
**Analyse des differentiellen Proteoms und
Phosphoproteoms von *Chinese Hamster Ovary*-Zellen
in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung**

Dissertation

zur Erlangung des Titels Doktor der Naturwissenschaft

der

Universität Bielefeld

Vorgelegt von

Louise Schelleter

Master of Science

Geboren am 11.05.1992

in Gütersloh – Deutschland

April 2021

Diese Arbeit wurde mit der Betreuung von Dr. Raimund Hoffrogge in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Noll angefertigt.

1. Gutachter Prof. Thomas Noll
AG Zellkulturtechnik
Technische Fakultät
Universität Bielefeld

2. Gutachter Prof. Karsten Niehaus
AG Proteom- und Metabolomforschung
Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert oder auf Konferenzen in Form von Vorträgen und Posterbeiträgen vorgestellt worden:

Peer-reviewed Zeitschriften:

- 06/2020 **Schelleter, Louise;** Hertel, Oliver; Antar, Shareef Jarvi; Scherling, Christian; Lättig, Jens; Noll, Thomas; Hoffrogge, Raimund (2020): *A Positive Pressure Workstation for Semi Automated Peptide Purification of Complex Proteomic Samples (online ahead of print)*.
- 10/2019 **Schelleter, Louise;** Albaum, Stefan; Walter, Stefan; Noll, Thomas; Hoffrogge, Raimund (2019): *Clonal variations in CHO IGF signaling investigated by SILAC-based phosphoproteomics and LFQ-MS*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (19), S. 8127–8143.

Conference proceedings/ Tagungsberichte:

- 04/2020 *Abstracts from the 26th European Society for Animal Cell Technology Meeting - Cell culture technologies: bridging academia and industry to provide solutions for patients*. BMC Proc 14, 5 (2020).
Schelleter, Louise; Noll, Thomas; Hoffrogge, Raimund: *Media supplement induced signaling in CHO cells via triple SILAC-MS*.
- 03/2018 *Abstracts from the 25th European Society for Animal Cell Technology Meeting: Cell Technologies for Innovative Therapies*. BMC Proc 12, 3 (2018).
Brachtvogel, Louise; Walter, Stefan; Noll, Thomas; Hoffrogge, Raimund: *MS-SILAC approach for phosphoproteomics of IGF signaling in producer CHO cells*.

Vorträge auf wissenschaftlichen Konferenzen

- 09/2018 Protein Rainbow Workshop, *Signaling studies via quantitative phosphoproteomics*, DDZ, Düsseldorf/Deutschland

Poster Präsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen

- 03/2020 53. DGMS Jahrestagung, Münster/Deutschland
- 09/2019 18th *Human Proteome Organization (HUPO) world congress*, Adelaide/Australien
- 05/2019 26th *European Society of Animal Cell Technology (ESACT) meeting*, Copenhagen/Dänemark
- 03/2019 XIII. *Annual congress of the EuPA*, Proteomic forum, Potsdam/Deutschland
- 08/2018 22nd *International Mass Spectrometry Conference (IMSC)*, Florence/Italien
- 07/2017 9th *MaxQuant summer school*, Berlin/Deutschland
- 05/2017 25th *European Society of Animal Cell Technology (ESACT) meeting*, Lausanne/Schweiz
- 11/2016 *Conference on biomolecule analysis*, MPI, Münster/Deutschland

Darüber hinaus wurden im Rahmen von Kooperationen weitere Arbeiten durchgeführt, die sich teilweise noch im Veröffentlichungsprozess befinden:

- 03/2021 Wedde, Severin; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Sproß, Jens; Gröger, Harald: *Adding in vivo Protein Circularization to the Toolbox of Protein Engineering of Oxidoreductases (in preparation)*.
- 03/2021 Romanova, Nadiya; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Noll, Thomas (2020): *Hyperosmolality in CHO Culture: Effects on Proteome*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology (in preparation)*.
- 03/2021 Herrmann, Leonie; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Niehaus, Karsten; Rudolph, Volker; Farr, Martin (2020): *Human Coxsackie- and adenovirus receptor is a putative target of neutrophil elastase-mediated shedding*. In: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology (resubmitted)*.
- 03/2021 Keysberg, Christoph; Hertel, Oliver; **Schelleter, Louise**; Busche, Tobias; Sorchart, Chiara; Kalinowski, Jörn; Hoffrogge, Raimund; Otte, Kerstin; Noll, Thomas (2020): *Initial Characterization of CHO Exosomes: Evaluating Separation Techniques, Protein and Small ncRNA Content*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology (accepted)*.
- 07/2020 Blifernez-Klasse, Olga; Berger, Hanna; Mittmann, Birgit Gerlinde Katharina; Klassen, Viktor; **Schelleter, Louise**; Buchholz, Tatjana; Baier, Thomas; Soleimani, Maryna; Wobbe, Lutz; Kruse, Olaf (2020): *A gene regulatory network for antenna size control in carbon dioxide-deprived Chlamydomonas cells*. In: *The Plant Cell (accepted)*.

It always seems impossible, until it's done.

- Nelson Mandela

Inhalt

Publikationen	6
Zusammenfassung.....	14
Abstract.....	16
1. Theoretischer Hintergrund	18
1.1. Die zelluläre Signaltransduktion in tierischen Zellen	18
1.1.1. mTOR-Signaling.....	18
1.1.2. Verbindung zu weiteren Signalwegen	20
1.2. Massenspektrometrie	23
1.2.1. Alternative Messmethoden und Weiterentwicklungen	25
1.3. Die Proteomanalyse	26
1.3.1. Limitierungen der Probenvorbereitung	26
1.3.2. Proteinquantifizierungs-Methoden.....	28
1.3.3. Die Mess- und Auswertestrategie	30
1.4. Phosphoproteomanalyse.....	32
1.4.1. Phosphopeptidanreicherung	33
1.4.2. Die Tiefe der Analyse	35
1.4.3. Auswertung und Interpretation der Daten.....	36
1.5. Produktion rekombinanter Pharmazeutika in CHO-Zellen.....	37
1.5.1. Die Kultivierung von tierischen Suspensionszellen.....	37
1.5.2. Die Editierung des Genoms und spezifische Datenbanken.....	38
1.5.3. Der Marktwert.....	41
1.5.4. Der Metabolismus im Kontext der Medienzusammensetzung	41
1.5.5. Das intrazelluläre Proteom.....	47
1.5.6. <i>Phosphoproteomics</i> und Signaling.....	49
1.5.7. Die epigenetische Regulierung der Genexpression.....	50
1.5.8. Glykosylierungen und Auswirkungen auf die Produktqualität	52
1.5.9. MicroRNAs zur Prozessoptimierung	52
1.5.10. <i>Host Cell Protein</i> und <i>Sekretomics</i>	53
1.6. Strategien zur Target-Identifizierung	54
2. Zielsetzung	58
3. Material und Methoden.....	60
3.1. Zellkultur.....	60
3.1.1. Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedium.....	60
3.1.2. SILAC Medium.....	61
3.1.3. Kryokonservierung.....	62
3.1.4. SILAC Hauptkultivierungen	62
3.1.5. Bioreaktorkultivierungen	63
3.1.6. Induktionen	63

3.2.	Kultivierungsbezogene Analytik	64
3.2.1.	Zelldichte	64
3.2.2.	Glukose- und Laktat-Bestimmung.....	64
3.2.3.	Antikörper- und Aminosäurebestimmung	64
3.2.4.	Zellzyklus	65
3.2.5.	Wachstumsraten und Produktbildungsgeschwindigkeiten	66
3.3.	Proteinextraktion und Quantifizierung	67
3.4.	Gelbasierte Proteinanalytik	71
3.5.	Probenvorbereitung Massenspektrometrie	74
3.5.1.	Enzymatischer Verdau.....	74
3.5.2.	Peptidaufreinigung	75
3.5.3.	Peptidfraktionierung	76
3.5.4.	Phosphopeptid-Anreicherung	77
3.5.5.	Peptidquantifizierung	78
3.5.6.	Massenspektrometrische Messung	78
3.6.	Bioinformatik	80
3.6.1.	Proteome Discoverer	80
3.6.2.	MaxQuant	81
3.6.3.	Perseus.....	82
3.6.4.	Visualisierung von Expressionsdaten.....	83
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	84
4.1.	Optimierungsschwerpunkte des Probenvorbereitungs-Workflows	84
4.1.1.	Evaluierung von entscheidenden Parametern der Probenvorbereitung	84
4.1.2.	Semi-automatische Peptidaufreinigung.....	88
4.1.3.	Methodenetablierung für ein sensitives nLC-Orbitrap MS-System	91
4.1.4.	Phosphoproteom-Messungen über verschiedenen Massenspektrometer.....	96
4.1.5.	Datenbanken für CHO-Zellen	98
4.1.6.	Analyse des <i>deep proteomes</i>	99
4.2.	Proteom- und Signaltransduktions-Analysen von CHO-Kultivierungen	102
4.2.1.	Proteomcharakterisierung von CHO-XL99-Zelllinien	104
4.2.2.	IGF-Signaling in CHO-Zellen.....	115
4.2.3.	Effekte einer L-Carnosin-Supplementierung auf CHO-Zelllinien	150
4.3.	Das CHO-K1 Proteom im Bioreaktorkultivierungs-Verlauf	180
4.3.1.	Proteomanalyse von CHO-K1 <i>fedbatch</i> -Kultivierungen.....	180
4.3.2.	Vergleich von <i>batch</i> - und <i>fedbatch</i> -Kultivierungen auf Proteomebene	188
4.3.3.	Spezifische Auswertung von Proteinprofilen im Kultivierungsverlauf.....	195
4.3.4.	PTM-basierte Optimierungsstrategien einer CHO-Kultivierung.....	207
5.	Fazit und Ausblick.....	212
5.1.	Der <i>Phospho/Proteomics</i> -Workflow als Basis für aussagekräftige Analysen.....	212

5.2.	Charakterisierung und Anwendung des Phospho/Proteoms von CHO-Zellen	214
5.3.	Erweiterung der Methoden zur Protein- oder Proteom-Analytik.....	218
6.	Anhang.....	220
6.1.	Weitere Daten	220
6.1.1.	Peptidkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop One	220
6.1.2.	PRIDE-Datensicherung und Veröffentlichung	220
6.2.	Weitere Abbildung und Tabellen.....	221
6.2.1.	Probenvorbereitung.....	221
6.2.2.	CHO-XL99	222
6.2.3.	CHO-K1	226
	Abkürzungsverzeichnisse	228
	<i>Curriculum Vitae</i>	233
	Danksagung.....	235
	Erklärung	237
	Literaturverzeichnis	239

Zusammenfassung

Die Relevanz der *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zelllinien für die pharmazeutische Industrie zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAb) bleibt aufgrund eines kontinuierlich ansteigenden Marktvolumens hoch. Optimierungen der teuren Kultivierungsprozesse konnten vor allem empirisch über vergleichende Kultivierungen mit spezifischer Analytik und teilweise durch *omics*-Analysen erreicht werden. Neben *Metabolomics* und *Transcriptomics* sind nur wenige aktuelle hoch-qualitative Analysen des intrazellulären Proteoms und Phosphoproteoms von CHO-Zellen publiziert. Massenspektrometrie (MS)-basierte *Proteomics*-Ansätze haben, im Gegensatz zu anderen *omics*-Techniken, jedoch das einzigartige Potential zur Analyse der Abundanzen von Proteinen als die „final“ bioaktiven Bestandteile der Zellen sowie der post-translationalen Modifikationen (PTM). Die Analyse von PTMs hat eine besondere Bedeutung, da diese Auswirkungen auf Proteinaktivität sowie Lokalisierung und darüber auf spezifische Funktionen des Proteins haben. Besonders über reversible Phosphorylierungsmechanismen erfolgen schnelle Signalweiterleitungen von außen, also über Faktoren im Zellkulturmedium, in die Zelle hinein, wo dann zum Beispiel über Regulierung der Translation und Transkription langfristige Änderungen der Kultivierungsparameter zu einer veränderten Prozessperformance führen.

Für eine Entwicklung gezielter Prozessoptimierungs-Strategien auf Ebene der PTM war zunächst ein verbessertes zelluläres Verständnis der hier verwendeten CHO-Zelllinien erforderlich. Durch eine Proteomcharakterisierung einer mAb-CHO-Zelllinie über *Label-Free Quantification* (LFQ)-MS konnten deutliche Unterschiede im Bereich der Redox- und Autophagie-Regulierung in der exponentiellen Phase im Vergleich zur entsprechenden parentalen CHO-XL99-Zelllinie ermittelt werden, was in Zusammenhang zum mTOR-Signaling und einem ineffizienteren Stoffwechsel dieser Zelllinie gebracht wurde. Sowohl über SILAC-MS als auch über Westernblot konnte ein aktives mTOR-Signaling in der exponentiellen Phase von CHO-Zellen analysiert werden. Eine zusätzliche *Insulin-like Growth Factor* (IGF)-induzierte Aktivierung von mTOR- und MAPK-Signaling führte unter anderem über Aktivierung des glykolytischen Phänotyps zu reduzierten zellspezifischen Produktivitäten (q_p) von zwei mAb-produzierenden CHO-Zelllinien und unterschiedlichen Effekten auf die maximale Zelldichte. In *Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture* (SILAC)-MS-Experimenten konnte über *Phosphoproteomics* erstmals ein IGF-abhängiges Signaling in CHO analysiert werden, wobei sowohl ein für alle nah-verwandten Zelllinien uniformes Signaling innerhalb von 5 Minuten, aber auch Zelllinien-spezifische Phosphorylierungsänderungen beobachtet werden konnten.

Eine zusätzliche Glutamin-Supplementierung der auf dem Glutamin Synthetase-Selektionssystem basierenden mAb-CHO führte zu späten inversen Effekten von IGF auf die maximale Zelldichte. Nach weiterer Methoden-Etablierung der nLC-MS/MS-basierten *Phospho/Proteomics* konnte über die Analyse von Zeitreihen jedoch ein ähnliches dynamisches IGF-Signaling innerhalb von 60 min in Medium mit und ohne zusätzliche Glutamin-Supplementierung beobachtet werden. Zusammenfassend führte IGF in der exponentiellen Phase zu einer Aktivierung von mTOR-*downstream* Targets und über ungeklärte Mechanismen zu einer späten Reduktion der q_p . Im

Gegensatz dazu sollte eine vermeintliche Inhibierung von mTOR evaluiert werden. Ähnlich wie der klassische mTOR-Inhibitor Rapamycin, soll auch das aus der Krebsforschung bekannte Dipeptid β -*alanyl-L-histidine* (Carnosin) inhibierende Effekte auf die Glykolyse haben und Autophagie-aktivierend wirken. Um eine darüber vermutete Verbesserung der Prozessperformance zu erzielen, wurde Carnosin spezifisch in der exponentiellen Phase supplementiert und erstmals Phospho-/Proteomanalysen durchgeführt, über die Hinweise auf ein frühes inhibiertes mTOR-Signaling gefunden werden konnten. Eine beobachtete Carnosin-vermittelte Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität bis in die Absterbephase konnte über eine differentielle Proteomanalyse der entsprechenden späten Zeitpunkte charakterisiert werden. Eine Hochregulierung von Targets der Transkriptionsfaktoren ATF4 und HIF1 72 h nach Carnosin-Supplementierung gab Hinweise auf ein reaktiviertes mTOR-Signaling in der späten Wachstumsphase und darüber einen Zusammenhang zu dem wünschenswerten Phänotyp der verlängerten zellspezifischen Produktivität. Zusammenfassend führte eine Carnosin-abhängige frühe mTOR-Inhibierung über sekundäre Mechanismen zu einer späteren Reaktivierung von mTOR und einer erhöhten q_p in der späten Kultivierungsphase des *batch*-Prozesses, weshalb ein hohes Potential in der Anwendung in *fedbatch*-Verfahren vermutet wird.

Eine erste Charakterisierung von Industrie-relevanten Bioreaktorkultivierungen sollte über LFQ-*Proteomics* erfolgen, wobei eine Steigerung der maximalen Zelldichte und Verlängerung des Kultivierungsprozesses der parentalen CHO-K1-Zelllinie zunächst über die Zugabe von *feed*-Medium erreicht wurde. Der gesamte *fedbatch*-Kultivierungsverlauf wurde erstmals mit einem entsprechenden *batch*-Prozess auf Proteomebene verglichen. Viele der evaluierten verzögerten Proteinprofile konnten auf die verlängerte Versorgung mit Nährstoffen zurückgeführt werden. Prozessstrategie-spezifische Unterschiede konnten hingegen in der Expression von Signaling-Komponenten und metabolischen Proteinen im Acetyl-CoA-Stoffwechsel mit möglichen Auswirkungen auf die Epigenetik identifiziert werden. Die Relevanz der Analyse von PTMs, insbesondere Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen konnte so verdeutlicht werden. Über eine detaillierte Untersuchung solcher PTMs mittels Gel-basierter *Proteomics* konnten erstmals Hinweise auf einen *chaperon code* am Beispiel des Modifizierungsmusters von HSPA5 in CHO-Zellen ermittelt werden.

In dieser Arbeit konnte an verschiedenen Stellen ein hohes Potential in der gezielten Modulierung von post-translationalen Modifikationen und Signalwegen zur Beeinflussung der Proteinaktivität evaluiert werden. Die Validierung vermuteter Effekte konnte nach erster Proteom- und Phosphoproteom-Charakterisierung der CHO-Zelllinien über die gezielte Anwendung von Carnosin erfolgen. Sowohl die entwickelten Workflows als auch die erhobenen Daten können für zukünftige Optimierungen von Industrie-relevanten Prozessen genutzt werden.

Abstract

The relevance of the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines for pharmaceutical industry for the production of monoclonal antibodies (mAb) remains high due to a continuously increasing market volume. Optimization of expensive cultivation processes were mostly achieved empirically through comparative cultivation with specific analytics and partly through omics-studies. Besides metabolomics and transcriptomics, only a few current high-quality studies of the intracellular proteome and phosphoproteome of CHO cells have been published. In contrast to other omics techniques, mass spectrometry (MS)-based proteomics approaches have the unique potential to analyze the abundances of proteins as the “final” bioactive components of the cells as well as the post-translational modifications (PTM). The analysis of PTMs is of particular importance due to its impact on protein activity, localization and hence specific functions of the protein. In particular, reversible phosphorylation mechanisms are used to transmit signals quickly from outside via factors in the cell culture medium into the cell. Here long-term changes in cultivation parameters lead to an altered cellular behaviour and process performance, for example through regulation of translational and transcriptional processes.

For the development of targeted process optimization strategies at PTM level, an improved cellular understanding of CHO cell lines utilized was initially required. A first proteome characterization of a mAb-CHO cell line via label-free quantification (LFQ)-MS uncovered clear differences in regulation of redox homeostasis and autophagy in the exponential phase compared to the corresponding parental CHO-XL99 cell line, related to mTOR-signaling and a more inefficient metabolism of this cell line. Active mTOR-signaling in the exponential phase of CHO cells was analyzed using both, SILAC-MS and Western blot. An additional insulin-like growth factor (IGF)-induced activation of mTOR- and MAPK-signaling included activation of the glycolytic phenotype and resulted in reduced cell-specific productivities (q_p) of two mAb-producing CHO cell lines and different effects on maximum cell density. In Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture (SILAC)-MS experiments IGF-dependent signaling was analyzed via phosphoproteomics in CHO for the first time, with signaling that is uniform for all closely related cell lines within 5 minutes, as well as observed cell line-specific changes in phosphorylation. Additional glutamine supplementation of the mAb-CHO based on the glutamine synthetase selection system led to late inverse effects of IGF on maximum cell density. After further establishment of the nLC-MS/MS-based phospho/proteome analysis a similar dynamic IGF-signaling was observed within 60 min in medium with and without additional glutamine supplementation via analysis of time series. In summary, IGF led to an activation of mTOR-downstream targets in the exponential phase and, via unexplained mechanisms, to a late reduction in q_p . In contrast, a supposed inhibition of mTOR should be evaluated. Similar to the classic mTOR-inhibitor rapamycin, the dipeptide β -alanyl-L-histidine (carnosine), known from cancer research, is said to have an inhibiting effect on glycolysis

and to activate autophagy. In order to achieve a supposed improvement in process performance, carnosine was specifically supplemented in the exponential phase and, for the first time, phospho/proteome analyzes were carried out which were used to find indications of an early inhibited mTOR-signaling. An observed carnosine-mediated stabilization of cell-specific productivity up to death phase could be characterized by a differential proteome analysis of the corresponding late cultivation phase. An upregulation of ATF4 and HIF1 transcription factor targets 72 h after carnosine supplementation indicated a reactivated mTOR-signaling in the late growth phase and a connection to the desirable phenotype of prolonged cell-specific productivity. In summary, a carnosine-dependent early mTOR-inhibition led to a later reactivation of mTOR via unknown mechanisms and an increased q_p in the late cultivation phase of the batch process, which is why a high potential of carnosin-induction on fedbatch processes is assumed.

An initial characterization of industry-relevant bioreactor cultivations was carried out using LFQ-proteomics, whereby an increase in the maximum cell density and an extension of the cultivation process of the parental CHO-K1 cell line was achieved by adding feed medium as an example. The entire fedbatch cultivation process was compared for the first time with a corresponding batch process at the proteome level. Many of the observed delayed protein profiles were traced back to the prolonged supply of nutrients. Process strategy-specific differences, however, could be identified in the expression of signaling components and metabolic proteins in acetyl-CoA metabolism with possible effects on epigenetic regulation. The relevance of PTM analysis, especially acetylation, methylation and phosphorylation, could thus be made clear. A detailed investigation of such PTMs using gel-based proteomics was the first time to identify indications of a chaperone code in CHO cells using the modification pattern of HSPA5 as an example.

In this work, a high potential of targeted modulation of post-translational modifications and signaling pathways to influence protein activity could be evaluated at various points. After a first proteome and phosphoproteome characterization of the CHO cell lines the validation of suspected effects could be carried out via the targeted application of carnosine. Both, the developed workflows and the collected data, can be used for future optimizations of industry-relevant processes.

1. Theoretischer Hintergrund

1.1. Die zelluläre Signaltransduktion in tierischen Zellen

Eine intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt zum Teil über eine reversible Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen, die häufig zu einer Aktivierung des Proteins führt. Über die Phosphorylierung, als post-translationale Modifikation (PTM), werden im Wesentlichen alle zellulären Prozesse reguliert (Humphrey *et al.* 2015b). Zwei Drittel aller Proteine enthalten ein oder mehrere Phosphorylierungsstellen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt phosphoryliert vorliegen können (Sharma *et al.* 2014). Die Analyse dieser Modifizierung ist somit für ein zelluläres Verständnis wesentlich. Kinasen katalysieren unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) oder Guanosintriphosphat (GTP) die Phosphorylierung der Hydroxy-Gruppe der entsprechenden Aminosäure im Protein. Dynamische Prozesse, wie die Signaltransduktion, bestehen außerdem aus der Dephosphorylierung der Proteine durch Phosphatasen, so dass über diese beiden Mechanismen eine entsprechende Ein- bzw. Ausschaltung der Aktivität des Phosphoproteins hervorgerufen werden kann (Leitner *et al.* 2011). Durch einen extrazellulären Reiz, zum Beispiel ein Wachstumsfaktor, kann nach Bindung eines entsprechenden Rezeptors auf der Zelloberfläche eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert werden, die zur Phosphorylierungskaskade und Signalverstärkung im Cytosol der Zellen führt. Das Signal wird in den Zellkern weitergeleitet und führt dort zum Beispiel zur veränderten Transkription oder löst sogenannte *feedback* Signale aus, die zur Beendigung des Signalings führen können (Geetha *et al.* 2012).

Neben der Phosphorylierung sind insgesamt über 400 verschiedene Proteinmodifizierungen beschrieben (Khoury *et al.* 2011), welche zum Beispiel für Funktion, Aktivität, Lokalisierung und Interaktion des Proteins essentiell sein können (Humphrey *et al.* 2015b).

1.1.1. mTOR-Signaling

Ein wichtiges Schlüsselenzym, um intra- und extrazelluläre Signale zu verarbeiten ist das *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR). Es reguliert unter anderem Wachstum, demnach die Proteinsynthese und Proliferation. Die Größe einer Zelle wird über eine Balance im Voranschreiten des Zellzyklus zur Proliferation und dem zellulären Wachstum bestimmt. Das Protein mTOR ist maßgeblich an der Regulierung der Zellgröße beteiligt. Eine mTOR-vermittelte Erhöhung der Proteinsynthese-Kapazität erfolgt durch eine erhöhte mRNA-Translation, wobei die Mechanismen der Regulierung spezifischer mRNA zu großen Teilen unbekannt sind (Tcherkezian *et al.* 2014). Die Kinase mTOR kommt in der Zelle in zwei verschiedenen Proteinkomplexen vor, dem mTOR-Komplex 1 (mTOR-C1) und 2 (mTOR-C2). Die beiden Komplexe sind zum Beispiel am *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF)-Signalweg beteiligt (Abbildung 1).

