10 Gelelektrophoretische Proteintrennung	35
3.3.11 Phytohormonbestimmung	35
3.3.12 Fettsäurebestimmung	38
4 Physiologische Charakterisierung von <i>Physcomitrella patens</i>	39
4.1 Voruntersuchungen zum Wachstum vom <i>Physcomitrella patens</i> in Suspension	39
4.1.1 Phytohormonspiegel	41

4.2 Einfluss der Gas-Zusammensetzung auf das Wachstum	42
4.3 Einfluss der Photonenflussdichte auf das Wachstum	44
4.4 Einfluss der Phytohormone auf das Wachstum und die Differenzierung	46
4.5 Quantifizierung des Proteingehalts der Moose	50
4.5.1 Kolorimetrische Bestimmungsmethoden	50
4.5.2 Verbesserung der Proteinextraktion	52
4.6 Gelelektrophoretische Trennung der Proteine von <i>Physcomitrella patens</i>	53
4.6.1 Zellaufschlussmethoden	53
4.6.2 Proteinreinigung	53
4.6.3 Proteinmenge	54
4.6.4 Prozentsatz der Gele	54
4.6.5 Färbemethode	54
4.6.6 Variation des Proteinmusters je nach Differenzierung	54
5 Kultivierungen von <i>Physcomitrella patens</i> in kleinem Maßstab	56
5.1 Batch-Kultivierungen im Modell-Photo-Bioreaktor	56
5.1.1 Kultivierung I	56
5.1.2 Kultivierung II	58
5.2 Kontinuierliche Kultivierung im Modellphotobioreaktor. Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum, die Differenzierung und die Proteinexpression	59
5.2.1 Variation des Wachstums	59
5.2.2 Einfluss auf die Moosmorphologie und -Differenzierung	62
5.2.3 Änderung des Chlorophyllgehalts	63
5.2.4 Variation des Fettsäuremusters	64
5.2.5 Änderung des Proteinmusters	65
5.2.6 Variation des intrazellulären Proteingehalts	66
5.2.7 Änderungen des intrazellulären rhVEGF ₁₂₁ -Gehalts	67
5.2.8 Integrität des sekretierten rhVEGF ₁₂₁	68
5.2.9 Abhängigkeit der rhVEGF ₁₂₁ -Produktionsrate von der Lichtqualität	68
5.2.10 Variation der Phytohormonzusammensetzung	69
5.3 Fazit über die Ergebnisse im Modell-Photo-Bioreaktor	70
6 Kultivierung von <i>Physcomitrella patens</i> in Pilotmaßstab	72
6.1 Lichtverteilung auf der Oberfläche des Photobioreaktors und radiale Lichtprofile	72
6.2 Versuche im Batch-Betrieb	73
6.2.1 Wachstum in Rohrreaktoren und Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit	74
6.2.2 Effekt des Tag/Nacht Rhythmus	76
6.3 Mechanische Kontrolle der Moosmorphologie	79
6.3.1 Zerkleinerungsmechanismen mittels Rotor-Stator Maschinen	79
6.3.2 Vergleich der Zerkleinerungswirkung zwischen Rotor-Stator Maschinen und Propellern	83
6.3.3 Optimierung der Mooszerkleinerung	84
6.3.4 <i>Inline</i> Zerkleinerung der Moose und ihre Effekte	86
6.3.5 Quantifizierung der Zellmorphologie. Bildverarbeitung	88

6.3.6 Anwendung der Bildverarbeitung in Kultivierung	90
6.4 Prozessführung	94
6.4.1 Perfusion mittels Querstromfiltration	97
6.4.2 Strategien zur Optimierung der <i>inline</i> Querstromfiltration	99
6.4.3 Einfluss der Perfusion auf das Wachstum und die Proteinproduktion	105
6.4.4 Kontinuierliche langfristige Kultivierung mit Perfusion und Mosszerkleinerung	107
7 Diskussion, Bewertung und Umsetzung	115
7.1 Bilanz der experimentellen Ergebnisse	115
7.1.1 Vorüberlegungen über die weitere Anwendung von Rohr-Photo-Bioreaktoren	115
7.2 Wirtschaftlichkeitsanalyse	117
7.2.1 Datenbank zur Wirtschaftlichkeitsanalyse	117
7.2.2 Analyse von Rohr-Photo-Bioreaktoren zur Herstellung von VEGF mit <i>Physcomitrella patens</i>	121
7.3 Photo-Bioreaktor für präklinische Produktion. Perspektiven von Moosen als Expressionssystem	124
7.3.1 Hauptreaktor	124
7.3.2 Peripherie	127
8 Zusammenfassung	128
9 Literaturverzeichnis	131
10 Symbolverzeichnis	139
11 Anhang	142

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Moose entstanden vor ca. 500 Millionen Jahren und gehören zu den ältesten Landpflanzen unserer Erde. Sie sind heute mit zahlreichen Arten in den unterschiedlichsten Lebensräumen vertreten, von Gebirgen über Wüsten und Wälder bis hin zur Antarktis (Frahm und Frey, 2004).

Im Bereich der Gentechnik und der Pflanzenphysiologie hat sich in den letzten Jahren ein gesteigertes wissenschaftliches Interesse speziell am Moos *Physcomitrella patens* entwickelt. Da die Moose ebenso wie andere hohe Organismen die Fähigkeit besitzen, Glycoproteine zu exprimieren, hat ihr möglicher Einsatz zur Produktion komplexer Pharmazeutika an Resonanz gewonnen (Gorr und Wagner, 2005; Reski und Frank, 2005).

Glycoproteine sind Makromoleküle, die aus einem Protein und einer oder mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen bestehen. Die Struktur ihrer Zuckerreste, das sogenannte Glycosylierungsmuster, lenkt mehrere ihrer physikalischen und biologischen Eigenschaften wie z.B. Aktivität, Löslichkeit und Antigenität (Restelli und Butler, 2002). Glycoproteine spielen eine zentrale Rolle u.a. beim Wachstum von Geweben, Entzündungs- und Immunreaktionen sowie Metastasierung von Tumoren (Dudziak, 1999). Deshalb werden sie intensiv in Therapie und Forschung verwendet. Das Marktvolumen für auf rekombinanten Proteinen basierende Arzneimittel steigt und wird laut Prognose im Jahr 2010 mehr als 50 Milliarden US\$ erreichen (Belsey und Pavlou, 2005).

Bisher werden die Proteinpharmazeutika aus Kulturen gentechnisch veränderter Tierzellen, wie Insekten- oder CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) hergestellt, da sie ein nahezu menschliches Glycosylierungsmuster aufweisen. Die üblichen prokariotischen Produzenten von rekombinanten Proteinen wie z.B. *Escherichia coli* sind nicht in der Lage, posttranslationale Modifikationen der Proteine durchzuführen, was ihre Anwendung als Expressionssysteme für komplexe Proteine verhindert.

Obwohl Pflanzen wie die Moose in ihrem nativen Glycosylierungsmuster gegenüber dem des Menschen Abweichungen aufweisen, sind in den letzten Jahren bezüglich der Modifikation der Proteinglykosylierung bei *Physcomitrella patens* wichtige Fortschritte erzielt worden. Es ist gelungen, glycoengineered Proteine mit nahezu humanisiertem Glycosylierungsmuster mittels transgenen Moosen herzustellen und ins Kultivierungsmedium zu sekretieren (Baur, 2005; Koprikova, et al., 2004). Gemäss dieser Strategie sind ein Blutgerinnungsfaktor (Faktor IX) und ein Wachstumsfaktor (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) mit stabilen Linien von *Physcomitrella patens* produziert worden.

Moose können Vorteile gegenüber herkömmlichen Expressionssystemen mit tierischen Zellen bieten. *Physcomitrella patens* wird im Gegensatz zu Tierzellen photoautotroph auf protein-, antibiotika-, antikörper-, und hormontfreien Nährmedien in Suspension kultiviert. Dabei werden ausschließlich Licht als Energiequelle, CO₂ als Kohlenstoffquelle und ein einfaches Mineralmedium benötigt. Der Einsatz rein anorganischer Kultivierungsmedien kann ungewünschte Nebenwirkungen bei Patienten aufgrund des Transfers von Risikofaktoren aus komplexen organischen Medien minimieren. Anders als bei Tierzellen sind keine Krankheitserreger bekannt, die sowohl Mooszellen als auch Menschenzellen befallen können. Es besteht also keine Gefahr der Infektionsübertragung durch aus Mooszellen hergestellte Arzneimittel. Da die rekombinanten Moose das Zielprotein sekretieren, sind der

verfahrenstechnische Aufwand und die Kosten für das Downstream-Process geringer, was eine bessere Wirtschaftlichkeit gewährleistet. Nach der Produktabtrennung können die Moose weiter kultiviert werden und mehr Proteine sekretieren. Daher kann eine Herstellungsstrategie mit langfristigen Kultivierungen von diesen Vorteilen profitieren.

Die Produktion rekombinanter Proteine mit Hilfe von *Physcomitrella patens* bietet auch Vorteile gegenüber der Produktion mit höheren Pflanzen. Die Moose lassen sich als kleine verzweigte Fäden in festen Medien oder submers kultivieren und zeigen mechanische Robustheit. Im Vergleich zu Suspensionskultivierungen höherer Pflanzenzellen weist *Physcomitrella patens* relativ hohe Wachstumsraten auf. Es ist während des Großteils seines Lebenszyklus haploid und vermehrt sich daher vegetativ. Folglich wirken sich die genetischen Veränderungen sofort auf den Phänotyp aus (Schaefer, 2001). Außerdem ist *Physcomitrella patens* bisher das einzige bekannte Pflanzensystem mit hoher Frequenz homologer Rekombination, was die Einführung von fremden Genen erleichtert (Reski, 1998). Die rekombinanten Proteine bei *Physcomitrella patens* lassen sich vorteilhaft aus einem haploiden, so genannten Protonema Stadium gewinnen. Durch Differenzierung (Übergang von einem Entwicklungsstadium in ein anderes) erfolgt später das diploide oder sexuelle Stadium, das für Kultivierungszwecke zu unterdrücken ist.

Die Steuerung von Glycosylierungsprozessen und alternative Verfahren zur effizienten Herstellung von Glycoproteinen mit definierter Struktur und pharmazeutischer Wirkung stellen ein vielversprechendes Arbeitsfeld dar. Daher muss die Gewinnung rekombinanter, humanidentischer Proteine mittels transgener *Physcomitrella patens* als Plattform für das *molecular farming* untersucht werden.

1.2 Aufbau der Arbeit und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Ansatz zur Entwicklung eines Produktionssystems für komplexe Glycoproteine mit Moosen in Photo-Bioreaktoren dargestellt. Der Ausgangspunkt befasst sich mit der physiologischen Charakterisierung des Wildtyps und rekombinanter Stämme des Mooses in photoautotrophen Kultivierungen in kleinem Maßstab. Das Wachstum und die Differenzierung der Moose werden bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen wie Mediums- und Gas-Zusammensetzung, Photonenflussdichte (PFD), sowie Zugabe von Pflanzenhormonen untersucht.

Mit den Anfangsdaten aus dem Kolbenmaßstab können Versuche in einem Modell-Photo-Bioreaktor durchgeführt werden. Da dieser Photo-Bioreaktor eine strenge Kontrolle der Kultivierungsbedingungen und eine nahezu homogene Lichtverteilung gewährleistet, können relevante kinetische Daten der Moose bei konstanter PFD ermittelt werden. Hier wird auch der Einfluss der spektralen Lichtverteilung auf das Wachstum, die Differenzierung und die Proteinexpression rekombinanter Moose überprüft. Die Variation der intra- und extrazellulären Phytohormonzusammensetzung während der Kultivierungen und ihr Einfluss auf die Produktionsrate eines Modellproteins (rhVEGF₁₂₁) werden diskutiert.

Rührkessel-Photo-Bioreaktoren, wie der Modell-Photo-Bioreaktor für kinetische Untersuchungen, weisen Schwierigkeiten für ihren Scale-Up auf. Daher werden für große Volumina andere Reaktorgeometrien, die ein hohes Oberfläche-Volumen Verhältnis und demzufolge eine bessere Lichtübertragung an die Moose gewährleisten, bevorzugt. In diesem Sinne wird ein Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor benutzt, um das Verhalten von *Physcomitrella patens* in geometrisch produktionsähnlichen Photo-Bioreaktoren zu untersuchen. Dabei steht die Etablierung von Betriebsbedingungen im Pilotmaßstab für eine langfristige und stabile

Produktion des Zielproteins steht im Vordergrund. Dementsprechend müssen der Zellstress, die Morphologie und die Entwicklung der Moose in Suspension quantifiziert werden. Es werden verschiedene Methoden zur Stabilisierung der Produktionsrate von rhVEGF₁₂₁ im Pilotmaßstab getestet, zum einen die mechanische Kontrolle der Moosmorphologie und zum anderen die Mediumperfusion zur Verdünnung extrazellulärer Pflanzenmetaboliten. Dann werden beide Methoden auf monatelange kontinuierliche Kultivierungen übertragen.

Ausgehend von den Ergebnissen vom kleinen bis zum Pilotmaßstab werden Aspekte über die biotechnologische Nutzung der Moose für die Produktion von Pharmazeutika diskutiert. Das Gewicht der Faktoren, welche die Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens dominieren, wird bewertet. Im Rahmen eines Medikamentenzulassungsverfahrens muss die nötige Menge an Zielprotein für die präklinische Entwicklung produziert werden. Überlegungen zum weiteren Scale-Up für diesen Zweck werden ebenfalls ausgeführt.

2 Grundlagen und Stand der Technik

2.1 *Molecular farming*

Die Produktion von Biopharmazeutika stellt heutzutage einen der wichtigsten und zukunftsorientiertesten Sektoren des Biotechnologiemarktes dar. Unter Biopharmazeutika werden Arzneimittel definiert, deren aktiver pharmazeutischer Bestandteil ein komplexes Molekül aus DNA von genetisch modifizierten, lebendigen Organismen ist. In den letzten Jahren hat sich der Begriff *molecular farming* verbreitet, um die Nutzung transgener Tiere und Pflanzen, sowie deren Zellkulturen als Bioreaktoren zur Produktion rekombinanter Proteine zu definieren (Pinkert and Murray, 1999).

In der Palette der Biopharmazeutika befinden sich rekombinante therapeutische Arzneimittel, Blutproteine, Impfstoffe und monoklonale Antikörper. Obwohl Bakterien, Hefen, Säugetier- und Insektenzellen, Pflanzen oder Tiere übliche Expressionssysteme sind, werden Biopharmazeutika industriell hauptsächlich mittels drei Säugetierzell-Linien produziert: Hybridoma, CHO (*chinese hamster ovary*) und NS0 (*non-Ig secreting myeloma*) (Wurm, 2004). Solche Zellen sind in der Regel sehr schereempfindlich und benötigen komplexe und teure Medien und die Zugabe von Hormonen und Antikörpern, was die Skalierbarkeit und Wirtschaftlichkeit der Produktion beeinträchtigt. Außerdem sind bei Kultivierungen tierischer Zellen der Sauerstofftransport und die Wärmedissipation besonders kritische Faktoren.

Transgene Tiere sind als Alternative zur Kultivierung tierischer Zellen für die Herstellung komplexer Proteine benutzt worden. Das Zielprotein wird im Fall von Säugetieren oft in die Milch sekretiert und dann aufgereinigt. Milch aus transgenen Ziegen, Schafen, Kühen und Kaninchen können bis $5\text{-}30\text{ g l}^{-1}$ menschliche Proteine beinhalten (Werner, 1999). Dennoch weist die Expression von Pharmazeutika mittels transgener Tiere viele Schwierigkeiten auf. Einerseits ist die *time to market* auf Grund des komplexen *screenings* sehr lang, andererseits sind manche humanen Proteine für die Tiere toxisch (Massoud et al., 1996). Mögliche Übertragung von Krankheiten, Viren und Prionen auf das Produkt und dann auf die Patienten sind bisher ungelöste Fragen, die eine Erweiterung solcher Expressionssysteme behindern.

Da die native Proteinsialylierung bei den Hühnern humanidentisch ist, sind in den letzten Jahren viele Versuche unternommen worden, Proteinpharmazeutika aus den Eiern transgener Hühner zu gewinnen (Raju et al., 2000). Trotzdem sind mit diesem System immer noch viele Hürden bezüglich Produktsicherheit und Regulation zu überwinden.

Hollister und Jarvis (2001) haben Baculovirusinsektenzellen (*Sf9 cells*) mit Genen aus Säugetieren transformiert und dadurch eine Variation der nativen Proteinglycosylierung erreicht. Die Wichtigkeit der N-Glycosylierung in Biopharmazeutika wird tiefer in weiteren Kapiteln erläutert. Die transgenen Insekten waren dazu fähig, fremde Glycoproteine mit terminal sialylierten N-Glycanen zu exprimieren. Trotz der vielversprechenden Vorteile dieses Expressionssystems gibt es große Variationen zwischen den einzelnen Generationen und die Insekten können sich einfach mit viraler Kontamination beladen.

Hefen sind immer noch das meist benutzte Expressionssystem für rekombinante Proteine. Die Kultivierungstechnik ist bei Hefen seit langem sehr gut etabliert, wobei hohe Zelldichten und Wachstumsraten erreicht werden können. Die Gentechnik bei Hefen ist die weitest entwickelte bei den Eukaryoten und ihre Anwendung dient als Standard. Außerdem sind inzwischen die Genome zahlreiche Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces waltii*, *Neurospora crassa*,

Schizosaccharomyces pombe, *Yarrowia lipolytica* schon sequenziert. Hefen besitzen keine Endotoxine wie z.B. die Bakterien, und als niedrige Eukaryoten können sie posttranslationale Modifikationen auf Proteinen durchführen. Trotzdem sind die N- und O-gebundenen Oligosaccharidstrukturen der Hefen sehr verschieden von denen aus Säugetieren (Kukuruzinska et al., 1987). Die Folge ist Aktivitätsverlust durch falsche Proteinfaltung. Es sind verschiedene Stämme entwickelt worden, die gezielt Zuckerreste an Glycanstrukturen verschiedener Proteine verbinden können. Die Glycosylierungsmuster aus Hefen sind homogener als die aus tierischer Herkunft (z.B. CHO Zellen), welche Mischungen aus verschiedenen Glyco-Formen erzeugen (Yuen et al., 2003). Der Einfluss radikaler Änderungen der Glycosylierungsmuster auf die Proteinsekretion bei Hefen ist jedoch noch unklar.

In den letzten Jahren sind auch Ciliaten, einzellige Eukaryoten, als Expressionssystem für therapeutische Proteine untersucht worden. Sie sind in der Lage komplexe, posttranslationale Modifikationen wie Disulfur-Brücken, Phosphorylierung, Acetylierung und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker durchzuführen. Dadurch können vorteilhaft komplexe Medikamente produziert werden (Tiedtke, 2001). Außerdem können Ciliaten große Mengen an Proteinen exprimieren und sekretieren, was ein wirtschaftliches Argument für ihre Anwendung in Therapeutika darstellt. Trotzdem gibt es bis heute keine Veröffentlichung, die die Entwicklung und Funktionalität von Zielproteinen aus Ciliaten dokumentiert.

2.1.1 Pflanzliche Expressionssysteme

Zahlreiche Pflanzen-Derivate und sekundäre Metaboliten weisen therapeutische Eigenschaften auf, beispielweise werden Shikonin, Ginseng und Paclitaxel (Taxol[®]) im kommerziellen Maßstab für die Krebstherapie produziert (Tabata, 2004). Die Anwendung von Pflanzen als Expressionssystem bietet neue Möglichkeiten für die Herstellung von Proteinpharmazeutika. Ihr Einsatz in dieser Branche ist nicht mehr neu und kann eine sichere, wirtschaftliche und effiziente Alternative zur Kultivierung tierischer Zellen bieten. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms, zusammen mit anderen innovativen Techniken der Molekularbiologie, die so genannten *Omic*s, haben die Expression rekombinanter menschlicher Proteine in Pflanzen seit rund 20 Jahren ermöglicht. Die erste Generation stabiler transgener Pflanzen für die Produktion fremder Proteine ist auf Anfang der 80er Jahre datiert (Horsch et al., 1985). Der erste funktionelle Antikörper aus Pflanzen wurde 1989 in Tabak exprimiert. Seitdem werden immer mehr Proteine in verschiedenen Pflanzen produziert (Ma et al., 2003).

Produktion in offenen Systemen

In den letzten Jahren stehen klassische Feldanbaupflanzen wie Mais, Tabak, Reis und Soja im Mittelpunkt der Entwicklung von *plant-made pharmaceuticals* im großen Maßstab. Die niedrigen Investitionskosten, die vorhandene landwirtschaftliche Infrastruktur und die einfache Skalierbarkeit machen den Feldanbau rekombinanter Pflanzen attraktiv. Dagegen sprechen dennoch lange Entwicklungszeiten, Produktheterogenität, hohe Aufreinigungskosten und besonders schwierige Prozessvalidierung (Ma et al., 2003; Fischer et al., 2004). Das Risiko horizontalen und vertikalen Gentransfers mit genetisch modifizierten Organismen

(GMO) und ihre ökologischen Folgen sind ungelöste Aspekte, welche die Akzeptanz des Publikums immer noch eindämmen. Dazu ist das Bewilligungsverfahren für neuen Anbaufelder von GMO's, wenigstens in Europa, zeitintensiv.

Tabak ist die meist genutzte Pflanze für die Herstellung rekombinanter Proteine. Sie bringt eine hohe Biomasseproduktion (bis 100 ton ha⁻¹), und als Standardpflanze für *molecular farming* ist die Technologie zur Transformation und Expression sehr gut entwickelt. Da Tabak keine Nahrungspflanze ist, wird das Risiko einer Kontamination der Nahrungskette eingeschränkt. Jedoch sind die Akkumulation von Alkaloiden und die Bildung phenolischer Substanzen in den Blättern vieler Tabakarten besonders für den Downstream-Process von Nachteil (Fischer et al., 1999). Falls die Proteine in den Blättern exprimiert werden, sind die Lagerfähigkeit des Materials und die Stabilität der Proteine bis zur Aufreinigung mögliche *bottle-necks* für das Verfahren. Luzerne, Sojabohne und Salat weisen auch eine hohe Produktivität pro angebaute Fläche auf und werden auch für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt (Horstmann, 2004).

Die Proteinakkumulation und die Lagereigenschaften werden erheblich verbessert, wenn die Expression der Zielproteine im Endosperm der Samen stattfindet. Getreide und Leguminosen bieten hier Vorteile (Stoger et al., 2000). Leider ist der Pollentransfer ein bisher unkontrollierter Faktor in offenen Systemen. Mais, Reis und Weizen sind heutzutage Beispiele für die erfolgreiche kommerzielle Produktion von Proteinpharmazeutika, u.a. Avidin, β -Glucuronidase und mehrere Antikörper (Fischer et al., 2004).

Zur Produktion von oralen Impfstoffen und Antikörpern (*edible vaccines*) ist eine wachsende Tendenz das Targeting relevanter Proteinen in essbaren Speicherorganen von Obst und Gemüse, z.B. Kartoffel, Tomate oder Banane, (Sala et al., 2003). Die hitzelabile Toxin B-Untereinheit enterotoxinbildender *E. coli* Bakterien (ETEC) und das Kapsidprotein des Norwalk-Virus werden in Kartoffeln exprimiert und befinden sich bereits im klinischen Test (Tacket et al., 2000). Bei Oleaginosen ist es möglich, das Zielprotein an die Oleosine des Samens zu fusionieren, um eine vereinfachte Aufreinigung des Proteins zu erzielen, wie z.B. bei Raps (Moloney, 2002).

Produktion in geschlossenen Systemen

Die Produktion interessanter rekombinanter Proteine mittels Pflanzen kann auch in Gewächshäusern mit ähnlichen Methoden wie beim freien Feldanbau stattfinden. Dadurch wird der Kontakt mit der Umgebung minimiert und die Chancen für die Bewilligung der Produktionsstrategie vor den Behörden e.g. FDA erhöht. Dagegen können zusätzliche Investitionen für geschlossene Systeme gravierende Nachteile für die Wirtschaftlichkeit des Projektes bedeuten (Decker und Reski, 2004). Verschiedenen Firmen haben jedoch Produktionsplattformen für Proteinpharmazeutika in Gewächshäusern oder ähnlichen Containern mit Luzerne und Wasserlinse entwickelt (Schaaf, 2004).

Eine Variante geschlossener Pflanzensysteme ist die hydroponische Kultivierung, wobei die hängenden Wurzeln von flüssigem Kulturmedium umströmt werden. Bei Tabak ist es gelungen, dass die Proteine durch die Wurzeln sekretiert und dann mit dem Medium transportiert werden. Dieses Rhizosekretionsverfahren ermöglicht eine einfache und kontinuierliche Aufreinigung des Produkts (Gaume et al., 2003).

Produktion in vitro

Die Kultivierung pflanzlicher Zellen in Bioreaktoren ermöglicht eine verbesserte Kontrolle der Produktionsvariablen und begrenzt den Einfluss externe Faktoren e.g. Tag-Nacht Zyklen, Jahreszeiten, Bodenqualität, Wetter und Lichtregime. Monoseptische Bedingungen im Reaktor sind Voraussetzungen für die Produktion nach den cGMP-Richtlinien (*current good manufacturing practice*) und dementsprechend für die spätere weltweite Vermarktung der pharmazeutischen Produkte (Fischer et al., 2004). Es sind zahlreiche Methoden für die *in vitro* Kultivierung (photoautotroph und heterotroph) für pflanzliche Zellen beschrieben worden: Suspensionskultivierung, immobilisierte Zellen, *hairy roots*, *shooty teratoma* und Oberflächekultivierungen (Baur, 2005).

Kommerziell bedeutend sind besonders Suspensionskultivierungen von Tabak-, Soja-, Tomaten-, und Reiszellen für die Produktion von Antikörpern und Fusionsproteinen (Fischer et al., 2004). Da die Suspensionskultivierungen höherer Pflanzen in der Regel aus Kalluszellen generiert werden, entstehen zusätzliche System- und Prozess-Komplikationen aufgrund der Zellagglomeration, der hohen Zellempfindlichkeit und der genetischen Instabilität durch somaklonale Variation. Aus Tabak- und Sonnenblumen-Kalli ist e.g. humanes Somatotropin und Aprotinin hergestellt worden (Fischer et al., 1999).

Eine alternative Lösung ist die Kultivierung von Pflanzengewebe oder ganzen Pflanzen in Suspension. Solche Expressionssysteme können optimiert werden, in dem das Zielprotein sekretiert wird. Dadurch wird der Downstream-Process stark vereinfacht, da mehrere Trennverfahren wie Zellaufschluss und unnötige Extraktionen vermieden werden können. Nachteile dabei sind Produktverdünnung und große Medienvolumina. Die Downstream-Process-Ausbeuten sind höher, wenn die Proteine aus zellfreien Extrakten aufgereinigt werden anstatt aus ganzen Zellextrakten (Doran, 2000). Unerwünschte intrazelluläre Metaboliten wie Proteasen können nicht nur die Produktausbeuten beeinträchtigen sondern auch die Produktaktivität. In diesem Fall können Proteaseinhibitoren in den Bioreaktor zugegeben werden. Ihre Wirkung in weiteren Purifikationschritten ist jedoch in der Regel nicht zu vernachlässigen und ihre Anwendung muss deshalb vorsichtig betrachtet werden. Auch die Adsorption der Zielproteine an den Reaktorwänden kann unter Umständen problematisch sein. Hier kann die Kontaktfläche des Reaktors beschichtet oder inaktiviert werden, um den Proteinverlust zu minimieren.

Obwohl die Suspensionskultivierung pflanzlicher Zellen eine hohe Reproduzierbarkeit und einfaches Scale-Up aufweist, liegen die Proteinausbeuten normalerweise weit unter denen von Tierzellen (Schillberg et al., 2003). Die Optimierung der Proteinregulation durch induzierbare Promotoren und die Verstärkung der Sekretionssignale haben positive Effekte auf die Ausbeute mancher Proteine in mehreren Gastorganismen gezeigt (Fischer et al., 2004).

Zusätzlich zu den bisher erwähnten stabil transformierten Pflanzenexpressionssystemen wird die transiente Expression in Geweben oder Zellen häufig angewendet. Ihre Einführung ist dennoch nicht als Substitut der stabilen Expression gedacht sondern als Komplement zur flexibeln und schnellen Evaluation eines neuen Produkts oder regulatorischer Sequenzen (Horstmann, 2004).

Eine Alternative zur Integration des Transgens ins Kerngenom ist die Plastidentransformation. Sie wurde bisher in verschiedenen Arten wie Tabak, Karotte und Tomate mit mäßigem Erfolg getestet. Ihr Vorteil liegt darin, dass eine hohe Kopienzahl des Transgens erzielt werden kann. In Plastiden können Produktausbeuten von bis 25 % der gesamten löslichen Proteine erreicht werden. Dagegen ist diese Ausbeute durchschnittlich bei

nuklear transgenen Pflanzen nur 0,1-1,0 % (Twyman et al., 2003). Es wurde nachgewiesen, dass oligomere Proteine in Chloroplasten korrekt assembliert und gefaltet werden können, wie beim Beispiel der Untereinheit B des Cholera-toxins. Trotzdem besitzen die Plastiden keine Glykosylierungsmaschinerie und deswegen ist ihre Anwendung zur Produktion komplexer Proteine unwahrscheinlich (Schaaf, 2004).

2.2 Protein N-Glycosylierung

Die Entscheidung über die richtige Produktionsplattform ist von der Größe, Struktur und Komplexität des Proteins abhängig. Bakterielle Expressionssysteme sind besonders geeignet für die Herstellung kleiner und einfacher Proteine, wie Insulin. Manche Proteine setzen die Anwesenheit bestimmter Zucker auf der Peptidkette für ihre biologische Aktivität voraus. Diese Zuckerreste beeinflussen u.a. die Löslichkeit, Denaturierung, proteolytische Degradation, Halbwertszeit im Blut, sowie die Protein-Faltung und pharmakokinetische Aktivität von Proteinpharmazeutika (Coloma et al., 2000). Medikamente wie Alpha-Interferon oder manche Wachstumsfaktoren mit mangelhafter Proteinglycosylierung können geringe biologische Wirkung aufweisen. Bei anderen Proteinpharmazeutika wie Erythropoietin (EPO), ist eine korrekte Glycosylierung die Voraussetzung für ihre Aktivität. Sogar komplexe eukariotische Proteine, die mittels CHO-Zellen exprimiert werden, (e.g. Blutgerinnungsfaktor IX) besitzen leichte posttranslationale Unterschiede (Sulfation und Phosphorylierung) gegenüber dem menschlichen Plasmaprotein. Trotzdem haben diese Variationen hier keine große Wirkung auf den Aktivitätsspiegel (Bond et al., 1998).

Glycoproteine aus pflanzlichen Systemen besitzen eine den menschlichen Proteinen ähnelnde N-Glycanstruktur im Vergleich zu denen aus Hefen oder filamentösen Pilzen. Obwohl nur kleine Abweichungen in der Abfolge und Positionierung verschiedener Zuckerreste zwischen dem nativen Glycosylierungsmuster von Pflanzen und Säugetieren vorhanden sind, können sie allergische Reaktionen hervorrufen (Westphal et al., 2003; Baur, 2005). Die wichtigen Unterschiede der Glycanstruktur zwischen Pflanzen und Säugetieren sind in der Abbildung 2.1 illustriert.

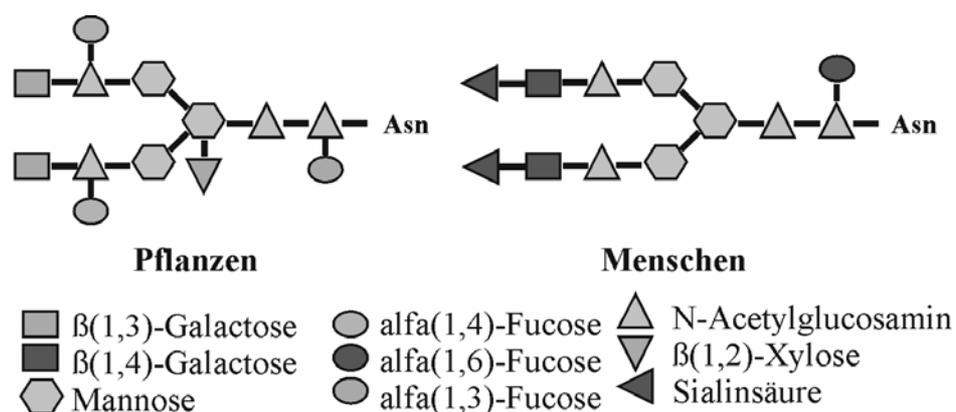


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des typischen Proteinglycosylierungsmusters von Pflanzen und Menschen (Huether et al., 2005)

In Pflanzen startet die N-Glycosylierung im endoplasmatischen Retikulum mit der Bindung eines transitorischen Oligosaccharids an den Asparaginrest des Proteins. Die Reifung

pflanzlicher Glykanstrukturen erfolgt ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, wobei verschiedene Glykanreste allmählich an Oligosaccharide angehängt werden. Die Reifung pflanzlicher und tierischer N-Glykane verläuft anders erst im trans-Golgi-Apparat. Säugetiere und Pflanzen besitzen einen identischen N-Glycankern aus Mannose- und N-Acetylglucosaminresten. Im Gegensatz zu Pflanzen haben Säugetiere auch einen α -1,6-Fucose-Rest sowie terminale Galactose und Sialinsäure. Pflanzen besitzen zwar keine der genannten Residuen, sie haben aber α -1,3-Fucose und β -1,2-Xylose (Huether et al., 2005; Lerouge et al., 1998). Durch die so genannte Humanisierung des pflanzlichen Glycosylierungsmusters wird versucht, eine Anpassung der N-Glykanstrukturen zu erreichen. Somit soll die Allergenizität reduziert und die Funktionalität des Zielproteins verbessert werden (Baur, 2005). Im Abschnitt 2.5 wird die Humanisierung der Glycosylierung im Detail diskutiert.

2.3 Ökonomische Aspekte

Die Produktion von Proteinpharmazeutika benötigt erhebliche Investitionen, da ihre Herstellung bisher nur durch Biosynthese möglich ist. Durchschnittlich betragen die Kosten für die Entwicklung von einem pharmazeutischen Wirkstoff ca. 560 Millionen US\$ (DiMasi, 2006), daher entstehen sehr hohe Preise pro Milligramm pharmazeutisches Protein. Während die Produktionskosten mehrerer „chemischer“ Moleküle um die 5 US\$ pro Gramm liegen, kostet die Herstellung therapeutischer Proteine mittels bakterieller Systeme zwischen 100 US\$ und 1000 US\$ pro Gramm.

Viele Autoren schätzen die Produktionskosten rekombinanter Proteine mit Pflanzen (Freiland) auf 2 – 10 % derer durch mikrobielle Fermentation, und auf 0,1 % derer von Säugerzellkulturen. Trotz der hohen Ausgaben für neue *facilities* und der langen Produktentwicklungszeit befinden sich die Herstellung und der Markt von Biopharmazeutika in ständigem Wachstum (Giddings, 2001). Das prognostizierte gesamte Marktvolumen für Pharmazeutika im Jahr 2006 wird 550 Mrd. US\$ erreichen, davon ca. 13 % aus Biopharmazeutika. Das geschätzte Marktvolumen der Auftragsherstellung von Pharmazeutika beträgt 4,3 Mrd. US\$. Hierbei steigt auch der Anteil von Medikamenten aus biologischen Herstellungsverfahren bis zur 85 % (Baur, 2005).

Allein der Markt der so genannten Neuroprotektiva gegen Krankheiten wie Alzheimer, Multiple Sklerose oder Schlaganfall, mit guten 10 Millionen Patienten in den USA und Europa, wird für das Jahr 2010 auf 11,5 Mrd. US\$ geschätzt (Research and Markets; Report: Neuroprotection-Drugs, Markets and Companies). Nicht selten werden die Prognosen für den Konsum von Medikamenten zu gering eingeschätzt. Leider ist die Kapazitätserweiterung keine einfache Aufgabe für die pharmazeutischen Firmen und die Zeitspanne bis zur Inbetriebnahme von Produktionsanlagen e.g. mit Säugerzellen kann äußerst lang sein (Werner, 2004).

2.4 Moose

Moose stellen eine der ältesten Gruppen der Landpflanzen dar. Ihren Ursprung haben sie vor ca. 500 Millionen Jahren und sind heutzutage mit ca. 20.000 – 26.000 Arten vertreten. Sie gehören zur Abteilung der Bryophyta, ihre Morphologien und Lebenszyklen unterscheiden sich erheblich von denen der Blütenpflanzen. Moose bevorzugen meist feuchte, schattige

Standorte, obwohl einige spezialisierte Formen auch in extremen Höhenlagen über der Baumgrenze, in Wüstengebieten oder in der Antarktis zu finden sind (Frahm und Frey, 2004). Einige Vertreter sind aquatisch, jedoch gibt es keine marinen Arten. Aufgrund ihrer Plastidenfarbstoffe werden die Moose von den Grünalgen abgeleitet. Ihre Anatomie ist komplexer als die der Algen, jedoch einfacher als die der vaskulären Pflanzen. Es wird zwischen drei Klassen von Moosen unterschieden: Laubmoose, Hornmoose und Lebermoose.

Die Hornmoose und viele der ursprünglicheren Lebermoose zeigen eine thallose Organisation. Ihr Vegetationskörper besitzt noch keine klare funktionelle Differenzierung in Sproßachse, Blätter und Wurzelsystem, wie es bei den Kormophyten üblich ist. Die Organisationsform wird Thallus genannt und entspricht einem lappigen Gebilde, das flach dem Boden anliegt und sich mit wurzelähnlichen Gebilden, den Rhizoiden, am Untergrund verankert. Echte Wurzeln sind nicht vorhanden (Sitte et al., 2002).

Die höher entwickelten Laubmoose lassen hingegen eine Differenzierung in Stämmchen und Blättchen erkennen. Bei diesen Vegetationskörpern spricht man von foliosen Formen. Da die Moose keine echten Gewebe zur Wasserleitung (Phloem und Xylem) besitzen, werden Wasser und Nährstoffe über die gesamte Oberfläche aufgenommen.

Die Anpassung an das Landleben ist bei den Moosen in mancher Hinsicht recht unvollkommen. So besitzen Moose im Gegensatz zu den höheren Pflanzen keine speziellen Gewebe, die sie vor Austrocknung schützen (z.B. Cuticula). Im Gegensatz dazu überstehen sie längere Trockenperioden und völlige Austrocknung, ohne Schaden dabei zu nehmen. Bei der Fortpflanzung ist Wasser unbedingt notwendig, da sich die Spermatozoiden schwimmend zur Eizelle fortbewegen, um diese zu befruchten.

Das Wachstum, die Aktivität und die Differenzierung der Mooszellen werden durch Wachstumsfaktoren und durch intrazelluläre Botenstoffe (z.B. Ca^{++}) gesteuert. Die Wachstumsrichtung der Moose ist unter anderem durch Licht (Phototropismus) und Schwerkraft (Gravitropismus) beeinflusst (Lüttge et al., 1994).

2.4.1 Lebenszyklus der Bryophyta

Die Moose sind durch einen typischen heteromorphen und heterophasischen Generationswechsel gekennzeichnet. Heteromorph bedeutet einen Unterschied im Erscheinungsbild zwischen dem Gametophyten und dem Sporophyten. Gametophyt ist die Generation, die sich vegetativ fortpflanzt. Sporophyt ist dagegen die sexuelle Generation.

Heterophasisch bedeutet eine Veränderung in der Kernphase während des Entwicklungszyklus. Der Gametophyt ist haploid und besitzt nur einen einfachen Chromosomensatz, während der Sporophyt den doppelten Chromosomensatz aufweist, also diploid ist. Gelangen die haploiden Sporen in ein günstiges Milieu mit genügend Licht und Feuchtigkeit, keimen sie zu einem aus einer einfachen Zellreihe bestehenden, mehrfach verzweigten Faden, dem Protonema, aus (siehe Abbildung 2.2). Protonema bestehen aus zwei Arten von Zellfäden. Die Chloronema sind gekennzeichnet durch rechtwinklige Querwände zwischen den Zellen, die eine große Anzahl von rundlichen Chloroplasten besitzen. Ihre hauptsächliche Funktion ist die Photosynthese.

Caulonema haben schräg stehende Querwände und enthalten weniger Chloroplasten, deren Form eher oval ist. Caulonemazellen sind etwas länger als Chloronemazellen und dienen in erster Linie der Verbreitung der Pflanze (Reski, 1998). Am Caulonema entstehen als seitliche

Auswüchse vielzellige Knospen oder „Buds“, die dann zu den eigentlichen Moospflanzen auswachsen. Diese entsprechen bei thallosen Moosen dem oben erwähnten lappigen „thallosen“ Gebilde, bei foliosen Moosen ist der Vegetationskörper gegliedert in Stämmchen und Blättchen (junge Gametophor). Die Protonema, also auch die Moospflanze sind haploid und repräsentieren den Gametophyt. Dieser erfährt somit einen Gestaltenwechsel, ist also dimorph, ohne dass damit ein Wechsel der Generation oder der Kernphase verbunden wäre.

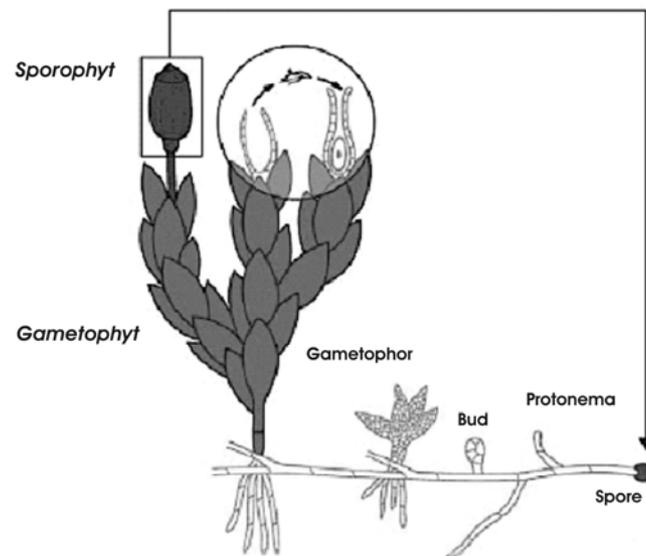


Abb. 2.2: Darstellung des Lebenszyklus eines Mooses anhand vom Laubmoos *Physcomitrella patens* (Frank et al., 2005)

Auf den Gametophoren entstehen die Gametangien (Geschlechtsorgane), die männlichen Antheridien und die weiblichen Archegonien. Die Antheridien stellen keulenförmige Gebilde dar, in deren Innern sich aus spermatogenem Gewebe durch Mitose Spermatozoiden, die männlichen Geschlechtszellen, bilden. Die Spermatozoiden bestehen hauptsächlich aus Kernmaterial und einem kleinen Cytoplasmarest. Sie tragen zwei Geißeln, mit deren Hilfe sie sich im Wasser zur Eizelle fortbewegen können (Sitte et al., 2002).

Die weiblichen Archegonien sind flaschenförmig, wobei der Bauchteil als sterile Hülle die Eizelle einschließt. Nach Heranreifen der Geschlechtsorgane erfolgt die Befruchtung, indem die chemotaktisch angelockten Spermatozoiden in den Hals des Archegoniums eindringen und eines mit der Eizelle zur diploiden Zygote verschmilzt. Die Zygote keimt zum Sporophyten (Sporogon) heran, der in der Moospflanze verankert bleibt und zum Teil auch von dieser ernährt wird. Der Sporophyt ist diploid und verkörpert die zweite Generation innerhalb des Generationswechsels.

Während seiner Entwicklung wächst der Sporophyt in die Höhe bis er sich schließlich in einen Fuß, einen Stiel (Seta) und eine endständige Sporenkapsel (Sporangium) gliedert. In der Sporenkapsel erfolgt durch Reduktionsteilung sporogener Zellen die Bildung der haploiden Sporen, die wiederum ins Freie entlassen werden. Die Sporen der Moose dienen vor allem der Vermehrung und der Verbreitung. Aber auch auf vegetativem Weg können sich Moose sehr wirkungsvoll vermehren. So wachsen abgetrennte Pflanzenteile und Zellfragmente wieder zu vollständigen Moospflänzchen heran. Die Zellen zeigen eine weitgehende Totipotenz (Lüttge et al., 1994).

Beim Generationswechsel der Moose dominiert die haploide Generation. Der Sporophyt lebt

dagegen ständig auf dem Gametophyten, führt also noch kein richtiges Eigenleben. Im Laufe der Evolution zu den höheren Pflanzen werden sich diese Verhältnisse umkehren.

2.4.2 Zellwachstum und Differenzierung der Bryophyta. Fall *Physcomitrella patens*

Die Differenzierung wird als Übergang von einem Stadium des Lebenszyklus in einen anderen definiert. Zum Beispiel der Übergang von Chloronema in Caulonema, Entwicklung von Buds, Entstehung von Gametophoren usw. Die verschiedenen Formen der Moosprotonema unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern auch physiologisch (Reski, 1998). Durch Wachstum und Differenzierung ändert sich die äußere Form des Mooses: Größe, Verzweigungsgrad und räumliche Konfiguration. Die Differenzierung und Morphologie der Moose kann durch mehrere Faktoren e.g. die Lichtqualität, die Energiezufuhr (Licht oder Glucose), Anwesenheit von Phytohormonen oder deren Antagonisten beeinflusst werden. Die Wechselwirkungen dieser Faktoren werden in den nächsten Abschnitten kurz anhand des Laubmooses *Physcomitrella patens* beschrieben. Seine Rolle als Modellorganismus wird auch im Abschnitt 2.5 erläutert.

Rolle des Lichts

Als photoautotrophe Organismen benötigen Moose Licht als Energiequelle, eine C-Quelle als Substrat und ein einfaches Mineralmedium. Durch Photosynthese werden Licht und CO₂ in chemische Energie und Kohlenhydrate umgewandelt. Moose besitzen verschiedene Pigmente (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotenoide) für eine effiziente Gestaltung der Lichtabsorption. Bei der Photosynthese laufen komplexe biochemische Prozesse ab. Die Photosynthese besteht aus einer Lichtreaktion und einer Dunkelreaktion, die auch als Primär- bzw. Sekundärreaktion bezeichnet werden. In der Lichtreaktion entstehen zunächst unter Nutzung von Lichtenergie chemische Energie in Form von ATP und ein Reduktionsmittel (NADPH). ATP und NADPH werden in der anschließenden Dunkelreaktion genutzt, um Glucose zu erzeugen. Dabei wird Kohlendioxid CO₂ mit ATP als Energiequelle und NADPH als Reduktionsmittel zu Glucose und Wasser umgesetzt. NADPH gibt bei diesem Vorgang den von ihm transportierten Wasserstoff und ein Elektron an das Kohlendioxid ab und wird selbst zum NADP⁺ oxidiert. Bei Pflanzen findet die Synthese von Glucose in den Chloroplasten statt. Die lichtabhängigen Reaktionen erfolgen in den Thylakoiden und die lichtunabhängige Dunkelreaktion im Stroma (Pfister und Lichtenthaler, 1978). Die allgemeine Synthesegleichung für die Photosynthese kann wie folgt zusammengefasst werden:

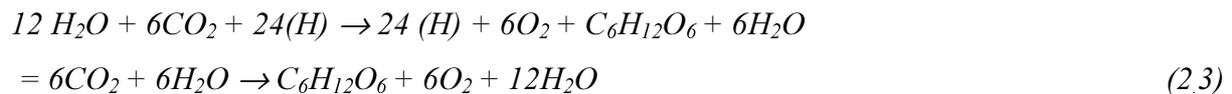
Teilgleichung Lichtreaktion :



Teilgleichung Dunkelreaktion:



Gesamte Photosynthese:



Diese Form der Photosynthese wird wegen der Bildung von molekularem Sauerstoff O_2 als oxygene Photosynthese bezeichnet. Sie wird von Cyanobakterien und allen eukaryotischen phototrophen Lebewesen betrieben.

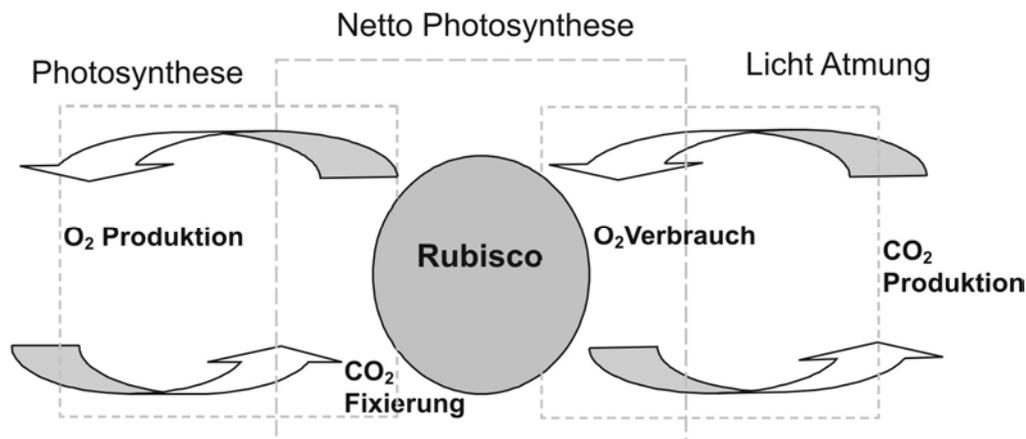


Abb. 2.3: Schema der Netto Photosynthese bei Pflanzen. Netto Photosynthese = Photosynthese - Atmung

Die üblicherweise genannte CO_2 -Fixierung beschreibt die Netto Photosynthese. Sie wird als die Differenz zwischen der „echten“ Photosynthese und der Licht-Atmung definiert (siehe Abbildung 2.3). In grünen Pflanzen ist das Enzym Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) für beide Vorgänge verantwortlich. In Dunkelperioden betreiben Pflanzen die so genannte Dunkelatmung (Gleichung 2.4).



Hier werden u.a. Kohlenhydrate oxidiert, um Energie bereitzustellen (Lawlor, 1990).

Einfluss der Lichtqualität und der Lichtintensität

Unter einer Vielfalt von Einflussfaktoren spielt die Lichtqualität eine wichtige Rolle in der Regulation physiologischer Prozesse bei Moosen. Viele ihrer Lichtsysteme sind dennoch nicht direkt an der Photosynthese beteiligt und haben u.a. eine sensorische Funktion. Verschiedene Wellenlängen (rot; langwelliges rot; blau; UV-A, 320 nm - 400 nm; UV-B, 280 nm - 320 nm) rufen jeweils gezielte Antworten hervor. Die Mechanismen, die das Zusammenspiel der Lichtrezeptoren (Phytochrome, Cryptochrome und UV-B-Photorezeptoren) steuern, sind dennoch umstritten. Beispielweise wurde ein Zusammenhang zwischen der Permeabilität der Zellmembran und zwei Formen von Phytochromen (P_r mit Absorptionsmaximum bei 660 nm und P_{fr} mit Absorptionsmaximum bei 730 nm) nachgewiesen (Smith, 1975). Dabei könnten biotechnologische und verfahrenstechnische

Vorteile für Proteinsekretionsvorgänge bei Moosen hervorgerufen werden.

Die kurzzeitigen Effekte monochromatischen Lichts auf das Wachstum, die Differenzierung und die Morphologie von *Physcomitrella patens* auf festen Nährmedien werden von mehreren Autoren qualitativ beschrieben. Unter Weißlicht entsteht eine komplexe Interaktion verschiedener monochromatischer Photorezeptoren. Uenaka et al., (2005) beschreiben synergetische Effekte blauen und roten Lichts auf die Entstehung von Verzweigungen und deren Positionierung. Obwohl rotes Licht allein die Verzweigung nur schwach induziert, verstärkt es den induzierenden Effekt blauen Lichts. Die Lokalisierung von Verzweigungen wird von beidem, rotem und blauem Licht, beeinflusst. Versuche von Kasahara et al., (2004) bestätigen, dass der Phytochromkomplex überwiegend beim Wachstum unter rotem Licht und in der Dunkelheit gebildet wird und im Weißlicht fehlt.

Rotes Licht allein fördert die Entstehung von Verzweigungen und das Anschwellen apikaler Zellen bei in Dunkelheit adaptierten *Physcomitrella patens* Protonema (Russell et al., 1998). Hartmann and Weber, (1990) berichten über eine normale Entwicklung von *Physcomitrella patens* im roten Licht trotz unregelmäßiger Verzweigung der Chloronema. Rotes Licht verstärkt auch die Entstehung von Buds. Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 730 nm inhibiert diesen Vorgang.

Blaues Licht hemmt den Übergang von Chloronema in Caulonema und die Entstehung von Buds. Es favorisiert ebenso die Entwicklung von Gametophoren aus Buds. Eine Erklärung dafür kann die Blockierung der Expression von auxinaktivierenden Genen unter blauem Licht in *Physcomitrella patens* sein (Imaizumi et al., 2002). Außerdem kann die Bestrahlung mit blauem Licht eine Erhöhung der Konzentration von Ca^{2+} (wichtig für die Zellteilung) im Zytoplasma, sowie Variationen des Membranpotentials und der Phosphorylierung von membrangebundenen Proteinen hervorrufen (Russell et al., 1998). Mit UV-A wird zugleich eine Zunahme der Konzentration von Ca^{2+} in der Zelle erzielt. Eine 24-stündige Bestrahlung mit $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist für die Induzierung von Verzweigungen durch blaues Licht notwendig (Uenaka et al., 2005).

Morphologische Änderungen und manche Differenzierungsereignisse können je nach Photonenflussdichte (PFD) produziert werden. Ab einer PFD von $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ berichten Thelander et al., (2005) eine Beschleunigung ins Caulonemastadium. Für die Entstehung von Buds aus Caulonema ist möglicherweise eine bestimmte Mindestenergie-dosis erforderlich (Hartmann und Jenkins, 1984).

Phytohormone

Verschiedene Gruppen von Phytohormonen sind bei *Physcomitrella patens* nachgewiesen und ihre physiologische Wirkung beschrieben worden e.g. Auxine, Cytokinine und Abscisinsäure (Bopp, 1990). Die Effekte bestimmter Phytohormone dürfen jedoch nur unter Berücksichtigung der Umweltbedingungen (zu denen die Lichtqualität und Intensität und die Konzentration von anderen Phytohormonen und deren Antagonisten gehören) betrachtet werden.

Auxine

Zur Gruppe der Auxine gehören chemisch unterschiedliche Phytohormone, die bei höheren

Pflanzen Streckungswachstum, Seitenwurzelbildung und Apikaldominanz induzieren. Das natürlich vorkommende Auxin im *Physcomitrella patens* ist die Indol-3-Essigsäure (IAA) (siehe Abbildung 2.4 A). Bei der exogenen Zugabe von Auxinen reagiert *Physcomitrella patens* mit der Ausdehnung von Protonema und Gametophorenblättern. Bei einer Auxin-Konzentration höher als 2,5-5,0 μM wird das Wachstum chloronemaler Filamente inhibiert und die Bud-Entwicklung unterdrückt (Bierfreund et al., 2003). Außerdem wird die Entstehung von chloronemalen Verzweigungen auf Caulonema gehemmt. Eine höhere Konzentration an Auxin favorisiert die Bildung von Rhizoiden (Ashton et al., 1979). Auxin in niedriger Konzentration ($<2,5 \mu\text{M}$) fördert den Übergang von Chloronema in Caulonema (Cove et al, 1991).

Die Auxine sind nicht nur in freier Form in den Moosen vorhanden, sondern auch als Konjugate. Sztein et. al. (1999) fanden 5-8 ng g^{-1} freier IAA (ca. 10 % des gesamten IAA-Gehalts), 2-5 ng g^{-1} von IAA-Ester-Konjugaten (ca. 6 %) und 33-71 ng g^{-1} von Amidkonjugaten (84 % des IAA-Gehalts). Da der Großteil von IAA in gebundener Form vorliegt, werden die analytischen Methoden aufwendig. Ashton et al. (1985) veröffentlichten niedrige Niveaus endogener IAA in *Physcomitrella patens* mittels GC-MS: 2,1 ng g^{-1} bzw. 75 ng g^{-1} , wobei die IAA- Konjugaten nicht erfasst wurden.

In den Experimenten von Reutter et al., (1998) wurde mittels der HPLC-ELISA-Methode ein IAA-Gehalt von 77 pM g^{-1} bei *Physcomitrella patens* gefunden. Dabei war es nicht klar, ob hier nur die freie IAA gemessen wurde. In Suspensionskultivierungen von *Physcomitrella patens* wurde mehr als 90 % der gesamten Auxine im Medium gefunden (Hohe und Reski, 2005a).

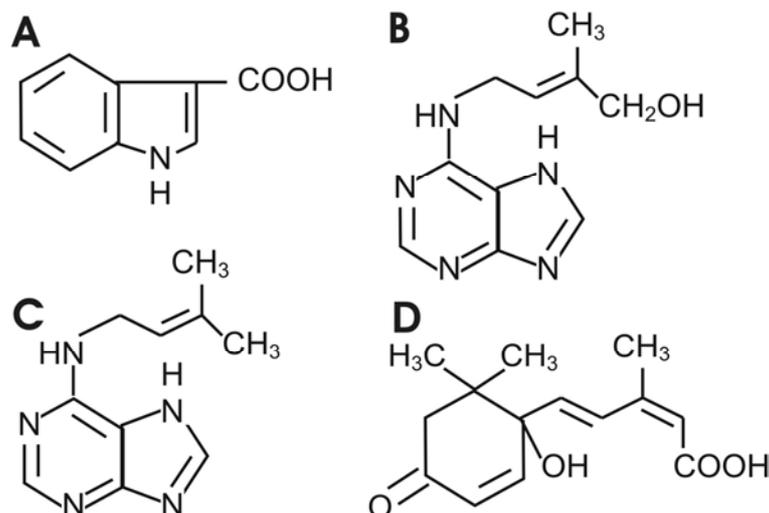


Abb. 2.4: Chemische Struktur der (A) Indol-3-Essigsäure, der Cytokinine (B) $N(6)$ -(Δ^2 -isopentenyl)adenine (i^6 Ade) und (C) Zeatin, und der (D) Abscisinsäure

Cytokinine

Die Hormone dieser Gruppe besitzen eine ähnliche chemische Grundstruktur und spielen eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Zellteilung sowie bei anderen Entwicklungsprozessen bei höheren Pflanzen (Schopfer und Brennicke, 1999). Bei *Physcomitrella patens* wurden folgende Phytohormone der Cytokiningruppe gefunden: i^6 Ade (N^6 -(Δ^2 -iso-pentenyl)-adenine), Zeatin (siehe Abbildung 2.4 B und C) und Zeatinglucoside (Bhatla und Dhingra-Babbar S, 1990).

Cytokinine fördern die Entstehung von Verzweigungen bei Caulonema und Chloronema und stimulieren die Teilung von Chloroplasten (Wang et al., 1981). Sie inhibieren den Übergang von Chloronema in Caulonema und favorisieren die Entstehung von Buds auf caulonemalen und chloronemalen Filamenten. In hohen Konzentrationen unterdrücken sie das Wachstum und die Bildung von Rhizoiden, dagegen rufen sie die Formation von kallusähnlichem Gewebe hervor (Ashton et al., 1979).

Die Cytokinine können bei *Physcomitrella patens* sowohl in Form freier Moleküle als auch als Teil der tRNA vorliegen (Bopp, 1990). Das Verhältnis zwischen freien und gebundenen Formen wurde bisher noch nicht dokumentiert. Schulz et al. (2000) fanden eine Konzentration von $i^6\text{Ade}$ mittels HPLC-ELISA um die 27 pM im Medium und $1,8 \text{ pg g}^{-1}$ intrazellulär. In Kultivierung betrug das Konzentrationsmaximum der $i^6\text{Ade}$ 90 pM und das Minimum 21 pM, wobei starke Variationen beobachtet wurden. In weiteren Experimenten von Schulz et al., (2001) mit Zugabe von Diammonium-Tartrat wurde eine $i^6\text{Ade}$ -Konzentration im Medium von 30 pM ebenfalls mittels HPLC-ELISA gemessen. Laut Reutter et al., (1998) lag der Gehalt von $i^6\text{Ade}$ in *Physcomitrella patens* bei ca. 24 pg g^{-1} , wobei mehr als 73 % des Cytokinins im Medium anwesend war. Zeatin wurde nicht detektiert. Wang et al., (1981) berichteten über einen $i^6\text{Ade}$ -Gehalt kleiner als 1 nM im Medium bzw. $0,04 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ im Gewebe. Ihre Werte für Zeatin lagen bei 0,2 nM und $0,004 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Messungen mit Hilfe eines radioaktiven Immunoassay (RIA) ergaben Werte für $i^6\text{Ade}$ im Medium kleiner als 0,36 nM (Wang et al. 1984). Bei den gleichen Essays wurde nur 0,08 nM $i^6\text{Ade}$ mittels GC-MS detektiert. Der Zeatin-Gehalt im Medium betrug 0,04 nM (RIA) und 0,06 nM (GC-MS).

Abscisinsäure

Die chemische Struktur von Abscisinsäure (ABA) ist in der Abbildung. 2.4 D dargestellt. In *Physcomitrella patens* wurde ihre Rolle in der Reaktion auf Wassermangel, erhöhte Salzkonzentration und Kälte beschrieben (Decker et al., 2006).

Die Abscisinsäure ruft die Entstehung der so genannten Brachyzyten oder Tmemazellen aus den chloronemalen apikalen Zellen hervor. Die Brachyzyten besitzen die Funktion der vegetativen Sporen und erlauben den Moospflanzen, ungünstige Umweltbedingungen zu überstehen. Abscisinsäure hat einen Einfluss auf die Expression mehrerer Gene, die Zellwandenzyme kodieren und verantwortlich für die Entstehung dicker Zellwände bei Brachyzyten sind. ABA ist sowohl in die Synthese der bei osmotischem Stress auftretenden hitzestabilen Polypeptide involviert, als auch in die Regulation der Expression der Kältetoleranz-Gene (Minami et al., 2003). Minami et al. (2005) fanden im 7 Tage alten und bei 25°C kultivierten Mossprotonema einen ABA-Gehalt von $2,4 \text{ ng g}^{-1}$ und von 0,89 nM im Medium.

Phytohormonantagonisten

Sie sind Substanzen, die den Einfluss der Pflanzenhormone verzögern oder blockieren. Ihre biochemische Wirkungsweise ist von Substanz zu Substanz unterschiedlich und nicht für alle Antagonisten bekannt. Sie können z.B. mit den Phytohormonen um die Bindungstellen an den Rezeptoren oder um die Transportkanäle konkurrieren, mit ihnen chemisch reagieren, die Phytohormonesynthese oder die durch die Phytohormone hervorgerufenen biochemischen Reaktionen beeinflussen (Schopfer und Brennicke, 1999).

Zu den Auxinantagonisten gehört z.B. (Parachlorophenoxy)isobutyl Säure (PCIB). Sie ruft die Reversion von Caulonema in die Chloronema hervor (Bopp, 1990). Ammoniumtartrat wird häufig in der Literatur als Auxinantagonist beschrieben, der die Entstehung von Caulonema inhibiert (Hohe and Reski, 2005b). Die Entstehung von Buds nach der Zugabe von Cytokinin kann durch die Zugabe z.B. von Trifluoperazine inhibiert werden (Saunders und Hepler, 1983).

2.5 *Physcomitrella patens* als Expressionssystem

Das Moos *Physcomitrella patens* wird seit mehr als 30 Jahren als Modellpflanze für *functional genomics* angewandt (Schaefer and Zryd, 2001). Umfangreiche EST-Daten und die aktuelle Sequenzierung des gesamten Moosgenoms bestätigen die Rolle dieses Bryophyts in der Konstellation der Pflanzenbiotechnologie (Reski und Frank, 2005). Die biotechnologische Nutzung von *Physcomitrella patens* als interessantes Expressionssystem und wertvolle Produktionsplattform für *molecular farming* wurde in den letzten Jahren intensiv dokumentiert (Gorr, 1999; Decker und Reski, 2004; Hohe and Reski, 2005b). Die besonderen Merkmale des Mooses *Physcomitrella patens*, die es zu einem wichtigen Kandidaten für die Expression komplexer rekombinater Glycoproteine machen, werden in den nächsten Abschnitten diskutiert.

2.5.1 Biologische Vorteile von *Physcomitrella patens*

Unter den Pflanzen weist *Physcomitrella patens* eine einzigartig hohe homologe Rekombinationsfrequenz auf, welche die gezielte Manipulation von Genen favorisiert. Da die haploide Phase bei *Physcomitrella patens* dominant und daher die Vermehrung vegetativ ist, sind die generierten Mooslinien äußerst stabil (Schaefer, 2002). Diese biotechnologischen Charakteristika ermöglichen einen kurzen Zeitaufwand für *screening* und erleichtern das Design und die Optimierung von Stämmen.

Bei *Physcomitrella patens* wurden markerfreie Transformationsmethoden entwickelt, was die Herstellung von Produktionslinien ohne Antibiotika oder andere Reagenzien zur Selektion gestattet, und ein Plus bezüglich der Sicherheit von Pharmazeutika darstellt (Baur et al., 2005b; Reski und Frank, 2005).

Gegenüber Systemen mit CHO- (*chinese hamster ovary*) oder Insektenzellen sind die Produktsicherheits- und Akzeptanzaspekte bei *Physcomitrella patens* besonders vorteilhaft. Moose sind keine Überträger oder Wirte für humanpathogene Viren (z.B. HIV, Hepatitis) und bisher sind keine humanpathogenen Pflanzenviren oder Moosviren bekannt (Schillberg et al., 2003; Twyman et al., 2003).

Glycoengineering und Protein Humanisierung

Wie schon erwähnt ist *Physcomitrella patens* als höherer Eukaryot in der Lage, komplexe posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Es wird versucht, die Abweichungen zwischen den Glycosylierungsmustern von Säugerzellen und Pflanzen (siehe Abbildung 2.1) durch eine gezielte Gendeaktivierung (*knockout*) und durch die Zugabe eines fremden Gens

(*knockin*) zu minimieren. Das Verfahren wird als Glycoengineering bezeichnet und hat besondere Fortschritte in der Proteinhumanisierung von *Physcomitrella patens* erzielt (Koprivova et al., 2004). Dabei wurden die humanallergischen $\alpha(1,3)$ -Fucose- und $\beta(1,2)$ -Xylosereste aus dem Glykosylierungsmuster entfernt und ein *knockout-knockin* der $\beta(1,3)$ -Galactose durch $\beta(1,4)$ -Galactose durchgeführt (Huether et al., 2005). Diese Modifikationen ermöglichen die Produktion hochwertiger rekombinanter Proteine mit nahezu human-identischem Glykosylierungsmuster (Horstmann, 2004; Baur, 2005; Gorr und Wagner, 2005).

