



Doctoral Thesis

Die Rolle von Serum bei der hydrodynamischen Belastung von tierischen Zellen im Bioreaktor Möglichkeiten der Serum-Reduktion

Author(s):

Jordan, Martin

Publication Date:

1993

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000888725> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

24. Mai 1993

DISS. ETH Nr 10098

**Die Rolle von Serum bei der hydrodynamischen Belastung von tierischen
Zellen im Bioreaktor; Möglichkeiten der Serum-Reduktion**

ABHANDLUNG
Zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
Martin Jordan
Dipl. Natw. ETH

geboren am 26. Oktober 1963
von Zwischbergen und Simplon, Wallis

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, Referent
Prof. Dr. F. Widmer, Korreferent
PD Dr. A. Einsele, Korreferent



1993

Prof. Dr. Hans M. Eppenberger
Institut für Zellbiologie
HPM - F 39
ETHZ Hönggerberg
CH-8093 ZÜRICH

I. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der schädigende Einfluss von mechanischem Scherstress auf Säugetierzellen in proteinfreiem Medium untersucht. Besonderer Wert wurde auf die Aufklärung der Mechanismen gelegt, durch welche Gasblasen auf Zellen letal wirken. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden für die Entwicklung einer neu konzipierten Blasenbegasung berücksichtigt. Die neue Blasenbegasung wurde ausführlich an Zellkulturen erprobt.

Bei der Kultivierung von tierischen Zellen spielt Serum sowohl für die Bereitstellung von notwendigen Wachstumsfaktoren als auch für die Erhöhung der Resistenz von Zellen gegenüber Scherkräften - insbesondere bei Schädigung durch aufsteigende und platzende Luftblasen - eine entscheidende Rolle. Demgegenüber aber ist Serum chemisch nicht definiert, nicht autoklavierbar und bei der Reinigung des Produktes unerwünscht. Zudem stellt Serum in Kulturen in grossem Massstab einen kostspieligen Zusatz dar. Bestrebungen, Serum aus dem Medium zu eliminieren, warfen die Frage auf, inwiefern dieser Schritt angesichts der Empfindlichkeit von Zellen gegenüber mechanischem Scherstress in grösseren Bioreaktoren zu neuen Problemen führt. Die Arbeit befasste sich mit der Lösung dieser Frage.

Die Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften wurde an zwei verschiedenen Zelltypen untersucht; an Hybridomzellen, welche als Produkt Antikörper synthetisieren und ausscheiden und an CHO Zellen. Es zeigte sich, dass Scherkräfte, die durch Rühren oder Luftblasen erzeugt wurden, die Kultivierung der Zellen nicht wesentlich beeinträchtigten, wenn im Medium 10% Serum vorhanden war. In einem dreiwöchigen Langzeitversuch im Bioreaktor nahm die spezifische Antikörperproduktivität infolge einer Selektion für nichtproduzierende Zellen rasch ab. Eine solche Abnahme konnte in den nachfolgenden Experimenten durch Subklonierung vermieden werden, indem nichtproduzierende Zellen mittels einer Fluoreszenzfärbung frühzeitig erkannt wurden.

Der Serumgehalt liess sich im RPMI-1640 Medium von 10% auf 1% reduzieren, ohne dass das Zellwachstum oder die Antikörperproduktion wesentlich vermindert wurden. Eine weitere Reduktion des Serumanteils hingegen erforderte eine Supplementierung des Mediums, z.B. mit Insulin und Transferrin, damit Zellwachstum überhaupt stattfand. Bei der Verwendung eines käuflichen, proteinfreien Mediums wurde in Zellkultur- und Spinnerflaschen rasches Zellwachstum erzielt, das durch Zugabe von Serum kaum weiter gesteigert werden konnte.

Experimente im Viskosimeter dienten zur Untersuchung des Zellverhaltens bei definierten Scherspannungen. Bei Hybridomzellen im proteinfreien Medium erhöhte sich die spezifische Absterberate bei Scherkräften bis zu 5.8N/m^2 nur minimal im Vergleich zu serumhaltigem Medium. CHO Zellen dagegen zeigten in Abwesenheit von Serum einen starken Anstieg der spezifischen Absterberate. Die Analyse der Partikelgrösse der Zellaggregate ergab eine gute Korrelation zwischen der erhöhten Empfindlichkeit der CHO Zellen gegenüber mechanischen Scherkräften und dem Anteil von Zellen in Aggregaten. Solche Aggregate kamen im serumfreien Medium besonders häufig vor, wobei ein Aggregat bis zu 100 Zellen enthalten konnte. Wurden die Aggregate durch die Zugabe von DNase I zum Medium vollständig aufgelöst, konnte während des Scherexperimentes keine Zunahme an abgestorbenen Zellen mehr festgestellt werden, was zeigte, dass der Schutzeffekt des Serums auf der Verminderung des Anteils von Zellen in Aggregaten beruhte.