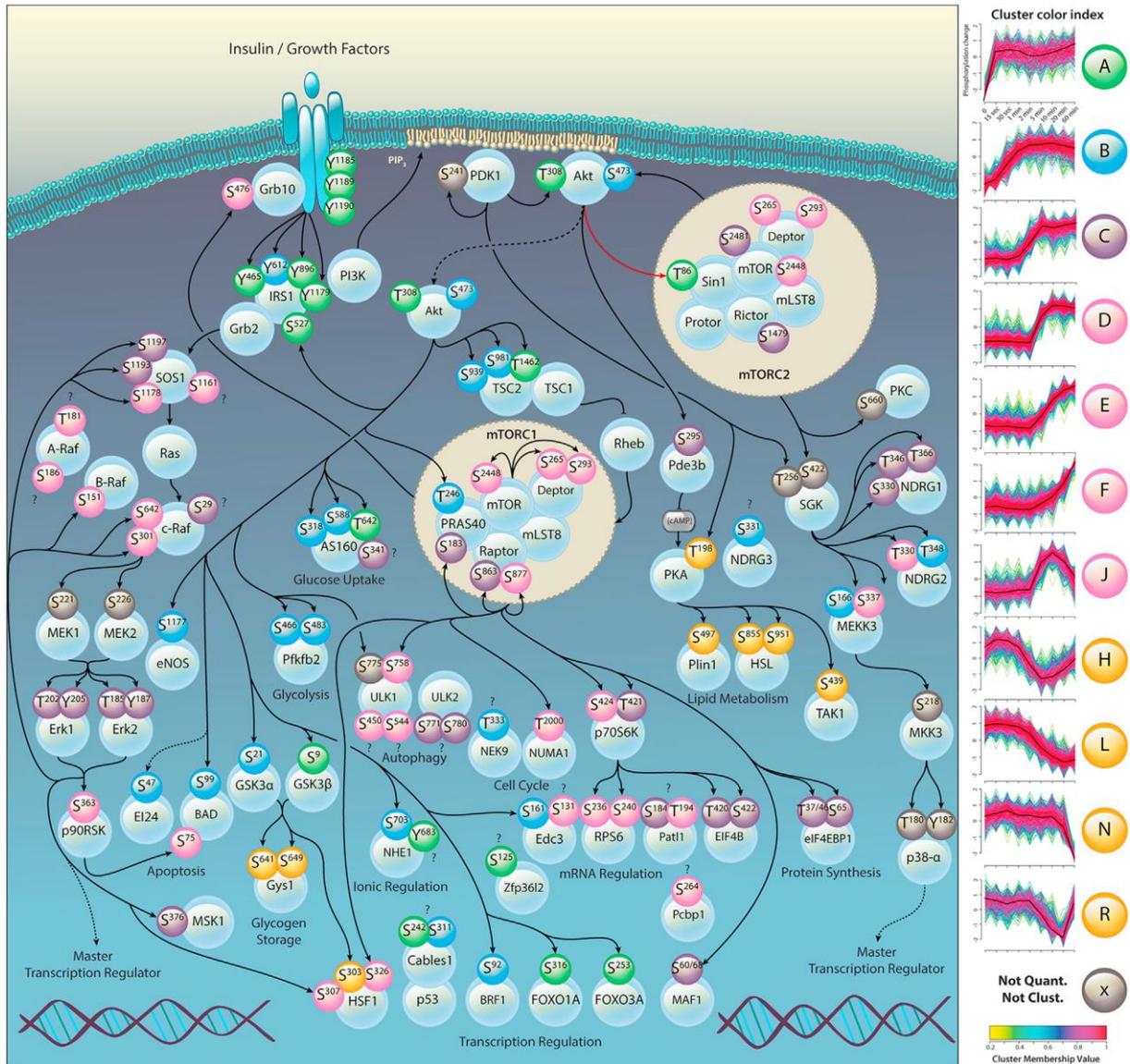


Abbildung 1 Schematische Abbildung des dynamischen Insulin- bzw. Wachstumsfaktor-vermittelten Signalings in Adipozyten. Die zeitliche Änderung der Phosphorylierung wurde über einen SILAC-basierten Phosphoproteom-Ansatz quantifiziert (Humphrey *et al.* 2013).

Zunächst modulieren IGF *Binding Proteins* (IGFBPs) die Verfügbarkeit von IGF und somit die Bindung von IGF an den entsprechenden IGF-1 Transmembranrezeptor (IGF-1R). Der IGF-1R ist eine sogenannte *Receptor Tyrosine Kinase* (RTK). Durch Autophosphorylierung wird der Rezeptor aktiviert und Adapterproteine, wie *Insulin Receptor Substrate* (IRS) und *Src Homology and Collagen* (SHC) werden rekrutiert sowie phosphoryliert. Zwei pro-survival Signalwege werden aktiviert, zum einen der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)- Pyruvat Dehydrogenase Kinase (PDK)-Akt-Signalweg über die Phosphorylierung von IRS-1 bzw. -2 und der *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK)- oder der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK)-Signalweg über die Phosphorylierung der Proteine SHC, RAS und RAF (Jung and Suh 2014).

Beide Komplexe bestehen neben der katalytisch-aktiven mTOR-Untereinheit aus *mammalian Lethal with Sec-13 protein 8* (mLST8), *DEP domain containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) und dem *TELO2-interacting protein 1 homolog* (TTI1)/*Telomere Maintenance 2* (TEL2)-Komplex. Der mTOR-C1-Komplex besteht weiterhin spezifisch aus den Proteinen *Regulatory-Associated Protein of mammalian Target Of Rapamycin* (RAPTOR) und *Proline-Rich Akt Substrate* 40 kDa (PRAS40). Der mTOR-C1 hat Auswirkungen auf die Proteinsynthese, den Energiemetabolismus, Autophagie, die Lipidsynthese und die Lysosomen-Bildung. Diese Effekte werden vor allem über die Phosphorylierung der *Ribosomal protein S6 kinase beta-1* (S6K1) und dem *Eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E)-*Binding Protein 1* (4E-BP1) ausgelöst (Laplanche and Sabatini 2012). Die Aktivierung führt zur Dissoziation von 4E-BP vom eIF4E, so dass eine *cap*-abhängige Translation von mRNA gesteigert wird (Jung and Suh 2014). Über einen Proteom-Ansatz konnten das *La-Related Protein 1* (LARP) und das *Polyadenylate-Binding Protein* (PABP), die mit dem mTOR-C1 assoziiert sind, als *key* Regulatoren für Zellgröße und Proliferation in humanen Zelllinien ermittelt werden (Tcherkezian *et al.* 2014). LARP1 ist ein proto-Onkogen und interagiert mit dem 5' *terminal oligopyrimidine* (TOP)-Motiv einer mRNA, welches in mRNA ribosomaler Proteine bzw. Proteine der Translationsmaschinerie vorhanden ist und inhibiert dessen Translation durch Blockierung der eIF4G-Bindung. Eine Phosphorylierung von LARP1 führt zur Dissoziation von der mRNA und einer Erhöhung der Translationsmaschinerie (Stavraka and Blagden 2015).

Der mTOR-C2 besteht weiterhin spezifisch aus den Proteinen *Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR* (RICTOR), *Stress-activated MAPK-Interacting protein 1* (SIN1) und *Protein Observed with rictor 1/2* (PROTOR1/2) und wirkt anti-apoptotisch auf das zelluläre Überleben über eine Akt-abhängige Regulierung des Zellzyklus sowie auf die Cytoskelet-Organisation. Akt (oder Protein Kinase B, PKB) ist eine Kinase die ebenfalls über die Phosphorylierung von Effektorproteinen Prozesse, wie den Metabolismus, das zelluläre Überleben bzw. Apoptose, Wachstum und Proliferation reguliert (Laplanche and Sabatini 2012). Eine Phosphorylierung von Akt inhibiert zum Beispiel das *Tuberous Sclerosis protein 2* (TSC2), worüber der mTOR-C1 und nachfolgendes Signaling aktiviert werden (Jung and Suh 2014). Eine detaillierte zeit-aufgelöste Analyse des Insulin-Signalings in Adiozyten wurde mit der Zugabe von Inhibitoren gegen die Proteine Akt und PI3K/mTOR kombiniert und ergab, dass Akt das Protein SIN1 direkt phosphoryliert (Abbildung 1, rot markiert). Es wurde ein Mechanismus evaluiert durch den Wachstumsfaktoren die mTOR-C2-Aktivität direkt erhöhen können (Yang *et al.* 2015; Humphrey *et al.* 2013).

1.1.2. Verbindung zu weiteren Signalwegen

Neben der Inhibierung der Apoptose und Induktion einer *pro-survival*-Genexpression beeinflusst das Akt-abhängige Signaling die Glukose-Verstoffwechslung über die Regulierung der *Glycogen Synthase Kinase-3 beta* (GSK3 β). Die GSK3 β -S9-Phosphorylierung via Akt führt zur

Deaktivierung (Koraishy *et al.* 2014), was zur Dephosphorylierung und Aktivierung von zum Beispiel der Glykogen Synthase (GYS1) und eIF2B führt (Jung and Suh 2014). Das regulierende Netzwerk um die Translations-Initiation über eIF2 ist in menschlichen Zellen sehr gut untersucht. Der GTP-bindende Proteinkomplex aus α , β und γ führt zusammen mit dem 40S Ribosom zur Erkennung des mRNA Initiations-Codons der Methionin-tRNA. Nach dem die 60S ribosomale UE gebunden hat, wird das GTP hydrolysiert, was zur Auflösung des Komplexes führt. Der *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF) eIF2B führt zur Wiederherstellung des eIF2-GTP-Komplexes. Eine Phosphorylierung der α -UE des eIF2 an Ser51 in Folge von zellulärem Stress führt zur Inhibierung der Aktivität und zu einer reduzierten mRNA-Translation. Nach der Initiation ist die Elongation der zweite Schritt der Proteintranslation, welcher hauptsächlich über den *eukaryotic Elongation Factor 2* (eEF2) und die entsprechende Kinase eEF2K reguliert wird. Die Phosphorylierung von eEF2 an Thr56 wirkt inhibierend auf dessen Aktivität. Die eEF2K wird über die Adenosinmonophosphat (AMP)-*Activated Protein Kinase* (AMPK) aktiviert (Pavitt 2018). Die AMPK hat wichtige Funktionen in der Regulierung des Energiemetabolismus und wird über Phosphorylierung aktiviert, sobald das ATP-Level der Zelle sinkt. Diese Aktivierung führt zu Phosphorylierung einer Vielzahl an *downstream*-Targets (wie eEF2K) und im Allgemeinen zur Reduktion von anabolischen sowie Verstärkung von katabolischen Prozessen führt (Carling *et al.* 2011).

Im Allgemeinen regulieren die PI3K-Akt-mTOR-, ERK/MAPK- und AMPK-Signalwege den Energiemetabolismus von Glukose und Glutamin (siehe auch 1.5.4), die zelluläre Sauerstoffversorgung, Alterungs- und Autophagie-Prozesse. Autophagie bezeichnet einen lysosomalen Abbauvorgang von cytosolischen Material und Organellen, welcher durch zellulären Stress ausgelöst wird. Zu den Auslösern zählen ein Mangel an Aminosäuren (*Amino Acid Response*, AAR-Signaling), eine virale Infektion oder die *Unfolded-Protein Response* (UPR) (Eskelinen and Saftig 2009). Eine Akkumulierung von falsch- oder ungefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Reticulum (ER) führt zum sogenannten ER-Stress und löst eine UPR aus. Initiiert durch ER-Transmembran Sensor Proteine *Proline-rich Receptor-like Kinase* (PERK), die Serin/Threonin Kinase (STK) IRE1 (ERN1) und der *Cyclic AMP-dependent Transcription Factor 6* (ATF6) führt dieses PERK-Signaling zur Phosphorylierung des eIF2 α und somit zur Inhibierung der Protein-Synthese, zur Aktivierung des *X-box Binding Protein 1* (XBP1), zu Autophagie-Prozessen und Expressionssteigerung von ER-Chaperonen. Das Chaperon *Binding Immunoglobulin Protein* (BIP) unterstützt die Synthese korrekt gefalteter Proteine und verhindert so den Zelltod (Ogata *et al.* 2006). BIP ist auch als *Heat Shock Protein Family A member 5* (HSPA5) oder *Glucose-Regulated Protein 78* (GRP78) bekannt und ein in tierischen Zellen hoch-konserviertes ubiquitär exprimiertes Protein, das hauptsächlich im ER lokalisiert ist (Miyata *et al.* 2018). GRP78va ist eine cytosolische Isoform, welche durch alternatives Splicen entsteht und Einfluss auf das PERK-Signaling hat (Ni

et al. 2009). Die Bindung von Immunoglobulinen (Ig) war die erste Funktion, die für das Protein HSPA5 identifiziert wurde. Anschließend konnten weitere Funktionen, wie die Sekretion von Glykoproteinen aus dem ER gefunden werden (Miyata *et al.* 2018).

Die Signalwege haben neben den genannten Aspekten weitere Effekte auf die Chromatin-Struktur bzw. Epigenetik (siehe 1.5.7), sowie auf die cytoskeletale Regulierung über Aktin- und Microtubuli-Dynamiken (Samaj *et al.* 2004). Das direkte Akt-Substrat AS160 (TBC1D4) führt nach Aktivierung zum vesikulären Transport von Glukose Transportern (z.B. GLUT4) zur Plasmamembran und somit zur erhöhten Aufnahme von Glukose (Siddle 2011). Der Metabolismus steht in direkter Verbindung zur zellulären Signaltransduktion, indem die Substrate für PTMs zur Verfügung gestellt werden (Abbildung 2, (Metallo and Vander Heiden 2010).

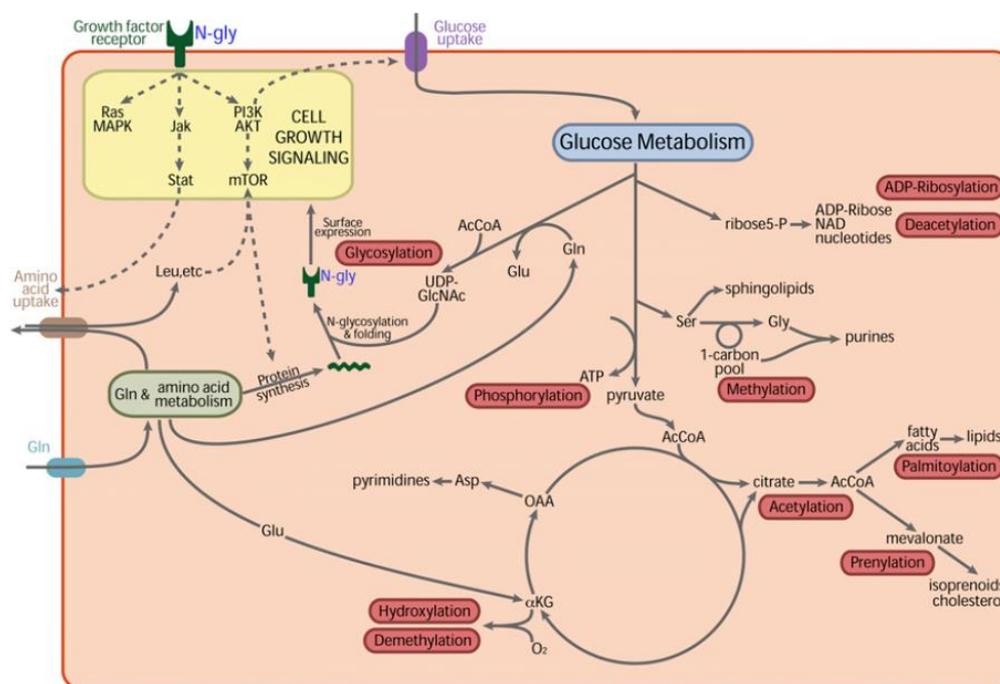


Abbildung 2 Die Verbindung von Metabolismus und Signaltransduktion besteht durch die metabolische Bereitstellung von Substraten für die post-translationalen Modifikationen (Metallo and Vander Heiden 2010).

Außerdem gibt es wichtige Signalwege, die in der Entwicklungsbiologie eine wichtige Rolle spielen, wie Hedgehog-, Notch, *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) und Wnt/ β -Catenin (Pelullo *et al.* 2019). Weitere Signalwege sind vor allem aus der Immunologie bekannt, wie die *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK/STAT)- (Rawlings *et al.* 2004) und *Nuclear Factor* κ B (NF- κ B)-Signaling (Liu *et al.* 2017). Neben dem RTK-abhängigen MAPK-Signaling gibt es noch weitere wichtige MAPK-Signalwege, wie das *G-Protein-Coupled Receptors* (GPCR)- (Hilger *et al.* 2018), p38 MAPK- (Zarubin and Han 2005) und *Stress-Activated Protein Kinase/Jun-amino-terminal Kinase* (SAPK/JNK)-Signaling (Nishina *et al.* 2004).

Neben vielen Signalkaskaden, um extrazelluläre Reize zu verarbeiten, ist die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im intrazellulären Proteom essentiell für das Überleben der Zelle. Diese Balance bzw. zelluläre *maintenance* wird vor allem über die Regulierung von Protein-Synthese und Degradierung erreicht (Abbildung 3). Viele Krankheiten sind mit einem Ungleichgewicht im Proteom assoziiert, darunter verschiedene Krebsarten. Um eine fehlende Balance aufgrund einer Erkrankung wieder herzustellen werden therapeutisch zum Beispiel *small molecules* eingesetzt (Harper and Bennett 2016).

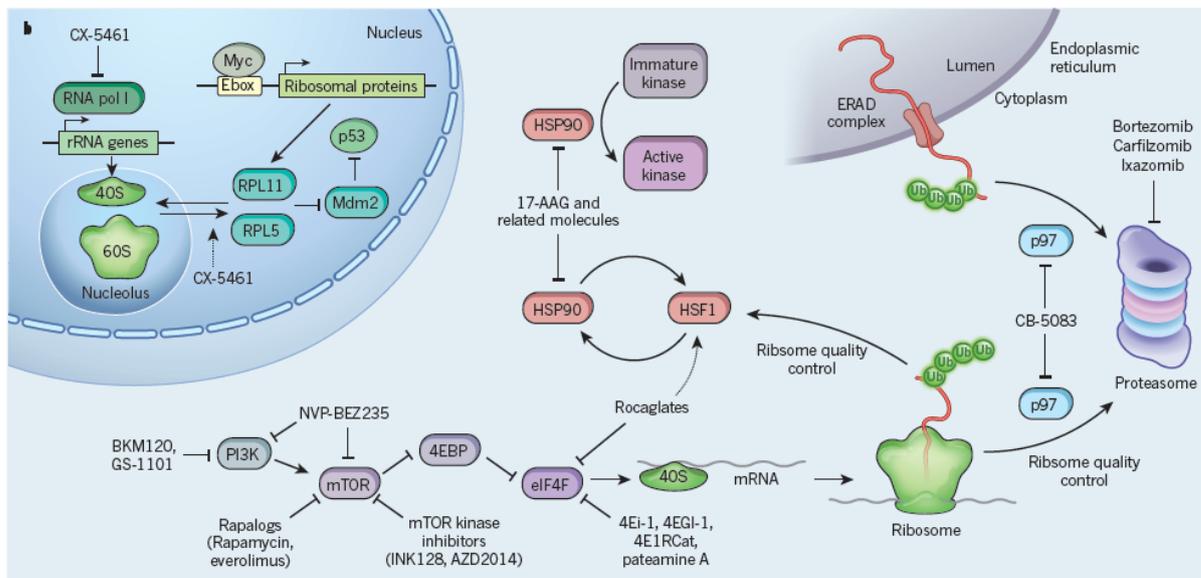


Abbildung 3 Darstellung von Signalwegen, die ein Gleichgewicht im zellulären Proteom regulieren, sowie Markierung möglicher Modulierungspunkte über *small molecules* (Harper and Bennett 2016).

Eine *small molecule*-vermittelte Inhibierung der Produktion von ribosomaler RNA führt zum Beispiel zur Stabilisierung des Tumorsuppressor Proteins p53 oder eine Inhibierung im mTOR-Signaling führt zur Verschiebung der ribosomalen Qualitätskontrolle (Harper and Bennett 2016). Um ein Ungleichgewicht im Proteom oder der Signaltransduktion festzustellen, können zum Beispiel Massenspektrometrie-basierte Methoden verwendet werden.

1.2. Massenspektrometrie

Eine Methode zur Aufklärung von Signaltransduktionskaskaden, die seit fast zwei Jahrzehnten zum Einsatz kommt, ist die Massenspektrometrie (MS)-basierte Phosphoproteomanalytik (Ficarro *et al.* 2002). Die technischen und methodischen Möglichkeiten haben sich jedoch rasant entwickelt, weshalb die Aufklärung komplexer Phosphorylierungsgeschehen noch relativ neu ist (Riley and Coon 2016).

Allgemein werden mittels Massenspektrometrie Analyten in der Gasphase analysiert, wozu diese zunächst in der sogenannten Ionenquelle ionisiert werden müssen. Neben der Ionenquelle besteht ein Massenspektrometer aus einem Massenanalysator und einem Detektor, wobei das *mass-to-*

charge ratio (m/z) der Analyten im Analysator ermittelt und die Anzahl der Ionen am Detektor detektiert wird. Das Ionisierungsverfahren und die eingesetzten Bestandteile des Massenspektrometers werden idealerweise abhängig von der zu analysieren Probe ausgewählt (Westermeier *et al.* 2008). Zur Ionisierung großer Biomoleküle, wie beispielsweise Peptide, stellt die *Electro Spray Ionisation* (ESI) eine Ionisierungsmethode der Wahl dar (Fenn *et al.* 1989). Da über ESI Analyten aus einer Lösung ionisiert werden, kann es an chromatographische Verfahren, wie der *Liquid Chromatography* (LC) gekoppelt werden. Die daraus resultierende LC-ESI Methode wird verwendet, um komplexe Peptidgemische zu analysieren. Der gewählte Massenanalysator sollte eine hohe Sensitivität, Auflösung und Massengenauigkeit aufweisen, sowie die Fähigkeit haben MS/MS-Spektren isolierter *precursor* zu erstellen, die der Datenbank-basierten Identifizierung des Peptids dienen (Abbildung 4).

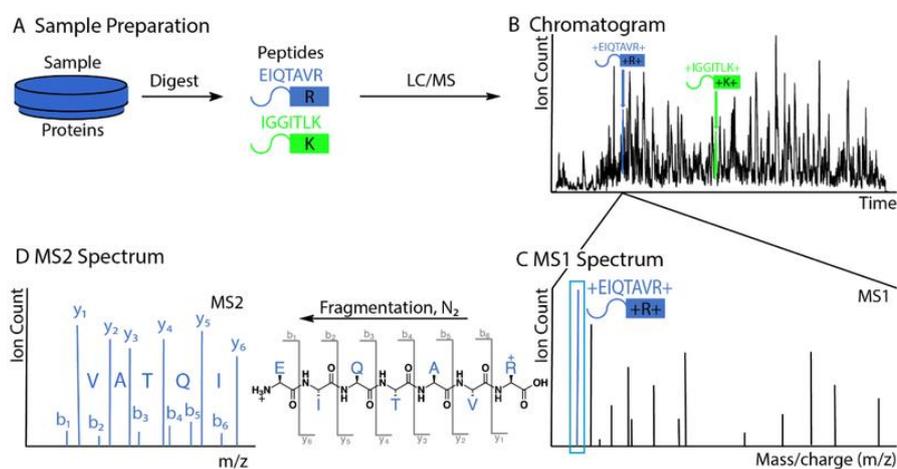


Abbildung 4 Eine Übersicht über den Workflow der LC-MS-basierten Proteom-Analyse (Pappireddi *et al.* 2019).

Zunächst gab es vier Analysatortypen: Ionenfallen, *Time-Of-Flight* (TOF)-, Quadrupol- und *Fourier Transform ion cyclotron* (FT)-MS (Aebersold and Mann 2003). Im Jahr 2005 entwickelte die Firma Thermo Fisher Scientific zusätzlich die Orbitrap™. Über eine zentrale, spindelförmige Elektrode und Anlegen eines elektrostatischen Feldes werden dabei die Ionen auf orbitalen Bahnen gehalten, aus denen über Fourier-Transformation die Massen akkurat berechnet werden können (Westermeier *et al.* 2008).

Der Aufbau eines hybrid Quadrupol-Orbitrap-MS, wie die Q Exactive Plus der Firma Thermo Fisher Scientific, beginnt mit der Ionenquelle, zum Beispiel einer sogenannten *Atmospheric Pressure Ion source* (API). In der Quellenregion befindet sich standardmäßig ein gestaffeltes Linsenobjekt, die *Stacked-ring ion guide* oder kurz *S-lens*, die die Ionen nach der Ionisierung über eine Kapillare erreichen. Die *S-lens* mündet im sogenannten *injection flatapole*. Neben einem *bent flatapole* im 90°C-Winkel folgt der hyperbolische Quadrupol-Massenfilter und eine Oktopol-Einheit, jeweils umgeben von entsprechenden Linsen. Daraufhin gelangen die Ionen in die *C-trap*,

aus der sie entweder in den Orbitrap-Massenanalysator oder in die *Higher energy C-trap Dissociation* (HCD)-Zelle gelangen. In den *Data-Dependent Acquisition* (DDA)-basierten Messmethoden erfolgt die Selektion bestimmter *precursor*-Ionen im Quadrupol, woraufhin diese in der HCD-Zelle mittels Kollisionsenergie einzeln, nacheinander fragmentiert werden können. Die „Top-N“ Fragment-Ionen gelangen dann zurück über die *C-trap* in den Orbitrap-Massenanalysator, in dem die sogenannten MS2-Ionen eines *precursors* detektiert werden. Für N gleich 10 werden somit zum Beispiel die 10 abundantesten *precursor* aus einem MS1-Spektrum nacheinander mit insgesamt 10 MS2-scans gemessen (Michalski *et al.* 2011; Olsen *et al.* 2007). DDA-basierte Messungen mit der Orbitrap liefern anfänglich beispielsweise ca. 2.900 identifizierte Proteine einer HeLa-Probe (5 µg, Triplikat) innerhalb eines 90-Minuten LC-Gradienten auf einer 15 cm-Säule (Michalski *et al.* 2011). Bereits einige Jahre später wurden mit der Orbitrap auch gute Ergebnisse in der Phosphoproteom-Analyse erzielt. Unter diesen Voraussetzungen konnten Humphrey *et al.* in einer umfangreichen Studie 2015 beispielsweise über 10.000 Phosphorylierungsstellen quantifizieren (Humphrey *et al.* 2015a).

Die Anschaffung der Q Exactive Plus Orbitrap-MS an der Universität Bielefeld erfolgte 2019. Zu dem Zeitpunkt der Gerätebestellung stellte das Impact II der Firma Bruker Daltonik die beste Alternative dar. Dieses Quadrupol-ToF-MS erzielte eine Identifizierung von über 4.800 Proteinen einer HeLa-Probe in einem 90 min LC-Gradienten (Beck *et al.* 2015), wurde jedoch deutlich weniger häufig in der Literatur zur Analyse von (Phospho-)Proteom-Daten gefunden.