2.5.2 Verfahrenstechnische Vorteile eines Expressionssystems mit *Physcomitrella patens*

Die Vorteile des Moores gegenüber den zumeist verwendeten Tierzellen liegen vor allem in seiner mechanischen Robustheit und der photoautotrophen Kultivierung (Hohe et al., 2002). Moossuspensionen sind gut handhabbar und weniger stressempfindlich als Tierzellen. *Physcomitrella patens* toleriert sowohl einen weiten pH Bereich (pH 4-8) als auch ein breites Temperaturspektrum. Die Moose benötigen nur Licht, CO₂ und ein einfaches Mineralmedium zum Wachsen (Reski und Abel, 1985). Das bedeutet niedrigere Mediumkosten im Vergleich zu hochwertigen Kulturmedien (mit u.a. Antibiotika und Hormonen), die für die Tierzellkulturen notwendig sind. Außerdem kann *Physcomitrella patens* axenisch kultiviert werden, da keine Wechselwirkungen oder Symbiosen mit anderen Organismen für die Expression der Proteine vorausgesetzt werden (Nishiyama et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Tierzellen werden die produzierten Proteine durch die Einführung eines Targeting-Tags ins Medium sekretiert (Horstmann, 2004). Die Kosten vom Downstream-Process sind im Vergleich mit herkömmlichen Kultursystemen geringer, da das Zielprotein nur aus einem proteinfreien Medium mit einem geringen Hintergrund an mooseigenen extrazellulären Proteinen aufgereinigt werden muss (Gorr und Wagner, 2005). Außerdem sind die Wachstumsraten der bisher untersuchten rekombinanten *Physcomitrella patens* höher als die typischen Wachstumsraten von Pflanzen in Suspension und von Tierzellen.

2.5.3 *Physcomitrella patens* als Zellfabrik für rekombinante Proteine

Baur et al., (2005a) haben die genetische Stabilität des rekombinanten Moores *Physcomitrella patens* und der Expression von Zielproteinen überprüft. In seiner Produktpalette stehen Blutgerinnungsfaktoren (IX), Wachstumsfaktoren (VEGF), humanes Serumalbumin (HSA), Enzyme (z.B. alkalische Phosphatase) und Antikörpern (Baur et al., 2005b; Horstmann, 2004).

Um die Produktausbeute an Zielproteinen zu verbessern wurden bisher verschiedene Strategien bei *Physcomitrella patens* getestet, u.a. Signalpeptide (Baur et al., 2005b; Schaaf et al., 2005), Promotoren, Introns (Weise et al., 2006) und Co-Expression eines stabilisierenden Proteins e.g. HSA (Baur et al. 2005b).

Als Modellprotein für die Entwicklung eines Expressionssystems mit Moosen wurde der Wachstumsfaktor VEGF ausgewählt. Die Eigenschaften dieses Glycoproteins und seine Anwendungsbereiche werden anschließend präsentiert.

VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ist ein N-glycosyliertes, homodimeres Protein, das in 5 unterschiedlichen Isoformen existiert: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. Nur VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ können sekretiert werden. Die anderen Formen sind stark zellgebunden (Ferrara et al., 1997). Es besteht aus zwei Peptidketten, die über Disulfidbrücken verknüpft sind (siehe Abbildung 2.5 A, B). VEGF₁₂₁ hat ein Molekulargewicht von 28 kDa (Forstreuter, 2001).

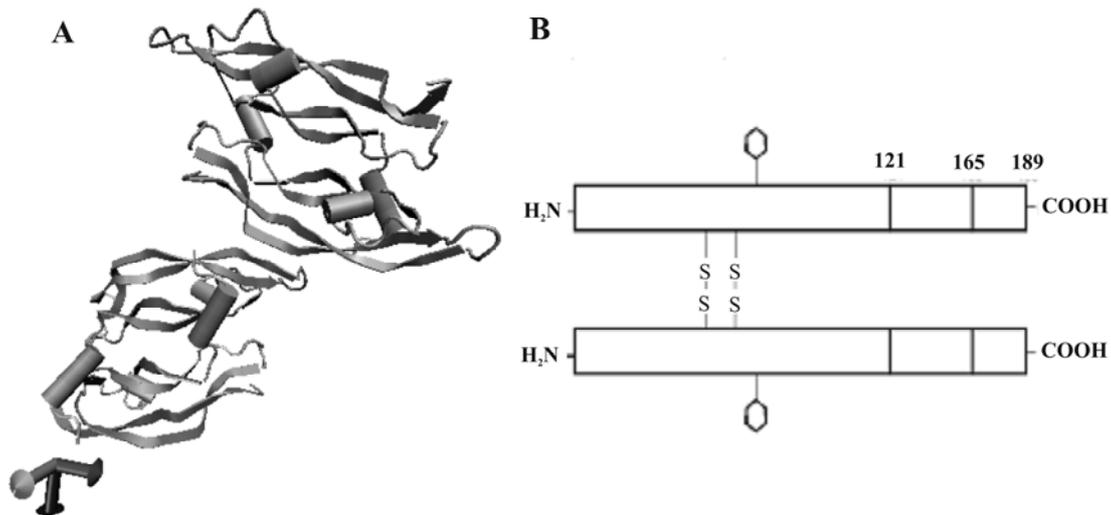


Abb. 2.5: (A) Allgemeine Struktur von VEGF₁₂₁. (B) Dieses Glycoprotein besteht aus zwei unterschiedlich langen über Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten. Die Aminosäureketten und die Glycosylierungsstellen werden gezeigt (Forstreuter, 2001)

Dieser polypeptidische Wachstumsfaktor ist spezifisch für die endothelialen Zellen der Blutgefäße. Zellen mit VEGF-Rezeptoren in Anwesenheit von diesem Faktor weisen moderate Mitogenese (Stimulation der Mitose) und ausgeprägte Angiogenese (Bildung von neuen Blutgefäßen) auf. Die Angiogenese spielt eine große Rolle sowohl bei der Entstehung von Metastasen in Krebserkrankungen als auch bei der Heilung von Wunden. Angiogenische Arzneimitteln werden bei der Behandlung von z.B. Herzinfarkt, Apoplexie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Angina, sowie bei der Krebsforschung eingesetzt (Henry et al., 2003).

Das rhVEGF₁₂₁ findet Anwendung in Therapie, medizinischer Diagnostik und Forschung. Die Preise des für Forschungszwecke zugelassenen rhVEGF₁₂₁ unterscheiden sich je nach Quelle. Aus Insektenzellen kostet 1 µg Mikrogramm des Wachstumsfaktors ca. 35 US\$ und aus *E. coli* (nicht glycosyliert) ca. 16 US\$ (Stand 11.06, Cell Sciences, eBioscience).

2.5.4 Photo-Bioreaktoren für die *in vitro* Kultivierungen von *Physcomitrella patens*

Obwohl Glasrührkessel und Blasensäulenreaktoren für die Suspensionskultivierung von *Physcomitrella patens* verwendet worden sind, sind diese Reaktortypen nur für die Produktion kleiner Volumina an Pflanzenmaterial geeignet und beinhalten viele Probleme bezüglich ihrem Scale-Up. Boyd et al., (1984) kultivierten das Moos in begasten sphärischen

Glasbehältern und in einem 10 L Airlift-Reaktor, um Gewebe für Entwicklungsstudien zu generieren. Gorr, (1999) führte die Kultivierung in von außen beleuchteten Glasrührkesseln ein, wobei die Bildung von Moospellets durch die Erhöhung der Drehzahl des Rührers unterdrückt wurde. Hohe und Reski, (2002) berichteten über die semikontinuierliche Ernte von *Physcomitrella patens* für die Produktion von Protoplasten in einem mit Halogenlampen beleuchteten 5 L Rührreaktor.

Wechselwirkungen und Einflussfaktoren in Photo-Bioreaktoren

Das Wachstum von photoautotrophen Organismen in Photo-Bioreaktoren ist von mehreren Faktoren, wie der Photosynthese, der Lichtübertragung an die Zellen und der Strömungsdynamik abhängig (Perner, 2003). Bei der Photosynthese kommt es zum Verbrauch von Kohlendioxid. Gleichzeitig reichert sich das Medium mit Sauerstoff an, der in hohen Konzentrationen toxisch wirken kann (Huang und Rorrer, 2003). Beispielweise werden in Rohrphotoreaktoren dadurch axiale $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ und pH Gradienten entlang des Reaktors erzeugt. Diese Gradienten werden durch die Strömungsdynamik des Systems und die Verweilzeit der Zellen im Reaktor beeinflusst (Perner et al., 2003). Beide Faktoren sind auch entscheidend bei der Etablierung geeigneter Mischzeiten und passender Begasungs-Entgasungsmuster beteiligt. Die Strömungsdynamik muss Gradienten z.B. von Nährstoffen sowie tote Zonen in Reaktor minimieren. Zellanhaftung oder -Ablagerung beeinträchtigen die Homogenität der Suspension und müssen dementsprechend vermieden werden.

Die Durchmischung im Reaktor kann durch die Erhöhung des Energieeintrags verbessert werden. Das kann aber die Zunahme des zellulären Stresses und den Verlust der Zellaktivität hervorrufen. Auch der Lichteintrag wird durch die Strömungsdynamik beeinflusst. Wenn das Licht einmal an die Oberfläche des Reaktors gelangt, entsteht eine Reduktion des verfügbaren Lichtes durch Absorption der Zellen und Streuung durch Partikel im Medium e.g. Salzkristalle oder Luftblasen. Somit ergibt sich ein Gradient der Photonenflussdichte (PFD) senkrecht zu der beleuchteten Fläche, der sich auch in Abhängigkeit von der Konzentration der Suspension ändert. Eine gute radiale Durchmischung und die Verwendung verdünnter Suspensionen vereinfachen den Lichteintrag zu den Zellen. Dagegen kann eine Erhöhung der Zellkonzentration zur gegenseitigen Lichtabschattung führen. Niedrige PFD auf der externen Seite des Photo-Bioreaktors oder dichte Suspensionen generieren Licht-Dunkelzyklen auf den Strömungspfad der Zellen. Solche Licht-Dunkelpfade sind gleichzeitig abhängig vom Strömungsregime im Reaktor und haben wichtige physiologische Folgen auf die Zellen (Perner, 2003).

Im Fall fädiger Organismen wie *Physcomitrella patens* spielt die Form und Größe der Moose eine Rolle bei der Licht- und Substratverfügbarkeit in der Suspension. Im Kern von Moosagglomeraten und Pellets können Licht und Nährstoffe mangelhaft sein. Außerdem kann es zu lokaler Anreicherung von sekretierten Metaboliten (z.B. Phytohormonen) kommen, die Differenzierungssignale stimulieren.

Gastransport

In phototrophen Kultivierungen erfolgt der Kohlendioxideintrag in der Regel durch die Zugabe einer Mischung von Luft und CO_2 , wobei der Stofftransport von den Gasblasen über die Flüssigkeit zur Zelle stattfindet. Nach der Zweifilmtheorie sind für diesen

Transportvorgang verschiedene Widerstände zu überwinden. Der Transport von Kohlendioxid durch die Grenzflächen Gasblase-Flüssigkeit und Flüssigkeit-Zelle erfolgt diffusiv (Perry et al, 1984). Der allgemeine Gastransport GTR (Gastransfer Rate) wird durch die folgende Gleichung bestimmt:

$$GTR_i = kla_i (C_{Li}^* - C_{Li}) \quad (2.5)$$

C_L^* bezeichnet die Sättigungskonzentration und C_L die aktuelle Konzentration von einem Gas i in der Suspension. kla beschreibt den gesamten volumetrischen Stoffübergangskoeffizient. C_L^* bzw. kla nehmen für jedes Gas (z.B. O_2 und CO_2) unterschiedliche Werte an. C_L^* in der flüssigen Phase kann wie folgt berechnet werden:

$$C_{Li}^* = \frac{y_i \cdot p}{H_i} \quad (2.6)$$

Wobei y der molare Kohlendioxidanteil von i im Gas, p der Gesamtdruck und H der Henry-Koeffizient sind. In Lösungen wird C_L^* durch gelöste Stoffe wie Salze deutlich reduziert. Andererseits ist die Konzentration von gelöstem CO_2 pH abhängig. Für pH-Werte höher als 6,5 sind die aus dem CO_2 -Gleichgewicht erzeugten Karbonate (CO_3^{2-}) und Bikarbonate (HCO_3^-) zu berücksichtigen (Lawlor, 1990). Moose können in protonemalem Zustand nur gelöstes CO_2 als C-Quelle benutzen, deshalb ist die pH-Wert-Steuerung ein wichtiger Parameter bei der Prozessführung.

Photonenflussdichte

Wie in der letzten Sektion erläutert wurde, entstehen in Photoreaktoren PFD Gradienten. Die Abschwächung des Lichts in einem absorbierenden Medium kann vereinfacht durch das Lambert-Beer Gesetz beschrieben werden:

$$I(\lambda, x) = I_o(\lambda) \cdot e^{-K(\lambda) \cdot x} \quad (2.7)$$

Hierbei sind I die abgeschwächte PFD als Funktion des Abstands und der Wellenlänge, I_o die einfallende Lichtintensität an die innere Seite der Photoreaktorwand, K der apparente Licht-Extinktionskoeffizient und x die durchlaufene Wegstrecke. Der Licht-Extinktionskoeffizient (K) kann wie eine lineare Funktion der Biomassekonzentration beschrieben werden. k_c bezeichnet die spezifische Licht-Extinktion der Biomasse und k_o die spezifische Licht-Extinktion des Mediums (Huang und Rorrer, 2002).

$$K = k_o + k_c c_x \quad (2.8)$$

Die durchschnittliche PFD (I_m) auf einem eindimensionalen Lichtweg quer eines Rohrphotoreaktors kann mit der von Huang und Rorrer (2002) vorgeschlagenen Gleichung

beschrieben werden:

$$I_m = \frac{\alpha}{d} \int_0^d I dx = \frac{\alpha I_o}{Kd} (1 - e^{-Kd}) \quad (2.9)$$

Hierbei ist d der Rohrdurchmesser und α eine Konstante mit dem Zahlwert 2 für eine symmetrisch gegenseitige Strahlung. Für dicke Glasrohre muss noch die Absorption vom Glas und gegebenenfalls Totalreflexion berücksichtigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Stämme und Medien

Wildtyp und transgene Stämme des Mooses *Physcomitrella patens* wurden von der Firma Greenovation Biotech GmbH zur Verfügung gestellt und für die Suspension Kultivierungen verwendet. Die Stämme P31 (tWTP31_{VEGF}) und F51 (tWTActin5_11.51) sind in der Lage die Isoform 121 des vaskulären endothelialen Faktors VEGF zu exprimieren. Die Moos-Linie tWTActin5_11.51 besitzt ein nahezu identisch humanes Protein-Glycosylierungsmuster. Gorr und Wagner, (2005) dokumentierten die Methoden zum Glycoengineering von tWT11.51_{VEGF}.

Alle Mooslinien werden photoautotroph in einem modifizierten Mineralmedium (Knop) in 500 ml Schüttelkolben kultiviert (Schween et al., 2003; Baur et al., 2005b). Das benutzte Knop Medium besteht aus 1.000 mg l⁻¹ Ca(NO₃)·4H₂O, 250 mg l⁻¹ KCl, 250 mg l⁻¹ KH₂PO₄, 250 mg l⁻¹ MgSO₄·7H₂O and 12,5 mg l⁻¹ FeSO₄·7H₂O. Dazu werden eine zusätzliche Eisenquelle (50 µM Fe-EDTA) und 1 ml l⁻¹ einer Spurenelementelösung zu der Hauptlösung zugegeben. Die Komposition der Spurenelementelösung ist wie folgt: 6,2 g l⁻¹ H₃BO₃, 25 mg l⁻¹ CoCl₂·6H₂O, 25 mg l⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 830 mg l⁻¹ KCl, 19,8 g l⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 250 mg l⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O, 25 mg l⁻¹ NiCl₂·6H₂O, 10 mg l⁻¹ Na₂SeO₃·5H₂O und 6,6 g l⁻¹ Zn (CH₃COO)₂·2H₂O. Die Suspensionen aus den Kolben werden in ca. 200 ml modifizierten Knop-Medium bei 21°C axenisch kultiviert. Die Kolben werden bei einer durchschnittlichen Photonenflussdichte (PFD) von 20 µE m⁻¹ s⁻¹, gemessen an der äußeren Wand der Gefäße, gehalten. Dabei wird ein Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden pro Tag (LD 16/8) eingeführt. Die protonemalen Suspensionen von *Physcomitrella patens* aus den Schüttelkolben werden wöchentlich mittels eines *offline* Rotor-Staturs (S25N-18G Ultra-Turrax[®], IKA-Werke GmbH) 30 Sekunden bei 24.000 rpm steril zerkleinert, und dann wird 50% des gesamten Suspensionsvolumens mit frischem Mineralmedium ersetzt. Die Suspensionen aus den 500 ml Kolben werden als Inokulum für die Kultivierungen in allen Maßstäben und für die Versuche zur physiologischen Charakterisierung angewandt.

3.2 Reaktoren

3.2.1 Modell-Photo-Bioreaktor

Der Umwurf-Photo-Bioreaktor ist ein zylindrischer Rührkessel mit flachem Boden und 3 Liter Füllvolumen, in dem ein zylindrischer Glasumwurfkörper mit angerauter Oberfläche eingebaut ist, der auch als Bestrahlungskörper dient. Er wurde als Modellreaktor für die Generation kinetischer Daten für photoautotrophe Mikroorganismen und Organismen unter hoch kontrollierte Bedingungen konzipiert. Der Modell-Photo-Bioreaktor wurde im Fachbereich Bioverfahrenstechnik, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik der Universität Karlsruhe (TH) von Csögör, (2000) entwickelt. Der Aufbau ermöglicht eine annähernd homogene Verteilung von pH-Wert, Temperatur und Licht in der Biosuspension. Der Photoreaktor und seine Peripherie sind in der Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

Das Licht wird von einer externen Lichtquelle (Halogenlampe, 150 W) erzeugt, durch einen

Glasfaserlichtleiter und einen Lichtring zur Stirnseite des Glasumwurfkörpers geleitet und dann in das Medium hinein gestreut. Zur Erzeugung von monochromatischem Licht für die Experimente mit Variation der Lichtqualität werden Lichtfilter (A08073 und A08070, Schott-Fostec LLC) eingebaut.

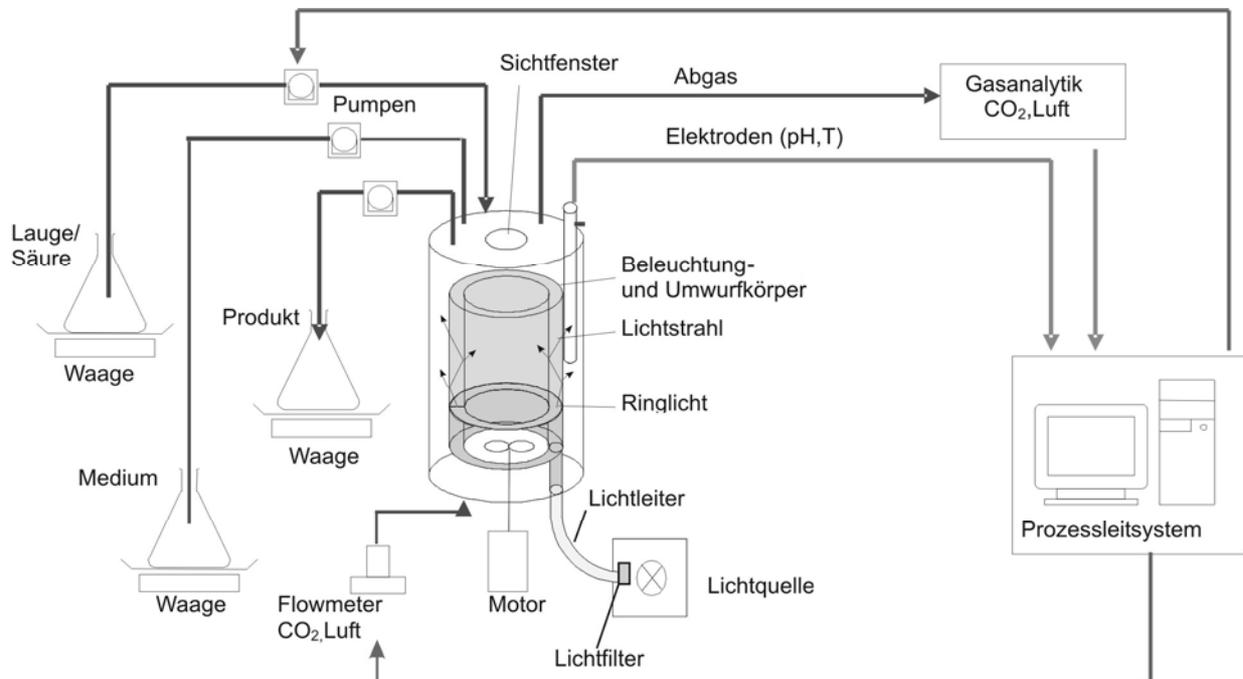


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des 3 L Modell-Photo-Bioreaktors (Csögör, 2000)

Ein 600 W Motor und ein Propellerrührer gewährleisten die Durchmischung der Biosuspension. Der Motor ermöglicht eine Variation der Rührdrehzahl von 20 bis 1.600 rpm. Auf dem Deckel des Reaktors befinden sich Anschlüsse für pH-Elektrode (AppliSensor), Manometer, Sicherheitsventile, Abluft, Zufuhr von Säure (0,1 M HCL), Lauge (0,1 M KOH), Nährmedium und Inokulum. Im Boden des Reaktors sind zusätzliche Kopplungen für den Temperaturfühler (Widerstandsthermometer Pt100), die Zuluft und den Lichtleiter vorhanden. Die Gasmischungen von Luft/CO₂ werden beliebig mit Hilfe von Flowmetern und deren Flowmeterkontroller (MKS Instruments) eingestellt. Für die Aufnahme, Darstellung und Regelung der Kultivierungen wird das Prozessleitsystem BioAG Bioprocess control 3.0 eingesetzt.

Die Abgaszusammensetzung wird mit dem Gasanalysator MULTOR 610 der Firma Maihak AG gemessen. Die CO₂-Konzentration wird durch die Bestimmung der Infrarotabsorption ermittelt und die Sauerstoffkonzentration mit einem Sauerstoffanalysator OXOR 610 gemessen. Hier beruht das Messprinzip auf den paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffs.

Der Reaktor wird thermisch sterilisiert, wobei Dampf durch den Kesselmantel zugeführt wird bis die Temperatur des Reaktors 121°C erreicht. Diese Temperatur wird mindestens 20 Minuten gehalten. Die Sterilität des Reaktors vor Inokulation, mindestens vier Tage nach dem Autoklavieren, sowie die monoseptischen Bedingungen während der Kultivierung werden

geprüft (siehe 3.3.1).

3.2.2 Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor

Der 30 L Rohr-Photo-Bioreaktor ermöglicht ein hohes Verhältnis Oberfläche/Volumen, und dadurch Vorteile bezüglich der Lichtübertragung in photoautotrophen Verfahren. Der Reaktor eignet sich auf Grund seiner geometrischen Ähnlichkeit zu industriellen Photo-Bioreaktoren für Scale-Down/Up Experimente. Dabei können die Bedingungen aus Produktionsreaktoren zwecks Prozessoptimierung nachgemacht werden. Die Definition geometrischer Maße und Konstruktion des Rohr-Photo-Bioreaktors wurde mit Strömungssimulation unterstützt. Perner et al., (2003) beschrieben die Entstehung von Hell/Dunkel Zyklen im Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor und ihre Wirkung auf die Physiologie von Phototrophen in Kultivierung.

Der Pilot-Photo-Bioreaktor besteht aus einem Glasteil, der ca. 85 % des Gesamtvolumens ausmacht und einer Dunkelstrecke (siehe Abbildung 3.2). Im Glasteil befinden sich 12 nahezu gerade, parallele Rohre von je 1,5 m Länge und 40 mm Innendurchmesser, die über U-Bögen miteinander verbunden sind. Die Beleuchtung erfolgt von außen über 6 Strahler (Lival-Power 150) mit jeweils einer 150 CW Entladungslampe (HITLite-HIT-DE, 10000K). Der Abstand zum Rohrreaktor, der Einstrahlwinkel und die Höhe der Strahler können geändert werden, um mittlere PFD auf die Oberfläche der Rohre bis über $150 \mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$ zu erreichen. Die Messung der PFD wurde mittels einem Miniquantensensor (MQS LI-190, Walz) durchgeführt. Eine genauere Charakterisierung des Lichtverhaltens im Reaktor wird im Kapitel 6 präsentiert.

Die Dunkelstrecke ist, bis auf die Verbindungsstellen mit dem Glasteil, aus Edelstahl gefertigt. Diese Verbindungsstellen bestehen aus lichtundurchlässigen, druckfesten Elastomerschläuchen. Eine Kreiselpumpe dient zur Umwälzung der Moossuspension. Sie ist an eine Doppelgleitringdichtung gekoppelt, für deren Schmierung eine Zahnkranzpumpe sorgt. In der Dunkelzone des Reaktors werden der Reaktorkopf und drei Messstrecken angeschlossen. Am tiefsten Punkt der Anlage befindet sich ebenso ein Anschluss für die Suspensionsernte.

Im Reaktorkopf sammelt sich die Abluft, die über eine Auffangflasche zur Abgasanalytik geleitet wird. Weiter befinden sich dort ein Manometer und ein Überdruckventil. Ein Sichtfenster im Reaktorkopf ermöglicht die Füllstandüberwachung. Die Messstrecken sind mit Normanschlüssen für Messsensoren und Nadeln ausgestattet. Dort können pH-, pO_2 - und Temperatursonden, Medien- und Inokulumzugabe, Probenahme und weitere Peripherie des Reaktors angeschlossen werden. Die Temperatur wird mit einem Widerstandsthermometer Pt100, der pH-Wert mittels eines pH-Meters (Hamilton) und der pO_2 -Wert mit einer AppliSensor-Sonde erfasst.

Die Kühlung des Reaktors erfolgt über einen Doppelmantel. Nach dem Pumpenausgang ist der Begasungsanschluss angebracht, dem ein Sterilfilter vorgeschaltet wird. Ein statischer Mischer dispergiert das zugeführte Gas. Der bewegungslose Mischer besteht aus fünf schraubenförmigen versetzten Elementen und hat eine Länge von 15 cm. Die beschriebenen Sonden für Temperatur, pH und pO_2 sind an einen BioController (ADI 1030, Applikon) angeschlossen. Das Prozessleitsystem steuert eine Schlauchpumpe, die je nach Einstellung entweder Säure oder Lauge zur Regelung des pH-Wertes zudosiert. Es besteht auch die Möglichkeit, einen Niveausensor im Kopf des Reaktors anzuschliessen. Die *online* Darstellung und Speicherung der Kultivierungsdaten von pH- und pO_2 -Werten, Temperatur, Begasungsraten und Verbrauch von Elektrolyten und/oder Medium wird mit einer Anwendung unter LabVIEW (National Instruments, TX) durchgeführt. Alle genannten Werte

werden im Minutentakt gespeichert. Die Messung der Zusammensetzung vom Abgas wird analog zum 3 L Modell-Photo-Bioreaktor gemacht.

Der Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor wird ebenfalls thermisch sterilisiert, unter den gleichen Bedingungen wie beim Modell-Photo-Bioreaktor. Hier ist es nötig, die Hell- und Dunkelsektionen des Photo-Bioreaktors mit Isolierungsmatten zu bedecken, um den Wärmeverlust während des Autoklaviervorgangs durch die große Fläche zu reduzieren. Die monoseptischen Bedingungen während der Kultivierungen werden täglich geprüft.

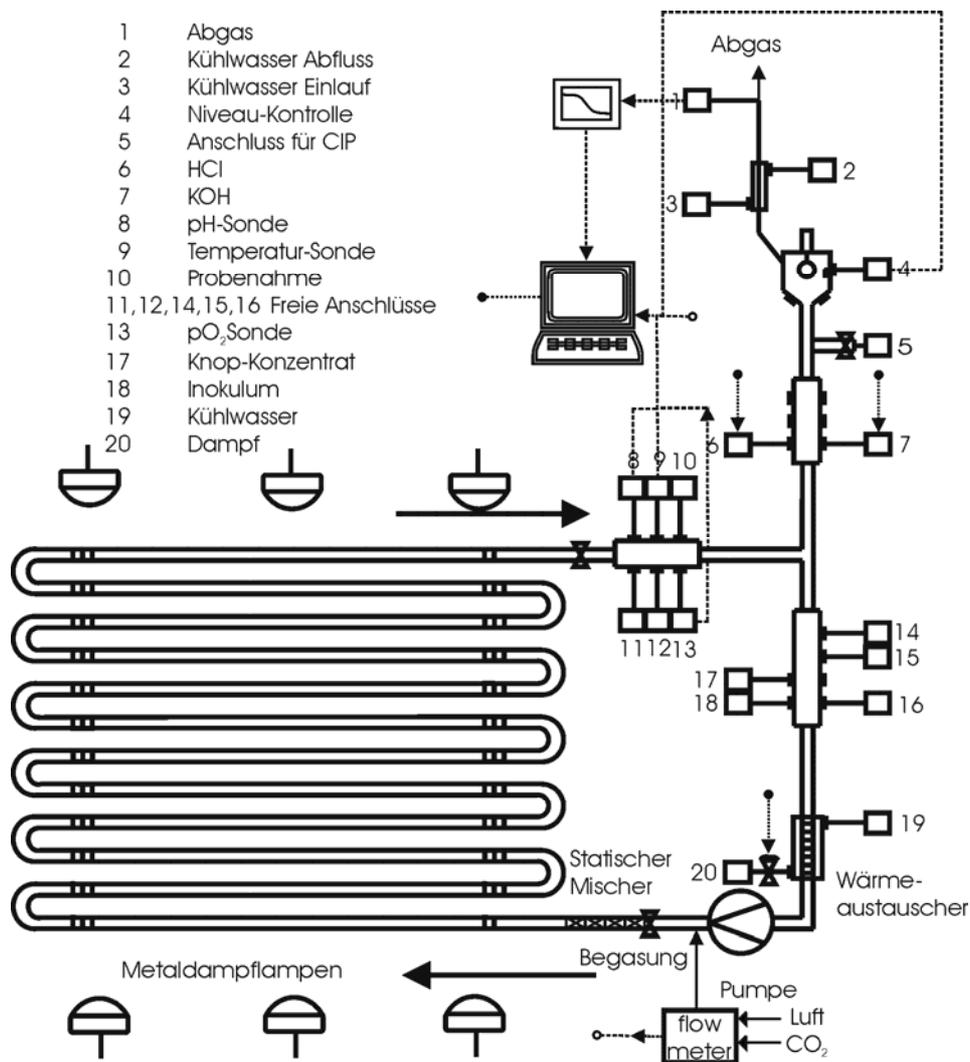


Abb. 3.2: Schema des 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktors zur Kultivierung von *Physcomitrella patens*.

3.3 Analytische Methoden

Für die *Offline*-Analyse werden Suspensionsproben aus den Kolben, 3 L und 30 L Photo-Bioreaktoren steril entnommen. Die Bestimmung extrazellulärer Komponente wird je nach Biomassekonzentration, entweder aus Suspensionsüberstand nach Dekantation der Moose oder aus dem mit einer 1 µm-Porendurchmesser Polysulfonmembran filtrierten Permeat durchgeführt.

Das Zellmaterial aus 5 ml Suspension wird für die intrazellulären Analysen in zwei Stufen abkonzentriert. Zuerst wird, wie oben genannt, Grossteil des Überstands abfiltriert. Dann wird die eingedickte Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend zentrifugiert (10 min, 6.000 rpm). Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und zum Pellet werden zwei Wolframkarbidkugeln und 1 ml Puffer hinzu gegeben. Die Wahl des Puffers hängt von der jeweiligen Bestimmungsmethode ab (siehe Abschnitte 3.3.4, 3.3.6-8). Das Eppendorfgefäß wird mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Danach erfolgt der Zellaufschluss in der Kugelmühle (3x3 min bei 27,5 Hz). Die Mahlkammer wird vor der Anwendung bei -17°C temperiert. Der Zellextrakt wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Wolframkarbidkugeln aus dem gebliebenen Eppendorfgefäß werden mit 0,5 ml des gewählten Puffers gewaschen. Nach dem Vortexen wird auch diese Waschlösung in das andere Eppendorfgefäß mit dem Zellextrakt überführt. Anschließend wird das gesamte Zellextrakt bei 4°C und 18.000 rpm, 5min lang zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand dient als Extrakt für die jeweiligen Analysen.

3.3.1 Sterilttest

Mit dem Sterilttest werden axenische Bedingungen bei der Stammhaltung und den Kultivierungen der Moose überprüft. In der Sterilwerkbank wird ein Probe-Abstrich mit einer Impföse auf Agarplatten mit zwei unterschiedlichen nicht selektiven Nährböden (Zusammensetzung in Anhang 1) gemacht. Ebenfalls werden ca. 5 ml Suspension auf einer weiteren Agarplatte bei ähnlichen Bedingungen zugegeben. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C werden die Platten auf die Anwesenheit von Mikroorganismen überprüft.

3.3.2 Mikroskopie

Variationen äußerer Merkmale der Moose werden täglich mittels Lichtmikroskopie verfolgt. Für diesen Zweck wird eine CAD Kamera (Sony – XC 77CE) an einen Lichtmikroskop (Leitz-Biomed) gekoppelt. Die Aufnahmen werden am Rechner mit einem *frame grabber* (Matrox Meteor) transferiert und mit dem Bildbearbeitungssoftware Visilog 5.4 (Noesis, Les Ulis) als Bild oder Video gespeichert und weiter bearbeitet.

3.3.3 Optische Dichte

Die Messung der optischen Dichte wird ergänzend zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration durchgeführt. Die Licht-Extinktion aus Moossuspensionen wird in einer 3 ml Küvette bei 750 nm gemessen (UV/Vis Spektrometer UV2). Die Küvette ist mit einem Magnetrührer gestattet, um die Sedimentation der Moose während des Messvorgangs zu vermeiden. Bei dieser Wellenlänge besitzt *Physcomitrella patens* keine Pigmente, die zu relevanter Absorption beitragen. Aufgrund der Schwankungen des Messwertes wird der Mittelwert der Extinktion bei 750 nm aus mindestens 60 Daten in einem 1 Sekunde-Takt gebildet.

Die Korrelation zwischen Licht-Extinktion und Biotrockenmasse (c_x) ist vom Differenzierungsgrad und Morphologie der Moose stark abhängig, jedoch kann die folgende Gleichung für die Bestimmung von c_x bei kurzen chloronemal geprägten Protonema

Suspensionen gut annähernd abgeschätzt werden:

$$c_x = 0,7741 \cdot OD_{750} + 0,0136 \quad (3.1)$$

3.3.4 Biotrockenmassekonzentration

40 ml Zellsuspension werden durch ein vorgetrocknetes und gewogenes Sieb (Porendurchmesser 1 μm) filtriert. Der Rückstand auf der Membran wird mit ca. 100 ml VE-H₂O gewaschen, dann bei 80°C, 24 Stunden lang getrocknet und anschließend gewogen. Die Biotrockenmassenkonzentration wird wie folgt berechnet:

$$c_x = \frac{m_p - m_{\text{leer}}}{V_p} \quad (3.2)$$

m_p Masse des Siebes plus trockene Zellen [g]

m_{leer} Masse des trockenen Siebes [g]

V_p Volumen der Probe [l]

3.3.4 Bestimmung des Pigmentgehaltes

Das Verfahren zur Extraktion und Quantifizierung verschiedener Pigmente bei *Physcomitrella patens* (Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotenoide) wird von Ziegler und Egle, (1965) übernommen. Die Pigmente werden, wie für die Behandlung von Zellproben beschrieben wurde, mit kaltem 80 %-igen Aceton extrahiert. Das Aceton wird mit 50 mg l⁻¹ CaCO₃ gesättigt.

Der 1,5 ml Pigmentextrakt wird in ein 5 ml Messkolben überführt und auf 5 ml mit Aceton aufgefüllt. Am Photometer werden bei folgenden Wellenlängen gegen das Lösungsmittel gemessen: für die Chlorophyllbestimmung bei 750 nm (Referenz), 647 nm und 664 nm, und für Carotenoide ebenfalls bei 744 nm, 663 nm, 644 nm und 453 nm.

Die Chlorophyllkonzentration erfolgt nach Korrektur der Absorption mit der unspezifischen Extinktion wie folgt:

$$c_{chla} = \left[-2,29 \cdot OD_{647} + 11,78 \cdot OD_{664} - 9,46 \cdot OD_{750} \right] \frac{V_E}{V_P} \quad (3.3)$$

$$c_{chlb} = \left[-20,05 \cdot OD_{647} + 4,47 \cdot OD_{664} - 15,58 \cdot OD_{750} \right] \frac{V_E}{V_P} \quad (3.4)$$

mit c_{chla} (Konzentration von Chlorophyll a), c_{chlb} (Konzentration von Chlorophyll b) in mg l⁻¹ und V_E (Volumen vom Extrakt), V_P (Volumen der Probe) in ml.

3.3.5 Mineralienverbrauch

Phosphor und Eisen spielen eine besonders wichtige Rolle bei der Pigmentbildung in den Chloroplasten. Ihre Konzentration im Medium wird bestimmt, um die Verbrauchskinetik und eventuelle Limitierungen dieser Elemente festzustellen.

Phosphatbestimmung

Die Methode basiert auf der Eigenschaft des anorganischen Phosphates in einer stark sauren Lösung (pH 4) unter Reduktion (FeSO_4) mit Ammoniummolybdat einen blauen Komplex zu bilden. Eine genauere Beschreibung der Methode und Reagenzien befindet sich im Anhang 2. Die Bestimmung der Phosphatkonzentration in mg l^{-1} erfolgt photometrisch mit Hilfe der Extinktion der Probe bei 740 nm laut der Gleichung (3.5). Als Standard wird KH_2PO_4 benutzt.

$$c_{\text{Phosphat}} = 73,876 \cdot O.D._{740} - 0,9951 \quad (3.5)$$

Eisenbestimmung

Nach der pH-Einstellung des Zellextrakts oder Überstands auf einem Wert von 4 mit Essigsäure/NaOH, werden die Fe^{2+} -Ionen zu Fe^{3+} durch die Zugabe von Hydroxylamin Hydrochlorid reduziert. Fe^{3+} -Ionen bilden mit 1,10-Phenanthrolin einen Komplex, der einen Absorptionsmaximum bei 508 nm besitzt und die photometrische Bestimmung ermöglicht. Die Gleichung (3.6) wird mit Hilfe von $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ als Standard erstellt. c_{Eisen} steht für die berechnete Konzentration von Eisen in der Probe in mg l^{-1} .

$$c_{\text{Eisen}} = 13,131 \cdot O.D._{508} - 0,3923 \quad (3.6)$$

3.3.6 Bestimmung der gesamten Proteine

Die Variation des Proteingehaltes ist ein äußerst wichtig physiologischer Indikator der Zellen. Für mehrere rekombinanten Organismen wird es berichtet, dass der Proteingehalt mit der Expression von Zielproteinen korreliert (Nelsen-Salz, 2003). Photometrische Methoden für die Bestimmung des Gesamtproteins werden in Pflanzenzellenkultivierungen bevorzugt, da sie eine schnelle Determination anbieten. Verschiedene Methoden mit eigenen Beschränkungen und Präzision stehen zur Verfügung, dennoch kann die meist geeignete Methode für jede Anwendung *a priori* nicht ausgewählt werden. Daher werden die folgenden Methoden bei *Physcomitrella patens* unter Kultivierungsbedingungen getestet. Für die Kalibrierkurven wird Bovineserumalbumin (BSA) von Sigma-Diagnostics als Standard benutzt. Bei allen Methoden wird ein mechanischer Zellaufschluss mit der Schwingmühle durchgeführt (siehe 3.3).

Bestimmung nach Bradford

Die Methode wird laut der Beschreibung von Bradford, (1976) adaptiert. Im Sauren wird der Farbstoff Coomassie Blue an das Protein gebunden. Der Farbstoff besitzt eine Affinität zu basischen und aromatischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) und ruft einer Verschiebung ihre Absorptionsmaximun von 465 nm nach 595 nm hervor. Detergenzien, Fette und Fettsäure Beeinträchtigen die Messung je nach Konzentration im Extrakt. Hier wird ein Puffer als Extraktionsmittel benutzt. 250 µl der Probe mit 2,5 ml der Bradford-Reagenzlösung (Merck, Darmstadt) werden in Kunststoff-Halbmikroküvetten versetzt und gut durchgemischt. Nach 2 min wird die Extinktion bei 595 nm gemessen. Diese Methode weist eine große Protein-Protein Variabilität und ihr Messbereich liegt zwischen 0,01 und 0,1 mg ml⁻¹.

Protein Assay ESL

Die Bestimmung basiert auf einer Biuret-ähnlichen Reaktion, wobei Cu²⁺ zunächst mit dem Protein im alkalischen Medium komplexiert wird. Jedoch wird der Proteingehalt durch Messung der Extinktion eines Cu⁺-Bathocuproin-Komplex gemessen, der sich aus Überschüssigen Cu²⁺ bildet, welches nicht durch das Protein komplexiert wurde. Der Überschuss an Cu²⁺ wird mit Ascorbinsäure zu Cu⁺ reduziert, mit Bathocuproin gebunden und dann gemessen. Mögliche Reduktionsmittel für Cu²⁺ stören daher die Messung.

Die Zusammensetzung des Puffers und die Beschreibung der Methode wird vom Hersteller (Roche) übernommen. 100 µl einer temperierten alkalischen Kupfertartratlösung werden in eine 1,5 ml Glasküvette mit 50 µl Probe vermischt. Die Küvette wird bei 15-25°C mindestens 5 min inkubiert und dann werden 1.000 µl der Ascorbinsäure, Bathocuproindisulfonsäure-Lösung zugegeben. Nach exakten 30 Sekunden wird die Extinktion bei 485 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit der Kalibrierungskurve kalkuliert. Laut Matsushita et al., (1993) bietet diese Methode geringe Protein-Protein Abweichungen, Resistenz vor üblichen Störungsfaktoren, sowie eine schnelle Bestimmung. Der Messbereich der Methode liegt zwischen 20 und 800 µg ml⁻¹.

Advanced Protein Assay

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Biuret Reaktion und der Bestimmung nach Bradford, (1976). Bei dieser Methode von Sigma-Diagnostics, auch als APA-Test bekannt, wird ein eigenes Puffer angewandt. Die APA-Lösung wird bei 4°C temperiert und dann 200 µl davon in eine 1,5 ml Glasküvette zugegeben. Dazu werden 800 µl bidestilliertes Wasser und 100 µl der Probe zupipettiert. Nach kurzem Durchmischen wird die Extinktion bei 590 nm gemessen. Geringere Protein-Protein Variationen und Empfindlichkeit zu Störungsfaktoren sind zu erwarten. Der APA-Test eignet sich für Protein-Konzentrationen zwischen 0,1 mg ml⁻¹ und 1,0 mg ml⁻¹.

Modifizierte Lowry Methode

Die Bestimmung nach Lowry ist eine Modifikation der Biuret Reaktion, wobei Cu^{2+} Ionen mit Stickstoffatomen von Peptidbindungen im alkalischen Milieu rotviolette Komplexe bilden. Um das Ausfallen von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ zu vermeiden, wird Tartrat zugegeben. Die Kupfer-Peptidkomplexe reduzieren das Folinreagenz zu Molybdänblau, was eine photometrische Messung ermöglicht. In der Variante nach Peterson werden potenzielle Störfaktoren (mit Ausnahme von Phenol) durch Aufreinigungsschritte mit Deoxicholsäure (DOC) und Trichloressigsäure (TCA) entfernt (Smith, 1982). Das ausgefallene Protein wird aufgelöst und dann gemessen.

Die Methode wird nach Anweisung des Herstellers (Sigma-Diagnostics) aus Puffer-Extrakten durchgeführt. In einem Eppendorfgefäß werden 1 ml Probe und 0,1 ml DOC Lösung vermischt. Nach 10 Minuten wird dann 0,1 ml TCA Lösung hinzugegeben und wieder vermischt. Das Eppendorfgefäß wird dann 10 Minuten bei 18.000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wird entfernt, das Protein-Pellet mit 1 ml Lowry Reagenz gelöst und das Eppendorfgefäß wird mit 1 ml VE-Wasser gewaschen. In eine 3 ml Glasküvette wird diese Lösung zusammen mit 1ml Wasser durchgemischt. Nach 20 Minuten bei RT, werden 0,5 ml Folin-Phenol in die Küvette zugegeben und nach zusätzlichen 30 Minuten wird die Extinktion bei 750 nm gemessen.

3.3.7 Bestimmung von Proteasen

Proteasen können die konstitutive Proteine und im Fall des rekombinanten *Physcomitrella patens* eventuell das rhVEGF degradieren. Die Proteasekonzentration wird mit Hilfe der von der Firma Novozymes empfohlenen Methode gemessen. Das Substrat NN-Dimethylcasein (DMC) wird durch Proteasen zu niedermolekularen Peptiden gespalten. Die hierbei entstandenen freien Aminogruppen reagieren mit 2,4,6-Trinitrobenzene Sulphonsäure (TNBS). Die Konzentration entstandener Komplexe sind photometrisch bei 425 nm zu quantifizieren. Dafür wird eine Kalibrierungsgleichung (3.7) mit der Protease-Standard Savinase erhalten.

$$c_{\text{Protease}} = 1490,6 \cdot O.D._{425} - 258,55 \quad (3.7)$$

Die Konzentration der Proteasen wird als NPU l^{-1} repräsentiert, wobei NPU der Anzahl an Proteaseäquivalenten oder Einheiten mit einer gleicher proteolytischen Aktivität einer Referenzmenge an Savinase deutet.

3.3.8 Bestimmung von VEGF

Die Konzentration des VEGF wird mit dem Sandwich ELISA-Test bestimmt. Eine Beschreibung der dafür benötigten Chemikalien ist im Anhang 3 zu sehen. $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ des Capture Antikörpers werden 1:500 im Coating-Puffer verdünnt und $50 \mu\text{l}$ dieser Lösung werden dann bei 4°C auf jedem Well der Mikrotiterplatte zugegeben. Die Platen werden ca.

24 Stunden bei RT inkubiert.

Anschließend werden die Platten geleert und dreimal mit TWEEN-0,05% PBS gewaschen und getrocknet. Danach werden 100 µl von PBS-1% BSA pro Vertiefung der Platte hinzugeführt und erneut eine Stunde bei RT inkubiert. Die Platten werden dann mit Blocking-Puffer bei -20°C eingefroren, und werden wie oben erwähnt dreimal gewaschen.

Die Proben aus dem Suspensionüberstand und/oder Zellextrakt, und die Standards werden mit PBS-0,1% BSA verdünnt und dann 50 µl jeder Verdünnung pro Well in die Platte hinzugefügt. Nach zwei Stunden bei RT wird die Mikrotiterplatte noch dreimal gewaschen.

Der Detektion Antikörper ($50 \mu\text{g l}^{-1}$) wird 1:1.000 in PBS-1% BSA verdünnt und 100 µl pro Well zupipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei RT und folgendem dreifachem Waschvorgang werden 100 µl von in PBS-0,1% BSA, 1:5.000 verdünntem Streptavidin-POD per Well zugegeben, und weiter eine Stunde inkubiert. Nach erneuten dreimaligem Waschen werden 100 µl der Substratlösung (TMB) zugegeben. Anschließend wird die Farb-Reaktion mit 50 µl 2M H₂SO₄ nach 10-15 min gestoppt. Schließlich wird die Extinktion bei 450 nm mit eine Referenzmessung bei 610 nm gemessen.

Die Probe-Vorbereitung für die Bestimmung des intrazellulären rhVEGF-Gehalts mittels ELISA setzt die Anwendung eines komplexen Puffers voraus, der die Extraktion der Proteine aus der Zellwand ermöglicht (Detergenz), die Aktivität bestimmter vorhandener Proteasen reduziert (Protease-Inhibitor) und die Proteindegradation verlangsamt z.B mit der Einführung von Schutzproteinen. Die Zusammensetzung des angewandten Puffers wird im Anhang 4 beschrieben.

3.3.9 Gelelektrophoretische Proteintrennung

Die Änderung des Proteinmusters weist auf die Variation der Genexpression hin und dient als Beweis bestimmter physiologischer Ereignisse der Moose während der Kultivierung. Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine aus der Probe nach der Denaturierung mit β-Mercaptoethanol und anschließender Behandlung bei hoher Temperatur (100°C), durch den anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecyl Sulfat) umhüllt. Die entstandenen negativ geladene Mizellen werden dann in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels gegeben. Das Mini Protean 3 Cell Gerät erzeugt ein elektrisches Feld, in dem die Mizellen sich durch die Gelporen in Richtung Kathode bewegen. Da die Proteine verschiedene Größe besitzen, bewegen sie sich unterschiedlich schnell.

Den Proben wird der Farbstoff Bromphenolblau zugesetzt. Dieser wandert durch das Gel mit der gleichen Geschwindigkeit wie ein Protein mit der Molmasse von 5 kDa. Nachdem die Linie des Farbstoffs das Ende des Gels erreicht, wird das elektrische Feld entfernt. Die Proteinbanden werden durch die Coomassie brilliant blue R250-Färbung oder mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Ihre Nachweisgrenze pro Band liegen bei 200 bis 400 ng für Coomassie Blau und 5 bis 30 ng für die Silberfärbung (Rehm, 2002). Die Komposition der Chemikalien für die Durchführung der gelelektrophoretischer Trennung wird im Anhang 5 gezeigt.

3.3.10 Phytohormonbestimmung

Phytohormone sind Signalmoleküle, die Wachstums- und Differenzierungsereignisse bei

Pflanzen hervorrufen und deswegen eine zentrale Rolle bei der Durchführung von Kultivierungen von Moosen spielen. Mehrere Methoden für die Bestimmung von Pflanzenhormonen bei Bryophyta: spektrometrische Bestimmungen (Ergün et al., 2002; Ünyayar et al., 1996), Biotest e.g. Koleoptilen-Krümmungstest (Lüttge et al., 1994), GC-MS (Ashton et al., 1985), HPLC-MS (Bhatla und Dhinga-Babbar, 1990) und HPLC-ELISA (Schulz et al., 2001) werden berichtet. Daraus ergibt sich, dass eine systematische Quantifizierung des Phytohormonespiegels bei biotechnologisch wichtigen Moosen mangelhaft ist. Eine Methode für den Einsatz in Suspensionskultivierungen von *Physcomitrella patens* muss eine schnell und reproduzierbare Quantifizierung mehrere Hormone erlauben. Unter diesen Betrachtungen werden zwei ausgewählte Methoden näher dargestellt.

Spektrophotometrische Methode nach Ünyayar und Ergün

Die spektrophotometrische Bestimmung nach Ünyayar und Ergün ist eine Modifikation der ursprünglichen Methode nach Ergün et al. (2002). Eine detaillierte Beschreibung dieser Prozedur ist im Anhang 6 zu finden.

Aus 100 ml Zellsuspension werden Moospellet und Überstand, wie bei den anderen analytischen Methoden, getrennt. Der Überstand aus der Probe kann direkt für die Bestimmung extrazellulärer Phytohormone benutzt werden. Die Zellen müssen jedoch zuerst bearbeitet werden, um ein Extrakt zu gewinnen.

Die Proben werden mit 200 ml VE-Wasser gewaschen und dann mit 100 ml von CH₃OH:CHCl₃:NH₄OH (12:5:3) zugemischt. Die Extraktion der Phytohormone läuft 1 Stunde unter ständigem Mischen mit einem Magnetrührer. Anschließend werden 50 ml VE-Wasser zugegeben. Die Proben werden dann ca. 12 Stunden für die Phasentrennung bei 4°C gelagert. Die wässrige Phase (CH₃OH, NH₄OH, Wasser mit gelösten Stoffen) wird in einen Rundbodenkolben überführt und ihr Volumen notiert. Die organische Phase (CHCl₃ mit gelösten Stoffen) wird verworfen.

Aus der wässrigen Phase werden die leichtflüchtigen Komponenten mittels einer 30 Minuten lang Vakuumverdampfung bei 50°C, -200 mbar entfernt. Um eine Extraktion von freien Auxinen und Abscisinsäure in die organische Phase zu ermöglichen wird der pH-Wert der Lösung mit 4 M HCL auf pH 2,5 eingestellt. Die Extraktion wird mit 45 ml Essigsäureethylester (EtOAc) durchgeführt, wobei EtOAc in drei Schritten zu je 15ml zugegeben wird. 40 ml der organischen Phase werden in einen Rundbodenkolben überführt und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer bei 50°C, -200 mbar entfernt.

Für die Extraktion freier Cytokininen in die organische Phase wird der pH-Wert der wässrigen Phase mit 4 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Extraktion wird Ebenfalls mit 45 ml Essigsäureethylester (EtOAc), auch in drei 15 ml Schritten. Das Lösungsmittel wird, wie bei den Auxinen, entfernt.

Die Konjugate der Phytohormone werden durch die Einstellung des pH-Wertes der wässrigen Proben auf 11 und durch die anschließende thermische Behandlung 1 Stunde bei 70°C hydrolysiert. Dann werden erneut zwei Phasen bei pH 7 und pH 2,5 mit Essigsäureethylester extrahiert und der EtOAc unter Vakuum entfernt, genau wie bei den freien Phytohormonen.

Der Trockenrückstand wird in 3 ml Methanol gelöst und das Absorptionsspektrum der Lösungen aufgenommen. Die Absorptionsmaxima liegen für Indol-3-Essigsäure bei 222 nm und 280 nm, für Abscisinsäure bei 263 nm, für Kinetin bei 267 nm und für Zeatin bei 269 nm.

Standardlösungen von Indol-3-Essigsäure und Kinetin im Methanol werden präpariert und Kalibrierungsgeraden ermittelt.

$$c_{IAA} = 22,677 \cdot OD_{280} + 0,1212 \quad (3.8)$$

$$c_{Kinetin} = 8,7523 \cdot OD_{267} - 0,0587 \quad (3.9)$$

Die Konzentration der Phytohormone aus den Extrakten in $\mu\text{g ml}^{-1}$ ergibt sich mit Hilfe der Gleichungen 3.8 und 3.9.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Diese Methode erlaubt die Durchführung der Auftrennung und Identifikation der Phytohormone in einem Schritt. Die Nachweisgrenze liegt für IAA bei 0,3 pmol, und für Zeatin bei 23 pmol (Birkemeyer et al., 2003). Baydar und Harmankaya, (2005) berichten über die erfolgreiche Anwendung des Extraktionsverfahrens nach Ünyayar und Ergün für die Probenvorbereitung der GC-MS-Bestimmung von Phytohormonen. Daher wird die Extraktion der Phytohormone wie bei der spektrometrischen Methode durchgebracht, außer dass eine zusätzliche Extraktion bei pH 8, um eine verbesserten Extraktion von $i^6\text{Ade}$ zu erreichen, gemacht wird. Der finale Trockenrückstand, der die konzentrierten Phytohormone beinhaltet, wird diesmal in 2,5 ml Essigsäureethylester mit 10% (v/v) Ameisensäure aufgelöst.

Nach der Probenvorbereitung werden die Extrakte unter Stickstoffatmosphäre auf 100°C erhitzt, bis das Lösungsmittel vollständig entfernt wird. Zum Trockenrückstand werden $5\mu\text{l}$ Lösung der Referenzkomponente ($5\alpha\text{-Cholestane}$) und $100\mu\text{l}$ von Silylierungsreagenz MTBSTFA (*N*-tert-Butyldimethylsilyl-*N*-methyl-trifluoroacetamid) zugegeben und 1h bei 100°C inkubiert. Die Derivatisierung der Phytohormone durch Silylierung ist notwendig für die weitere Durchführung der GC-MS (Birkemeyer et al., 2003). Hier werden die aktiven Wasserstoffatome durch Tertbutyl-dimethylsilyl ersetzt (siehe Abbildung 3.3).

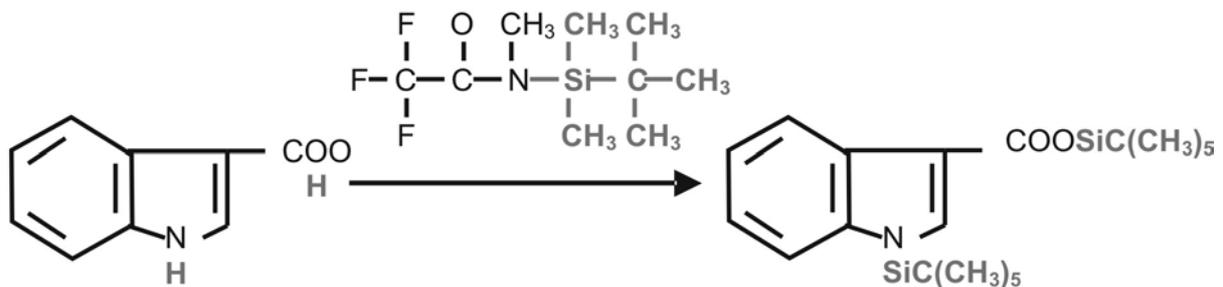


Abb. 3.3: Silylierung der Indol-3-Essigsäure (IAA) mit *N*-tert-Butyldimethylsilyl-*N*-methyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA)

Mit Hilfe der Silylierung wird die Entstehung von Dimeren während der Verdampfung im GC-Injektor vermieden und die Siedetemperatur gesenkt. Außerdem wird die Masse der kleinen Phytohormonmoleküle erhöht, wodurch die Phytohormonpeaks auf dem Chromatogramm größer und somit leichter erkennbar werden. Im Vergleich zu den anderen gängigen Methoden ist bei der Silylierung die Entstehung von Nebenprodukten minimal und

die Derivate sind stabiler.

Für die Etablierung der Methode wird zunächst die Derivatisierung der Phytohormonstandards (IAA, i^6 Ade, ABA und Zeatin) durchgeführt. Die Massenspektren und Retentionszeiten der Derivate werden für die weitere Identifikation der Phytohormone aus den Proben mittels GC-MS-SIM (*selected ion monitoring*) ermittelt. Um eine bessere Trennung der Moleküle in der Säule zu erzielen, wird der Temperaturgradient von 6°C min^{-1} auf 2°C min^{-1} abgesenkt. Bei der GC-MS-SIM misst der Detektor des Massenspektrometers nur die Ionen mit vorgegebenem Verhältnis von Masse zu Ladung. Die Fläche des Peaks soll dadurch der Masse des Phytohormons entsprechen. Die Methodenparameter und Prozedur befinden sich im Anhang 7.

3.3.11 Fettsäurebestimmung

Änderungen des Fettsäuremusters können Umwelt- oder Entwicklungsereignisse in Pflanzen wieder spiegeln. Für die Bestimmung der Fettsäurenkonzentration in *Physcomitrella patens* wird die MIDI-Methode angewandt. Hier werden die Lipide der Moose mit Hilfe des Reagenz 1 (NaOH, Methanol) zu freien Fettsäuren gespalten. Sie werden dann mit Reagenz 2 (Ethanol, HCl) methyliert und die Fettsäuremethylester werden mit dem Reagenz 3 (Hexan, Methyl-tert-butylether) extrahiert. Der Extrakt wird durch die Zugabe von Reagenz 4 (NaOH, Wasser) gereinigt und mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Als Standard dient die Mischung F.A.M.E. MixC4-C24 (Sigma-Aldrich). Die Gewinnung der Fettsäuremethylester und die Einstellungen der GC-MS sind im Anhang 8 zu sehen.

4 Physiologische Charakterisierung von *Physcomitrella patens*

In den letzten Jahren nahm die Anzahl an Veröffentlichungen über *Physcomitrella patens*, besonders im Bereich der Pflanzenphysiologie und Entwicklung, sowie in *functional genomics* zu. Mehrere davon stammen jedoch aus nicht systematischen Untersuchungen oder wurden aus Versuchen in festen Medien erfasst. Da z.B. die Gastransport-Bedingungen äußerlich anders als in Suspension sind, ist die Übertragbarkeit der Daten aus der Literatur für den Kultivierungszweck schwierig. Manche Autoren betonen die Notwendigkeit neuer Strategien für die Prozessentwicklung mit Bryophyta und deren Scale-Up (Hohe und Reski, 2005b; Gorr, 1999).

In diesem Kapitel werden die Antworten des Moooses *Physcomitrella patens* in Suspensionskultivierungen auf die Variation ausgewählter Umgebungsparameter überprüft und die Proteinbestimmungsmethoden verfeinert. Die im Kolbenmaßstab durchgeführten Versuche sollen die Definition der Kultivierungsbedingungen für weitere Größen unterstützen.

4.1 Voruntersuchungen zum Wachstum vom *Physcomitrella patens* in Suspension

Das Wachstum von *Physcomitrella patens* Wildtyp und dem Stamm tWTActin5_11.51VEGF in Suspension wird verglichen. Für diese Experimente werden die Moose in 250 ml und 500 ml Schüttelkolben in modifiziertem Knop Medium bei $20,5 \pm 1,0$ °C und Photonenflussdichte (PFD) von $20 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ in Tag/Nacht Zyklen von 16/8 Stunden (LD) kultiviert. Der pH-Wert der Biosuspensionen wird täglich *offline* gemessen und dann bei $5,8 \pm 0,5$ mittels 0,1 M KOH oder 0,1 M HCl steril justiert. Den begasten Kolben wird kontinuierlich 3,3 vvm Luft zugegeben.

In der Abbildung 4.1 ist ein Unterschied zwischen den Wachstumskurven der begasten und der nicht begasten Kolben zu sehen. Das liegt, wie erwartet, am für die Moose verfügbaren CO₂. Die spezifische Wachstumsrate (μ) der Moose aus nicht begasten Kolben liegt bei $0,17 \text{ d}^{-1}$, die aus begasten Kolben bei $0,21 \text{ d}^{-1}$.

Basierend auf täglichen mikroskopischen Aufnahmen der Moose sind keine Unterschiede zwischen beiden Stämmen erkennbar, und ihre Wachstumsraten sind statistisch gleich. Diese Beobachtungen unterstützen die Berichte von Bauer et al., (2005b), die keine phenotypischen Variationen bei tWTActin5_11.51VEGF und dem Wildtyp detektiert haben.

Wie im Kapitel 2 erwähnt wurde, wachsen die Moose apikal oder durch Verzweigung. Aus einem Inokulum, das aus kurzen protonemalen Filamenten besteht, bilden sich allmählich große Moosagglomerate während der Kultivierung. Sie stellen Probleme für die richtige Durchmischung der Kolben dar, gefährden die Homogenität der Biosuspension und die Reproduzierbarkeit der Versuche. Deswegen werden die Moose, genauso wie bei der Stammhaltung (Abschnitt 3.1), am 6. und 10. Kultivierungstag mit einem Ultra-Turrax® steril mechanisch zerkleinert. Die Proteaseaktivität beider Stämme vor und nach der Zerkleinerung wird in Abbildung 4.2 verglichen. Hier ist der Unterschied bezüglich der Proteasekonzentration im Moosüberstand zwischen beiden Stämmen klein, aber messbar. Gleich nach der Zerkleinerung sind mehrere Moose zerstört und ihre Zellinhalte freigesetzt, was den Anstieg der Proteaseaktivität erklärt. Dennoch kehrt der Proteasegehalt der zerkleinerten Biosuspensionen nach ca. 1 Stunde zu den Anfangswerten vor der

Zerkleinerung zurück. Es scheint, dass intrazelluläre Proteasen nur eine begrenzte Stabilität im Medium besitzen.

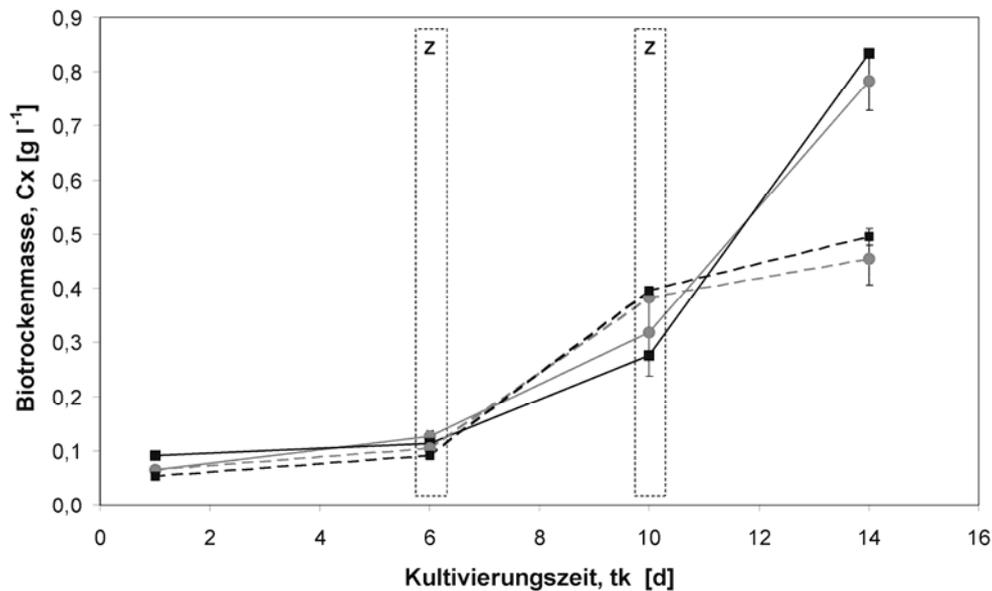


Abb. 4.1: Verlauf der Kultivierung von *Physcomitrella patens* Wildtyp (●) und *tWActin5_11.51VEGF* (■) in begasten (—) und nicht begasten (--) Schüttelkolben. Am 6. und 10. Kultivierungstag wird eine mechanische Zerkleinerung der Moose durchgeführt (Z).