Weitere Hinweise auf mechanische Zellschäden ergaben sich aus mikroskopischen Untersuchungen der Zellmorphologie. Hybridomzellen reagierten im proteinfreien Medium auf bestimmte mechanische Reize mit einer reversiblen Änderung der Zellmorphologie, im besonderen der Zelloberfläche. Die Veränderungen der Zelloberfläche wurden nicht unmittelbar während der mechanischen Beanspruchung, sondern frühestens 15 Sekunden später sichtbar und erreichten ihre ausgeprägteste Form nach etwa einer Minute. Nach 5 Minuten hingegen wiesen die Zellen in der Regel wieder ihre ursprüngliche Morphologie auf. Zur Induktion der Veränderung der Morphologie genügte entweder die Behandlung der Zellprobe mit einem Vortexrührer, das Zuführen von Luftblasen oder mehrmaliges Pipettieren. Die Veränderungen der Zellmorphologie liessen sich durch die Zugabe von Serum oder Pluronic F-68 vollständig unterdrücken.

Die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Luftblasen im proteinfreien Medium wurden experimentell eingehender untersucht. Dazu wurden Luftbläschen, gesteuert über einen Mikromanipulator, mit Zellen in einer Kulturflasche in Kontakt gebracht. Auf diese Weise wurde erstmals gezeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Luftblasen durch die Absättigung der Luftblase mit oberflächenaktiven Substanzen entscheidend mitbestimmt werden: Die Zellen wurden bei der Berührung mit einer nicht abgesättigten Luftblase unweigerlich zerstört. Erst die partielle Absättigung der Luftblase verhinderte die letalen Folgen der Kontaktbildung; jedoch blieben die Zellen nach einer allfälligen Berührung an der Luftblase haften und konnten nur schwer wieder abgelöst werden. An abgesättigten Luftblasen hafteten keine weiteren Zellen mehr. Das Absättigen mit Pluronic F-68, Serum oder mit oberflächenaktiven Stoffen aus Zellen erfolgte dann besonders rasch, wenn die Luftblase im Medium bewegt wurde.

Anhand dieser Ergebnisse erfordert eine zellschonende Blasenbegasung einen möglichst hohen Anteil an abgesättigten Blasen. Dies kann entweder durch Zugabe von oberflächenaktiven Stoffen wie Serum oder Pluronic F-68 oder durch sehr lange Verweilzeiten der Gasblasen im Bioreaktor erreicht werden. Letztere Bedingung war im Blasenbettreaktor, dessen Begasung sich bei der Kultivierung von Zellen im proteinfreien Medium bewährte, verwirklicht worden. Zwar liess die gering erhöhte Absterberate auf eine minimale Zellzerstörung durch Gasblasen schliessen, doch war der notwendige Gaseintrag in den Bioreaktor wegen des hohen Sauerstoffausnutzungsgrades so gering, dass zum proteinfreien Medium weder Schutzfaktoren noch Antischaummittel hinzugegeben werden mussten. Die spezifische Wachstums- sowie die Syntheserate der Hybridomzellen waren mit derjenigen einer schonend gerührten Kultur in einer Spinnerflasche vergleichbar, und es war kein Einfluss der Gasblasen auf diese Parameter festzustellen.

Summary

In this thesis, the behaviour of animal cells in protein-free media and in particular their sensitivity to fluid-mechanical forces has been investigated. Special attempts were made to identify the physical phenomena responsible for cell injury during sparging. A new bubble-aeration system, developed on the basis of the present data, was tested employing freely suspended cells.

Serum not only plays an important role in providing nutrients and growth factors, but also protects cells from fluid-mechanical damages, such as the detrimental effect of rising and bursting gas-bubbles. Serum, however, has the disadvantages that it is chemically undefined, is not autoclavable and may be an undesirable compound during down-stream product isolation. Moreover, serum is an expensive medium additive. It is still an open question whether the elimination of serum from the medium would be advantageous in large scale cell cultures, because as a consequence of shear sensitivity new problems would have to be expected. A main task of this thesis was to address this kind of question.