1.2.1. Alternative Messmethoden und Weiterentwicklungen

Beim Sammeln bestimmter *precursor*-Ionen im DDA-Modus werden alle anderen ankommenden Ionenspezies verworfen. Dieser Ionenverlust ist besonders ausgeprägt, wenn gering abundante *precursor* gesammelt werden, wie zum Beispiel bei Phosphopeptid-Proben mit einem hohen dynamischen Bereich. Über Methodenentwicklungen, wie der sogenannten „BoxCar“-Datenaufnahme können mehr der hereinkommenden Ionen über die Füllung von multiplen segmentierten *windows* genutzt werden, wodurch sich das *signal-to-noise* und der dynamische Bereich im MS1-Level verbessert (Meier *et al.* 2018). Generell zeichnen sich DDA-Methoden durch eine einfache Etablierung und Datenauswertung, sowie einen damit verbundenen hohen Durchsatz aus (Schmidt *et al.* 2008). Eine robustere Quantifizierung von ausgewählten Peptiden (10s-100s) wird über entsprechend genannte *targeted* MS-Messungen erzielt, wie *Selected* oder *Multiple Reaction Monitoring* (SRM, MRM) (Graaf *et al.* 2015). Eine Weiterentwicklung für einen erhöhten Umfang an Peptiden (1000s) stellt die *Sequential Window Acquisition of all Theoretical spectra* (SWATH)- oder *Hyper Reaction Monitoring* (HRM)-Methode dar, wobei SWATH und HRM eingetragene Markenzeichen der Firmen SCIEX für Q-ToF-Geräte bzw. Biognosis für Orbitrap-Geräte sind (Ludwig *et al.* 2018). Diese Methode mit zwei verschiedenen Namen ist eine Variante der sogenannten *Data-Independent Acquisition* (DIA) (Schubert *et al.* 2015). Durch die

Anwendung einer DIA-Methode werden Vorteile von DDA- und *targeted* MS-Methoden kombiniert. Für DIA-Messungen werden definierte *mass-to-charge* Segmente nacheinander gemessen, wobei alle in diesen Segmenten befindlichen Ionen fragmentiert werden. Diese komplexen MS²-Spektren werden dann meist mit Hilfe zuvor generierter *libraries* ausgewertet (Bilbao *et al.* 2015).

Neuste Massenspektrometer enthalten eine weitere Dimensionsgröße der Ionentrennung, die *Ion Mobility Spectrometry* Massenspektrometrie (IMS-MS). Hierbei wird die spezifische *drift time* eines Moleküls zur Charakterisierung genutzt, was zum Beispiel eine Enantiomerentrennung möglich macht (Domalain *et al.* 2014). Als erstes brachte die Firma Waters das Synapt G2 Si auf den Markt. Kurze Zeit später stellte die Firma Thermo Fisher Scientific die *Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry* (FAIMS) Pro Technologie vor, eine Schnittstelle, die ebenfalls an bestehende (neuere) Massenspektrometer nachgerüstet werden kann. Eine Arbeit unter Verwendung eines Evosep LC-Systems mit FAIMS Pro-ausgestatteter Orbitrap Exploris 480 MS erzielte in einem 20-Minuten LC-Gradienten einer 0,5 µg HeLa-Probe eine Identifizierung von ca. 3.500 Proteinen (Bekker-Jensen *et al.* 2020).

1.3. Die Proteomanalyse

Geprägt von der Arbeit von Wasinger *et al.* entstand 1995 der Begriff *Proteomics* (Wasinger *et al.* 1995), der globalen Studie von Proteinprodukten, die auf Grundlage des Genoms exprimiert werden (Wilkins *et al.* 1996). Schätzungsweise werden in einer Zelle ca. 10.000 Gene der 20.000 Proteinkodierenden Gene des humanen Genoms transkribiert (Nagaraj *et al.* 2011). Die Komplexität des Proteoms ist jedoch durch die Ebene der Protein-Modifikationen, des alternativem Splicings, der Expression von Zelllinien-spezifischen Genen, sowie durch generelle Unterschiede im Genom weiter erhöht (Harper and Bennett 2016).

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen stellt die Massenspektrometrie eine zentrale Methode dar (Aebersold and Mann 2003). Die MS-basierte Proteinanalyse erfolgt entweder *bottom up*, als ein Peptid-basierter Ansatz oder *top down*, der Messung von intakten Proteinen, wobei die Analyse komplexer Proteingemische in *Proteomics* klassisch auf *bottom up*-Methoden basiert, was *shotgun-Proteomics* genannt wird (Westermeier *et al.* 2008).

1.3.1. Limitierungen der Probenvorbereitung

Der Proteom-Probenvorbereitungsworkflow kann in drei Gebiete unterteilt werden, der Probenvorbereitung, der nLC-MSMS-Messung und der Datenanalyse. Die Probenvorbereitung beginnt mit dem Aufbrechen der Zelle und der möglichst vollständigen Solubilisierung der Proteine. Standardmäßig folgt eine Reduktion von Disulfidbrücken und eine Alkylierung der Cysteine, um einen anschließenden effizienten enzymatischen Verdau zu ermöglichen. Die zu Peptiden verdauten Proteine werden aufgereinigt sowie über die nLC-MS/MS-Strecke vermessen.

Die Spektren werden zunächst über entsprechende Software Datenbank-basiert Peptidsequenzen zugeordnet und diese in einem weiteren Schritt Proteinen zugeordnet.

Der genaue Workflow wird dabei auf die Proben und Ziele, die gewünschte Analysentiefe, die zur Verfügung stehenden Mittel und/oder die vorhandene Messzeit abgestimmt. Die Wahl des Protein-Solubilisierungspuffers als erster Schritt zum Zellaufschluss stellt zum Beispiel immer einen Kompromiss zwischen der Lösung schwer-löslicher Proteine, wie hydrophober Membranproteine, und der Kompatibilität des Puffers zu nachfolgenden Schritten dar. *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) als anionisches Detergens führt zur Solubilisierung und Denaturierung sämtlicher Proteine, wie schwer-lösliche, hydrophobe Membranproteine (Westermeier *et al.* 2008). Ohne entsprechende Abreicherungen führen Cluster von *Dodecyl Sulfate* jedoch zur Ionensuppression, so dass keine Peptid-Identifizierung mehr möglich ist (Tubaon *et al.* 2017). Eine elegante Möglichkeit, um SDS zu verwenden, ist die *Filter-Aided Sample Preparation* (FASP)-Methode. Die Verwendung einer Membran mit einer Porengröße von ca. 5 nm macht es möglich Proteine zunächst mit SDS vollständig zu solubilisieren und denaturieren, um dieses dann vor dem Verdau von den auf der Membran-befindlichen Proteinen zu waschen und SDS, als störende Komponente im Verdau und nLC-MS/MS-Lauf zu eliminieren (Wisniewski *et al.* 2009; Wisniewski 2016).

Um das Proteom im *bottom up*-Modus mit möglichst-vollständiger Komplexität zu erfassen, kann eine Reduktion der Komplexität jeder einzelnen Probe durch Fraktionierung erfolgen. Entweder wird eine Methode zur subzellulären Fraktionierung (Orre *et al.* 2019), eine Fraktionierung auf Protein-Ebene, wie eine *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), eine Isoelektrische Fokussierung (IEF) oder eine *Strong Cation eXchange chromatography* (SCX) oder auf Peptid-Ebene, über zum Beispiel *high-pH* (HpH)-Chromatographie durchgeführt (Widbiller *et al.* 2019). Die HpH-Chromatographie stellt im Vergleich zu der für die nLC-MS/MS-Analyse eingesetzten *low pH*-Chromatographie eine semi-orthogonale Methode dar, so dass die Kombination dieser Techniken eine Zweidimensionale Proteomanalyse ergibt (Yang *et al.* 2012). Die Unterschiede in der Selektivität dieser beiden Methoden bestehen in der Änderung der Ladungsverteilung in der Peptidkette durch Veränderung des Eluenten pH-Werts, wobei Reste mit positiver oder negativer Ladung am meisten beeinflusst werden. Asparaginsäure und Glutaminsäure sind zum Beispiel bei pH 2 neutral und moderat hydrophob. Bei pH 10 sind diese Reste hingegen negativ geladen und hydrophil. Das Gegenteil gilt für die basischen Reste Argin, Lysin und Histidin, welche bei hohem pH hydrophober werden (Dwivedi *et al.* 2008). Die beschriebenen Möglichkeiten zur Reduktion der Komplexität führen zur Erhöhung der Schritte des Probenvorbereitungs-Workflows. Die Anzahl an Schritten des Workflows sollte jedoch minimal gehalten werden, um Probenverluste zu vermeiden und eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Westermeier *et al.* 2008). Die Verwendung eines bestimmten Workflows ist somit ein Kompromiss und sollte immer auf die jeweilige Fragestellung angepasst werden.

Weiterhin kann der Workflow hinsichtlich zeitlicher Aspekte optimiert werden, indem der standardmäßige Einsatz von Dithiothreitol (DTT) und Iodacetamid (IAA) zur Reduktion und Alkylierung von Cystein-Resten mit insgesamt drei Arbeitsschritten zu einem Schritt unter der Verwendung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und 2-Chloracetamid (CAA) zusammengefasst werden kann (Jersie-Christensen *et al.* 2016).

Die Wahl des Verdau-Enzyms ist weiterhin von entscheidender Bedeutung für die generierten Daten. Für das in Peptid-zentrischen Ansätzen am häufigsten verwendete Enzyme Trypsin ist bekannt, dass zum Beispiel Modifizierungen, wie Phosphorylierungen in der Nähe der Schnittstelle zu einer geringen Spaltungseffizienz führen können (Gershon 2014). Parallele Ansätze mit alternativen Verdauenzymen, wie ArgC, AspN, Chymotrypsin, GluC, LysC und LysN führen zu vollständigeren Datensätzen (Giansanti *et al.* 2016). Die parallele Verwendung von zwei (oder mehr) Verdauenzymen steigert jedoch den Aufwand, die Kosten und die Mess- sowie Auswertzeit. Nach dem enzymatischen Verdau folgt mit der Peptidaufreinigung ein wichtiger Schritt für sensitive nLC-MS/MS-Analysen in *bottom up- Proteomics* (Tubaon *et al.* 2017). Neben dem Kontaminationsrisiko und dem Kostenpunkt kann durch diesen Schritt wiederum Variabilität bzw. *bias* in die Probe gebracht werden. Routinemäßig wird eine C18-basierte *Reversed Phase* (RP) *Solid Phase Extraction* (SPE)-Chromatographie durchgeführt, hauptsächlich um die Peptide zu entsalzen (Conlon 2007; Insuasty-Cepeda *et al.* 2019). Eine Peptidaufreinigung wird sowohl für die klassische als auch für die zuvor beschriebene FASP-Methode angewandt. Neuere *single pot*-Methoden, wie die *in Stage Tip* (iST)-Methode (Kulak *et al.* 2014) oder die *Simple and Integrated Spintip-based Proteomics Technology* (SISPROT) (Chen *et al.* 2016) vereinen alle Schritte von der Zellyse bis zum aufgereinigten Peptid in einem einzigen Reaktionsgefäß, wobei die Reproduzierbarkeit durch weniger Probenverlust potentiell erhöht wird.

Wird diese C18-basierte SPE mit einer Überdruck (*Positive Pressure*)-Workstation kombiniert, steht ein leistungsfähiges *tool* für den *Proteomics*-Probenvorbereitungsworkflow zur Verfügung. *Positive Pressure*-Systeme sind besonders für die parallele Durchführung etabliert und bieten neben dem hohen Durchsatz eine hohe Reproduzierbarkeit. Werden diese Systeme mit Lösemittel-Dosierungsautomaten und Computer-kontrollierten Druckgradienten ausgestattet, ergibt sich neben der hohen Zeitersparnis, eine Reduktion der Verbrauchsmaterialien und Kosten. Eine Entwicklung von *high-throughput* Methoden der *Proteomics*-Probenvorbereitung in den letzten Jahren bedingt die Publikation entsprechend großer, *high-throughput*-basierter Proteomanalysen (Humphrey *et al.* 2018).

1.3.2. Proteinquantifizierungs-Methoden

Peptid-zentrische Quantifizierungsmethoden, wie in *bottom up* oder *shotgun Proteomics*, werden in isobare und nicht-isobare Markierungsmethoden, sowie Label-freie Methoden eingeteilt.

Für die *Label-Free Quantification* (LFQ) von Proteinen ist eine reproduzierbare Probenvorbereitung und Analytik Grundvoraussetzung, da die zu vergleichenden Proben parallel vorbereitet, vermessen und somit relative Intensitäten (Ratios) bestimmt werden (Abbildung 5). Diese Methode wurde in der Arbeitsgruppe (AG) Zellkulturtechnik in Kooperation mit der Firma Bruker Daltonik zur Analyse Butyrat-behandelter *Chinese Hamster Ovary* (CHO) DP12-Zellen über Messungen am Quadrupol-ToF-MS maXis 4G eingesetzt (Müller *et al.* 2017) und konnte nach Etablierung der MaxQuant-Software-basierten Quantifizierung bereits für die Evaluierung von Proteomunterschieden zwischen CHO-Zelllinien innerhalb dieser Arbeit genutzt werden (Schelletter *et al.* 2019).

Eine nicht-isobare Markierungsmethode ist *Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture* (SILAC) (Abbildung 5). Chemisch-definiertes Zellkulturmedium wird (neben Standardmedium) mit Isotopen-markierten Aminosäuren Lysin und Arginin hergestellt. Die Zellen bauen die markierten Aminosäuren in die Proteine ein, so dass Peptide aus diesen Zellen, aus dem sogenannten „schweren“ Medium, ein Massenshift im Vergleich zu denen im Standardmedium („leicht“) aufweisen. Aufgrund dieser Massendifferenz können die Zellen eines Experiments der zu analysierenden Bedingung direkt am Erntezeitpunkt mit den Kontrollzellen vereint werden. Nach Probenvorbereitung und Messung der kombinierten (gepoolten) Probe werden aufgrund gleicher chemischer Eigenschaften und gleichzeitiger Elution von der nLC Peakpärchen im Massenspektrometer detektiert, worüber eine relative Quantifizierung möglich ist. Da das verwendete Verdauenzym Trypsin spezifisch C-terminal von Lysin und Arginin schneidet, enthält jedes Peptid entweder ein isotopenmarkiertes-Lysin oder Arginin und damit eine definierte Massendifferenz von 8,0142 bzw. 10,00827 Da.

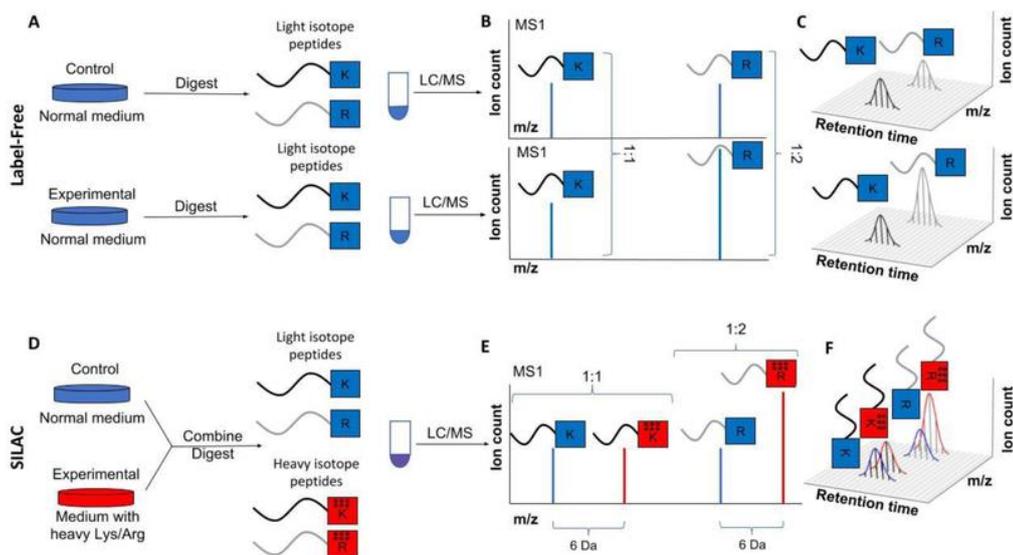


Abbildung 5 Schematischer Ablauf der Label-freien und SILAC-basierten Quantifizierung von Peptiden (Pappireddi *et al.* 2019).

Der Hauptvorteil von SILAC liegt in geringeren Varianzen der relativen Quantifizierung, bedingt durch den gleichmäßigen *bias* der kombinierten Probenvorbereitung. Mittlerweile wurde diese Methode schon auf viele andere Felder ausgeweitet, wie für die Ermittlung von Interaktionspartnern oder IgG-Sekretions-Kinetiken (Emmott and Goodfellow 2014; Kantardjieff *et al.* 2010).

Zu den Isobaren-Markierungsmethoden gehört unter anderem *isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ), welche zur Analyse von sogenannten *high-producer* CHO-Zellen an der Universität Bielefeld erfolgreich zum Einsatz kam (Beckmann 2012).

Weiterhin findet eine von Thompson *et al.* 2003 erstmals angewendete *Tandem Mass Tag* (TMT)-basierte Methode (Thompson *et al.* 2003) aktuell häufig Anwendung (Heffner *et al.* 2020). Für TMT und iTRAQ werden die durch den enzymatischen Verdau generierten Peptide markiert und diese erst nach Fragmentierung im MS/MS über die Freisetzung von spezifischen Reporterionen quantifiziert. Multiplexing erlaubt eine Analyse von bis zu 11 Proben in einem Ansatz. Insgesamt stellen diese Methoden sehr kostspielige Möglichkeiten der Protein-Quantifizierung dar, so dass sie vor allem für nicht-kultivierbare Proben zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel Gewebeproben (Hughes *et al.* 2016).

Neben diesen *untargeted* Identifizierungs- und Quantifizierungsmethoden können über *targeted Proteomics*-Experimente gezielte *precursor* hoch-konsistent und akkurat quantifiziert werden. Die Durchführung von *targeted SRM/MRM*-Methoden erfordert das Vorhandensein von drei Quadrupolen (*triple quad-MS*), wobei die spezifischen *precursor* im ersten Quadrupol gefiltert und im zweiten fragmentiert werden. Im dritten Quadrupol werden die definierten Produktionen analysiert (Picotti *et al.* 2010). Für Orbitrap- oder ToF-MS werden über *Parallel Reaction Monitoring* (PRM)-MS hingegen alle Produktionen des ausgewählten *precursors* analysiert, wodurch eine korrekte Identität des Peptids sichergestellt werden kann. Die *precursor* werden dabei im Quadrupol gefiltert, in der HCD-Zelle fragmentiert und die Produktionen in der Orbitrap analysiert (Ronsein *et al.* 2014). Außerdem wird neben der relativen Quantifizierung an der Verbesserung der absoluten Quantifizierung des zellulären Proteoms geforscht. Ein absoluter Wert wird zum Beispiel als Verhältnis zum Gesamt-MS-Signal des gemessenen Proteoms oder als Verhältnis von Histon- und DNA-Masse bestimmt, welches generell als konstant erachtet wird (Wisniewski and Rakus 2014; Wisniewski *et al.* 2014).

1.3.3. Die Mess-und Auswertestrategie

Besonders für LFQ-Experimente sind hoch reproduzierbare Probenvorbereitungs- und Messmethoden notwendig. Die in die nLC injizierte Peptidmenge hat einen großen Einfluss auf die Varianz der Daten, so dass akkurate Peptidquantifizierungs-Methoden für eine normierte Injektion identischer Peptidmengen essentiell sind und zu stabilen Quantifizierungs-Ergebnissen führen (Chen *et al.* 2016; Maia *et al.* 2020; Hughes *et al.* 2019). Ebenfalls entscheidend für reproduzierbare

Ergebnisse ist eine empirische Ermittlung der optimalen Peptidbeladung einer nLC-Säule. Beispielsweise konnten für eine 40 cm-Trennsäule optimale Ergebnisse mit 1,5 bis 5 µg Peptidprobe erzielt werden (Maia *et al.* 2020).

Die MS-basierte Datenauswertung kann in der Literatur häufig anhand der frei verfügbaren Software MaxQuant und Perseus gefunden werden (Halbach *et al.* 2016; Humphrey *et al.* 2015a; Thingholm and Larsen 2016; Jersie-Christensen *et al.* 2016; Williams *et al.* 2016), die für eine effiziente Peptid-Identifizierung und Protein-Quantifizierung aus Rohdaten MS-basierter *Proteomics* entwickelt wurde (Cox and Mann 2008). Eine sehr ausführliche Beschreibung zur Auswertung mit MaxQuant liefert Ravikumar *et al.* und die Arbeitsgruppe von Matthias Mann (Ravikumar *et al.* 2016; Cox *et al.* 2009). Die Datenbank, als essentieller Bestandteil der Auswertung von Proteom-Daten sollte hoch-qualitativ annotierte Proteinsequenzen enthalten, welche nicht redundant vorliegen und mit aussagekräftigen Bezeichnungen (*identifiern*) ausgestattet sind (O'Donovan and Apweiler 2011). Die *Universal Protein Resource* (UniProt) stellt dabei eine zentrale Zusammenstellung von über 60 Millionen Sequenzen und vielen funktionalen Informationen dar. Die *UniProt KnowledgeBase* (UniProtKB) besteht aus der Swiss-Prot-Datenbank, welche manuell von Experten geprüft und annotiert (*reviewed*) ist und *Translated EMBL* (TrEMBL), eine automatisch annotierte Datenbank die größtenteils auf *high-throughput* DNA-Sequenzierdaten der EMBL/GenBank-Nucleotid-Datenbank basiert. Die Peptid-Identifizierung erfolgt über den Abgleich von MS/MS-Spektren zu *in silico* verdauten, theoretischen Spektren und der Berechnung eines *scores* dieser *Peptide Spectrum Matches* (PSM) auf Basis der Übereinstimmung. Das Vorhandensein von falsch-positiven bzw. falsch-negativen Identifizierungen wird über die Berechnung einer *False Discovery Rate* (FDR) abgeschätzt. Dafür werden die Sequenzen der Datenbank-Einträge jeweils umgekehrt und diese *decoy*-DB ebenfalls für die Peptid-Identifizierung eingesetzt. Es wird angenommen, dass die Anzahl an zufälligen Hits für die *reverse* bzw. *decoy* DB identisch für die ursprüngliche (*forward, target*) DB ist, was die Berechnung einer FDR ermöglicht. In der MaxQuant-Software wird zum Beispiel ein bestimmtes FDR-Level auf Ebene der Peptid- und Protein-Identifizierung für den Andromeda-Algorithmus zugelassen, woraufhin die Listen der *forward*- und *reverse*-Hits dementsprechend angepasst werden (Lenz and Dihazi 2016). Die in ProteomeDiscoverer (PD) implementierte Suchmaschine Percolator basiert dahingegen auf einem *machine learning*-Algorithmus zur verbesserten Unterscheidung von wahren und falschen Hits (Käll *et al.* 2007).

Bei dem DB-Abgleich der gemessenen Spektren gegen die *in silico* Spektren einer Datenbank hat neben der Messung selbst, vor allem die Größe der ausgewählten Datenbank, aber auch die Anzahl an möglichen, variablen Modifikationen einen großen Einfluss auf die benötigte Rechenleistung. Mit jeder zusätzlich ausgewählten Modifikation vergrößert sich der „Suchraum“ exponentiell, so dass die Analyse der über 400 beschriebenen Proteinmodifizierungen rechnerisch nicht praktikabel

ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass bereits bekannte Modifizierungen an anderen Aminosäuren auftreten oder dass es ganz unbekannte Modifizierungen gibt, die den Suchraum unendlich groß bzw. eine Datenbank-basierte Identifizierung unmöglich machen (Ahmadi and Winter 2019). Außerdem stellt die Sensibilität der Peptid-Identifizierung im Bezug auf die Größe des Suchraums ein großes Problem dar (Shanmugam and Nesvizhskii 2015), welches besonders aus der Metaproteom-Forschung bekannt ist (Beyter *et al.* 2018). Umso größer der Suchraum, desto geringer wird die Rate an identifizierten Peptiden, weshalb von einer Angabe aller in den Proben vorhandenen PTMs abgesehen werden sollte. Eine Strategie um die Häufigkeit bestimmter Proteinmodifizierungen in einem Probenset zu evaluieren verläuft über sogenannte *open* oder *Error-Tolerant* (ET)-Suchen (Svozil and Baerenfaller 2017). Dafür können Software-Lösungen über eine Mascot ET-Suche oder die sogenannte *dependent peptides*-Funktion in MaxQuant verwendet werden (Tyanova *et al.* 2016).

Aus den quantifizierten Proteinlisten werden über anschließende statistische Auswertungen biologisch interessante, differentiell exprimierte Targets extrahiert, zum Beispiel über einen Zweistichproben t-Test oder eine *Analysis Of Variance* (ANOVA) unter Angabe des gewünschten Signifikanzniveaus über den *probability of type I error* (p-value). Bei der Durchführung einer Vielzahl von statistischen Tests für jedes quantifizierte Protein führt das sogenannte *multiple hypothesis testing* Problem zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Hits (Tyanova and Cox 2018). Notwendige Methoden zur Korrektur stellen immer einen Kompromiss zwischen falsch-akzeptierten (*error type I*) und falsch-verworfenen (*error type II*) Hits dar, wobei zum Beispiel die Permutations-basierte FDR (Tusher *et al.* 2001) einen geringeren *error type II* aufweist als die Korrektur nach Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995).

1.4. Phosphoproteomanalyse

Die Phosphorylierung als post-translationale Modifikation an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin ist reversibel, zeigt eine hohe Dynamik *in vivo* und unterliegt somit einer hohen Komplexität. Die Aminosäure Serin wird am häufigsten phosphoryliert vorgefunden, vor Threonin und Tyrosin mit einem Verhältnis von ca. 100:10:1 (Humphrey *et al.* 2013). In *shotgun* MS/MS-Experimenten zeigen phosphorylierte Peptide generell nur eine geringe Abundanz gegenüber nicht-modifizierten Peptiden. Die Analyse dieser Peptide erfordert die Vermessung eines hohen dynamischen Bereichs, weshalb Phosphoproteomanalysen fast ausschließlich unter Verwendung von Phosphopeptid (PP)-Anreicherungsstrategien durchgeführt werden.

Trotz intensiver Studien zu Kinasen und deren Aktivität, werden immer weiter unerwartete und neue Funktionen von eigentlich gut untersuchten Kinasen gefunden. Das Vorhandensein von weiteren, über 400 humanen Kinasen lässt vermuten, dass sehr interessante und wichtige biologische Funktionen noch unentdeckt sind. Die MS-basierte Phosphoproteomanalyse wird dafür

als ideales *tool* angesehen, um Einblicke in die komplexen Mechanismen von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zu erlangen, um dann beispielsweise mit diesem Wissen anschließend zelluläres Verhalten beeinflussen zu können (Needham *et al.* 2019). Eine phänotypische Charakterisierung durch z.B. *knock-out* ist jedoch meist trotzdem notwendig. So konnte durch einen *knock-out* der NUAK *family* SNF1-like kinase 1 (NUAK1) ein inhibiertes Insulin-Signaling in Mäusen detektiert werden (Inazuka *et al.* 2012). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine aktive *Dual specificity Tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 3* (DYRK3) in humanen Zellen zur Auflösung von Stressgranula und der Auflösung von inhibiertem mTOR-C1, also zur Aktivierung durch Phosphorylierung des Inhibitors PRAS40 führte (Wippich *et al.* 2013). Vor allem nach spezifischer Anreicherung von Phosphopeptiden kann über eine MS-basierte Messung eine umfangreiche quantitative Analyse von Phosphorylierungsstellen erfolgen.