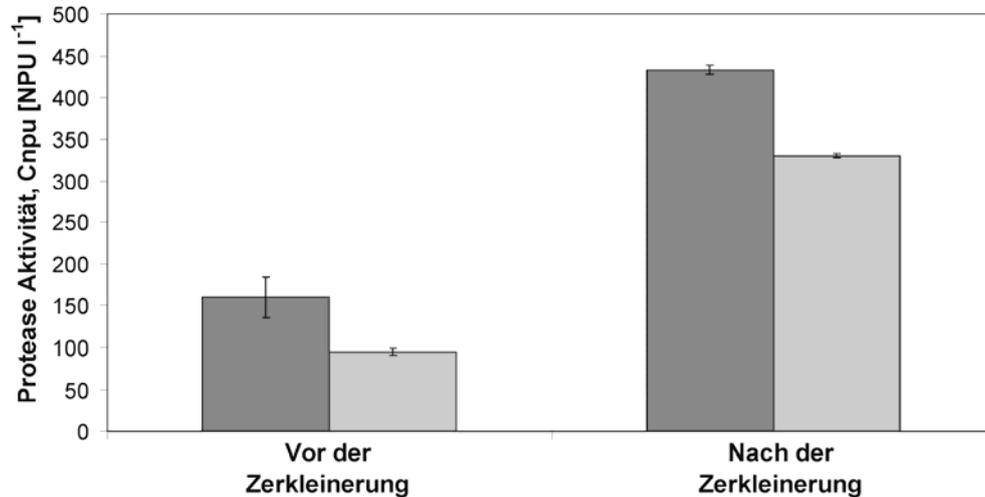


Abb. 4.2: Variation der Proteaseaktivität vor und nach der Zerkleinerung von *Physcomitrella patens* Wildtyp (■) und *tWActin5_11.51VEGF* (■) aus begasten Kolben am 10. Kultivierungstag

Die Proteasekonzentration vom Überstand aus den Biosuspensionen bleibt bis zum Ende der Kultivierung klein, wobei maximal ca. 150 NPU l⁻¹ beim Wildtyp gemessen werden. Frühere Untersuchungen haben nachweislich gezeigt, dass *Physcomitrella patens* keine bekannte Pflanzenprotease ins Medium sezerniert (Tintelnot et al., 2004).

4.1.2 Phytohormonspiegel

Physcomitrella patens Wildtyp wird in unbegasteten Schüttelkolben kultiviert (Abschnitt 3.1) und Zellproben sowie Suspensionsüberstand werden auf Phytohormone geprüft. Die Ergebnisse und die verfügbaren Daten aus der Literatur sind in Tabelle 4.1 dargestellt. In den untersuchten Proben werden IAA, i^6 Ade und Zeatin, aber keine Abscisinsäure identifiziert.

Tabelle 4.1: Phytohormonkonzentration von *Physcomitrella patens* Wildtyp aus Suspensionskultivierungen in Schüttelkolben (intra- und extrazellulär) mittels GC-MS

Phytohormon	Konzentration (intrazellulär) [$\mu\text{g g}^{-1}$]			Konzentration (extrazellulär) [$\mu\text{g l}^{-1}$]		
	Ergebnis	Literatur		Ergebnis	Literatur	
		Wert	Methode		Wert	Methode
IAA	1,27±0,16	0,075	GC-MS (Ashton et al., 1985)	0,84±0,14	0,63**	GC-MS (Ashton et al., 1985)
		0,027*	HPLC-ELISA (Reutter et al., 1998)		0,22**	HPLC-ELISA (Reutter et al., 1998)
i^6 Ade	1,76±0,28	0,01*	HPLC-ELISA (Reutter et al., 1998)	0,78±0,04	0,0061*	HPLC-ELISA (Schulz et al., 2001)
		0,0007*	HPLC-ELISA (Schulz et al., 2000)		0,005*	HPLC-ELISA (Schulz et al., 2000)
		<0,076*	HPLC-GC-MS (Wang et al., 1981)			
Zeatin	0,55±0,14	<0,0076*	HPLC-GC-MS (Wang et al., 1981)	0,2±0,06	0,076**	HPLC-GC-MS (Wang et al., 1981)
ABA	nicht detektiert	0,002*	HPLC-GC-MS (Minami et al., 2005)	nicht detektiert	0,24*	HPLC-GC-MS (Minami et al., 2005)

* Umgerechnete Werte aus feuchter Biomassekonzentration.

** Abschätzung für $c_x = 1 \text{ g l}^{-1}$ mit der Annahme, dass 88 % der IAA und 73 % des i^6 Ade im Medium vorliegen.

Die erhaltenen Werte weichen zwar von den in der Literatur angegebenen stark ab, zeigen aber eine mit den Angaben der Literatur übereinstimmende Tendenz. Zum Beispiel ist der in diesen Untersuchungen detektierte Gehalt an i^6 Ade größer als der Gehalt an Zeatin. Diese Abweichungen können mehrere Gründe haben. Ein Großteil der Phytohormone liegt in gebundener Form vor, e.g. 76-88 % der IAA in manchen Moosen als Komplex (Sztein et al., 1999). In den Literaturquellen wird nicht angegeben, ob die gebundenen Phytohormone analysiert werden. Falls die Werte aus der Literatur sich nur auf freie Phytohormone begrenzen, wird nur ein kleiner Teil davon betrachtet.

Außerdem ist die Konzentration der Phytohormone von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen und dem Differenzierungsgrad abhängig. Zum Beispiel beziehen sich die Werte von Schulz et al., (2001) auf eine Zellkultur, bei der die Differenzierung durch die Zugabe des Auxinantagonisten Diammoniumtartrat unterdrückt wurde. Die ermittelten Werte aus Tabelle 4.1 stammen dagegen aus hoch differenzierten Moosen am

Kultivierungsende in Kolben. Schulz et al., (2000) beobachteten starke Veränderungen der $i^6\text{Ade}$ -Konzentration im Laufe der Kultivierung, von $0,018 \mu\text{g l}^{-1}$ bis $0,004 \mu\text{g l}^{-1}$.

4.2 Einfluss der Gas-Zusammensetzung auf das Wachstum

In diesen Versuchen wird *Physcomitrella patens* tWTActin5_11.51VEGF in 250 ml Schüttelkolben mit 150 ml modifiziertem Knop-Medium bei $20,5 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und PFD von $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LD 16/8) kultiviert. Der pH-Wert wird täglich *offline* gemessen und dann bei $5,8 \pm 0,5$, sowie in den Vorversuchen, gehalten. Ebenfalls werden 3,3 vvm Luft oder Mischungen von Luft, CO_2 , N_2 und O_2 kontinuierlich zugegeben, wobei die Konzentration von Kohlendioxid im Gas 5 % (v/v) für alle Kolben beträgt. Dadurch wird der Einfluss anderer Bestandteile der Gasmischung auf die Moose überprüft. Die Zusammensetzung der Gasmischungen befindet sich in Tabelle 4.2.

Tabelle 4.2: Physiologische Eigenschaften des Moooses *Physcomitrella patens* tWTActin5_11.51VEGF in begasteten Schüttelkolben bei unterschiedlicher Gas-Zusammensetzung

	Suspension 1	Suspension 2	Suspension 3	Suspension 4
Begasung-Zusammensetzung	0,05 CO_2	0,05 CO_2	0,05 CO_2	0,05 CO_2
[l l ⁻¹]	0,95 N_2	0,95 Luft	0,50 O_2	0,95 O_2
c_x^* [g l ⁻¹]	0,07	0,52	0,34	0,02
μ [d ⁻¹]	0,07	0,22	0,20	-
Verzweigungsgrad**	++	++++	+++	+
Anteil an Caulonema**	++	++	++	-
Tendenz zur Agglomeration**	-	++	++	-

* Am 13. Kultivierungstag.

** Qualitative Bewertung aus mikroskopischen Aufnahmen.

Die unterschiedlichen Gas-Zusammensetzungen in den Kolben rufen Variationen äußerer Merkmale der Moose wie Verzweigung oder Tendenz zur Agglomeration, sowie der spezifischen Wachstumsraten (μ) hervor. Diese Eigenschaften werden nach 13 Kultivierungstagen ebenfalls in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Kolben mit 5 % CO_2 und 95 % Luft, sowie mit 5 % CO_2 , 45 % N_2 und 50 % O_2 zeigen aktive Verzweigung und hohes Wachstum. Dagegen weisen die Moose, die mit 5 % CO_2 und 95 % O_2 begast werden, schon nach den ersten Kultivierungstagen Pigmentverlust und *cell bleaching* auf, woraufhin sie dann sterben.

Die spezifische Wachstumsrate der Moose mit hoher Verzweigung liegt um die $0,22 \text{ d}^{-1}$ und ist vergleichbar mit den Werten aus den Vorversuchen. Daraus ergibt sich, dass bei der Begasungsrate in 4.1 (3 vvm Luft, 0,03 % CO_2 (v/v)) die CO_2 -Transferrate gleich oder höher ist als die Kohlendioxid-Fixierungsrate. Andere Faktoren, die hier ebenfalls das Wachstum limitieren, werden in den nächsten Abschnitten untersucht.

Die Variationen des Chlorophyllgehalts der Moose zwischen der Anfangsphase und dem 9. Kultivierungstag werden in Abbildung 4.3 dargestellt. Wie erwartet steigt im Lauf der Kultivierung der Gehalt an Pigmenten in den Moosen mit hohem Wachstum. Genau umgekehrt verhält er sich bei den Moosen, die langsam wachsen.

Moose aus den Kolben mit Luft und 5 % CO₂ sekretieren, mit einer maximalen Konzentration im Suspensionsüberstand von 4.033 pg ml⁻¹ (ca. 13 µg g⁻¹) am meisten VEGF (siehe Abbildung 4.4). Das Verhältnis des extrazellulären VEGF zum gesamten Proteingehalt der Moose variiert zwischen 0,007 % und 0,03 % (je nach Phase der Kultivierung).

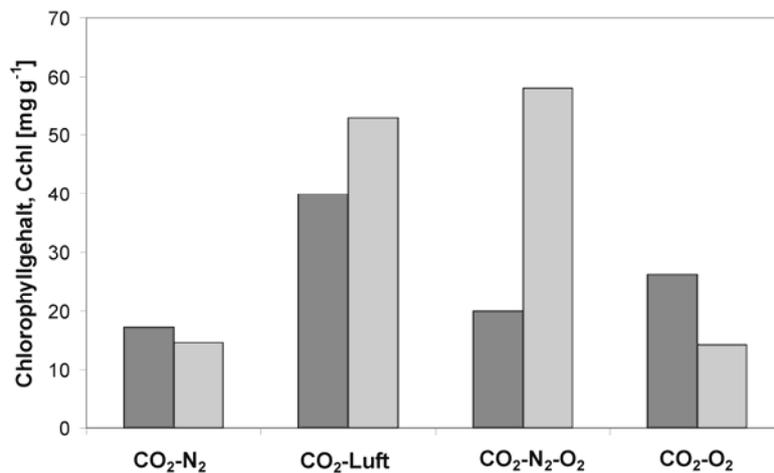


Abb. 4.3: Vergleich des gesamten Chlorophyllgehalts von Stamm *tWActin5_11.51VEGF* zwischen dem 2. (■) und 9. (□) Kultivierungstag aus Kolben mit diversen Gas-Zusammensetzungen gemäß Tabelle 4.2

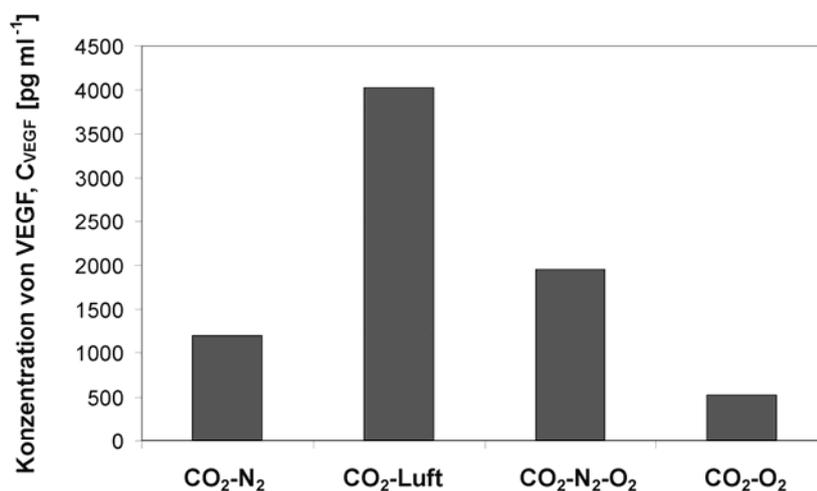


Abb. 4.4: Konzentration von VEGF im Überstand von *tWActin5_11.51VEGF* Suspensionen aus Kolben mit diversen Gas-Zusammensetzungen gemäß Tabelle 4.2 am 9. Kultivierungstag

Physcomitrella patens, das mit 95 % (v/v) O₂ begast wird, zeigt nach einigen Tagen deutliche Signale von Zellschädigung auf und ist auf Dauer nicht lebensfähig. Bei Gasmischungen, die zwischen 20 % und 50 % Sauerstoff beinhalten, sind keine negative Erscheinungen zu

beobachten. Moose aus Schüttelkolben mit 5 % CO₂ in der Begasung zeigen keine detektierbare phenotypische Variation verglichen mit Moosen, die mit normaler Luft begast werden. Eine Erklärung für das schlechte Anpassungsvermögen der Moose bei sauerstofffreien Gasmischungen (5 % CO₂ und 95 % N₂) ist nicht deutlich ersichtlich. Deshalb könnten geringe O₂-Mengen für die Stabilität des Metabolismus nötig sein, wie bei anderen Pflanzen der Fall ist (Lüttge et al., 1994).

4.3 Einfluss der Photonenflussdichte auf das Wachstum

Kultivierungen von *Physcomitrella patens* tWTActin5_11.51VEGF in Schüttelkolben werden bei vergleichbaren Bedingungen wie in den früheren Untersuchungen 8 bis 9 Tage durchgeführt. Die 0,25 L und 0,5 L Kolben werden mit durchschnittlicher PFD zwischen 11 und 460 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt und mit Luft, Mischungen von Luft und CO₂ (1, 7 % (v/v) sowie reinem CO₂ begast.

Die Sauerstoffproduktion aufgrund der Photosynthese einer tWTActin5_11.51VEGF Suspension mit einer Konzentration von 0,34 g l⁻¹ wird bei verschiedenen PFD untersucht. Als Messkammer dient ein 3 cm dünner Glasszylinder, der mit zwei Metallampfen (HITLite-HIT-DE, 150 CW, 10.000K) aus entgegengesetzten Richtungen bestrahlt wird. Es werden PFD zwischen 5 und 600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreicht, je nach Abstand der Lampen zur Messkammer. Eine 0,038 M NaHCO₃-Lösung sorgt für den für die Moosphotosynthese nötigen Kohlenstoff, der hier im Überschuss vorliegt. Die Suspension wird auf pH 7,6 geführt und während der Messung auf 22°C temperiert. Die Moose werden 30 Minuten vor der Bestrahlung an Dunkelheit adaptiert und dann wird die NaHCO₃-Lösung kurz vor Messbeginn, zugesetzt. Nach der Einstellung einer bestimmten PFD wird das Volumen des produzierten Sauerstoffs mittels einer 2 mm dünnen Wassersäule gemessen. Jede Messung dauert 20 Minuten, wobei sich die Sauerstoffproduktionsraten aus den Daten des verdrängten Volumens pro Zeit berechnen lassen.

Moose aus Kolben mit einer hoher PFD (über 57 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zeigen ein klares Muster intensiven Wachstums, das mit hoher Verzweigung und der Bildung großer, hauptsächlich chloronemaler Filamente charakterisiert werden kann (siehe Abbildung 4.5). Aus diesem Grund müssen die Moose, die zur Klumpenbildung tendieren, mit dem Ultra-Turrax[®] zerkleinert werden. Für PFD bis ca. 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gilt, je höher die PFD, desto früher entsteht eine Phase langsamen Wachstums. Bei hoher Biomassekonzentration lassen die Wachstumsraten in allen Kolben nach.

Der Übergang von einer Phase exponentiellen Wachstums in eine nahezu lineare gilt in photoautotrophen Bioverfahren als Beweis des Auftretens von lichtlimitiertem Stoffwechsel, überwiegend bedingt durch Abschattungseffekte (Huang und Rorrer, 2003). Eine langfristige Exposition bei hoher PFD kann inhibierend auf das Wachstum wirken (Photoinhibition), ebenso wie die Abwesenheit von Tag/Nacht Zyklen bei hoher PFD schädlich sein kann. Hohe und Reski, (2002) berichten dennoch über erfolgreiche Suspensionskultivierungen von *Physcomitrella patens* ohne Tag/Nacht Zyklen bei ca. 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In der Abbildung 4.6 werden die Werte der spezifischen Wachstumsrate (μ) gegen die PFD in der Phase schnellen Wachstum für die getesteten Kolben dargestellt. Laut Literatur sollte der Verlauf von μ vs PFD bei niedriger PFD linear sein. Leider ist die Auflösung im niedrigen Bereich nicht gut genug. Die maximal erreichte Wachstumsrate aus den Experimenten ist ca. 0,45 - 0,5 d⁻¹, wobei keine Erhöhung von μ bei einer PFD über 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu sehen ist.

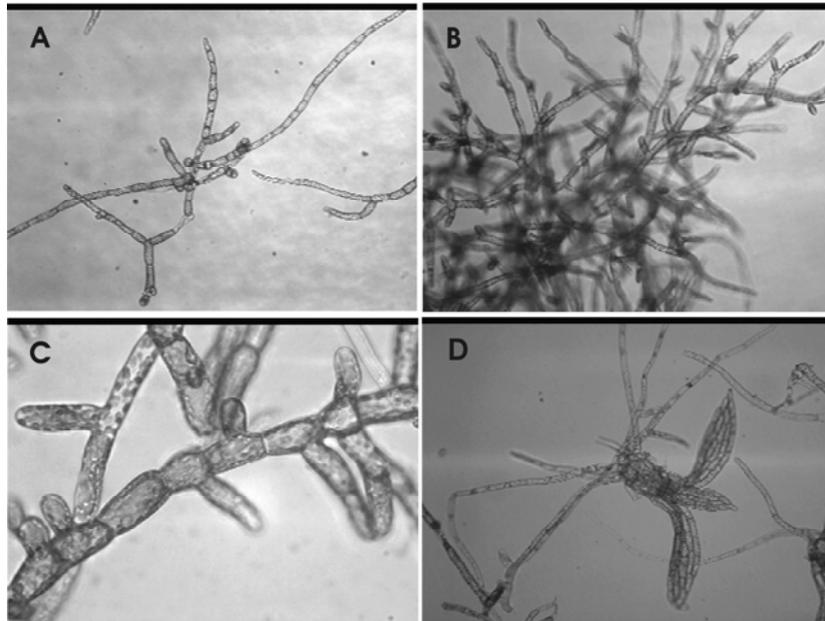


Abb. 4.5: Variation der Morphologie von *tWTActin5_11.51VEGF* während der Kultivierung in Schüttelkolben bei einer PFD von $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Begasungsmischung von Luft und CO_2 (1,7 % (v/v)). (A) Lag-Phase. (B) und (C) Exponentielle Wachstumsphase, hoher Verzweigungsgrad. (D) Ende der Kultivierung, junger Gametophor mit Rhizoiden

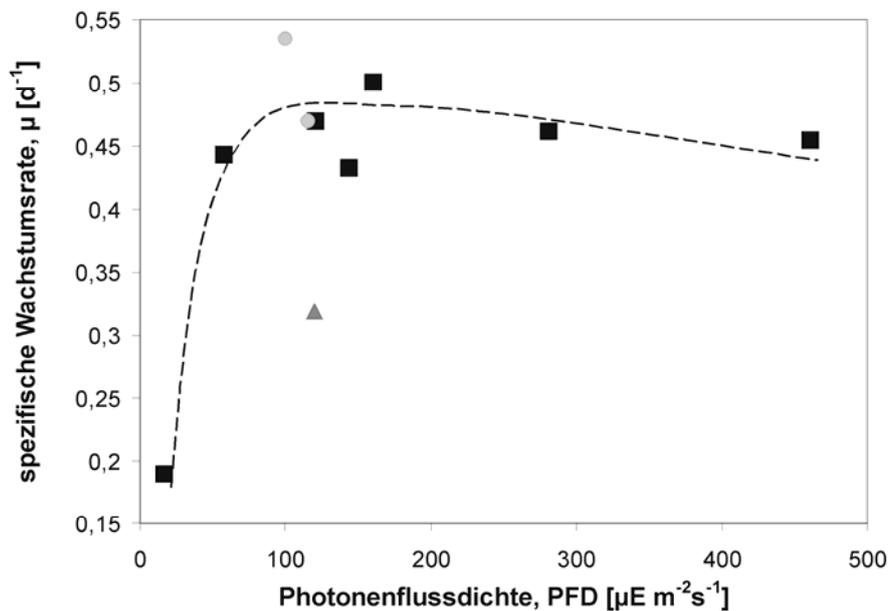


Abb. 4.6: Änderung der spezifischen Wachstumsrate (μ) bei einer Variation der PFD in *tWTActin5_11.51VEGF*. Die untersuchten Kolben werden mit Luft (■), Mischungen aus Luft- CO_2 (1,7 % (v/v))(●) und reinem CO_2 begast (▲).

Kultivierungen von *Physcomitrella patens*, bei denen nur mit CO_2 begast wird, zeigen deutliche Signale von Zellstress, kaum Verzweigungen, niedrige μ , und brüchige Zellwände. Da der pH-Wert aus den Kolben nur einmal täglich *offline* reguliert wird, leiden diese Suspensionen besonders unter drastischen pH-Variationen. Vorversuche bestätigen dennoch

die Kultivierbarkeit von *Physcomitrella patens* mit der Zugabe von reinem CO₂ bei einer passenden pH-Regelung.

Die Begasung mit Luft-CO₂ Mischungen hat keinen besonderen Einfluss auf die Wachstumsraten der Moose im Vergleich zu den mit Luft begasten Kolben. Hier weist eine 60-malige Erhöhung des für die Moose verfügbaren Kohlendioxids keine proportionale Änderung der μ bei einer PFD zwischen 100 und 115 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf.

Die Produktion von Sauerstoff bei verschiedener PFD wird in der Abbildung 4.7 zusammen mit den Wachstumsraten aus den Kolben (Abbildung 4.6) abgebildet. Hier ist die Tendenz beider Kurven ähnlich. Bis zu einer PFD von 155 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ steigt die Produktionsrate von O₂ annähernd linear. Eine zusätzliche Erhöhung der PFD ruft keinen Anstieg der Photosyntheseleistung hervor. Beim Versuch mit einer PFD von 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entsteht ein Vakuum in der Messkammer, was ein Indiz für Atmung darstellt. Die gemessenen Werte der O₂-Produktion bzw. des O₂-Verbrauchs können bei niedrigen PFD nahe oder unter dem Kompensationspunkt leider nicht reproduzierbar ermittelt werden. Obwohl die Moose aus einer einzelnen Biosuspension stammen und jedes Experiment mit einer frischer Probe nicht länger als 30 Minuten durchgeführt wird, zeigen die Zellen 3 Stunden nach der Zugabe von NaHCO₃-Lösung äußere Schäden. Eine toxische Wirkung auf die Moose ist nicht auszuschließen.

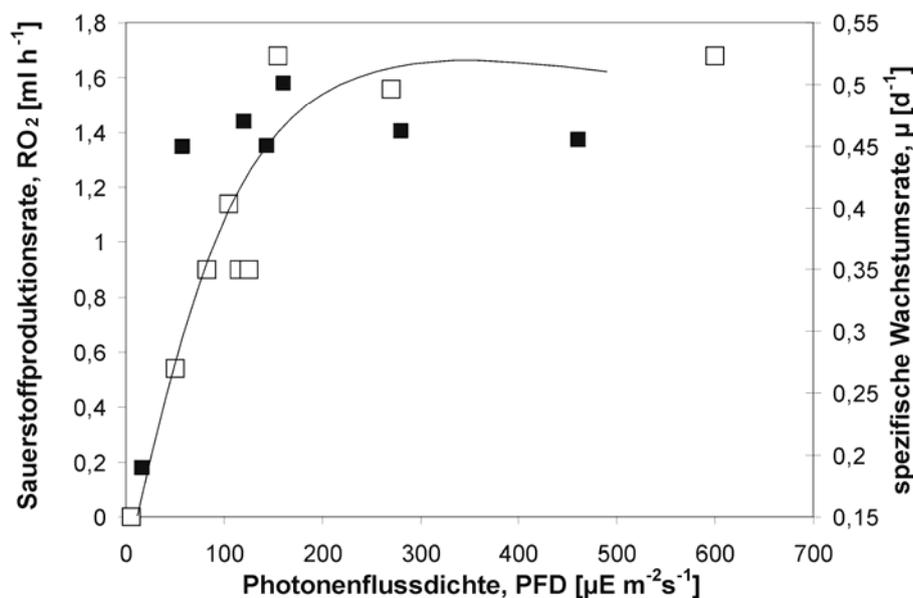


Abb. 4.7: Effekt der PFD auf die Sauerstoffproduktion (□) und auf die Wachstumsrate (■) einer Suspension von *Physcomitrella patens*

4.4 Einfluss der Phytohormone auf das Wachstum und die Differenzierung

Zwei Kultivierungsreihen von tWTActin5_11.51VEGF im Schüttelkolbenmaßstab werden durchgeführt, um die physiologische Rolle mancher Pflanzenhormone und ausgewählter Phytohormonantagonisten in Suspensionskultivierungen zu untersuchen. Die 0,25 L Kolben werden bei $20,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$, einer PFD von $57 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einem pH-Wert von $5,8 \pm 0,5$ gehalten und mit 4 vvm filtrierter Luft begast. Die Konzentration der zugegebenen Phytohormone (IAA und Kinetin) und des Auxininhibitors (Ammoniumtartrat) in den Kolben

ist in der Tabelle 4.3 aufgelistet. Für jeden Suspensionstyp werden turraxierte und nicht turraxierte Kolben verglichen, um mögliche physiologische Variationen der Moose aufgrund der mechanischen Zerkleinerung zu erforschen. Die Zerkleinerung wird bei der ersten Versuchsreihe am 3. und 9. Kultivierungstag und bei der zweiten am 4. und am 11. Tag durchgeführt. Das Kriterium für die Zerkleinerung der Biosuspensionen ist die mittlere Größe der Fäden (ca. 2000 μm), die aus mikroskopischen Aufnahmen ermittelt wird.

Tabelle 4.3: Nomenklatur der Suspensionen von *tWTActin5_11.51VEGF* zur Untersuchung des Einflusses exogener Phytohormone und Phytohormonantagonisten auf das Wachstum und die Differenzierung. Inokulumsorte: Protonema (PRO); Gametophor (GAM)

	B	AT	AT/2	AX	AXC	G	GAXC
Konzentration von Ammoniumtartrat [mM]	-	5,0	2,5	-	-	-	-
Konzentration von IAA [μM]	-	-	-	5	5	-	5
Konzentration von Kinetin [μM]	-	-	-	-	10	-	10
Inokulumsorte	PRO	PRO	PRO	PRO	PRO	GAM	GAM

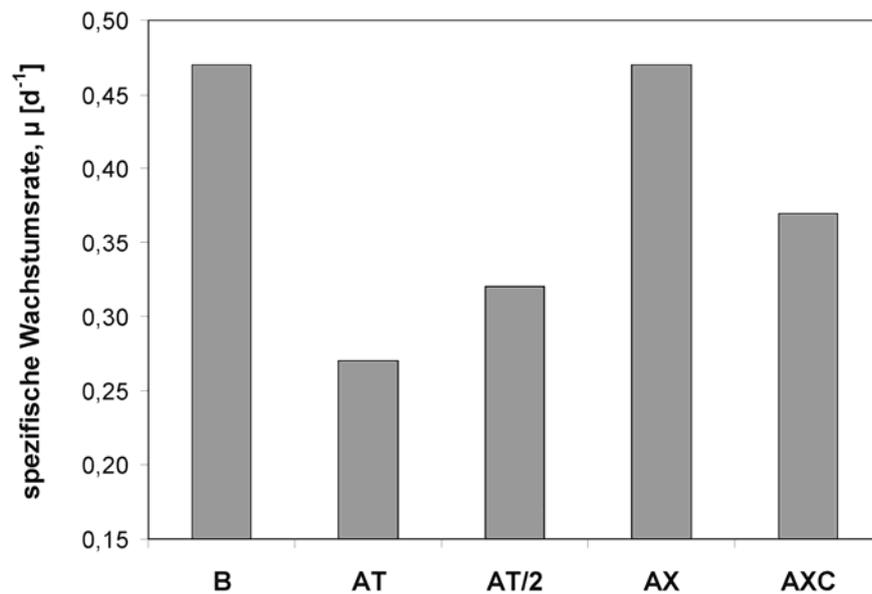


Abb. 4.8.: Spezifische Wachstumsrate von *Physcomitrella patens*-Protonema aus Schüttelkolben nach der Zugabe von 5 mM (AT) und 2,5 mM Ammoniumtartrat (AT/2), 5 μM IAA (AX) und 5 μM IAA plus 10 μM Kinetin (AXC)

Da eine photometrische Abschätzung des Verlaufs der Biomassekonzentration nur aus Moosen mit kleinen Filamenten möglich ist, werden die durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten der Moose aus turraxierten Kolben in der Abbildung 4.8 gegenübergestellt. Hier sind die Wachstumsraten der Moose, die mit exogenem IAA kultiviert werden, vergleichbar zu denen des Referenzkolbens. Dagegen zeigen die Kolben mit 5 mM Ammoniumtartrat ca. 20 % kleinere Werte für μ . Eine toxische Wirkung des 5 mM Ammoniumtartrats auf *Physcomitrella patens* ist zu vermuten. Die Halbierung der

Konzentration von Ammoniumtartrat steigert das Wachstum und die Addition von 10 μM Kinetin scheint wachstumshemmend auszuwirken, ganz anders als bei AX-Moosen.

Typische morphologische Merkmale der Moose in den letzten Kultivierungstagen sind in Abbildung 4.9 zu sehen. Suspensionen von *Physcomitrella patens*, die nicht zerkleinert werden, neigen zur Bildung pelletartiger Agglomeraten und Buds. Aus diesen Buds entstehen Blätter, und somit junge Gametophoren (B). Die Moose mit 5 μM IAA zeigen wenig Verzweigung, hohen Anteil an Caulonema (lange und eher durchsichtigen Filamente) und dann Buds, dennoch weisen sie hohes Wachstum auf. Bei den Referenzkolben zeigt sich eine mechanische Behandlung der Moose als effektiv, um die Formation von Gametophoren zu verhindern (Bz). Die Reduktion des Chlorophyll_{a+b}-Gehalts ist mit einer Anreicherung an Caulonema verbunden: 12,7 mg g^{-1} für B-Moose und 10,0 mg g^{-1} für AX-Moose. AT-Moose sind in der ersten Phase der Kultivierung verzweigt und hauptsächlich chloronemal, daher besitzen sie zahlreiche Chloroplasten und einen hohen Chlorophyllgehalt (15,6 mg g^{-1}). Einige Tage später wachsen sie nicht mehr weiter und die Anzahl der toten Zellen steigt.

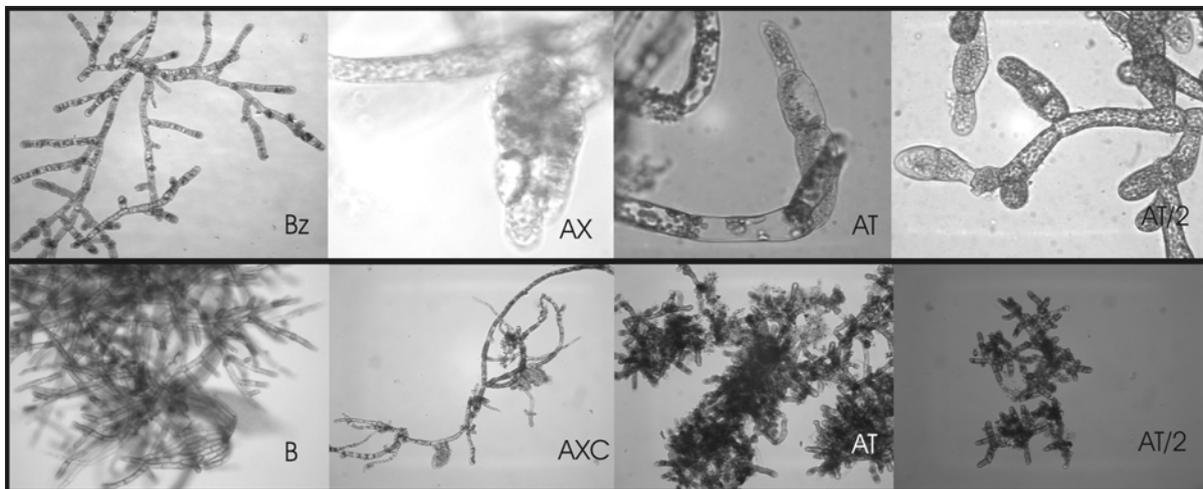


Abb. 4.9: Vergleich der Morphologie von *Physcomitrella patens* nach der Zugabe von 5 mM (AT) und 2,5 mM (AT/2) Ammoniumtartrat, 5 μM IAA (AX), 5 μM IAA plus 10 μM Kinetin (AXC). Die Moose aus dem Referenzkolben Bz wurden zweimal mechanisch zerkleinert

Die Zugabe von IAA plus Kinetin favorisiert die Bildung von Buds selbst aus relativ kleinen Filamenten, die Ausdehnung der Fäden und die Anreicherung an Caulonema und Rhizoiden (AXC). Die Zerkleinerung der Moosfäden kann die Entstehung von Gametophoren in den in AXC-Moosen nicht verhindern oder verzögern. Die Zugabe von 2,5 mM IAA motiviert das Wachstum von Chloronema, das hier überwiegend durch Verzweigung stattfindet (AT/2). Dennoch ist die Toxizität des Ammoniumtartrats schon ab dem 2. (AT) und dem 10. (AT/2) Kultivierungstag bemerkbar.

Der Proteingehalt der Moose in der letzten Phasen der Kultivierung bietet zusätzliche Informationen über den Verlauf der Zelldifferenzierung. Die Moose aus den Referenzkolben (B) besitzen den höchsten Proteingehalt in dieser Versuchsreihe (151 mg g^{-1}). Die toxischen Effekte des Ammoniumtartrats spiegeln sich in kleinen Proteinwerten wieder: 110 mg g^{-1} für die Kolben mit 2,5 μM , dementsprechend 95 mg g^{-1} mit 5 μM . Bei den hochdifferenzierten AXC-Moosen können nur ca. 74 mg g^{-1} Protein gemessen werden, obwohl sie keine Zellschädigung vorweisen.

Junge *Physcomitrella patens* Gametophoren aus festem Medium werden in Kolben inokuliert und ihr Verhalten mit dem der Protonema in Suspension verglichen. Die Gametophoren werden mit und ohne Zugabe von IAA und Kinetin kultiviert. Da ein Verlauf der Biotrockenmasse sehr schwer für verschiedene Formen und Größen der Pflanzen zu ermitteln ist, werden einzelne Individuen bei jeder Probenahme getestet und mittlere Werte berechnet. Die inokulierten Gametophoren sind durchschnittlich 3 mm groß, gemessen entlang der Pflanzenachse. Ab dem 5. Kultivierungstag erscheinen deutliche Unterschiede bei der Bildung neuer Blätter zwischen G- und GAC-Moosen. GAC-Moose sind kleiner und wachsen langsamer als die Referenzmoose (siehe Abbildung 4.10).

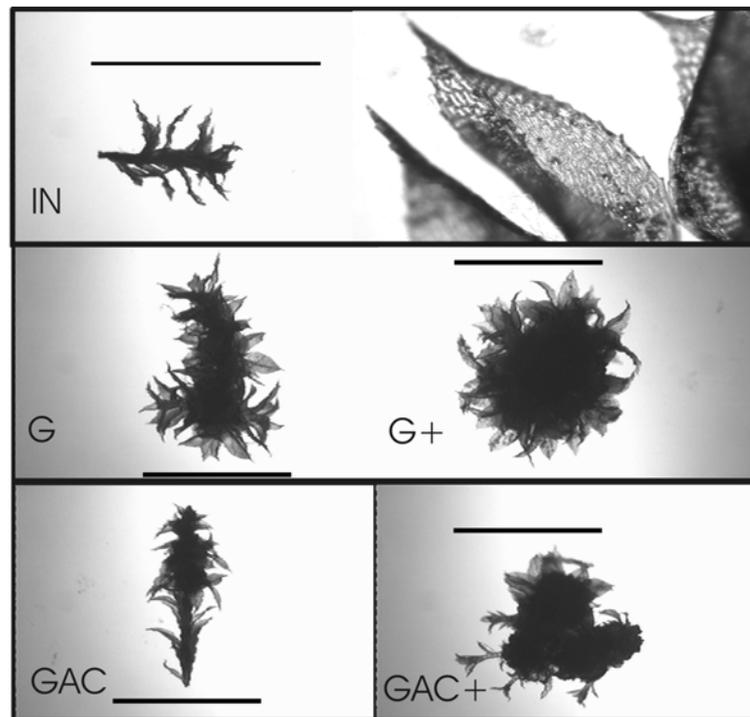


Abb. 4.10: Variation der Morphologie und des Wachstums von submers kultivierten *Physcomitrella patens* Gametophoren. (IN) Inokulum aus Kultur in festem Medium und Detail von Gametophorblättchen; Moose aus Kolben ohne (G) und mit Zugabe von $5\mu\text{M}$ IAA plus $10\mu\text{M}$ Kinetin (GAC); (+) Gametophoren nach der Erhöhung der CO_2 -Konzentration in der Begasung auf 1,7 % (v/v). Balken: 5 mm

Ab dem 16. Kultivierungstag wird der CO_2 -Anteil in der Begasung auf 1,7 % (v/v) erhöht. Daraus ergibt sich eine Beschleunigung des Wachstums bei beiden Typen, jedoch bleiben die G-Moose bis zum Ende der Kultivierung größer als die GAC. Die Erhöhung des Mooswachstums nach dem Anstieg des Kohlendioxid-Anteils beim überschüssigem CO_2 spricht entweder für eine mangelnde Verfügbarkeit von CO_2 im Inneren des Gametophors oder für die Anschaltung alternativer Stoffwechselwege. Bei den Protonemakolben wird keine physiologische Variation bei einer identischen CO_2 -Erhöhung beobachtet.

Die Trockensubstanz der Gametophoren variiert während der Kultivierung für die Referenzmoose zwischen 11 % und 14 %, für die GAC-Moose zwischen 10 % und 12 %. Der gemessene Chlorophyllgehalt der Gametophore zeigt seit dem Anfang der Kultivierung steigende Tendenz, ist aber beachtlich kleiner als der von Protonema (ca. $2,5\text{ mg g}^{-1}$ bei GAC, $2,1\text{ mg g}^{-1}$ bei G). Da hier die Bestimmungsmethoden von *Physcomitrella patens* Protonema auf die Gametophore übertragen wurden, sind Ungenauigkeiten aufgrund der unterschiedlichen Natur der Proben nicht auszuschließen. Daher müssen u.a. die Leistung des

Zellaufschlusses sowie die Methoden zur Extraktion und Bestimmung von Proteinen in diversen physiologischen Stadien von *Physcomitrella patens* genauer überprüft werden. Einige dieser Aufgaben werden im Detail in den nächsten Abschnitten bearbeitet.

4.5 Quantifizierung des Proteingehalts der Moose

4.5.1 Kolorimetrische Bestimmungsmethoden

Wie bereits im Kapitel 3.3.6 erwähnt, kann die quantitative Bestimmung von Proteinen nach verschiedenen Verfahren erfolgen. Nach Vorversuchen werden hier vier kolorimetrische Methoden für Suspensionen von tWTActin5_11.51VEGF verglichen. Bisher wurde für die Bestimmung der intrazellulären gesamten Proteine bei *Physcomitrella patens* häufig der Commassie Protein Assay verwendet (Gorr, 1999). Eine Methode sollte für verschiedene Entwicklungsstadien der Moose zum Einsatz kommen und geringe Protein-Protein-Variabilität aufweisen. Dafür werden Suspensionen des rekombinanten Stamms mit ansteigender Differenzierung nach dem Proteingehalt untersucht (siehe Abbildung 4.11). Hier sind die ermittelten Proteinwerte stark methodenabhängig. Der Bradford und der APA-Test ergeben ähnliche Ergebnisse, da beide Methoden über ein ähnliches Prinzip verfügen. Obwohl große Abweichungen zwischen den Methoden beobachtet werden (bis ca. 300 %), sind ihre Verläufe in der Kultivierung ähnlich. Leider gibt es in der Literatur bisher keine Referenzwerte für den Proteingehalt in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Moose. Deshalb lassen sich keine Zusammenhänge zwischen den Proteingehalten und der beobachteten Steigung des Anteils an Caulonema erkennen.

Im Zellextrakt befinden sich mehrere Substanzen, die Störfaktoren für die Proteinbestimmung darstellen können, z.B. Salze des Mediums und nicht peptidische Makromoleküle. Weitere potenzielle Störfaktoren für die Proteinbestimmung befinden sich auch im Überstand: Knop Medium, extrazelluläre Moosmetaboliten und Zellreste. Ihr Einfluss auf die Messung eines Referenzproteins bekannter Konzentration (BSA: 0,2 g l⁻¹; 0,1 g l⁻¹; 0,05 g l⁻¹ und 0,025 g l⁻¹) wird vergleichend in VE-Wasser und Suspensionsüberstand überprüft. In der Abbildung 4.12 kann die Abweichung der jeweils ermittelten Proteinkonzentration von vier Proteinstammlösungen in Wasser und in Suspensionsüberstand mit der Lowry-, ESL-, Bradford- und APA-Methode abgelesen werden. Anhand der vorliegenden Daten ergibt sich, dass der Lowry-Test den kleinsten Messfehler bei der Proteinbestimmung der Moose aufweist. Durch den nach Peterson modifizierten Lowry-Test werden die Proteine gefällt, um Ionen oder Reagenzien, die die Proteinbestimmung stören, zu entfernen. Hier scheint die Behandlung der Proteinprobe mit TCA (Trichloressigsäure) und DOC (Deoxycholsäure) von Vorteil zu sein. Je geringer jedoch die Proteinkonzentration, desto größer ist die Abweichung der Messung. Der hohe Proteingehalt der Moose gemäß dem ESL-Test, lässt sich als Wertüberschätzung durch die Wirkung des Mediums erklären. Infolgedessen wird der nach Peterson modifizierte Lowry-Test für die nächsten Kultivierungen verwendet.

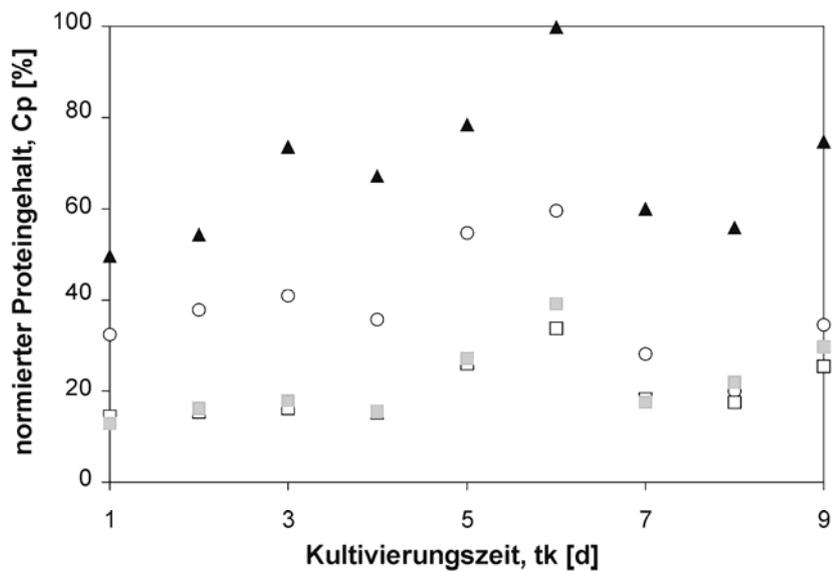


Abb. 4.11: Vergleich der ermittelten Proteinkonzentration von *Physcomitrella patens* in Suspension bei verschiedenen Kultivierungsstadien mittels vier kolorimetrischer Bestimmungsmethoden. (▲) ESL, (○) Lowry nach Peterson, (■) APA und (□) Bradford

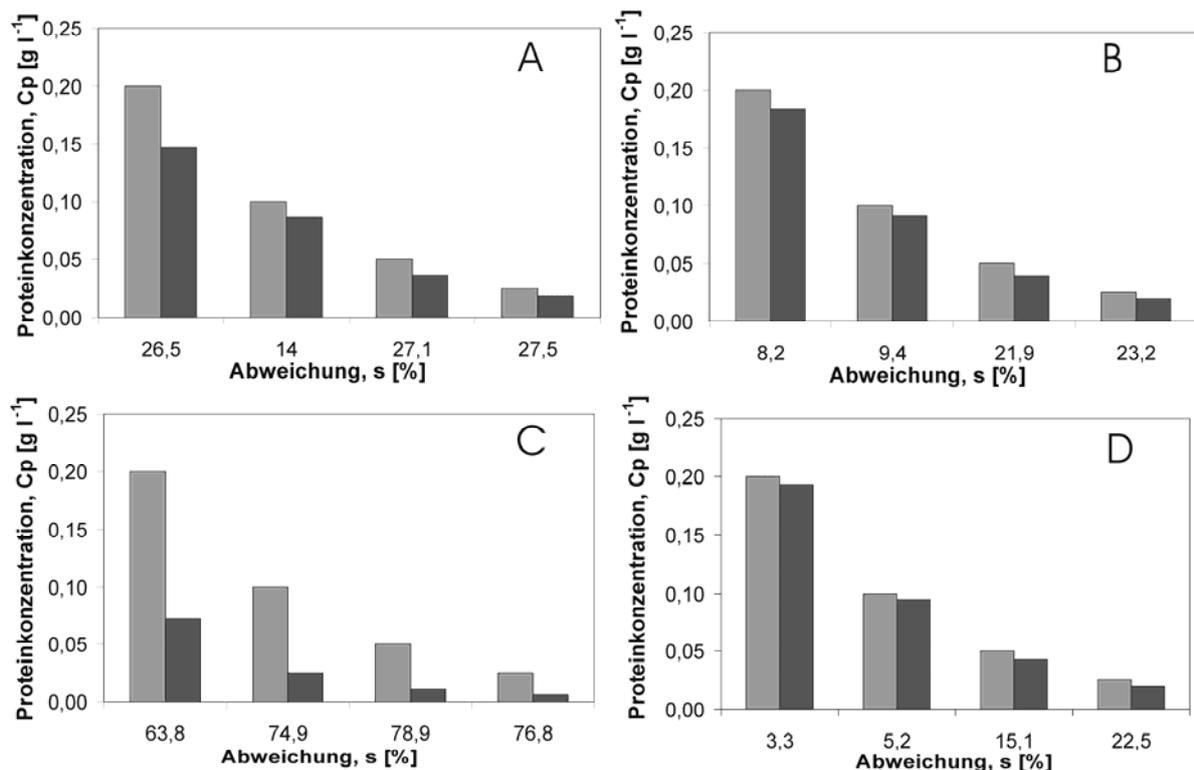


Abb. 4.12: Abweichung zwischen dem Proteingehalt einer BSA Lösung in VE-Wasser (■) und im Überstand (▲) einer *Physcomitrella patens* Suspension. Bestimmungsmethoden: gemessen mit dem (A) Bradford-Test; (B) APA-Test; (C) ESL-Test und (D) Lowry-Test nach Peterson

4.5.2 Verbesserung der Proteinextraktion

Die Zusammensetzung des Extraktionspuffers für die Lowry-Methode wird anhand der nächsten Versuche für die Moossuspension optimiert. Dabei wird der Einfluss eines Proteaseinhibitors (Pefablock[®], Roth), einer nicht ionischen Detergenz (Nonidet P40[®], Sigma) und eines Schutzpuffers (MES II; 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) mit dem üblichen Extraktionspuffer D (Tris-HCl) verglichen (siehe Anhang 4). In der Abbildung 4.13 wird der gemessene Proteingehalt von *Physcomitrella patens* aus Schüttelkolben bei verschiedenen Puffern dargestellt.

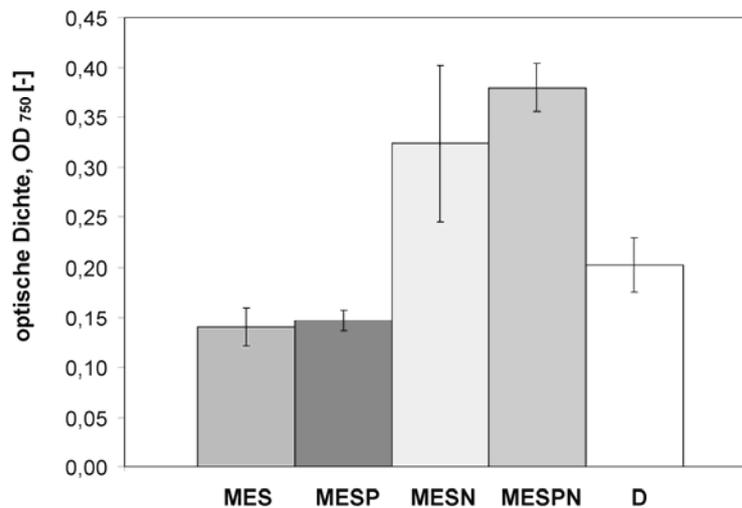


Abb. 4.13: Einfluss diverser Puffer auf die Proteinextraktion von *Physcomitrella patens* aus Suspensionskultivierungen nach der Lowry-Methode. Nomenklatur: (MES) MES II; (P) 2 mM Pefablock[®]; (N) 2 mM Nonidet P40[®]; (D) Puffer D

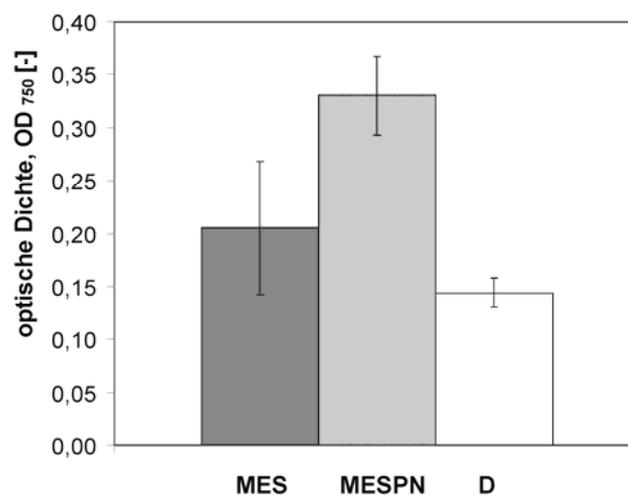


Abb. 4.14: Einfluss von drei Puffern auf die Proteinbestimmung einer 55,2 µg ml⁻¹ BSA Referenzlösung, verdünnt im Überstand einer Suspension von *Physcomitrella patens*

Die höchste Proteinkonzentration wird mit einer Mischung von MES II, Protease-Inhibitor und Detergenz (Cocktailpuffer) erreicht, wobei die nicht anionische Detergenz die wichtigste Rolle bei der Verbesserung der Proteinextraktion (Zellwandproteine) spielt. Diese Ergebnisse werden mit einer BSA-Lösung überprüft, wobei die Proteinlösung mit der gleicher Methode wie die Moossuspension bearbeitet wird (siehe Abbildung 4.14). Hier ist die Leistung der Extraktion mit den getesteten Puffern quantitativ und qualitativ ähnlich der aus Zellextrakten. Messungen in Abwesenheit von Proteinen bestätigen, dass keine Hintergrundsignale durch die Zugabe von MES II, Nonidet[®] oder Pefablock[®] hervorgerufen werden. Daher wird der Cocktailpuffer ab diesem Punkt als Extraktionsmittel für die Moosproteine benutzt.

4.6 Gelelektrophoretische Trennung der Proteine von *Physcomitrella patens*

Die Variation der Protein-Zusammensetzung von *Physcomitrella patens* in verschiedenen Entwicklungsstadien kann Indizien über den Differenzierungsgrad in der Kultivierung geben. Eine Optimierung der Parameter zur Durchführung der gelelektrophoretischen Proteintrennung von *Physcomitrella patens* mit SDS-PAGE (siehe 3.3.9) ist daher vorausgesetzt. Die Tabelle 4.4 listet die durchgeführten Vorversuche zur Optimierung der Proteintrennung rekombinater *Physcomitrella patens* aus Suspensionen auf.

Tabelle 4.4: Vorversuche zur Optimierung der Proteintrennung von *Physcomitrella patens* mittels SDS-PAGE. Nomenklatur vom Gewebetyp aus Tabelle 4.3

Vorversuch	Vergleich
Zellaufschlussmethode	Kugelmühle - Mörser
Proteinreinigung	Ohne und mit Reinigung (DOC-TCA)
Proteinmenge [µg]	10, 20, 50 und 100
Prozentsatz der Trenngel [%]	12 - 15
Färbemethode	Coomasie Blau - Silberfärbung
Gewebetyp	Protonema: B – AT - AT/2 - AXC Gametophore: G - GAC

4.6.1 Zellaufschlussmethoden

Die Tests ergeben, dass die ausgeführten beiden Aufschlussmethoden keinen Unterschied in der Proteinauftrennung hervorrufen. Beide Methoden zeigen gleiche Proteinbanden und es werden keine zusätzlichen Banden detektiert. Da die Aufschlussmethode mit der Schwingmühle praktisch, reproduzierbar und skalierbar ist, wird sie für weitere Analysen benutzt.

4.6.2 Proteinreinigung

Da einige Verunreinigungen aus dem Zellaufschluss die Gelelektrophorese stören könnten, werden Protein-Aufreinigungsschritte mit Deoxycholat (DOC) und Trichloressigsäure (TCA) vorgenommen. Diese Maßnahmen haben keine verbesserte Auflösung der Gele oder

Steigerung gebracht. Dennoch ist für die Auftragung der Proteine auf das Gel eine Quantifizierung der Proteinmenge nötig. Dafür sind die Reinigungsschritte unerlässlich und dementsprechend werden alle Ansätze aufgereinigt.

4.6.3 Proteinmenge

Mit der Zugabe von 10 µg Protein pro Tasche sind nur schwache Banden erkennbar. Die Erhöhung der aufgetragenen Menge bis 20 µg verstärkt deutlich die Intensität der Banden (siehe Anhang 9). Bei 50 µg und 100 µg Protein pro Tasche ist jedoch keine proportionale Erhöhung der Bandenstärke zu sehen. Beim Einsatz von 100 µg Protein sind die Banden zwar etwas stärker, aber mit viel Hintergrund. Es sollten folglich für die Gelelektrophorese Proteinmengen zwischen 10 µg und 20 µg eingesetzt werden. Die tatsächliche Menge ist von der Färbemethode abhängig.

4.6.4 Prozentsatz der Gele

Die Auftrennung der Proteine auf einem 12 %-igen Trenngel ist möglich, jedoch ist die Auflösung der Banden nicht ausreichend und manchmal lassen sich Proteine um die 14 kDa damit nicht separieren. Das 15 %-ige Gel zeigt dagegen mehrere und deutliche Banden. Da die untere Markerbande kleine Rubisco-Untereinheiten, die anteilmäßig in Pflanzen am stärksten vorhanden ist, aufweist, werden die weiteren Versuche mit einem 15 %-igen Gel durchgeführt.

4.6.5 Färbemethode

Es zeigt sich, dass bei der Coomassie-Färbung nur zwei Banden deutlich erkennbar sind. Da jedoch weitaus mehr Banden zu erwarten sind, wird die Silberfärbung ausprobiert, die als sensitivere Methode gilt (Rehm, 2002).

Es muss davon ausgegangen werden, dass eventuell vorhandene Proteinbanden wenig Protein enthalten, somit unter die Nachweisgrenze von Coomassie Blau fallen und deshalb damit nicht detektierbar sind. Um dies zu überprüfen wird das Gel erst mit Coomassie-Blau angefärbt und dann mit der Silberfärbung nachgefärbt. Es sind so deutlich mehr Banden zu erkennen und auch in der 10 µg Proteinprobe können dann die Proteinbanden angefärbt werden. Im ersten Versuch der Silberfärbung (siehe Anhang 10) wirkt jedoch die Entwicklerlösung etwas zu lange ein, da die Stopplösung noch nicht vollständig fertig war. Aus diesem Grund ist das Gel so stark schwarz gefärbt. Durch diese starke Färbung sind nicht alle Proteinbanden zu erkennen. Bei den nachfolgenden Silberfärbungen wird die Farbreaktion dann früher abgestoppt.

4.6.6 Variation des Proteinmusters je nach Differenzierung

Proteinmuster verschiedener Differenzierungsstadien von *Physcomitrella patens* aus den Versuchen mit exogenen Phytohormonen und Phytohormonantagonisten des Abschnitts 4.4

werden in Abbildung 4.15 gezeigt. Die Trennung mit einem 15 %-igen SDS-Gel, 10 µg Protein und die anschließende Silberfärbung bringt eine gute Bandenauflösung hervor. Eine genaue Zuteilung der einzelnen Banden zu Proteinen ist jedoch nicht möglich.

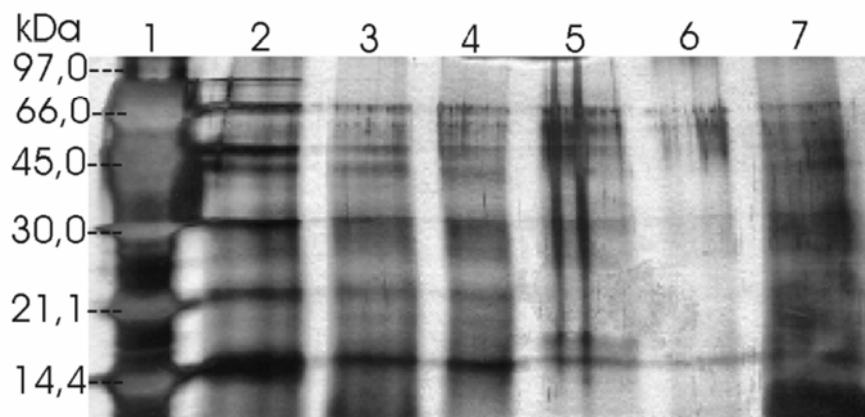
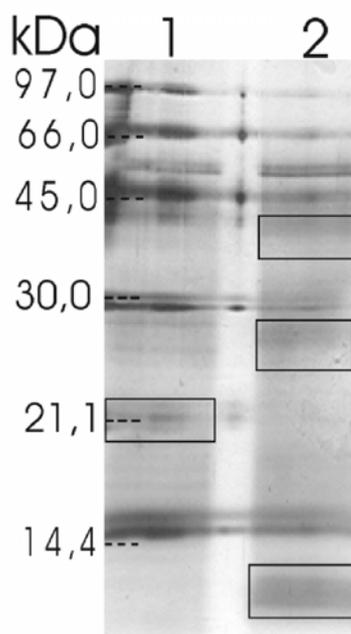


Abb. 4.15: Proteinauftrennung verschiedener Differenzierungsstadien von *Physcomitrella patens* nach der Zugabe von Phytohormonen und Phytohormonantagonisten auf einem 15 %-igen Gel mit anschließender Silberfärbung; 10 µg Protein pro Tasche. (1) Marker; (2) Referenzmoos; (3) Moose mit IAA und Kinetin; (4) 5 mM Ammoniumtartrat; (5) 2,5 mM Ammoniumtartrat; (6) Referenzgametophor; (7) Gametophor mit IAA und Kinetin

Anhand von Literaturwerten kann davon ausgegangen werden, dass die deutlich erkennbaren Proteinbanden im Bereich von 14 kDa eventuell von der kleinen Rubisco-Untereinheit stammen. Die anderen deutlichen Spots auf dem Gel könnten von Proteinen des Photosystems I kommen. Unter diesen Proteinen können sich unter anderem die Aldolase, die Fructose-1,5-bisphosphat-Aldolase, die Rubisco-Aktivase und weitere Rubisco-UE befinden. Laut 2-D-Gelelektrophorese kommen sie in diesem Größenbereich vor (Sarnighausen et al., 2004).



Da die Abweichungen des Proteinsmusters zwischen den protonemalen Geweben sehr gering sind, werden zwei extreme Stadien aufgetragen: Protonema mit einem hohen Anteil an Chloronema und Gametophoren. Klare Unterschiede im Protein-Bandenmuster zwischen Protonema und Gametophoren von *Physcomitrella patens* sind in der Abbildung 4.16 zu erkennen. Eine Aussage, welche einzelnen Proteine diese Variationen verursachen, kann jedoch nicht getroffen werden.

Abb. 4.16: Proteinauftrennung von zwei Differenzierungsstadien von *Physcomitrella patens* auf einem 15 %-igen Gel mit anschließender Silberfärbung; 10 µg Protein pro Tasche. (1) Protonema aus der Referenzsuspension. (2) Gametophoren. Die Quadraten zeigen die größten Unterschiede im Muster

5 Kultivierung von *Physcomitrella patens* in kleinem Maßstab

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den Vorversuchen zur Charakterisierung von *Physcomitrella patens* in Suspension werden die Anfangsbedingungen für die Kultivierung im 3 L Modell-Photo-Bioreaktor definiert. In diesem Maßstab werden wichtige kinetische und physiologische Kennzeichen der Moose für die Prozessentwicklung mit rekombinanten Linien dank der geringen PFD-Gradienten und der hohen Kontrolle von Umweltfaktoren im Reaktor ermittelt.

5.1 Batch-Kultivierungen im Modell-Photo-Bioreaktor

5.1.1 Kultivierung I

Zunächst wird der Stamm tWTP31_{VEGF} im Modell-Photo-Bioreaktor in Batchbetrieb bei $21^{\circ}\text{C}\pm 0,5$ und einem pH-Wert von $5,8\pm 0,5$ kultiviert. Ein 6:10 verdünntes Knop-Medium wird benutzt, um den Einfluss der Trübung auf die optischen analytischen Bestimmungen zu minimieren. Laut Bilanzierung der Medium- und Zellzusammensetzung tritt bei dieser Knop-Konzentration bis zu einer Biomassekonzentration von ca. $1,5\text{ g l}^{-1}$ keine Wachstumslimitierung durch Mineralien auf (siehe Anhang 11). Der Volumenverlust von Biosuspension durch die Probenahme wird regelmäßig mit frischem Medium ausgeglichen. Die daraus resultierende geringfügige Verdünnung wird bei der späteren Auswertung berücksichtigt. Die Rührerdrehzahl wird auf 300 rpm gehalten, und $0,4\text{ l m}^{-1}$ ($0,13\text{ vvm}$) einer Gasmischung aus Luft und CO_2 (3,4 % (v/v)) wird kontinuierlich zugegeben. Die Lichtquelle wird wie in Abbildung 3.1 angeschlossen, wobei keine Tag-Nacht Zyklen eingeführt werden (LL).

Aus Daten von Vorkultivierungen mit dem Wildtyp von *Physcomitrella patens* im Modell-Photo-Bioreaktor wird festgestellt, dass der Propellerrührer des Reaktors hohen Zellstress hervorruft. Die Reduktion der Drehzahl beeinträchtigt das Mischverhalten der Biosuspension und verursacht Sedimentation der Moose. Durch die Abstumpfung der Propellerblätter wird das Problem beseitigt. Der Verlauf der Biotrockenmasse zeigt, dass kein Wachstum in der Größenordnung der Vorversuche in den ersten Tagen der Kultivierungen stattfindet (siehe Abbildung 5.1). Obwohl über Lag-Phasen von 1 bis 3 Tagen in *Physcomitrella patens* Suspensionskultivierungen in extern beleuchteten Photo-Bioreaktoren berichtet wird (Boyd et al., 1998), sind nach dieser Periode keine Signale von Zellwachstum zu beobachten. Das geringe Wachstum der Moose hängt hier mit der schwachen PFD aufgrund der mangelhaften Lichtübertragung durch die Beleuchtungseinrichtung des Reaktors zusammen. Homogene aber niedrige PFD zwischen $1,8\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ und $5,0\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ bringen im Photo-Bioreaktor zu wenig Energie für das Wachstum der Moose. Gemäß der Charakterisierungsversuche werden ca. $20,0\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ benötigt, um Wachstumsraten von $0,2\text{ d}^{-1}$ zu erreichen (siehe Abschnitt 4.3). Um eine mögliche durch die C-Quelle verursachte Limitierungen auszuschließen, wird am 7. Kultivierungstag die Begasungsrate und ihr Kohlendioxid-Anteil auf $0,5\text{ l m}^{-1}$ bzw. auf 5,3 % erhöht. Wie erwartet ist keine Variation bezüglich des Wachstums oder der Physiologie der Moose zu erkennen. In beiden Fällen wird CO_2 im Überschuss zugegeben. Die Moose wachsen in dieser Phase meistens apikal und weisen einen erhöhten Anteil an Caulonema auf (siehe Abbildung 5.2).

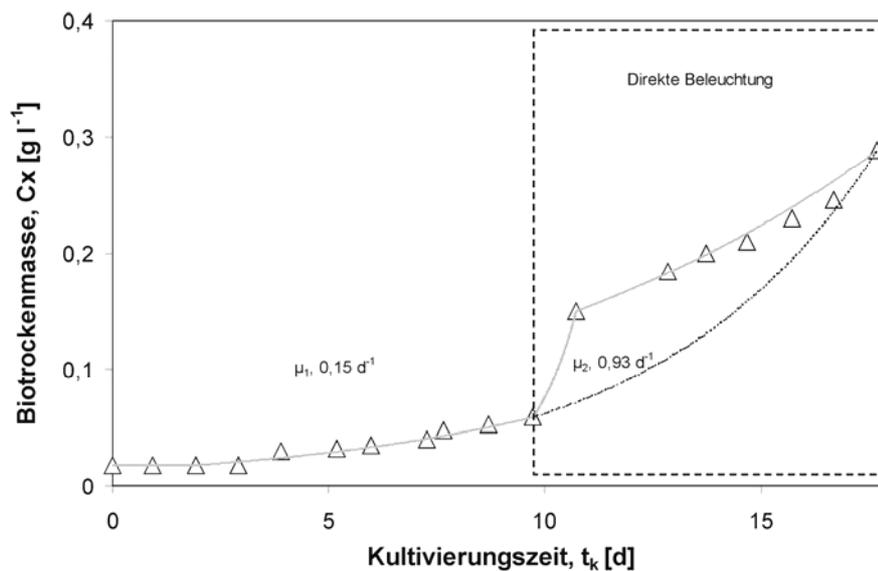


Abb. 5.1: Verlauf der Biotrockenmasse (Δ) von $tWTP31_{VEGF}$ im 3 L Modell-Photo-Bioreaktor während der Kultivierung I. Ab dem 10. Kultivierungstag wird die PFD durch direkte Beleuchtung erhöht. Werte von μ vor und gleich nach der Lichtumschaltung werden gezeigt

Ab dem 10. Kultivierungstag wird die Lichtquelle von außen am Reaktordeckel angebracht. Das hat zur Folge, dass die Beleuchtung nicht mehr durch Lichtstreuung am Glaskörper erfolgt, sondern direkt durch das Sichtfenster. Daher entsteht eine Erhöhung des verfügbaren Lichts in der Suspension, aber auch ein von oben nach unten absteigender PFD-Gradient wie folgt: $368\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ am Suspensionsspiegel, $236\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ in der Mitte, und $167\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ an der unteren Seite des Reaktors. Diese Maßnahme ruft einen Anstieg der Biomassekonzentration und eine Erhöhung des CO_2 -Verbrauchs hervor. Die spezifische Wachstumsrate einen Tag nach der Zunahme der PFD erreicht den Wert $0,93\ d^{-1}$. Die Moose bilden viele Knospen und Verzweigungen und der Anteil an Chloronema steigt (siehe Abbildung 5.2). In der folgenden Phase der Kultivierung wachsen die Moose zwar weiter, aber sie weisen ein Muster linearen Wachstums ab einer Biomassekonzentration (c_x) von ca. $0,15\ g\ l^{-1}$ auf. Dieser Phase lässt sich mit dem fast 8-maligen Anstieg von c_x und dem langem Lichtpfad im Reaktor erklären.