The shear sensitivity was investigated using two different cell lines: hybridoma cells, which produce and secrete antibodies, as well as CHO cells, which are frequently used as a mammalian producer cell line for exogenous proteins. Initial experiments demonstrated that agitation and sparging had little influence on cell growth in the presence of 10% serum. A drastic decrease, however, of antibody production was observed in cultures which were strongly agitated over a period of 3 weeks. The decreased antibody productivity was due to an overgrowth of a subpopulation of nonproducing cells. Loss of productivity was prevented in further experiments by subcloning of producing cells, whereby early detection of nonproducing cells was possible through an immunofluorescence staining method.

A reduction of serum in the RPMI-1640 medium from 10% to 1% had no influence on the specific growth rate nor the specific antibody productivity. At a lower serum concentration, however, the medium had to be supplemented, e.g. with insulin and transferrin. A commercially available protein-free medium showed excellent cell growth in spinner flasks for different hybridoma clones. Addition of serum to this medium showed no further improvement of cell growth.

The effect of nonturbulent shear stress up to 5.8 N/m^2 was investigated in a study using a viscosimeter. Hybridoma cells showed only a minimal increase in the specific death rate in serum-free as compared to serum-containing medium. In contrast, CHO cells were

much more shear sensitive in serum-free medium. Analysis of the particle size distribution in cultures of CHO cells demonstrated a strong correlation between the shear sensitivity and the percentage of cells being present as aggregates. Such cell aggregates were observed most frequently in serum-free medium and could contain as many as 100 cells. Experiments using DNase I in order to separate aggregates led to the conclusion that the protective effect of serum is based on the reduction of cell aggregation. DNase I could disperse the aggregates, resulting in cultures with only single cells. In cultures grown in the presence of DNase I, no increase of dead cells could be measured after shearing.

Further indications of a mechanical cell damage were obtained from microscopic studies of the cell morphology. Hybridoma cells in the protein-free medium reacted to mechanical stimulation with reversible changes of the morphology of the cell membrane. It was demonstrated that these changes were not caused during exposure to fluid-mechanical forces, but appeared as early as 15 seconds after the mechanical treatment. The morphological changes were most obvious after one minute, then the cells returned within 5 minutes to their original morphology. These changes could be induced either by treating a cell sample with a vortex mixer, by sparging air into the test tube or by repeated pipetting. The presence of serum or pluronic F-68 prevented changes of cellular morphology.

The interaction of air bubbles with cells was investigated in more detail. Single gas-bubbles were moved by a micromanipulator and could be used for making contact with individual cells under the microscope. Using this technique, for the first time it could be demonstrated that interactions between cells and gas-bubbles are mainly influenced by surfactants which have saturated the surface of the bubbles. For example, the contact of a cell with a non saturated bubble-surface always led to the destruction of the cell. Cell lysis after contact was only prevented if the bubble surface was partially saturated, in which case the cell strongly stuck to the bubble. Such cells are candidates to be carried into the foam region, where bubble rupture occurred and high shear forces could destroy cells. Bubbles with a saturated surface, however, showed no interactions with cells, and no more cells did adsorb. Bubbles could be saturated in the presence of serum, pluronic F-68 or "protein-free" cell culture supernatant. Surface saturation was accelerated by moving around the bubble in the medium.

In accordance with these results, a mild bubble aeration requires a high percentage of bubbles saturated by surfactants. This can be achieved either by addition of a high concentration of surfactants, which provides a rapid saturation of the sparged airbubbles, or by growing the cells in a bioreactor where the bubbles have a prolonged resting time.

A prolonged resting time allows the problem of unsaturated fresh bubbles to be overcome. This was achieved with the "Blasenbettreaktor" (bubble bed bioreactor). The newly adapted aeration was shown to be very gentle and well suited for cell cultivation in a protein-free medium. The death rate was only slightly increased, probably due to unsaturated bubbles in the nozzle region. As a consequence of the high oxygen transfer rate, the air flow rate was small enough to prevent foam formation and subsequent cell damage without any addition of protecting factors or antifoam agents. The specific growth rate and the specific antibody productivity in the "Blasenbettreaktor" were on the one hand identical to that obtained in control culture in a mild agitated spinner flask, and there was on the other hand no measurable effect of bubble aeration on these parameters.