1.4.1. Phosphopeptidanreicherung

Die zwei am häufigsten angewandten Methoden der Phosphopeptidanreicherung sind *Metal Oxide Affinity Chromatography* (MOAC), zu welcher die Titandioxid (TiO₂)-basierte Anreicherung gehört, und *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), zu welcher die Eisen-Nitriloessigsäure (Fe-NTA)-basierte Aufreinigung zuzuordnen ist (Abbildung 6 A). Weitere Methoden beruhen zum Beispiel auf der Antikörper-basierten Bindungen von Phosphorylierungen, wie die Verwendung von anti-Phospho-Tyrosin-Antikörpern (Leitner 2016). IMAC- und MOAC-basierte Methoden binden neben identischen Phosphopeptiden, auch für die jeweilige Methode spezifische Peptide aufgrund unterschiedlicher Bindungseigenschaften des Säulenmaterials. Das parallele Durchführen mehrerer Methoden führt generell zu einer größtmöglichen Abdeckung des Phosphoproteoms und ist somit zu bevorzugen. Die dafür benötigten hohen Protein-Ausgangsmaterialien und die teilweise Komplementarität von IMAC sowie MOAC führten zur Entwicklung von sequentiellen Anreicherungs-Methoden. Erfolgt zuerst die IMAC- und dann die MOAC-basierte Anreicherung nennt sich das Verfahren *Sequential Elution from IMAC* (SIMAC) (Thingholm and Larsen 2016). Die umgekehrte Reihenfolge wird als *Sequential Elution from MOAC* (SMOAC) bezeichnet. Die benötigten Materialien und die entsprechenden Protokolle werden von der Firma Thermo Fisher Scientific vertrieben, wobei SMOAC-basierte Anwendungen deutlich seltener in wissenschaftlichen Publikationen vorgefunden werden.

Eine C18-basierte Peptidaufreinigung vor der Phosphopeptidanreicherung ist häufig aufgrund mit dem Säulenmaterial-interagierender störender Probenbestandteile notwendig. Eine zusätzliche Aufreinigung von Phosphopeptiden über C18-Material (nach der Phosphopeptidanreicherung) wird zum Schutz der teuren und empfindlichen Geräte der nLC-MS/MS-Strecke häufig durchgeführt. Dieses erfolgt entweder *off-line* vor der Messung oder unter Verwendung einer Vorsäule im nLC-System. Da vor allem multi-phosphorylierte Peptide nicht effizient an C18-Material binden (Larsen *et al.* 2004), kommt es zu (hohen) Verlusten (Ondrej *et al.* 2020). Neben der reduzierten Bindung

hydrophiler, phosphorylierter Peptide spielt die Beladung der (Trenn-) Säule eine wichtige Rolle in der Phosphoproteom-Analyse, denn neustens konnte gezeigt werden, dass besonders hydrophile Peptide bei Überladung der Säule zu großen Teilen verloren gehen (Maia *et al.* 2020).

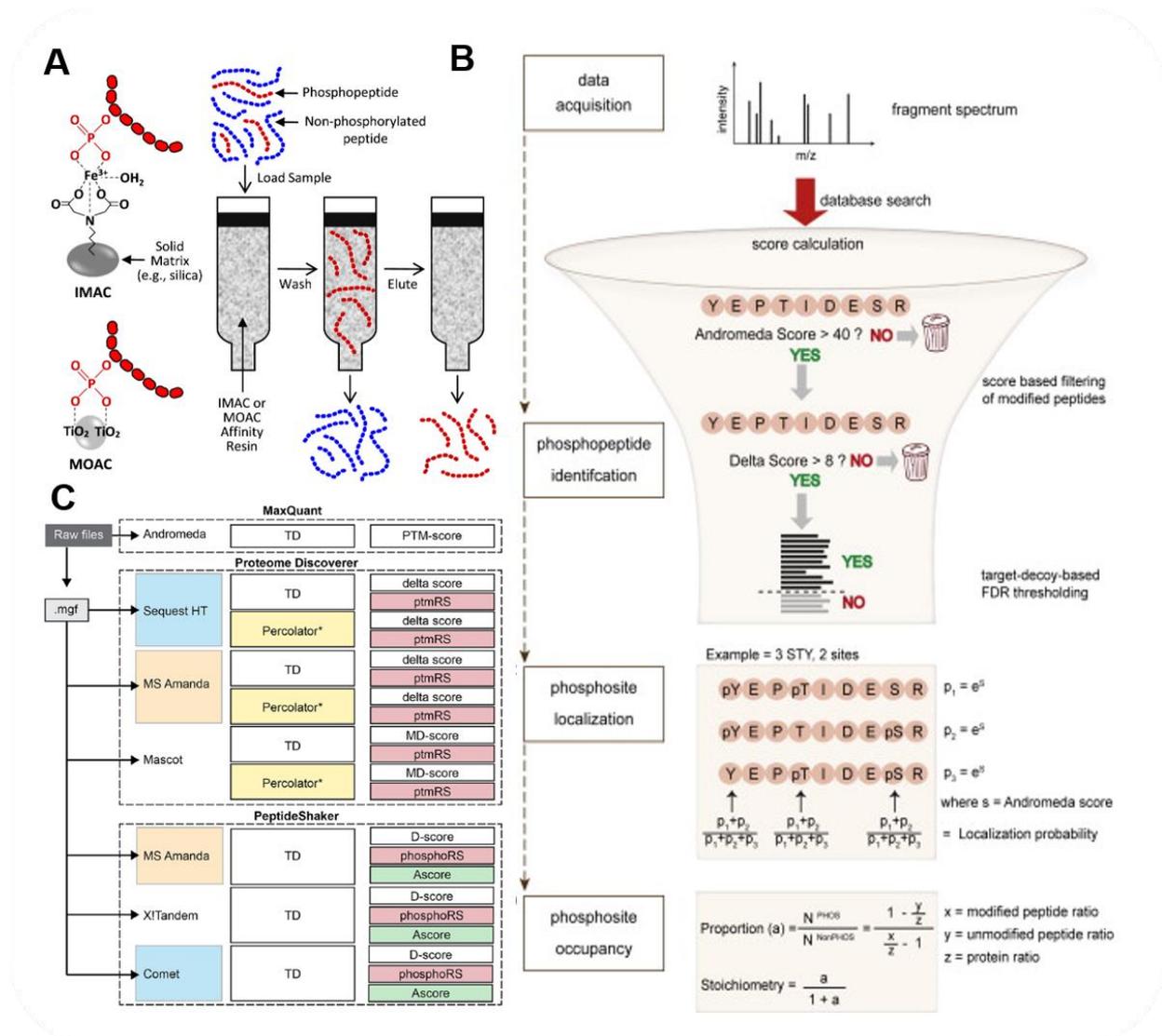


Abbildung 6 Schematische Überblicke über die Anreicherung, Identifizierung und Quantifizierung von Phosphopeptiden. **A**) Überblick über die Anreicherungsstrategien MOAC und IMAC (Wilson *et al.* 2018). **B**) Schematischer Ablauf einer Phosphoproteom-Analyse in MaxQuant mit der Andromeda-Suchmaschine. Zunächst wird ein *score* berechnet und modifizierte Peptide mit einem *score* niedriger als 40 ausgeschlossen. Weiterhin wird ein *target-decoy*-basierter *False Discovery Rate* (FDR)-Filter durchgeführt und für die Phosphorylierung der verbleibenden Peptide eine Lokalisierungswahrscheinlichkeit berechnet. Die finale Berechnung der *occupancy* erfolgt durch Kombination des modifizierten und unmodifizierten Peptid-Ratios mit dem Protein-Ratio (Sharma *et al.* 2014). **C**) Vergleich verschiedener Auswertestrategien über die Suchmaschinen Andromeda, Sequest HT, MS Amanda, Mascot, X!Tandem und Comet (Locard-Paulet *et al.* 2020).

Die Arbeitsgruppe von Humphrey *et al.* entwickelte ein sogenanntes EasyPhos-System, womit aus 1 mg Ausgangsmaterial 10.000 Phosphopeptide identifiziert werden konnten. Bei Verwendung des EasyPhos-Systems kann auf die Entsalzung vor der Phosphopeptid-Anreicherung verzichtet werden. Für Proteinsolubilisierungspuffer werden chaotrope Agentien, wie Guanidinhydrochlorid

(GdmCl) oder SDS eingesetzt, welche durch Aceton- oder Chloroform/Methanol-Fällung anschließend wieder abgereichert werden. Die generelle Notwendigkeit einer Abreicherung besteht aufgrund der Inkompatibilität der Puffer mit der Phosphopeptid-Anreicherung, der Inhibierung der Enzymaktivität im Proteinverdau (durch GdmCl) oder/und aufgrund des Interferierens von SDS mit der RP-Trennung von Peptiden, sowie der Ionisierung über ESI (siehe 1.3.1). Nach der Proteinfällung wird in einem für den Verdau kompatiblen Puffer, wie zum Beispiel Trifluorethanol (TFE), weitergearbeitet. Neben einer Kostenersparnis der C18-Aufreinigung kommt es zu weniger Peptidverlust, weniger Varianz und einer Zeitersparnis (Humphrey *et al.* 2015a). Ein Nachteil lag zunächst in der hohen Menge an benötigtem Proben-Ausgangsmaterial, welche jedoch durch eine Weiterentwicklung verringert wurde und zur Identifizierung von ca. 4.000 Phosphopeptiden in 90 min Messzeit aus nur 25 µg Zelllysate führte. Der EasyPhos-Workflow wird ab 500 µg Ausgangsmaterial als „gesättigt“ beschrieben und führte zur Quantifizierung von ca. 16.000 Phosphopeptiden pro Probe mit ca. 280 Phosphopeptiden pro Minute Messzeit (Humphrey *et al.* 2018). Experimentell wurde auf den Schritt der Proteinfällung verzichtet. Eine dafür notwendige Puffer-Reevaluierung führte zu einem Lysepuffer, der eine gute Proteinsolubilisierung bewirkte, die Trypsin-Aktivität nicht inhibierte, sowie eine Kompatibilität zur Phosphopeptid-Anreicherung und nLC-MS/MS-Strecke aufwies. Ein möglicher Puffer, Natriumdesoxycholat (*Sodium Deoxycholate*, SDC) erfüllte die ersten beiden Eigenschaften, ist jedoch nicht direkt kompatibel zur Phosphopeptid-Anreicherung, da es unter niedrigem pH in wässriger Lösung ausfällt. Durch die Verwendung von SDC-Puffer in mindestens 50 % Acetonitril oder Isopropanol konnte das EasyPhos-System verbessert und anstelle von ca. 3.000 quantifizierten Phosphorylierungsstellen mit dem neuen Protokoll ca. 9.000 Stellen quantifiziert werden (Humphrey *et al.* 2018).

1.4.2. Die Tiefe der Analyse

Ein erstes Beispiel hochqualitativer Literatur umfasst die Quantifizierung von 1.000 Phosphorylierungsstellen ausgehend von 10.000 Zellen einer humanen Krebszelllinie (Masuda *et al.* 2011). Kurze Zeit später konnten bereits 12.000 Phosphorylierungsstellen über neun Zeitpunkte nach 100 nM Insulin-Supplementation in Adipozyten in einem SILAC-Experiment quantifiziert werden (Humphrey *et al.* 2013).

Single-shot Phosphoproteom-Studien ermöglichen einen hohen Probendurchsatz, also das Analysieren vieler verschiedener Zustände, Zelllinien und/oder Zeitreihen (Jersie-Christensen *et al.* 2016). Demgegenüber stehen sogenannte (*ultra*) *deep phosphoproteome* Studien, durch die zum Beispiel ca. 50.000 Phosphopeptide einer humanen Krebszelllinie identifiziert werden konnten (Sharma *et al.* 2014). Als Kompromiss von Kosten bzw. Messzeit und gewünschter „Tiefe“ der Analyse wird teilweise entweder vor (Reimann *et al.* 2020) oder nach Phosphopeptid-Anreicherung (Courcelles *et al.* 2013) eine Peptidfraktionierung über SCX, HpH-Chromatographie oder *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) durchgeführt (Leitner 2016). In einem

Vergleich zwischen HpH und SCX konnte gezeigt werden, dass die HpH-basierte Fraktionierung zu höheren Identifizierungen an Phosphopeptiden führt (Batth *et al.* 2014). Allerdings werden durch Fraktionierungen unter anderem Peptidspezies über verschiedene Fraktionen verdünnt, so dass *single-shot* Analysen einen Sensitivitäts-Vorteil der gering abundanten Phosphopeptide darstellt. Der hohe experimentelle Aufwand vermindert die Robustheit des Workflows, sodass mit Limitierungen in der Quantifizierung gerechnet werden muss, vor allem bei der häufig verwendeten Label-freien Quantifizierung (Humphrey *et al.* 2018).

1.4.3. Auswertung und Interpretation der Daten

Die Lokalisierung der Phosphorylierung, demnach die Bestimmung der exakten Position der Phosphorylierung innerhalb des Peptids beruht auf hoch-qualitativen MS/MS-Informationen (Abbildung 6 B). Die HCD-basierte Fragmentierungstechnik der Orbitrap (Zubarev and Makarov 2013) zeigte die besten Ergebnisse in *large-scale* Phosphoproteom-Analysen (Nagaraj *et al.* 2010). Die Datenauswertung der Phosphoproteomanalyse inklusive Phosphorylierungs-Lokalisierung erfolgt nicht nach einem einheitlichen Vorgehen, sondern kann über vielen verschiedenen Workflows erfolgen. Ein aktueller Vergleich der am häufigsten verwendeten Software-Strecken über MaxQuant, Proteome Discoverer und PeptideShaker verlief unter Einbeziehung der sechs Suchmaschinen Andromeda, Sequest HT, MS Amanda, Mascot, X!Tandem und Comet (Abbildung 6 C) sowie unter Einbeziehung verschiedener *score*-Berechnungen für die Lokalisierungen der Phosphorylierungsstellen. Durch die parallele Auswertung derselben Ausgangsdaten wurden Stärken und Schwächen der Workflows evaluiert und Unterschiede in den ausgewerteten Daten konnten durch Anpassung der Parameter angeglichen werden (Locard-Paulet *et al.* 2020).

Ein weiterer Aspekt, der bei der Analyse von spezifisch-angereicherten Proben zu beachten ist, ist die Berechnung der Stöchiometrie der Modifikation, *occupancy* genannt (Sharma *et al.* 2014). Für differentielle Phosphoproteomanalysen von zellulären Zuständen, die zeitlich über eine Stunde versetzt geerntet werden, sollte neben der Messung der Phosphopeptid-angereicherten Probe, die Messung der Ausgangs-Proteomprobe erfolgen, um dann die Stöchiometrie der Phosphorylierung berechnen zu können (Abbildung 6 C, (Roux and Thibault 2013).

Nach statistischer Evaluierung von signifikant regulierten, biologisch relevanten Phosphoproteinen erfolgt häufig eine manuelle Analyse regulierter Phosphorylierungsstellen mit Hilfe spezifischer Datenbanken. Die größte Datenbank für Phosphorylierungsstellen ist PhosphoSitePlus® (PSP). Insgesamt sind über 450.000 Modifizierungsstellen in der Datenbank enthalten, wobei Phosphorylierungen mit 65 % den größten Anteil darstellen. Neben hauptsächlich humanen Daten, liegen teilweise auch Daten für Maus und Ratte vor (Hornbeck *et al.* 2019), jedoch nicht für CHO oder für den chinesischen Hamster *Cricetulus griseus*.

1.5. Produktion rekombinanter Pharmazeutika in CHO-Zellen

Für die industrielle Produktion therapeutischer Proteine werden tierische Zelllinien verwendet, da diese in der Lage sind große und komplexe Proteine mit human-ähnlichen Glykosylierungen und Faltungsstrukturen zu erzeugen. Die hohe Ähnlichkeit zum entsprechenden körpereigenen Protein führt zu einer guten Wirksamkeit und Verträglichkeit des Wirkstoff-Proteins beim Patienten. Die am häufigsten verwendeten Zelllinien sind *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen, welche zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (*monoclonal Antibodies*, mAb), Wachstumsfaktoren, wie Erythropoetin (EPO), Blutgerinnungsfaktoren, wie Faktor VIII, Hormonen, wie das *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH), dem *tissue Plasminogen Activator* (tPA), sowie Enzymen und Fusionsproteinen eingesetzt werden (Walsh 2018). Insgesamt beruht die Monopolstellung von CHO-Zellen auf guten und robusten Wachstumseigenschaften im Produktionsmaßstab im Vergleich zu humanen Zelllinien. In den 1950er Jahren wurde die Ursprungszelle der CHO K1-Zelllinie aus einer Primärkultur von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters isoliert (Puck *et al.* 1958). Ein spontaner Übergang dieser Zellen zur kontinuierlichen Zelllinie (Puck *et al.* 1964) lässt insgesamt ein geringeres Risiko vermuten, als ein durch UV-Bestrahlung oder einen durch Viren induzierten Übergang. Außerdem bewirkt die langjährige Erfahrung in der sicheren, industriellen Nutzung der Zellen Vorteile in der Zulassung von Biopharmazeutika bei regulatorischen Behörden, wie der US-Amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) oder der *European Medicines Agency* (EMA) (Chu and Robinson 2001).

1.5.1. Die Kultivierung von tierischen Suspensionszellen

Ein genereller Nachteil tierischer Zelllinien im Vergleich zu nicht-tierischen Zelllinien liegt in den geringen zellspezifischen Produktivitäten mit Produkttitern im Bereich von ca. 1-10 g/l, wodurch hohe Produktionskosten entstehen (Stolfa *et al.* 2018). Die Produktausbeute berechnet sich aus der zellspezifischen Produktivität (q_p) und der viablen Zelldichte (*Viable Cell Density*, VCD). Obwohl die zusätzliche Last der Produktion eines rekombinanten Antikörpers schätzungsweise bis zu 10 % der Proteinsynthesekapazität beträgt (Geoghegan *et al.* 2018) können durch Optimierungsansätze selten beide Parameter verbessert werden können (Doolan *et al.* 2013). Auf dem Weg zu effizienteren Prozessen mit höheren Ausbeuten werden deshalb entweder höhere zellspezifische Produktivitäten angestrebt (Kumar *et al.* 2007), so dass der Energiebedarf gezielt in die Produktion des Produkts geleitet wird. Alternative Ansätze erzielen ein höheres Wachstum der Zellen (Coleman *et al.* 2019), wobei die erhöhte Biomasse insgesamt höhere Produkttiter erzeugen kann. Ansatzpunkte für diese Effizienzsteigerung liefern zum Beispiel die Prozessoptimierung, die Medienentwicklung und das *cellular engineering* der verwendeten Zelllinie. Optimierungsansätze werden häufig aufgrund vieler paralleler Ansätze in Schüttelkolben ohne pH- und Sauerstoff-Kontrolle (*Dissolved Oxygen Tension*, DOT) durchgeführt. Die industrielle Kultivierung tierischer Suspensionszellen erfolgt jedoch pH und DOT-geregelt in großen Bioreaktoren im industriellen

Maßstab in bis zu 20.000 l. Eine Übertragbarkeit der Daten zwischen geregelten und ungeregelten Prozessen ist nicht immer möglich (Trummer *et al.* 2006; Wurm and Jesus 2016). Neben dem geregelten Satz-bzw. *batch*, gibt es *fedbatch*-Verfahren, kontinuierliche Prozesse, wie Chemostat, oder Perfusions-basierte Kultivierungen. Bei den letzteren drei Strategien werden durch längere Kultivierungsdauern höhere Zell-Zeit-Integrale (*Integral of Viable Cell Density/Concentration*, IVCD oder IVCC) angestrebt (Kim *et al.* 2012).

1.5.2. Die Editierung des Genoms und spezifische Datenbanken

CHO-Zellen, als nahe Verwandte von Nagetieren, besitzen eine deutlich höhere Rate an chromosomalen Mutationen im Vergleich zum Menschen (Wu and Li 1985). Die genetische Instabilität führt zur Erleichterung der genetischen Veränderung der Zellen, weshalb *cellular engineering*-Strategien zur Verbesserung der (Parental-)Zelllinie häufig Anwendung finden (Krämer *et al.* 2010). Die Instabilität hat jedoch negative Effekte auf Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Prozesse und Forschungen. Im Laufe der Jahre führte dieses zur Entstehung verschiedenster Zelllinien aus der Ursprungszelllinie (Abbildung 7).

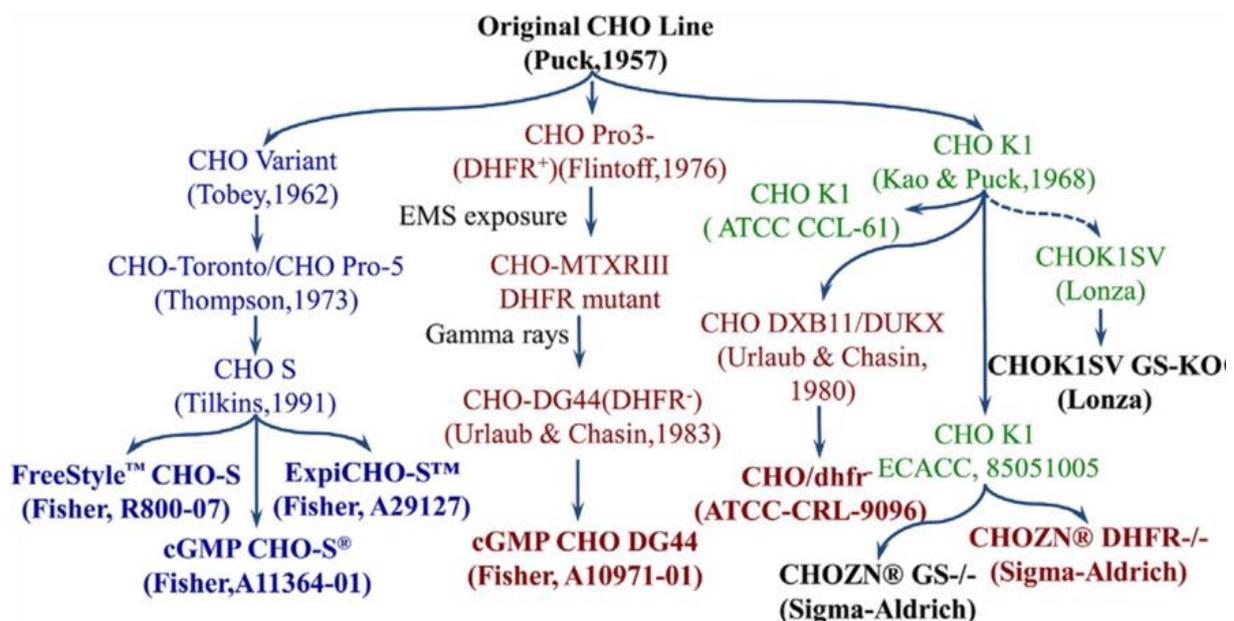


Abbildung 7 Eine Übersicht zu verschiedenen CHO-Zelllinien, die sich aus der Originalen CHO-Zelllinie seit 1957 entwickelt haben (Xu *et al.* 2017a).

Für die häufigsten eingesetzten CHO Parentalzelllinien, namens K1, DG44 und S konnten über einen *Genomics*-Ansatz innerhalb des 24.044 Genen umfassenden Genoms über 3,7 Millionen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) gefunden werden (Lewis *et al.* 2013). Die Unterschiede im Genom führen zu gravierenden Unterschieden im Transkriptom, Proteom und zudem im Bioprozess. Generelle Zellheterogenitäten erschweren eine Klon-übergreifende Forschung an CHO-Zellen (Davies *et al.* 2013). Um Zellheterogenitäten zu analysieren, müssen Zellen einzeln

über *single cell* Analysen betrachtet werden. Aktuell werden hierfür an der Universität Bielefeld Microfluid-Tools entwickelt (Schmitz *et al.* 2019).

Für diese Arbeit wurde hauptsächlich mit CHO-XL99 Zelllinien und der CHO-K1 (ATCC CCL-61, Abbildung 7) Zelllinie gearbeitet. Die CHO-K1 stellt sowohl ein viel-verbreitetes Grundmodell der CHO-Zellen dar (Xu *et al.* 2011), als auch die Vorläuferzelllinie der CHO-XL99.

Weitere große Heterogenitäten werden durch das Einfügen des Zielgens (*Gene Of Interest*, GOI) in das CHO-Genom erzeugt. Die Integration erfolgt entweder „transient“, was eine Expression des Zielgens für eine kurze Dauer bedeutet oder „stabil“, wobei die Co-Transfektion und Anwendung eines Selektionssystems über einen deutlich erhöhten Zeitraum möglich ist. Die stabile Integration des GOI verläuft dabei häufig ungerichtet an (einer) unbestimmten Stelle(n) im Genom. Die Produkt-Genexpression ist somit von der lokalen Chromatin-Organisation und epigenetischer Regulation abhängig und nicht vorhersehbar. Nach (langen) Transfektions- und Selektionsprozessen werden aus dem generierten Zellpool, bestehend aus Zellen mit Unterschieden in Integrationsort und damit zusammenhängenden Charakteristiken, zum Beispiel *high-producer* Zellen, isoliert und für die Produktion verwendet. Die Definition einer *high-producer* Zelllinie variiert über verschiedene Literaturangaben. Josse *et al.* definierten zum Beispiel die verwendeten Zelllinien mit einer q_p von ca. 7 pg/Zelle/Tag (pcd) als *high-producer* (Jossé *et al.* 2016) und Chong *et al.* verwendeten den Begriff *high-producer* für CHO-Zelllinien mit zellspezifischen Produktivitäten von über 20 pcd und *low-producer* mit ca. 2 pcd (bei Kultivierung mit 0,25 μ M MSX) (Chong *et al.* 2012). Trotz sogenannter Klonalität der Zelllinien (*Clonally-Derived Cell Lines*, CDCL), die den Ursprung aller Zellen aus einer Vorläuferzelle beschreibt, können intra-klonale Heterogenitäten beobachtet werden (Pilbrough *et al.* 2009). Als Selektionssystem zur stabilen Integration ins CHO-Genom stehen zum Beispiel das Dihydrofolatreduktase (DHFR)- oder das Glutamin Synthetase (GS)-System zur Verfügung. Die Synthese von Glutamin durch die GS erfolgt durch Kondensation von Glutamat und Ammonium. Durch Kultivierung der transfizierten Zellen mit GS-Selektionssystem in Glutamin-freiem Medium können nur positive Klone überleben, da die endogene GS-Aktivität nicht für ein exponentielles Wachstum der Zellen ausreicht. Da CHO-Zellen eine geringe endogene GS-Aktivität besitzen, erfolgt die Kultivierung zusätzlich unter Verwendung des GS-Inhibitors Methioninsulfoximin (MSX). Eine Erhöhung des Selektionsdrucks durch eine Steigerung der eingesetzten 25 μ M MSX-Konzentration kann eine zusätzliche Genamplifikation hervorrufen (Birch *et al.* 2005), die zu höheren Produktkonzentrationen führen kann. Die Effizienz des GS-Systems konnte durch Generierung einer GS-negativen Parentalzelllinie weiter erhöht werden (Fan *et al.* 2012).