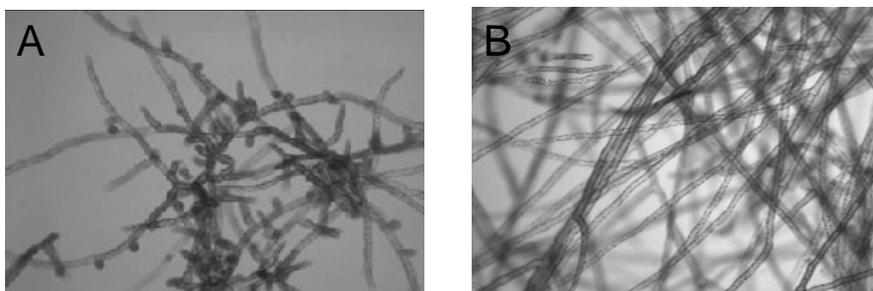


Abb. 5.2: Variation des Wachstumsmusters von $tWTP31_{VEGF}$ bei hoher und niedriger PFD. (A) Intensive Verzweigung, hauptsächlich chloronemal. (B) Langsames apikales Wachstum, Etiolation in Caulonema

Für das Wachstum durch Verzweigung subapikaler Zellen ist vermutlich eine Grenzlichtintensität vorausgesetzt. Geringe Lichtintensität fördert dagegen apikales Wachstum. Letzteres wird überprüft, indem die Moose nach Kultivierungsende in einem begasten Glaskessel bei einer PFD von $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ drei Wochen untersucht werden. Die Begasungsrate und der CO_2 -Anteil der Gasmischung bleibt gegenüber der Kultivierung I im Modell-Photo-Bioreaktor unverändert. Die Umwälzung der Moossuspension erfolgt mittels eines Magnetrührers. Nach zwei Kultivierungstagen steigt der Caulonemaanteil merklich, die Moose wachsen geringfügig und etolieren (Verlängerung der Moose ohne einen nennenswerten Anstieg der Biomasse). Das apikale Wachstum verläuft allerdings so langsam, dass nach 3 Wochen lediglich eine Zunahme des Trockengewichts von $0,04 \text{ g l}^{-1}$ (μ : $0,05 \text{ d}^{-1}$) erreicht wird. Obwohl am Ende dieser zweite Etappe der Kultivierung fast ausschließlich Caulonemazellen in der Suspension vorhanden sind, erfolgt keine Differenzierung ins Gametophorstadium.

5.1.2 Kultivierung II

Eine Begasungsrate von $0,55 \text{ l min}^{-1}$ einer Mischung von Luft und CO_2 (1,3 % (v/v)) wird bei der nächsten Kultivierung im Modell-Photo-Bioreaktor eingestellt. Ebenfalls wird das CO_2 hier für die zu erwartete Biomassekonzentration im Überschuss geliefert. Von Beginn an wird der Modell-Photo-Bioreaktor von oben direkt beleuchtet. In Abbildung 5.3 ist bis zum 7. Kultivierungstag ein steiler Anstieg der Biomassekonzentration zu beobachten, wobei die mittlere spezifische Wachstumsrate in dieser Phase ca. $0,4 \text{ d}^{-1}$ beträgt. Mikroskopaufnahmen bestätigen einen hohen Anteil an verzweigten Chloronema in der Biosuspension, die hauptsächlich durch „branching“ wachsen.

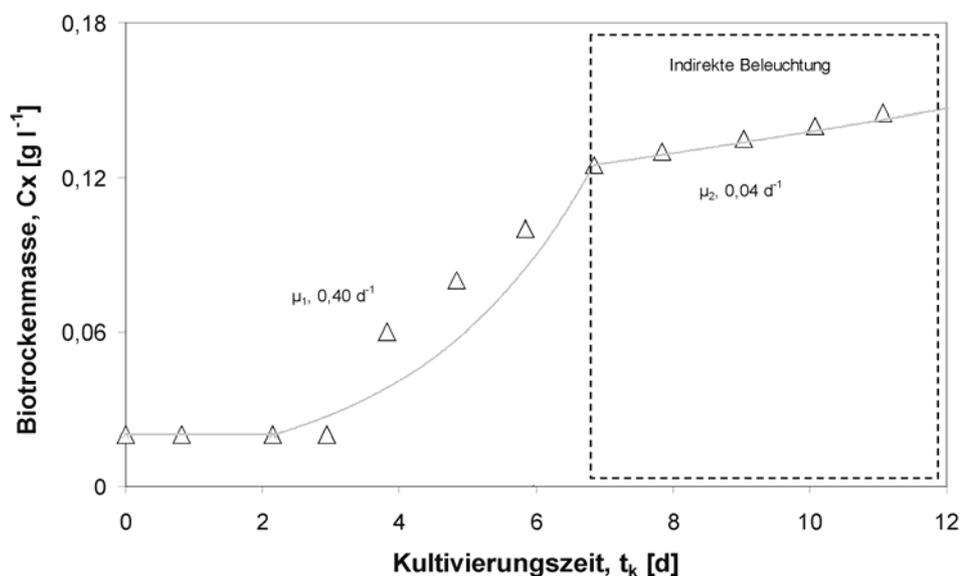


Abb. 5.3: Verlauf der Biotrockenmasse (Δ) von $tWTP31_{VEGF}$ im 3 L Modell-Photo-Bioreaktor während der Kultivierung II. Ab dem 7. Kultivierungstag wird die Beleuchtung indirekt durchgeführt. Werte von μ vor und gleich nach dem Lichtumschaltung werden gezeigt.

Um die Ergebnisse aus der Kultivierung im Glaskessel zu überprüfen, wird die Beleuchtung nach dem 7. Tag und bis zum Kultivierungsabbruch indirekt angeschaltet. Dies führte, selbstverständlich zu einer Stagnation des Wachstums, und zum Anstieg des überwiegend apikal wachsenden Caulonema-Anteils. Damit wird eine Steuerung der Moosdifferenzierung durch die Variation mancher Umgebungsbedingungen im Photo-Bioreaktor erreicht (siehe Abbildung 5.2). Dies könnte von Vorteil sein, falls bestimmte Moosstadien verfahrenstechnische Vorteile bieten wie z.B. Reduktion von Transportproblemen, oder Vermeidung von Agglomeration. Ebenfalls könnten bestimmte Entwicklungsstadien von *Physcomitrella patens* hohe Produktivität bezüglich des Zielsproteins aufweisen. Zu einer Differenzierung ins Gametophorstadium kam es auch bei der Kultivierung II nicht.

Ein Vergleich der Kultivierungen ergibt, dass die Wachstumsrate der Moose bei identischen Bedingungen von PFD und Anfangsbiomasse äußerst abhängig vom Entwicklungszustand ist. Lange Filamente mit hohem Anteil an Caulonema erreichen μ -Werte von $0,90 \text{ d}^{-1}$, kurze und verzweigte Moose hingegen nur $0,40 \text{ d}^{-1}$.

5.2 Kontinuierliche Kultivierung im Modell-Photo-Bioreaktor. Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum, die Differenzierung und die Proteinexpression

5.2.1 Variation des Wachstums

In den nächsten zwei Kultivierungen werden Daten über die physiologischen Antworten von tWTActin5_11.51VEGF im Modell-Photo-Bioreaktor auf Variationen der Lichtqualität gesammelt. Bei allen Kultivierungen wird die Temperatur auf $21 \pm 0,05^\circ\text{C}$ und der pH-Wert auf $5,8 \pm 0,1$ konstant gehalten. Die Motordrehzahl beträgt $300 \pm 5 \text{ rpm}$, außer vor jeder Probeentnahme, da wird sie für 20 s auf 1000 rpm erhöht. Weitere Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 5.1 dargestellt. Mit einer neuen Vorrichtung für die Übertragung des Lichtes aus der externen Lichtquelle wird eine höhere und homogene PFD im Reaktor verglichen mit der aus früheren Versuchen bewirkt. Dennoch werden die Experimente aufgrund der erreichten PFD ($27 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) immer noch im unteren μ -Bereich durchgeführt. Während der Experimente wird ein LD 16/8 Regime für das filtrierte (rot und blau) und unfiltrierte Licht (weiß) beibehalten. Zwischen den Phasen mit rotem und blauem Licht werden Perioden mit weißem Licht eingeführt, um einen Einfluss aus den früheren Phasen zu reduzieren.

Das Medium wird ca. 4 Tage vor der Inokulation mit CO_2 gesättigt. Ca. 100 ml tWTActin5_11.51-Suspensionsinokulum (c_x : $0,7 \text{ g l}^{-1}$) werden für die erste Kultivierung 7 Tage und für die Zweite 6 Tage vor dem Animpfen turraxiert und dann überimpft. Ein neues Probenahmerohr mit 5 mm Durchmesser wird eingebaut, um Verstopfungen im Inneren des Rohres zu vermeiden. Genauso wie in den Vorversuchen hatte eine Erhöhung des Kohlendioxid-Partialdrucks von 0,03 % (v/v) auf 1,7 % (v/v) keine Wirkung auf das Wachstumsverhalten oder die Differenzierung von *Physcomitrella patens*.

In der ersten Phase der Kultivierung III zeigt das Wachstum aufgrund der Lichtlimitierung ein nahezu lineares Verhalten. Nährstofflimitierung sowohl durch CO_2 als auch durch Salze kann ausgeschlossen werden (siehe Anhang 11). Die mittlere Wachstumsrate in der Batchphase beträgt $0,08 \text{ d}^{-1}$. Die kontinuierliche Kultivierung wird als Chemostat ab einer Mooskonzentration von $0,026 \text{ g l}^{-1}$ und mit einer Verdünnungsrate (D) von $0,13 \text{ d}^{-1}$ betrieben. Dieser Wert von D ist die minimal technisch realisierbare Verdünnungsrate an diesem

Zeitpunkt des Versuchs. Aus der Differenz zwischen D und μ entsteht eine Verdünnung der Suspension. Außerdem wird eine Verlangsamung des Wachstums in den Phasen mit monochromatischem Licht aufgrund der Reduktion der gesamten PFD beobachtet.

Tabelle 5.1: Prozessbedingungen der Kultivierungen III und IV im Modell-Photo-Bioreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Lichtqualität auf *tWTActin5 11.51VEGF*

Kultivierung III, [d]	1-20	20-24	24-28	28-29	29-32		
Gasmischung	Luft - CO ₂						
Begasungsrate, [l min ⁻¹]	0,507						
CO ₂ im Zuluft (v v ⁻¹), [%]	1,4						
Lichtqualität	weiß (400nm-750nm)		rot (620nm-750nm)	weiß (400nm-750nm)	blau (400nm-460nm)		
LD, [h]	16 / 8						
PFD, [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	27		12	27	3		
Prozessführung	Batch	Konti, D: 0,13 d ⁻¹					
Zerkleinerung, [d]	Keine						
Kultivierung IV, [d]	1-8	8-14	14-20	20-24	24-28	28-35	35-38
Gasmischung	Luft						
Begasungsrate, [l min ⁻¹]	0,5						0,8
CO ₂ im Zuluft (v v ⁻¹), [%]	0,04						
Lichtqualität	weiß			rot	weiß	blau	weiß
LD, [h]	16 / 8						
PFD, [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	27			12	27	3	13
Prozessführung	Batch		Konti, D: 0,14 d ⁻¹		Konti, D: 0,08 d ⁻¹		
Zerkleinerung, [d]	10	16	22	24	30		

In der Kultivierung IV präsentiert sich zunächst wieder das typische Muster des linearen Wachstums mit einem μ -Wert von 0,14 d⁻¹ in der Batchphase, höher als bei der Kultivierung III (siehe Abbildung 5.5). Dann wird der kontinuierliche Betrieb ab einer Biomassekonzentration von 0,15 g l⁻¹ gestartet. Leider tritt am Anfang dieser Phase eine Verstopfung des Ernterohres mit Moosen auf. Die Entfernung der Biomasse ruft eine Verdünnung der Suspension hervor. Die Biomassekonzentration beträgt an diesem Punkt der Kultivierung 0,11 g l⁻¹ und wird konstant bis zum Ende der Weißlichtphase bei D gleich 0,14 d⁻¹ gehalten. Während der Phase mit rotem Licht nimmt die PFD ab und dadurch sinkt am 24. Kultivierungstag die Biomassekonzentration auf 0,09 g l⁻¹. Durch die Bilanzierung der Biomasse im Bioreaktor (m_x) kann die Wachstumsrate der Moose in den Chemostat-Phasen berechnet werden (Gleichung 5.1).

$$\frac{dm_x}{dt} = \mu \cdot m_x - D \cdot m_x \quad (5.1)$$

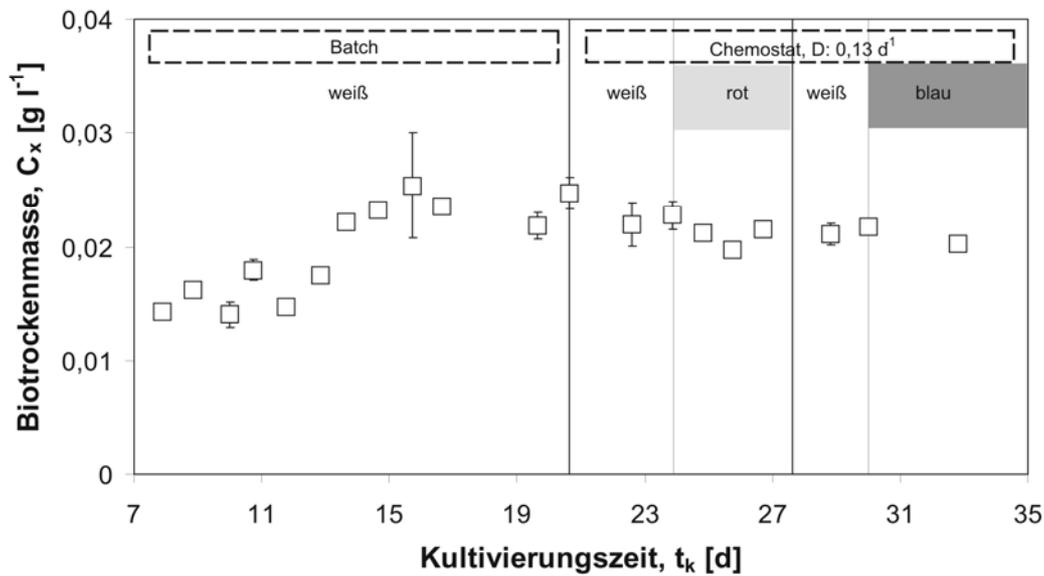


Abb. 5.4: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (\square) bei der Kultivierung III im Modell-Photo-Bioreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Lichtqualität auf *tWTActin5_11.51VEGF*

Eine 44 %-ige Reduktion der PFD in der Phase mit rotem Licht ruft eine Senkung der spezifischen Wachstumsrate auf $0,03 \text{ d}^{-1}$ hervor. Sie beträgt ca. 21 % der μ in der Weißlichtphase. Diese überproportionale Variation des Wachstums spricht für komplexe Zellvorgänge, die mit der Präsenz oder Abwesenheit mancher Lichtsignale stimuliert werden. Infolgedessen wird in der letzten Etappe der Kultivierung IV eine Phase mit weißem Licht mit nahezu gleicher PFD wie in der roten Phase eingeführt, um die Effekte der Lichtqualität von denen der PFD getrennt zu untersuchen. Solche Aspekte werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

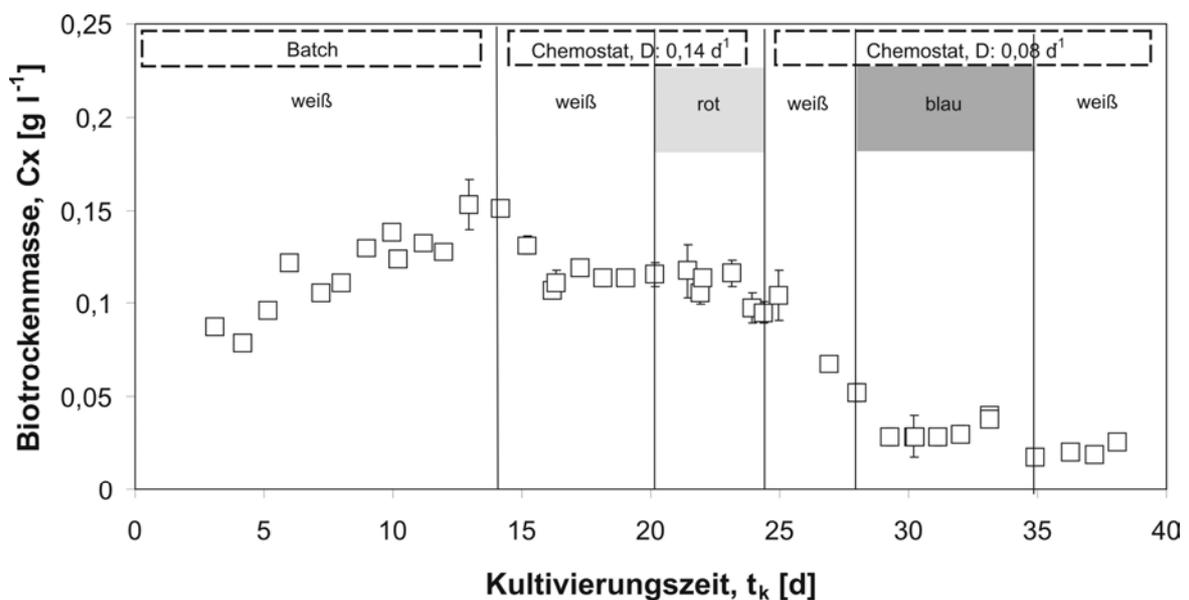


Abb. 5.5: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (\square) bei der Kultivierung IV im Modell-Photo-Bioreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Lichtqualität auf *tWTActin5_11.51VEGF*

Um eine weitere Verdünnung der Suspension zu vermeiden, wird in der Zwischenphase mit weißem Licht die Zuflussrate auf $0,08 \text{ d}^{-1}$ abgesenkt. Wie erwartet steigt dann die Biomassekonzentration am 25. Kultivierungstag. Eine genaue Ermittlung der Werte von c_x ist ab diesem Zeitpunkt nicht möglich, da das Probenahmerohr unregelmäßig verstopft ist. Obwohl keine reproduzierbaren Daten für die Biomassekonzentration im letzten Teil der Kultivierung zur Verfügung stehen, können intakte Moose und Suspensionsüberstand aus jeder Phase für andere Analysen entnommen werden.

In der Kultivierung IV beträgt die spezifische CO_2 -Aufnahmerate $21 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ am Ende der Batchphase, $18 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der ersten Chemostat-Phase mit weißem Licht, $12 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der Phase mit rotem Licht und $19 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der Zwischenphase mit weißem Licht. Die Werte für weitere Phasen sind aufgrund der erwähnten starken Schwankungen der Biotrockenmasse nicht ermittelbar.

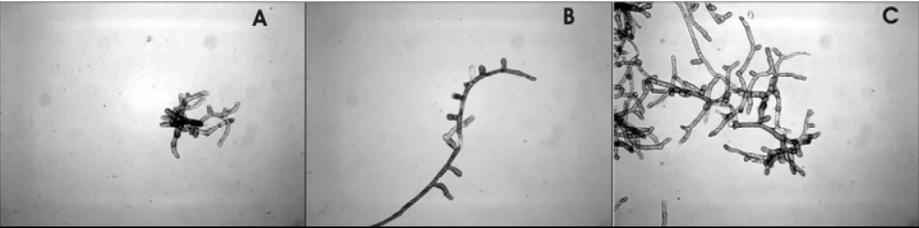
5.2.2 Einfluss auf die Moosmorphologie und -Differenzierung

Durch den Einfluss des monochromatischen Lichtes werden deutliche Änderungen der Morphologie von *Physcomitrella patens* verursacht. Typische Moose aus den verschiedenen Phasen sind in der Tabelle 5.2 dargestellt. Unter weißem Licht findet intensive Verzweigung statt, wobei sich viele subapikale Zellen mehrmals teilen. Deshalb ist hier das Wachstum durch Verzweigung dominierend.

In der Phase mit rotem Licht bilden die Moose lange, apikal wachsende caulonemale Filamente. Die subapikalen Zellen teilen sich höchstens einmal und bilden je einen Seitenarm aus.

Mit blauem Licht ist das Apikalwachstum deutlich schwächer ausgeprägt als bei rotem Licht und es findet eine intensivere Verzweigung statt. Die Verzweigung erreicht aber nicht die Intensität, die bei weißem Licht beobachtet wird. Nur sehr wenige subapikale Zellen teilen sich mehr als einmal. Bezüglich der Moosmorphologie hat die Absenkung der PFD des weißen Lichtes in der letzten Phase der Kultivierung II keinen Einfluss. Es wird das gleiche Erscheinungsbild wie bei der Phase mit höherer PFD beobachtet.

Tabelle 5.2: Variation morphologischer Merkmale von *Physcomitrella patens* unter dem Einfluss von (A) weißem und (B, C) filtriertem Licht im Modell-Photo-Bioreaktor



Lichtqualität	weiß	rot	blau
PFD [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	27,3	12,0	3,4
Verzweigungsgrad	++	-	+
Verzweigungen in subapikalen Zellen	mehrere	1	1
Apikales Wachstum	-	++	-

Die beobachteten morphologischen Änderungen stimmen mit mehreren in der Literatur beschriebenen Effekten weitgehend überein. Imazumi et al., (2000) dokumentierten ebenso die Stimulation der Verzweigung und die Unterdrückung des Effektes von Auxinen (u.a. apikales Wachstum) mit blauem Licht. Die schwache Verzweigung des Moooses bei blauem Licht verglichen mit der bei weißem Licht kann durch einen synergetischen Effekt von rotem und blauem Licht erklärt werden (Uenaka et al., 2000).

Als Maß der Verzweigung wird die Anzahl an Seitenarmen pro Mooslänge in jeder Lichtphase ermittelt (siehe Abbildung 5.6). Die Daten werden aus mikroskopischen Aufnahmen, generiert, wobei die Verzweigung in der Mitte des Chemostats mit weißem Licht als 100 % betrachtet wird. Der Verzweigungsgrad steigt im Laufe der Batchphase, sowie während des Chemostats mit weißem Licht. Er sinkt in der Phase mit rotem Licht aufgrund des apikalen Wachstums und nimmt in der Phase mit blauem Licht wieder zu. Die Differenz des Verzweigungsgrads zwischen der Blaulichtphase und der Weißlichtphase kann vermutlich mit der Unterschätzung der Mooslänge aus Moosagglomeraten erklärt werden.

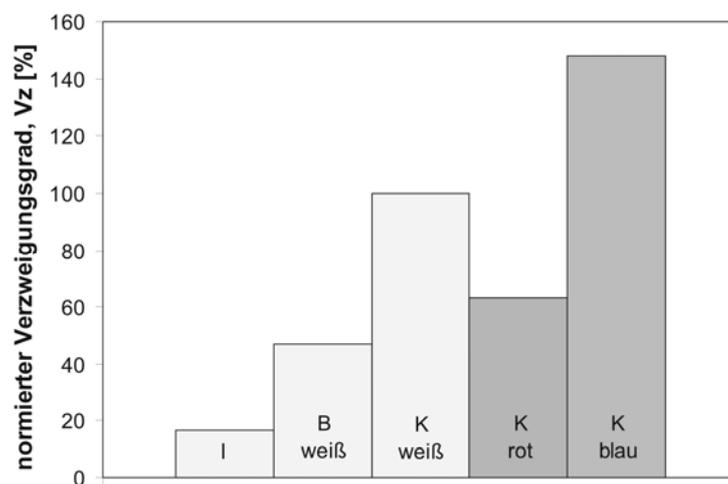


Abb. 5.6: Einfluss der Lichtqualität auf den Verzweigungsgrad von *tWTActin5_11.51VEGF* im Modell-Photo-Bioreaktor bei (I) Inokulum, (B) Batch Phase und (K) Chemostat

Unter rotem Licht wird die Differenzierung von Chloronema in Caulonema und die Bildung von Buds aus Caulonema ausgeprägt. Gametophoren entstehen unter blauem Licht, aber übereinstimmend mit den Beobachtungen von Imazumi et al. (2002) nur aus schon vorhandenen Buds. Ebenso unter blauem Licht findet eine Reversion von Caulonema in Chloronema statt. In den Zwischenphasen mit weißem Licht wird keine Änderung bezüglich der Gametophoren beobachtet.

5.2.3 Änderung des Chlorophyllgehalts

In den Batch- und Kontiphasen mit weißem Licht wird ein Chlorophyllgehalt (c_{chl}) zwischen $7,25 \text{ mg g}^{-1}$ und $9,29 \text{ mg g}^{-1}$ gemessen. Die Einführung von rotem Licht ruft eine Abnahme von c_{chl} auf $6,21 \text{ mg g}^{-1}$ hervor (siehe Abbildung 5.7). In der Zwischenphase mit weißem Licht steigt der gesamte Chlorophyllgehalt wieder auf $9,5 \text{ mg g}^{-1}$ und dann sinkt er allmählich in der Phase mit blauem Licht auf $3,71 \text{ mg g}^{-1}$. Während der darauf folgenden Phase mit weißem Licht und einer geringeren PFD gleich $13 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreicht der Chlorophyllgehalt der Moose nur $3,24 \text{ mg g}^{-1}$.

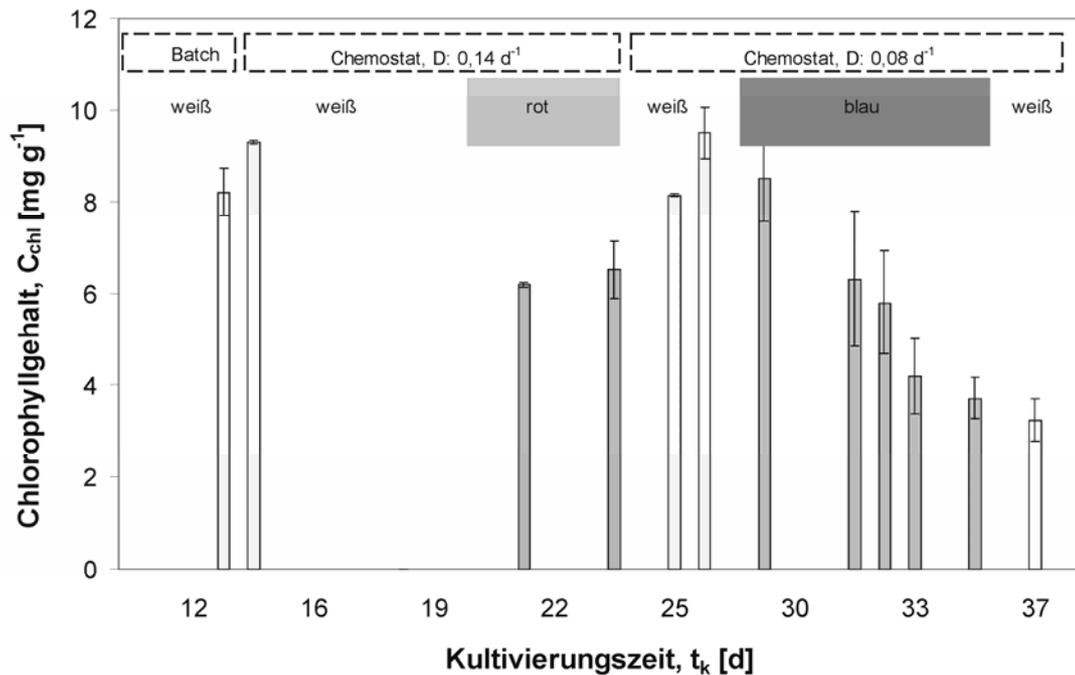


Abb. 5.7: Gesamter Chlorophyllgehalt der Moose bei unterschiedlichen Lichtphasen der Kultivierung IV im Modell-Photo-Bioreaktor

Die Absenkung der Chlorophyllproduktion in der Phase mit rotem Licht wird anscheinend durch die Entstehung von Caulonema verursacht. Der Grund für die Reduktion des spezifischen gesamten Chlorophyllgehalts bei blauem Licht ist dennoch unklar. Obwohl in dieser Phase eine Reversion von Caulonema in Chloronema stattfindet, entstehen auch Gametophoren, die weniger Chlorophyll als die chloronemale Zellen besitzen. In der Literatur werden Chlorophyllgehalte für reife Moose zwischen 1,64 und 3,76 mg g⁻¹ berichtet (Marschall und Proctor, 2004), die kleiner sind als die in Chloronema zu findenden Werte.

Das Verhältnis Chlorophyll a zu Chlorophyll b zeigt für die Phasen mit weißem und rotem Licht einen annähernd konstanten Wert von ca. 1,8. In der Mitte der Phase mit blauem Licht wird ein Maximum von 2,7 erreicht, fällt aber wieder dann auf 1,2. Mit weißem Licht und niedriger PFD wird eine Erhöhung des Chlorophyll a-Anteils im gesamten Chlorophyll detektiert, und sein Verhältnis steigt bis 2,9. Die Schwankungen der Zusammensetzung dieser Pigmente könnten durch die Anpassung von *Physcomitrella patens* an die Änderung der PFD, von 27,3 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Zwischenphase mit weißem Licht auf 3,36 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in der Blaulichtphase, hervorgerufen werden. Im Vergleich zu reifen Gametophoren zeigen Protonema höhere Werte für das Verhältnis Chlorophyll a/b.

5.2.4 Variation des Fettsäuremusters

Variationen des Fettsäuremusters bei *Physcomitrella patens* weisen auf das Auftreten von Differenzierungsereignissen hin. Der gesamte Fettsäuregehalt in den Kultivierungen variiert je Phase: Anfangsphase, 23,9 mg g⁻¹; Rotlicht, 30,7 mg g⁻¹; Weißlicht, 84,3 mg g⁻¹; Blaulicht, 72 mg g⁻¹ und 44 mg g⁻¹ in der Weißlichtphase bei niedrigerer PFD. Folgende Fettsäuren werden detektiert: (16:2) Palmitoleinsäure, (16:3) Hexadecatriensäure, (16:0) Palmitinsäure, (18:2) Linolsäure, (18:3) Linolensäure, (18:1) Ölsäure, (18:0) Stearinsäure und (20:4)

Arachidonsäure, wobei Palmitoleinsäure (16:2) und Hexadecatriensäure (16:3) nur in den Phasen mit weißem und rotem Licht gefunden werden (Abbildung 5.8).

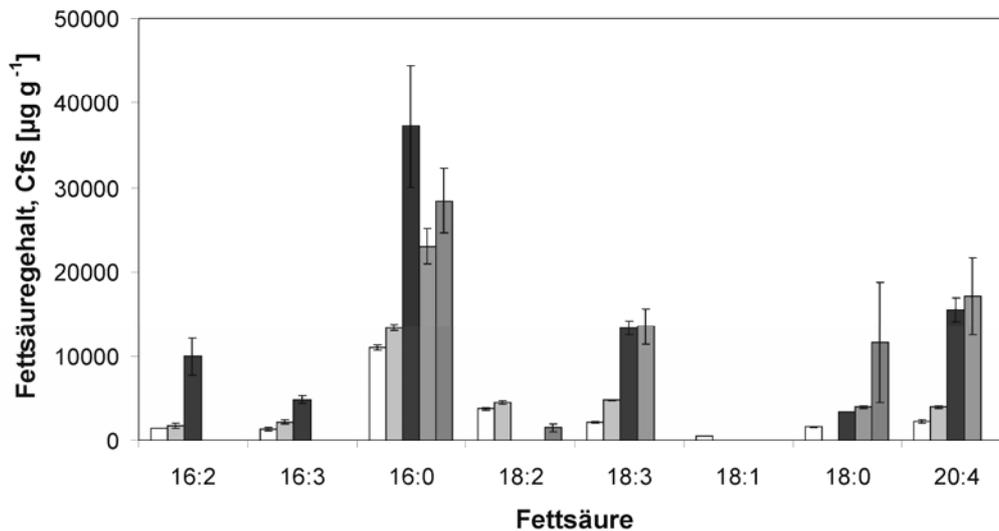


Abb. 5.8: Variation des Fettsäuregehalts von *Physcomitrella patens* in Abhängigkeit der Lichtqualität im Modell-Photo-Bioreaktor. (□) Batch-Phase mit weißem Licht; (■) rotes Licht; (▨) Zwischenphase mit weißem Licht; (■) blaues Licht; (■) weißes Licht bei PFD von $13 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Palmitinsäure (16:0) wird in allen Phasen gemessen, steigt aber deutlich in der Phase mit weißem Licht an und bleibt bis zum Ende der Kultivierung näherungsweise konstant. Der leichte Anstieg des Palmitinsäuregehalts unter dem Einfluss von rotem Licht entspricht der Erhöhung des Anteils an Caulonema. Linolsäure (18:2) wird weder in der Blaulichtphase noch in der Übergangsphase mit weißem Licht detektiert, dafür steigt in diesen Phasen der Gehalt an Linolensäure (18:3). Ölsäure wird nur am Anfang der Kultivierung nachgewiesen. Stearinsäure (18:0) wird am meisten in den letzten Phasen des Versuches, beim Blaulicht und der Weißlichtphase mit niedrigerer PFD, gemessen und wird bei rotem Licht nicht detektiert. Die kommerziell wertvolle Arachidonsäure (20:4) wird bevorzugend beim blauen Licht produziert. *Physcomitrella patens* wird als Modellorganismus zur Untersuchung möglicher Produktionswege von mehrfach ungesättigten Fettsäuren für die Pharma- und Lebensmittelindustrie angewandt (Zankt et al., 2002; Napier und Michaelson, 2001).

Die experimentellen Ergebnisse befinden sich im Bereich der Aussagen aus Literaturquellen über den Wildtyp (Grimsley et al., 1981). Dennoch sind die Änderungen der Fettsäure-Zusammensetzung bei *Physcomitrella patens* durch zahlreiche Faktoren bedingt, u.a. Entwicklung, PFD und Lichtqualität. Wie diese Faktoren agieren und welche Mechanismen dabei aktiviert werden, ist dennoch bisher unbekannt.

5.2.5 Änderung des Proteinmusters

Zur Überprüfung des Proteinmusters je nach Lichtphase wird eine gelelektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE von $4 \mu\text{g}$ Moos-Protein aus jeder Phase mit anschließender Silberfärbung vorgenommen (siehe Abbildung 5.9).

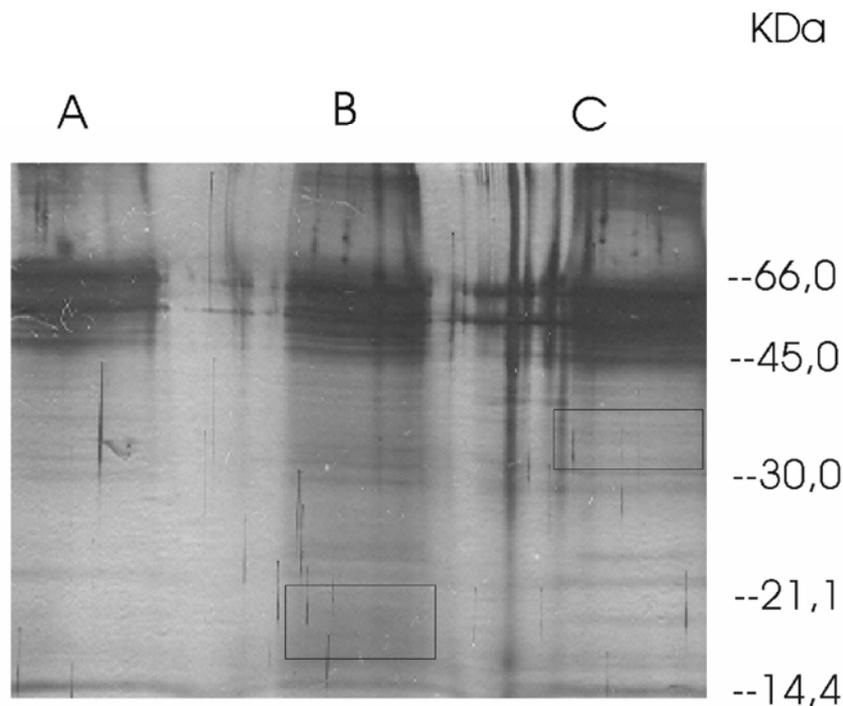


Abb. 5.9: SDS-PAGE der intrazellulären Proteine von *Physcomitrella patens* während der Kultivierung im Modell-Photo-Bioreaktor mit blauem (A), rotem (B) und weißem (C) Licht

Laut Literatur stammen die Proteinbänder zwischen 66 kDa und 37 kDa großteils aus Proteinen der Energiesysteme der Moose (ATP Synthase, ATPase, Aldolase, Rubisco-Activase u.s.w.), die ca. 44 % des Gesamtproteingehalts ausmachen (Sarnighausen et al., 2004). Unterschiede im Proteinmuster in diesem Bereich sind zwischen den Phasen nicht zu erkennen.

Innerhalb 35 kDa und 14 kDa sind vier Proteinbänder aus der Probe bei rotem Licht zu sehen, die weder bei blauem noch bei weißem Licht vorkommen. Diese Änderungen sind vermutlich auf die Erhöhung des Anteils von Caulonema zurückzuführen.

Moose aus der Phase mit blauem Licht zeigen ein Proteinband bei ca. 38 kDa, das bei rotem Licht abwesend ist. Eine genaue Identifizierung ist hier nicht möglich, da sich einige Proteine der Energiesysteme ebenfalls in diesem Bereich befinden. In blauem Licht sind deutlich weniger Proteinbänder zwischen 30 kDa und 14,4 kDa zu sehen als in den anderen Phasen. Ein ähnliches Proteinmuster ergibt sich bei jungen Gametophoren (siehe Abschnitt 4.6). Daher ist die Entstehung von solchen Mustern vermutlich auf die beobachtete Entwicklung von Gametophoren in der Blaulichtphase zurückzuführen.

5.2.6 Variation des intrazellulären Proteingehalts

Der durchschnittliche Proteingehalt von *Physcomitrella patens* beträgt in der Phase mit rotem Licht 148 mg g^{-1} , mit weißem Licht 170 mg g^{-1} und mit blauem Licht 202 mg g^{-1} (siehe Abbildung 5.10). Es liegen keine vergleichbaren Literaturdaten bezüglich der Änderung des Proteingehalts der Moosgewebe unter dem Einfluss monochromatischen Lichtes vor, daher ist der Grund solcher Variationen schwer zu beurteilen. Dennoch ist die Stimulation von

Caulonema in der Phase mit rotem Licht wahrscheinlich verantwortlich dafür, dass der Proteingehalt in dieser Phase steigt.

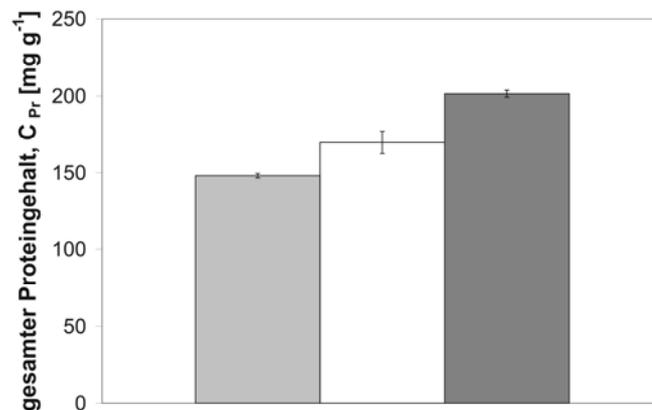


Abb. 5.10: Proteingehalt von *tWTActin5_11.51VEGF* in Kultivierung bei unterschiedlichen Lichtphasen im Modell-Photo-Bioreaktor: (■) rotes; (□) weißes und (■) blaues Licht

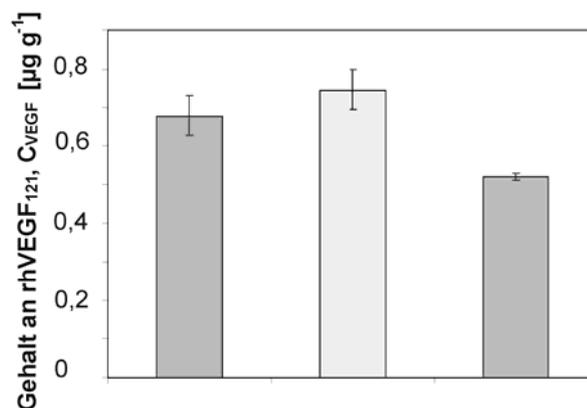


Abb. 5.11: Änderung der intrazellulären Konzentration an rhVEGF₁₂₁ von *tWTActin5_11.51VEGF* in Kultivierung bei unterschiedlichen Lichtphasen im Modell-Photo-Bioreaktor: (■) rotes; (□) weißes und (■) blaues Licht

5.2.7 Änderungen des intrazellulären rhVEGF₁₂₁-Gehalts

rhVEGF₁₂₁ ist nur in kleiner Konzentration innerhalb der Moose vorhanden, wobei keine erhebliche Variation in der Kultivierung bemerkbar ist. Sein Gehalt erreicht 0,68 $\mu\text{g g}^{-1}$ in der Phase mit rotem Licht, 0,74 $\mu\text{g g}^{-1}$ mit weißem Licht und 0,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ mit blauem Licht (siehe Abbildung 5.10). Zwischen dem intrazellulären rhVEGF₁₂₁-Gehalt und dem Gesamtproteingehalt von *tWTActin5_11.51* (siehe Abschnitt 5.2.6) ist keine Korrelation zu erkennen.

5.2.8 Integrität des sekretierten rhVEGF₁₂₁

Der SDS-PAGE von rhVEGF₁₂₁ aus tWTActin5_11.51 ergibt zwei Banden, bei 18 kDa und 20 kDa, die den unglycosylierten und glycosylierten Ketten des Zielproteins entsprechen können. Aus Überständen von jeder Kultivierungsphase werden ebenso mittels SDS-PAGE nur wenige Banden zusätzlich zu denen vom Produkt gefunden. Sie liegen zwischen 66 kDa und 45 kDa, sowie um die 30 kDa und stammen hauptsächlich aus Hintergrundproteinen von mechanisch beschädigten Mooszellen. Zwischen den verschiedenen Lichtphasen der Kultivierungen werden keine Änderungen im Verhältnis von glycosyliertem zu unglycosyliertem rhVEGF₁₂₁ mit SDS-PAGE festgestellt.

5.2.9 Abhängigkeit der rhVEGF₁₂₁-Produktionsrate von der Lichtqualität

Das sezernierte rhVEGF₁₂₁ wird aus dem Überstand unterschiedlicher Lichtphasen der Kultivierungen III und IV mittels ELISA gemessen und seine Produktionsraten ermittelt. Die maximale Konzentration von rhVEGF₁₂₁ in beiden Kultivierungen wird in der Phase mit weißem Licht erreicht, nämlich $3,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ($116 \mu\text{g g}^{-1}$).

In der Kultivierung III ist die rhVEGF₁₂₁-Produktionsrate in der Phase mit rotem Licht eindeutig kleiner als in der Phase mit weißem Licht und steigt in der Phase mit blauem Licht wieder an (siehe Abbildung 5.12).

Eine Reduktion der Produktsekretion mit rotem Licht ist wieder in der Kultivierung IV zu erkennen (siehe Abbildung 5.13). Nach dem Wechsel zum blauen Licht findet eine Erhöhung der Produktionsrate in dieser Phase statt, obwohl die PFD und somit die verfügbare Energie deutlich kleiner ist, als in der Phase mit weißem Licht. Diese Ergebnisse wiederholen sich in beiden Kultivierungen.

Eine Korrelation zwischen den Änderungen des extrazellulären rhVEGF₁₂₁ und den Variationen seines Gehalts innerhalb der Zellen (siehe Abschnitt 5.2.7) wird nicht beobachtet. Das Verhältnis zwischen der Menge an extrazellulärem rhVEGF₁₂₁ und dem gesamten Proteingehalt der Moose liegt in der Größenordnung von 10^{-4} . Der Quotient zwischen extrazellulärem und intrazellulärem rhVEGF₁₂₁ ist 63,1 für die Phase mit rotem Licht; 145,5 für die Zwischenphase mit weißem Licht und 135,6 für die Phase mit blauem Licht. Der kleine Wert für die Phase mit rotem Licht könnte auf eine ineffiziente Sekretion von rhVEGF₁₂₁ der Caulonema zurückzuführen sein.

In der Phase mit blauem Licht wird eine Intensivierung des Verzweigungsprozesses und der Reversion von Caulonema in Chloronema beobachtet. Beide Fakten könnten die Steigerung der Produktionsrate von rhVEGF₁₂₁ stimuliert haben. Das rhVEGF₁₂₁ wird im Stamm tWTActin5_11.51 mit Hilfe eines Actinpromotors exprimiert. Actin ist ein Strukturprotein des Cytoskeletts, das an vielen physiologischen Prozessen (u.a. an der Mitose) teilnimmt (Schopfer und Brennicke, 1999) und dessen Expression differenzierungsabhängig sein könnte. Andererseits aktiviert das blaue Licht die Zellteilung durch Verzweigung, was die Expression des rhVEGF₁₂₁ ebenfalls favorisieren könnte. Genaue Aussagen über den Wirkungsmechanismus von beiden Faktoren auf die Expression von rhVEGF₁₂₁ sind anhand der Daten schwer zu ermitteln.

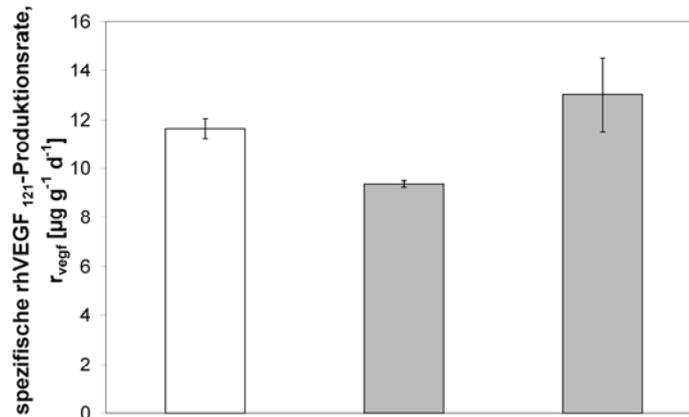


Abb. 5.12: spezifische rhVEGF-Produktionsrate bei unterschiedlichen Lichtphasen der Kultivierung III im Modell-Photo-Bioreaktor: (■) rotes; (□) weißes und (■) blaues Licht

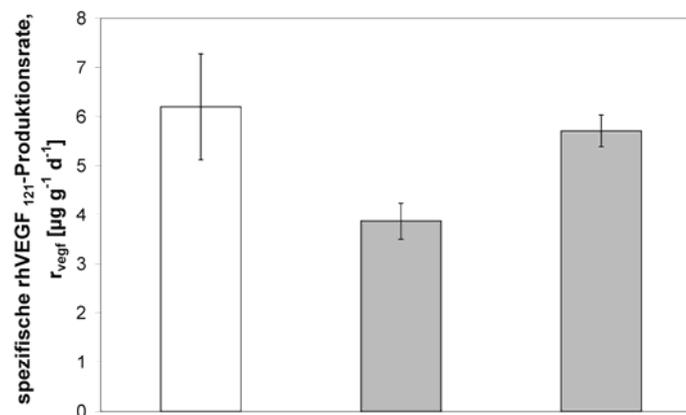


Abb. 5.13: spezifische rhVEGF-Produktionsrate bei unterschiedlichen Lichtphasen der Kultivierung IV im Modell-Photo-Bioreaktor: (■) rotes; (□) weißes und (■) blaues Licht

5.2.10 Variation der Phytohormonzusammensetzung

Die Variationen der Phytohormone des rekombinanten Stamms tWTActin5_11.51 werden während der Kultivierung unter filtriertem Licht in der Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die Werte befinden sich im Allgemeinen in der Größenordnung derer aus den Vorversuchen mit dem Wildtyp. Es ist kein relevanter Unterschied zwischen den Phytohormonspiegeln aus den Schüttelkolben und aus dem Modell-Photo-Bioreaktor zu erkennen.

Die Konzentrationen exogener IAA und Cytokinin sind höher als in der Literatur, aber es wird keine ABA detektiert. Hohe Konzentrationen von Auxinen und Cytokinin sind dennoch für mehrere Moose nicht ungewöhnlich: z.B. bei *Pellia epiphylla* 2,5-2,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ freie IAA, bei *Funaria hygrometrica* 2-5 $\mu\text{g g}^{-1}$ IAA (Ergün et al., 2002). OVEA 200 Mutanten von *Physcomitrella patens* wiesen 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ Zeatin auf (Cove und Ashton, 1984).

Da die Differenzierungsvorgänge nicht nur von den absoluten Mengen der Phytohormone sondern auch von ihren Verhältnissen abhängen, werden sie in der Abbildung 5.14 dargestellt.

Tabelle 5.3: Konzentration von Phytohormonen im Überstand bei unterschiedlichen Lichtphasen der Kultivierung von *tWTActin5_11.51* im Modell-Photo-Bioreaktor

Konzentration von Phytohormonen [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Kultivierungsphase - PFD [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]		
	weiß - 27,3	rot - 11,97	blau - 2,13
$i^6\text{Ade}$	0,94 \pm 0,28	2,13 \pm 0,64	1,27 \pm 0,38
Zeatin	0,29 \pm 0,09	1,03 \pm 0,31	0,29 \pm 0,09
IAA	1,25 \pm 0,37	3,68 \pm 1,10	1,60 \pm 0,48

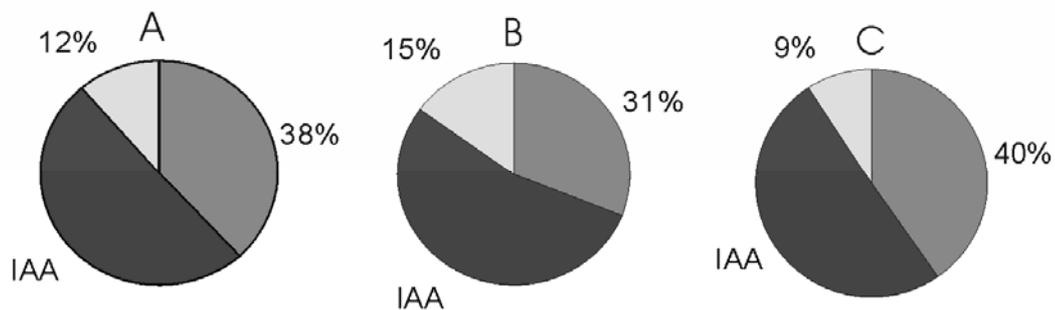


Abb. 5.14: Zusammensetzung der extrazellulären Phytohormone von *tWTActin5_11.51* im Modell-Photo-Bioreaktor. Hormone: Auxine (IAA) und Cytokinine ($i^6\text{Ade}$ (■) und Zeatin (□)). Lichtphasen: (A) weiß, (B) rot und (C) blau

Trotz der intensiven Bildung von Caulonema in der Phase mit rotem Licht ist keine große Variation in der Hormonzusammensetzung zwischen den Phasen zu sehen. Laut Schulz et al., (2000) ist die Erhöhung des Cytokinins, das die Entstehung von Buds in der Kultivierung hervorruft, ein eher punktuellere Ereignis. Es steigt von 30 pmol l^{-1} bis 90 pmol l^{-1} an und fast am selben Tag fällt es wieder zur Anfangskonzentration. Da die Proben vom Ende jeder Phase stammen ist es möglich, dass solche sprunghaften Variationen nicht erfasst wurden.

Jedoch präsentieren die Moose aus der Phase mit rotem Licht ca. um einen Faktor zwei mehr Phytohormone als die unter weißem und blauem Licht. Die Anwesenheit von Gametophoren in der Phase mit blauem Licht bedingt verglichen mit Weißlicht nur eine leichte Erhöhung der Konzentration von IAA und $i^6\text{Ade}$.

5.3 Fazit über die Ergebnisse im Modell-Photo-Bioreaktor

Der Stamm *tWTActin5_11.51* kann sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichen Betrieb im Modell-Photo-Bioreaktor kultiviert werden. Keine negativen Erscheinungen, wie das Absterben der Zellen oder eine Anhaftung an den Reaktorwänden, wurden bemerkt. Verglichen mit dem Wildtyp von *Physcomitrella patens* werden auch keine physiologischen Änderungen in der Kultivierung beobachtet.

Bestimmte gewünschte morphologische und physiologische Zustände der Moose lassen sich im kleinen Maßstab gezielt durch der Anwendung monochromatischen Lichtes in Suspensionskultivierungen erreichen. Demzufolge stellt die Einführung der Lichtqualität als Kultivierungsparameter ein neues und wertvolles Tool zur Prozessoptimierung dar.

Die Produktion von rhVEGF₁₂₁ wird bei tWTActin5_11.51 mit blauem Licht stimuliert und mit rotem Licht inhibiert. Obwohl die PFD und somit die verfügbare Energie in der Phase mit weißem Licht in den Experimenten fast zehnfach höher war als in der Phase mit blauem Licht, wurden ähnliche Produktionsrate erreicht: 6,2 µg d⁻¹ g⁻¹ mit weißem bzw. 5,7 µg d⁻¹ g⁻¹ mit blauem Licht. Darüber hinaus eröffnet sich die Möglichkeit für eine neue Kultivierungsstrategie für *Physcomitrella patens*, basierend auf Zyklen monochromatischen Lichtes oder deren Kombinationen, um den Energieinput zu reduzieren und den Wirkungsgrad des Lichtes zu erhöhen.

Um die technisch bedingten Unterschiede der PFD des weißen, roten und blauen Lichtes, sowie das lichtlimitierte Wachstum während der Kultivierungen zu überwinden, muss das Beleuchtungssystem optimiert werden. Damit können die Daten über die Physiologie rekombinanter Moose bei verschiedenen Lichtqualitäten auf höhere Wachstumsraten und PFD Bereiche erweitert werden.

Das Phytohormonmuster von tWTActin5_11.51 liefert Indizien über die Kinetik der Differenzierung und die rhVEGF₁₂₁-Produktion. Die Erhöhung der Konzentration von i⁶Ade, Zeatin und IAA im Suspensionsüberstand fand parallel mit der Bildung von caulonemalen Zellen und einer ca. 25 %-igen Reduktion der Produktionsrate vom Zielprotein statt. Die Wirkung der Verdünnung der Phytohormone durch Mediumaustausch (Perfusion) auf die Differenzierung und Stabilität der Sekretion von rhVEGF₁₂₁ in langfristigen Kultivierungen wird im nächsten Kapitel untersucht.

6 Kultivierung von *Physcomitrella patens* in Pilotmaßstab

In diesem Kapitel wird die langfristige Kultivierbarkeit rekombinanter Stämme von *Physcomitrella patens* in einem 30 L Rohr-Photo-Bioreaktor untersucht. Die Ergebnisse aus der Charakterisierung der submers Kultivierung von Moosen werden in einem skalierbaren Photo-Bioreaktor, der nahezu geometrisch identisch zu Produktionsreaktoren ist, überprüft. Neue Erkenntnisse über den Zellstress in Suspension, das Wachstum, die Produktbildung bei hoher PFD und die Rolle der Verdünnung von Pflanzenhormonen zur Stabilisierung der Sekretion der Zielproteine können damit erreicht werden.

6.1 Lichtverteilung auf der Oberfläche des Photo-Bioreaktors und radiale Lichtprofile

Das Verhältnis Oberfläche-Volumen des Pilot-Photo-Bioreaktors ist 89 m^{-1} , wobei der volumetrische Dunkelanteil 11 % beträgt. Die effektive PFD auf die Reaktorrohre wird durch die Anzahl und den Abstand der Lampen zum Reaktor variiert. Dennoch ist die Lichtverteilung auf die Glasoberfläche nicht homogen, da sie abhängig von der Fokussierung und der geometrischen Anordnung der Lampen ist (siehe Abbildung 6.1). Für den Fall einer akzeptablen homogenen Lichtverteilung an der externen Seite des Reaktors kann das Lambert-Beersche Gesetz angewandt werden, um die radiale Variation der PFD im Photo-Bioreaktor zu beschreiben (siehe Abschnitt 2.5.4) (Huang und Rorrer, 2002).

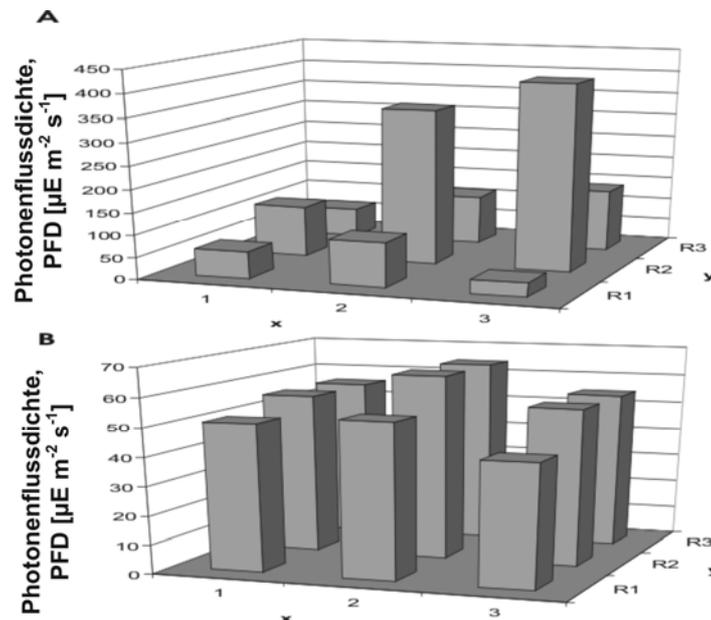


Abb. 6.1: Mittlere Verteilung der PFD an der externen Seite des 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktors. Die beleuchtete Oberfläche des Reaktors wird in neun Sektoren segmentiert und die mittlere PFD ermittelt. Der Abstand zwischen den Lichtquellen und den Reaktor wird bei (A) 380 mm und (B) 1030 mm gehalten

Die gemessenen radialen PFD-Profile im Pilot-Photo-Bioreaktor werden bei verschiedenen Biomassekonzentrationen der Moos-Suspension und einer mittleren PFD von $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf der externen Seite des Reaktors mit den berechneten Werten aus den Gleichungen 2.7 und

2.8 verglichen (siehe Abbildung 6.2). Bei diesen Bedingungen wird eine Reduktion der PFD von $73 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf der inneren Seite des Reaktorrohres gemessen. Ab einer Biomassekonzentration von ca. $0,5 \text{ g l}^{-1}$ wird eine erhebliche Reduktion des verfügbaren Lichtes im Zentrum des Rohres beobachtet.

Die experimentellen Daten lassen sich gut mit der linearen Korrelation zwischen c_x und K mittels der Gleichung 2.8 reproduzieren. Die berechneten Extinktionskoeffizienten für das Medium (k_o) und die Moose (k_c) liegen bei $0,0027 \text{ mm}^{-1}$ und $0,0654 \text{ l g}^{-1} \text{ mm}^{-1}$. Die mittleren Werte der PFD aus der Gleichung 2.9 werden auch in der Abbildung 6.2 gezeigt.

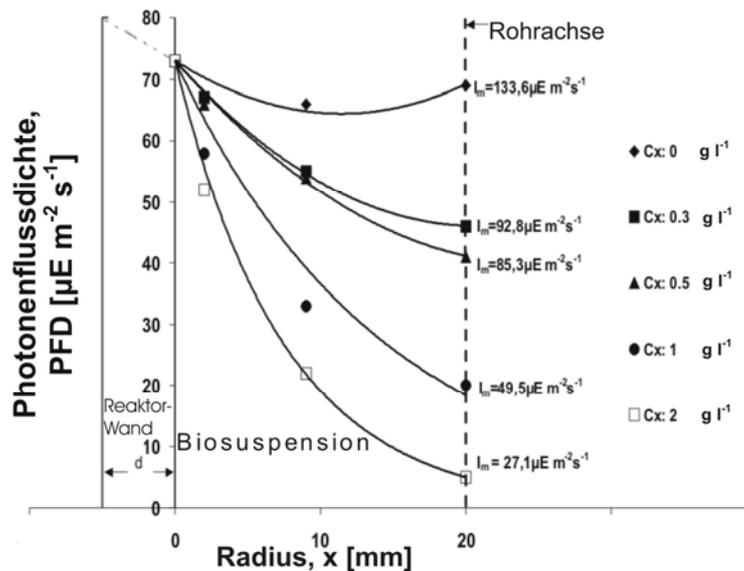


Abb. 6.2: Radiale Variation der PFD bei verschiedenen Biomassekonzentrationen in einem Rohr-Photo-Bioreaktor mit 40 mm Durchmesser. Die Biosuspension besteht aus protonemalem Gewebe von *Physcomitrella patens* und Knop-Medium. Die berechneten Werte der PFD nach dem Lambert Beerschen Gesetz (Linien) und die mittlere PFD entlang eines eindimensionalen Weges (I_m) sind dargestellt

6.2 Versuche im Batch-Betrieb

In einer ersten Kultivierung werden die Antworten der Moose auf Variationen der axialen Geschwindigkeit und PFD in einem Rohr-Photo-Reaktor getestet. Für diesen Zweck wird der Stamm tWTP31VEGF im Knop-Medium mit $0,4 \text{ l min}^{-1}$ einer Gasmischung von Luft und CO_2 (2,16 % (v/v)) bei einem LD 16/8 Lichtregime kultiviert. Die Drehzahl der Pumpe wird für die Stressversuche kleiner gehalten als die maximalen Grenzwerte, die Vandanjon et al., (1999) für empfindliche Mikroorganismen in Kreiselpumpen vorschlagen. Dadurch wird der Stresseffekt der Moose durch die Pumpe minimiert und eine Analyse der Folgen, die eine Erhöhung der axialen Geschwindigkeit mit sich bringt, ermöglicht. Für die Stressversuche wird die durchschnittliche Geschwindigkeit der Biosuspension allmählich von $0,20 \text{ m s}^{-1}$ (erster Kultivierungstag) bis $0,95 \text{ m s}^{-1}$ (12. Tag) erhöht. Ansonsten wird sie bis zum Kultivierungsende auf $0,70 \text{ m s}^{-1}$ eingestellt. Die PFD an der äußeren Seite der Reaktorwände beträgt bis zum 8. Kultivierungstag $59,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.2.1 Wachstum in Rohrreaktoren und Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit

Vor der Phase exponentiellen Wachstums zeigen die Moose ähnliche Charakteristika wie das Inokulum: kurze Fäden und einen mäßigen Anteil an Caulonema (Abbildung 6.3A). Mit der Intensivierung des Wachstums nimmt die Verzweigung und Länge der Moose, sowie der Anteil an Chloronema zu (Abbildung 6.3B). In dieser Periode besitzen die Zellen eine hohe Zahl an runden Chloroplasten (Abbildung 6.3D). Die spezifische Wachstumsrate (μ) erreicht $0,52 \text{ d}^{-1}$ bis zum 6. Kultivierungstag (Abbildung 6.4), was vergleichbar mit den Werten aus semikontinuierlichen Kultivierungen in Rührkessel-Photo-Bioreaktoren von Hohe et al., (2002) ist. Dann nimmt das Wachstum, genauso wie in den Kultivierungen im kleineren Maßstab, graduell bis zu einer μ von $0,24 \text{ d}^{-1}$ ab. Während der Phase des langsamen Wachstums werden die Moosfilamente immer größer und der Anteil an Caulonema steigt. Die Moose erreichen eine Größe im Millimeterbereich und erscheinen als Klumpen oder Agglomerate. In den späteren Phasen der Kultivierung entstehen Buds, besonders aus dem Kern von Moosagglomeraten, und zuletzt ganze Gametophoren (Abbildung 6.3C). Vermutlich gibt es eine kritische Größe der Moose, ab der die Generation von Buds unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen stimuliert wird (Knoop, 1984). Am Ende der Kultivierung wird eine Biomassekonzentration von $2,4 \text{ g l}^{-1}$ erreicht. Der Gehalt an Chlorophyll zeigt ein Maximum von $9,0 \text{ mg g}^{-1}$ am 12. Kultivierungstag, dann nimmt er bis zum Kultivierungsabbruch ca. $3,0 \text{ mg g}^{-1}$ ab (Abbildung 6.4).

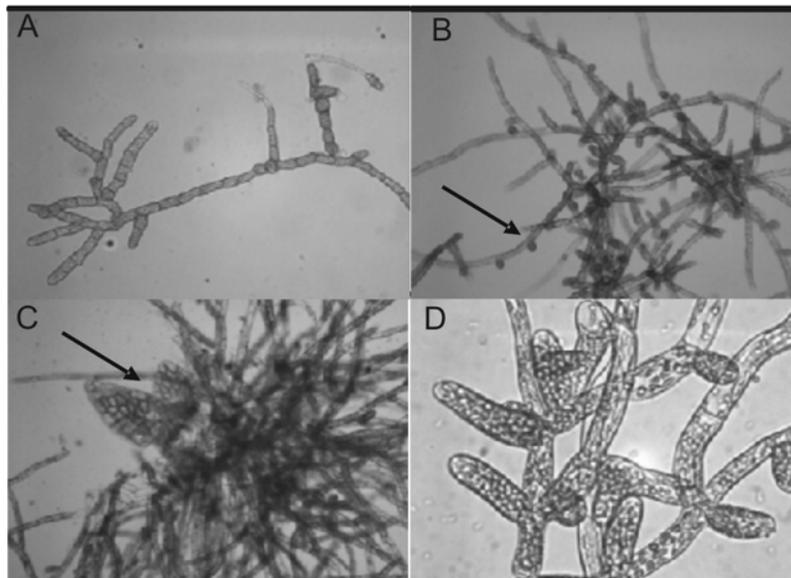


Abb. 6.3: Entwicklungsstadien von *Physcomitrella patens* während einer Batchkultivierung in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. (A) Lag-Phase: Hoher Anteil an Chloronema. (B) Schnelle Wachstumsphase (5. Kultivierungstag): Lange Filamente und hohe Verzweigung (Pfeil.) (C) Kultivierungsende: Buds und junge Gametophore (Pfeil). (D) Detail der Phase mit schnellem Wachstum: Intensive Verzweigung

Beim Übergang zwischen exponentiellen und linearen Wachstumsphasen wird die Strömungsgeschwindigkeit (u) stufenweise geändert (Abbildung 6.4). Bei einer Geschwindigkeit von $0,20 \text{ m s}^{-1}$ wird die Bildung pelletartiger Moose, sowie die Anhaftung der Fäden an die Wände des Pilot-Photo-Bioreaktors favorisiert. Der mittlere Durchmesser der Gasblasen steigt und der volumetrische Gastransferkoeffizient ($k_{l,a}$) nimmt ab ($0,002 \text{ s}^{-1}$). Bei der Erhöhung der Geschwindigkeit auf $0,80 \text{ m s}^{-1}$ werden die Moose auseinander bewegt

und somit wird die Tendenz zur Agglomeration minimiert. Der k_{1a} -Wert beträgt $0,0042 \text{ s}^{-1}$, was bessere Transportbedingungen im Reaktor andeutet. Dennoch wird nach langen Perioden bei dieser Strömungsgeschwindigkeit Zellzerstörung hervorgerufen. Eine weitere Anhebung von u auf $0,95 \text{ m s}^{-1}$ provoziert das Zerbrechen der Mooszellwand. Es kann keine Zellregeneration stattfinden. Daraufhin muss ein Kompromiss getroffen werden, wobei u für den Kultivierungszweck zwischen $0,4 - 0,7 \text{ m s}^{-1}$ beträgt.

