

Inhaltsverzeichnis

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

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

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