Bei stabil-integrierten GOIs kommt es nach einer gewissen Zeit zu einer Verringerung der Produktbildung durch Verlust von Genkopien (*copy number loss*) oder Gen-Silencing, einer

Suppression der Produkt-Genexpression. Insgesamt wird dieses Phänomen der verringerten Expression *production instability* genannt (Wippermann and Noll 2017). Um der Integration in transkriptionell weniger aktive Bereiche des Genoms oder Gen-Silencing bei einer ungerichteten Integration entgegenzuwirken, werden sowohl Methoden zur gerichteten Integration, wie CRISPR/Cas9, als auch Methoden zur Identifikation geeigneter, hoch-transkribierter Integrationsstellen benötigt (Ronda *et al.* 2014). In aktuell publizierten Studien zu einem 3D Chromatin-Profilung des CHO-Genoms wurden Bereiche von essentiellen *housekeeping* Genen als genomisch sowie transkriptionell stabil identifiziert und somit als mögliche Integrationsstellen vorgeschlagen (Bevan *et al.* 2020).

Bei der (Proteom-) Analyse von Organismen, die nicht zu den häufig studierten Modellorganismen gehören, ist die (Protein-) Datenbank häufig ein limitierender Faktor der Datenanalyse (Russell *et al.* 2017). Um dem entgegenzuwirken werden entweder Datenbanken von Organismen mit hohem Verwandtschaftsgrad oder mit unvollständigen Datenbanken gearbeitet. Für CHO-Zellen bildet das erste *draft* Genom der Zelllinie CHO-K1 „CriGri_1.0“ (Xu *et al.* 2011), sowie weitere Transkriptom-Sequenzierdaten (Becker *et al.* 2011), die erste Grundlage für eine spezifische Datenauswertung mit 34.914 Einträgen in der resultierenden Proteindatenbank. Die Arbeit mit *Chinese Hamster Ovary*-Zellen basiert häufig auf Sequenzierdaten des Chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus*, welche aus den Wüsten des nördlichen Chinas und der Mongolei stammen (Lewis *et al.* 2013). Für *Cricetulus griseus* gibt es aktuell (Mitte 2020) 56.345 Einträge der TrEMBL-Datenbank und 238 Einträge in der SwissProt-Datenbank. Neben UniProtKB gibt es die Rubrik *Proteomes*, welche Proteom-Datensätze zum Datenbank-Abgleich zur Verfügung stellt (UniProt Consortium 2018). Diese Rubrik beinhaltet seit kurzem Daten zu der Zelllinie CHO-K1 (23.885 Einträge), welche bereits von neusten Publikationen zum CHO-Proteom Anwendung gefunden haben (Chevallier *et al.* 2020). Erste *single molecule real-time* Sequenzierungen wurden zuletzt mit Illumina-basierten Assemblierungen kombiniert und führten zu einem verbesserten CHO-Genom (Rupp *et al.* 2018). Die sogenannte „CriGri_PICR“-Assemblierung führte zu 46.583 Einträgen in der Proteindatenbank. Daraufhin wurde das Genom des Chinesischen Hamsters unter Verwendung von RNA-Sequenzierungs-, *Proteomics*- und sogenannten Ribo-Seq-Daten neu annotiert und eine sogenannte proteogenomische Datenbank generiert, was zur Identifizierung von über 3.500 neuen Proteinen führte und somit die Interpretation von *omics*-Daten fördert (Li *et al.* 2019). So konnten bereits neuste CHO-Proteomstudien mit diesen proteogenomischen Datenbanken arbeiten (Kaushik *et al.* 2020). Nach einem aktuellen Update (Juli 2020) der sogenannten „CriGri_PICRH“-Assemblierung enthält die entsprechende Proteindatenbank 46.476 Einträge.

1.5.3. Der Marktwert

Ein aktuell kontinuierliches Ansteigen des Marktwerts an Protein-basierten Biopharmazeutika bewirkt ein konstant hohes Interesse der Optimierung CHO-basierter Produktionsprozesse. Schätzungen diesbezüglich belaufen sich auf kumulative Umsätze von 651 Milliarden US-Dollar von 2014 bis 2017, wobei monoklonale Antikörper die lukrativste Klasse mit über 65 % des Umsatzes darstellen. Ca. 84 % der in dieser Zeit zugelassenen mAbs werden aktuell in CHO-Zellen produziert (Walsh 2018). Aktuell stellen mAbs eine Möglichkeit zur Neutralisierung von *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) dar (Zhang *et al.* 2021), wobei mAb-Produkte der Firma Eli Lilly und Regeneron Pharmaceuticals über eine *Emergency Use Authorization* (EUA) für bestimmte *Corona Virus Disease 2019* (COVID-19)-Fälle als Therapeutikum zugelassen sind.

Neben diesem enormen und stabilen Marktvolumen, entwickelt sich ein weiterer rasant wachsender Markt in der Produktion von Pharmazeutika zur Behandlung seltener Erkrankungen, den sogenannten *orphan diseases* (Reis *et al.* 2015). Die Rentabilität eines Prozesses und den enormen Entwicklungskosten wird jedoch nicht zuletzt über die zu produzierende Menge definiert. Zur ökonomischen Herstellung geringer Mengen eines speziellen rekombinanten Produkts zur Behandlung dieser *orphan diseases* werden ein umfassendes zelluläres Verständnis und rationale Methoden zur Prozessentwicklung benötigt. Beides wird durch Fortschritte einzelner *omics*-Technologien und durch die Integration mehrerer *omics*-Daten erreicht (Lewis *et al.* 2016).

1.5.4. Der Metabolismus im Kontext der Medienzusammensetzung

Der Metabolismus und die Analyse über *Metabolomics*-Methoden sind für ein zelluläres Verständnis wichtig. Die Energiegewinnung in tierischen Zellen erfolgt über Glykolyse, den Tricarbonsäurezyklus (TCA) und die oxidative Phosphorylierung mit einer Produktion von bis zu 36 Mol ATP pro Mol Glukose. Oft wird in CHO-Zellen jedoch ein alternativer, energetisch ungünstigerer Stoffwechselweg vorgefunden, bei dem unter normalen Sauerstoffkonzentrationen nur über die Glykolyse 4 Mol ATP pro Mol Glukose hergestellt werden. Dieser aus der Krebszellforschung bekannte glykolytische Phänotyp wird Warburg Effekt genannt und vermutlich sowohl über die Mikroumgebung der Zellen hervorgerufen wie über pH-Wert und Nährstoffkonzentrationen, als auch durch Mutationen der Gene p53, MYC, *Hypoxia-Indicible Factor 1* (HIF1), AMPK-*Liver Kinase B1* (LKB1) oder PI3K (Cairns *et al.* 2011). Über eine Akt-vermittelte Aktivierung von mTOR werden Transkriptionsfaktoren, wie HIF1, aktiviert. HIF1 bewirkt daraufhin eine Transkription von Genen, die die Glykolyse-Kapazität der Zelle erhöhen, wie zum Beispiel Gene für Glukosetransporter oder glykolytische Enzyme. Weiterhin werden PDKs aktiviert, der mitochondriale Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) inhibiert, der Fluss von Pyruvat in den TCA reduziert und somit die oxidative Phosphorylierung verringert (Cairns *et al.* 2011). Die Produktion von 1-2 Mol Laktat pro Mol Glukose in der Glykolyse führt zu hohen

Laktatkonzentrationen im Medium, wobei gezeigt werden konnte, dass Konzentrationen ab 18 mM Wachstums-inhibierend wirken (Kurano *et al.* 1990) oder im Gegenteil als Energiequelle verbraucht werden können (Dorai *et al.* 2009). Die Änderung des Stoffwechsels von Laktatproduktion zum Laktatverbrauch wird ist Gegenstand aktueller Forschung (Hartley *et al.* 2018), Klon-spezifische Charakteristiken erschweren jedoch die Aufschlüsselung genauer Mechanismen (Zagari *et al.* 2013). Zwei Schlüsselproteine in der Regulierung des sogenannten *lactate switchs* sind der *Mono-Carboxylate Transporter* (MCT), welches Laktat zusammen mit H⁺ aus und in die Zellen transportiert und die Laktat Dehydrogenase (LDH), welche Laktat in Pyruvat umwandelt. Die Autoren eines *reviews* vermuten, dass der Redox-Status der Zelle für einen schnellen Stoffwechselshift verantwortlich ist (Hartley *et al.* 2018).

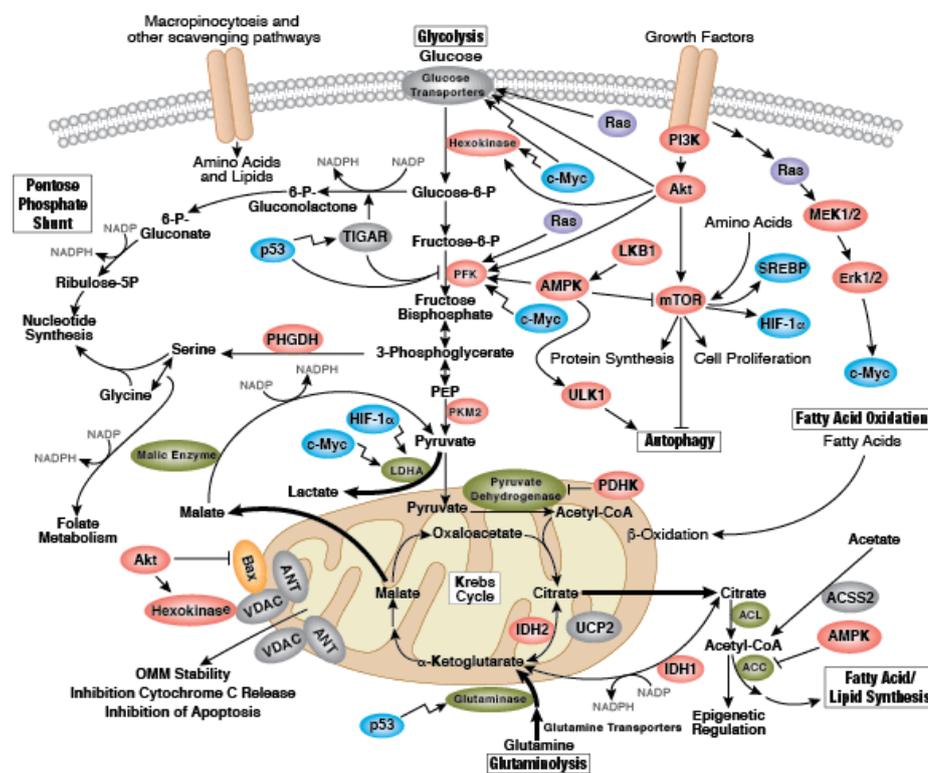


Abbildung 8 Eine Übersicht zum zellulären Metabolismus des Warburg-Effekts (Cell Signaling Technology 2020).

Kommerziell erhältliches (flüssiges) Zellkulturmedium wird ohne Glutamin hergestellt, da der spontane Zerfall und die Degradierung von Glutamin zur Bildung von Ammonium führen. Ammonium ist, wie Laktat, ein für die Zellen toxisches Nebenprodukt (Wlaschin and Hu 2006). Dieses Glutamin-freie Medium kann demnach für die Kultivierung von GS-Selektionssystem-basierten rekombinanten Zelllinien verwendet werden. Sofern ein Überschuss an Glutamin im Medium herrscht, kann neben der Glykolyse, der Verstoffwechslung von Glukose mit Laktat als Nebenprodukt, auch die Glutaminolyse unter Freisetzung von Ammonium der Energiegewinnung dienen (Fan *et al.* 2015).

In der Glutaminolyse, der Umwandlung von Glutamin zu Glutamat entsteht unter anderem direkt Glutathion (GSH, Abbildung 9) (Cairns *et al.* 2011).

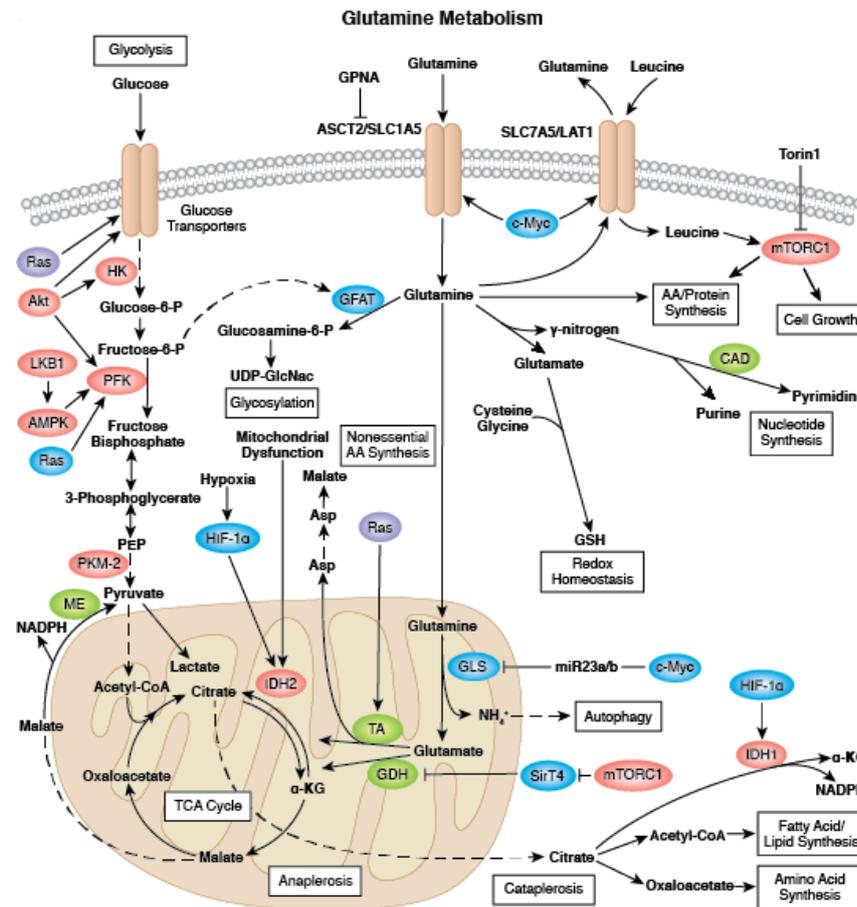


Abbildung 9 Eine Übersicht zum zellulären Metabolismus mit dem Fokus auf der Glykolyse und dem Glutamin-Stoffwechsel (Cell Signaling Technology 2016).

Die umgekehrte Reaktion, die *de novo* Synthese der Aminosäure Glutamin erfolgt über die Glutamin Synthetase (GS, GLS oder *L-glutamate:ammonia ligase*, *GLUL*-Gen), ein sogenanntes *housekeeping* Enzym, welches unter ATP-Verbrauch Glutamat und Ammonium zu Glutamin, ADP und Phosphat umwandelt. Außerdem kann Glutamin über das Enzym Asparagin Synthetase (ASNS) zu Glutamat hydrolysiert werden und umgekehrt, worüber zum Beispiel teilweise Limitierungen von Asparagin ausgeglichen werden können (Seewoster and Lehmann 1995).

In CHO-Zellen konnte die Anpassung der Proteinsyntheserate an die aktuelle Nährstoffbedingung gezeigt werden, wobei zum Beispiel eine Leucin-Limitierung eine Aktivierung des AAR-Signalwegs und Inaktivierung von mTOR bewirkte (Fomina-Yadlin *et al.* 2014). Die mTOR-vermittelte Regulierung der Aminosäure-Homöostase (über Aminosäure-Transportern, tRNA *aminoacyl* Transferasen und Enzyme) erfolgt dabei über den Transkriptionsfaktor ATF4 (Park *et al.* 2017), obwohl ATF4-abhängige Mechanismen teils kontrovers diskutiert werden (Mu *et al.* 2019). Für eine Glutamin-Limitierung konnten CHO-Zelllinien-spezifische Effekte auf Wachstum und Produktivität gezeigt werden (Ghaffari 2011). Eine kontrollierte Limitierung von Glutamin

oder Asparagin führte über AAR-Aktivierung zu einer Wachstums-Inhibierung und zu höheren Produktausbeuten (Kim *et al.* 2013a; Fomina-Yadlin *et al.* 2014). Außerdem kann durch die Minimierung der Glutamin-Konzentration die Konzentration von Wachstums-inhibierenden Ammonium reduziert werden. Die Ammonium-Konzentration kann außerdem zum Beispiel über die Verwendung von Glutamin-enhaltenen Dipeptiden gesenkt werden (Kim *et al.* 2013a).

Die Adaptation von CHO-Zellen an Serum-freie Medien und das Wachstum in Suspension stellt weitere wichtige Vorteile gegenüber anderen tierischen oder humanen Zelllinien dar. Die Zusammensetzung des Chemisch-Definierten Mediums (CDM) ist von entscheidender Bedeutung und die Medienentwicklung insgesamt ein wichtiger Parameter der Prozessoptimierung. Für die therapeutische Anwendung des Produkts ist vor allem eine gleichbleibende Zusammensetzung über viele Chargen entscheidend für zum Beispiel die Prozess-Performance oder für die Aufreinigungsstrategie des Produkts. Um dieses zu gewährleisten wurden komplexe Bestandteile mit tierischem Ursprung, wie Serum (*Fetal Calf Serum*, FCS) mit teils unbekanntenen Komponenten, aus den verwendeten Medien herausgenommen. Eine (teilweise) Kompensierung erfolgt zum Beispiel über Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie IGF (Chun *et al.* 2003), oder Phospholipiden, wie *Lyso-Phosphatidic Acid* (LPA) (Miki and Takagi 2015). IGF ist ein seit langer Zeit und häufig eingesetzter Wachstumsfaktor (Rasmussen *et al.* 1998), der einen Wachstums-fördernden und starken anti-apoptotischen Effekt auf CHO-Zellen ausübt (Miki and Takagi 2015). Die Signaltransduktion kann sowohl über den IGF-1R, als auch den Insulin Rezeptor (IR) erfolgen. Trotz hoher struktureller Übereinstimmung der beiden Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass der IGF-1R die MAPK-Signalkaskade effizienter aktiviert als der Insulin Rezeptor (Nelson 2008). Jedoch wird auf Basis älterer Daten vermutet, dass der IR in CHO-Zellen nur gering exprimiert wird (Seta and Roth 1997).

Die Zusammensetzung des CDM ist weiterhin von den Kosten der einzelnen Medienkomponenten abhängig und steht somit in direktem Zusammenhang zur Rentabilität des Prozesses. Hefeextrakt (*Yeast Extract*, YE) ist ein günstiges Additiv, welches die Produktausbeute deutlich erhöht, aber ebenfalls eine undefinierte Zusammensetzung aufweist. Um diese positiven Effekte kontrolliert zu erzeugen, wurde an der Entschlüsselung der YE-vermittelten zellulären Reaktion geforscht, wobei eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs beobachtet werden konnte (Mosser *et al.* 2015; Hu *et al.* 2015; Hu *et al.* 2018). Eine Möglichkeit das mTOR-Signaling spezifisch zu aktivieren, ist die Zugabe des Wachstumsfaktors IGF (Jung and Suh 2014). Die Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie IGF, führt zu Proliferations- und Anti-Apoptose-Signaling, jedoch nicht immer zu verbesserten Prozess-Ausbeuten und stellt einen kostspieligen Bestandteil von Zellkulturmedien dar (Becker *et al.* 2014). Für eine Substitution von IGF durch eine kostengünstigere Alternative mit dem Eisenchelatlagerer *Aurin Tricarboxylic Acid* (ATA) konnten vergleichbare Ergebnisse in Schüttelkolben-Kultivierungen erzielt werden (Miki and Takagi 2015).

Neben der Zugabe von chemisch-undefinierten tierischen Zusätzen oder teuren Wachstumsfaktoren besteht ein Bestreben die Effektivität eines Prozesses durch Zugabe von sogenannten *small molecules* oder auch *chemical chaperones* zu verbessern (Toronjo Urquiza *et al.* 2019). Zum Beispiel wirkt Natrium-Butyrat durch Inhibierung von Histon-Deacetylasen auf den Zellzyklus, führt jedoch zu einer frühen Apoptose-Induktion (Jiang and Sharfstein 2008; Camire *et al.* 2017). Die Zugabe von Retinsäure ist in vielen tierischen Zellsystemen für proliferative Effekte bekannt (Rahimi-Zarchi *et al.* 2018). Weitere chemische Additive, wie zum Beispiel Zink (Prabhu *et al.* 2018), Valeriansäure (Coronel *et al.* 2016) und neustens Resveratrol (Toronjo-Urquiza *et al.* 2020), können durch Beeinflussung der Proliferation (via Zellzyklus-Arrest) sowie der Stabilität des Produkts (via Chaperon-Funktionen) oder durch anti-oxidative Eigenschaften zu verbesserten Prozessparametern führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Small Molecule Inhibitors* (SMIs) zur Zellzykluskontrolle und Prozessoptimierung verwendet werden können (Du *et al.* 2015).

Je nach Struktur des rekombinanten Produkts, kann die Produktion des Produkts zu einer Verschiebung des gesamten Metabolismus führen. Für die Synthese eines monoklonalen Antikörpers werden spezifische Aminosäuren überdurchschnittlich viel benötigt, darunter Cystein, Tyrosin, Valin, Serin und Threonin. Nach Translation und Translokation in das ER erfolgt die Bildung von Disulfidbrücken und die N-Glykosylierung. Nach einem *COat Protein complex II* (COPII)-vermittelten Transport in den Golgi-Apparat werden die N-Glykane weiter prozessiert und weitere O-Glykosylierungen angebracht, bevor die finale vesikuläre Sekretion des mAbs ins Zellkulturmedium erfolgt (Gutierrez *et al.* 2020). Die für die mAb-Synthese verwendeten Aminosäuren stehen damit der Proteinhomöostase nicht mehr zur Verfügung, was zu einer erhöhten Proteinsynthese-Last führt. Besonders die Aminosäuren Cys, Tyr, Val, Ser und Thr sind überdurchschnittlich oft in der Sequenz eines IgGs enthalten (Geoghegan *et al.* 2018). Das sekretierte Produkt ist bis zur Ernte den Einflüssen des Zellkulturmediums ausgesetzt, weshalb an der Entschlüsselung des Sekretoms von CHO-Zellen geforscht wird (Slade *et al.* 2012). Da es vor allem bei der Bildung von Disulfidbrücken zur Produktion von *Reactive Oxygen Species* (ROS) kommt, wird eine hohe Antikörper-Produktion mit einem vermehrt oxidativen Metabolismus in Verbindung gebracht. Die Zelle produziert daraufhin mehr GSH, welches im ER durch Oxidation den reduzierten Zustand von Oxidoreduktasen erhält, sowie ROS und frei Radikale neutralisiert (Chong *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2018). Da in *high-producer* DHFR-basierten CHO-Zellen hohe intrazelluläre GSH-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, gilt GSH als Produktivitäts-Marker (Chong *et al.* 2012). Generell stellt der Glutathion-Metabolismus ein gut-untersuchtes Feld in der CHO-Forschung dar. Glutathion besteht aus drei Aminosäuren und schützt die Zelle vor oxidativem Stress durch den Übergang von reduzierter (GSH) zu oxidiert dimer Form (GSSG). Die Synthese von GSH erfolgt im Cytosol durch die *Glutamate-Cysteine Ligase* (GCL), welche aus zwei Untereinheiten (UE) besteht: der *catalytic* (GCLc)- und der *modifier* (GCLm)-UE. Die GCL-

Aktivität wird zum einen durch die GSH-Konzentration über eine *feedback*-Hemmung, zum anderen über post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, reguliert. In einem weiteren Schritt erfolgt die finale Synthese von GSH durch das Enzym *Glutathione Synthase* (GSS). GSH spielt unter anderem eine wichtige Rolle im Redox-Signaling und der Regulation von Proliferation und Apoptose (Pereira *et al.* 2018). Neben ROS-Stress wurde in *high-producer* CHO-Zellen ein erhöhtes UPR-Signaling (siehe 1.1.2) nachgewiesen (Prashad and Mehra 2015).

Teilweise werden nur einige wenige extrazelluläre Metabolite während einer Kultivierung gemessen. Eine umfassendere Metabolom-Analyse über LC- oder *Gas Chromatography* (GC)-MS erlaubt hingegen tiefere Einblicke in den physiologischen Zustand der Zellen (Vodopivec *et al.* 2019). Folgende Studien sind beispielsweise zu *Metabolomics* in CHO-Zellen publiziert: Ein Vergleich einer Wachstumshormon-produzierenden zur Parental-Zelllinie (Dietmair *et al.* 2012) oder von *high* und *low-producer* Zelllinien (Chong *et al.* 2012), eine Charakterisierung über den Verlauf einer *fedbatch*-Kultivierung (Ahn and Antoniewicz 2012) oder von zwei verschiedenen Laktatstoffwechsel-Phänotypen (Luo *et al.* 2012), sowie eine Analyse der Verbindung des Metabolismus zur Produktglykosylierung (Fan *et al.* 2015).