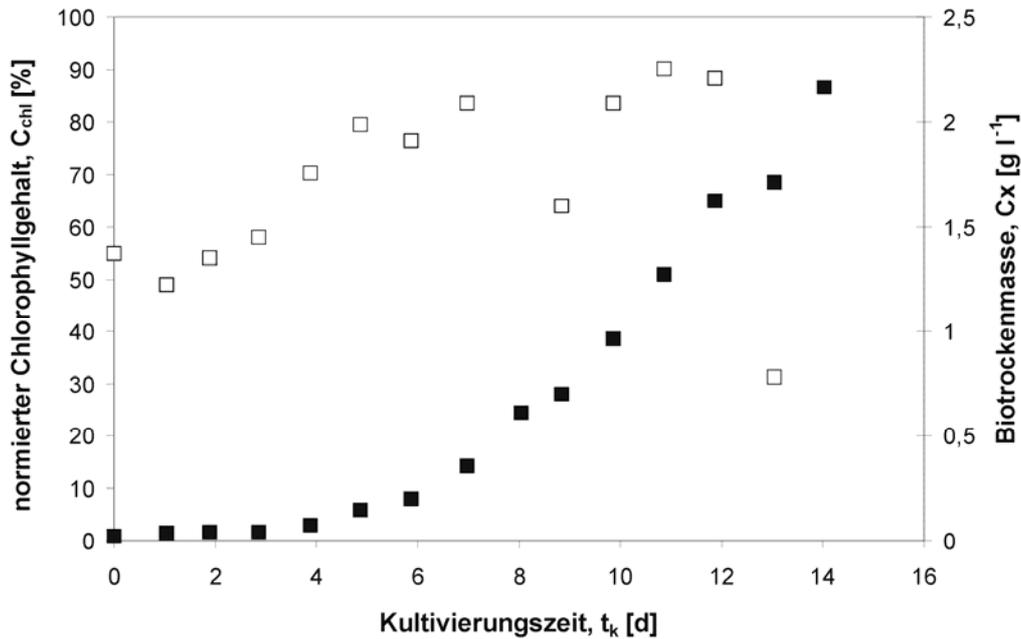


Abb. 6.4: Verlauf der Biomassekonzentration (■) und des Chlorophyllgehalts (□) in einer Batchkultivierung von *Physcomitrella patens* in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Axiale Geschwindigkeit: $0,20 \text{ m s}^{-1}$ (bis 8. Kultivierungstag); $0,40 \text{ m s}^{-1}$ (9. Kultivierungstag); $0,60 \text{ m s}^{-1}$ (10. Kultivierungstag); $0,80 \text{ m s}^{-1}$ (11. Kultivierungstag); $0,95 \text{ m s}^{-1}$ (12. Kultivierungstag); $0,70 \text{ m s}^{-1}$ (bis zum Kultivierungsende)

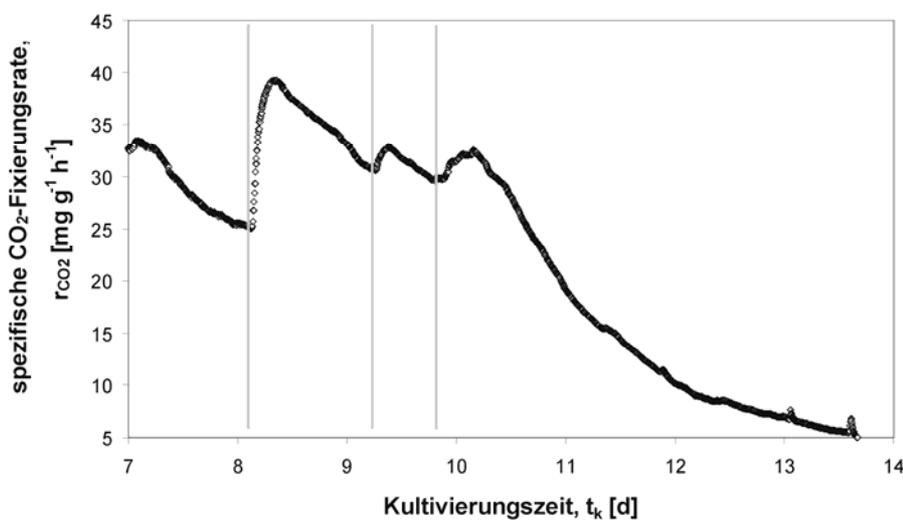


Abb. 6.5: Kohlendioxid-Fixierungsraten (r_{CO_2}) von tWTP31VEGF in einer Batchkultivierung im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Die Linien zeigen drei Pulse mit hoher PFD am 8., 9. und 10. Kultivierungstag von $66,2$; $81,1$; und $100,7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Um den Effekt der Lichtlimitierung bei hoher Biomassekonzentration zu überprüfen, werden drei Pulse mit hoher PFD (LL) am 8. ($66,2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 9. ($81,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 10. Kultivierungstag ($100,7 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eingeführt. In der Abbildung 6.5 wird die photosynthetische Aktivität der Moose dargestellt. Die CO_2 -Fixierungsrate (r_{CO_2}) steigt am 6. Kultivierungstag von $20 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ bis $35 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ und sinkt dann wieder. Mit der Erhöhung der PFD am 8. Kultivierungstag wird ein Anstieg der Fixierung von Kohlendioxid beobachtet. Die zwei folgenden Lichtpulse am 10. und 11. Tag haben einen ähnlichen, jedoch nicht so intensiven Effekt auf r_{CO_2} . Die CO_2 -Fixierungsrate nimmt ständig bis zum Kultivierungsende ab.

Variation des Fettsäuremusters

In der exponentiellen Wachstumsphase bleibt der Gehalt an Fettsäure nahezu konstant zwischen $40,7 \text{ mg g}^{-1}$ und $35,4 \text{ mg g}^{-1}$. Folgende Fettsäuren werden in dieser Phase detektiert: (C16:0) Palmitinsäure, 25,0 %; (C18:3) Linolenicssäure, 25,9 %; (C20:4) Araquidonsäure, 16,6 %; (C16:2) Hexadecadienoicssäure, 13,4 %; (C18:2) Linoleicssäure, 7,2 %; (C18:2) Linoleilaidicssäure, 4,8 % und (C22:0) Behenicssäure, 2,8 %. Mit der Verlangsamung des Wachstums sinkt der Anteil an Fettsäure auf $15,7 \text{ mg g}^{-1}$. In der letzten Phase der Kultivierung werden jedoch $25,0 \text{ mg g}^{-1}$ erreicht. Ein Vergleich zwischen früheren und späteren Phasen der Kultivierung zeigt eine Variation der Fettsäure-Zusammensetzung. C16:0 und C18:2 steigen auf 33,8 % und 14,6 %. Dagegen sinken C16:2 und C18:3 auf 6,5 % bzw. 15,9 %. Girke et al., (1998) haben über ein ähnliches Fettsäuremuster in *Physcomitrella patens* Wildtyp berichtet, dennoch sind ihre beobachteten Konzentrationen kleiner als die Werte aus dieser Kultivierung. Der Anstieg der Konzentrationen an Linolensäure und Palmitinsäure bei einer Erhöhung des Caulonemaanteils stimmt mit den Ergebnissen aus dem Modell-Photo-Bioreaktor überein.

6.2.2 Effekt des Tag/Nacht Rhythmus

Es werden Batchkultivierungen von *Physcomitrella patens* im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor durchgeführt, um den Einfluss des Tag-Nacht Rhythmus auf die Kohlendioxid-Fixierung und die Differenzierung zu untersuchen. Die Moose werden bei $21,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von $5,8 \pm 0,05$ in Knop-Medium (6:10) kultiviert (siehe Abbildung 6.6). Eine Mischung von $0,4 \text{ l min}^{-1}$ Luft ($0,0136 \text{ vvm}$) und CO_2 ($1,75 \text{ } \%$ (v/v)) wird ebenfalls kontinuierlich zugegeben. Zunächst wird die mittlere axiale Geschwindigkeit der Biosuspension im Reaktor auf $0,70 \text{ m s}^{-1}$ eingestellt, und ein LL Regime bei einer mittleren PFD von $84,1 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrieben (Abbildung 6.6, oben).

Einigen Stunden nach der Inokulation wird intensives Wachstum beobachtet. Boyd et al., (1988) berichteten eine zwei Tage lange Lag-Phase für Suspensionskultivierungen von *Physcomitrella patens* Wildtyp in einem Airlift-Reaktor. Das schon beschriebene Muster von exponentiellem Wachstum zeigt sich bis zur Mitte der Kultivierung mit einem μ -Wert von $0,864 \text{ d}^{-1}$. Dieser Wert ist ca. 25 % höher als die maximale Wachstumsrate, die Boyd et al., (1988) bei vergleichbaren Bedingungen erreicht haben. Der Anstieg der Biomasse in dieser Phase lässt sich gut mit der Erhöhung des CO_2 -Verbrauchs korrelieren, wobei er am Ende der exponentiellen Wachstumsphase $0,019 \text{ mol h}^{-1}$ erreicht.

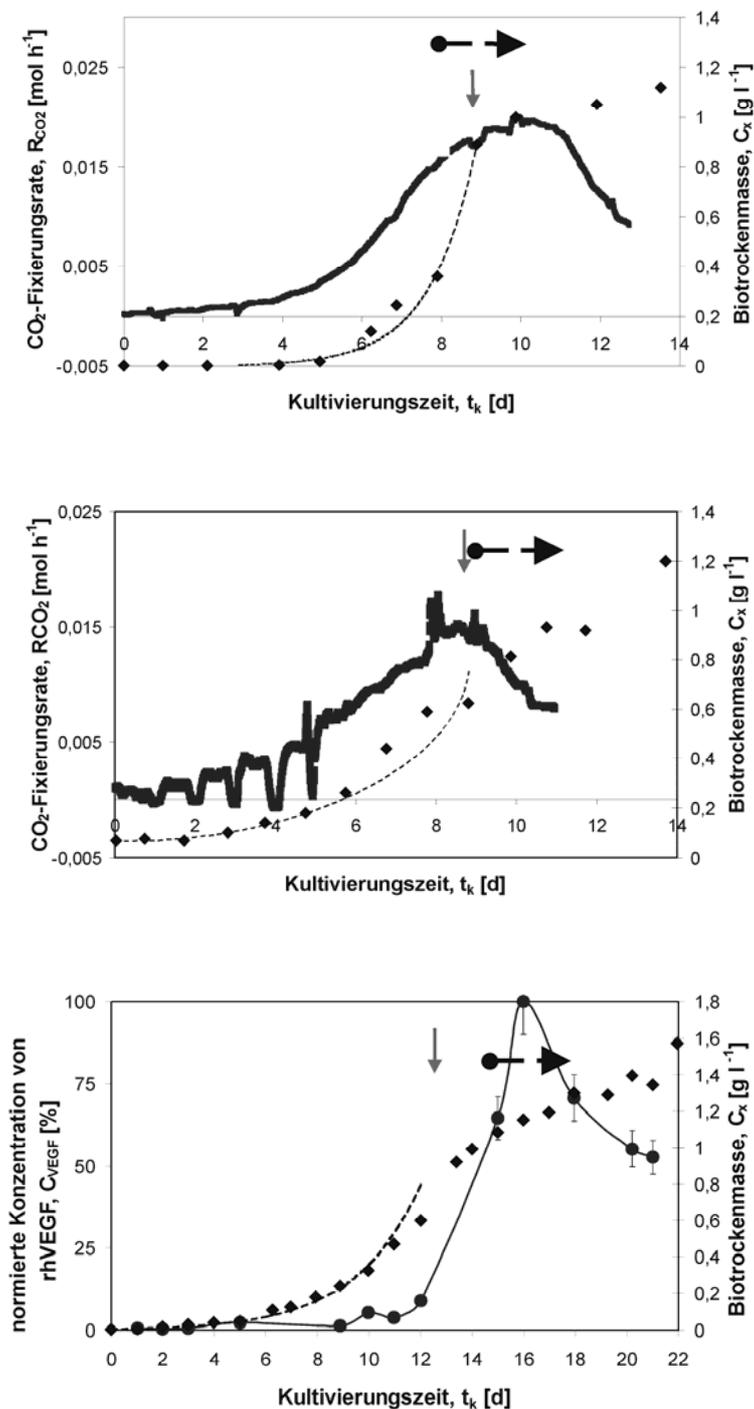


Abb. 6.6: Einfluss der Tag/Nacht Zyklen auf das Verhalten von *Physcomitrella patens* in Batchkultivierungen in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Die Biotrockenmasse (\blacklozenge), Kohlendioxid-Fixierung (—) und die normierte Konzentration des sekretierten rhVEGF (\bullet) werden gezeigt. Die vertikalen Pfeile signalisieren den Übergang zwischen exponentiellen und linearen Wachstumsphasen. Die diskontinuierlichen Pfeile zeigen den Zeitpunkt, ab dem Moosgametophoren in Suspension detektiert werden. (Oben) Wildtyp bei LL. μ -Wert für die exponentielle Wachstumsphase: $0,864 \text{ d}^{-1}$. (Mitte) Wildtyp mit Einführung von LD in der früheren Phase der Kultivierung. (Unten) Batch des rekombinanten Stamms *tWTActin_11.51* mit LD 16/8 während der ganzen Kultivierung

Die Verlangsamung des Wachstums und der CO₂-Fixierungsrate tritt ab einer Biomasse von 0,9-1,0 g l⁻¹ auf. Das Verhältnis Chlorophyll a/b, das üblicherweise als Indikator des Zustandes der photosynthetischen Maschinerie bei Bryophyta benutzt wird (Marshall and Proctor, 2004), bleibt während des schnellen Wachstums bei 2,6 ± 0,3 und fällt am Ende der Kultivierung auf 1,6 ± 0,1.

Für eine zweite Serie von Batchkultivierungen werden Hell/Dunkel Zyklen eingeführt: LD 16/8 (bis zum 4. Kultivierungstag) und LD 20,5/3,5 (am 5. Tag). Die anderen Bedingungen werden gleich wie bei den LL Kultivierungen gehalten (siehe Abbildung 6.6, Mitte). Die Dunkelperioden führen zu einer Reduktion der spezifischen Wachstumsrate im Vergleich zur LL Phase, der μ -Wert beträgt 0,54 d⁻¹. Gleich nach der Beendigung der Dunkelzyklen verhält sich das Mooswachstum und der Kohlendioxid-Verbrauch wie bei den LL-Kultivierungen. Dennoch nimmt die Photosynthese nach dem Erreichen einer Biotrockenmassekonzentration von 0,8 g l⁻¹ irreversibel ab und der CO₂-Verbrauch fällt auf 0,018 mol h⁻¹. In den LD Phasen beträgt das Verhältnis Chlorophyll a/b 2,6±0,2. Der gesamte Chlorophyllgehalt liegt zwischen 11 und 14 mg g⁻¹. Bei LL, sie sinken diese Werte auf 2.1±0.1 und 7 mg g⁻¹.

Eine dritte Versuchsreihe von Batches mit dem Stamm tWT11.51VEGF wird mit identischen Bedingungen wie in den früheren Versuchen aber mit LD 16/8 bis zum Kultivierungsende realisiert (siehe Abbildung 6.6, unten). Hier erreicht die spezifische Wachstumsrate in den ersten Kultivierungstagen 0,57 d⁻¹. Dennoch sind die korrigierten R_{CO₂}-Werte, die nur auf die Hellperiode der Zyklen bezogen sind, vergleichbar mit denen aus den Kultivierungen von Abbildung 6.6, oben und 6.6, Mitte. Diesmal wird keine irreversible Reduktion der R_{CO₂} bei späteren Phasen der Kultivierung beobachtet, wobei ihre Werte zwischen 28-50 mg g⁻¹ h⁻¹ bleiben. Der Pigmentgehalt der Moose liegt während der Kultivierung bei 12 mg g⁻¹ und das Verhältnis Chlorophyll a/b fällt nur 4 % zwischen der exponentiellen und der linearen Wachstumsphase. Die Konzentration des sekretierten rhVEGF steigt kontinuierlich bis zum 16. Kultivierungstag. Jedoch wird am Ende der Kultivierung nur die Hälfte der maximal erreichten rhVEGF Konzentration im Überstand gemessen.

Die Batchkultivierungen bestätigen die kritische Rolle der Tag/Nacht Zyklen bei den physiologischen Antworten von *Physcomitrella patens* (Aoki et al., 2004). Die Reduktion der Netto-Kohlendioxid-Fixierungsrate in den späteren Phasen der LL Kultivierungen bei hoher PFD kann durch eine graduelle langfristige Belastung der Zellphotosysteme erklärt werden (Endress, 1994), die eventuell von der Circadian-Uhr der Moose abhängig ist (Aoki et al., 2004). Obwohl die Induktion von LD 16/8 nicht genügt, um die CO₂-Fixierung bis zum Ende der Kultivierung hoch zu halten, zeigt sie einen begrenzten stabilisierenden Effekt. Die Einführung von Tag/Nacht Zyklen ruft im Vergleich zu LL Kultivierungen eine 62 %-ige Erhöhung des Verhältnisses Chlorophyll a/b und eine Verzögerung der Anwesenheit von Moosgametophoren hervor. Die ersten Moos „leafy shots“ werden bei 0,3 g l⁻¹ in LL-, bzw. bei 0,6 g l⁻¹ in LD Kultivierungen detektiert. Letzteres kann als ein Indiz für die Stimulation der Zelldifferenzierung des Moores bei kontinuierlicher Beleuchtung mit hoher PFD interpretiert werden.

Die gemessenen Verhältnisse von Chlorophyll a/b sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Yasumura et al., (2005) für *Physcomitrella patens* in festen Medien. Trotzdem ist ein direkter Vergleich hier nicht möglich, da die Verteilung der Moosstadien nicht betrachtet wurde.

Durch die Anwendung von Tag/Nacht Zyklen ist es möglich, die R_{CO₂} bis zum Ende der Kultivierung zu stabilisieren. Laut Fischer and Alfermann, (1995) spiegeln die erreichten CO₂-Fixierungsraten (28-50 mg g⁻¹ h⁻¹) eine hohe photosynthetische Aktivität der Moose wider.

Die durchgeführten Batches stellen die ersten Versuche zur Expression von rhVEGF in einem

Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor mittels *Physcomitrella patens* dar. Nach einer kritischen Biomassekonzentration nimmt die Menge an VEGF im Medium, eventuell auf Grund der Akkumulation von Zellmetaboliten und/oder Differenzierung ab (Schween et al., 2003). Darüber hinaus liegt die maximale Produktion von rhVEGF aus den Batchkultivierungen im Pilotmaßstab bei $80 \mu\text{g g}^{-1}$.

Bisher gibt es in der Literatur keine vollständigen Berichte über die Expression heterologer Proteine mit *Physcomitrella patens* in skalierbaren Photo-Bioreaktoren. Unoptimale Bedingungen bezüglich der Lichtübertragung, Reaktorgeometrie, Strömungsdynamik und Prozessführung führen bei früheren Stadien der Kultivierung zu lichtlimitiertem Wachstum und zu erhöhtem Energieinput, wie im Fall der Rührkessel-Photo-Bioreaktoren (Hohe and Reski, 2002). Der eingeführte Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor überwindet manche Nachteile der klassischen Systeme zur *in vitro* Propagation pflanzlicher Gewebe und erlaubt eine bessere Prozesskontrolle. Daraufhin wird die Verfügbarkeit von CO_2 und die Desorption von O_2 verbessert. Auf Grund der kleinen Begasungsrate und des Gas-Holdups wird das Reaktorvolumen effizient genutzt. Ferner werden spezifische Wachstumsraten von $0,864 \text{ d}^{-1}$ in *Physcomitrella patens* Kultivierungen bei LL und einem PFD von $84 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreicht.

Die Etablierung langfristiger Kultivierungen von Moosgewebe für *molecular farming* setzt voraus, dass sowohl die Moosdifferenzierung als auch das unbalancierte Wachstum minimiert werden (Hohe and Reski, 2005a). Darum wird in den nächsten Kapiteln die Rolle der fokussierten Zerkleinerung der Moose und der Verdünnung der Phytohormone im Pilotmaßstab zur Verzögerung der Differenzierung und zur Verbesserung der rhVEGF Produktion evaluiert.

6.3 Mechanische Kontrolle der Moosmorphologie

Aus den Ergebnissen zur Charakterisierung der Moossuspensionen im Kolbenmaßstab wurde festgestellt, dass die Beeinflussung mancher morphologischer Merkmale bei *Physcomitrella patens* eine Verzögerung der Differenzierung hervorrufen kann (siehe Abschnitt 4.4). Um eine passende Strategie für die *inline* Zerkleinerung der Moose im Pilotmaßstab zu etablieren, muss zuerst ein geeignetes System für diesen Zweck ausgewählt werden und dann müssen seine operativen Parameter definiert werden. Da diese Operation eine schonende Reduktion der Größe von *Physcomitrella patens* Agglomeraten in Suspension mit möglichst kleinem Zellstress erlauben muss, wird ein Zerkleinerer, der auf dem Rotor-Stator Prinzip beruht, angewandt. Die Mechanismen, welche die Rotor-Stator Maschinen für eine fokussierte Zerkleinerung filamentöser Organismen geeignet machen, werden kurz in den folgenden Abschnitt erläutert.

6.3.1 Zerkleinerungsmechanismen mittels Rotor-Stator Maschinen

Schon im Jahre 1960 berichtete Willems über die Anwendung von Hochfrequenzgeneratoren für die mechanische Bearbeitung disperser Systeme mit flüssigen, pumpfähigen Trägermedien, die auf dem Prinzip des Rotor-Stators beruhen. Solche Hochfrequenz-Generatoren, oft bekannt als Ultra-Turrax[®] (IKA, Staufen), werden auch zur Zerkleinerung biologischen Materials benutzt. Sie bestehen aus einem Rotor und einem Stator mit jeweils unterschiedlichen Zahnkränzen. Rotor und Stator sind tangential und radial geschlitzt (Abbildung 6.7), wobei der Rotor im konzentrischen Stator mit hoher

Umfangsgeschwindigkeit betrieben wird. So wird bei einem Durchgang der Suspension ein wiederholtes tangenciales Abbremsen und Beschleunigen gewährleistet.

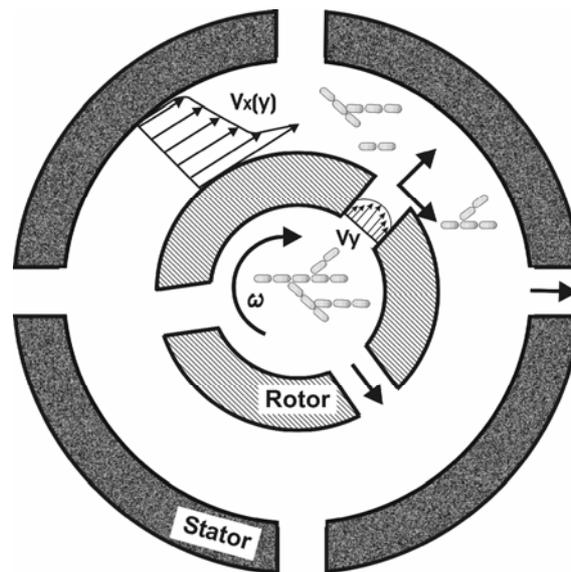


Abb. 6.7: Schematische Darstellung eines Rotor-Stator Zerkleinerers (Wiedmann, 1975)

Die Zerkleinerungswirkung ergibt sich aus einer konvektiven Flüssigkeitsbeschleunigung im Geschwindigkeitsgradienten einer hochturbulenten Couetteströmung, welche durch Rotation und der daraus resultierenden Strömungsführung erzeugt wird. Zerkleinerungseffekte durch Kavitation, Prall und Schlag sind aufgrund ihrer nicht selektiven Wirkungsweise und schweren Skalierung für die Anwendung mit Moosen unerwünscht. Ihre Rolle bei der Zerkleinerung mit Rotor-Stator Geräten kann wie folgt zusammengefasst werden.

Kavitation

Nach Bernoulli ist in schnell strömenden Medien ein lokales Verdampfen von Flüssigkeit möglich, wenn der statische Druck unter den Dampfdruck der Flüssigkeit absinkt. Dies ist die Entstehungsursache für Kavitationsblasen, die beim Eintritt in ein Gebiet höheren Drucks rasch zusammenbrechen. Dabei treten örtlich heftige Temperatur- und Druckstöße auf, die nahegelegene Moosfäden unregelmäßig beanspruchen könnten. Dennoch ist selbst bei hoher Umfangsgeschwindigkeit des Rotor-Stators (bis 23 m s^{-1}), was einem Drehzahlbereich von 18.000 min^{-1} bis 24.000 min^{-1} entspricht, keine Kavitation zu beobachten. Diese Aussage wurde von Wiedmann (1975) durch die Bestimmung von Kavitationsfeldern mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, das bei Kavitation dehydriert und sich rot färbt, bestätigt. Außerdem tritt die Strömungskavitation erst ab einer bestimmten Geschwindigkeit auf, was einen sprunghaftigen Zerkleinerungseffekt der Moose produzieren sollte. Wie in den nächsten Sektionen zu sehen ist, gibt es kein solches Muster bei den Zerkleinerungsversuchen.

Prall-Schlag

Beim Austritt aus dem Rotorkanal wird die Flüssigkeitsströmung abgebremst, bevor sie mit der Tangentialgeschwindigkeit Null in einen Statorkanal eintritt. Ein Teilchen wie die

Moosfäden, dessen Dichte größer als die des Trägermediums ist, folgt aufgrund seiner Trägheit nicht dem Stromlinienverlauf. Es widersetzt sich also dem Abbremsvorgang und könnte theoretisch auf einen Statorzahn aufprallen. Das Aufprallen von Moosagglomeraten gegen die inneren Wände des Stators produziert hauptsächlich eine Beschädigung der oberflächlichen Zellen und kaum eine Änderung der Größe der Moose. Da die Moosbuds bevorzugt aus dem Kern der Moospellets entstehen (siehe Abbildung 6.3C), wirkt ein Zerkleinerungsmechanismus, der auf Prall und Schlag basiert, energetisch ineffizient und äußerst schädlich auf die Zellen.

Im für einen Aufprall günstigsten hypothetischen Fall besitzen die kaum abgebremsten, dispergierten Teilchen eine Rotorumfangsgeschwindigkeit von ca. 20 m s^{-1} . Ein in der Größenordnung der Moosfäden liegendes Teilchen von $500 \text{ }\mu\text{m}$ mit der genannten Geschwindigkeit kommt nach Rumpf in Luft nach ca. 2000 mm zum Stillstand. Das 1000-mal kleinere Dichteverhältnis in Wasser verkürzt den Flugweg auf 2 mm . Die Zähigkeit von Wasser bewirkt eine geringere Beschleunigung und eine schnellere Abbremsung des Teilchens relativ zum umgebenden Medium. Folglich muss nicht einmal mit der Berührung eines Statorzahns gerechnet werden (Rumpf, 1959).

Schub- und Normalspannung

Da Kavitation, Prall und Schlag für den Zerkleinerungseffekt von Rotor-Stator Maschinen nicht entscheidend sind, bleiben noch die vom umgebenden Medium auf die Teilchenoberfläche wirkenden Schub- und Normalspannungen zu betrachten. Diese beiden örtlichen Spannungen erzeugen den Strömungswiderstand und wirken somit als Störungen auf die vorherrschende Couetteströmung. Folglich könnten sie die Teilchen beanspruchen und zerkleinern.

Die Couetteströmung wird erzeugt, indem sich der Rotor im größeren Stator dreht und dadurch die Flüssigkeit in Bewegung versetzt. Die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit im Scherspalt nimmt von der Innenseite nach außen hin ab (siehe Abbildung 6.7). Deshalb wirkt auf die Flüssigkeitsteilchen der inneren Bahnen eine größere Zentrifugalkraft als auf die der äußeren Bahnen. Es entsteht eine instabile Schichtung. Die Zentrifugalkraft ist aber erst bei einer bestimmten, kritischen Drehzahl groß genug, um den Strömungswiderstand der Flüssigkeit zu überwinden. Das führt zur Ausbildung von Wirbeln. Dabei wird die Couetteströmung durch eine radiale Strömung überlagert, so dass spiralförmige Wirbel, so genannte Taylor-Wirbel, entstehen. Wegen der Viskosität der Flüssigkeit werden benachbarte Schichten mitgezogen und es entsteht ein zweiter Ringwirbel mit entgegengesetzter Rotationsrichtung. So wird nach und nach der ganze Raum mit Wirbeln im entgegengesetzten Drehsinn ausgefüllt, es entsteht also eine hochturbulente Couetteströmung.

Für eine Rotor-Stator Dispergiermaschine mit einer Scherspaltweite s von $0,7 \text{ mm}$ ergibt sich nach Wiedmann (1975) eine hochturbulente Couetteströmung mit der Spaltreynoldszahl:

$$\text{Re}_s = \frac{v_x \cdot s}{2 \cdot \nu} \approx 10^4 \quad (6.1)$$

mit einer mittleren tangentialen Strömungsgeschwindigkeit im Spalt $v_x/2$ von 15 m s^{-1} und einer kinematischen Viskosität für Wasser ν von $10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Auch für höhere Viskositäten als für Wasser sind laut Wiedmann (1975) rein turbulente Strömungen zu erwarten, da die Couetteströmung, wie bereits erwähnt, ständig durch eine ebenfalls turbulente Radialströmung überlagert wird.

Nach Reichardt gilt für reine Couetteströmungen die Annahme, dass die ohnehin geringfügige Abhängigkeit des maximalen Geschwindigkeitsgradienten von der Spaltreynoldszahl bei einem hohen Turbulenzgrad, wie er in Rotor-Stator Maschinen vorliegt, verschwindet (Reichardt, 1974). Dieser Geschwindigkeitsgradient wird im turbulenten Scherspalt zwischen den Tangentialflächen der Rotor- und Statorzähne erzeugt. Reichardts Annahme wurde von Wiedmann experimentell durch die Abhängigkeit der spezifischen Phasengrenzfläche (a) von der Drehzahl (N) bestätigt. Demnach dürfte auch die Scherspaltweite (s) den Zerkleinerungseffekt nicht beeinflussen, sofern s größer als die Moose ist.

Verantwortlich für die Zerkleinerungswirkung durch das umgebende Medium müssen folglich die erwähnten, den Strömungswiderstand erzeugenden turbulenten Spannungen sein. Die Ursachen für die Zerkleinerungswirkung können mittels einer Impulsbilanz ausführlich dargestellt werden (Wiedmann, 1975).

Betrachtet werden soll ein rechtwinkliges xyz -Koordinatensystem mit den Geschwindigkeiten v_x in Umfangsrichtung, v_y in radialer Richtung und v_z in axialer Richtung:

Die Hauptbeanspruchung wird am Scherspalteneintritt angenommen, hier liegt der Koordinatenursprung. Es werden nur die Bewegungsgleichungen für die xy -Ebene in Umfangsrichtung angegeben, da keine mittlere Axialgeschwindigkeit, sondern nur ein mittlerer radialer Gradient auftritt. Das Newtonsche Aktionsprinzip besagt, dass die Impulsänderung eines Volumenelements gleich der Summe der eingepprägten Kräfte ist. Für inkompressible Newtonsche Flüssigkeiten führt das zu den Bewegungsgleichungen von Navier-Stokes, wobei ein Volumenelement sowohl durch äußere Volumenkräfte wie die Erdanziehungskraft, als auch durch Kräfte aus Druck- und viskosen Spannungen beschleunigt wird.

Bei einer formalen Zerlegung der momentanen Drücke und Geschwindigkeiten in die mittleren und die Schwankungskomponenten, treten in den Bewegungsgleichungen die Reynolds'schen Scheinspannungen $-\rho \cdot \overline{v_x'^2}$ (turbulente Normalspannung) oder $-\rho \cdot \overline{v_x' \cdot v_y'}$ (turbulente Schubspannung) auf.

Diese beiden genannten Größen sind mittlere Schwankungsgrößen und charakterisieren den intensiven dreidimensionalen Impulsaustausch in turbulenten Strömungen. Zudem nimmt Wiedmann (1975) an, dass sie den viskosen Spannungen überlagert sind und diese außerhalb extremer Wandnähe bei weitem überwiegen. Damit erhält man die x -Komponente der allgemeinen Reynolds'schen Gleichung. Sie stellt die Kräfteverhältnisse beim Eintritt in den turbulenten Scherspalt dar:

$$\rho \cdot \left(\frac{\partial \overline{v_x}}{\partial t} + \overline{v_x} \cdot \frac{\partial \overline{v_x}}{\partial x} + \overline{v_y} \cdot \frac{\partial \overline{v_x}}{\partial y} \right) = -\frac{\partial \overline{p}}{\partial x} + \mu \cdot \left(\frac{\partial^2 \overline{v_x}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \overline{v_x}}{\partial y^2} \right) - \rho \cdot \left(\frac{\partial \overline{v_x'^2}}{\partial x} + \frac{\partial \overline{v_x' \cdot v_y'}}{\partial y} \right) + \rho \cdot g \quad (6.2)$$

Als Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Gleichung für heterogene Systeme, wie die verwendete Moossuspension, werden folgende Annahmen getroffen:

- Das Medium liegt ausreichend dispers vor und verhält sich somit quasihomogen.
- Die Betriebsweise ist stationär, deshalb entfallen die Ausdrücke:

mittlere lokale Beschleunigung $\frac{\partial \overline{v_x}}{\partial t}$

mittlerer tangentialer Druckgradient am Scherspalt $-\frac{\partial \bar{p}}{\partial x}$

viskose Schubspannungen $\mu \cdot \left(\frac{\partial \bar{v}_x}{\partial x} + \frac{\partial \bar{v}_y}{\partial y} \right)$, da sie, wie bereits erwähnt, von den Reynolds'schen Scheinspannungen überwogen werden

Volumenkraftdichte $\rho \cdot g$ aus Gravitation oder Zentrifugalbeschleunigung.

Damit vereinfacht sich Gleichung (6.2) zu der Aussage, dass die beim Scherspalteneintritt auftretende mittlere konvektive Impulsänderung $\bar{\dot{I}}_x$ eines Volumenelements V gleich der darauf einwirkenden Kraft \bar{K}_x aus Reynolds'schen Scheinspannungen ist:

$$\frac{\bar{\dot{I}}_x}{V} = \rho \cdot \bar{v}_y \cdot \frac{\partial \bar{v}_x}{\partial y} = -\rho \cdot \left(\frac{\partial \bar{v}_x^2}{\partial x} + \frac{\partial \bar{v}_x \cdot \bar{v}_y}{\partial y} \right) = \frac{\bar{K}_x}{V} \quad (6.3)$$

Diese Kraft \bar{K}_x verursacht den Zerkleinerungseffekt (Wiedmann, 1975).

6.3.2 Vergleich der Zerkleinerungswirkung zwischen Rotor-Stator Maschinen und Propellern

Der häufig für die Zerkleinerung von Moosen oder fädigen Organismen benutzte hoctourige Rührer (z.B. mit Propellerrührblättern) (Hohe und Reski, 2002) wird mit einem Rotor-Stator-Zerkleinerer nach Wiedmann (1975) verglichen.

Ein Rührer erzeugt großvolumige, in einem weiten Raum zerfallende Wirbel. Dabei beanspruchen sekundär gebildete kleinere Wirbel die Zellen. Aus dem Quotienten der Turbulenzleistung (P_{turb}) und dem Flüssigkeitsvolumen lässt sich eine mittlere turbulente Leistungsdichte (ε) berechnen, die mit der 3. Potenz der Drehzahl (N) zunimmt. Für die spezifische Phasengrenzfläche (a) führt dies zu der Proportionalität:

$$a \sim \varepsilon^{0,4} \sim N^{1,2} \sim P_{turb}^{0,4} \quad (6.4)$$

Dagegen erzeugt ein Rotor-Stator auf engem, sehr begrenztem Raum das zum Zerkleinern benötigte Wirbelspektrum. Die Tangential- und Radialgeschwindigkeiten am Scherspalteneintritt sind der Drehzahl direkt proportional. Es gilt die Beziehung, dass die am Scherspalt herrschende örtliche turbulente Leistungsdichte der 4. Potenz der Drehzahl proportional ist. Folglich wächst die spezifische Phasengrenzfläche gegenüber einem normalen Rührer rascher mit der Drehzahl:

$$a \sim \varepsilon^{0,4} \sim N^{1,6} \sim P_{turb}^{8/15} \quad (6.5)$$

Sowohl für den normalen Rührer, als auch für eine Dispergiermaschine gilt für die insgesamt verbrauchte Turbulenzleistung die Proportionalität:

$$P_{turb} \sim N^3 \quad (6.6)$$

Da die örtliche Leistungsdichte (Rotor-Stator) schneller wächst als die mittlere (Rührer), ergibt sich bei dem ersten auch eine mit der Drehzahl zunehmende Leistungskonzentration. Der Zerkleinerungsgrad wird verbessert und die investierte Leistung besser genutzt. Das

bedeutet einen energetischen Vorteil des Turrax Systems, der sich auch in den Operationskosten widerspiegelt.

Der oben aufgeführte Vergleich zwischen einem Turrax System und einem hochtourigen Rührer lässt die Vermutung zu, dass die Zerkleinerung mit dem Turrax wesentlich gezielter abläuft. Die experimentelle Überprüfung dieser Annahme folgt im nächsten Abschnitt.

6.3.3 Optimierung der Mooszerkleinerung

Die Abbildung 6.8 illustriert die Zerkleinerung von Moosen in Suspension vergleichend zwischen einer Rotor-Stator Maschine und einem Propeller nach einer Minute Behandlung. Bei einer Drehzahl von 3000 rpm generiert der Propeller nicht homogene Stressvektoren und die Moosfilamente erfahren hohe Zellschädigung (siehe Abbildung 6.8A). Bei dem Rotor-Stator Zerkleinerer (22000 rpm, 0,25 mm Spalte zwischen Rotor und Stator, 8 Statorzähne) wird der mechanische Stress durch die Überlappung zweier Strömungsgeschwindigkeit-Gradienten fokussiert und darum wird ein scharfer Schnitt der Moosagglomerate erzielt (siehe Abbildung 6.8B). Die Anwendung von Rührgeräten zur Zerkleinerung von *Physcomitrella patens* Protonema führt zu intensivem Zellaufschluss und erweist sich, genau wie die theoretischen Beschreibungen im Abschnitt 6.6.1 darstellen, als ungeeignet für den Kultivierungszweck.

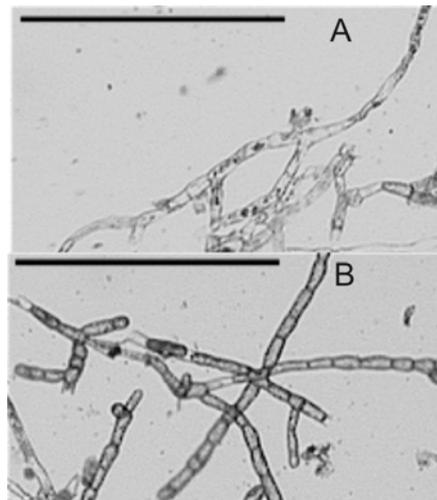


Abb. 6.8: Effekt der mechanischen Zerkleinerung von protonemalen Suspensionen von *Physcomitrella patens* ($0,20 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1}$) nach 1 Minute Behandlung. (A) 25 mm Durchmesser Propellerrührer bei 3000 rpm. (B) Batch Rotor-Stator, Konfiguration 1 (Spalte zwischen Rotor und Stator: 0,25 mm; Zahl an Statorzähne: 8; 22000 rpm). Vergleich zwischen zufälliger Zellschädigung und fokussierter Zerkleinerung. Bar: 500 μm

Verschiedene geometrische Konfigurationen von Rotor-Stator Maschinen und Behandlungszeiten werden getestet, um den Effekt der Zerkleinerung auf den Zellstress zu überprüfen. Darüber hinaus wird der Gehalt an freien Pigmenten im Suspensionsüberstand als Indikator der Intensität der Zerkleinerung quantifiziert (siehe Abbildung 6.9). Die Erhöhung der Drehzahl des Rotors führt zu einem nicht direkt proportionalen Anstieg der Zellschädigung. Außerdem spielen die geometrische Konfiguration des Rotor-Stators und die Zerkleinerungszeit wichtige Rollen für die Effizienz der Operation. Die Konfiguration 1 ruft eine intensive Zerkleinerung der Moose hervor, wobei 15 % mehr freie Pigmente detektiert

werden als bei der Konfigurationen 2 und 3. Dennoch ist die Reduktion der Größe von Moosagglomeraten mit der Konfigurationen 2 und 3 nicht ausreichend. Der beste Kompromiss zwischen Zellschädigung und Reduktion der Größe von *Physcomitrella patens* aus den Biosuspensionen wird mit der Konfiguration 1 nach 1 Minute Behandlung erreicht (Abbildung 6.10).

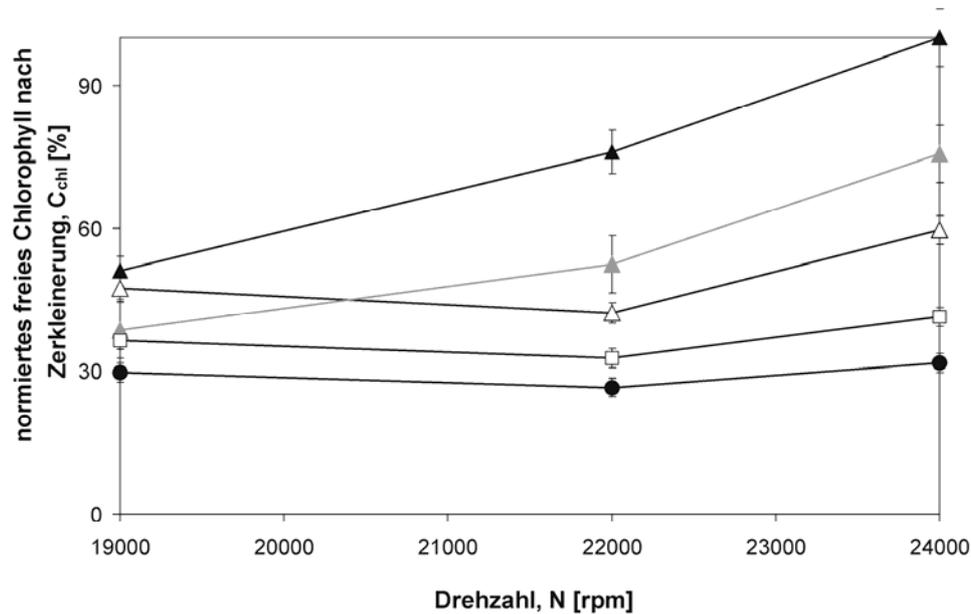


Abb. 6.9: Evaluation der Zellschädigung von *Physcomitrella patens* in Suspension ($0,20 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1}$) nach der Zerkleinerung mit Rotor-Stator Maschinen. Die normierte Konzentration an freien Moospigmenten nach der Zerkleinerung wird über die Drehzahl des Rotor-Stators aufgetragen. Drei geometrische Konfigurationen des Rotor-Stators: Spalte zwischen Rotor und Stator, Zahl an Statorzähnen, sowie Behandlungszeiten werden getestet. Konfiguration 1 (0,25 mm; 8; 1 min (Δ), 2 min (▲) and 3 min (▲), Konfiguration 2 (□) (0,30 mm; 10; 1min) und Konfiguration 3 (●) (0,50 mm, 12; 1 min)

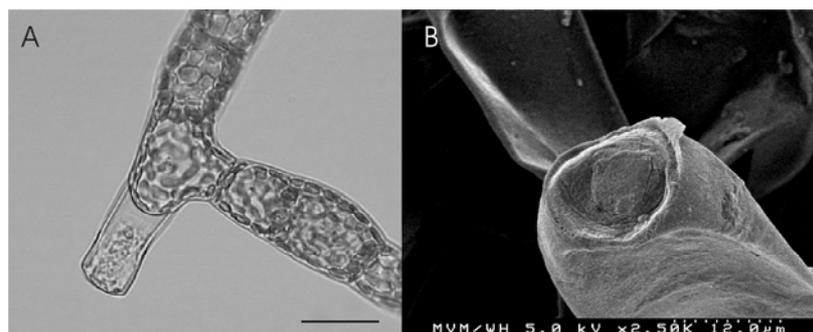


Abb. 6.10: Fokussierte Mooszerkleinerung basiert auf den Prinzip des Rotor-Stators. Mikroskopische Aufnahme (A) und REM (B) eines geschnittenen Protonema von *Physcomitrella patens* nach einer Minute Behandlung bei 24000 rpm mit der Rotor-Stator, Konfiguration 1 (siehe Abbildung 6.9). Nach der Zerkleinerung wird Zellregeneration beobachtet (A). Bar. $24 \mu\text{m}$

Die Verweilzeit eines Moosfilaments im Rotor-Stator wird als Parameter für den Scale-Up der Zerkleinerung während der *inline* Operation am 30 L Pilot-Photo-Bioreaktor benutzt. Da

sich die Zerkleinerung der Moose mit dem Rotor-Stator in einem breiten Drehzahlbereich mittels der empirischen Gleichungen von Widmann, (1975) beschreiben lässt, ist die weitere Feineinstellung der Zerkleinerungsbedingungen für den Pilotmaßstab einfacher.

6.3.4 Inline Zerkleinerung der Moose und ihre Effekte

Um die Moosagglomerate am Pilot-Photo-Bioreaktor axenisch zu zerkleinern, wird ein sterilisierbares Rotor-Stator Gerät (Ultra-Turrax[®], 0,5 mm Spalte zwischen Rotor und Stator, 12 Stator Zähne) angewandt. Die Moossuspension wird in den Ultra-Turrax[®] geleitet und danach in den Reaktor zurückgeführt. Die Zerkleinerungszeit im Reaktor wird mit Hilfe der Netto-Verweilzeit der Zellen (t_z) im Rotor-Stator bei einer Drehzahl (N) definiert (siehe 6.3.1). Die nötige Verweilzeit der Moose im Zerkleinerungsgerät ist abhängig von der Konzentration der Biomasse (c_x) in der Biosuspension.

Die Form der Moose beeinflusst die Effizienz des Zerkleinerungsvorgangs. Darüber hinaus muss vor und nach der Behandlung eine Charakterisierung der Moose durch morphologische Parameter (F_i) wie z.B. der Fädengröße, durchgeführt werden. Dieser Aspekt wird in der folgenden Sektion (6.3.5) diskutiert.

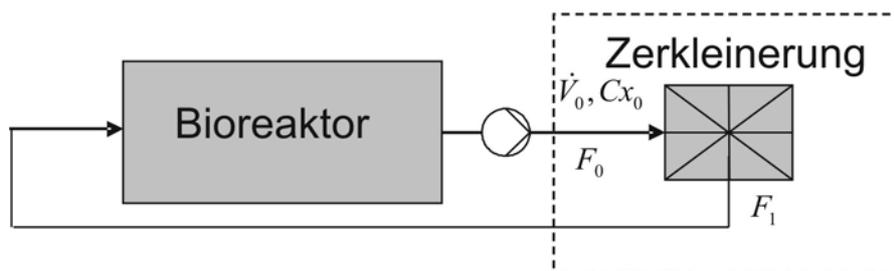


Abb. 6.11. Inline Zerkleinerung. Die Biosuspension fließt mit einer bestimmten Konzentration (c_{x_0}) und mit einem Volumenstrom (\dot{V}_0) durch den Ultra-Turrax[®] und wird nach der Zerkleinerung mit einem neuen Formfaktor (F_{i1}) in den Reaktor zurückgeführt

Der Einfluss der Zerkleinerung auf die Moosdifferenzierung und die Kohlenstofffixierung wird in Batchkultivierungen von *Physcomitrella patens* im 30 L Photo-Bioreaktor bei einer mittleren Geschwindigkeit der Suspension von $0,70 \text{ m s}^{-1}$ überprüft (siehe Abbildung 6.11).

In den Kultivierungen ohne Beeinflussung der Morphologie besteht das Lichtregime bis zum 4. Kultivierungstag aus einer LL Phase, und einer darauf folgenden LD 16/8 Phase bis zum Kultivierungsende (Abbildung 6.12A). Die gemessene PFD an der externen Seite des Reaktors beträgt $84,1 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Die exponentielle Wachstumsphase dauert ca. 12 Tage, wobei Werte von μ bis zu $0,56 \text{ d}^{-1}$ erreicht werden. Bei ca. $0,8 \text{ g l}^{-1}$ wird der Effekt der Zellabschattung durch den Übergang zu einem linearen Wachstumsmuster und die Reduktion der CO_2 -Fixierung ersichtlich. Genauso wie in früheren Batches wird eine schnelle Variation der Moosform binnen weniger Tage von kleinen chloronemalen Filamenten bis hin zu großen Agglomeraten beobachtet. Weiterhin entwickeln sich *Physcomitrella patens* Pellets mit losen Kernen. Hier erhöht sich der caulonemale Anteil. Die ersten Gametophoren entstehen bei einer Biomasse von $0,28 \text{ g l}^{-1}$ hauptsächlich aus den Kernen von Moospellets. Für die Identifikation der Buds ist es nötig,

eine Sezierung der Pelletkerne durchzuführen. Der gemessene Durchmesser der Moospellets bevor die Gametophoren auftreten liegt um die 500 μm . In der letzten Phase der Kultivierungen liegen alle Moose als junge Gametophoren mit vielen Blättern (ca. ab $0,8 \text{ g l}^{-1}$) vor.

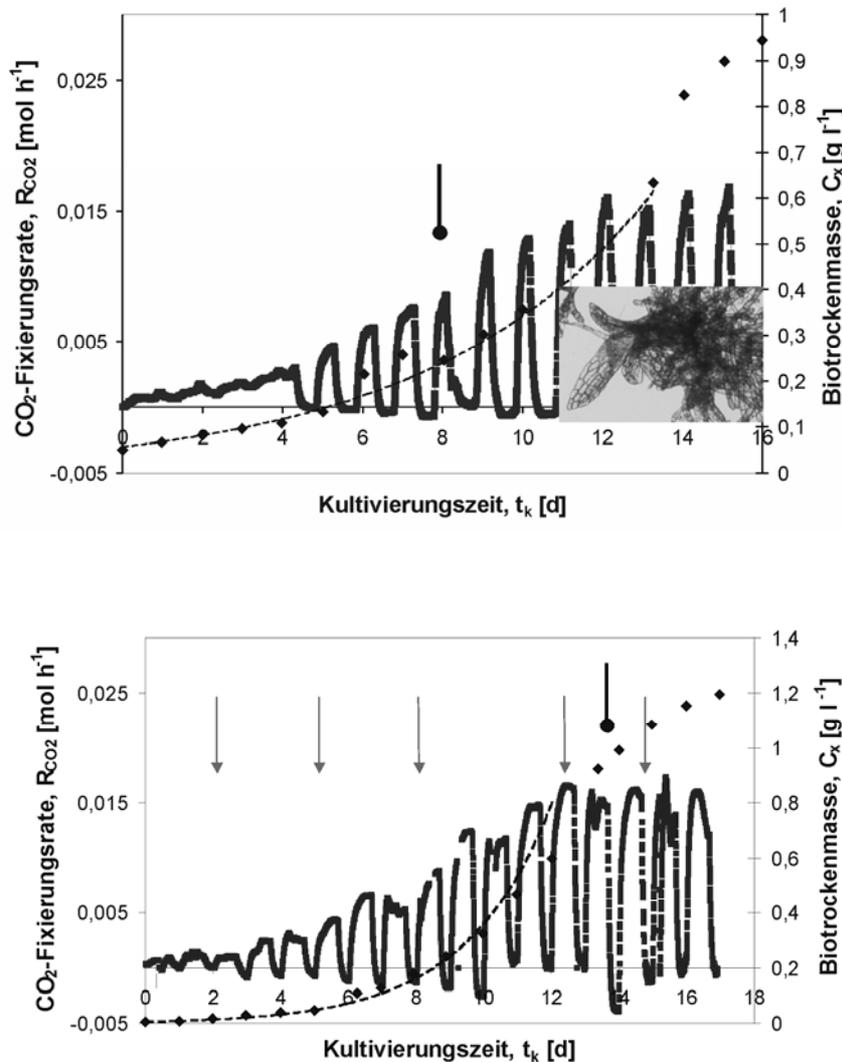


Abb. 6.12: Batchkultivierungen von *Physcomitrella patens* in einem 30 L Pilot-Photo-Bioreaktor zur Untersuchung der Rolle der Zerkleinerung auf die Differenzierung. Bedingungen: Temperatur $21,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$; pH $5,8 \pm 0,05$; Begasung $0,4 \text{ l min}^{-1}$, CO₂-Konzentration in der Begasung 1,75 % (v/v); u $0,70 \text{ m s}^{-1}$. Kurven: Biotrockenmasse (\blacklozenge) und Kohlendioxid-Fixierung (—). (A) Ab dem 7. Kultivierungstag (Schwarze Marke) werden junge Gametophoren aus dem Kern von Moospellets detektiert (Bild). (B) Kultivierung mit *in line* Mooszerkleinerung. Die Pfeile zeigen die Frequenz der Zerkleinerung mit dem Rotor-Stator. Verzögerung bei der Entstehung von Moosblättern bis zum 13. Kultivierungstag bzw. $0,9 \text{ g l}^{-1}$

Die Batches mit *in line* Zerkleinerung der Moose werden bei ähnlichen Bedingungen wie oben genannt durchgeführt (Abbildung 6.12B). Die Kontrolle der Größe der Moose mittels des Rotor-Stators wird an den Kultivierungstagen 2, 5, 8, 12 und 14 bei den Zerkleinerungsbedingungen aus den *offline* Versuchen vorgenommen. Die Zerkleinerungszeit während der Kultivierung beträgt nur Minuten und ist dementsprechend vernachlässigbar

verglichen mit der gesamten Kultivierungszeit. Ferner wird kein Unterschied in der Kohlenstofffixierungsrate zwischen zerkleinerten und nicht zerkleinerten Moosen beobachtet, beide variieren um die 30-50 mg g⁻¹ h⁻¹. Dennoch ist eine deutliche Verzögerung der Differenzierung bei zerkleinerten Moosen bemerkbar und die ersten Gametophoren entstehen am 13. Kultivierungstag bei einer Biomassekonzentration von 0,9 g l⁻¹. Eine weitere Zerkleinerung von Gametophoren oder pelletartigen Moosen konnte jedoch nicht durchgeführt werden, ohne dass die Protonema sehr beschädigt wurden. Trotzdem bleibt der Anteil an Gametophoren in der Suspension nahezu konstant bis zum Kultivierungsende, etwa 1 % (w/w), was viel weniger ist als bei nicht zerkleinerten Moosbiosuspensionen.

Die letzten Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, dass manche Differenzierungs- und Wachstumsereignisse von der Moosgröße abhängen, wie z.B. die Variation der Expressionsmuster von Auxinen und Cytokinen nach der Entfernung einiger Zellen aus *Physcomitrella patens* Filamenten (Knoop, 1984; Cove and Ashton, 1984). Obwohl sich eine totale Hemmung der Differenzierung der Moose nicht nur mit der mechanischen Zerkleinerung erreichen lässt, ist sie sehr effektiv um die Homogenität der Suspension zu erhöhen und die Transporteigenschaften der Biosuspension zu verbessern. Wenn die Zugabe von fremden Phytohormonantagonisten ungewünscht ist, da z.B. Schwierigkeiten bei weiteren Aufreinigungsschritten von Zielproteinen auftreten, kann der kombinierte Effekt der Mooszerkleinerung und der Entfernung oder Verdünnung der Mooshormone hilfreich für die Verzögerung der Differenzierung in Kultivierungen sein (Hohe and Reski, 2002). Diese Aspekte werden im Abschnitt 6.4 im Detail behandelt.

6.3.5 Quantifizierung der Zellmorphologie. Bildverarbeitung

Da das Wachstum, die Produktbildung und die rheologischen Eigenschaften der Suspension durch die Formen und metabolischen Zustände der Moose in der Kultivierung beeinflusst werden, ist eine Charakterisierung der Morphologie für eine geeignete Prozesssteuerung notwendig. Der Gehalt an Pigmenten und Proteinen, und die Photosyntheseaktivität sind kaum mit den morphologischen Änderungen der Moose korrelierbar. Bisher wurden Flow-Cytometrische Methoden angewendet, um die Differenzierung zu quantifizieren (Hohe et al, 2002). Leider ist diese Technik nicht einfach *online* einzustellen und ihre Ergebnisse liefern keine Aussagen über wertvolle phenotypische Parameter der Fäden wie Länge und Verzweigung.

Durch die Bildverarbeitung von mikroskopischen Aufnahmen können Aussagen über die Biomasse in der Suspension, die Verteilung der Zellzustände und die Form von filamentösen Organismen erhalten werden (Treskatis, 1996; Pons, 1999). Im Fall der filamentösen Photoautotrophen (z.B. das Moos *Physcomitrella patens*) muss ebenfalls eine Bearbeitung der Aufnahmen (*acquisition, filtering, cleaning*) zur Bestimmung von morphologischen Parametern ermittelt werden. Damit können u.a. Aussagen über die Variation der Moosmorphologie in Kultivierung (einzelne Fäden, Netze, Klumpen, Pellets) quantifiziert werden. Darüber hinaus können morphologische Veränderungen der Moose je nach Variation der Kultivierungsbedingungen (e.g. Lichtintensität- und Qualität, CO₂-Zugabe) eng korreliert werden. Ein mit den Formparametern gefütterter Regelungskreis könnte die Morphologie mittels eines steuerbaren Zerkleinerungsgerätes und/oder eines Perfusionssystems kontrollieren.

Bisher ist die Beschreibung der morphologischen Veränderungen der Moose in Suspensionskultivierung nur qualitativ dargestellt (Schumaker, 1997). Im Bereich

Bildverarbeitung von filamentösen Organismen sind Strategien für die Bestimmung von Formparametern und Biomasse untersucht worden. Dennoch existiert kein Modell, welches die Morphologie, die Differenzierung und die Wachstumskinetik in Kultivierung beschreibt.

Bildverarbeitungsalgorithmus

Die üblichen Schritte einer Bildverarbeitungsstrategie sind von Pons und Vivier, (1999) zusammengefasst worden und werden in der Abbildung 6.13 illustriert. Die Bildverarbeitung beginnt mit der Konversion von Farbbildern in *grey level* Bildern, die dann u.a. binarisiert, segmentiert, filtriert und „*labeled*“ werden. Dennoch ist die finale Form der Algorithmen immer von der Anforderung des Prozesses abhängig.

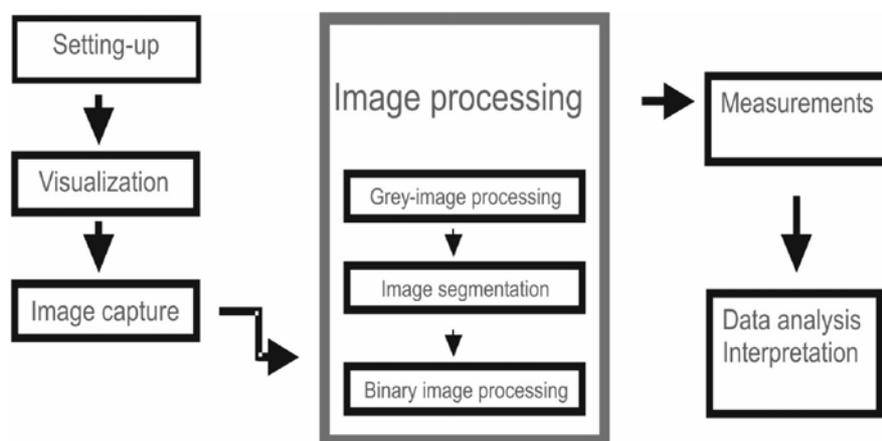


Abb. 6.13: Grundschrte der Bildverarbeitung mikroskopischer Aufnahmen (Pons und Vivier, 1999)

Ein Algorithmus für die Analyse filamentöser Organismen wird mit Hilfe der Bildverarbeitungsplattform Visilog 5.4. und 6.1 (Noésis, Les Ulis, Frankreich) auf die Besonderheiten der Moose angepasst (Pons et al., 1998). Jedes Bild wird zuerst segmentiert, um die Biomasse zu identifizieren. Hier wird eine logische Kombination binärer Bilder aus einem Entropiealgorithmus (für unbeschädigte Filamente und Moosagglomerate) und aus einem *top-hat* Algorithmus (für die Detektion der Zellmembranen bei beschädigten Zellen) durchgeführt (Russ, 1995) (siehe Abbildung 6.14). Ein *1-iteration closing* wird angewandt, um kleine leere Stellen der Filamente zu füllen, ohne dass Interstizien von z.B. Moosagglomeraten maskiert werden. Objekte, die kleiner als eine bestimmte Oberfläche sind, werden als *Debris* entfernt und dann als solche charakterisiert. Daraus resultiert ein binäres Bild B, wobei jedes Objekt davon ein *label* besitzt und unabhängig weiterbearbeitet werden kann.

Die Anwesenheit von Agglomeraten wird mit einem *15-iteration linear thinning* detektiert, wobei die filamentöse Komponente jedes Objekts eliminiert wird. Der restliche Teil ist der Kern des Bildes (Bild C) und seine Größe (*core_size*) wird mit dem maximalen Wert seines Euklidischen *distance map* evaluiert. Der filamentöse Teil (Bild F) wird als logische Differenz zwischen den Bildern B und C erhalten. Für die Bestimmung ihrer Länge (*L_F*) werden die Filamente skelettiert und beschnitten, so dass kleinere Elemente als 10 Pixels, die als noise zu betrachten sind, ebenfalls eliminiert werden. Dann wird die Anzahl an Filament Tips (*N_{tip}*)

kalkuliert.

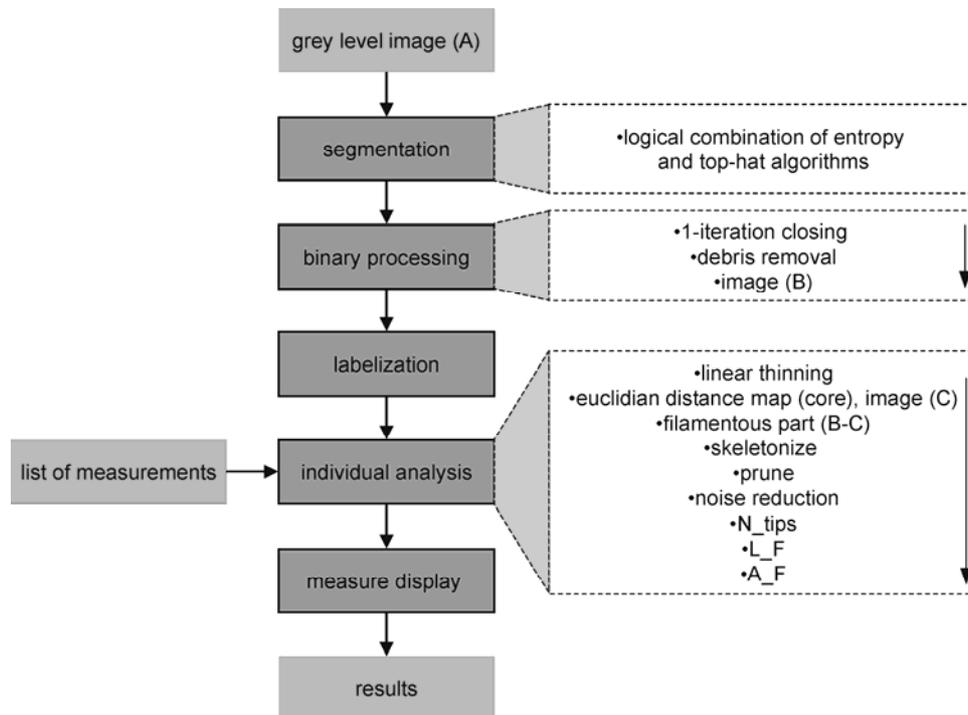


Abb. 6.14: Darstellung des Algorithmus zur Bildverarbeitung von *Physcomitrella patens*

Der auf der Oberfläche basierende *hyphal growth unit* (HGU_A) wird als $A_F Ntip^{-1}$ berechnet, wobei A_F die projizierte Oberfläche der Filamente darstellt. Der auf der Länge basierte *hyphal growth unit* (HGU_L) wird dementsprechend als $L_F Ntip^{-1}$ definiert. Die filamentöse Fraktion wird als das Verhältnis zwischen A_F und der totalen projizierten Oberfläche des betrachteten Objektes kalkuliert.

Aufnahmen mit wenig Vergrößerung können benutzt werden, um allgemeine morphologische Parameter, die das Erscheinungsbild der Moose beschreiben, zu ermitteln. So können Algorithmus-Subroutinen zur Klassifizierung der Moose in Filamente, Fäden, Aggregate, Agglomerate, Pellets und zur Detektion von Gametophoren eingeführt werden. Aufnahmen mit höherer Vergrößerung können Informationen über die Länge einzelner Zellen, das Verhältnis zwischen Zellstadien und ihren Pigmentgehalt bringen. Mit einer hohen Vergrößerung können keine Daten des Mooses als Organismus extrahiert werden, aber Details über den Zustand der Zellwand sowie die Anzahl und Form der Chloroplasten ermittelt werden. Die zuverlässige Bestimmung morphologischer Parameter setzt dennoch eine sehr intensive Probenahme voraus, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten (Pons und Vivier, 1999).

