

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Vorwort	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung und Arbeitshypothesen	3
3 Theoretische Grundlagen.....	5
3.1 Gelbfieber als Vertreter der vernachlässigten tropischen Krankheiten	5
3.2 Virus-like Particles (VLPs)	7
3.2.1 VLPs als flexible Plattform für den Weg der passiven Immunisierung	7
3.2.2 Herstellungsmöglichkeiten für VLPs	8
3.3 HEK 293T-Zelllinie als Produktionsorganismus der VLPs.....	9
3.4 Bioverfahrenstechnische Auslegung eines Bioreaktors.....	15
3.4.1 Bioprozesstechnik.....	15
3.4.2 Online Monitoring System für Bioreaktoren – dielektrische Spektroskopie	26
3.5 Arbeitsprozess	29
4 Materialien und Methoden	30
4.1 Materialien	30
4.1.1 Plasmide	30
4.1.2 Primer	30
4.1.3 Restriktionsenzyme	31
4.1.4 Zelllinien und Mikroorganismen.....	32
4.1.5 Medien	33
4.1.6 Geräte und Software	34
4.2 Molekularbiologische Methoden	37

4.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	37
4.2.2	Bestimmung der optischen Dichte (OD _{600 nm}).....	38
4.2.3	Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
4.2.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheit der Plasmid-DNA	39
4.2.5	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	40
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	40
4.2.7	Sequenzierung nach Sanger	41
4.3	Zellbiologische Methoden	41
4.3.1	Kultivierung von HEK 293T (/17 SF)-Zellen	41
4.3.2	Erstellung der Master- und Working Cell Bank.....	42
4.3.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	43
4.3.4	Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen	44
4.3.5	Färbung der Polyplex	46
4.4	Proteinbiochemische Methoden	46
4.4.1	SDS-PAGE.....	46
4.4.2	Western Blot.....	47
4.5	Analytische Methoden	48
4.5.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	48
4.5.2	Imaging Flow Cytometry Analyse (IFCM).....	48
4.5.3	Polyplexgrößenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung	49
4.5.4	Ermittlung der eGFP-Fluoreszenzintensität	49
4.5.5	Ermittlung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie	50
4.5.6	Glukose-/Laktatkonzentration in zellfreien Zellkulturüberständen	50
4.6	UpStream-Prozess	51
4.7	Aufreinigungsstrategie der produzierten Gelbfieber-VLPs	52
4.8	Statistische Analyse	53
5	Ergebnisse und Diskussion	55
5.1	Optimierung der pDNA-Produktion	55
5.1.1	Modell- und Gelbfieber-VLP-Plasmide	56
5.1.2	Mediumoptimierung für die pDNA-Produktion	57
5.1.3	Einfluss der Phosphat-Pufferkapazität auf die pDNA-Ausbeute	59
5.1.4	Einfluss der Temperatur auf die pDNA-Ausbeute	62
5.1.5	Analytik der Plasmid-DNA für Transfektionszwecke	63

5.1.6	Zusammenfassung und Potential der pDNA-Produktion	64
5.2	Optimierung der transienten Transfektion und Transfer in die Suspension.....	65
5.2.1	Einfluss von Medien auf das Wachstum und die Transfektionseffizienz	65
5.2.2	Transfektionskinetiken	69
5.2.3	Etablierung eines Transfektionsverfahrens für adhärente HEK-Zellen mittels DoE 70	
5.2.4	Transfer der transienten Transfektion in die Suspension	73
5.2.5	Bewertung der DoE Optimierungen	76
5.2.6	Die Begrenzung der transienten Transfektion durch das lineare Polyethylenimin .80	
5.2.7	Verifizierung des Transferkriteriums für eine Maßstabsvergrößerung	80
5.2.8	Einfluss der Polyplexgröße auf die Transfektionseffizienz.....	81
5.3	Etablierung einer Produktionsplattform für Gelbfieber-VLPs	85
5.3.1	Untersuchung verschiedener Transfektionsstrategien.....	85
5.3.2	Etablierung eines VLP-Produktionsprozesses im STR	116
5.4	Charakterisierung der Oberflächenproteine der produzierten Gelbfieber-VLPs ...	131
5.4.1	Spezifischer Nachweis der produzierten Gelbfieber-Oberflächenproteine	131
5.4.2	Quantifizierung der Gelbfieber-VLPs	137
5.4.3	Bildgebendes Verfahren zur Bestimmung der Größe der Gelbfieber-VLPs.....	140
5.4.4	Zusammenfassung und Bewertung.....	141
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	143
7	Literaturverzeichnis	147
Abbildungsverzeichnis		181
Tabellenverzeichnis		191
Anhang		195
Danksagung.....		201
Publikationen und Konferenzbeiträge		203