Neben den standardmäßig im Medium enthaltenen Aminosäuren kommen aufgrund von Hitzestabilität oder erhöhter Löslichkeitsgrenzen auch Dipeptide als Supplement in Zellkulturmedien zum Einsatz (Kang *et al.* 2012). Carnosin (β -*alanyl-L-histidine*) ist ein Imidazol Dipeptid, welches in verschiedenen Muskelgeweben von Wirbeltieren weit verbreitet ist. Die Synthese erfolgt durch das Enzym Carnosin Synthase und die Degradierung durch die Carnosinase. Es hat Funktionen als Antioxidans im ROS-Signaling, als Chelatbildner zweiwertiger Metallionen und ist an der Pufferung sowie dem Abfangen von Carbonyl-Verbindungen beteiligt (Abbildung 10 A). Allgemein werden Histidin-enthaltene Dipeptide aufgrund der entzündungshemmenden, antioxidativen, antiglykierende Wirkung zur Vorbeugung von chronischen Erkrankungen im Menschen eingesetzt (Menon *et al.* 2018; Cararo *et al.* 2015).

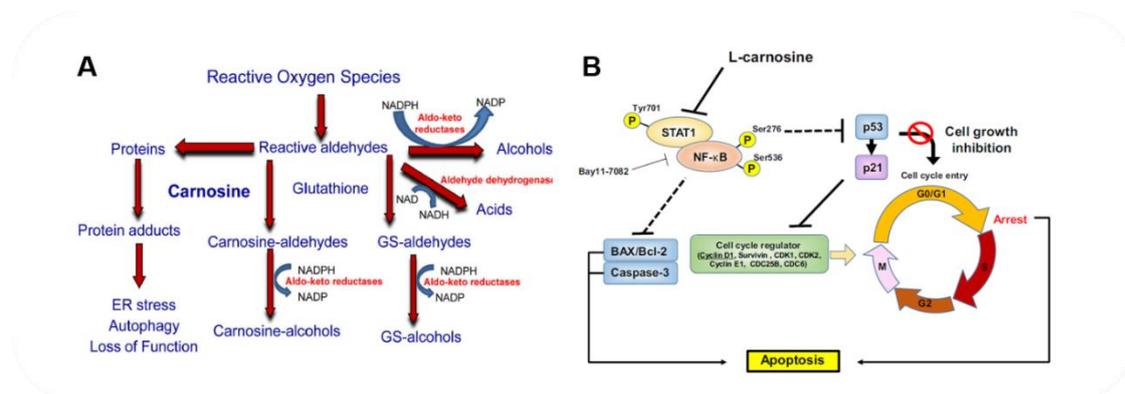


Abbildung 10 Publierte Modelle zu Funktionen von Carnosin. **A**) Eine schematische Darstellung der Detoxifizierung von Aldehyden über Histidin-enthaltene Dipeptide, wie zum Beispiel Carnosin oder Glutathion (Xie *et al.* 2013). **B**) Carnosin führt in Krebszellen innerhalb von 24 h zur Apoptose-Induktion und einem Zellzyklus-Arrest über Inhibierung des NF-κB/STAT1-Signaling (Lee *et al.* 2018).

Für Carnosin wird eine Rolle in der Regulierung der *cellular maintenance* vermutet, unter anderem da höhere Konzentrationen in Muskelzellen von Menschen im Vergleich zu Mäusen gefunden wurden und diese eine deutlich kürze Lebenszeit aufweisen (Holliday and McFarland 2000). Diese *anti-aging* Effekte von Carnosin werden auf die Reaktion mit *Reactive Carbonyl Species* (RCS) oder auf die Modulation der Glykolyse zurückgeführt. RCS sind hochreaktiv und führen zur Bildung von *Advanced Glycation End products* (AGE), nicht-enzymatisch glykosylierte Proteine, die eine Vielzahl an pathologischen Effekten verursachen. Die Autoren diskutieren eine mögliche Rapamycin-ähnliche Wirkungsweise (Hipkiss 2011). Die Supplementierung humaner diploider Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 20-50 mM L-Carnosin und erhöhte die Lebensdauer, wohingegen zytotoxische Effekte bei Abwesenheit von Pyruvat auf Tumorzellen beobachtet werden konnten (Holliday and McFarland 2000). Carnosin konnte außerdem Wasserstoffperoxid-vermittelten ROS-Stress und die dadurch bedingte Phosphorylierung von eIF4E und Akt inhibieren (Son *et al.* 2008). In einer neueren Studie an Krebszellen führte die Supplementierung von L-Carnosin zu einem Zellzyklusarrest und Apoptose über die Inhibierung von NF- κ B/STAT-Signaling (Abbildung 10 B), weshalb ein möglicher Einsatz in der Krebstherapie vermutet wird (Lee *et al.* 2018). Neben Studien die anti-proliferative Effekte beschreiben (Zhang *et al.* 2014a; Iovine *et al.* 2014; Oppermann *et al.* 2020), gibt es Studien in denen eine Stimulierung der Proliferation beobachtet werden konnte (Vishnyakova *et al.* 2014). Neusten Studien zur Folge konnte eine Carnosin-vermittelte PDK4-Expression nach erhöhter Histon-Acetylierung (Oppermann *et al.* 2019) und eine Inhibierung des Pentose Phosphat Pathways (PPP) beobachtet werden (Oppermann *et al.* 2019). In der CHO-basierten Forschung ist Carnosin als Antioxidans bekannt (Gille *et al.* 1991). Neustens wird vermutet, dass Hydrolysat-vermittelte Verbesserungen der Prozessperformance von CHO-Zellen unter anderem auf den Inhalt von Carnosin zurückzuführen sind (Azarian *et al.* 2017). Demnach könnten diese Verbesserungen durch die spezifische Zugabe von Carnosin hervorgerufen werden, ohne den Nachteilen von Chargenschwankungen von Hydrolysaten zu unterliegen. Da das Metabolom eine hohe Wechselwirkung zum Proteom und der post-translationalen Modifikationen aufweist (Metallo and Vander Heiden 2010), ist eine Analyse dessen für die Entschlüsselung globaler regulatorischer Netzwerke, die die rekombinante Protein-Produktion kontrollieren, von großer Bedeutung (Sharma *et al.* 2016).

1.5.5. Das intrazelluläre Proteom

Eine der allerersten Proteom-Arbeiten für CHO-Zellen diente der Proteomanalyse nach Verringerung der Kultivierungstemperatur zur Produktivitätssteigerung. Damals konnten über Gelbasierte Methoden generelle Unterschiede im Proteom festgestellt werden. Zusätzlich wurde über einen Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper Westernblot-basiert eine Änderung der Phosphorylierung einiger Proteine nachgewiesen (Kaufmann *et al.* 1999), so dass gleichzeitig die Basis für weitere Phosphoproteom-Studien gelegt wurde. Das Vorfinden eines nicht-linearen

Zusammenhangs von Transkriptom und Proteom in CHO-Zellen im Jahr 2006 (Nissom *et al.* 2006) führte dazu, dass viele Arbeitsgruppen an der Entschlüsselung des CHO-Proteoms unter anderem zur Identifizierung von Targets zum *cellular engineering* arbeiteten, wie zum Beispiel durch das Proteom-Profilung einer *high-producer* CHO-Zelllinie (Carlage *et al.* 2009). Auf Grundlage neuer Sequenzierdaten konnten CHO-spezifische Datenbanken angelegt werden, die zur Verbesserung der Identifizierungsrate von CHO-Proteomanalysen führte. In ersten differentiellen Analysen von zwei CHO-K1 Produktionszelllinien konnten 12 regulierte Proteine mittels Gel-basierter *Two Dimensional-Differential In Gel Electrophoresis* (2D-DIGE)-Methodik und anschließender LC-MS/MS-Messung ermittelt werden (Meleady *et al.* 2011). Arbeitsgruppen-interne Arbeiten an einer Mucin1-IgG-Fusionsprotein produzierenden CHO-Zelllinie (MUC1-CHO) in einer Glukose-limitierten Perfusionskultur zeigten Unterschiede im Energiestoffwechsel und der Cytoskelettorganisation in unterschiedlichen Wachstumsphasen der Kultivierung. Es konnte z.B. eine Hochregulierung der Proteine HSPA5/BIP/GRP78 (Mitglied der HSPA/HSP70-Proteinfamilie), sowie GRP94, *Hypoxia up-regulated protein 1* (HYOU1/GRP170, Mitglied der HSP11-Proteinfamilie) und Protein Disulfide-Isomerase 3 (PDIA3/ERP57) über 2D-DIGE quantifiziert werden (Wingens *et al.* 2015). HSPA5 ist ein wichtiges IgG-Chaperon und daher besonders für mAb-produzierende Zelllinien von Bedeutung (Ho *et al.* 2015). Weitere Gel-basierte Proteomarbeiten identifizierten Unterschiede zwischen exponentieller und stationärer Phase einer anti-Apoptose-optimierten (*B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-Xl)-Protein überexprimierenden), sowie mAb-produzierenden CHO-Zelllinie, wie zum Beispiel wiederum HSPA5 und PDIs, als auch die *DNA replication licensing factors* MCM2/5, eine Transglutaminase und Clusterin (Carlage *et al.* 2012).

Mitunter durch Wissenschaftler der Universität Bielefeld konnten enorme Verbesserung der CHO-spezifischen MS-basierten Proteinidentifikation mittels LC-ESI-MS erzielt werden (Meleady *et al.* 2012b). In ersten, direkten *shotgun* CHO-spezifischen Arbeiten konnten erstmals tausende an Proteinen identifiziert und quantifiziert werden (Baycin-Hizal *et al.* 2012). Ein Vergleich von *low*- und *high-producer* Zellen in DASGIB®-Bioreaktoren wurde an verschiedenen Kultivierungstagen durchgeführt, wobei 2.890 Proteine identifiziert wurden, von denen 277 Proteine als mindestens zweifach reguliert ermittelt wurden (Dorai *et al.* 2013). Weitere Ansätze folgten, zum Beispiel mit einer Identifizierung von 5.000 Proteine und der Quantifizierung von 2.800 Proteinen von Zellen im *high-glucose* Medium (Liu *et al.* 2015), der weiteren Optimierung von label-frei Quantifizierungsmethoden (Sommeregger *et al.* 2016) oder mit einem Vergleich von mehreren Parental-Zelllinien (Xu *et al.* 2017a; Lakshmanan *et al.* 2019). Ein weiterer Zelllinien-Vergleich erfolgte Proteom-basiert inklusive verschiedener Proben des *Cricetulus griseus* (Heffner *et al.* 2017). Auf dem Weg zu einer verbesserten Prozesskontrolle konnte über einen künstlich eingeleiteten Zelltod und anschließender Proteomanalyse spezifische Viabilitäts-Marker-Proteine

identifiziert werden (Albrecht *et al.* 2018). Weiterhin wurden der Einfluss des *feed*-Mediums oder Zelllinien-spezifische Unterschiede der unerwünschten Produkt-Proteolyse auf Proteom-Ebene analysiert (Torkashvand *et al.* 2018; Henry *et al.* 2018). Aktuelle Proteom-Studien fokussierten sich auf die Analyse von gewebspezifischen Funktionalitäten des chinesischen Hamsters und dem Vergleich zu den Zelllinien CHO-S und CHO-DG44. Demnach sollten zur Optimierung der verwendeten Zelllinie die spezifischen Fähigkeiten des Gewebes bei der Zelliniengenerierung beachtet werden und ggf. eingefügt werden, wenn diese Fähigkeit der parentalen Zelllinie nicht gegeben sei (Heffner *et al.* 2020).

Basierend auf Arbeiten von Feary *et al.* 2017 mit einer GS-basierten CHO-Zelllinie wurde in einer neusten Studie das Glutathion-Proteom in CHO DG44-Zellen analysiert. Eine vermutete Verbindung von GSH zur Produktivität und Cholesterolsynthese konnte bestätigt und detaillierter analysiert werden. Die Buthioninsulfoximin (BSO)-vermittelte Inhibierung von GSH führte zwar nicht zur erhöhten Produktbildung oder zu erhöhtem Wachstum, aber zu einer Überexpression von GCLc und GCLm. Außerdem konnte ein Anstieg des Zelldurchmessers, eine Verlangsamung des TCA-Zyklus und erhöhte Sekretion von Laktat und Alanin beobachtet werden. Neben der Anpassung des GSH-Metabolismus konnte eine globale Herunterregulierung der Cholesterolsynthese ermittelt werden, was wiederum eine Verbindung zur Protein-Sekretion dargestellt und somit als Brücke zwischen spezifischer Produktivität und GSH-Produktion gesehen wurde. Eine vermutete Inhibierung von GSH durch die Limitierung von Cystein im *feed*-Medium erbrachte keine Veränderungen (Chevallier *et al.* 2020).

1.5.6. Phosphoproteomics und Signaling

Zeitgleich zu der ersten öffentlichen Präsentation der für diese Arbeit erhobenen Daten zur IGF-induzierten Phosphorylierungsänderung in CHO-Zellen (Brachtvogel *et al.* 2018) wurde eine erste Phosphoproteom-Studie zur Analyse der Verringerung der Kultivierungstemperatur einer humanen *Secreted Alkaline* (SEAP)-produzierenden CHO-K1-Zelllinie veröffentlicht (Henry *et al.* 2017b). Ausgehend von ca. 2.500 und 3.400 identifizierten Phosphopeptiden über TiO₂- und Fe-NTA-basierte Anreicherungsstrategien konnten für 100 differentiell exprimierte Phosphopeptide über einen LFQ-Ansatz konsistente Daten für beide Methoden detektiert werden. Dabei wurden die folgenden Proteine beispielsweise als reguliert identifiziert: eIF4G, ATF2 (CREB2), *Microtubule-Associated Protein 1B* (MAP1B), das Protein NDRG1, *Ras and rab Interactor 2* (RIN2) und STK10. Die Änderung der Phosphorylierung von ATF2 und NDRG1 wurde orthogonal über Westernblot bestätigt (Henry *et al.* 2017b). Weiterhin beschäftigte sich diese Arbeitsgruppe mit einem Phosphoproteom-Profil einer mAb-produzierenden CHO DP12-Zelle über verschiedene Wachstumsphasen einer *batch*-Kultivierung. Insgesamt konnten ca. 3.800 differentiell exprimierte Phosphopeptide bestimmt werden, darunter Phosphorylierungen des humanen *Transcription Intermediary factor 1-beta* (TRIM28), *Pleckstrin-like domain-containing family G member 6*

(PLEKHG6) und des Proto-Oncogen c-CRK. Außerdem konnten Phosphorylierungen an mTOR und an *downstream* Targets, wie 4E-BP1, RAPTOR und PRAS40 quantifiziert werden. Die Autoren vermuten, dass die höchste mTOR-Aktivität an Tag 3 der *batch*-Kultivierung vorliegt (Kaushik *et al.* 2018). In einer weiteren kombinierten Phospho/Proteom-Studien konnten eine verringerte *Cyclic AMP-Responsive Element-Binding protein 1* (CREB1)-Menge im Nucleus und eine erhöhte CREB1-Aktivität in *high-producer* Zelllinien detektieren (Dahodwala *et al.* 2019). Neuste Phosphoproteom-Studien dieser Arbeitsgruppe vergleichen CHO-K1 Zellen in standardmäßigem, mit L-Glutamin supplementierten Medium zu Zellen, welche über 17 Passagen an Glutamin-freies Medium adaptiert wurden. Die LC-MS/MS-Messungen an der neueren Orbitrap Fusion Tribrid-MS führten zur Identifizierung von fast 10.000 Phosphorylierungsstellen und ca. 4.000 Proteinen, mit hauptsächlichlichen Protein-Expressionsunterschieden in der Organisation der extrazellulären Matrix (*Extracellular Matrix*, ECM) und der RNA-Prozessierung und Unterschieden der Phosphorylierung in der Calcium- und MAPK-Signaltransduktion (Kaushik *et al.* 2020). Nach aktuellem Kenntnisstand sind außer der Phosphorylierungen kaum andere PTMs an Proteinen, damit auch unerwartete PTMs eingeschlossen, in CHO-Zellen erforscht, was als ein weiteres wichtiges Forschungsfeld für das zelluläre Verständnis angesehen wird, darunter die Analyse von Modifikationen, wie Methylierungen und Acetylierungen zum Beispiel in der epigenetischen Regulierung.

1.5.7. Die epigenetische Regulierung der Genexpression

Die Chromosomen einer Zelle sind aus kondensiertem Chromatin aufgebaut. Chromatin, hauptsächlich bestehend aus DNA und Protein, dient der Verpackung und Komprimierung der DNA und ist in DNA-Replikation und Regulation der Transkription involviert. Die Proteine der Chromatinstruktur sind überwiegend Histone, wobei je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 ein Oktamer zusammen mit der DNA, auch Nukleosom genannt, bilden, welche weiterhin mit dem linker-Histon H1 verbunden sind. Histone sind 10-16 kDa große (kleine) Proteine, die N-terminal viele basische Aminosäuren aufweisen und somit in der Zelle positiv geladen vorliegen, worüber die Bindung zur negativ-geladenen DNA erfolgen kann. Generell wird zwischen kondensiertem, inaktivem Chromatin, auch Heterochromatin, und offenem, aktiven Chromatin, auch Euchromatin genannt, unterschieden (Mandal 2017). Der Wechsel zwischen den verschiedenen Formen des Chromatins erfolgt über Modifikationen an Histonen und an der DNA. Eine Vielzahl an Modifikationen, wie zum Beispiel Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen, bewirken eine dynamische, hoch-komplexe Regulation der Genexpression ohne Änderung der DNA-Sequenz, was Epigenetik genannt wird. Eine Abkürzung dieser Vielzahl an Modifikationen folgt einem spezifischen Muster, wobei H3K9me3 zum Beispiel für eine Trimethylierung der Aminosäure Lysin an der 9. Position des Histon 3 steht. Eine Besonderheit der Epigenetik ist, dass einige dieser Modifikationen bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden können

(Bernstein *et al.* 2007). Eine Histon-Acetylierung an der Aminosäure Lysin führt zu einer Ladungs-Neutralisierung und verminderten Bindung des acetylierten Histons zur DNA. Die dadurch bewirkte Öffnung des Chromatins führt zu einer verbesserten Zugänglichkeit der DNA und somit potentiell zu einer erhöhten Transkription der Gene des betroffenen DNA-Bereichs (Mandal 2017). Eine globale Chromatin-Öffnung kann zum Beispiel durch Supplementierung des chemischen Additivs Natrium-Butyrat ausgelöst werden (Jiang and Sharfstein 2008). Auch Retinsäure wirkt auf die epigenetische Regulierung und löst darüber proliferative Effekte in CHO-Zellen aus (Rahimi-Zarchi *et al.* 2018). Retinsäure gelangt über Diffusion in die Zelle und in den Zellkern, wo sie die sogenannten *Retinoic Acid* und *Retinoic X* Rezeptoren (RAR bzw RXR) bindet. Als Heterodimere binden diese dann RA *Responsive Element* (RARE) auf der DNA und bewirken eine aktivierte Transkription spezifischer Bereiche unter anderem durch Rekrutierung von Histon Acetyltransferasen (HAT), Histon Methyltransferasen (HMT) und Kinasen. Im Anschluss der Signaltransduktion wird der Rezeptor phosphoryliert, ubiquitinyliert und proteosomal abgebaut. In Abwesenheit von Retinsäure sind Histondeacetylasen (HDAC) assoziiert, welche über Modifizierung der Histone eine transkriptions-inaktivierende Wirkung ausüben (Mandal 2017). Die MS-basierte Quantifizierung der hoch-modifizierten Peptide und Proteine stellt eine große Herausforderung dar und erfolgt entweder auf Label-freier Basis oder durch ¹⁵N metabolisches Labeling (Zhang *et al.* 2013). Bei Anwendung von label-freien Methoden werden z.B. unmodifizierte Peptide mit geringer Varianz über technische oder biologische Replikate für eine Normalisierung auf die entsprechende Histon-Menge eingesetzt (Drogaris *et al.* 2012).

Die Auswirkungen einer Natrium-Butyrat-Supplementierung von CHO-Zellen wurden in der AG Zellkulturtechnik genauer untersucht und dabei Änderungen der DNA-Methylierung festgestellt (Wippermann *et al.* 2014). Die Methylierung der DNA an der Base Cytosin erfolgt meist an sogenannten CpG di-Nukleotiden, also dem Aufeinanderfolgen von Cytosin und Guanin in der DNA. Das Clustern von mehreren CpGs wird dann als CpG *islands* bezeichnet und kommt in tierischen Zellen häufig in Promotorregionen vor. Obwohl CpGs meist methyliert vorliegen, sind diese CpG *islands* häufig unmethyliert (Bernstein *et al.* 2007). Eine DNA-Methylierung kann zum irreversiblen Gen-Silencing beitragen, so führt eine Hypermethylierung von Tumorsuppressor Gen-Promotoren zum Silencing der entsprechenden Gene und trägt so zur Tumorentwicklung bei (Jones and Baylin 2002). Zwischen *Genomics* und *Transcriptomics* ist das Forschungsfeld der *Epigenomics* oder *DNA-Methylomics* als eine Art Bindeglied anzusehen. Für CHO-Zellen wurde eine spezifische, globale Hypomethylierung in Verbindung mit hypermethylierten CpG-*islands* identifiziert (Wippermann *et al.* 2014; Wippermann *et al.* 2015, 2016). Mit Hilfe von *Epigenomics*-Daten können sowohl geeignete Integrationsorte der rekombinanten Gensequenz, sowie rationale Mediendesigns ermittelt werden.

1.5.8. Glykosylierungen und Auswirkungen auf die Produktqualität

Für die Anwendung der Biopharmazeutika im Menschen spielt die Produktqualität eine wichtige Rolle. Neben der Quantität, die hauptsächlich für das Unternehmen und die Rentabilität entscheidend ist, sollte das Produkt zusätzlich eine gleichbleibende, hohe Qualität besitzen. Bei einer Produktion von zum Beispiel EPO, aber auch für mAbs, ist die Qualität vor allem durch die Protein-Glykosylierung definiert. Die Glykosylierung eines Proteins hat, neben Effekten auf Biosynthese und Sekretion des Produkts, Effekte auf Struktur, Stabilität, Löslichkeit, Immunogenität, pharmakologische Halbwertszeit und biologische Aktivität. CHO-Zellen produzieren keine exakt human-identischen Glykosylierungen, da zum Beispiel bestimmte Enzyme, wie Sialinsäure-Transferasen, nicht exprimiert werden. Eine dadurch verminderte Sialylierung des Produkts kann zum Beispiel Effekte auf die Halbwertszeit haben (Costa *et al.* 2014). Für die industrielle Anwendung eines Produktionsprozesses ist das Monitoring der Produktqualität somit essentiell und ein weiterer Parameter, der bei Optimierungen berücksichtigt werden muss. Aber auch während der Ernte des Zellkulturmediums und Produkts kann es durch mechanische Zellyse zu einer Verminderung der Produktqualität, zum Beispiel durch Reduktion der Disulfidbrücken kommen (Kao *et al.* 2010). Im Gegensatz zu dieser spezifischen Analyse des Produkts wird die Studie aller Glykane und Glykoproteine einer Zelle zu einer bestimmten Zeit als *Glycomics* bezeichnet (Thaysen-Andersen *et al.* 2020).

1.5.9. MicroRNAs zur Prozessoptimierung

MircoRNAs (miRNAs) sind kleine non-coding RNAs, die Genexpression post-transkriptionell regulieren können. Über Sequenz-Komplementarität kommt es zur Bindung von mRNA und dadurch inhibierter Translation, wobei eine miRNA multiple mRNA-Targets besitzen kann und eine mRNA über multiple miRNAs reguliert werden kann. Die komplexen Eigenschaften von miRNAs können einfach manipuliert und für therapeutische Zwecke eingesetzt werden (Jung and Suh 2014).

Die Anwendung von miRNA im biotechnologischen Kontext konnte aufgrund der systemischen Wirkmechanismen vieler miRNAs in vielen Studien einer irischen Arbeitsgruppe positive Ergebnisse erzielen, weshalb auch Proteomänderung nach Überexpression oder Depletion von microRNAs (miRNA) analysiert wurden. Außerdem konnte eine Wirkung von miRNA auf die epigenetische Regulation über doppelt-negative *feedback loops* gezeigt werden (Osella *et al.* 2014).

In einem Vergleich von Klonen mit unterschiedlichen Wachstumsraten konnte ein Zusammenhang von miRNAs und der Wachstumsrate von CHO-Zellen ermittelt werden (Clarke *et al.* 2012). Die Forschung im Feld der miRNAs führte zu weiteren spannenden Ansätzen. Eine Überexpression von miR-7 führte zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase, wobei vermutet wird, dass Stathmin (STMN1) und Catalase (CAT) Target-Gene dieser miRNA sind (Meleady *et al.* 2012a). Später

fürhte dann die Depletion dieser miRNA zu einer erhöhten Wachstumsrate und Produktivität (Coleman *et al.* 2019). Durch die Depletion von miR-23 konnte der Metabolismus der Zellen beeinflusst werden, so dass eine Steigerung der spezifischen Produktivität erreicht werden konnte, ohne dass das Wachstum beeinflusst wurde (Kelly *et al.* 2015a). Eine ektopische Expression von miR-341 führte zur Verdopplung der Produktausbeute bei gleichzeitiger Reduktion des Wachstums (Kelly *et al.* 2015b) und eine Depletion der miR-378-3p führte hingegen zur Erhöhung der Zelldichte einer CHO DP12-Zelllinie (Costello *et al.* 2018) und wurde auf Proteomebene charakterisiert (Coleman *et al.* 2018).

Es besteht eine große Verbindung von miRNAs zur zellulären Signalweiterleitung. Viele Proteine des IGF-1 Signalwegs können über miRNA beeinflusst werden, wie zum Beispiel auch miR-378 und miR-7 (Jung and Suh 2014). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass miR-378 die IGF-1R 3' *Untranslated Region* (UTR) bindet und eine Überexpression zu einem verringertem IGF-Signaling führte und dass, miR-7 den IGF-1R bindet und zu Reduzierung von Protein und mRNA-Level führt und somit das Signaling über Akt reduziert (Jung and Suh 2014). Das reduzierte IGF-Signaling (über die beiden miRNAs) könnte zu den positiven Ergebnissen der Depletion dieser miRNAs der irischen Arbeitsgruppe geführt haben, wurde jedoch in den Publikationen nicht diskutiert.