6.3.6 Anwendung der Bildverarbeitung in Kultivierung

Physcomitrella patens wird aus Proben der Kultivierungen im Pilot-Photo-Bioreaktor, wie beschrieben in 6.3.4, steril gesammelt und dann mit einer zu einem Lichtmikroskop verbundenen CCD Kamera aufgenommen. Die Grundverarbeitung der Moosaufnahmen wird anhand der Abbildung 6.15 dargestellt. In der Abbildung 6.16 werden beispielsweise zwei

Moose verglichen, die trotz der ähnlichen Größe einen unterschiedlichen Verzweigungsgrad (HGU_L) besitzen. Die Sensibilität des errechneten Parameters erlaubt eine gute Auflösung der hier betrachteten Eigenschaft Moosverzweigung.

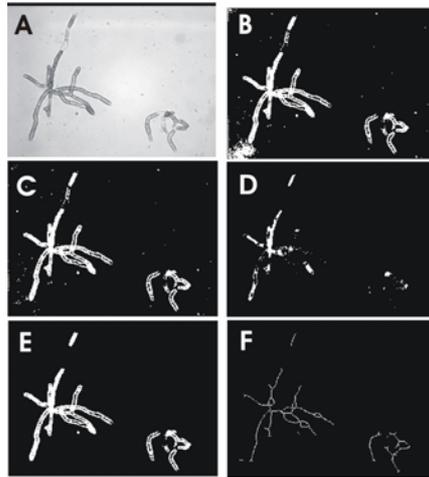


Abb. 6.15: Verarbeitung von grey level Bildern von *Physcomitrella patens*. (A) Grey level Bild. (B) Binarisierung. (C) Border kill. (D) Erosion. (E) Reconstruction. (F) Skelettierung

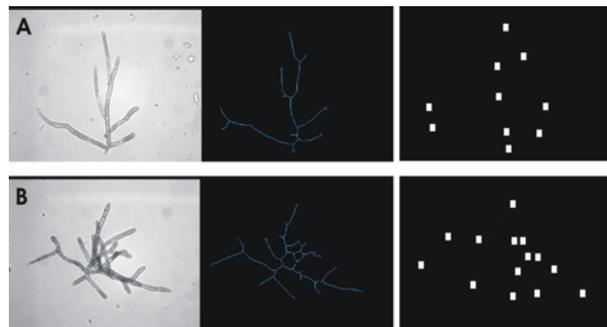


Abb. 6.16: Charakterisierung des Verzweigungsgrads von *Physcomitrella patens* durch die Parameter HGU_A und HGU_L . Bild (B) zeigt niedrigen HGU_L und hohe Verzweigung verglichen mit (A). Originale grey level Bilder, Skelettierungen zur Bestimmung von L_F und Tips sind dargestellt

Zusätzliche Routinen können zum Algorithmus hinzugefügt werden, um die Farbprofile der Moose für die Quantifikation des Pigmentgehalts oder die Detektion von leeren Zellen zu ermitteln. Die Anwendung von *grey level* Bildern für diesen Zweck kann den rechnerischen Aufwand erheblich senken. Hauptvoraussetzung hierfür ist eine akzeptable Korrelation zwischen dem Pigmentsgehalt (z.B. Chlorophyll und Carotenoide) und einem ermittelten Grauskala.

Die *inline* Zerkleinerung im Reaktor kann mit der morphologischen Charakterisierung der Moose optimiert werden. In der Abbildung 6.17 wird die Wirkung des Rotor-Stators mit dem Zerkleinerungseffekt durch die Erhöhung der axialer Geschwindigkeit im Rohr-Photo-Bioreaktor auf $2,5 \text{ m s}^{-1}$ verglichen. Eine leichte und intensive Behandlung mit dem Rotor-

Stator wird bei 25.000 rpm durchgeführt, wobei die Verweilzeit der Moose im Ultra-Turrax® bei der leichten Behandlung nur halb so groß wie bei der intensiven ist. Die Variation der Filamentlänge, das Verhältnis Filament zu Pellet und die CO₂-Fixierungsrate vor und gleich nach der Zerkleinerung der Moose wird gemessen.

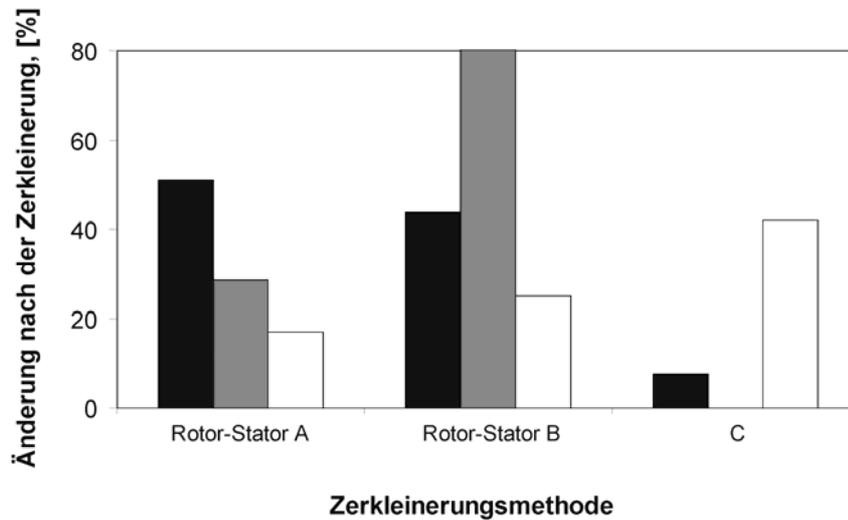


Abb. 6.17: Vergleich zwischen drei Zerkleinerungsmethoden für *Physcomitrella patens* in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Die Behandlung mit dem Rotor-Stator wird bei 25.000 rpm durchgeführt. Die Zerkleinerungszeit der leichten Methode (A) ist halb so groß wie bei der intensiven (B). Der Impakt-Versuch (C) wird bei einer axialen Geschwindigkeit der Suspension von $2,5 \text{ m s}^{-1}$ durchgeführt. Die Variation der Länge der Moose (■) und des Verhältnisses Filament/Pellet (▒) vor und nach der Zerkleinerung werden mittels Bildverarbeitung quantifiziert und mit der Änderung der spezifischen Kohlendioxid-Fixierungsrate (□) verglichen. c_x $0,5 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1}$

Daraus ergibt sich, dass die Energie für die Zerkleinerung der Moose mit den Rotor-Stator im Gegensatz zum Prallmechanismus optimal genutzt wird. Mit einer hohen axialen Geschwindigkeit wird kaum ein Effekt auf die Form der Moose hervorgerufen jedoch intensive Zellschädigung produziert. Die dargestellte Reduktion der Photosynthese nach der Zerkleinerung mit dem Rotor-Stator ist nicht irreversibel und die Kohlendioxid-Fixierungsrate kommt schon Minuten nach der Behandlung zu den Anfangswerten zurück, genauso wie bei den *Offline*-Versuchen.

Eine weitere Anwendung der Bildverarbeitung ist die Detektion von Gametophoren aus der Biosuspension. In der Abbildung 6.18 werden zwei Moose mit vergleichbaren Werten von Länge und Verzweigung gezeigt. Hier ist es möglich, mit Hilfe der Parameter *core_size* und den abgeleiteten Verhältnis Pellet zu Filament, die Gametophoren in früheren Stadien zu detektieren.

Moose aus den Kultivierungen in 6.3.4 werden anhand ihrer mittleren Länge und des Verhältnisses zwischen Filamenten und Pellets beschrieben. Ohne eine Steuerung der Morphologie weisen die Moose verschiedene Formen und Stadien während der Kultivierung auf (siehe Abbildung 6.19). Mit dem Einsatz von Rotor-Stator Zerkleinerern kann eine gewünschte Morphologie für die ganze Kultivierungsdauer erzielt werden. Daher kann eine Verzögerung der Entstehung von Gametophoren und eine Verbesserung der Homogenität der Suspension erreicht werden.

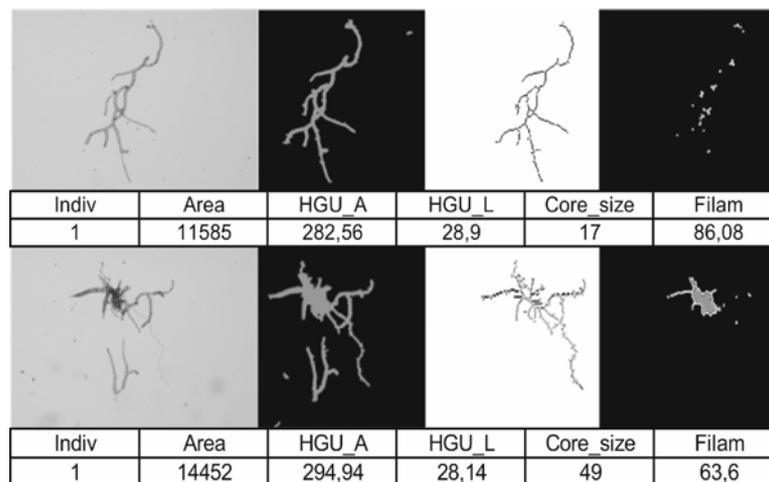


Abb. 6.18: Morphologische Parametrisierung zerkleinerter *Physcomitrella patens* Agglomerate mit einem Rotor-Stator in einer Batch Kultivierung im Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor zur Identifizierung von Gametophoren. Unten, junge Gametophoren (core size=49). Oben, Protonema (core size=17). Bilder: $1.297\mu\text{m} \cdot 1.014\mu\text{m}$

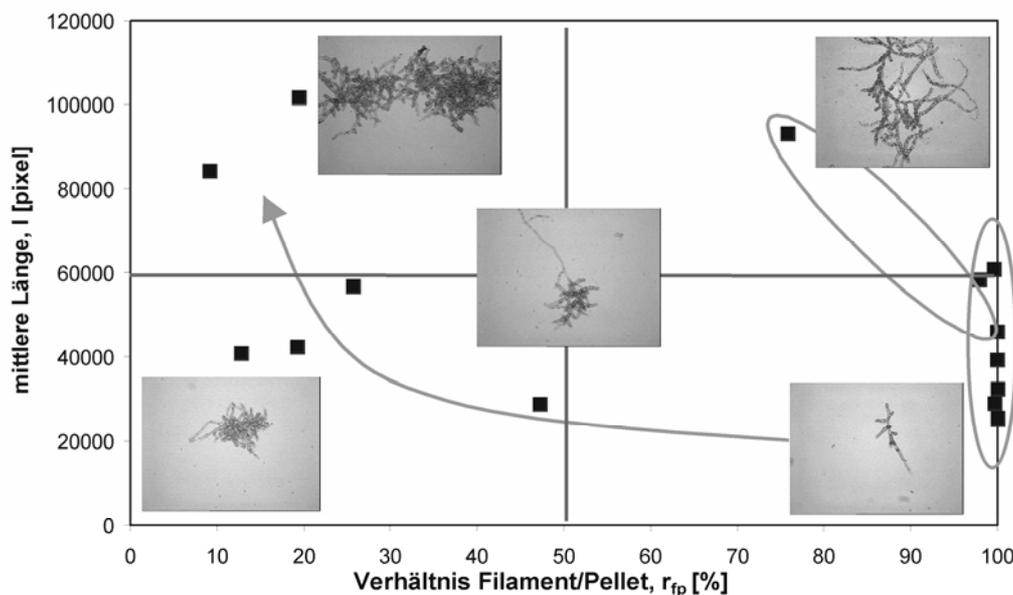


Abb. 6.19: Vergleich der morphologischen Änderung von *Physcomitrella patens* in Batches im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor mit und ohne mechanische Zerkleinerung der Moose. Der Pfeil zeigt die Variation der Form der Moose in einer Batchkultivierung ohne Zerkleinerung. Wenn gezielte Zerkleinerung der Moose mit Rotor-Stator Maschinen eingeführt wird, kann die Form der Moose beliebig bis zum Kultivierungsende kontrolliert werden (ovale Oberflächen). Die experimentellen Daten entsprechen der Analyse von 1.367 Moosen aus typischen Batches. Bilder: $1.297\mu\text{m} \cdot 1.014\mu\text{m}$

Populationsmodelle, die das Wachstum von filamentösen Organismen mit ausgewählten morphologischen Parametern wie der mittleren Fädenlänge oder *HGU* darstellen, konnten nicht für *Physcomitrella patens* angewandt werden. Mehrere solcher Modellen betrachten die Zelldifferenzierung nicht oder sind ungeeignet für photoautotrophes Wachstum (Metz und

Kossen, 1977).

Die Charakterisierung der Differenzierung durch Bildverarbeitungsmethoden kann möglicherweise auf andere filamentöse Organismen extrapoliert werden. Die Anwendung von einem Steuerungssystem, das erstmals auf die Morphologie bezogen ist, kann eine enge und bessere Kontrolle der Kultivierung gewährleisten und zu einem sicheren Scale-Up führen. Eine derartige Strategie kann später mit der Einführung von *in situ* Mikroskopen zu einem kompletten, nicht invasiven, automatisierten Überwachungs- und Regelungssystem erweitert werden (Treskatis et al., 1999; Frerichs et al., 2002). Der mögliche Zusammenhang zwischen Proteinexpression, Stabilität und der Morphologie in rekombinanten Stämmen muss jedoch noch tiefer untersucht werden.

6.4 Prozessführung

Die Definition kinetischer Messgrößen der Moose in Kultivierung ist eine Voraussetzung für ihre biotechnologische Nutzung im *molecular farming*. Aus den Ergebnissen vorangehender Sektionen dieser Arbeit wurde klar, dass die Vorteile von *Physcomitrella patens* als Expressionssystem besonders in langfristigen Kultivierungen mit kontinuierlicher Ernte der rekombinanten Proteine genutzt werden können. Wichtig für eine langfristige Kultivierung von Moosen in Suspension ist, dass die Moose soweit wie möglich in protonemalem Zustand bleiben. Gesunde und aktive Zellen mit vielen Chloroplasten (Chloronema) müssen den größten Anteil der Biosuspension darstellen. Alte und tote Zellen sind zu entfernen und die Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung fördern, müssen verdünnt, entfernt oder deaktiviert werden. Durch die Zugabe von CO₂, die Verdünnung der Phytohormone, die Perfusion der Biosuspension und die Zerkleinerung der Moosagglomerate können das Wachstum, die Zelldifferenzierung und die Produktbildung gesteuert werden.

Eine allgemeine Bilanz des Photo-Bioreaktors kann folgendermaßen dargestellt werden:

$$S_i = \phi_i + Q_i \Rightarrow \frac{dMs_i}{dt} = \phi_{i\text{ ein}} - \phi_{i\text{ aus}} + Q_i \quad (6.7)$$

Die zeitliche Variation einer Komponente i in einem Bilanzraum (S_i) oder dMs_i/dt ergibt sich aus dem Transport außerhalb des Bilanzraums (ϕ) plus ihre Produktion oder Abbau (Q_i). Im quasistationären Zustand ist S_i gleich null.



Abb. 6.20: Schematische Darstellung des Gastransports einer Substanz (i) in einer kontinuierlichen Kultivierung

In Photo-Bioreaktoren ist die CO₂ Zugabe, normalerweise aus einer Gasmischung, nötig für das Wachstum der Moose. Die Abbildung 6.20 illustriert schematisch die Übertragung des

CO₂ im Reaktor sowie die Entfernung des während der Photosynthese produzierten Sauerstoffs. Die Verteilung von einer Substanz *i* in beiden Phasen kann mit Hilfe der Gleichungen 2.5 und 2.6 dargestellt werden.

In einer kontinuierlichen Kultivierung werden ein Gasstrom und ein Verdünnungsstrom (*D*) in und den Reaktor hinein und wieder aus herausgeleitet. Bei konstantem Suspensionsvolumen lässt sich die allgemeine Gasbilanz für *i*, z.B. CO₂ und O₂ ableiten (Gleichung 6.8). $Y_{x/i}$ steht für die Ausbeute an Biomasse aus dem Substrat *i*, c_x für die Biotrockenmassekonzentration, μ für die spezifische Wachstumsrate der Moose und *D* für die Verdünnungsrate (siehe Abbildung 6.20).

$$\frac{dc_i}{dt} = D(c_{iL, \text{ein}} - c_{iL, \text{aus}}) \pm \frac{1}{Y_{x/i}} \mu c_x + kla (c_{iL}^* - c_{iL}) \quad (6.8)$$

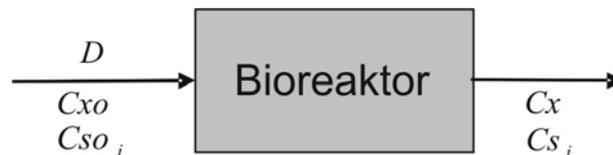


Abb. 6.21: Schema einer kontinuierlichen Kultivierung. Eine Moossuspension mit einer Biomassekonzentration c_x und Substratkonzentration c_{si} wird kontinuierlich mit dem Verdünnungsstrom *D* entfernt

Die Gleichung 6.9 beschreibt die Variation der Biomassekonzentration im Reaktor im Laufe einer kontinuierlichen Kultivierung (Abbildung 6.21). Im Turbidostatbetrieb wird die Biomassekonzentration des Reaktors konstant gehalten. Dafür muss die Verdünnungsrate gleich der Wachstumsrate sein. Für den Chemostatbetrieb nimmt dc_x/dt einen anderen Wert als null an. Hier kann die Wachstumsrate aus dem Verlauf der c_x errechnet werden.

$$\frac{dc_x}{dt} = D(c_{xo} - c_x) + \mu c_x = (\mu - D) c_x \quad (6.9)$$

Die Substrate können analog bilanziert werden. Hier ist C_s die Substratkonzentration und $Y_{x/s}$ die Ausbeute von Biomasse aus dem Substrat *s*.

$$\frac{dc_{si}}{dt} = D(c_{so} - c_s) \pm \frac{1}{Y_{x/i}} \mu c_x \quad (6.10)$$

Die Perfusion bzw. der Mediumaustausch ist wichtig für die Produktabtrennung und die Verdünnung von Wachstumshormonen, welche die Differenzierung der Moose stark beeinflussen (Cove und Ashton, 1984). Ferner sind häufig Querstromfiltration (QSF) für die Zellrückführung und Produktaufkonzentrierung von Biosuspensionen benutzt worden (Abbildung 6.22). Hierbei wird versucht, den Aufbau eines Filterkuchens während der Filtration durch tangentielle Strömung zu verhindern bzw. zu begrenzen. Mehrere Querstromfiltrationsmodule sind sterilisierbar, geeignet für CIP (*cleaning in place*) und den Einsatz in pharmazeutischen Verfahren.

Ein Permeatstrom $\dot{V}_{Permeat}$ wird kontinuierlich aus dem Reaktor abgetrennt, wobei eine konzentrierte Moos-Suspension $\dot{V}_{Konzentrat}$ kontinuierlich zum Reaktor zurückgeführt wird.

Im Kontrollraum der Abbildung 6.22 stellt dm_x/dt die Anreicherung der Biomasse im QSF-Modul dar. Die Ablagerung der Moose an der Filtrationsmembran nimmt mit der Filtrationszeit zu und verringert den Permeatstrom stark. Dennoch kann manchmal eine moderate und kontrollierte Ablagerung der Biomasse im Filter vorteilhaft sein, in dem die Trennung der Proteine nicht durch die Membran entsteht, sondern durch poröse Schichten des filtrierten Organismus. In der so genannten Querstromfiltration mit Deckschicht wird das Filtermedium eher als Zellträger benutzt. Damit wird der Scherstress für die Zellen reduziert und höhere Filtrationsraten entstehen.

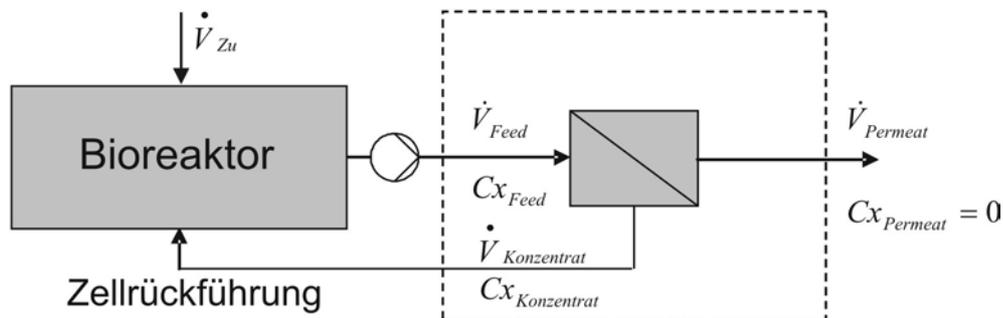


Abb. 6.22: Darstellung einer kontinuierlichen Perfusionskultivierung. Die Moossuspension wird filtriert um ein Permeat ($\dot{V}_{Permeat}$) aus dem Reaktor zu entfernen. Ein Konzentrat mit Moosen wird zum Reaktor zurückgeführt

Die Biomasse kann während der Filtration im QSF-Modul wie folgt bilanziert werden:

$$\frac{dm_x}{dt} = \dot{V}_{Feed} c_{xFeed} - \dot{V}_{konz.} c_{xKonz.} - \dot{V}_{Permeat} c_{xPermeat} \quad (6.11)$$

Damit keine Variation des Volumens in Photobioreaktor vorkommt, muss die Mediumzugaberate \dot{V}_{Zu} gleich dem Permeatstrom sein.

Die Ausbeute der Filtration (AB) wird durch das Verhältnis zwischen dem Permeatstrom und dem Feedstrom definiert.

$$AB = \dot{V}_{Permeat} / \dot{V}_{Feed} \quad (6.12)$$

Die auf die Filterfläche bezogene Filtrationsrate J_w lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$J_w = \frac{\dot{V}_{Permeat}}{A_F} \quad (6.13)$$

mit :

$\dot{V}_{Permeat}$ = experimentell ermittelter Permeatstrom in $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$

A_F = Oberfläche des Filterelements in m^2

6.4.1 Perfusion mittels Querstromfiltration

Ein Querstromfilter (SE 020 TP 1N, Microdyn, Deutschland) wird für die Charakterisierung der Filtrierbarkeit der Moose eingeführt. Die Filtrationsoberfläche des Moduls ($0,033 \text{ m}^2$) wird in drei Polyethylen Hohlfasern mit einem 5 mm Durchmesser und einem Porendurchmesser von $1 \mu\text{m}$ aufgeteilt. Fünf *Physcomitrella patens* Suspensionen mit unterschiedlicher Biomassekonzentration, Morphologie, Differenzierungszustand und mechanischem Stress werden für diesen Zweck benutzt (siehe Abbildung 6.23). Die Suspensionen werden aus Batches im 30 L Pilot-Photo-Bioreaktor (wie in 6.3.4) zu diversen Kultivierungszeiten entnommen und bei verschiedenen tangentialen Geschwindigkeiten (w) und transmembranen Drücken (TMD) *offline* filtriert. Die Variation der Filtrationsrate wird mit Hilfe einer Waage und mit einer Routine in LabVIEW (National Instruments, Austin, TX) erfasst. Der Zellstress während der Filtration wird anhand der Konzentration an freien Pigmenten und Proteinen gemessen. Die morphologischen Änderungen der Moose und Zell-Debris werden durch mikroskopische Inspektion verfolgt und dann mit Bildverarbeitung quantifiziert.

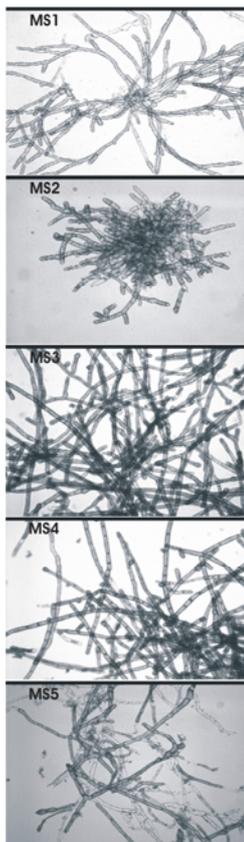


Abb. 6.23: Morphologische Diversität von *Physcomitrella patens* in Suspension. MS1, aus Schüttelkolben bei einer PFD von $20,0 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, LD, 16/8. MS2 bis MS5 aus Batchkultivierungen im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Bedingungen: Temperatur $21,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$; pH $5,8 \pm 0,05$; Begasung $0,0136 \text{ vvm}$; CO_2 -Konzentration in Begasung $1,75 \%$ (v/v); v $0,45 \text{ m s}^{-1}$; PFD $84,1 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; LD 16/8. MS1: lange Fäden mit apikalem Wachstum und geringer Verzweigung. MS2: kleine Chloronemaagglomerate mit hoher Verzweigung. MS3: große Moosagglomerate vor der Zellzerkleinerung. MS4: Moose nach einer fokussierten Zerkleinerung. Wenige Zell-Debris. MS5: spätere Phase der Kultivierung. Hoher Zellstress und viel Zellreste im Überstand aus der Biosuspension. Bildergröße: $1.297 \mu\text{m} \cdot 1.014 \mu\text{m}$

Die Referenzproben aus Schüttelkolben (MS1) sind hauptsächlich chloronemale Moose. Sie wachsen apikal und besitzen kaum Verzweigung. Die Moose aus MS2 stammen aus der Phase exponentiellen Wachstums (μ : 0,9 d⁻¹) einer Kultivierung im Rohrreaktor. Sie bilden kleine kompakte Agglomerate mit ca. 100-200 μm Durchmesser und präsentieren hohe Verzweigung. In MS2 werden nur Chloronema beobachtet. In einer weiteren Phase der Kultivierung besitzen die Moose eine Länge im mm Bereich und ihr Verzweigungsgrad nimmt ab (MS3). Nach einer mechanischen Zerkleinerung der Moosagglomerate (MS4) wird das Verhältnis Pellet/Filament kleiner als bei MS3 und die Moospellets lockern sich. Der Anteil an beschädigten Zellen und *Debris* ist klein für MS4. Die Erhöhung der Biomassekonzentration auf 2,0 g l⁻¹ begünstigt den Zellstress durch die Vernetzung der Moosagglomerate und die zunehmende sterische Interaktionen der Fäden. In den letzten Tagen der Kultivierung (MS5) wird klar, dass die Differenzierung nicht mehr mit der mechanischen Behandlung der Moose aufzuhalten ist. MS5 zeigt einen großen Anteil an Caulonema und Buds.

Mikrofiltrationsversuche der Modellsuspensionen werden bei einer c_x von 0,2 g l⁻¹, einer TMD von 0,5 bar und einer axiale Geschwindigkeit von 0,45 m s⁻¹ durchgeführt. Bei einer Verweilzeit der Moose im QSF-Modul kleiner als 15 s wird keine Variation der Zellreste oder Chlorophyll im Überstand nach der Filtration detektiert. Ebenso gibt es bei niedriger Turbulenz ($Re < 2250$) und kleiner TMD keine Stresserscheinungen auf Grund der Filtration in allen Modellsuspensionen. Eine Zunahme der Verweilzeit der Moose im QSF von 60 % (τ_{CFF}) ruft nahezu eine Verdopplung der Proteine im Probeüberstand aus MS1, MS3, MS4 und MS5 hervor. Eine achtmalige Erhöhung von τ_{eff} produziert Zellschädigung, massive Befreiung von Zellinhalt und beeinträchtigt eine spätere Zellregeneration, besonders bei MS1 und MS5. Kleine chloronemale Agglomerate (MS2) zeigen verglichen mit langen Filamenten und stark differenzierten Moosaggregaten Robustheit während der Filtration.

Die Abbildung 6.24 stellt die mittleren Filtrationsraten der Biosuspensionen MS1, MS2 und MS3 bei verschiedenen TMD und c_x dar. Bei einer TMD kleiner als 0,4 bar ist ebenfalls J_w für alle getesteten morphologischen Zustände klein. Die Zunahme von J_w nach einer Erhöhung der TMD ist sehr abhängig von der Morphologie der Moose und ihrer Stressgeschichte. Kleine klumpige Moose (MS2) bieten den kleinsten Kuchenwiderstand und dementsprechend die maximale J_w . Filterkuchen, die aus solchen Moosklumpen bestehen, werden einfach durch die tangentielle Strömung im QSF-Modul entfernt. Dabei leiden die Moose unter keiner bemerkbaren Deformation auf Grund der Filtration. Andererseits werden kleine Filamente gezwungen, sich parallel zur Membranfläche auszurichten, was einen hohen Filterkuchenwiderstand provoziert. Diese Orientierung der Filamente ruft eine zusätzliche Zellschädigung und mehr Zell-*Debris* hervor, was jeweils die Membranverstopfung erhöht. Die Suspension MS3 ist aus der Perspektive der Differenzierung und bezüglich der Homogenität der Suspension sehr geeignet für den Kultivierungszweck. Dennoch ist bei ihr eine deutliche Reduktion der Filtrationsleistung bei kleiner TMD und hoher c_x zu beobachten. Für MS3 reagiert die J_w wenig sensitiv auf eine Variation des c_x bei Biomassekonzentrationen zwischen 1,3 und 2,1 g l⁻¹. Dieses Verhalten lässt sich gut mit der Filtration von filamentösen Pilzen in QSF-Modulen vergleichen (Haarstrick et al., 1991).

Der Einfluss der Zellreste nach der Zellzerkleinerung auf die Mikrofiltration wird mit Hilfe der Suspensionen MS3 und MS4 getestet. Beide besitzen eine ähnliche Morphologie aber MS4 hat 3 % mehr Trübung als MS3. Diese kleine Zunahme der Suspensionstrübung ruft eine überproportionale Abnahme von J_w , von $3,1 \cdot 10^{-5}$ auf $2,4 \cdot 10^{-5}$ m³ s⁻¹ m⁻² hervor. Die Zell-*Debris* von MS4 verstopfen allmählich sowohl die Membranporen als auch die Moosinterstizien im Filterkuchen.

MS4 wird benutzt, um die Rolle von w in der Filtration von *Physcomitrella patens* zu

überprüfen. Nach einer Erhöhung der Reynoldszahl (Re) im QSF-Modul von 2.789 auf 4.648 bei 0,4 bar TMD variiert J_w dementsprechend von $2,45 \cdot 10^{-5}$ auf $3,38 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Eine zusätzliche Erhöhung der Turbulenz verbessert jedoch J_w nicht und induziert mehr Zellschädigung und *Debris*. Die experimentelle maximale Turbulenz bei der Filtration von *Physcomitrella patens* liegt im Bereich der ermittelten Werte für empfindliche Organismen laut Vandanjon et al., (1999). Es werden keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Stamm tWT11.51_{VEGF} bezüglich ihrer Filtrierbarkeit oder ihrer physiologischen Antworten nach der QSF bemerkt.

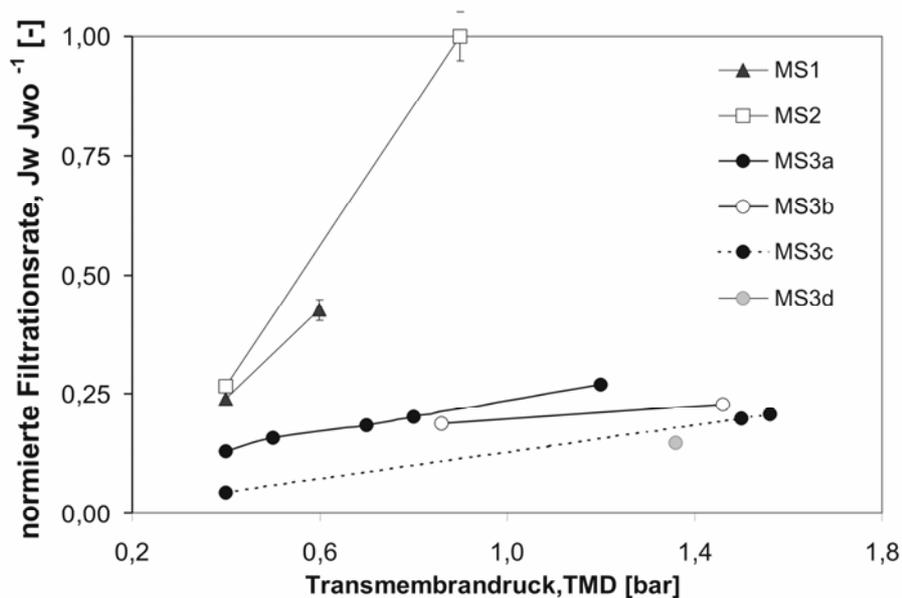


Abb. 6.24: Effekt des Transmembrandrucks (TMD) auf die Filtrationsrate (J_w) bei der Querstromfiltration von *Physcomitrella patens* Modellsuspensionen gemäß der Abbildung 6.23. Mittlere axiale Geschwindigkeit im QSF-Modul: $0,45 \text{ m s}^{-1}$. c_x : MS1 und MS2, $0,2 \text{ g l}^{-1}$. MS3a, $1,3 \text{ g l}^{-1}$. MS3b, $1,5 \text{ g l}^{-1}$. MS3c, $2,0 \text{ g l}^{-1}$. MS3d, $2,1 \text{ g l}^{-1}$. Für die dargestellten Filtrationen ist die zeitliche Abnahme von J_w kleiner als $0,5 \% \text{ min}^{-1}$. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus dreifachen Bestimmungen und ihren Standardabweichungen

Wie schon beschrieben zeigen kleine Moosagglomerate die besten Eigenschaften für die QSF, verhalten sich als mikrometrische Partikel und sedimentieren einfach. Trotzdem ist dieses morphologische Stadium äußerst ungünstig, um die Entstehung und Ausbreitung von Caulonema zu verzögern und homogene Bedingungen in der Kultivierung zu garantieren. Folglich muss hier ein Kompromiss gefunden werden.

6.4.2 Strategien zur Optimierung der *inline* Querstromfiltration

Zwei-Schritt-Filtration

Die Anwendung einer Zwei-Schritt-Filtration, die aus einer Vorfiltration (primäre Filtration) und einer Mikrofiltration besteht, kann die Effizienz der Moostrennung erhöhen und den Zellstress reduzieren. In einem ersten Schritt werden die Moose in den Vorfilter geführt und dann wird das resultierende Permeat zum Querstrom-Mikrofiltrationsmodul geleitet (siehe

Abbildung 6.25). Bei der Vorfiltration werden die meisten Moose abgetrennt, indem sie einen Filterkuchen auf zwei verschiedenen $4,3 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ großen Trägern bilden. Die darauf folgende Operation des Mikrofilters wird so äußerst vereinfacht. Die Träger FE1 und FE2 bestehen aus Edelstahl-Platten mit $1.000 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. $500 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser Bohrungen.

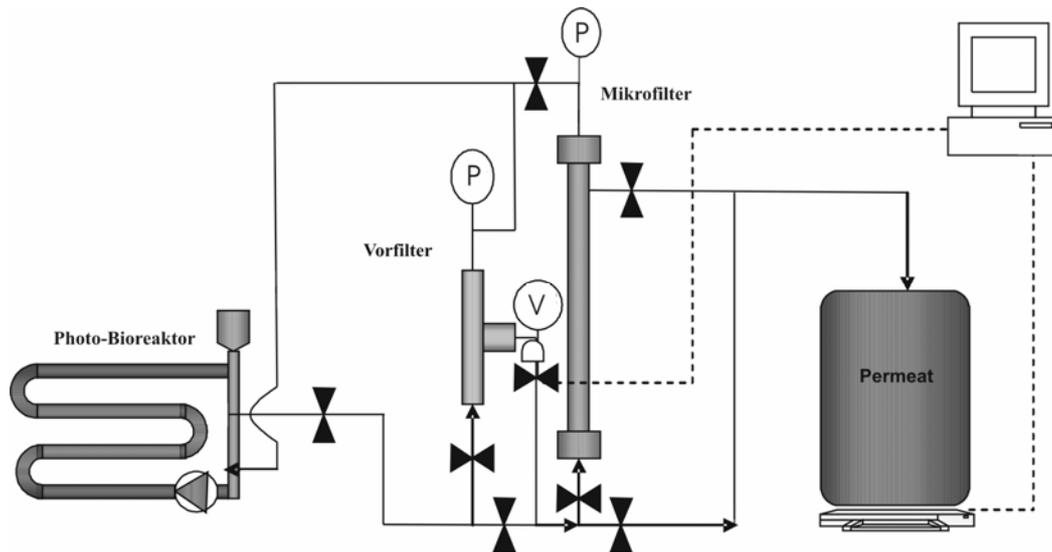


Abb. 6.25: Schema der Anordnung zu einer Zwei-Schritt-Filtration am Rohr-Photo-Bioreaktor. Im Vorfilter fließt die Biosuspension tangential zu zwei Trägertypen (FE1 und FE2), auf denen sich die Moose ablagern. Das Permeat des Vorfilters wird zum Querstrom-Mikrofilter geführt. Bei der pulsierenden QSF wird das Ventil (V) durch die Filtrationsrate gesteuert

Für die Charakterisierung der Vorfiltration werden Moossuspensionen aus einer Batch-Kultivierung im 30 L Pilot Rohr-Photo-Bioreaktor, wie in 6.3.4 beschrieben, *inline* filtriert. Drei typische unterschiedliche Modellsuspensionen werden bei verschiedenem Strömungsverhalten und TMD getestet (Abbildung 6.26). Die Moossuspension MS6 besitzt einen hohen Anteil an Chloronema und kaum Zell-Debris. MS7 entsteht nach einer fokussierten Zerkleinerung von MS6 und weist kurze Moosfäden und mehr Zellreste als MS6 auf. Die Suspension MS8 wird am Kultivierungsende des Batches herausgenommen. In dieser Suspension sind die Moose sehr differenziert und haben einen großen Anteil an Gametophoren. Aus Vorversuchen wird geschlossen, dass die Filtrationsversuche für MS6 und MS7 mit dem Vorfilter FE2 durchgeführt werden. Dagegen wird MS8 mit dem Filterelement FE1 behandelt.

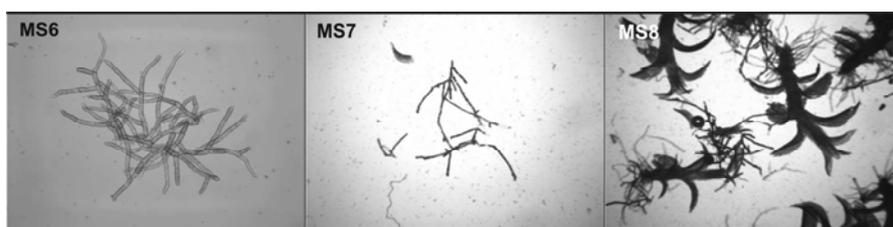


Abb. 6.26: Modellsuspensionen für die Charakterisierung der QSF mit Vorfiltration. MS6: Protonema Suspension mit c_x $0,2 \text{ g l}^{-1}$. MS7: Suspension nach intensiver Zerkleinerung und c_x $0,1 \text{ g l}^{-1}$. MS8: Hoch differenzierte Suspension mit vielen Gametophoren, c_x $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Bilder: MS6, $83 \cdot 63 \mu\text{m}$, MS7 und MS8, $207 \cdot 157 \mu\text{m}$

Die t/V über V Kurve für MS6 zeigt kein lineares Verhalten für die Versuche bei Re gleich 1.631. Hier ist eine ständige Steigung des Kuchenwiderstands zu sehen (Abbildung 6.27). Die besten Filtrationsbedingungen werden bei Re gleich 1.007 erreicht. Eine Verbesserung der Filtration durch die Erhöhung des TMD beschränkt sich nur auf den ersten Teil des Versuchs.

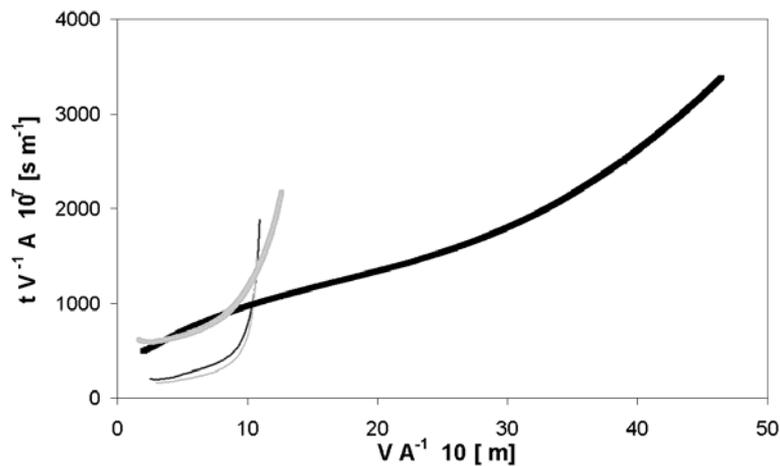


Abb. 6.27: Querstromfiltrationsversuche der Moossuspension MS6 mit Vorfiltration mit dem Filterelement FE2. (—) Re : 1.007; 0,1 bar TMD. (---) Re : 1.631; 0,1 bar TMD. (- -) Re : 1.631; 0,5 bar TMD. (- - -) Re : 1.631; 1,0 bar TMD

MS6 Suspensionen tendieren zur Verstopfung des Vorfilters und bringen ein trübes Permeat zur Mikrofiltration. Die Filtrationsrate (J_w) für Re gleich 1.007 und 0,1 bar TMD liegt im Bereich von $7,4 \cdot 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$. Das Verhältnis zwischen dem Permeatstrom und dem Feedstrom (AB) des Vorfilters laut der Gleichung 6.12 ist hier 2,8 %.

In Abbildung 6.28 werden die Ergebnisse der Filtration der MS7 Suspension dargestellt. Die besten Filtrationsbedingungen werden bei hoher Re Zahl und hohem TMD erreicht. Jedoch rufen Versuche bei Re höher als 3.500 und TMD größer als 1,5 bar erheblichen zellulären Stress hervor. Deshalb sind Re im Bereich von 1.600 und TMD zwischen 0,5 bar und 1 bar zu empfehlen. Die Filtrationsrate (J_w) liegt bei $0,042 \text{ m s}^{-1}$ und AB bei 17,48 %. Diesmal zeigen die Filtrationskurven für MS7 ein nahezu lineares Verhalten und einen nahezu konstanten Kuchenwiderstand.

Die Filtrationskurven für die Moossuspension MS8 sind in Abbildung 6.29 dargestellt. Die Ergebnisse sind deutlich besser als die von den Suspensionen MS6 und MS7. Die Gametophoren ermöglichen die Bildung eines äußerst permeablen und inkompressiblen Filterkuchens im Vorfilter. Die besten Filtrationseigenschaften werden bei hoher Reynoldszahl und großem TMD erzielt. Jedoch werden hier Versuche bei extremen TMD und Re nicht empfohlen, um die Integrität der Zellen zu erhalten. Die maximale J_w ($0,1 \text{ m s}^{-1}$) und AB (41,5 %) werden bei Re gleich 1.600 und TMD zwischen 0,5 bar und 1,0 bar erreicht. Mit MS8 tritt nach 72 Minuten Filtration eine Verstopfung des Vorfilters am Photo-Bioreaktor auf.

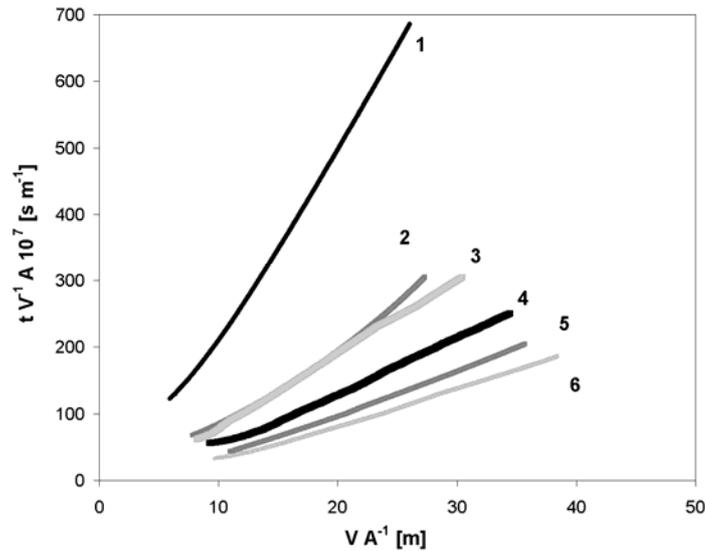


Abb. 6.28: Querstromfiltration der Suspension (MS7) mit Vorfiltration (Filterelement: FE2). (1) Re: 1.631; 0,1 bar TMD. (2) Re: 2.878; 0,1 bar TMD. (3) Re: 1.631; 0,5 bar TMD. (4) Re: 1.631; 1,0 bar TMD. (5) Re: 1.631; 0,5 bar TMD. (6) Re: 2.878; 1,0 bar TMD

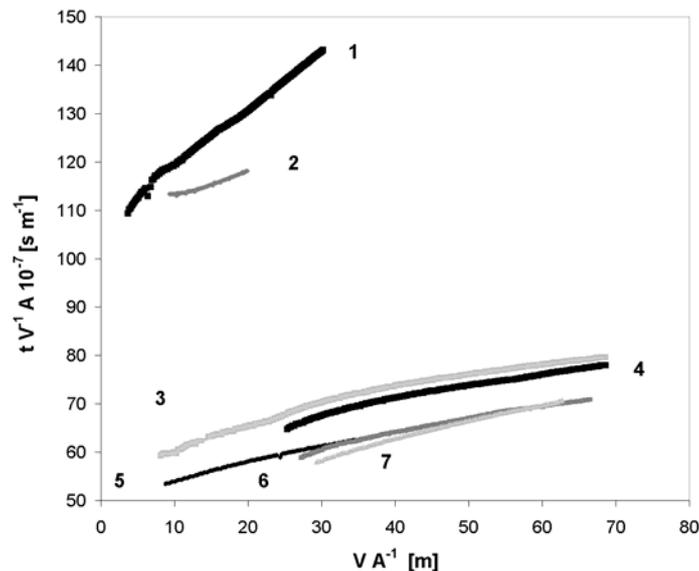


Abb. 6.29: Querstromfiltrationsversuch der Moossuspension MS8 mit Vorfiltration (Filterelement: FE1). (1) Re: 1.007; 0,1 bar TMD. (2) Re: 1.631; 0,1 bar TMD. (3) Re: 1.631; 0,5 bar TMD. (4) Re: 1.631; 1,0 bar TMD. (5) Re: 2.878; 0,1 bar TMD. (6) Re: 2.878; 0,5 bar TMD. (7) Re: 2.878; 1,0 bar TMD

Experimentell wird bestätigt, dass die Filtration von Moosen durch eine Vorfiltration verbessert werden kann. Moose werden auch als natürliche Filter betrachtet und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wasserkreisläufen in Wäldern. Die besten Filtrationsraten wurden bei den durchgeführten Versuchen mit Suspensionen mit hohem Gametophorenanteil erzielt. Letztere sind dem ungeachtet in Suspensionskultivierungen zu vermeiden. Eine Verbesserung der Zwei-Schritt-Filtration kann durch einen pulsartigen

Abbau des Filterkuchens am Vorfilter erreicht werden, was eine Nutzung des Filters für lange Perioden ermöglichen kann. Dies wird in den nächsten Abschnitten genauer erläutert.

Pulsierende QSF mit Vorfilter

Wenn J_w während der Filtration unter einem gewünschten Wert fällt, wird das Permeatventil automatisch geschlossen und damit der bisher erzeugte Moosfilterkuchen abgebaut. Danach kann die Filtration weiter durchgeführt werden, ohne dass eine Rückspülung mit Permeat nötig wird. Diese Operation kann immer wieder wiederholt werden. Bevor ein kompletter Moosfilterkuchen aufgebaut werden kann, ist es möglich, dass Zellen durch den Träger durchfließen und dadurch die Operation des Querstrommikrofilters belasten. Hier muss ein Kompromiss zwischen dem minimalen Wert für J_w und der maximalen zulässigen Biomassekonzentration im Permeat aus dem Vorfilter getroffen werden.

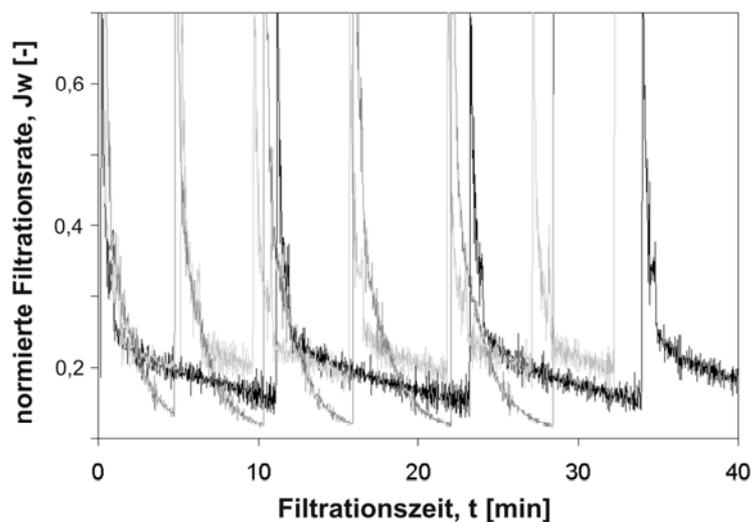


Abb. 6.30: Verlauf der Filtrationsrate bei einer Querstromfiltration der Moossuspension MS6 mit pulsierendem Deckschichtaufbau für verschiedene Werte von Reynoldszahl (Re) und minimalem zulässigem Wert des Permeatstroms (SP). (-) Re : 1.007; SP : $0,5 \text{ ml s}^{-1}$. (-) Re : 1.007; SP : $1,0 \text{ ml s}^{-1}$. (-) Re : 1.943; SP : $0,5 \text{ ml s}^{-1}$. TMD: 0,1 bar

Für die Moossuspension MS6 werden Filtrationen mit pulsierendem Deckschichtaufbau und minimalem Permeatstrom von $1,0 \text{ ml s}^{-1}$ und $0,5 \text{ ml s}^{-1}$ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 6.30 dargestellt. Hier ist die typische, sprunghafte Form einer pulsierenden Filtration im Pilot-Photo-Bioreaktor zu sehen. Das kumulierte Filtratvolumen wird ebenfalls in der Abbildung 6.31 gegen die Filtrationszeit aufgetragen. Die Einführung der pulsierenden Filtration hat eine 70 %-ige Verbesserung der Filtrationsrate verglichen mit einer Standard QSF mit Vorfiltration zur Folge.

Die besten Betriebsbedingungen für die pulsierende Filtration mit MS6 ergeben sich bei einer Reynoldszahl von 1.943 und einem minimalen Wert des Permeatstroms von $0,5 \text{ ml s}^{-1}$. Eine Erhöhung der Pulsfrequenz wird mit der Zunahme der Biomasse im Vorfilterpermeat verbunden, da ein Teil der Moose vor dem Aufbau des Moosfilterkuchens durch den Träger in den Permeatstrom einfließt. Der Biomassegehalt des Permeats wird in der Abbildung 6.32 vergleichend gegen den aus einer Querstrommikrofiltration ($1 \mu\text{m}$ Porendurchmesser)

dargestellt. Für die pulsierende Filtration mit minimalem Permeatstrom: $0,5 \text{ ml s}^{-1}$ und $Re: 1.007$ ist der Anteil an Zellresten genauso klein wie bei der Mikrofiltration. Die Erhöhung der Turbulenz im Vorfilter ($Re: 1.943$) ruft bei minimalem Permeatstrom von $0,5 \text{ ml s}^{-1}$ eine Zunahme der Moose im Permeat hervor.

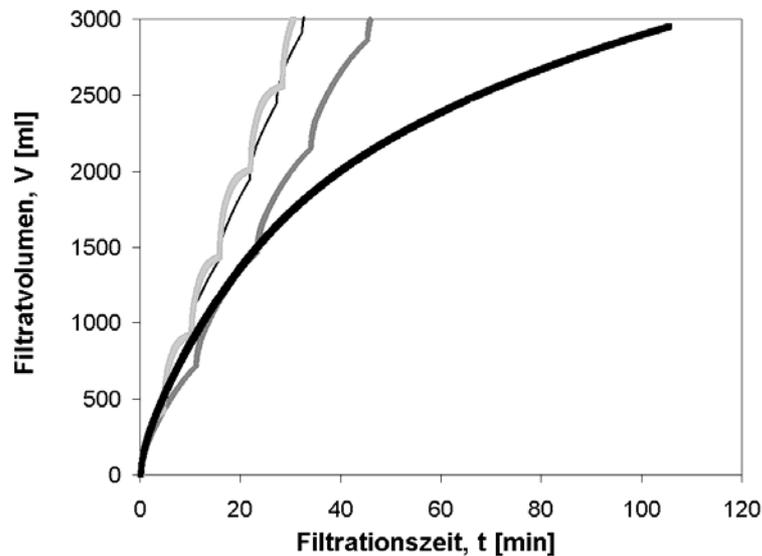


Abb. 6.31: Vergleich des zeitlichen Verlaufs vom Filtratvolumen zwischen der pulsierenden und nicht pulsierenden QSF der Moossuspension MS6. (-) $Re: 1.007$; $SP: 1,0 \text{ m s}^{-1}$. (—) $Re: 1.943$; $SP: 0,5 \text{ m s}^{-1}$. (— · —) $Re: 1.007$; $SP: 0,5 \text{ m s}^{-1}$. (—) $Re: 1.007$; keine pulsierende Filtration. TMD: $0,1 \text{ bar}$

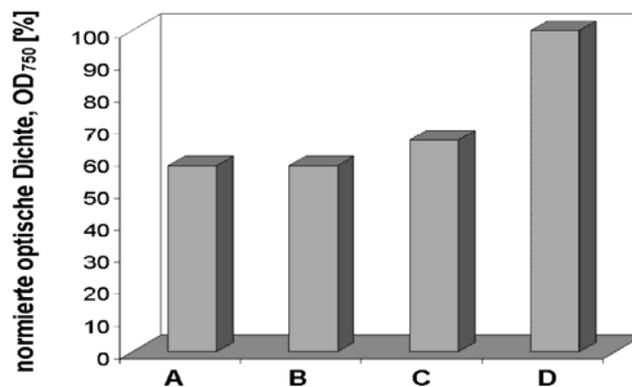


Abb. 6.32: Vergleich der Permeattrübung aus Querstromfiltrationen der Suspension MS6 mit und ohne Vorfiltration und pulsierendem Deckschichtabbau. Als Referenz dient das Permeat aus einem Querstrom-Mikrofiltrationsmodul ($1 \mu\text{m}$ Porendurchmesser). Der Träger FE2 wird für die Vorfiltration benutzt. (B) $Re: 1.007$; $SP: 0,5 \text{ m s}^{-1}$. (C) $Re: 1.007$; $SP: 1,0 \text{ m s}^{-1}$. (D) $Re: 1.943$; $SP: 0,5 \text{ m s}^{-1}$. (A) $Re: 1.007$; Mikrofiltration. TMP: $0,1 \text{ bar}$

Die optimalen Filtrationsbedingungen für die getesteten Modellsuspensionen: hohe gesamte Filtrationsrate, niedrige Trübung im Vorfilterpermeat und mäßiger Zellstress, werden in der Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der besten Betriebsparameter für die Zwei-Schritt-Querstromfiltration von drei Moosmodellsuspensionen

Moossuspension	Träger	Re [-]	TMD [bar]	Pulsierende Filtration	Jw [m s ⁻¹]	AB [%]
MS6	FE1	1.007	0,1	Ja	0,01	2,8
MS7	FE2	1.631	1,0	Nein	0,04	17,5
MS8	FE2	1.631	1,0	Nein	0,10	41,6

Die Filtrationsrate des Vorfilters ist bei der Moossuspension MS6 mit pulsierender Vorfiltration um einen Faktor 100 höher, als bei der konventionellen Querstrommikrofiltration, obwohl sie bei kleinerem TMD und geringer Turbulenz betrieben wird. Dadurch wird der Zellstress vermindert, die Operation des Querstrommikrofilters vereinfacht und die gesamte Filtrationsrate erhöht. Suspensionen von *Physcomitrella patens* mit einem hohen Anteil an Gametophoren lassen sich zwar einfach filtrieren, dennoch ist dieses Differenzierungsstadium in der Kultivierung zu vermeiden.

6.4.3 Einfluss der Perfusion auf das Wachstum und die Proteinproduktion

Eine Perfusionskultivierung des rekombinanten Stamms tWTActin5_11.51 wird mit vollständiger Zellrückführung mittels Querstromfiltration durchgeführt, um ein Vergleich mit den herkömmlichen Batchkultivierungen zu etablieren. Die Konzentration von CO₂ in der Gasmischung wird schrittweise von 0,78 % auf 1,75 % (v/v) erhöht, um eine Kohlenstofflimitierung zu vermeiden (Abbildung 6.33). Die Verfügbarkeit von CO₂ wird ständig *online* mit den Werten der Abgasanalytik überprüft. Das Verhältnis Filament/Pellet und die mittlere Größe der Moose werden mit Hilfe von drei Zerkleinerungszyklen mit dem Rotor-Stator am 16., 20. und 24. Kultivierungstag bei 98 % bzw. 2.400±200 µm gehalten. Bei einer Biomassekonzentration von ca. 0,8 g l⁻¹ wird das Wachstumsmuster linear. Die Anwendung einer fokussierten Mooszerkleinerung produziert eine Verzögerung der Entstehung von Gametophoren bis zu einer Biomassekonzentration von 1,2 g l⁻¹, was den Ergebnissen aus 6.3.4 entspricht.

Die Konzentration von rhVEGF₁₂₁ im Überstand nimmt bis zum 25. Kultivierungstag ständig zu und fällt dann, genauso wie bei den Batchversuchen ab (Abbildung 6.6, unten). Obwohl die Zelldifferenzierung in dieser Kultivierung langsamer verläuft als bei den Kultivierungen ohne Mooszerkleinerung, verhält sich die Sekretion von rhVEGF₁₂₁ ins Medium bis zu einer Biotrockenmasse von 1,0 g l⁻¹ ähnlich in beiden Untersuchungen.

Am 27. Kultivierungstag wird eine Fraktion des alten Mediums mittels Querstromfiltration ausgetauscht. Die Bedingungen für die Perfusion werden aus den Optimierungsversuchen nach dem Kriterium des kleinsten Zellstress ausgewählt: TMD 0,6 bar und Re < 3.000. Eine Perfusion von 0,1 d⁻¹ wird am 27. und 30. Kultivierungstag durchgeführt. An den folgenden Tagen werden Perfusionen von 0,2 d⁻¹ vorgenommen (Abbildung 6.33).

Durch den Mediumaustausch ist es möglich, die Abnahme der Konzentration von rhVEGF₁₂₁ in der Biosuspension bis zu einer Biomassekonzentration von 2,0 g l⁻¹ zu verzögern. Ebenfalls kann das Verhältnis Chloronema zu Caulonema stabilisiert und die Anzahl an jungen Gametophoren klein gehalten werden. Trotzdem konnte die Abnahme der Konzentration von rhVEGF₁₂₁ nach dem 33. Kultivierungstag weder durch zusätzliche noch

intensivere Perfusion vermeiden werden.

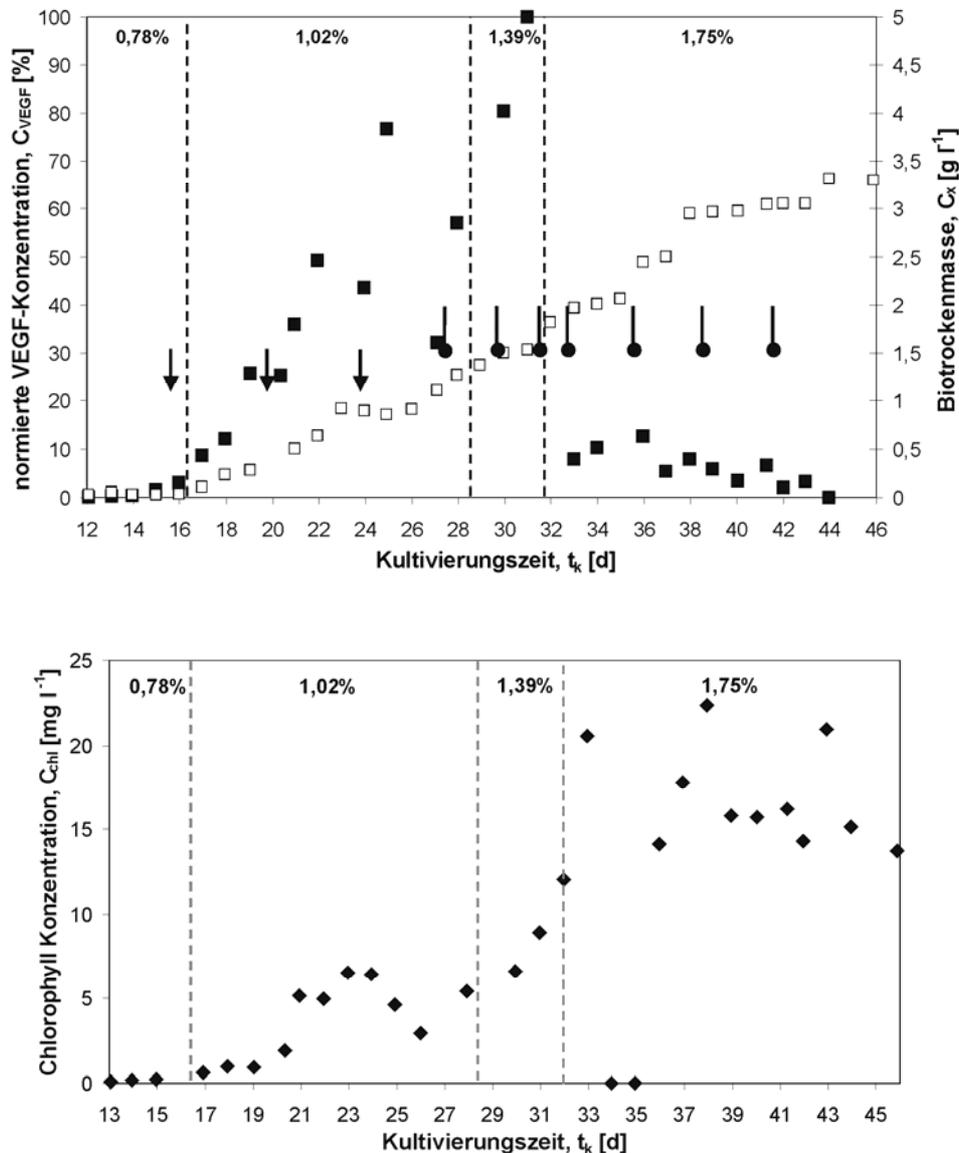


Abb. 6.33: Perfusion Kultivierung des Stammes *Physcomitrella patens* tWT11.51_{VEGF} mit vollständiger Zellrückhaltung in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. Bedingungen: Temperatur, $21,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$; pH, $5,8 \pm 0,05$; Begasung, 0,0136 vvm; CO₂-Konzentration in der Begasung: 0,78, 1,02, 1,39, 1,75 % (v/v) (diskontinuierliche Linien); u , $0,45 \text{ m s}^{-1}$; LD 18/6, PFD an der externen Seite des Reaktors, $84,1 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (A) Biotrockenmasse (□). Normierte Konzentration von rhVEGF (■). Die vertikalen Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zerkleinerung mit dem Rotor-Stator. Perfusion mit QSF (Schwarze Marken): $0,1 \text{ d}^{-1}$ an den 27. und 30. Kultivierungstagen, ansonsten $0,2 \text{ d}^{-1}$. (B) Verlauf des Chlorophyllgehalts (a+b) der Moose während der Kultivierung (◆). Die Daten entstehen aus Mittelwerten von Duplikaten (Chlorophyll und c_x) und dreifachen Bestimmungen (rhVEGF). Die Standard Abweichung aller Bestimmungen ist kleiner als 4 % des Mittelwertes

Durch den regelmäßigen Mediaustausch können spezifische VEGF₁₂₁ Produktionsraten von $139,2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht werden. Sobald die Perfusion aufhört, beschleunigt sich die

Bildung von Gametophoren und fällt die Produktbildungsrate ebenso wie die spezifische Kohlendioxid-Fixierungsrate letztere auf Werte unter $5 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab. Der Gehalt an Chlorophyll a und b der Moose sinkt während der Kultivierung ab (Abbildung 6.33). Wie mehrere Autoren berichten, hat die Verdünnung der Phytohormone einen stabilisierenden Effekt bei der Entwicklung und dem Metabolismus von *Physcomitrella patens* (Reski, 1998a; Cove und Ashton, 1984). Darüber hinaus kann die Perfusion ebenfalls einen Einfluss auf die Expression rekombinanter Proteine, die eine Entwicklungsabhängigkeit aufweisen, darstellen.

Die *inline* Trennung des Suspension-Überstands aus dem Pilot-Photo-Bioreaktor dient einerseits zur Ernte des Produkts und zur Reduktion der Konzentration zahlreicher Pflanzenmetaboliten, andererseits zur Rückführung produktiver Moose in den Reaktor. Die morphologischen und entwicklungsbedingten Variationen der protonemalen Suspensionen von *Physcomitrella patens* stellen eine Herausforderung für die Trennmethode dar. Viele Veröffentlichungen berichten über die Anwendung alternativer Techniken für die Separation pflanzlicher Zellen aus Biosuspensionen. Sie beruhen auf dem Einsatz u.a. kontinuierlicher Sedimentation, Ultraschall, Hydrozyklonen und differentialer Zentrifugation (Su und Arias, 2003; Cho und Shin, 2001; Wagner und Elsayed, 2004). Für langfristige, photoautotrophische Kultivierungen sind manche dieser Systeme für *inline* Anwendungen nicht geeignet oder sie können nicht passend auf die wechselnden Eigenschaften der Moose reagieren. Viele der üblichen Systeme zur Zelltrennung können für den Scale-Up ungeeignet sein oder sind bedenklich für die Validierung bezüglich pharmazeutischer Produktion.

6.4.4 Kontinuierliche langfristige Kultivierung mit Perfusion und Mosszerkleinerung

Kontinuierliche Kultivierung von tWTActin5_11.51

Mit dem Ziel, eine stabile Expression von rhVEGF₁₂₁ in Suspension zu erreichen, wird zunächst eine 43 Tage lange kontinuierliche Kultivierung von tWTActin5_11.51 mit Zellzerkleinerung und Perfusion durchgeführt (Abbildung 6.34). Die Kultivierung besteht aus einer Batch- und einer Chemostatphase. Die Moose erfahren eine durchschnittliche spezifische Wachstumsrate von $0,46 \text{ d}^{-1}$ bis zu einer c_x von $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Dann nimmt der Verlauf der Biotrockenmasse wie erwartet ein lineares Muster an.

In der Batchphase werden zwei Zerkleinerungszyklen der Moose am 11. und 16. Kultivierungstag durchgeführt. Wenn die c_x der Suspension $0,9 \text{ g l}^{-1}$ erreicht, wird die kontinuierliche Kultivierung mit einer Verdünnungsrate (D) von $0,2 \text{ d}^{-1}$ gestartet. D wird nach dem 25. Kultivierungstag auf $0,3 \text{ d}^{-1}$ erhöht. Für diese Phasen wird die Wachstumsrate der Moose durch die Zugabe von CO_2 gesteuert. Zusätzlich werden zwei Perfusionsen von $0,18 \text{ d}^{-1}$ und $0,30 \text{ d}^{-1}$ während der kontinuierlichen Phase am 24. und 28. Tag durchgeführt. Die Sekretion von rhVEGF₁₂₁ zeigt bis zu einer Biomasse von $1,0 \text{ g l}^{-1}$ eine ähnliche Tendenz wie in früheren Versuchen. Anscheinend hat die Änderung der Verdünnungsrate von $0,2 \text{ d}^{-1}$ auf $0,3 \text{ d}^{-1}$ keinen Einfluss auf die Konzentration von rhVEGF₁₂₁. In dieser Kultivierung bleibt die Konzentration des rekombinanten Proteins bis zum Ende der kontinuierlichen Phase bei einem Wert über 85 % des Konzentrationsmaximums (28. Tag).

Obwohl zwei Perfusionsen durchgeführt werden, wird auf Grund der Verdünnung zwischen den täglichen Probenahmen keine proportionale Reduktion der Konzentration an rhVEGF₁₂₁ beobachtet. Das bedeutet, dass *Physcomitrella patens* in der Lage ist innerhalb ca. eines Tages ebenso viele Proteine zu produzieren, wie durch Perfusion geerntet werden. Dieses Phänomen

wurde schon von Bauer et al., (2004) berichtet (unveröffentlichte Daten). Es wird keine Makroelementenlimitierung erwartet, da die Mineralien im Überschuss im modifizierten Knop-Medium vorhanden sind. Dennoch kann das *sequestering* mancher Mineralien oder Spurenelemente nicht ausgeschlossen werden. Außerdem können hormonelle Effekte bei der Expressionskinetik komplexer Proteine in Moosen relevant sein.

Nach dem 34. Kultivierungstag wird die Verdünnung und damit die kontinuierliche Phase beendet. Die Konzentration von rhVEGF₁₂₁ nimmt deutlich ab, genauso wie in den späteren Phasen der Batchversuche und den Perfusionskultivierungen mit totaler Zellrückhaltung (Abbildungen 6.6, unten; 6.33).

Während der kontinuierlichen Kultivierung ist es möglich, die Konzentration der rekombinanten Proteine, den Pigmentgehalt und den Gehalt an konstitutiven Proteinen der Moose nahezu stabil zu halten. Hier wird eine maximale Konzentration von VEGF₁₂₁ im Überstand von 360 $\mu\text{g g}^{-1}$ gemessen, was ungefähr 65 % der maximal erreichten Konzentration für diesen Stamm im Kolben darstellt (Baur et al., 2005b).

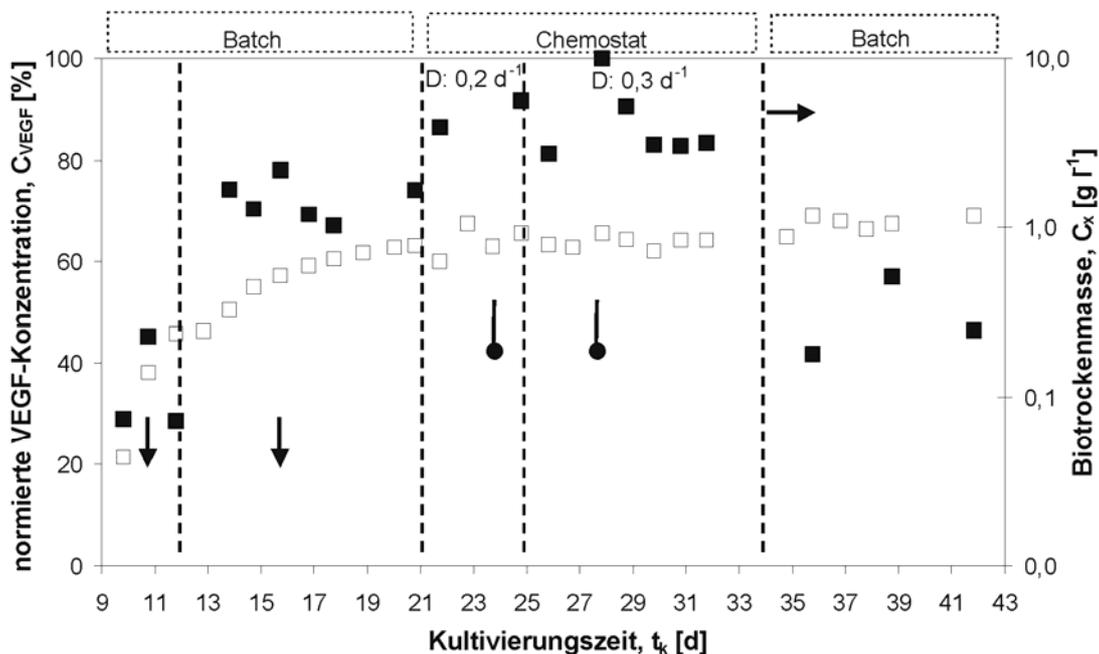


Abb. 6.34: Kontinuierliche Perfusionskultivierung des Stamms *Physcomitrella patens* *tWT11.51*_{VEGF} in einem 30 L Pilot Photo-Bioreaktor. Bedingungen: Temperatur, $21,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$; pH, $5,8 \pm 0,05$; Begasung, $0,0136 \text{ vvm}$; CO_2 -Konzentration in der Begasung variiert zwischen $0,08$ und $0,065 \%$ (v/v); u , $0,45 \text{ m s}^{-1}$; PFD $84,1 \pm 3,0 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, LD 18/6. Die diskontinuierlichen Linien zeigen den Übergang zwischen der exponentiellen und linearen Wachstumsphase und den zwei Phasen des Chemostats (D , $0,2 \text{ d}^{-1}$ bis 25. Kultivierungstag und dann $0,3 \text{ d}^{-1}$). Der horizontale Pfeil stellt das Ende der kontinuierlichen Kultivierung dar. Die vertikalen Pfeile deuten die Zellzerkleinerungszyklen mit dem Rotor-Stator an. Perfusion mit Querstromfiltration (Schwarze Marken): am 24. und 29. Kultivierungstag, $0,18 \text{ d}^{-1}$ bzw. $0,30 \text{ d}^{-1}$. c_x (□) und normierte Konzentration von rhVEGF (■). Für alle Bestimmungen ist die Standard Abweichung kleiner als 5 % des Mittelwerts. Die Daten entstehen aus dreifachen Bestimmungen.

Inline VEGF-Aufkonzentrierung am Rohr-Photo-Bioreaktor

Das Permeat aus der Mikrofiltration am 30 L Pilot-Photo-Bioreaktor (Abbildung 6.35) wird ebenfalls mit zwei Typen von Querstrom-Ultrafiltrationsmodulen aufkonzentriert. Diese zwei Module sind ein Zirconium-Titanium Keramikmodul (Membralox TI 70, Pall) mit einer Porengröße von 50 nm und $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ Filteroberfläche und ein Polysulfon Hohlfaser Ultrafilter (UFP_10_C MM01A, Amersham biosciences) mit cut off von 10000 Da und $27 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ Filterfläche. Sie werden für die Aufkonzentrierung von rhVEGF121 benutzt. Mit beiden Modulen ist es möglich, eine sterile und semikontinuierliche Aufkonzentrierung des Permeats aus der primären Filtration durchzuführen. Mit dem Keramikmodul wird eine 3,3-fache Erhöhung der Konzentration von VEGF und mit dem Hohlfasermodule ca. eine 9,4-fache Erhöhung bei einer TMD: 2,5 bar und $w: 3,5 \text{ m s}^{-1}$ erreicht. Damit werden weitere Schritte zur Aufreinigung des Zielproteins stark vereinfacht.

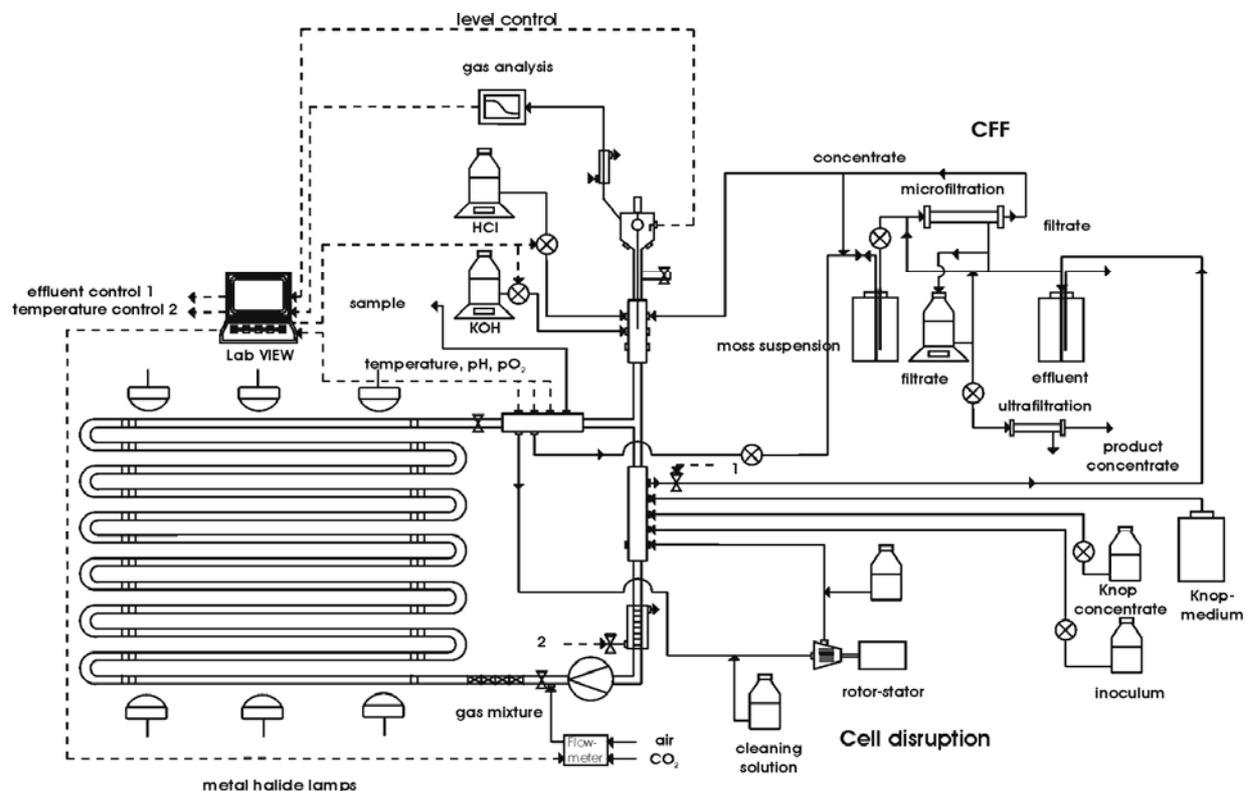


Abb. 6.35: Schema des 30 L Rohr-Photo-Bioreaktors für die langfristige Kultivierung von *Physcomitrella patens*

Einfluss der PFD auf die CO_2 -Fixierungsrate im Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor

Die rekombinanten Moose werden schrittweise mit verschiedenen PFD beleuchtet, um die Variation der Kohlendioxid-Fixierung im 30 L Rohr-Photo-Bioreaktor zu überprüfen. Für den Versuch wird das CO_2 in der Begasung im Überschuss zudosiert. Die Ergebnisse aus der Abbildung 6.36 zeigen ein ähnliches Muster für R_{CO_2} vs PFD wie im Kapitel 4. Dennoch sind

die Werte von R_{CO_2} für die gleiche PFD ca. 50 % kleiner, da die Moose bei diesem Versuch hoch differenziert sind. Maximale Werte für r_{CO_2} wie $50 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ können mit einem hohem Anteil an Gametophoren nicht erreicht werden. Eine PFD zwischen 80 und $120 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ zeigt sich als geeignet für den Kultivierungszweck. Höhere PFD führen zu einer ineffizienten Umsetzung des Energieinputs.

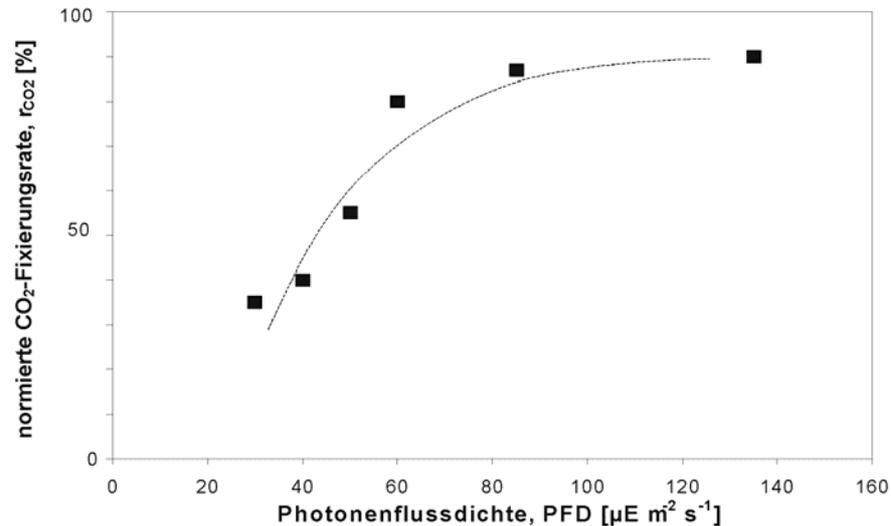


Abb. 6.36: Zusammenhang zwischen der Kohlendioxid-Fixierungsrate und der PFD von *tWActin5_11.51* in einer Suspensionskultivierung im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor

Langfristige kontinuierliche Kultivierungen

Die Beobachtungen des letzten kontinuierlichen Versuchs werden in einer 90 Tage langen Kultivierung ebenfalls im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor überprüft. Der Einfluss der Perfusion zusammen mit der Variation der Gas-Zusammensetzung, PFD und Mediumkonzentration auf die Produktion von rhVEGF₁₂₁ wird dabei untersucht. Die Betriebsbedingungen sind gleich wie beim früheren Versuch. Die Wachstumsrate der Moose wird in der ganzen Kultivierung mit der Zugabe von CO_2 gesteuert. Es werden vier Phasen mit unterschiedlichen Verdünnungsraten im kontinuierlichen Betrieb definiert (siehe Abbildung 6.37). Am Anfang und Ende jeder Phase werden Zerkleinerungszyklen durchgeführt. Ebenfalls werden zwei Mediumperfusionsen pro Phase gemacht, $0,1 \text{ d}^{-1}$ am Phasenanfang und $0,2 \text{ d}^{-1}$ am Phasenende. Dies dient der Charakterisierung der Produktionsvariation von rhVEGF₁₂₁ nach dem Mediaustausch.

In der Batchphase ergibt sich ein Wert für die Wachstumsrate von $0,07 \text{ d}^{-1}$ und danach richtet sich die Verdünnungsrate des ersten Teils der kontinuierlichen Kultivierung. Für die weiteren Phasen des kontinuierlichen Betriebs sind die Verdünnungsraten kleiner als μ , deshalb entsteht eine leichte Erhöhung der c_x in jeder Phase. Die Kurven aus Abbildung 6.38 zeigen die typischen Verläufe des Verbrauchs und der Produktion von CO_2 und O_2 während der Hell/Dunkel Zyklen in der Konti-Phase der Kultivierung. Die CO_2 Speicherung in der Dunkelphase ruft eine Erhöhung der CO_2 -Fixierung (Peak) gleich nach dem Start der Lichtphase hervor, bis wieder quasistationäre Bedingungen erreicht werden.

Der gesamte Proteingehalt der Moose liegt zwischen 50 mg g^{-1} und 150 mg g^{-1} und zeigt eine konstante Tendenz entlang der Kultivierung. Der Chlorophyllgehalt der Moose weist große

Schwankungen zwischen $5\text{--}20\text{ mg g}^{-1}$ auf, wobei keine Beziehung zwischen bestimmten Kultivierungsereignissen und dem Pigmentgehalt festgestellt wird. Die Moose haben in allen Phasen der Kultivierung eine nahezu gleiche Morphologie und besitzen einen hohen Anteil an chloronemalen Zellen. Sobald die kontinuierliche Phase am 90. Kultivierungstag abgebrochen wird, ändert sich die Form der Moose und die Differenzierung wird ausgeprägt.

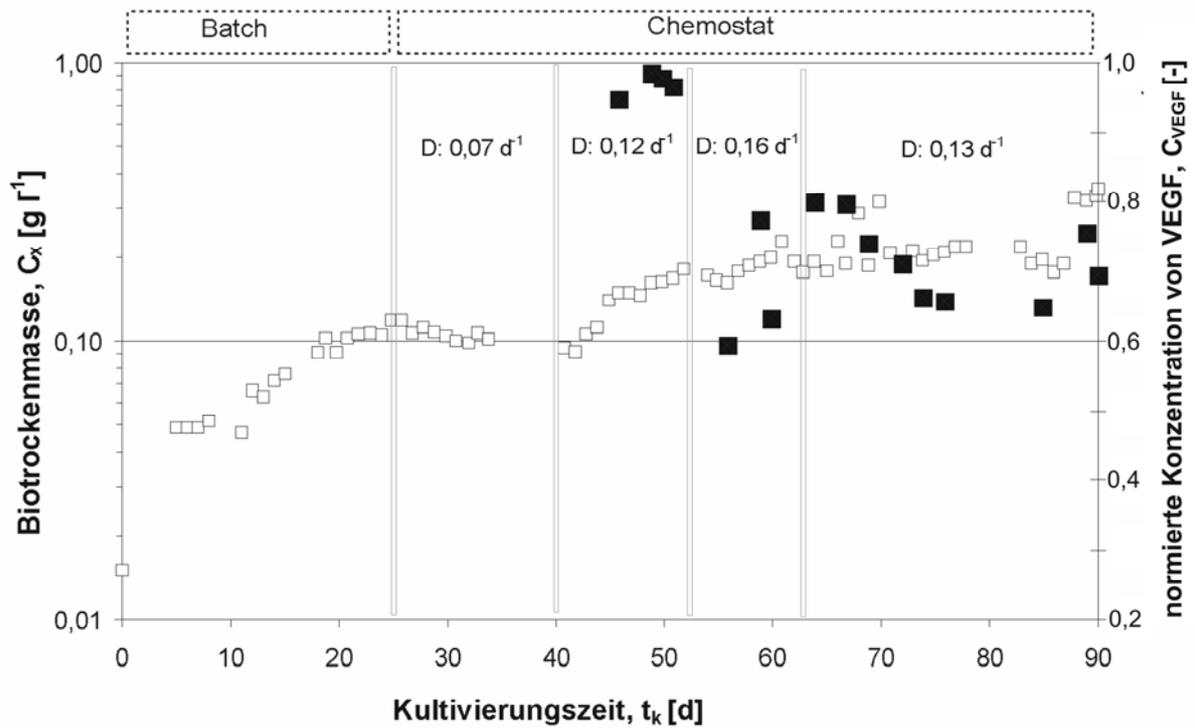


Abb. 6.37: Verlauf der Biomassekonzentration (□) und der Konzentration von VEGF (■) in einer langfristigen Kultivierung von *tWTActin5_11.51* in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor

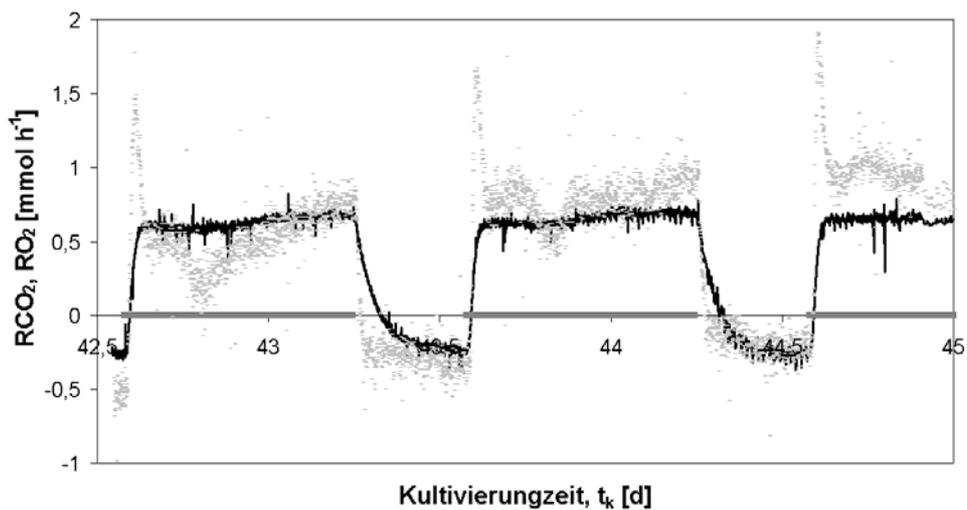


Abb. 6.38: Typischer Verlauf von R_{CO_2} (■) und RO_2 (—) für die Chemostat-Phase ($D: 0,12\text{ d}^{-1}$) einer Kultivierung von *tWTActin5_11.51* in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor. (—) Lichtphase

Die Konzentration von rhVEGF₁₂₁ erreicht Werte zwischen 70 µg g⁻¹ und 190 µg g⁻¹. Am 50. Kultivierungstag wird die maximale Konzentration von Zielprotein gemessen. Danach sinkt sie leicht ab, bleibt jedoch bis zum Kultivierungsende nahezu konstant auf einem hohen Niveau. Eine abrupte Reduktion der Produktion von rhVEGF₁₂₁, wie sie beim Batch oder Perfusionsbetrieb mit totaler Zellrückführung stattfindet, wird nicht beobachtet. Die Konzentrationen vom Protein im Überstand der Biosuspension erreichen 70 % bis 100 % der maximalen Werte aus Schüttelkolben nach Baur et al., (2005a).

Der Verlauf der rhVEGF₁₂₁-Konzentration nach einer 20 %-igen Perfusion bei μ : 0,18 d⁻¹ wird in der Abbildung 6.39 illustriert. Innerhalb weniger Stunden sind die Moose fähig, die rekombinanten Proteine, die geerntet werden, zu ersetzen. Daher steigt die spezifische Produktbildungsrate mit der Perfusion. Eine Halbierung der Perfusion von 20 % auf 10 % pro Tag ruft eine Reduktion der rhVEGF₁₂₁-Produktionsrate von 1,0 µg g⁻¹ h⁻¹ auf 0,7 µg g⁻¹ h⁻¹ hervor. Ohne Perfusion, also nur mit dem Mediaumtausch auf Grund der Verdünnung (D : 0,12 d⁻¹), ist die Produktionsrate von Zielprotein ca. 0,25 µg g⁻¹ h⁻¹.

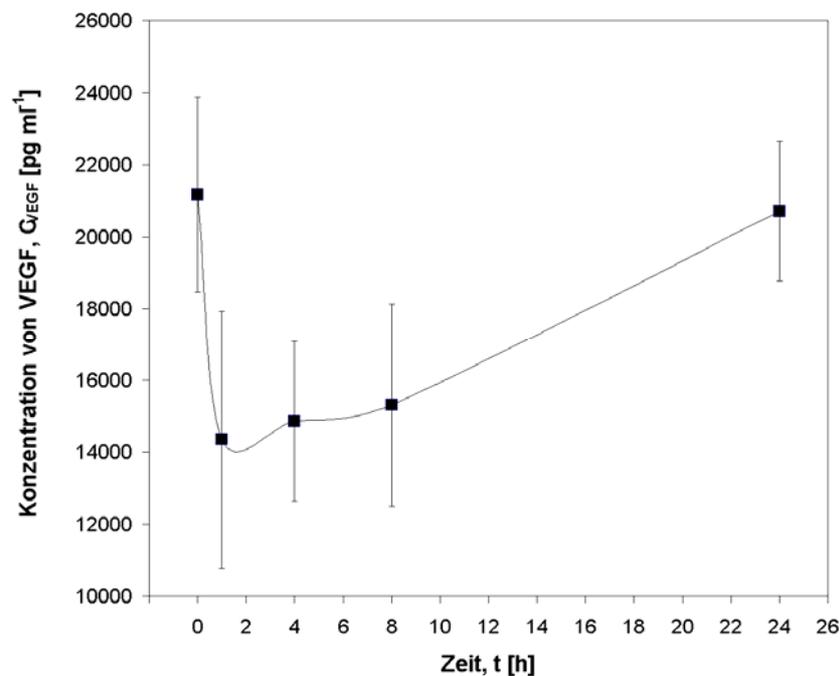


Abb. 6.39: Verlauf der rhVEGF₁₂₁ Konzentration nach einer 20 %-igen Perfusion, μ : 0,18 d⁻¹, c_x : 0,15 g l⁻¹

Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Produktionsrate von VEGF

Die mögliche Rolle von Umweltparametern bei der Produktionsrate von VEGF nach einer Perfusion wird in Abbildung 6.40 dargestellt. Hier wird die Produktion oder der Abbau des Zielproteins einen Tag nach einer 20 %-igen Perfusion evaluiert. Eine Verdünnung des Knop-Mediums hat, wie erwartet bei kleiner Biomassekonzentration ($c_x < 1,5$ g l⁻¹), keinen Einfluss auf die Produktionsrate des Proteins. Die Reduktion des Partialdrucks von Sauerstoff in der Begasung ergibt ebenfalls kein Indiz einer Variation der rhVEGF₁₂₁-Produktionsrate. Dagegen findet bei kleiner PFD (17 µE m⁻² s⁻¹) nur eine mäßige Produktion des Proteins (Abbildung 6.40B) und bei 131 µE m⁻² s⁻¹ ein Abbau von rhVEGF₁₂₁ statt (Abbildung 6.40C).

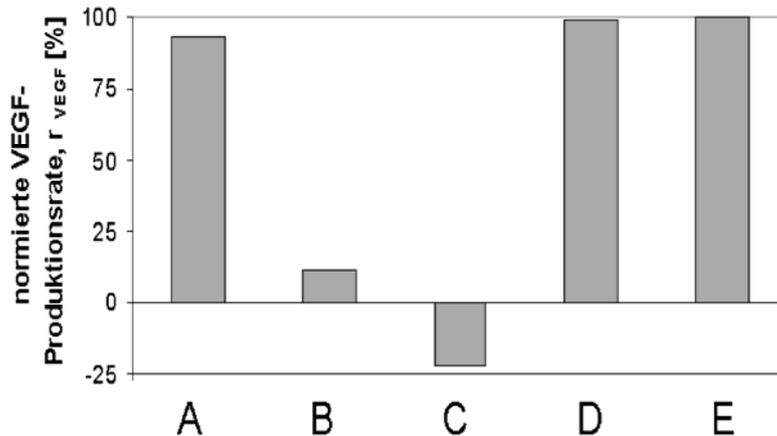


Abb. 6.40: Einfluss der Mediumkonzentration, der PFD und des Sauerstoffpartialdrucks auf die Produktbildungsrate. Normierte $rhVEGF_{121}$ -Produktionsrate nach einer 20 %-igen Perfusion in einer kontinuierlichen Kultivierung. Der Versuch wird bei einer konstanten Konzentration von CO_2 in der Begasung (0,06 %) und einer Wachstumsrate von $0,2 d^{-1}$ durchgeführt. (A) 21 % O_2 in der Begasung; Knop-Medium 3:10; PFD: $76 \mu E m^{-2} s^{-1}$. (B) 21 % O_2 in der Begasung; Knop-Medium 3:10; PFD: $17 \mu E m^{-2} s^{-1}$. (C) 21 % O_2 in der Begasung; Knop-Medium 3:10; PFD: $131 \mu E m^{-2} s^{-1}$. (D) 11 % O_2 in der Begasung; Knop-Medium 3:10; PFD: $70 \mu E m^{-2} s^{-1}$. (E) 21 % O_2 in der Begasung; Knop-Medium 1:1; PFD: $69 \mu E m^{-2} s^{-1}$

Variation des Phytohormonspiegels

Proben aus einer Chemostatkultivierung werden nach Phytohormonen analysiert. Nach dem Ende der kontinuierlichen Kultivierungsphase wird im Batchbetrieb weiterkultiviert. Ohne Mediaustausch steigt die Zelldifferenzierung rasch an. Vor Versuchsabbruch wird die Suspension auf mechanischen Zellstress getestet, in dem die axiale Geschwindigkeit im Reaktor auf $0,8 m s^{-1}$ erhöht wird. Wie bei den Versuchen in kleinem Maßstab aus Kapitel 5 werden Unterschiede des Hormonspiegels von tWTActin5_11.51 zwischen früheren und späteren Phasen der Kultivierung bemerkt (Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Konzentration der Phytohormone im Überstand bei unterschiedlichen Phasen einer kontinuierlichen Kultivierung im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor

	Phytohormone Konzentration [$\mu g l^{-1}$]			
	Chloronema bei schnellem Wachstum	Hoher Anteil an Caulonema	Protonema mit jungen Gametophoren	Hoher Anteil an Gametophoren, mechanische Zellstress
i^6Ade	$2,48 \pm 0,75$	$3,69 \pm 1,11$	$2,12 \pm 0,64$	$0,66 \pm 0,20$
Zeatin	-	$0,38 \pm 0,12$	-	$0,07 \pm 0,02$
IAA	$3,76 \pm 1,13$	$5,44 \pm 1,63$	$0,94 \pm 0,28$	$0,38 \pm 0,11$
ABA	-	-	-	$0,31 \pm 0,09$

Die Zusammensetzung extrazellulärer Phytohormone von protonemalen Suspensionen (Chloronema und Caulonema) unterscheidet sich eindeutig von der in Suspensionen mit Gametophoren. Der IAA-Anteil an den gesamten Phytohormonen liegt bei 50 % und 60 % in den Proben ohne Gametophoren. In stark differenzierten *Physcomitrella patens* beträgt der IAA-Anteil nur 30 %. Der Gehalt an Cytokinin ist deutlich höher in Proben mit Gametophoren. Abscisinsäure wird nur in der Probe mit hohem mechanischen Zellstress detektiert. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da dieses Phytohormon in *Physcomitrella patens* an der Stresstoleranz beteiligt ist. In der Literatur wird ein Einfluss der Abscisinsäure auf die Reaktion auf Temperatur- und osmotischem Stress berichtet (Decker et al., 2006). Es ist aber nicht auszuschließen, dass ähnliche physiologische Reaktionen auch bei mechanischem Stress auftreten.

Eine große Variation des Phytohormonspiegels ist nur in späteren Phasen der Kultivierung erkennbar. Mehrere physiologische Merkmale der Moose ändern sich jedoch schon in den ersten Kultivierungstagen. In semikontinuierlichen Kultivierungen von *Physcomitrella patens* Wildtyp in 10 L Rührkesseln von Hohe et al., (2002) wurde ab dem Kultivierungsstart eine Erhöhung polyploider (4C) Zellen beobachtet. Die Akkumulation von Phytohormonen ist als wichtiger Grund für die Zellalterung und die Verlangsamung des Metabolismus zitiert worden (Schween et al., 2003; Hohe und Reski, 2002). Die Zugabe von Ammoniumtartrat und anderen Entwicklungsantagonisten bieten manche Vorteile in Kultivierungen pflanzlicher Zellen. Jedoch ist ihre Anwendung für die Expression heterologer Proteine unerwünscht. Ihre Nebeneffekte auf die rekombinanten Stämme lassen sich nicht vorhersagen und viele Hormonantagonisten komplizieren den Downstream-Process.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen das Potenzial von *Physcomitrella patens* als Tool in *molecular farming* und weisen auf die Vorteile der Produktion komplexer Proteine in langfristigen Kultivierungen hin. Perspektiven über die Anwendung dieses Expressionssystems in industriellem Maßstab sind vielversprechend. Im nächsten Kapitel werden Überlegungen bezüglich der Skalierung von Photo-Bioreaktoren für die Produktion von Proteinpharmazeutika zusammengefasst.

7 Diskussion, Bewertung und Umsetzung

7.1 Bilanz der experimentellen Ergebnissen

Der Scale-Up von Rührkessel Glas-Photo-Bioreaktoren gestaltet sich schwierig. Die Lichtausnutzung in diesen Reaktoren ist auf Grund des langen Lichtpfads ungünstig. In Rohr-Photo-Bioreaktoren wird der Durchmesser der photoaktiven Sektion des Reaktors möglichst gering gehalten, um die größtmögliche Lichtübertragung an die Zellen zu gestatten. Die geometrischen Auslegungsparameter ergeben sich aus dem Lichteintrag pro Oberfläche, der anzustrebenden optischen Dichte der Kulturen, den sich in Strömungsrichtung aufgrund der Stoffwechselaktivität ausbildenden pH, pCO₂ und pO₂-Gradienten sowie den zum Teil erwünschten Turbulenzen. Für den Kultivierungszweck kann die Steuerung der Wachstumsrate der Moose über die Zugabe von Licht und CO₂ erfolgen (Kapitel 5 und 6).

Für die Etablierung rekombinanter Linien von *Physcomitrella patens* als neuer Produzent komplexer Proteine wurden mehrere Erkenntnisse über sein Verhalten in Suspension gewonnen. Die Kultivierbarkeit von tWTActin5_11.51VEGF wurde in Kolben, 3 L und 30 L Photo-Bioreaktoren überprüft. Der für Scale-Up/Down Untersuchungen benutzte 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor ist *in situ* sterilisierbar und gewährleistet eine enge Lichtverteilung auf der Oberfläche im Bereich von 0-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (siehe Abschnitt 6.1). Für die notwendige regelmäßige Zerkleinerung der Moosagglomerate wurden verschiedene Systeme mit unterschiedlichen Prinzipien getestet. Im Vergleich zur Zerkleinerung durch einen Propeller, wie es in Rührkessel-Bioreaktoren durchgeführt wird (Hohe und Reski, 2005b; Gorr, 1999), erwies sich die Verwendung eines Ultra-Turrax[®] als effizienter, um den Anteil an Moospellets in Suspension zu begrenzen (Abbildung 6.8).

Das Wachstumsverhalten transgener Mooslinien im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor war mit dem des Wildtyps vergleichbar. Darüber hinaus sind analoge Kultivierungsstrategien für weitere transgene Linien von *Physcomitrella patens* denkbar (Gorr und Wagner, 2005). Durch die Optimierung der Prozessführung wurde eine progressive Verbesserung der Produktion von VEGF im Pilotmaßstab erreicht. Eine Produktkonzentration von 360 $\mu\text{g g}^{-1}$ wurde in kontinuierlichen Kultivierungen vom tWTActin5_11.51VEGF bei einer c_x von 1 g l^{-1} und einer spezifischen Wachstumsrate von 0,2 d^{-1} erzielt. Die beobachtete Menge an VEGF stimmt mit den Daten für die stabile Expression von tWTActin5_11.51VEGF von Baur et al., (2005b) überein.

Mit Hilfe der Perfusion war es möglich, die rhVEGF-Produktionsrate zu erhöhen. In mittleren Bereichen der Wachstumsrate (0,2-0,5 d^{-1}) ruft ein Anstieg der Perfusion bis auf 0,3 d^{-1} die Zunahme der Produktbildung bis auf 108 $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ hervor. PFD unter 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und über 130 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ beeinträchtigen die Produktion des Zielproteins in Perfusionskultivierungen. Daher kann die kontinuierliche Kultivierung von Moosen mit Perfusion, *inline* Kontrolle der Zellmorphologie sowie Trennung und Aufkonzentrierung der sekretierten Proteine als eine neue, viel versprechende Strategie für den *molecular farming* eingesetzt werden.

7.1.1 Vorüberlegungen über die weitere Anwendung von Rohr-Photo-Bioreaktoren

Die Entwicklung neuer Arzneimitteln ist kapitalintensiv und langwierig. Sie besteht aus drei Phasen, die eventuell parallel laufen können: präklinische Entwicklung, klinische Prüfung und galenische Entwicklung. Darüber hinaus müssen umfangreiche Wirksamkeits- und

Verträglichkeitsprüfungen für die Zulassungsverfahren durchgeführt werden. Nach den durchgeführten Versuchen mit den produktiven Linien im Pilotmaßstab besteht die Notwendigkeit, im Rahmen eines Zulassungsverfahrens für Pharmazeutika ausreichende Mengen des Produkts für die präklinische Entwicklung zur Verfügung zu stellen. In dieser Phase wird das Profil der Proteinpharmazeutika vor der Anwendung bei Menschen bestimmt, u.a. Haupt- und Nebenwirkungen, Toxikologie, Stabilität und Sicherheitspharmakologie (Werner, 2004). Da sich die dafür nötige Produktmenge im Gramm-Bereich befindet, wird eine Erweiterung der Produktionskapazität erforderlich.

Die allgemeine Strategie für die Kultivierung in größeren Maßstäben wird hauptsächlich mit den Erkenntnissen, die für den geometrisch identischen Pilot-Photo-Bioreaktor entwickelt wurden, übernommen (Abbildung 7.1). Folgende Aussagen, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, sind zu betrachten:

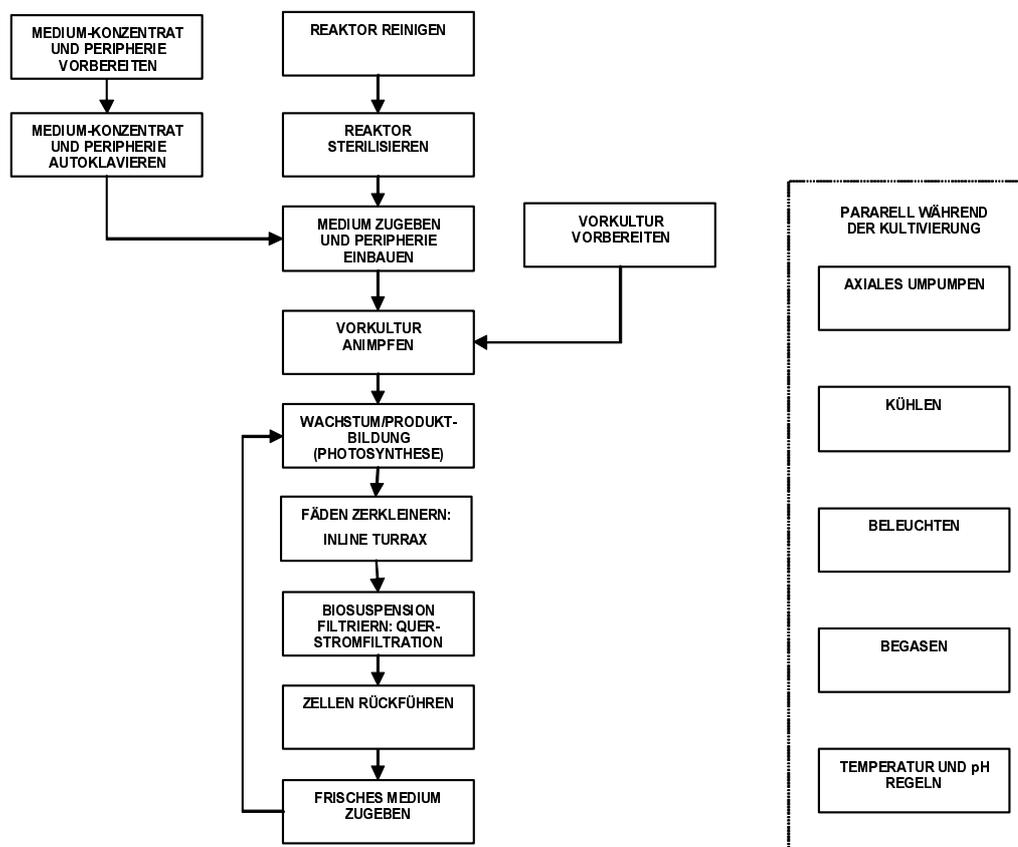


Abb. 7.1: Schematische Darstellung des Prozessablaufs einer Kultivierung von *Physcomitrella patens* in Rohr-Photo-Bioreaktoren

Die Lichtsättigung der Moose befindet sich zwischen $80\text{-}120 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$. Kleine PFD führen zu lichtlimitiertem Wachstum, höhere PFD zu schlechten Wirkungsgraden und Zellschädigung.

Die Gradienten von pO_2 , pH und pCO_2 entlang eines Rohr-Photo-Bioreaktors können effektiv durch die Verweilzeit der Zellen während eines kompletten Durchlaufs durch den Reaktor bzw. mit der axialen Geschwindigkeit der Suspension gesteuert werden. Im Pilotmaßstab entstehen pH -Gradienten kleiner als 0,5 zwischen Begasungs- und Entgasungsstelle im

Reaktor. Diese haben keine nachweisbare negative Wirkung auf die Moose.

Physcomitrella patens wächst in einem breiten pH- (4.5-6.8) und pCO₂-Spektrum, ohne dass sich schwere Beeinträchtigungen des Stoffwechsels zeigen. CO₂-Konzentrationen in der Begasung bis zu 7 % (v/v) rufen keine negativen Auswirkungen auf die Moose hervor.

Für die Umwälzung der Suspension wird eine Kreiselpumpe benutzt, die bei niedriger Drehzahl keine bedeutende Zellschädigung oder Zerkleinerungseffekte auf die Moose ausübt. Eine axiale Geschwindigkeit unter 0,3 m s⁻¹ favorisiert die Anhaftung der Fäden an der Reaktorwand (nach langer Kultivierungszeit). Über 0,9 m s⁻¹ kommt es durch Aufprall zur Schädigung der Fäden. Im Betrieb soll w bei 0,4 m s⁻¹ - 0,7 m s⁻¹ gehalten werden.

Eine deutliche Verzögerung der Differenzierung kann durch die mechanische und fokussierte Zerkleinerung der Moose erzielt werden. Dennoch reicht das nicht aus, um die Differenzierung definitiv zu stoppen. In kontinuierlichen Kultivierungen mit Perfusion und Kontrolle der Moos-Morphologie konnte sie jedoch verzögert werden.

Die Perfusion des Mediums, Zellrückhaltung und Ernte des Zielproteins kann mittels QSF erreicht werden. Die Trennung der Moose aus der Suspension kann effizient und stabil am Reaktor mit einer zwei Schritt Querstromfiltration erfolgen, ebenso die *inline* Aufkonzentrierung des Produkts.

Im Rohr-Photo-Bioreaktor sind Konzentrationen der Biomasse bis 3,5 g l⁻¹ erreicht worden. Dennoch muss auf Grund sterischer Interaktionen der Moose ab 2,0 g l⁻¹ mit hoher Zellschädigung und Schwierigkeiten bei der Behandlung der Biosuspension gerechnet werden. Die maximal erreichte spezifische Wachstumsrate von *Physcomitrella patens* liegt bei 0,9 d⁻¹.

7.2 Wirtschaftlichkeitsanalyse

Ziel der Wirtschaftlichkeitsanalyse ist es, Entscheidungen über den weiteren Verlauf eines Projektes auf der Basis ökonomischer Sachverhalte herbeizuführen. Dafür ist es zuerst nötig, das Ziel der Wirtschaftlichkeitsanalyse und die Art von Entscheidungen, die damit zu treffen sind, zu identifizieren. In Frühstadien der Entwicklung von neuen Projekten sind einfache Strukturmethoden, wie die *short-cut* Methode, besonders geeignet (Storhas, 2003). Da hier ein definitives Anlagekonzept nicht vorausgesetzt ist, kann sie zur Prozessoptimierung benutzt werden, wobei eine Auswahl zwischen Verfahrensoperationen oder Verfahrensvarianten unterstützt wird. Einzelne Parameter für die Produktion des Proteins für die präklinische Entwicklung müssen gewichtet und ihre Relevanz auf die Wirtschaftlichkeit des Projekts überprüft werden.

7.2.1 Datenbank zur Wirtschaftlichkeitsanalyse

Die Wirtschaftlichkeitsanalyse wird mit Hilfe einer Datenbank in Access[®] implementiert. Sie erfüllt folgende Aufgaben: sie sammelt die Kostendaten des Projekts, fasst sie zusammen und erlaubt ihre weitere Aufbereitung und liefert schließlich Kennzahlen, die Entscheidungen zwischen Prozess- oder Anlagevarianten steuern. Daraus ergibt sich eine Architektur der Datenbank, die aus drei Ebenen besteht: Dateneingabe (*data entry*), Berichte (*reports*) und Analyse (*analysis*).

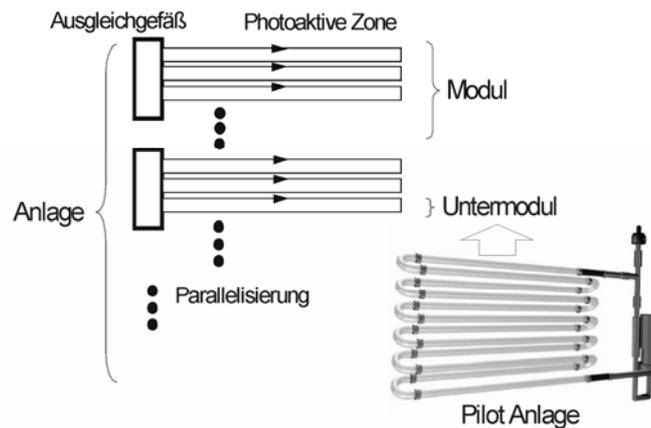


Abb. 7.2: Konzept zum Scale-Up von Rohr-Photo-Bioreaktoren

Dateneingabe

Zunächst werden alle fixen Kosten einer Anlage sowie deren wichtigste Eckdaten zu einer Anlage (*plant*) zusammengefasst. Dann werden die variablen Kosten zu einem *cost profile* zusammengeführt. In der dritten Ebene werden das *cost profile* zusammen mit der Aufreinigungsausbeute (*purification yield*) und weiteren, nicht kostenrelevanten Angaben in einem Profil (*profile*) gespeichert.

Wegen der Besonderheiten von Rohr-Photo-Bioreaktoren werden die verwendeten Glasrohre gesondert erfasst. Alle anderen fixen Faktoren werden zu Modulen zusammengefasst. Das entspricht der Strategie des Scale-Up bis zum beliebigen Volumen durch Parallelisierung von Anlagemodulen einer festen Konfiguration, wie z.B. Rohrlänge und Volumen. Hierbei wird zwischen Anlage, Modul (*plantmodule*), Untermodul und *length configuration* unterschieden (siehe Abbildung 7.2). Dies hängt mit dem Aufbau der Anlage zusammen. Während die Bausteine des *plantmodules* nur einmal in der Anlage vorkommen, sind die Elemente der *length configuration* proportional zur Länge des verwendeten Glasrohrs (siehe Abbildung 7.3).

Eine Anlage wird durch die Angabe des Reaktorvolumens, des verwendeten Glasrohrdurchmessers, der Anzahl der Module pro Anlage, der Anzahl von Untermodulen pro Modul und der erwarteten Nutzungsdauer der Anlage hinreichend beschrieben.

Die Kosten eines Produktionszyklus werden als Kostenprofile (*cost profile*) bezeichnet. Diese gesamten Kosten werden insbesondere durch die variablen Betriebskosten bestimmt, die über die Eingabemaske (*cost profile data*) einem Kostenprofil in Art und Menge zugeordnet werden. Hier werden e.g. die Kosten für Dampf, Strom, Kühlwasser, Medium, pyrogenfreies Wasser, Druckluft und CO₂ eingegeben (Atkinson, 1991). Hierzu muss eine Produktivität angeführt werden, um die Menge an Rohprodukt (VEGF) während der produktiven Phase des Produktionszyklus pro Tag und Liter Reaktorvolumen zu ermitteln. Dementsprechend werden Werte für die Dauer des Produktionszyklus (*culture time*) sowie produktive und unproduktive Anteile (*productive time*, *down time*) betrachtet.

Tierische Zellkulturen und transgene Tiere sind bisher die einzigen Systeme zur Produktion korrekt glykolyzierter rekombinanter Proteine. Dennoch stellt nur die Zellkultur ein validierbares System dar. Die Proteinausbeuten von Säugetierzellen liegen um ca. einen Faktor 50 höher als die von *Physcomitrella patens*, die von Insektenzellen um ca. einen Faktor 10 (Raven, 2004). Dennoch kann die kontinuierliche Ernte des Zielproteins die netto

Produktivität der Kultivierung mit Moosen auf vergleichbare Werte wie bei Tierzellkulturen bringen. Ein direkter Vergleich beider Expressionssysteme befindet sich leider außerhalb des Rahmens dieser Analyse.

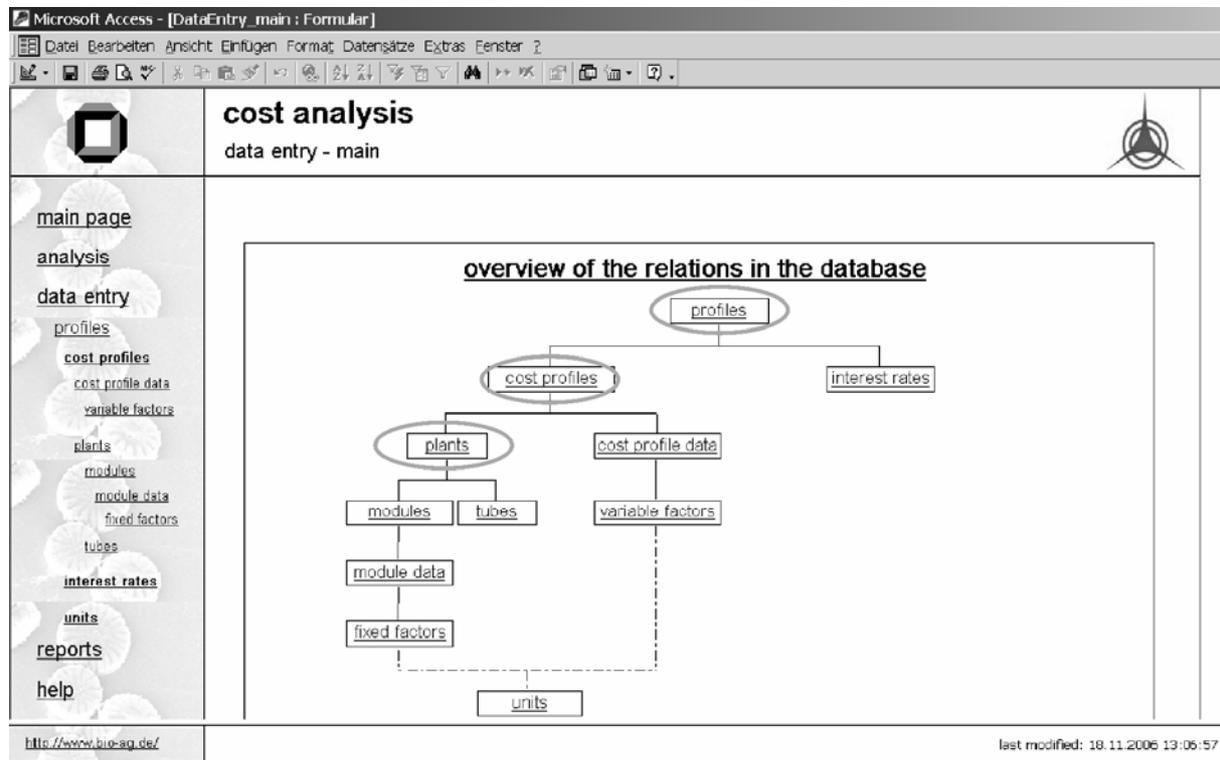


Abb. 7.3: Übersicht über die Relationen in der Datenbank

Die nächste Ebene über den Kostenprofilen ist die Definition der Produktionsprofile. In ihnen werden alle Daten gespeichert, die nicht direkt im Zusammenhang mit dem Produktionszyklus stehen, z.B. Marktpreis des Produktes, interner Zins und Downstream Ertrag (*purification yield*). Die Forschungs- und Entwicklungskosten im Rahmen des Projektes können von mehreren Anlagen getragen werden. Da die Marktpreise sehr stark von Anbieter zu Anbieter variieren, wurde ein Preis von $13,6 \text{ € } \mu\text{g}^{-1}$ für die Analyse in 7.2.2 angewandt (www.cellsciences.com, www.ebioscience.com).

Berichte

Berichte sollen die detaillierten Daten aus der Datenbank für die drei wichtigsten Ebenen (*plant*, *cost profile* und *profile*) aufarbeiten und komprimieren. Im *plant report* wird neben den Gesamtkosten der Anlage eine übersichtliche und detaillierte Liste aller Reaktorkomponenten geliefert. Im *cost profile report* werden die variablen Kosten nach Downstream- und Kultivierungskosten getrennt aufgelistet und als zusätzliche Information erhält der Benutzer die korrigierte Produktivität sowie die Produktbildungsrate. Der *profile report* ist in einen Kopf- und vier Detailbereiche aufgeteilt (Abbildung 7.4). Im Kopfbereich stehen die Höhe der Investition für die Anlage, die Betriebskosten pro Jahr und der Umsatz bei Volllastung.

data record sheet - profile		
profile: <i>pilot plant; BTM=0,4; PR=0,5;</i>		
No. of plants:		1
plant costs:		68.690,45 €
variable costs:		338.881,51 €
turnover:		1.653.678,81 €
project costs:		0,00 €
commentary:		
plant: <i>pilot plant</i>		
plant costs*:		68.690,45 €
volume:		0,03 m ³
diameter of tubes:		0,04 m
tube length:		23,87 m
exp. useful life:		2 years
* plantcosts per plant		
cost profile: <i>pilot plant; BTM=0,4; PR=0,5;</i>		
cultures per year:		5,45
variable costs per culture*:		62.205,65 €
→ variable costs per year*:		338.881,51 €
* variable costs per plant		
turnover per year*: 1.653.678,81 €	price:	13,6 €/µg
	product formation rate:	666,2 µg/day
	product formation p. year:	243188 µg/year
	corrected productivity:	22,2 µg/l*day
	purified product p. year::	121594 µg/year
* turnover per plant		
interest rate: 8,00%		

Abb. 7.4: Beispiel eines Berichts für ein cost profile

Analyse

Für die Analyse der Profile stehen fünf Kennzahlen zur Verfügung. Zwei davon kommen aus der Investitionsrechnung (Kapitalwert und Amortisationsdauer), die anderen drei aus der Kostenrechnung (*break-even* Preis, *break-even* Menge und Deckungsbeitrag) (Eichhorn, 2000). Bei der Kostenrechnung steht die verursachungsgerechte Verteilung der Kosten auf Kostenträger im Mittelpunkt. Kostenträger ist in diesem Fall das Produkt. Gegenstück der Kosten sind in der Kostenrechnung keine Einzahlungen sondern Leistungen. Anders als bei der Investitionsrechnung spielt die Entstehung der Kosten eine bedeutende Rolle. Es interessiert, welche Produktionsfaktoren in Anspruch genommen werden. Diese Produktionsfaktoren werden als Kostenarten bezeichnet. Zum Vergleich einzelner Profile ist im diesem *study case* am besten der *break-even* Preis geeignet, da er aus einer kostenorientierten Sicht einen Vergleich von unterschiedlichen Anlagen und Ausbringungsmengen ermöglicht. Ihre Bedeutung wird wie folgt zusammengefasst.

Break-even Preis

Der *break-even* Preis (p') ist der Preis, bei dem der erwartete Gewinn null ist. Die Anschaffungskosten der Anlage werden linear abgeschrieben und tauchen in allen Perioden ihrer Lebensdauer zu gleichen Teilen als Kosten auf. p' wird wie folgt definiert :

$$p' = \frac{\frac{K_{fix}}{t_{eul}} + K_{var}}{x_p} \quad (7.1)$$

Hier sind K_{fix} die Anschaffungskosten einer Anlage, K_{var} die variable Betriebskosten pro Anlage und Jahr, x_p die Produktionsmenge pro Anlage und Jahr, t_{eul} die erwartete Lebensdauer einer Anlage. Bei variablen Produktionsvolumina und Kostenstrukturen lässt der *break-even* Preis eine Aussage über die günstigste Alternative zu.

7.2.2 Analyse von Rohr-Photo-Bioreaktoren zur Herstellung von VEGF mit *Physcomitrella patens*

Diese Wirtschaftlichkeitsanalyse sollte keine endgültigen Verfahrenskonzepte präsentieren, sondern zur Diskriminierung von günstigen Verfahrensvarianten dienen (Storhas, 2003). Hierzu spielen Parameter in der Prozessstruktur sowie auch im Reaktoraufbau eine entscheidende Rolle in der Kostenstruktur des Gesamtprofils.

Die Perfusionsrate ließ sich identifizieren als der Steuerungsparameter, der allesamt sowohl die Produktivität als auch die Kosten beeinflusst. Außerdem wurde das Gewicht der Aufreinigungskosten auf die Gesamtkostenstruktur von Bioverfahren als kritisch erkannt (Werner, 2004).

Perfusionsrate

Die Einführung der Perfusion in kontinuierlichen Kultivierungen erhöht die Kosten, da das abgezogene Medium bearbeitet und ersetzt werden muss. Die Daten in Tabelle 7.1 sind auf Experimentalergebnisse aus den Photo-Bioreaktoren zurückzuführen. Die Werte der Produktivität entsprechen dem *worst case* in jeder Kultivierung. Der Anstieg der variablen Kosten bei der Perfusion ist nicht auf die Perfusion selbst zurückzuführen.

Ein weit größerer Kostenanstieg entsteht durch die entsprechenden Aufreinigungskosten. Andererseits wird bei Perfusionskultivierungen eine höhere Produktivität erreicht als ohne Mediaustausch (siehe Kapitel 6.4). Die Erhöhung der Produktivität trägt in dieser Analyse dennoch das größte Gewicht. Bei den untersuchten Biomassekonzentrationen lässt sich der *break-even* Preis durch die Einführung der Perfusion senken.

Tabelle 7.1: Einfluss der Perfusionsrate auf die Produktivität und die Kosten des 30 L Pilot-Photo-Bioreaktors

c_x [g l ⁻¹]	Perfusionsrate, D [d ⁻¹]	Produktivität [$\mu\text{g l}^{-1}\text{d}^{-1}$]	normierte variable Kosten [-]	normierte Aufreinigungs- kosten [-]	break-even Preis, p' [€ μg^{-1}]
0,7	0	3,5	0,9	1,3	7,3
0,7	0,2	5,6	1,7	2,2	6,7
1,3	0	3,0	0,8	1,1	7,9
1,3	0,2	6,9	1,7	2,7	6,0
2,0	0	1,4	0,6	0,5	13,6
2,0	0,2	2,6	1,0	1,0	10,6

Reaktordurchmesser

In Rohr-Photo-Bioreaktoren entspricht die Halbierung des Glasrohrdurchmessers einer 4-fachen Erhöhung der Reaktorlänge bei konstantem Reaktorvolumen. Aus den Gleichungen 2.7-2.9 wird ebenfalls klar, dass Reaktoren mit kleinem Reaktordurchmesser hohe Netto-PFD erreichen können. Dennoch hat das zu Folge, dass die Kosten der Anlage steigen (Tabelle 7.2). Der Korrelationskoeffizient zwischen Durchmesser und Anlagenkosten liegt für die Operation ohne Perfusion bei $r = -0,938$ und mit Perfusion bei $r = -0,956$. Der Anstieg der Kosten entsteht erstaunlicherweise hauptsächlich nicht durch die Kosten der Glasrohre selbst, sondern durch die Kosten, die aufgrund der begrenzten Länge eines Moduls in größerer Anzahl benötigt werden (siehe Abbildung 7.2).

Eine Korrelation zwischen den Kosten der Anlage und dem Break-Even Preis ist nicht zu erkennen ($r = -0,014$). Gleichwohl liegt eine Korrelation zwischen Produktivität und Break-Even Preis nahe ($r = -0,988$).

Tabelle 7.2: Einfluss des Glasrohrdurchmessers auf die Produktivität und die Kosten eines 5 m³ Rohr-Photo-Bioreaktors; Lichtleistung 300 W m⁻²

Reaktordurch- messer [m]	c_x [g l ⁻¹]	Perfusionsrate, D [d ⁻¹]	Anlagekosten [10 ³ €]	break-even Preis, p' [€ μg^{-1}]
0,05	0,9	0	806,1	5,2
0,25	0,5	0	290,2	4,8
0,50	0,1	0	126,8	5,4
0,05	0,9	0,2	872,9	5,0
0,25	0,5	0,5	357,1	4,0
0,50	0,1	0,5	143,5	4,4

Es muss auf ein günstiges Verhältnis zwischen Lichtkosten und Investitionen bei der Anlage

geachtet werden, wobei beide Faktoren nicht stark miteinander korrelieren ($r = -0,709$). Für jede gewünschte c_x bzw. Produktivität muss also eine optimale Kombination aus Lichtintensität und Rohrdurchmesser ausgewählt werden.

Erneut sind die Aufreinigungskosten bestimmend. Ein Zusammenhang zwischen den gesamten Kosten und dem Rohrdurchmesser ist schwer zu beurteilen. Die Wahl eines Reaktordurchmessers wird auf jeden Fall aufgrund der Produktivität und nicht aufgrund der Erhöhung der Investitionserhöhung getroffen.

Aufreinigungskosten

Die Kosten des Downstream-Process können ca. 40 % der gesamten Kostenstruktur zur Produktion von Biopharmazeutika darstellen (Perry, 1984). Pharmazeutika sollen nicht mehr als 1 ppm Kontaminanten im finalen Produkt aufweisen (Rehm, 1999). Solche hohen Reinheitsanforderungen führen zu hohen Aufreinigungskosten, die sich in zwei Gruppen aufteilen lassen: Opportunitätskosten, da nicht das gesamte Rohprodukt aufgereinigt werden kann, und echte Kosten, die im Rahmen der Aufreinigung anfallen.

Aufgrund des einfachen Mediums und des nicht nötigen Zellaufschlusses ist die Aufreinigung günstiger, als bei vergleichbaren Expressionssystemen aus tierischen Zellkulturen. Die Werte, die in dieser Analyse benutzt wurden, gehen von 5-6 Aufreinigungsschritten mit einem Ausbeutekoeffizienten von jeweils etwa 0,9 aus, deswegen bringen die Aussagen der Tabelle 7.3 nur Richtlinien zur weiteren Analyse.

Es wird untersucht, wie sich eine Veränderung des Ausbeutekoeffizienten ($\pm 20\%$) oder eine Veränderung der Aufreinigungskosten (Halbierung oder Verdopplung der Downstream Schritte) auf die variablen Kosten pro Einheit Produkt auswirkt. Da die Aufreinigungskosten einen hohen Anteil der variablen Kosten darstellen, werden Kostenvorteile und Nachteile im Bereich der Aufreinigung in fast gleicher Höhe auf das Produkt übertragen. Verbesserungen in diesem Bereich wirken sich spürbar auf die Gesamtkosten aus.

Tabelle 7.3: Einfluss des Ausbeutekoeffizienten und der Aufreinigungskosten auf die Kostenstruktur des gesamten Prozesses; 30 L Pilot-Photo-Bioreaktor; c_x : 0,4 g l⁻¹; Perfusionsrate, 0,5 d⁻¹

Produkt Ausbeute [mg g ⁻¹]	Aufreinigungs- kosten [€ µg ⁻¹]	Aufreinigungskosten /variable Kosten [%]	variable Kosten [€ µg ⁻¹]	normierte variable Kosten [%]
0,5	1,6	80,6	4,1	100,0
0,4	1,6	80,6	5,1	125,0
0,6	1,6	80,6	3,4	83,0
0,5	0,8	67,5	3,4	84,0
0,5	3,3	88,9	7,3	181,0

7.3 Photo-Bioreaktor für präklinische Produktion. Perspektiven von Moosen als Expressionssystem

Wie schon erwähnt, stellt die Definition eines Photo-Bioreaktors für die Produktion der nötigen Menge für die präklinische Entwicklung den nächsten Schritt der Strategie *Physcomitrella patens* als System für *molecular farming* dar. Dafür wird ein so genanntes Lastenheft oder USR (*user requirement specifications*), das auf den Erkenntnissen über die Kultivierung von tWTActin5_11.51VEGF in verschiedenen Maßstäben und Bedingungen basiert, aufgebaut. Die Vorteile hydraulischer Reaktoren gegenüber pneumatischen Photo-Bioreaktoren (z.B. Blasensäulen, Airlift) wurden im Abschnitt 6 diskutiert. Darüber hinaus wird ein geschlossener Rohr-Photo-Bioreaktor mit modularer Einordnung (siehe Abbildung 7.2) für diesen Zweck bevorzugt. Eine Erweiterung des Reaktorvolumens erfolgt durch die Parallelisierung von Modulen mit einer kritischen Länge. Sie wird aufgrund der maximalen CO₂-Fixierungsrate und den axialen pH-, pO₂- und pCO₂-Grenzgradienten im Photo-Bioreaktor bestimmt. Die hohe Oberfläche des Rohr-Photo-Bioreaktors erfordert eine aufmerksame Anwendung des verfügbaren S1-Produktionsraums. Ein mobiles und flexibles System kann dabei Vorteile bieten.

Der Rohr-Photo-Bioreaktor besteht aus einem Hauptreaktor und der Peripherie, die durch sterile Bypässe mit dem Hauptreaktor verbunden ist. Die Bypässe führen entsprechend zu der Zellerkleinerungseinrichtung (Rotor-Stator), der Produktabtrennung (Perfusion) und der Verdünnung der Biosuspension. Der Hauptreaktor besteht aus einer Basiseinheit (Sonden, Mess- und Regelungstechnik, Pumpe und Ausgleichbehälter) und einer Reaktoreinheit (Rohrschlange und Beleuchtungseinrichtung), an die Interpiping und Verbindungselemente angeschlossen sind. Der Hauptreaktor und die Peripherie müssen die höchsten Sterilitätsanforderungen erfüllen, so dass axenische, langfristige Kultivierungen bis zu ca. 6 Monaten durchgeführt werden können.

7.3.1 Hauptreaktor

Der Hauptreaktor besitzt ein gesamtes Volumen von 250 l, davon ca. 80 % photoaktiv, und eine maximale Länge von ca. 200 m ± 20 % . Die Länge des Photo-Bioreaktors wird als der Abstand zwischen der Begasungs- und Entgasungsstelle definiert (siehe Abbildung 6.33). Zusätzliche Scale-Up bis zu einer Größenordnung von 1000 Litern Nutzvolumen sind nach dem Reaktorkonzept möglich. Verbindungsstellen, insbesondere Glasrohrverbindungsstellen sind zu minimieren.