1.5.10. Host Cell Protein und Sekretomics

Secretomics im Allgemeinen umfasst die Analyse von konditioniertem Medium zur Medienentwicklung, der Analyse von *Host Cell Proteins* (HCPs) zur *Downstream Process* (DSP)- oder Zelllinien-Entwicklung oder der Analyse von extrazellulären Vesikeln, wie Mikrovesikel und Exosomen. Exosomen enthalten Proteine, Lipide und Nukleinsäuren, sind ca. 30-100 nm groß, besitzen endosomalen Ursprung und dienen der interzellulären Kommunikation (Colombo *et al.* 2014). Die Komposition der Exosomen ist dabei nicht zufällig, sondern spezifisch von der Zelle beladen. Über die enthaltene RNA kann zum Beispiel horizontaler RNA-Transfer erfolgen. Neben funktionaler mRNA sind auch miRNAs und sind weitere *non-coding* RNAs (ncRNAs) Bestandteil von Exosomen, was sie zu einem potentiellen *drug delivery tool* der RNA Interferenz Forschung macht (El-Andaloussi *et al.* 2012). Die Anwendung von Exosomen in der Zellkultur konnte an einem ersten Beispiel gezeigt werden, bei dem nach Zugabe von Exosomen eine verminderte Staurosporin-induzierte Apoptose beobachtet werden konnte (Han and Rhee 2018).

Mittels *Proteoinformatics* wurde außerdem das „CHO-super-Ome“, also das HCP im Überstand evaluiert (Kumar *et al.* 2015). Eine weitere, iTRAQ-basierte Proteomanalyse des HCPs einer CHO-S-Zelllinie quantifizierte Kontaminanten, welche die Aufreinigung des mAb beeinflussen (Chiverton *et al.* 2016). Die Analyse dieser Proteine führte zur Entwicklung einer neuen

Aufarbeitungsstrategie, bei der synthetische Peptide die HCPs binden und über Chromatographie eingesetzt werden, um eine HCP *clearance* zu bewirken (Lavoie *et al.* 2020).

1.6. Strategien zur Target-Identifizierung

Das Ziel der Zellkulturtechnik, Prozesse effizienter zu gestalten, wird zum Beispiel über die Steigerung der zellspezifischen Produktivität, der damit oft einhergehenden Steigerung der Kultivierungszeitraums und/oder über die Steigerung des Wachstums der Zellen (Abbildung 11).

Um eine gezielte Verbesserung zu erreichen werden häufig Gen- oder Proteintargets gesucht und diese über verschiedene Methoden moduliert. Targets können entweder über bereits erlangtes Wissen oder durch Wissenstransfer aus anderen Gebieten identifiziert werden. Besonders über *bottlenecks* der Proteinsynthesekapazität, der Glykosylierungsmaschinerie und der Sekretion in CHO-Zellen konnten vielversprechende Targets gefunden werden (Punkt 1A, Abbildung 11). Weiterhin werden und wurden bekannte metabolische Prozesse, insbesondere die Akkumulation toxischer Metabolite, die Ansäuerung des Mediums und die Osmolaritätssteigerung bei konzentrierter *feed*-Zugabe zur Targetidentifizierung genutzt (Punkt 1B, Abbildung 11). Auch die Modulierung von Apoptose- und Autophagie-Prozesse führte bereits zur verbesserten Prozessperformance (Jardon *et al.* 2012), wobei vermutet wird, dass die potentiellen Autophagie-Inhibitoren tatsächlich eine Autophagie-Induktion hervorrufen und dadurch die spezifische Produktivität erhöhen (Baek *et al.* 2016). Um andere/neue Zielgene zu finden, werden häufig die Prozessparameter variiert und verglichen oder auf den Vergleich von *high*- und *low-producer* oder der Parental-Zelllinien zurückgegriffen. Auch der *knock-down* von Genen kann als Strategie angewendet werden, um Target-Gene für eine Zelllinienoptimierung zu identifizieren (Klausing 2013).

Ein Vergleich von CHO-Zelllinien (Punkt 1D, Abbildung 11) mit unterschiedlichen Wachstumsraten in einer Kombination aus Microarray-Transkript- und einer frühe Proteom-Analyse führt zum Beispiel zu dem *Valosin-Containing Protein* (VCP), welches über *knock-down* validiert werden konnte (Doolan *et al.* 2010). Im Kontext der mTOR-vermittelte Signaltransduktion konnte über eine Transkript-Analyse acht differentiell regulierte Gene zwischen *high* und *low-producer* Zellen ermittelt werden, darunter PIK3CD, eine katalytische Untereinheit der PI3K (Edros *et al.* 2014). Auch *Metabolomics* wurden zum Vergleich von *high* und *low-producer* CHO-Zellen genutzt, wobei vermutet wird, dass die Aufrechterhaltung des Redox-Potentials in *high-producer* Zelllinien durch eine identifizierte, erhöhte Anzahl an spezifischen Metaboliten als Voraussetzung zur Deckung des „erhöhten“ Energiebedarfs zur Produktion von glykosyliertem rekombinanten Produkt dient (Chong *et al.* 2012).

Auch die Supplementierung des Mediums und eine entsprechende Analyse können zur Identifizierung von Targets führen (Punkt 1C, Abbildung 11). In einem kombinierten Ansatz aus

Butyrat-Supplementierung und Absenkung der Kultivierungstemperatur konnte über Transkriptom- und Proteom-Analysen eine Hochregulierung von Genen in Verbindung zu Sekretionsprozessen ermittelt werden (Kantardjieff *et al.* 2010), woraufhin das Feld der *Secretomics* eröffnet wurde (Slade *et al.* 2012). Weiterhin kann die Analyse von konditioniertem Medium zur Identifikation neuer Medienkomponenten führen. So konnten 2013 acht neue Wachstumsfaktoren identifiziert werden, welche nach gezielter Zugabe in frisches *single-cell cloning* Medium zu erhöhten Klonierungseffizienzen führte (Lim *et al.* 2013).

Entgegen der empirischen, Kosten- und Zeit-intensiven Forschung wurden schon früh nicht Hypothesen-limitierte Ansätze vorgeschlagen (Korke *et al.* 2002), welche seit ein paar Jahren durch systembiologische *omics*-Ansätze umgesetzt werden (Punkt 1E, Abbildung 11) (Sharma *et al.* 2016). Solche multi-*omics*-Ansätze wurde zur Analyse von *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293)-Zellen zur Proteinproduktion oder EPO-produzierenden CHO-Zellen durchgeführt (Dietmair *et al.* 2012; Ley *et al.* 2015).

Die empirisch oder rational identifizierten Targets werden dann häufig über *knock-out*, *knock-down* oder Überexpression des entsprechenden Gens eingesetzt oder durch *small molecules* oder miRNA gezielt inhibiert oder aktiviert. Eine weitere Möglichkeit ist die Auswahl endogener Promotoren, um Gen-Silencing entgegenzuwirken (Punkt 2, Abbildung 11) (Nguyen *et al.* 2019).

Die effektive Sekretion des Produktproteins ins Zellkulturmedium wurde bereits früh als *bottleneck* von produzierenden CHO-Zellen beschrieben und eine Erhöhung der sekretorischen Prozessierkapazität durch z.B. Überexpression des Transkriptionsfaktor XBP1 angestrebt, was zu erhöhten Produkttitern führte (Becker *et al.* 2008; Rahimpour *et al.* 2013). Auch eine Überexpression der Kombination von XBP1 und der ER Oxidoreduktase ERO1- α führte zur verbesserten Prozessperformance (Cain *et al.* 2013). Die Überexpression weiterer Proteine bewirkte ebenfalls positive Auswirkungen auf die Prozessperformance, darunter zum Beispiel PDIA3 (Hwang *et al.* 2003), oder eine nicht-spezifizierte PDI (Borth *et al.* 2005), die Malat-Dehydrogenase II (MDH2) (Chong *et al.* 2010), sowie Calnexin (CNX) und Calreticulin (CRT) (Chung *et al.* 2004).

Neben der Überexpression von Proteinen zur Steigerung der Sekretion des Produkts stellt ein *knock-out* von HCP einen weiteren Ansatz zur Bioprozessoptimierung dar (Punkt 2, Abbildung 11). In einer aktuellen Arbeit von Kol *et al.* konnten durch CRISPR-Cas9-vermittelte *knock-outs* einer Vielzahl von HCPs positive Auswirkungen auf Produkttiter und Reinheit erzielt werden (Kol *et al.* 2020).

Zur Zelllinienoptimierung kann außerdem der transiente *small-interfering* RNA (siRNA)-vermittelte *knock-down* von Genen genutzt werden. Ein in der AG Zellkulturtechnik durchgeführter *knock-down* der *De Novo* Methyltransferase 3A (DNMT3A) führte beispielweise zu erhöhten

zellspezifischen Produktivitäten einer mAb-produzierenden XL99-PGC-Zelllinie (Schmidt *et al.* 2015). Ebenso konnten Verbesserungen durch den *knock-down* der Laktat Dehydrogenase A (LDHA) alleine (Kim and Lee 2007) oder als *knock-down* in Kombination mit der PDK (PDHK) erreicht werden (Zhou *et al.* 2011).

Small molecules können neben der therapeutischen Anwendung (Harper and Bennett 2016) auch als Zellkulturmedium-Supplement positive Auswirkungen auf die Prozessperformance besitzen, wie zum Beispiel der natürliche mTOR-Inhibitors Rapamycin (Lee and Lee 2012a), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Liu and Chen 2007), DMSO und ER-Stress Inhibitoren (BIP *Inducer* X, BIX) (Ha *et al.* 2019), Natrium-Butyrat (siehe 1.5.4) oder 5-Phenylvaleric Acid (5-PVA) in Kombination mit Hexamethylene Bis(Acetamide) (HMBA) (Allen *et al.* 2008) oder vermeintliche Autophagie-Inhibitoren, wie 3-Methyl Adenine (3-MA), Dorsomorphin und SP600125 (Baek *et al.* 2016). Vorteile in der Anwendung von *small molecules* (zur Zellzykluskontrolle) werden in geringen Nebenwirkungen durch Signaling *crossstalk* gesehen, so führte das spezifische Anwenden von SMIs gegen *Cyclin-Dependent Kinases* (CDKs) 4 und 6 zu einem G0/G1-Zellzyklusphasen-Arrest und deutlich erhöhten zellspezifischen Produktivitäten (Du *et al.* 2015).

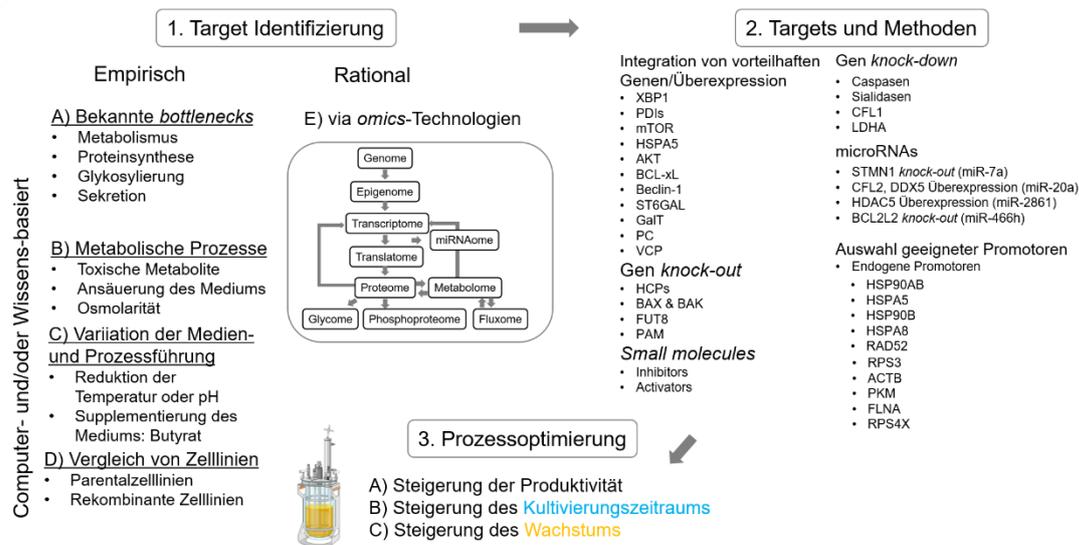


Abbildung 11 Der Workflow von der Target-Identifizierung bis zur Prozessoptimierung.

Die Steigerung der zellspezifischen Produktivität (Punkt 3A, Abbildung 11) wird häufig durch die Kontrolle des Zellwachstums erreicht. Prozesstechnisch wird hierfür zum Beispiel die Kultivierungstemperatur herabgesenkt (Kaufmann *et al.* 1999), der pH-Wert verändert (Trummer *et al.* 2006), ein osmotischer Schock induziert (Shen *et al.* 2010) oder zytotoxische Substanzen supplementiert, sobald eine gewünschte Zelldichte erreicht ist (Wlaschin and Hu 2006). Die Absenkung der Temperatur zum Beispiel, hat einen deutlichen Einfluss auf den Stoffwechsel der

Zellen und darüber auch auf die Produktausbeute (Kaufmann *et al.* 1999). Der vermittelte Zellzyklus-Arrest der Zellen in der G1-Phase wird in Verbindung zu einer erhöhten Produktivität gebracht (Kumar *et al.* 2007). Die Reduktion von Wachstum und Metabolismus durch eine Absenkung von 37 auf 32 °C an Tag 3 einer Kultivierung einer mAb-produzierenden XL99-Zelllinie konnte in einer australischen Studie zu deutlich erhöhten Produktkonzentrationen durch verlängerte Kultivierungszeiten führen (Martínez *et al.* 2015). Eine erhöhte zellspezifische Produktivität wird außerdem im späten Verlauf einer Perfusionskultivierung beobachtet. Für diese Glukose-limitierten Zellen konnte ein unterschiedliches Proteom im Energiestoffwechsel und der Cytoskelet-Organisation im Vergleich zu anderen Wachstumsphasen ermittelt werden (Wingens *et al.* 2015).

Eine Verlängerung des Kultivierungszeitraums (Punkt 3B, Abbildung 11) konnte in vielen Studien durch zum Beispiel die Überexpression anti-apoptotischer Proteine oder den *knock-down* pro-apoptotischer Proteine herbeigeführt werden, so dass eine Verbesserung der Prozessperformance erreicht werden konnte (Henry *et al.* 2020). Aus einer umfassenden *review*-Arbeit gingen eine Vielzahl neuer potentieller Targets aus dem Bereich des anti-Apoptose *engineering* hervor (Orellana *et al.* 2020).

Im Gegensatz zur Steigerung der Produktivität und der häufig damit einhergehenden Steigerung des Kultivierungszeitraums, ist die Steigerung des Wachstums (Punkt 3C, Abbildung 11) ein deutlich seltener adressiertes Ziel der Prozessoptimierung. Durch die Erhöhung der Wachstumsrate können jedoch neben der Reduktion der benötigten Zeit für die Inokulierung großer Bioreaktoren und der Prozesszeit, auch die Anzahl an Prozessen pro Jahr erhöht werden (Doolan *et al.* 2013).

2. Zielsetzung

Über die Modulierung von mTOR konnte in CHO-Zellen bereits auf Basis verschiedener Methoden positive Auswirkungen auf die Prozessperformance erzielt werden, zum Beispiel durch die Supplementierung des natürlichen Inhibitors Rapamycin (Lee and Lee 2012b) oder durch Überexpression (Dreesen and Fussenegger 2011). Die Verbindung von spezifischer Produktivität und dem Protein mTOR konnte durch diese ektopische Überexpression in einer CHO-K1-Zelle verdeutlicht werden. Es wurden verbesserte Wachstums-, Produktions- und Sekretionsergebnisse erreicht und somit der Stellenwert von mTOR in der Proteinbiosynthese verdeutlicht (Dreesen and Fussenegger 2011). Die entgegengesetzten Ergebnisse einer Studie zur Erforschung von Autophagie in CHO-Zellen konnten jedoch durch den Einsatz des mTOR-Inhibitors Rapamycin ebenfalls eine verbesserte Produktivität ermitteln, wobei dies auch durch eine erhöhte Viabilität im *fedbatch*-Prozess begründet wird (Lee and Lee 2012b). Ein CRISPR/Cas-9-vermittelter *knock-out* von TSC2, einem mTOR-Inhibitor, führte wiederum zu einem konstitutiv aktivierten mTOR-C1 Komplex in GS-*Knock-Out* (KO) CHO-Zellen und verbesserten Parametern in einer *fedbatch*-Kultivierung. Neben einer verdoppelte spezifische Produktivität, wurde eine erhöhte Zellgröße, eine gesteigerte Proteinsynthese, eine niedrigere Zelldichte, aber auch ein schneller Einbruch in Viabilität beobachtet (McVey *et al.* 2016). Positive Effekte über verschiedene, gegenteilige Strategien werden vermutlich zum Teil durch Klon-spezifische Charakteristiken hervorgerufen (McVey *et al.* 2016). Um den hohen Zeit- und Kostenaufwand empirischer Studien zu verringern, sollte in dieser Arbeit die Abhängigkeit einer Signaling-Modulierung von der Zelllinie und dem Medium analysiert werden und Herangehensweisen für eine Computer-basierte Targetidentifizierung entwickelt werden. Dafür sollten Softwarestrecken für die Ermittlung grundlegender Proteomunterschiede von zwei mAb-produzierenden und der parental CHO-Zelllinie etabliert werden und ein differentielles mTOR- und MAPK-Signaling anhand der Zugabe des Wachstumsfaktor IGF in der exponentiellen Phase evaluiert werden. Eine Kultivierung der GS-mAb-CHO in Glutamin-freiem Medium erforderte zusätzliche Experimente zur Interpretation einer Interaktion von Glutamin und IGF. Auf Basis der erhobenen (Phospho-) Proteomdaten sollten vielversprechende Targets für eine Prozessoptimierung über die Supplementierung spezifischer Medienkomponenten ermittelt und angewandt werden. Da die speziellen SILAC-Medien kostspielig sind, sollten diese Experimente im unregulierten Schüttelkolben durchgeführt werden. Nach Optimierung des MS-Probenvorbereitungs-, Mess- und Auswerteworkflows sollte das Proteom einer Industrie-relevante *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung erstmals analysiert und anschließend mit einer *batch*-Bioreaktorkultivierung verglichen werden. Über *Proteomics* sollten aus der Industrie-relevanten Kultivierung Targets für eine Prozessoptimierung in einer *non-hypothesis-limited* Herangehensweise extrahiert und diskutiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedium

Hauptsächlich wurde mit der *Chinese Hamster Ovary* (CHO) XL99-basierenden Zelllinie „G4“ gearbeitet, welche einen rekombinanten monoklonalen Antikörper (mAb) produziert. In Zelllinien-vergleichenden Studien wurde außerdem mit der parentalen XL99-Zelllinie gearbeitet, sowie mit einer weiteren XL99-basierten Zelllinie „E3“, die im selben Transfektionsprozess wie G4 erstellt und parallel vereinzelt wurde. Die Zelllinien wurden von dem *Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology* (AIBN, University of Queensland-Brisbane, Australia) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Für die Produktion des Antikörpers vom Typ IgG wurden die Antikörper-Gene zusammen mit dem Gen für die Glutamin-Synthetase transfiziert, wodurch eine Kultivierung ohne Glutamin als Selektionsdruck dient. Weiterhin wurde der Selektionsdruck der mAb-produzierenden Zellen erhöht, indem das Medium mit MSX und Puromycin supplementiert wurde. Während der Vorkultur wurde unter dem Selektionsdruck von 10 µg/ml Puromycin (aus einer 1 mg/ml Puromycin-Stammlösung) und 25 µM MSX (225 µl/l MSX aus einer 111 mmol/l MSX-Stammlösung) kultiviert. Ein spezifisch auf diese Zellen angepasstes Medium ist das TCX10D-Medium (veraltet „06-GS“, Xell AG, Bielefeld, Deutschland), welches ohne Glutamin geliefert wird. Für die Parental-Zelllinie wurde das Medium aufgrund der geringen Stabilität von Glutamin in Lösung jeweils frisch mit 8 mM Glutamin supplementiert. Es handelt es sich um ein chemisch-definiertes und serumfreies Medium, welches zur Pufferung Natriumhydrogencarbonat und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), sowie Pluronic F-68 zur Vermeidung von erhöhter Zelladhäsion (Tharmalingam *et al.* 2008) enthält.

Außerdem wurde für diese Arbeit das Proteom von CHO K1-Zellen analysiert, wobei die Kultivierung der Zellen durch Herrn Oliver Hertel erfolgte. Die CHO-K1 Zellen (ATCC CCL-611), adaptiert an das Wachstum in Suspension, wurden in TCX6D-Medium (Xell AG, Bielefeld, Deutschland) mit 8 mM Glutamin kultiviert.

Die Stammhaltung von CHO-Zellen erfolgte in Schüttelkolben im Brutschrank bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂), 80 % Luftfeuchtigkeit und 185 rpm bei einer Auslenkung von 5 cm. Die Zelldichte der Vorkultur wurde täglich mittels automatischer Zellzählung am CEDEX (früher Innovatis, jetzt Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt und die Zelldichte zwei Mal in der Woche auf einen Bereich von 2,5-3·10⁵ Zellen/ml eingestellt. Nährstofflimitierungen wurden durch das Verdünnen mit frischem Medium (auch passagieren genannt) verhindert, was reproduzierbare Experimente ermöglichen sollte.

3.1.2. SILAC Medium

Das TCX10D *with out* (w/o) L-Lysin/L-Arginin ist speziell angefertigtes Medium für SILAC-Ansätze ohne die L-Aminosäuren Lysin und Arginin. Zur Vorbereitung einer SILAC-Kultivierung wurden zwei bzw. drei verschiedene Medien parallel durch Zugabe von L-Lysin und L-Arginin hergestellt. Je nach Ansatz wurden die Standard-L-Aminosäuren („leicht“) oder die isotonenmarkierten L-Aminosäuren („medium“ und/oder „schwer“) verwendet. Zunächst wurde jeweils eine Konzentration von 2,46 mM L-Lysin und 1,7 mM L-Arginin eingestellt und teilweise der pH-Wert auf 7,4 mit 6 M Salzsäure (HCl) eingestellt (für den IGF- und HPI4-SILAC-Ansatz). Die Isotopen-markierten Aminosäuren waren teilweise nur in unterschiedlichen Formulierungen zu den Standard-Aminosäuren erhältlich, so dass sich Unterschiede in den Osmolaritäten der zwei bzw. drei Medien (*light, medium, heavy*) ergaben.

- **Light-Medium**
 - L-Lysin-HCl (MW 182,65 g/mol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - L-Arginin (MW 174,2 g/mol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- **Medium-Medium**
 - D₄-Lysin-2HCl (4.4.5.5-D₄ *labeled* (MW 123,1 g/mol, Silantes, München, Deutschland) +4 Da
 - ¹³C₆-Arginin (MW 216,7 g/mol, Silantes, München, Deutschland) +6 Da
- **Heavy-Medium**
 - ¹³C₆, ¹⁵N₂-Lysin-HCl (MW 190,7 g/mol, Silantes, München, Deutschland) +8 Da
 - ¹³C₆, ¹⁵N₄-Arginin-HCl (MW 220,7 g/mol, Silantes, München, Deutschland) +10 Da

Die Osmolarität des SILAC-Mediums wurde daher am Gefrierpunkt-Osmometer (Gonotec Meß- und Regeltechnik GmbH, Berlin, Deutschland) gemessen und mit dem Referenzmedium TCX10D verglichen. Vor Inbetriebnahme wurde das Gerät über eine 3-Punkt-Messung kalibriert, dazu wurden destilliertes Wasser und zwei Standards (300 und 585 mOsmol) in Doppelbestimmung im Gerät vermessen. Da die Osmolarität eines Mediums vom CO₂-Partialdruck abhängig ist, wurden die Medien vor der Messung unter gleicher Rührgeschwindigkeit für gleiche Zeit gerührt (Boning and Maassen 1983). Das Referenzmedium wies zum Beispiel eine Osmolarität von 305 mOsmol auf (IGF-SILAC-Ansatz). Die Osmolarität des SILAC-Mediums wurde dann durch Zugabe von 37 mg Natriumchlorid (NaCl) pro mOsmol und Liter Medium bis zur Referenz erhöht und die Osmolarität erneut vermessen. Abschließend wurde das Medium durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert und jeweils zur Überprüfung der Sterilität ein 50 ml Kultivierungsröhrchen mit 20 ml Medium im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.3. Kryokonservierung

Für das Anlegen einer *Working Cell Bank* (WCB) wurden pro Kryoröhrchen $1 \cdot 10^7$ Zellen für die Zelllinien XL99, E3 und G4 eingefroren. Die Zellen sollten hierfür drei reproduzierbare Passagen durchlaufen haben. Für die Kryokonservierung wurde je Kryoröhrchen 1,5 ml Medium benötigt, welches zu 10 % aus DMSO bestand. Die Zellen wurden für 7 min bei 800 rpm abzentrifugiert und zügig im Medium mit DMSO resuspendiert und in die vorbeschrifteten Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden schnell verschlossen und in einen Mr. Frosty Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) platziert, welcher mit Isopropanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt wurde. Der Gefrierbehälter wurde für 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, so dass ein konstantes Absinken der Temperatur um $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erreicht und die Zellen so schonend konserviert wurden (Thermo Fisher Scientific 2015). Anschließend wurden die Kryoröhrchen in den $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank eingepflegt. Nach einigen Tagen wurde der Einfrierprozess überprüft, indem ein Kryoröhrchen aufgetaut und über einige Passagen kultiviert wurde. Die gesamten Experimente konnten so aus einer WCB aus begonnen werden, wodurch das Erzielen reproduzierbarer Ergebnisse gegeben sein sollte. Die Haupt-Experimente wurden jeweils aus frisch-aufgetauten Zellaliquots der WCB nach drei-vier Passagen begonnen.

Zum Auftauen neuer Zellen aus der WCB wurden die Kryoröhrchen komplett in der Hand aufgewärmt und um zellschädigendes DMSO schnellstmöglich von den Zellen zu entfernen, wurden diese in einem 50 ml Kultivierungsröhrchen in 10-15 ml *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, 137 mM NaCl, 2,6 mM Kaliumchlorid (KCl), 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 1,8 mM (Kaliumdihydrogenphosphat) KH_2PO_4 , pH 7,4) verdünnt und anschließend bei 200 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 15 ml Medium resuspendiert. Das Medium wurde dann je nach Zelllinie mit Selektionsdruck oder Glutamin supplementiert. Zur Überprüfung der Startzellichte wurde direkt eine Probe zur automatischen Zellzählung gezogen und vermessen.