Ein Ziel des 250 L Rohr-Photo-Bioreaktors ist außerdem die Datenerweiterung, um die spätere Validierung von Produktionsreaktoren unter cGMP zu sichern. Hier muss der Hauptreaktor eine in sich geschlossene, validierbare Einheit bilden. Das CIP des Hauptreaktors ist ebenso als in sich geschlossene, validierbare Einheit zu betrachten. Darüber hinaus sollen beide, Hauptreaktor und CIP, gemäß FDA zertifizierbar sein. Das CIP-Verfahren besteht aus Spülzyklen mit VE-Wasser, Lauge und Zitronensäure. Die Neigung der Reaktorrohre muss ein „passives“ Leerlaufen des gesamten Systems gewährleisten.

Allgemeine Anforderungen

Hydraulik: Fließgeschwindigkeit im Glasrohr: $0,1-2,5 \text{ m s}^{-1}$, wobei im Betrieb $0,4-0,7 \text{ m s}^{-1}$ und bei CIP $w > 1 \text{ m s}^{-1}$.

Lichteintrag: PFD an der Glasrohroberfläche zwischen 0 und $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die PFD wird wie der Mittelwert aus diskreten Punkten über die Glasrohroberfläche ermittelt. Ferner muss die PFD so homogen wie möglich für die verschiedenen Sektoren des Reaktors sein, und eine einseitige Belichtung ist zu vermeiden. Unabhängig vom benutzten Beleuchtungssystem (z.B. Leuchtstofflampen OSRAM, cool-white 740 oder Kombination von LED's) muss die gesamte PFD regelbar gestaltet werden. Bei Ausfall einer Lichtquelle ist ein minimaler Gradient des Abfalls der Lichtintensität zu gewährleisten und ein schneller Austausch technisch realisierbar. Die elektrische Leistungsaufnahme des Beleuchtungssystems ist zu überwachen (evt. mit Alarmfunktionen).

Begasung: Mischungen aus Luft, CO_2 und Stickstoff werden angewendet (0,0133 vvm). Für den 250 L Photo-Bioreaktor ist die Begasungsrate $3,33 \text{ l min}^{-1}$. Eine maximale Konzentration von CO_2 in der Gasmischung von 7 % wird empfohlen. Die Dosierung der Gasmischung erfolgt kontinuierlich und unabhängig vom pH-Wert.

Messparameter/Sensoren: Die Sonden müssen während des Betriebes sterilisierbar sein und es sind sterile Wechselarmaturen zu verwenden. Eine gute Durchmischung und minimale Anhaftung der Moosfäden in der Messstrecke des Reaktors muss garantiert werden.

- Druck: Der Messbereich liegt zwischen -1 und 3 bar . Ein Überdruck von min. $0,2 \text{ bar}$ muss während der Kultivierung realisierbar sein, um das Kontaminationsrisiko zu senken. Außerdem sind Alarmgeber für die Überschreitung bzw. Unterschreitung des Sollwerts einzubauen. Der Druck wird als Reglerfunktion auf die Begasungsrate ausgelegt.
- Temperatur: Die Betriebstemperatur $21 \text{ }^\circ\text{C}$ kann eine Abweichung von $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ tolerieren, wobei der Messbereich zwischen 0 und $150 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt. Da die verfügbare Oberfläche des Wärmeaustauschers begrenzt ist, wird die Reaktortemperatur mit der Raumtemperatur unterstützt. Wenigstens zwei Temperatursonden werden pro Modul benötigt: Eine im Vorlauf die für Prozessführung (Temperierregler) und eine weitere im Rücklauf für eine genauere Prozessbeschreibung nach FDA.
- Niveau: Der Volumenausgleich im Behälter wird mittels zwei Füllstandsgebern (oberer und unterer) unterstützt, um die Menge aus der Produkt- und Biomasseentnahme (Perfusion und Verdünnung) und aus der Verdunstung anzugleichen. Ein Alarm bei Leckage bzw. Leerlauf im Betrieb muss mit der unteren Niveausonde angekoppelt sein. Die Sonden müssen möglichst berührungslose und selbstreinigend sein und nicht am Kopfraum des Hauptreaktors eingebaut werden, um Moosbewuchs zu vermeiden.
- Beleuchtung: Die Beleuchtung wird nach der elektrischen Leistungsaufnahme der

Lichtquellen geregelt. Dafür ist für jede dimmbare Quelle eine Korrelation zwischen PFD und Leistungsaufnahme zu etablieren, sowie die Variationen des Spektrums durch Alterung und Standzeiten.

- Axiale Geschwindigkeit: Ihre Regelung erfolgt über die Drehzahl der Pumpe. Dafür muss die Charakteristik der Pumpe (Drehzahl vs Fließgeschwindigkeit) ermittelt werden. Die Messungen können mit einer externen Meßeinrichtung (z.B. Ultraschalldurchflußmesser) überprüft werden.
- pH- Wert: Messbereich zwischen 0 und 14 mit einem Sollwert von pH 6,0. Dieser wird mit der Zugabe von HCl und KOH mittels Dosierpumpen geregelt.
- pO₂-und pCO₂-Werte: Ihre Messung ist optional. Im Fall pO₂ wird der Wert mit der Verweilzeit der Suspension über die Pumpendrehzahl geregelt (PID- Regler). Der pO₂-Wert hat einen Messbereich zwischen 0 und 100 % (bezogen auf Luft). Begleitend zu der Messung des pCO₂-Wertes kann evt. der CO₂ im Abluft verfolgt werden. Hier wird eine Schnittstelle in der Abluftleitung vorgesehen.

Kritische Punkte

Hier werden die wichtigsten technischen Faktoren aufgelistet, die zu einem nicht konformen Verlauf der Kultivierung gemäß der zitierten Anforderungen führen können. Die kritischen Punkte werden in biologisch und technisch untergeteilt.

Biologisch

- Anhaftungen und Immobilisierungen von *Physcomitrella patens*, insbesondere an Übergängen zwischen Rohrschlange und Ausgleichgefäß, Verbindungselementen, Dichtungen sowie im Kopfraum.
- Sensorenausfall, wobei die Temperatur 30 °C übersteigt und der pH<4 oder pH>7 wird.
- Pumpenausfall bei $c_x > 1 \text{ g l}^{-1}$ (Moosagglomeration).

Technisch

- Pumpe: Ausfall. Schwierigkeiten beim Prozessstart durch Moosverstopfung in den Rohren.
- pH- und Temperatursensor: Redundanz
- Füllstand: Bewuchs von Moosen.
- 1 Jahr Standzeit für die Bestandteile des Hauptreaktors.

7.3.2 Peripherie

Bypass I, Mooszerkleinerung

Die Zerkleinerung der Moose erfolgt in Intervallen, durchschnittlich einmal jeden 4. Tag, 10 min bei 22.000 rpm. Dies dient zur Homogenisierung der Moose und zur besseren Lichtverteilung in der Biosuspension. Der gesamte Durchfluss ist über den Ultra-Turrax® im Rücklauf des Hauptreaktors zu führen. Der Bypass I ist CIP-fähig, sterilisierbar und mit Spülpumpe, Spülbehälter und entsprechender Einbindung zu gestalten. Eine leichte Demontage bzw. Montage des Bypasses I ist zu ermöglichen. Seine Grundsterilisierung erfolgt vor Kultivierungsstart zusammen mit dem Hauptreaktor und nach jedem Zerkleinerungszyklus (thermisch) automatisch.

Bypass II: Perfusion

Die Produktabtrennung erfolgt diskontinuierlich, ca. 25 l d⁻¹ für die geplante Kapazität des Reaktors. Der Durchfluss ist in diesen Perioden über den Bypass zu führen. Der Bypass II ist im Rücklauf des Hauptreaktors nach dem Glasrohrmodul einzubauen. Außerdem ist er während des Betriebes steril spülbar mit Spülpumpe, Spülbehälter und entsprechender Einbindung zu gestalten. Eine leichte Demontage bzw. Montage des Bypasses II ist vorgesehen, sowie seine automatische Sterilisierung (thermisch, temperatur- und zeitgesteuert). Die Grundsterilisierung vor Inokulation des Reaktors wird ebenfalls mit dem Hauptreaktor zusammen durchgeführt.

Bypass III: Verdünnung

Dieser Bypass ist nach dem Glasrohrmodul im Rücklauf anzuordnen. Die Verdünnung erfolgt bei laufendem Kultivierungskreislauf, wobei das Volumen der Biosuspension durchgehend mit Nährlösung ausgeglichen wird. Diese Prozedur wird über das Ausgleichgefäß mit Hilfe des Füllstandsreglers unterstützt. Die Schnittstelle ist eine sterilisierbare Clampverbindung zum Erntebehälter.

8 Zusammenfassung

Das Moos *Physcomitrella patens* ist ein interessantes Tool für das *molecular farming* komplexer Pharmazeutika. In den letzten Jahren ist es gelungen, glycoengineered transgene Linien dieses Mooses zu entwickeln, die humanisierte Glycoproteine synthetisieren. Die Proteinproduktion mittels Suspensionskultivierungen pflanzlicher Zellen bietet mehrere biologische und verfahrenstechnische Vorteile gegenüber den herkömmlichen Expressionssystemen von Proteinpharmazeutika mit tierischen Zellen. Bisher sind keine Krankheitserreger bekannt, die von Pflanzen auf Menschen übertragen werden können, ganz in Gegensatz zu Insekten- oder CHO-Zellen. Die Moose werden photoautotroph kultiviert, daher sind lediglich Wasser, Licht, CO₂ und ein einfaches Mineralmedium nötig. Demzufolge sind die Produktionskosten im Vergleich zu Kultivierungen von Tierzellen geringer. Da die rekombinanten Moose in der Lage sind, das Zielprotein ins Mineralmedium zu sekretieren, werden mehrere Schritte des Downstream-Process eliminiert oder vereinfacht.

In seinem Lebenszyklus erfährt *Physcomitrella patens* verschiedene entwicklungsbedingte Variationen, welche die Zelldifferenzierung, sein Erscheinungsbild, seine physiologischen Antworten und im Fall rekombinanter Stämme, die Expression des Zielproteins beeinflussen. Für biotechnologische Anwendungen werden die Moose bevorzugt in ihrem filamentösen Entwicklungsstadium, Protonema genannt, kultiviert. Daher muss auf die Moosdifferenzierung während der Kultivierung besonders geachtet werden.

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz zur Produktion komplexer Glycoproteine mit Moosen in Photo-Bioreaktoren entwickelt und überprüft. Für diesen Zweck diente das rhVEGF₁₂₁ (*recombinant human vascular endothelial growth factor*) als Modellprodukt. Bei diesem Ansatz wurde zunächst eine Charakterisierung der Moose im Kolbenmaßstab vorgenommen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden Versuche in einem Modell-Photo-Bioreaktor bei hoch kontrollierten Umweltbedingungen durchgeführt, die zur Gewinnung kinetischer Parameter der Moose für weitere Größenmaßstäbe dienten. In der nächsten Stufe wurde ein Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor benutzt, um das Verhalten der Moose bei produktionsähnlichen Bedingungen zu ermitteln und die Unit-Operations und Prozessführung zu optimieren.

Die Kultivierbarkeit von tWTActin5_11.51VEGF wurde in allen untersuchten Skalen, den Kolben, dem 3 L Modell-Photo-Bioreaktor und dem 30 L Rohr-Photo-Bioreaktor, überprüft. Sein Wachstumsverhalten, die physiologischen Antworten auf Kultivierungsbedingungen und die Morphologie waren mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Lichtsättigung von *Physcomitrella patens* befand sich zwischen 80-120 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$. Ebenfalls war das Moos fähig, in einem breiten pH-Spektrum (4.5-6.8) zu wachsen. Die Anreicherung von Phytohormonen und extrazellulären Metaboliten im Medium, sowie die Bildung von Moospellets favorisierten die Differenzierung in junge Gametophoren. Die Zugabe von Ammoniumtartrat als Differenzierungsantagonist ab 2,5 mM erwies sich auf Dauer als toxisch für die Zellen.

Untersuchungen über den Einfluss der Lichtqualität auf die Physiologie von tWTActin5-11.51VEGF sowohl im Batch- als auch im kontinuierlichem Betrieb im 3 L Modell-Photo-Bioreaktor haben ergeben, dass sich die Morphologie und die Differenzierung durch die Anwendung monochromatischen Lichtes in Suspensionskultivierungen eindeutig steuern lassen. Blaues Licht stimulierte und rotes Licht inhibierte die Produktion von rhVEGF₁₂₁. Mit blauem und weißem Licht wurden vergleichbare spezifische rhVEGF₁₂₁-Produktionsraten ($5,7 \mu\text{g d}^{-1} \text{g}^{-1}$ bzw. $6,2 \mu\text{g d}^{-1} \text{g}^{-1}$) erzielt, obwohl die Photonenflussdichte (PFD) mit weißem Licht fast zehnfach höher war als mit blauem Licht. Daher ist eine Erhöhung des

Lichtwirkungsgrades durch die Kombination von Zyklen mit monochromatischen günstigen Lichtquellen in Kultivierung denkbar. rhVEGF₁₂₁ wurde bei allen durch filtriertes Licht entstandenen protonemalen Moosstadien detektiert. Klare Unterschiede im intrazellulären Proteinmuster der Moose wurden in den Phasen mit weißem, rotem und blauem Licht mit SDS-PAGE festgestellt. Die Differenzierung der Moose rief ebenso eine Änderung in der Zusammensetzung von Fettsäuren hervor, z.B. variierte der Gehalt an Arachidonsäure zwischen 3,98 mg g⁻¹ mit rotem und 21,38 mg g⁻¹ mit blauem Licht. Zwei Cytokinine (i⁶Ade und Zeatin) sowie IAA und Abscisinsäure wurden aus dem Phytohormonspiegel der Moose quantifiziert. Nach der Entstehung von Gametophoren wurden deutliche Variationen in der Konzentration und Zusammensetzung der Mooshormone gemessen. Eine Erweiterung der Untersuchungen im Modell-Photo-Bioreaktor mit höherer monochromatischer PFD soll die Einführung alternativer Beleuchtungssysteme in großem Maßstab unterstützen.

Die Produktionsrate von rhVEGF₁₂₁ wurde bei einer fortgeschrittenen Differenzierung der Moose beeinträchtigt. Einerseits können die benutzten Promotoren möglicherweise entwicklungsabhängig sein, andererseits kann die Akkumulation von Moosmetaboliten im Medium Zellalterung verursachen. Demzufolge wurden verschiedene Strategien zur Verzögerung der Moosdifferenzierung und zur Stabilisierung der Expression des Zielsproteins untersucht, in einem 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor implementiert und optimiert.

Frühzeitige und kurze Zerkleinerungszyklen im Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor haben ohne bemerkbare Reduktion der Photosynthese zu einer Reduktion des Anteils an Gametophoren in der Biosuspension geführt. Zur schonenden und fokussierten mechanischen Zerkleinerung der Moose eigneten sich Maschinen, die auf dem Rotor-Stator Prinzip beruhen. Mit der Anwendung der bildverarbeitungsgestützten Zerkleinerung konnte die Morphologie der Moose beliebig in Kultivierung gesteuert werden. Die Parametrisierung der Form von *Physcomitrella patens* und die Detektion von Gametophoren wurde erfolgreich mit Algorithmen für filamentöse Organismen erreicht. Mit einer optimierten mechanischen Zerkleinerung wird das Regenerationsverhalten der Moose nicht beeinträchtigt. Bei einer frühen und fokussierten Zerkleinerung der Moose in den Kultivierungen wurde keine dauerhafte Zunahme der freien Proteasen im Medium oder Reduktion der Proteinproduktion verursacht.

Eine Verbesserung des Batchverfahrens wurde mit der Durchführung von Perfusionskultivierungen mit totaler Zellretention erreicht. Die Perfusion wurde mit einer pulsierenden, zweistufigen Querstromfiltration optimiert und am Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor getestet. Damit wurden ein geringer Energieeintrag und Zellstress sowie hohe Filtrationsraten (J_w) ermöglicht. Die Verdünnung der Pflanzenhormone, eine gleichzeitige Ernte und eine zehnfache Aufkonzentrierung des Produkts im Reaktor ist gelungen, was eine wichtige Reduktion des Proteinaufreinigungsaufwands darstellt. Eine Kombination von Zerkleinerung und Perfusion hat einen positiven Effekt auf die Stabilität der Produktion von rhVEGF₁₂₁ bewirkt. Jedoch konnten so die Entstehung von Gametophoren und die Abnahme der Proteinproduktion in späteren Phasen der Kultivierung nur verzögert, aber nicht verhindert werden.

In axenischen kontinuierlichen Kultivierungen von tWTActin5-11.51VEGF im 30 L Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor war es mit der Einführung von Mediumperfusion und mechanischer Zerkleinerung der Moose gelungen, eine nahezu stabile Sekretion des rekombinanten Proteins und eine Verzögerung der Differenzierung über mehr als 3 Monate zu erreichen. Die Perfusion hat einen besonders kritischen Einfluss auf die Produktionsrate von rhVEGF₁₂₁.

Hier hat sich eine kontinuierliche oder semikontinuierliche Perfusion bis zur $0,3 \text{ d}^{-1}$ als effektiv gezeigt, um die Produktionsrate von rhVEGF₁₂₁ auf ca. $100 \mu\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu erhöhen. Die Zellmechanismen zur Expression komplexer Proteine in Photo-Bioreaktoren sind jedoch höchst kompliziert und ihre vollständige Beschreibung wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. *Physcomitrella patens* wies im Rohr-Photo-Bioreaktor eine hohe spezifische Wachstumsrate (bis ca. $0,9 \text{ d}^{-1}$) und Kohlendioxid-Fixierungsrate ($30\text{-}50 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) auf, die weit über die Referenzwerten für analoge pflanzliche Expressionssysteme liegen. Biotrockenmasskonzentrationen bis $3,5 \text{ g l}^{-1}$ konnten in Kultivierung erreicht werden, aber es wurden verfahrenstechnische Nachteile bezüglich des Biosuspension-Handlings und erheblicher Zellstress bei hoher Biotrockenmasse beobachtet. Bei kleinerer und mittlerer Biomassekonzentration konnten folglich bessere Produktionsraten erreicht werden.

Im Rahmen einer Wirtschaftlichkeitsanalyse für die Herstellung von rhVEGF₁₂₁ mit *Physcomitrella patens* in Photo-Bioreaktoren wurde der Einfluss der wichtigsten Kostenfaktoren identifiziert. Die Erhöhung der Produktivität durch die Perfusion hat sich als einer der sensibelsten Parameter der Kostenrechnung des Verfahrens herausgestellt. Ebenso wurde das Kosteneinsparpotential der Pharmeutikaherstellung mit Moosen bestätigt, da die Aufreinigungskosten im Vergleich mit konventionellen Expressionssystemen kleiner sind. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit wurden Ausgangsparameter zur Definition eines Produktionssystems für die präklinische Entwicklung eines Medikaments bereitgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Produktionsstrategie für Proteinpharmazeutika mit rekombinanten Moosen in Photo-Bioreaktoren entwickelt. Langfristige kontinuierliche Kultivierungen in Rohr-Photo-Bioreaktoren mit strikter Kontrolle der Kultivierungsbedingungen, Perfusion sowie Steuerung der Moosmorphologie zeichnen sich als ein einfach skalierbares, vielversprechendes neues Verfahren für *molecular farming* ab. Die Erhöhung der Sezernierungsraten von Zielproteinen und die Konzepterweiterung auf weitere Glycoproteine sind weitere wichtige Schritte für die Konsolidierung dieser Expressionsplattform.

9 Literaturverzeichnis

- Aoki, S., Kato, S., Ichikawa, K., and Shimizu, M. (2004) Circadian Expression of the PpLhcb2 Gene Encoding a Major Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant and Cell Physiology* 45:1, 68-76
- Ashton, N., Grimsley, N., and Cove, D. (1979) Analysis of gametophytic development in the moss *Physcomitrella patens* using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144, 427-435
- Ashton, N.W., Schulze, A., Hall, P., and Bandurski, R.S. (1985) Estimation of indole-3-acetic acid in gametophytes of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 164, 142-144
- Atkinson, B. (1991) *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. New York, Nature Press.
- Baur, A., Kaufmann, F., Rolli, H., Weise, A., Luethje, R., Berg, B., Braun, M., Baeumer, W., Kietzmann, M., Reski, R., and Gorr G. (2005a) A fast and flexible PEG-mediated transient expression in plants for high level expression of secreted recombinant proteins. *J Biotechnol.* 119:4, 332-342
- Baur, A., Reski, R., and Gorr, G. (2005b) Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal* 3, 331-340
- Baur, A. (2005) *Optimisation of the expression of biopharmaceuticals in the moss Physcomitrella patens*. Dissertation an der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau.
- Baydar, G. N., and Harmankaya, N. (2005) Changes in endogenous hormone levels during the ripening of grape cultivars having different berry set mechanisms. *Türk. J. Agric For.* 29, 205-210
- Belsey, M. J., and Pavlou, A. K. (2005) Marketspace: Leading therapeutic recombinant protein sales forecast and analysis to 2010. *Journal of Commercial Biotechnology* 12, 69-73
- Bhatla, S., and Dhingra-Babbar, S. (1990) Growth regulating substances in mosses. In: *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry* 55-77
- Bierfreund, N.M., Reski, R., and Decker, E.L. (2003) Use of an inducible reporter gene system for the analysis of auxin distribution in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Rep.* 21, 1143-1152
- Birkemeyer, C., Kolasa, A., and Kopka, J. (2003) Comprehensive chemical derivatisation for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J. of Chromatography A.* 993, 89-102
- Bond, M., Jankowski, M., Patel, H., Karnik, S., Strang, A., Xu, B., Rouse, J., Koza, S., Letwin, B., Steckert, J., Amphlett, G., and Scoble, H. (1998) Biochemical characterization of recombinant factor IX. *Semin. Hematol.* 35, 11-17
- Bopp, M. (1990) Hormones of the moss protonema. In: *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry* 55-77
- Boyd, P.J., Hall, J., and Cove, D. (1988) An airlift fermenter for the culture of the moss *Physcomitrella patens*. In: J.M. Glime (ed) *Methods in Bryology*, Proc. Bryol. Meth. Workshop Mainz, Hattori Bot. Lab., Nichinan 41-45
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Cho, G.H., and Shin, M.G. (2001) *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*. High cell density cultivation method of plant cell using ultrasonic wave. Patent KR 2001094111.01.10.31
- Chopra, R.N., and Bhatla, S.C. (1988) *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*. CRC Press

- Coloma, M.J., Clift, A., Wims, L., and Morrison, S.L. (2000) The role of carbohydrate in the assembly and function of polymeric IgG. *Mol. Immunol.* 37, 1081-1090
- Cove, D.J., and Ashton, N. (1984) The hormonal regulation of gametophytic development in bryophytes. In: Dyer, A.F. and Duckett, J.G. *The experimental Biology of Bryophytes.* Academic Press. London 177-196
- Cove, D.J., Kammerer, W., Knight, C.D., Leech, M.J., Martin, C.R., and Wang, T.L. (1991) Developmental genetic studies of the moss *Physcomitrella patens*: Society for Experimental Biology 31-43
- Csögör, Z. (2000) Untersuchungen zur Modellierung des Wachstums und der Produktbildung bei Mikroalgen. Dissertation an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
- Decker, E.L., Frank, W., Sarnighausen, E., and Reski R. (2006) Moos systems biology en route: Phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol.* 8, 1-9
- Decker, E. L., and Reski, R. (2004) The moss bioreactor. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 166-170
- DiMasi, J. (2006) The Cost of Biopharmaceutical R&D: Is Biotech Different?. Vortrag am Leonard Davis Institute of Health Economics am 7. April. www.upenn.edu/ldi/dimasi.html
- Doran, P.M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 199-204
- Dudziak, G. (1999) Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden. Berichte des Forschungszentrums Jülich 3696
- Eichhorn, P. (2000) Das Prinzip Wirtschaftlichkeit. Basis der Betriebswirtschaftslehre. Wiesbaden, Gabler
- Endreß, R. (1994) *Plant Cell Biotechnology.* Springer Verlag
- Ergün, N., Topcuoglu, S., and Yildiz, A. (2002) Auxin (Indole-3-acetic acid), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and cytokinin (zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Türk. J. Bot.* 26, 13-18
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25
- Fischer, R., Emans, N., Schuster, F., Hellwig, S., and Drossard, J. (1999) Toward molecular farming in the future: Using plant cell suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol Appl Biochem.* 30, 113-116
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Twyman, R.M. (2004) Plant based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 152-158
- Fischer, U., and Alfermann, A. (1995) Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. *J. Biotechnol.* 11, 199-204
- Forstreuter, F. (2001) Effekte des Angiogenesefaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) an Glioma- und Mikrogliazellen. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Frank, W., Decker, E.L., and Reski, R. (2005) Molecular Tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.* 7, 220-227
- Frahm, J. P., and Frey, W. (2004) *Moosflora.* Stuttgart. Ulmer.
- Frerichs, J.-G., Joeris, K., Konstantinov, K., and Scheper, T. (2002) *In-situ* microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Chemie Ingenieur Technik* 74, 1629
- Giddings, G. (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 450-454
- Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R., and Heinz, E. (1998) Identification of a novel D6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 15, 39-48
- Gorr, G. (1999) Biotechnologische Nutzung von *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Dissertation an der Universität Hamburg

- Gorr, G. (2003) Workshop zum Status der Nachhaltigkeit biotechnologischer Prozesse und Produkte des BMBF-Förderschwerpunkts. Nachhaltige BioProduktion
- Gorr, G., and Wagner, S. (2005) Humanized Glycosilation : production of biopharmaceuticals in a moss bioreactor. In: Modern biopharmaceuticals 3, 919-930
- Grimsley, N., Grimsley J., and Hartmann E. (1981) Fatty acid composition of mutants of the moss *Physcomitrella patens*. Phytochemistry 20:7, 1519-1524
- Haarstrick, A., Rau, U., and Wagner, F. (1991) Cross-flow filtration as a method of separating fungal cells and purifying the polysaccharide produced. In: Bioprocess Engineering, Springer Verlag
- Hartmann, E., and Jenkins, G.I. (1984) Photomorphogenesis of mosses and liverworts. In: Experimental Botany 203-224
- Hartmann, E., and Weber, M. (1990) Photomodulation of protonema development. In: Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry 33-54
- Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., and Azrin, M.A. (2003) The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. Circulation 107:10, 1359-1365
- Hohe, A., Decker, E.L., Gorr, G., Schween, G., and Reski, R. (2002) Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss *Physcomitrella patens* bioreactor cultures. Plant Cell Rep. 20, 1135-1140
- Hohe, A., and Reski, R. (2002) Optimisation of bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. Plant science 163, 69-74
- Hohe, A., and Reski, R. (2005a) Control of growth and differentiation of bioreactor cultures of *Physcomitrella* by environmental parameters. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81, 307-311
- Hohe, A., and Reski, R. (2005b) From axenic spore germination to molecular farming. Plant Cell Reports 23:8, 513-521
- Hollister, J.R., and Jarvis, D.L. (2001) Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian beta 1,4-galactosyltransferase and alpha 2,6-sialyltransferase genes. Glycobiology 11, 1-9
- Horsch, R.B., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985) Transgenic plants. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 50, 433-437
- Horstmann, V. (2004) *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. als Bioreaktor: quantitative Promotoranalyse und Produktion eines komplexen humanen Blutgerinnungsfaktors. Dissertation an der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breslau.
- Huang, Y., and Rorrer, G. (2003) Cultivation of Microplantlets Derived from the Marine Red Alga *Agardhiella subulata* in a Stirred Tank Photobioreaktor. Biotechnol. Prog. 19, 418-427
- Huether, C.M., Lienhart, O., Baur, A., Stemmer, C., Gorr, G., Reski, R., and Decker, E.L. (2005) Glycoengineering of moss lacking plant-specific sugar residues. Plant Biol. 7, 292-299
- Imaizumi, T., Kadota, A., Hasebe, M., and Wada, M. (2002) Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. The Plant Cell 14, 373-386
- Jenkins, G., and Cove, D. (1983) Light requirements for regeneration of protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. Planta 157, 39-45
- Kadota, A., Sato, Y., and Wada, M. (2000) Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. Planta 210: 932-937
- Kasahara, M., Kagawa, T., Sato, Y., Kiyosue, T., and Wada M. (2004) Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. Plant Physiology 135, 1388-1397

- Knoop, B. (1984) The Experimental Biology of Bryophytes, Dyer, A.F. and Duckett, J.G. (eds), Academic Press. London, 143
- Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R., and Decker, E.L. (2004) Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnology Journal* 2, 517-523
- Kukuruzinska, M.A., Bergh, M.L., and Jackson B.J. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 915-944
- Lawlor, D.W. (1990) Photosynthese, Stoffwechsel-Kontrolle-Physiologie, Thieme Verlag, Germany
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.C., Gomord, V. and Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* 38, 31-48
- Lüttge U., Kluge M., and Bauer G. (1994) Botanik: Wiley-VCH Verlagsgesellschaft GmbH
- Ma, J.K., Drake, P.M., and Christou, P. (2003) The production of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 433-445
- Marschall, M., and Proctor, M. (2004) Are Bryophytes Shade Plants? Photosynthetic Light Responses and Proportions of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Total Carotenoids. *Annals of Botany* 94, 593–603
- Massoud, M., Attal, J., Thepot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Theron, M.C., Lopez, C., and Houdebine, L.M. (1996) The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 555-563
- Matsushita, M., Irino, T., Komoda, T., and Sakagishi, Y. (1993) Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocuproine chelate reaction. *Clin. Chim. Acta* 216, 103-111
- Metz, B., and Kossen, N.W.F. (1977) The growth of molds in the form of pellets-a literature review. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 781-799
- Minami, A., Nagao, M., Arakawa, K., Fujikawa, S., and Takezawa D. (2003) Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J. Plant Physiol.* 160, 475-483
- Minami, A., Nagao, M., Ikegami, K., Koshiha, T., Arakawa, K., Fujikawa, S., Takezawa, D. (2005) Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta* 220, 414-423
- Moloney, M. (2002). Plant Molecular Farming: Using Oleosin Partitioning Technology in Oilseeds. In: Current Advances in Molecular Farming. Hood, E., Howard, J., Elsevier.
- Napier, J., and Michaelson, L. (2001) Towards the production of pharmaceutical fatty acids in transgenic plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 883-888
- Nelsen-Salz, B. (2003) Bioreaktor Gerste - Produktion pharmazeutisch nutzbarer Proteine in Bioreaktoren. Maltagen Forschung GmbH. Workshop zum Status der Nachhaltigkeit biotechnologischer Prozesse und Produkte des BMBF-Förderschwerpunkts. Nachhaltige BioProduktion
- Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Sakakibara, I., Kato, M., and Hasebe, M. (2000) Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. *DNA Research* 7, 9-17
- Perner, I., Posten, C., and Broneske, J. (2003) CFD optimization of a plate photobioreactor used for the cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 3, 287-291
- Perner, I. (2003) Scale-Down von Photobioreaktoren. Dissertation an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
- Perry, R.H., Green, D.W., and Maloney, J.O. (1984) Perry's Chemical engineers' handbook. 6th edition. New York, McGraw-Hill

- Pinkert, C.A., and Murray, J.D. (1999) Transgenic farm animals. In: Transgenic animals in Agriculture. Murray, J.D., Anderson, G.B., Oberbauer, A.M., McGloughlin, M.M. (Eds.), Commonwealth Agricultural Bureau International, London, 1-18
- Pfister, K., and Lichtenthaler, H. (1978) Praktikum der Photosynthese. Quelle & Meyer, Heidelberg
- Pons, M.-N., and Vivier, H. (1999) Biomass quantification by image analysis. Advances in Biochemical engineering/Biotechnology 66, 133-184
- Pons, M.N., Drouin, J.F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H., and Germain, P. (1998) Physiological investigations by image analysis. J. Biotechnol. 65, 3-14
- Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M., and Jones, A.J. (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10, 477-486
- Raven, N. (2004) Pflanzenzellen als Produktionssystem zur Gewinnung von Interleukin-4 Doppelmuten (IL-4 DM). Dissertation an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
- Rehm, H.-J. (1999) Biotechnology. Second, Completely Revised Edition. Volume 5a. Weinheim, Wiley-VCH
- Rehm, H. (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum-Verlag
- Reichardt, H. (1974) Gesetzmäßigkeiten der geradlinigen turbulenten Couetteströmung. Max Planck-Institut für Strömungsforschung DK
- Reski, R. (1998) Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot. Acta* 111, 1-15
- Reski, R., and Abel, W.O. (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354-358
- Reski, R., and Frank, W. (2005) Moss (*Physcomitrella patens*) funktional genomics-Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health: Briefings in Functional Genomics and Proteomics 4, 48-57
- Restelli, V., and Butler, M. (2002) The effect of cell culture parameters on protein glycosilation. In: Cell engineering Vol 3: Glycosilation 61-89
- Reutter, K., Atzorn, R., Hädeler, B., Schmülling, T., and Reski, R. (1998) Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. *Planta* 206, 196-203
- Rumpf, H. (1959) Beanspruchungstheorie zur Prallzerkleinerung. *Chemie Ingenieur Technik* 31:5, 323-337
- Russ, J.C. (1995) The image processing handbook, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Russell, A.J., Cove, D.J., Trewavas, A.J., and Wang T.L. (1998) Blue light but not red light induces a calcium transient in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 206, 278-283
- Sala, F., Rigano, M.M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., and Castiglione, S. (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21, 803-808
- Sarnighausen, E., Wurtz, V., Heintz, D., Dorsselaer, A., and Reski, R. (2004) Mapping of the *Physcomitrella patens* proteome. *Phytochemistry* 65, 1589-1607
- Saunders, M.J., Hepler, P.K. (1983) Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Funaria*. *Developmental Biology* 99:1, 41-49
- Schaaf, A. (2004) *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. als Bioreaktor: Proteinzielsteuerung und Produktion von rekombinantem humanem Blutgerinnungsfaktor IX. Dissertation an der Universität Freiburg
- Schaaf, A., Tintelnot, S., Baur, A., Reski, R., Gorr, G., and Decker, E.V. (2005) Use of endogenous signal sequences for transient production and efficient secretion by moss (*Physcomitrella patens*) cells. *BMC Biotechnology* 5, 30

- Schaefer, D.G., and Zryd, J.P. (2001) The Moss *Physcomitrella patens*, Now and then. *Plant Physiology* 127, 1430-1438
- Schillberg, S., Fischer, R. and Emans, N. (2003) Molecular farming of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 4, 794-805
- Schopfer, P., and Brennicke A. (1999) *Pflanzenphysiologie*. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 389-421
- Schulz, P., Hofman, A., Russo, V., Hartmann, E., Laloue, M., and Schwartzberg K. (2001) Cytokinin overproducing over mutants of *Physcomitrella patens* show increased riboside to base conversion. *Plant Physiology* 126, 1224-1231
- Schulz, P., Reski, R., Maldiney, R., Laloue, M., and Schwartzberg K. (2000) Kinetics of cytokinin production and bud formation in *Physcomitrella*: analysis of wild type, a developmental mutant and two of its *ipt* transgenics. *J. Plant Physiol.* 156, 768-774
- Schween G, Gorr G, Hohe A, Reski R. Unique tissue-specific cell cycle in *Physcomitrella*. *Plant Biol* 2003;5:50-8.
- Sedmak, J.J., and Grossberg, S.E. (1977) Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 79, 544-552
- Sitte, P., Zeigler, H., Ehrendorfer, F., and Bresinsky, A. Strasburger (2002) *Lehrbuch der Botanik*, Gustav-Fischer-Verlag
- Smith, H. (1975) *Phytochrome and photomorphogenesis*. McGraw-Hill, New York 22-53
- Smith, J. (1982) Plant Constituents Interfering with the Lowry Method of Protein Determination. *University of Oklahoma. Proc. Okla. Acad. Sci.* 62, 80-83
- Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., and Fischer, R. (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* 42, 583-590
- Storhas, W. (2003) *Bioverfahrensentwicklung*. Weinheim, Wiley-VCH
- Su, W., and Arias, R. (2003) Continuous plant cell perfusion culture : Bioreactor characterization and secreted enzyme production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95:1, 13-20
- Sztein, A.E., Cohen, J.D., Garcia de la Fuente, I., and Cooke, T.J. (1999) Auxin metabolism in mosses and liverworts. *American Journal of Botany* 86:11, 1544-1555
- Tabata, H. (2004) Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 87, 1-23
- Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Estes, M.K., Levine, M.M., and Arntzen, C.J. (2000) Human immune response to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 182, 302-305
- Thelander, M., Ollson, T., and Ronne H. (2005) Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*: *Journal of Experimental Botany* 56:412, 653-662
- Tiedtke, A. (2001) *Biotechnology with Protozoa*. In: *Biotechnology*, Ed.: H.-J. Rehm & G. Reed. Wiley-VCH, Weinheim 10, 137-149
- Tintelnot, S., Heintz, D., High, A.A., Wurtz, V., Decker, E.L., van Dorsselaer, A., Reski, R., and Sarnighausen, E. (2004) The moss (*Physcomitrella patens*) secretome: Phytohormones influence plant extracellular matrix proteins. *Plant Phys.*, submitted
- Treskatis, S.-K., Orgeldinger, V., Wolf, H., and Gilles, E.D. (1997) Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 191-201
- Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Fischer, R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21, 570-578
- Uenaka, H., Wada, M., and Kadota A. (2005) Four distinct photoreceptors contribute to light – induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 222, 623-631

- Ünyayar, S., Topcuoglu, S., and Ünyayar, A. (1996) A modified method for extraktion and identification of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and Zeatin produced by *Phanerochaete chrysosporum* ME446. *Bulg. J. Plant Physiol.* 22:3-4, 105-110
- Vandanjon, L., Rossignol, N., Jaouen, P., Roberts, J.M., and Quemeneur, F. (1999) Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems. *Biotechnol Bioeng.* 63, 1-9
- Wagner, R., and Elsayed, AE. (2004) GBF-Gesellschaft Fuer Biotechnologische Forschung mbH, Germany. Method, apparatus and system for separating eucaryotic or procaryotic cells or other particularly biological material from a suspension. Patent. WO 2004099362. 04. 11.18.
- Wang, L.T., Horgan, R., and Cove D. (1981) Cytokinins from the moss *Physcomitrella patens*: *Plant Physiol.* 68, 735-738
- Wang, L.T., Futers, T.S., McGeary, F., and Cove, D.J. (1984) Moss mutants and the analysis of cytokinin metabolism. In: *The biosynthesis and Metabolism of plant hormones* 105-135
- Werner, R.G. (1999) Transgenic manufactured biopharmaceuticals: a new method of drug manufacturing. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8, 731-736
- Werner, R.G. (2004) Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals *Journal of Biotechnology* 113, 171-182
- Weise, A., Rodriguez-Franco, M., Timm, B., Hermann, M., Link, S., Jost, W., and Gorr, G. (2006) Use of *Physcomitrella patens* actin 5' regions for high transgene expression: importance of 5' introns. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:6, 337-345
- Wiedmann, W.M. (1975) Wirkungsweise von Rotor-Stator Dispergiermaschinen. Dissertation an der Universität Stuttgart
- Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1393-1398
- Yasumura, Y., Moylan, E.C., and Langdale, J.A. (2005) A Conserved Transcription Factor Mediates Nuclear Control of Organelle Biogenesis in Anciently Diverged Land Plants. *The Plant Cell* 17, 1894-1907
- Yuen, C.T., Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Izquierdo, M., Wait, R., Gee, C.K., Gerson, P., Lloyd, P. and Cremata, J.A. (2003) Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *Br. J. Haematol.* 121, 511-526
- Zank, T., Zähringer, U., Beckmann, C., and Pohnert, G. (2002) Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of $\Delta 6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 31:3, 255-268
- Ziegler, R. and Egle, K. (1965) Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. *Beitr. Biol. Pflanz.* 41, 11-63

www.researchandmarkets.com/reports/39073 (Stand 12.12.06)

In Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Studien-, Seminar- und Diplomarbeiten angefertigt:

- Arancibia, M. B. (2006) Untersuchung zur physiologischen Charakterisierung des Mooses *Physcomitrella patens*. Seminararbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Coron, F. I. (2005) Untersuchungen über die langfristige kontinuierliche Kultivierung des rekombinanten Mooses *Physcomitrella patens* in einem 30 L Photobioreaktor für die Produktion von rhVEGF₁₂₁. Diplomarbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)

- Costa, R. (2004) Untersuchungen über die Produktivität vom rekombinaten Moos *Physcomitrella patens* in Photobioreaktoren. Diplomarbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Hauber, N. (2006) Untersuchungen über den Einfluss der Lichtqualität auf die Physiologie und Expression rekombinater Proteine des Mooses *Physcomitrella patens*. Diplomarbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Haunß, C. (2003) Optimierung der Kultivierung des Mooses *Physcomitrella patens* in Photobioreaktoren. Diplomarbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Martinez, L. (2004) Optimierung eines Perfusion-Photobioreaktors für rekombinate Linien von *Physcomitrella patens*. Diplomarbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Rother, M. (2005) Evaluation der Wirtschaftlichkeit von photoautotrophen Verfahren. Seminararbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)
- Sanchez, D. E. (2005) Charakterisierung der Differenzierung des Mooses *Physcomitrella patens* in Suspension. Seminararbeit am Institut für MVM an der Universität Karlsruhe (TH)

10 Symbolverzeichnis

Formeln und Symbole

a	Spezifische Phasengrenzfläche	m^{-1}
A	Oberfläche	m^2
AB	Ausbeute der Filtration	-
A_F	projizierte Oberfläche des Filaments	pixel^2
A_F	Oberfläche des Filterelements	m^2
$c_{Chl,a}$	Konzentration an Chlorophyll a	mg l^{-1}
$c_{Chl,b}$	Konzentration an Chlorophyll b	mg l^{-1}
$c_{Chl,ges}; c_{Chl}$	Gesamtchlorophyllkonzentration	mg l^{-1}
c_L	Sättigungskonzentration von einem Gas i in der Suspension	g l^{-1}
c_L^*	Konzentration von einem Gas i in der Suspension	g l^{-1}
c_{IAA}	IAA-Konzentration	$\mu\text{g ml}^{-1}$
$c_{Kinetin}$	Kinetin-Konzentration	$\mu\text{g ml}^{-1}$
$c_{Protease}$	Proteasekonzentration	NPU l^{-1}
$c_{Protein}$	Proteinkonzentration	g l^{-1}
c_s	Substratkonzentration	g l^{-1}
c_x	Biotrockenmassekonzentration	g l^{-1}
d	Durchmesser	m
D	Verdünnungsrate	d^{-1}
G	Gravitationskonstante	m s^{-2}
HGU_A	Oberfläche basierende hyphal growth unit	pixel^2
HGU_L	Länge basierende hyphal growth unit	pixel
H_i	Henry-Koeffizient für i	$\text{N}^{-1} \text{m}^2 \text{l g}^{-1}$
I_m	Mittlere Photonenflussdichte auf einem eindimensionalen Weg	$\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$
I_0	Photonenflussdichte	$\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$
\bar{I}_x	mittlere konvektive Impulsänderung	N
J_w	Filtrationsrate	m s^{-1}
K	Apparente Lichtextinktionskoeffizient	m^{-1}
kc	Spezifische Lichtextinktionskoeffizient der Biomasse	$\text{l g}^{-1} \text{m}^{-1}$
K_{fix}	Anschaffungskosten einer Anlage	€
k_o	Spezifische Lichtextinktionskoeffizient des Mediums	m^{-1}
kla	volumetrischen Stoffübergangskoeffizient	s^{-1}
\bar{K}_x	Kraft, die den Dispergiereffekt verursacht	N
K_{var}	variable Betriebskosten pro Anlage und Jahr	€ a^{-1}
L_F	Filamentlänge	pixel
m_{leer}	Masse des trockenen Siebes	g
m_p	Masse des Siebes plus trockene Zellen	g
m_x	Biomasse im Reaktor	g
N	Drehzahl	s^{-1}
$Ntip$	Anzahl an Filamenttips	-
p	Druck	N m^{-2}
p'	Break-even Preis	$\text{€ } \mu\text{g}^{-1}$

P_{turb}	Turbulenzleistung	W
Q	Produktion-Verbrauch im Bilanzraum	$g\ s^{-1}$
r	Korrelationskoeffizient	-
R_{CO_2}	Kohlenstoffdioxidfixierungsrate	$mol\ h^{-1}$
r_{CO_2}	Spezifische Kohlenstoffdioxidfixierungsrate	$mg\ g^{-1}\ h^{-1}$
r_{O_2}	Spezifische Sauerstoffproduktionsrate	$mg\ g^{-1}\ h^{-1}$
r_{VEGF}	Spezifische VEGF-Produktionsrate	$\mu g\ g^{-1}\ d^{-1}$
Re	Reynoldszahl	-
Re_s	Spaltreynoldszahl	-
s	Scherspaltweite	m
t	Zeit	s
t_{eul}	erwartete Lebensdauer einer Anlage	a
t_k	Kultivierungszeit	d
t_z	Verweilzeit im Rotor-Stator	s
u	Axiale Strömungsgeschwindigkeit im Reaktor	$m\ s^{-1}$
\dot{V}_i	Volumenstrom	$l\ s^{-1}$
V	Volumen	l
V_z	Verzweigungsgrad (Anzahl an Seitenarme/Länge)	μm^{-1}
v_x	Tangentiale mittlere Strömungsgeschwindigkeit im Spalt des Rotor-Stators	$m\ s^{-1}$
w	Mittlere axiale Strömungsgeschwindigkeit im QSF-Modul	$m\ s^{-1}$
x	Wegstrecke	m
x_p	Produktionsmenge pro Anlage und Jahr	$\mu g\ a^{-1}$
y_i	Molare Anteil von i im Gas	-
$Y_{x/i}$	Ausbeute an Biomasse aus dem Substrat i	-

Griechische Symbole

α	Geometrische Konstant bei der Beleuchtung	-
ρ	Dichte	$kg\ m^{-3}$
μ	Spezifische Wachstumsrate	d^{-1}
μ'	Dynamische Viskosität	$kg\ s^{-1}\ m^{-1}$
ν	Kinematische Viskosität	$m^2\ s^{-1}$
λ	Wellenlänge	nm
ε	Mittlere turbulente Leistungsdichte	$W\ kg^{-1}$
τ_{CFF}	Verweilzeit im QSF-Modul	s
\emptyset	Transport außerhalb des Bilanzraums	$g\ s^{-1}$

Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovineserumalbumin
cGMP	Current good manufacturing practice
Chl	Chlorophyll
CHO	Chinese hamster ovary

CIP	Cleaning in place
DMC	NN-Dimethylcasein
DOC	Deoxicholsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
EST	Expressed sequence tag
ETEC	Enterotoxigenische <i>Escherichia coli</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
FDA	U.S. Food and drug administration
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GMO	Genetisch modifizierte Organismen
GTR	Gastransferrate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
i ⁶ Ade	N6-(delta 2-isopentenyl)-Adenin
IAA	Indol-3-Essigsäure
LD	Tag/Nacht Rhythmus [h h ⁻¹]
LED	Leuchtdioden
LL	Kontinuierliche Beleuchtung
MeOH	Methanol
MTBSTFA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyl-trifluoroacetamid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
PCIB	(Parachlorophenoxy)isobutyl Säure
PFD	Photonenflussdichte [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Prot	Protein
QSF	Querstromfiltration
rhVEGF ₁₂₁	Rekombinant humane Isoform 121 vom VEGF
RIA	Radioaktiven Immunoassay
rpm	Revolutions per minute [min ⁻¹]
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SIM	Selected ion monitoring
SP	Minimaler zulässiger Wert des Permeatstroms [l s ⁻¹]
TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandruck [bar]
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene Sulphonsäure
USR	User requirement specifications
VEGF	Recombinant human vascular endothelial growth factor
vvm	Begasungsrate [l min ⁻¹] · Biosuspensionsvolumen [l]

11 Anhang

Anhang 1. Zusammensetzung der nicht selektiven Medien zur Überprüfung der Sterilität in Kultivierung

Standard Agar für Bakterien:

Pepton	15 g l ⁻¹
Hefeextrakt	3 g l ⁻¹
Glucose	1 g l ⁻¹
NaCl	6 g l ⁻¹
Agar-Agar	12 g l ⁻¹

Malzextraktagar für Pilze:

Malzextrakt	20 g l ⁻¹
Glucose	20 g l ⁻¹
Pepton	1 g l ⁻¹
Agar-Agar	15 g l ⁻¹

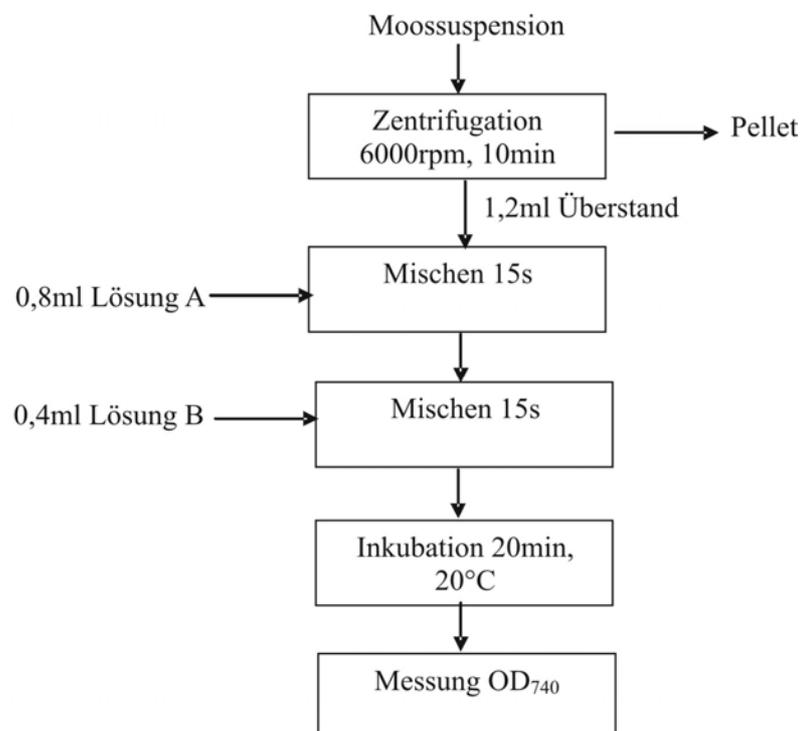
Anhang 2. Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphats

Stammlösung: 100ml 1mM KH₂PO₄

Immer frisch ansetzen:

Lösung A: 0,5g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O in 18 ml lösen und 7,5ml 3,75M H₂SO₄ zugeben.

Lösung B: 0,75g FeSO₄·7H₂O in 0,15ml 3,75M H₂SO₄ und 12,5ml Wasser lösen.



Anhang 3. Reagenzienzusammensetzung zur Bestimmung von VEGF mittels Sandwich-ELISA

Coating Buffer:

- Lösung A: 0,1M Na₂CO₃, 10,6 g l⁻¹
 - Lösung B: 0,2M NaHCO₃, 16,8 g l⁻¹
- ca.70 ml Lösung A + 175 ml Lösung B bis pH 9,6 erreicht wird

10x PBS:

- 1M KH₂PO₄ 20 ml
- 1M K₂HPO₄ 80 ml
- NaCl 87,66 g

auf 1 L auffüllen der 1x Puffer sollte einen pH von ca. 7,2 - 7,4 haben.

1M KH₂PO₄ 136,09 g l⁻¹

1M K₂HPO₄ 3H₂O 228,23 g l⁻¹

alle Chemikalien Merck, Darmstadt, Germany

Blockierungspuffer: 1% BSA in PBS

Waschpuffer: PBS/0,05% v/v TWEEN Puffer

ELISA-Platten: NUNC A/S, Roskilde, Denmark. NUNC-Immuno Module F16 MaxiSorp, zertifiziert. #467466A (mit Rahmen), #469914A (ohne Rahmen)

BSA: SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany #11926

TWEEN Puffer: Sigma, Co. P1379

Strep.-POD: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany #1089153.

Substrat (TMB):DUNN Labortechnik - Moss, INC. , USA #TMBE-500

anti-hVEGF (Capture): R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany #AF-293-NA

anti-hVEGF (Detection): R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany #BAF-293

rhVEGF₁₂₁(Standard): R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany #298-VS

Anhang 4. Zusammensetzung des Puffers für die Extraktion von Proteinen

PBS:

- KH₂PO₄ 0,27 g l⁻¹
- K₂HPO₄ 1,39 g l⁻¹
- NaCl 8,77 g l⁻¹

MES II:

Stammlösung:

- 100 mM MES/NaOH pH 6,2
- 100 mM Na-EDTA
- 100 mM MgCl₂

und immer frisch dazugeben:

- 2 mM Pefabloc von Sigma
- 0,1 % NP-40

Für 10ml Puffer:

- 1 ml MES
- 1 ml MgCl₂
- 1 ml EDTA
- 120 µl NP-40
- 4,8 mg Pefabloc
- bis 10 ml mit VE-Wasser

Anhang 5. Parameter der SDS-PAGE zur Proteintrennung von Physcomitrella patens

Trenngel:

Prozentsatz der Gele	12 % (für 10 ml Gel)	15% (für 10 ml Gel)
VE-H ₂ O	3,3 ml	2,3 ml
30 % Acrylamid-Mix	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

Sammelgel:

Stoff	Menge (für 3 ml Gel 5%ig)
VE-H ₂ O	2,1 ml
30 % Acrylamid-Mix	0,5 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,38 ml
10 % SDS	0,03 ml
10 % APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

Coomassie-Färbelösung:

- 0,25 g Coomassie brilliant Blue R250
- 100 ml Ethanol
- 100 ml dd H₂O

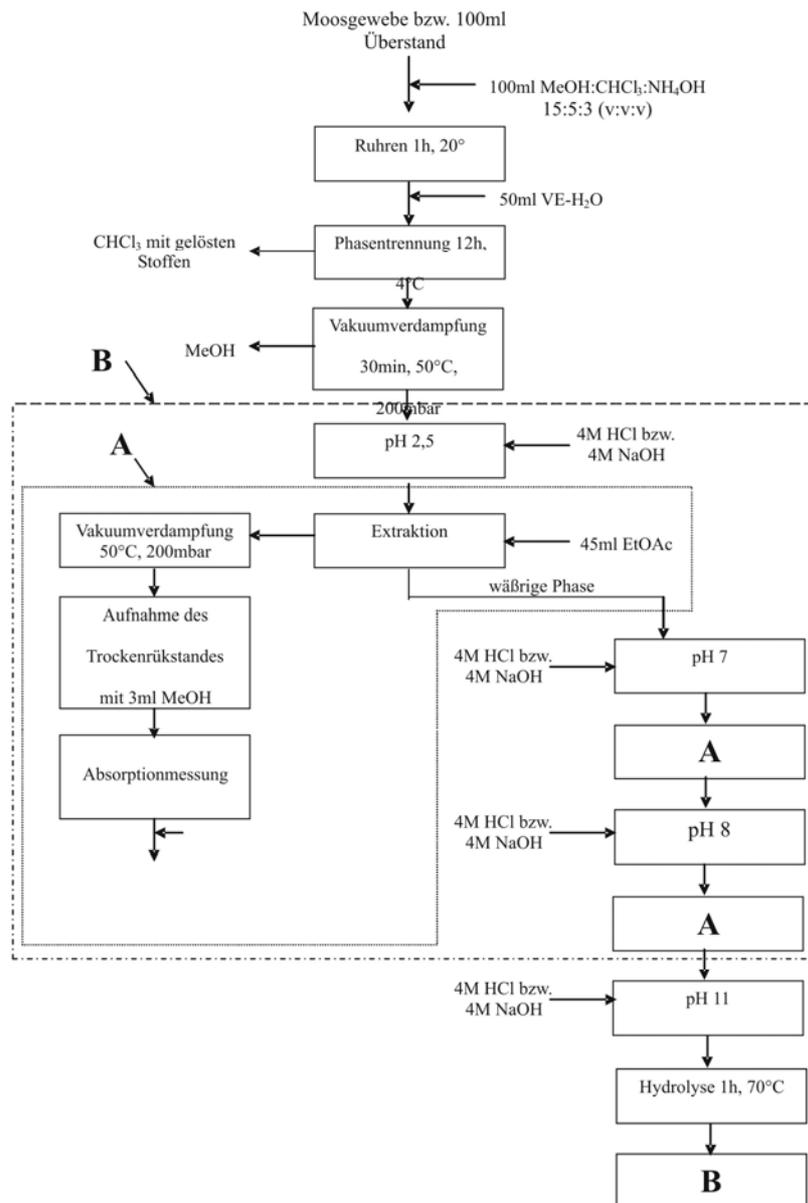
1 Stunde rühren, 100 ml Essigsäure zugeben und auf 250 ml mit VE-H₂O auffüllen.

Coomassie Entfärber-Lösung:

- 450 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 400 ml dd H₂O

mit VE-H₂O auf 1 Liter auffüllen.

Anhang 6. Spektrophotometrische Methode nach Ünyayar und Ergünzur zur Bestimmung von Phytohormonen



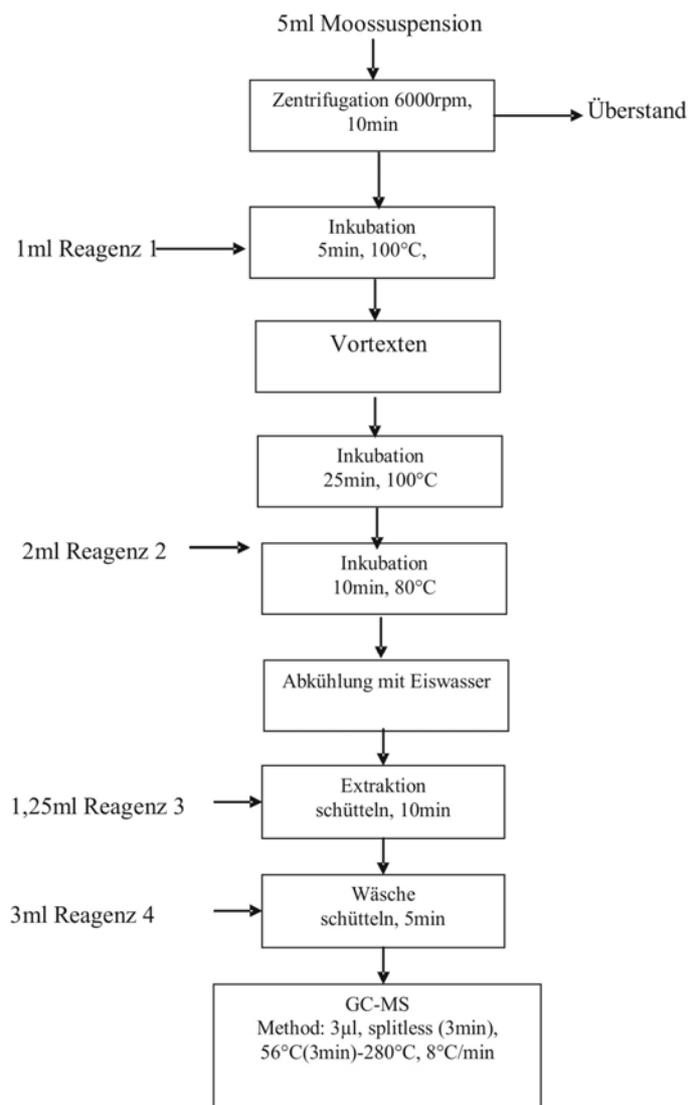
Anhang 7. Parameter der GC-MS-SIM zur Bestimmung von Phytohormonen

GC-SIM Programm zur Phytohormonanalyse:

Kapillarsäule	Varian CPSIL5CB 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Phase	100 % Dimethylpolysiloxan
Helium 5.0	1 ml/min
Injektor	Splitless 230 °C (3 min)
Injektionsvolumen	2 µl (5 µl-Spritze)
Ofentemperatur	200° (3 min) bis 270°C, 2°/min
Dauer	38 min
MS-Transferline	Aux B 260 °C
Solvent delay	5 min
Massenbereich	SIM

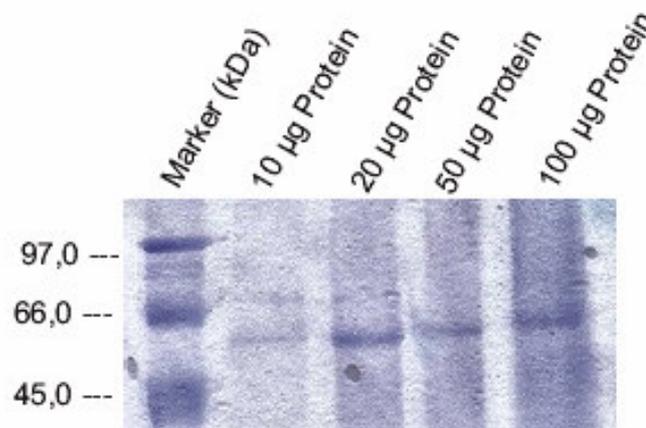
SIM-Ionen:

Molekül	Silylierungsgrad	Charakteristische Ionen m/z					Retentionszeit
IAA	2	403,2	346,2	244,2			12,2-13,6
Kinetin	2	443,2	386,2	338,2			?
¹⁶ Ade	1	317,2	302,2	274,2			11,6-12,2
Zeatin	3	561,4	546,3	504,3	430,3		29,25-29,6
Zeatin	2	447	432	390	315	302	27,1-27,6
ABA	1	363	321	225	190		?
ABA	2	492	477	225			20,3-20,4
5 α -Cholestan	-						24,1-24,9

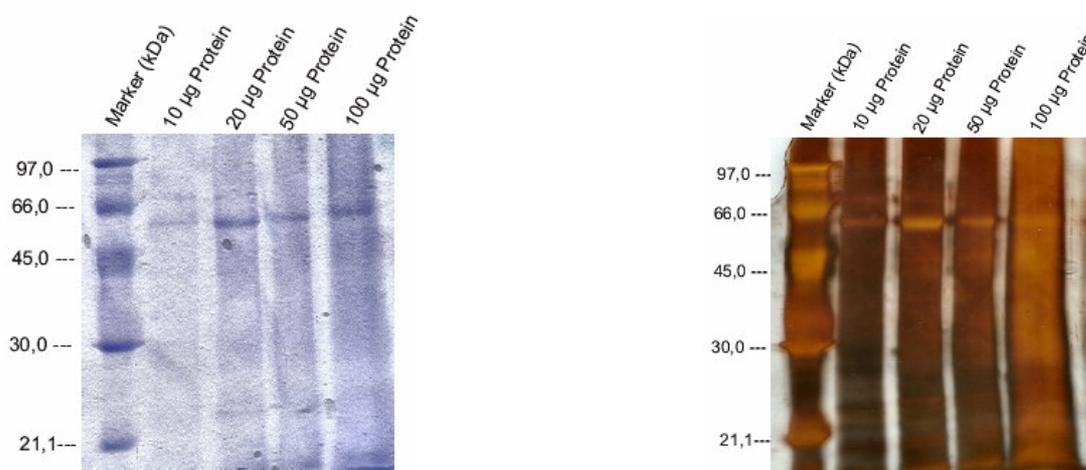
Anhang 8. Methode zur Bestimmung von Fettsäuren

Reagenz 1	45 g NaOH 150 ml Methanol 150 ml Wasser
Reagenz 2	325 ml 6 M HCl 275 ml Ethanol
Reagenz 3	200 ml Hexan 200 ml Methyl-tert-butylether (MTBE) C ₅ H ₁₂ O
Reagenz 4	10,8 g NaOH 900 ml Wasser

Anhang 9. Proteinauftrennung einer Probe von *Physcomitrella patens* auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung je nach Proteinzugabe



Anhang 10. Proteinauftrennung verschiedener Proteinladungen aus einer Probe von *Physcomitrella patens*; links auf einem 12 %igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung; rechts auf einem 12 %igen SDS-Gel mit Coomassie-Färbung und folgender Silberfärbung



Anhang 11. Elementarzusammensetzung des Knop-Mediums

	Im Reaktor [g]	Benötigt			
		LL [g g ⁻¹] %	HL [g g ⁻¹] %	LL [g]	HL [g]
C		42	45	0,126	0,135
H		6	6	0,018	0,018
O		44	45	0,132	0,135
N	0,379661017	1,5	3	0,0045	0,009
Ca	0,542372881	0,5	3	0,0015	0,009
P	0,182352941	0,2	0,4	0,0006	0,0012
K	0,648203711	1	2	0,003	0,006
S	0,123587343	0,1	0,9	0,0003	0,0027
Cl	0,381208054	0,01	1,5	0,00003	0,0045
Mg	0,07804878	0,1	0,2	0,0003	0,0006
I				0	0
Fe	0,034164029	0,01	0,05	0,00003	0,00015
F				0	0
Al				0	0
Si				0	0
Mn		0,005	0,025	0,000015	0,000075

In der Tabelle ist die Elementar-Zusammensetzung eines Modellbryophyts dargestellt. Die Spalte 3 und 4 zeigen die typischen unteren und oberen Grenzen für den Gehalt jedes Elements in der Pflanze. Die Spalten 5 und 6 zeigen die benötigte Menge für eine maximale beabsichtigte c_x : 0,1 g l⁻¹ im 3 L Photo-Bioreaktor. In der Spalte 2 ist die Menge an vorhandenen Elementen im 3 L Knop-Medium.

Die maximale spezifische CO₂-Aufnahmerate von *Physcomitrella patens* beträgt 50 mg g⁻¹ h⁻¹. Daher ist die maximale mögliche CO₂-Aufnahmerate bei einer c_x : 0,1 g l⁻¹ im 3 L Modell-Photo-Bioreaktor 0,36 g d⁻¹. Mit einem Luft-Volumenstrom (CO₂ 0,04%) von 500 ml min⁻¹ werden 0,6 g d⁻¹ von CO₂ zugeführt.

Moose sind in den letzten Jahren als interessante Expressionsplattform für rekombinante Proteine entdeckt worden. In dieser Arbeit wird ein Ansatz zur Produktion komplexer Glycoproteine mit dem Moos *Physcomitrella patens* in Photo-Bioreaktoren entwickelt und überprüft. Zunächst wird eine physiologische Charakterisierung der Moose vorgenommen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen werden Versuche in einem Modell-Photo-Bioreaktor bei streng kontrollierten Umweltbedingungen durchgeführt, die zur Gewinnung kinetischer Parameter der Moose für weitere Größenmaßstäbe dienen. In der nächsten Stufe wird ein Pilot-Rohr-Photo-Bioreaktor benutzt, um das Verhalten der Moose bei produktionsähnlichen Bedingungen zu ermitteln und die Unit-Operations und Prozessführung zu optimieren.

Auf diese Weise wird eine neue Produktionsstrategie für Protein-Pharmazeutika mit rekombinanten Moosen in Photo-Bioreaktoren eingeführt. Langfristige kontinuierliche Kultivierungen in Rohr-Photo-Bioreaktoren mit strikter Kontrolle der Kultivierungsbedingungen, mit Perfusion sowie mit Steuerung der Moosmorphologie zeichnen sich als ein einfach skalierbares, vielversprechendes neues Verfahren für *Molecular Farming* ab.