3.1.4. SILAC Hauptkultivierungen

Die verschiedenen SILAC-basierten Hauptkultivierungen wurden in 3-4 biologischen Replikaten jeweils in zwei- bzw. dreifach SILAC-Medium durchgeführt. Das IGF- und HPI4-SILAC-Experiment wurde jeweils in 125 ml Schüttelkolben der Firma Corning (NY, US) durchgeführt. Das dreifach IGF- und Glutamin-SILAC-Experiment erfolgte in 50 ml TubeSpin® Kultivierungsröhrchen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) und das dreifach Carnosin- und Glutamin-SILAC-Experiment in 125 ml Schüttelkolben der Firma Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, Deutschland).

3.1.5. Bioreaktorkultivierungen

Die Bioreaktorkultivierung wurden von Herrn Oliver Hertel in B-DCU 2 L-Glasbioreaktoren der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Rührerdrehgeschwindigkeit der Rushton-Turbinen wurde auf 150 rpm gestellt. Insgesamt wurde den Kulturen Sauerstoff über eine Ringbrause und CO₂ und Luft über eine Kopfraumbegasung zugeführt. Der pH-Wert wurde dabei mittels pH-Sonden (405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, US) gemessen. Die Regelung auf den pH-Wert 7,2 erfolgte über den CO₂-Gasfluss der Kopfraumbegasung und die Zugabe von 1 M Natriumhydrogencarbonat. Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurde durch VisiFerm-Sauerstoffoptoden (ECS 225 H0, Hamilton, Reno, Nevada, Unites States) gemessen und durch Regelung des Sauerstoffgasflusses über eine Ringbrause auf > 40 % Sättigung geregelt. Die Probennahme erfolgte zweimal am Tag nach Verwerfen von jeweils 5 ml Vorlauf.

Für die *batch*-Experimente wurde ein Aliquot der WCB aufgetaut und dreimal passagiert. Für die *fedbatch*-Experimente wurden parallel drei Aliquots der WCB aufgetaut, in 125 ml-Plastikschüttelkolben im Brutschrank kultiviert und als Vorkultur für drei Bioreaktorkultivierungen verwendet. Im *fedbatch*-Kultivierungsverlauf wurde den Zellen insgesamt viermal pulsartig *Basic feed*-Medium inklusive 20 g/L *Dexter* (D)-Glukose (Xell AG, Bielefeld, Deutschland) zugefüttert, welches zuvor mit 40 mM L-Glutamin supplementiert wurde.

3.1.6. Induktionen

Die Induktionen mit ausgewählten Mediensupplementen erfolgte während der Kultivierung, sobald eine Zelldichte von ca. 4-6·10⁶ Zellen/ml erreicht war, und stellte somit einen Kompromiss zwischen dem Erhalten von ausreichendem Zellmaterial und dem frühestmöglichen Zeitpunkt zur Darstellung von Änderungen auf Wachstums- oder Produktionsebene dar. Die Konzentration der ausgewählten Mediensupplemente musste jeweils in Vorexperimenten ermittelt werden.

Die IGF-Induktion erfolgte jeweils mit einer Endkonzentration von 10 µM, oder 0,1 mg/l aus einer 100 mM IGF-Stammlösung, welche in Vorexperimenten von Anna Lieske (2015) und Miriam Fougeras (2016) ermittelt wurde. Es wurde humanes LONG®R3IGF-I (Repligen, Waltham, MA, US) verwendet. LONG®R3 IGF-1 als Analogon des humanen IGF-1 wird ohne tierische Supplemente kostengünstig in *E.coli* produziert und zeichnet sich durch eine spezifische Substitution von Arginin in Glutaminsäure an Position 3 und die Verlängerung um ein 13-Aminosäure langes N-terminales Peptid aus, so wird eine über 1000-fache Reduzierung der Affinität zu IGF-Bindeproteinen erreicht, wodurch sich die Bioverfügbarkeit im Vergleich zu nativem IGF-1 stark erhöht (Repligen 2020).

Das HPI4-SILAC-Experiment wurde mit einer Induktion von 10 µM HPI4 durchgeführt. Die 10 mM HPI4 (Selleckchem, Houston, Texas, US) Stammlösung wurde in DMSO gelöst und

sterilfiltriert. Die Kontrollkulturen wurden mit dem entsprechenden Volumen DMSO supplementiert.

3.2. Kultivierungsbezogene Analytik

3.2.1. Zelldichte

Für die Bestimmung der Zelldichte wurden täglich 300 µl bzw. 1 ml Zellsuspension in ein unsteriles 4,0 ml Probennahmegefäß (Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland) pipettiert und im CEDEX (früher Innovatis, jetzt Roche, Mannheim, Deutschland) vermessen. Die automatische Zellzählung basiert auf einer Trypanblau-Ausschlussfärbung (Gudermann *et al.* 1997). Zur exakten Bestimmung der Wachstumskinetiken wurde die Zelldichte teilweise in drei technischen Replikaten vermessen. Aufgrund einer geringen technischen Schwankung wurde für spätere Ansätze die Messung auf ein technisches Replikat reduziert.

3.2.2. Glukose- und Laktat-Bestimmung

Die Glukose- und Laktat-Analytik erfolgte zum Teil mittels YSI 2700 Select (YSI Inc., Yellow Springs, OH, US) mit 2710 *turntable* für die automatische Messung von 24 Proben. Das Prinzip beruht hier auf einem elektro-enzymatischem Nachweis, wobei die Stoffe oxidiert werden, dessen Konzentration bestimmt werden soll, hier Glukose und Laktat. Die Oxidierung erfolgt über membrangebundene Enzyme, die während der Reaktion Wasserstoffperoxid freisetzen. Das Wasserstoffperoxid kann durch eine Celluloseacetat-Membran diffundieren und gelangt so zur Platinelektrode, wo es zu Sauerstoff oxidiert wird. Der dabei entstehende Strom ist proportional zur Konzentration des jeweiligen Stoffes in der Ausgangsprobe (Guilbault and Lubrano 1973). Während der Kultivierung (IGF- und HPI4-SILAC-Experiment) wurden die zentrifugierten Medienüberstände täglich in einer Doppelbestimmung als technische Replikate 1:10-verdünnt gemessen. Für die Messung wurden spezielle 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 900 µl PBS befüllt und 100 µl zellfreien Kulturüberstands hinzugegeben, kurz gevortext und offen in den *autosampler* des Geräts platziert.

Für spätere Ansätze erfolgte die Glukose- und Laktat-Analytik mittels Biosen C-line (EKF Diagnostics, Barleben, Deutschland), welches nach dem gleichen Prinzip funktioniert. Für die Messungen an diesem Gerät wurden 20 µl eines zellfreien Kulturüberstands in ein industriell-vorgefertigtes Probengefäß mit Puffer überführt und kurz gevortext. Die Kalibrierung erfolgte zuvor mit jeweils 12 mM Glukose- und Laktat-Standard.

3.2.3. Antikörper- und Aminosäurebestimmung

Zur Bestimmung der Aminosäure- und Antikörper- Konzentration im Medium wurde zellfreier Kulturüberstand verwendet und von Angela Ehrlich (technisches Personal der Arbeitsgruppe) vermessen. Für die Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren wurde vor der Trennung auf der

Hauptsäule eine Derivatisierung nach der o-Phthaldialdehyd (OPA)-Methode durchgeführt (Büntemeyer *et al.* 1991). Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte über eine C18-RP *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), so dass eine Identifizierung über die Retentionszeiten mittels Fluoreszenz möglich war. Die Quantifizierung wurde über die Integration der *peak*-Flächen und des Vergleichs zu einem externen Standard durchgeführt. Die Bestimmung der Antikörper-Konzentration erfolgt ebenfalls über eine HPLC-Messung mit Standards eines in CHO-DP12 produzierten IgG mit bekannter Konzentration.

3.2.4. Zellzyklus

Die Bestimmung der Anteile an Zellen in den Zellzyklus-Phasen G1, S und G2 erfolgte mittels Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Vermessung. Der Farbstoff Propidiumiodid interkaliert dabei in die DNA und lässt so Messung am Durchflusszytometer bei bestimmter Wellenlänge zu, wodurch eine relative Quantifizierung der jeweiligen Zellpopulationen ermöglicht wird.

Zur Probenvorbereitung wurden zunächst $2 \cdot 10^6$ Zellen bei 200 g für 5 min abzentrifugiert und zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Bei diesem und den folgenden Schritten wurde immer auf Eis gearbeitet. Zur Permeabilisierung wurde das erhaltene Pellet in 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol resuspendiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 2 h gelagert. Vor der anschließenden Färbung wurde 10 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml PBS in 0,1 % Saponin resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde ein Mal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von $20\text{ }\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen Propidiumiodid und $40\text{ }\mu\text{g/ml}/10^6$ Zellen RNase in PBS in 0,1 % Saponin und eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 45 min unter Lichtausschluss. Da freie RNA die Messung beeinflussen würde, wurde parallel eine Inkubation mit RNase durchgeführt. Die lyophilisierte RNase wurde zuvor in Tris-Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) (TE)-Puffer gelöst, in 2 mg/ml aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis und im Dunkeln gelagert.

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, US). Die Filtereinstellungen FL3 wurden mit einer Anregungswellenlänge bei 488 nm und einer Emissionswellenlänge bei 630 nm gewählt, wodurch charakteristische Kurven im Histogramm gemessen werden konnten. In der Geräte-spezifischen Software wurden *dot plots* für SSC/FSC-H und FSC-H/FL3 und ein Histogramm für *counts/FL3* angelegt. Der G1-Peak wurde über den *gain* des P5-Detektors auf ca. 200 eingestellt.

Die Probe wurde kurz vor der Messung 1:10 mit PBS verdünnt, die Messgeschwindigkeit auf maximal 100 Zellen/Sekunde eingestellt und standardmäßig 10.000 *events* gemessen. Die Auswertung der Anteile in der jeweiligen Phase erfolgte mit der Software ModFit LT 4.1 (Verity

Software House o. J.). Dabei wurden folgende Einstellungen der Modellierung vorgenommen: Diploid, keine Aggregate, keine Apoptose, sichtbarer G2/M-*peak* und keine Standards.

Für die statistische Auswertung der Zellzyklusmessungen für das IGF-SILAC-Experiment wurde der t-Test für zwei Stichproben mit gleicher Stichprobenanzahl nach vereinfachter Gleichung 1 angewendet.

$$t_{\text{vers}} = \frac{|\bar{x}_{\text{Ko}} - \bar{x}_{\text{IGF}}|}{\sqrt{\frac{\text{sd}_{\text{Ko}}^2 + \text{sd}_{\text{IGF}}^2}{n}}} \quad (1)$$

mit t_{vers} = t-Wert für den jeweiligen Versuch, \bar{x} = Mittelwert, sd = Standardabweichung, n = Stichprobenanzahl einer Stichprobe, Ko = Messwerte der Kontrollkultur, IGF = Messwerte der IGF-induzierten Kultur.

Die H_0 -Hypothese lautete dabei: Die mittlere Paardifferenz ist null. Es galt:

$$t_{\text{vers}} < t_{\text{krit}} \quad H_0 \text{ wird beibehalten}$$

$$t_{\text{vers}} > t_{\text{krit}} \quad H_0 \text{ wird abgelehnt.}$$

Mit einer Anzahl an vier Freiheitsgraden wurden Signifikanzniveaus folgender *p-values* unterschieden und mittels Sternchen direkt in den entsprechenden Graphiken dargestellt:

$$p < 0,05 \quad * \quad \text{schwach signifikant}$$

$$p < 0,01 \quad ** \quad \text{signifikant}$$

$$p < 0,001 \quad *** \quad \text{hoch signifikant.}$$

Der t-Test konnte nur angewendet werden, wenn für den jeweiligen Zeitpunkt jedes der drei biologischen Replikate vermessen wurde, da sonst die Voraussetzungen zur Anwendung verletzt worden wären.

3.2.5. Wachstumsraten und Produktbildungsgeschwindigkeiten

Die Änderung der Zelldichte einer Kultivierung wurde mit Gleichung 2 beschrieben.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2)$$

mit X = Lebendzellendichte [Zellen/ml], t = Zeit [d, Tage], μ = spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [d^{-1}].

Daraus ergab sich Gleichung 3 zur Berechnung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ .

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (3)$$

Für die Produktionszelllinien ist außerdem die Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate interessant. Dazu wurde die zeitliche Änderung der Produktkonzentration in Gleichung 4 beschrieben.

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X \quad (4)$$

mit P = Produktkonzentration [g/l] und q_P = spezifische Produktbildungsrate [pg/Zelle/Tag, pcd].

Die Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate q_P ergab sich dann aus Gleichung 5.

$$q_P = \frac{(P_2 - P_1)}{(t_2 - t_1) \cdot \left(\frac{X_1 + X_2}{2}\right)} \quad (5)$$

Die Umrechnung der Glukose- und Laktatkonzentrationen von g/l in mol/l erfolgte über das Molekulargewicht (M) von Glukose 180,156 g/mol und Laktat 90,08 g/mol über die Gleichung 6.

$$M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] = \frac{m [\text{g}]}{n [\text{mol}]} \quad (6)$$

3.3. Proteinextraktion und Quantifizierung

Zur Vorbereitung von Zellpellets aus einer Kultivierung wurde das über eine Zelldichte-Messung bestimmte Volumen an Zellsuspension abzentrifugiert, der Überstand verworfen oder für eine Metabolit-Analytik bei -20°C gelagert. Das erhaltene Pellet wurde unsteril zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend bei -80 °C gelagert. Abhängig von der weiteren Verwendung der Proteine wurde ein bestimmter Lysepuffer zur Extraktion der Proteine gewählt.

Lysepuffer

Die Lyse von Zellen, zum Beispiel zur Detektion von Proteinen im Westernblot, erfolgt mit eiskaltem Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 2 mM EDTA, 1 % *Nonidet* P-40 (NP40), 0,1 % SDS), jeweils frisch supplementiert mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 0,25 % Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Aufschluss der Zellen für 5 min im Ultraschallbad und eine weitere Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde der Zelldebris 30 min bei 4 °C und 17.000 g abzentrifugiert und die löslichen Proteine im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Proteinquantifizierung galt grob, dass mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen ungefähr eine Proteinmenge von 1 mg erreicht werden konnte. Der kommerzielle Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 enthielt Natrium Orthovanadat, Natrium Molybdat, Natrium Tartrat und Imidazol in einer wässrigen Lösung, welche sich bei längerer Lagerung verfärbte. Der Phosphataseinhibitor-Cocktail 3 enthielt hingegen Cantharidin, (-)-p-Bromotetramisol und Calyculin A in einer DMSO-Lösung. Die Verwendung beider Cocktails ergibt eine Inhibierung von

alkalinen Phosphatasen (pH 8-11), Ser/Thr-Phosphatasen (pH 7-8) und Tyrosin Phosphatasen (pH 7-8) ohne den Zusatz von EDTA (Gleiser *et al.* o.J.).

TE-Puffer

Eine Gesamtproteinextraktion mittels TE-Puffer und *glass beads* mit einem Durchmesser von 0,15 mm erfolgte entweder für die Proteinanalytik über 2D-Strecken oder eine direkte Probenvorbereitung für sensitive nLC-MS/MS-Messungen. Der TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,8) wurde frisch mit PMSF und 0,25 % Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) supplementiert. Es wurden Reaktionsgefäße mit jeweils ca. 1 g *glass beads* gefüllt, das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer aufgenommen resuspendiert und zu den *glass beads* gegeben. Nach einem Verschließen mit Parafilm wurden die Proben viermal für 30 Sekunden gevortext und zwischenzeitlich auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 17.000 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

IP-Zellyse

Der sogenannte Immunopräzipitations (IP)-Lysepuffer setzt sich aus 40 mM HEPES (pH 7,5), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Natrium-Pyrophosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 50 mM Natriumfluorid (NaF) und 0,3 % 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) zusammen (Sarbasov *et al.* 2012) und wurde zusätzlich jeweils frisch mit 1 mM PMSF und Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) in einer 1:400 Verdünnung supplementiert und eiskalt auf die gefrorenen Zellpellets gegeben. Dieser Frier-Tau-Zyklus war für die Verwendung des nicht-denaturierenden Lysepuffers essentiell. Auf ein starkes Vortexen folgte eine 30-minütige Inkubation der Proben auf Eis und ein erneutes starkes Vortexen. Die löslichen Proteine wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 17.000 g vom Zelldebris getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Quantifizierung oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

SDC-Zellyse

Das Natriumsalz der Desoxycholsäure, Natriumdesoxycholat, ist ein anionisches Tensid, welches zum Beispiel in viel eingesetzten Zellysepuffern verwendet wird, wie den *Radio-Immune Precipitation Assay* (RIPA)-Puffer (Peach *et al.* 2015). Für eine Phosphoproteomanalyse wurden beispielsweise 12 mM SDC in 100 mM Tris-HCl (pH 9) verwendet (Masuda *et al.* 2011). Hier wurde nach dem Protokoll von Humphrey *et al.* SDC-Puffer (4 % SDC in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) frisch angesetzt, auf 4 °C gekühlt und jeweils 100 μ l pro $1 \cdot 10^7$ Zellen gegeben. Eine direkte Hitzebehandlung für 5 min bei 95 °C wurde zur vollständigen Inaktivierung aller Proteinasen und Phosphatasen durchgeführt (Humphrey *et al.* 2018). Anschließend erfolgte eine Inkubation im Ultraschallbad zweimal für 10 min mit zwischenzeitiger Abkühlung auf Eis. Eine

Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mit einer Verdünnung von 1:5 via BCA. Die Proteinlösung wurde entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Differentielle Detergens Fraktionierung

Durch den Einsatz verschiedener Puffer können über die sogenannte Differentielle Detergens Fraktionierung (DDF) sequentiell Proteinfractionen aus einem Zellpellet extrahiert werden, darunter die cytosolische, die Membran-Organell (MO)-, die Zellkern- und die Cytoskelett (CSK)-Fraktion. Auf das eingefrorene Zellpellet von $1 \cdot 10^7$ Zellen wurde 100 μ l Digitonin-Puffer (0,015 % Digitonin, 120 mM Saccharose, 40 mM NaCl, 4 mM Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES), 1,2 M $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 6,8) gegeben, für 12 min bei 4 °C und 250 rpm inkubiert und bei 4 °C und 500 g für 10 min abzentrifugiert. Die cytosolische Fraktion wurde als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Als nächstes wurde durch Zugabe von 100 μ l Triton X-100-Puffer (0,5 % Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM PIPES, 3 mM $MgCl_2$, 300 mM Saccharose, 3 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,4) das Pellet gelöst. Eine Inkubation von 30 min bei 4 °C und 250 rpm folgte, sowie eine anschließende Zentrifugation mit 5.000 g für 10 min. Die so erhaltene MO-Fraktion wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die weitere Zugabe von 50 μ l Tween/DOC-Puffer (1 % Tween 40, 0,5 % SDC, 10 mM NaCl, 10 mM PIPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF, pH 7,4) wurde das Pellet erneut gelöst und mit einer Ultraschallspitze (Branson Sonifier S-250A, Thermo Fischer Scientific, Hampton, USA) mit 10 Pulsen behandelt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 6.800 g für 10 min konnte die Kernfraktion als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Für die letzte Fraktion wurde das Pellet zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen und dafür jeweils für 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für diese Schritte verworfen. Anschließend wurde das Pellet für das Erhalten der CSK-Fraktion in 250 μ l CSK-Puffer (5 % Tween, 10 mM Natriumphosphat, 20 mM SDS, pH 7,4) mit 0,25 % Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) gelöst. Alle Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

Kernextraktion – und Lyse

Die Extraktion von Zellkernen und Lyse (KEL) erfolgte aus $1 \cdot 10^7$ Zellen. Über insgesamt drei Puffer werden nacheinander die Zellen lysiert, die Zellkerne gewaschen und dann eine DNA-Fragmentierung und Lyse der Zellkerne durchgeführt. Der Zellyse-Puffer (50 mM HEPES-Kaliumhydroxid (KOH), pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (v/v) NP-40, 0,25 % Triton X-100) wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und frisch mit 1 mM PMSF und 0,25 % Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) supplementiert. Die Zellpellets im 15 ml Zentrifugationsgefäß wurden mit 5 ml Zellyse-Puffer resuspendiert, für 10 min rotiert und bei 2.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die cytosolischen

Proteine im Überstand wurden entweder verworfen oder bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 5 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)), welcher auf einen pH-Wert von 8 eingestellt wurde, resuspendiert, für 5 min bei 4 °C rotiert und wieder bei 2.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Lyse der Zellkerne erfolgt in 300 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1 % (w/v) SDC, 0,5 % (v/v) N-Laroylsarcosin), welcher auf pH 8 eingestellt und ebenfalls mit 1 mM PMSF und 0,25 % Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) supplementiert wurde. Nach einem Überführen der Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße erfolgte eine Ultraschallbehandlung im Branson Sonifier S-250A (Thermo Fischer Scientific, Hampton, USA) mit einer Amplitude von 40 % jeweils dreimal für 10 Sekunden. Die Proben wurden dabei in Eiswasser gekühlt und anschließend mit 30 µl 10 %igem Triton X-100 supplementiert und bei 17.000 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Kernproteomproben wurden entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Als Quantifizierungsmethode wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA) mittels *Protein quantification kit* (Interchim, Montluçon, Frankreich) durchgeführt. Die Quantifizierung beruht hier auf der Biuretreaktion, wobei Kupfer (Cu²⁺)- Ionen zu Cu⁺-Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu reduziert werden. Bei Zugabe von BCA bildet sich ein farbiger Komplex mit den entstandenen Cu⁺-Ionen, welcher bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Durch Vermessung einer Verdünnungsreihe des Proteins *Bovine Serum Albumin* (BSA) mit bekannter Konzentration konnte durch die direkte Proportionalität zur Absorption eine Kalibriergerade erstellt und so die unbekannt Konzentrationen bestimmt werden.

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers, wobei die Volumina zur Minimierung von Probenverlust halbiert wurden, so dass 12,5 µl Probe mit 100 µl fertig-angesetztem BCA-Reagenz vermischt und für 30 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert wurden. Um Proteinkonzentrationen bestimmen zu können, musste eine Verdünnung gewählt werden, so dass die Konzentration innerhalb der Kalibriergerade (2000–100 µg/ml) lag. Beispielsweise konnte für eine Proteinextraktion mit 500 µl IP-Puffer aus 10⁷ Zellen mit einer 1:5 Verdünnung gearbeitet werden. Die Messung erfolgte teilweise gerätebedingt bei 570 nm am Synergy™ HT (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) oder später bei 560 nm am iMark™ *Microplate Absorbance Reader* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, US).

Acetonfällung

Eine Methode zur Abreicherung von Salz und teilweise auch von unerwünschten Pufferkomponenten ist die Fällung von Proteinen mit Aceton. Das bei -20 °C gelagerte Aceton

wurde dazu im neunfachen Volumen zu den Proben gegeben, gut gevortext und über Nacht (oder mind. 3 h) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 17.000 g wurde das Aceton abgenommen und die Proteinpellets unter dem Abzug offen getrocknet. Bei ausreichender Abreicherung der unerwünschten Bestandteile erschien das Proteinpellet durchsichtig, ansonsten wurde die Fällung unter Verwendung von 90 %-igem Aceton wiederholt. Der Probenverlust durch eine Fällung ist nicht zu vernachlässigen, ist aber häufig eine unumgängliche Methode, wie zum Beispiel für die isoelektrische Fokussierung einer 2DE-Auftrennung (Jiang *et al.* 2004).

Entsalzung

Die Entsalzung von Proteinen erfolgte über Zeba Spin *desalting columns* 7K (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Diese enthalten $800\text{ }\mu\text{l}$ *High Performance Desalting Resin Slurry* und wurden nach Herstellerangaben zunächst gewaschen und dann mit der Probe beladen. Die Bindung des Salzes an das Säulenmaterial und die damit erreichte Abreicherung des Salzes aus der Probe, sowie das Auffangen der entsalzten Probe erfolgt dabei durch einfache Zentrifugationsschritte nach Herstellerangaben.

3.4. Gelbasierte Proteinanalytik

1D-SDS-PAGE

Die SDS-*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) wurde zur Auftrennung von Proteinen nach dessen Molekulargewicht verwendet. Als Protein-Größenstandard wurden die Marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* oder der *PageRuler Prestained Plus Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) verwendet. Die Proben, häufig Aceton gefällt, wurden mit 4-fach-Lämmli-Ladepuffer (40 % Glycerin, 250 mM Tris-HCl, 8 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau) und optional mit 50 mM DTT und MilliQ-Wasser resuspendiert und 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und leichtem Schütteln inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Tris-Glycin-Gele wurden im Gelgießstand (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, US) selbst gegossen, wobei die Porengröße abhängig von der erwarteten Größe der zu trennenden Proteine von 10-12,5 % Polyacrylamid variiert wurde. Die Gele wurden mit Proben beladen, mit Elektrophoresepuffer (125 mM Tris, 960 mM Glycin, 5 % SDS) überdeckt und an den Spannungsgeber angeschlossen. Bei 180–200 Volt wurde eine Laufzeit von ca. 45–60 min benötigt, bis die Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mittels kolloidaler Färbemethode. Für eine kolloidale Färbung von Proteinen wurden die Gele zwei Mal für 10 min in MilliQ-Wasser gewaschen. Die Färbelösung (10 % Ethanol, 8 % Ortho-Phosphorsäure, 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 0,02 % Coomassie *brilliant blue* G250) wurde auf RT erwärmt, gut geschwenkt und auf die Gele gegeben. Nach ausreichender Färbung (zum Beispiel über Nacht) wurde die Lösung verworfen und entweder mittels MilliQ-Wasser langsam oder durch kolloidale Entfärbelösung

(10 % Ethanol, 8 % Ortho-Phosphorsäure) entfärbt. Nach der Entfärbung wurden die Gele mit einem Durchlicht-Scanner eingescannt oder auf einem Leuchttisch abfotografiert und bis zur eventuellen Extraktion von Gelbanden in MilliQ-Wasser im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

Westernblot

Für die Durchführung eines Westernblots im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel nicht fixiert oder gefärbt, sondern das *blotting* auf eine Transfer-Membran mittels XCell II Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden vier *blotting pads* und zwei zugeschnittene Filterpapiere in Transferpuffer (25 mM Bicin, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, 10 % Ethanol, 1 µl/ml NuPAGE Antioxidant, pH 7,2) eingeweicht. Die Transfer-Membran (Immuno-Blot® LF PVDF 0,45 µM, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, US) wurde sorgfältig zugeschnitten und 60 Sekunden in Ethanol äquilibriert und dann einige Minuten bis zum Start des Westernblots in Transferpuffer gelagert. Auf die Seite der Kathode wurden zunächst zwei *blotting pads*, dann ein Filterpapier und das Gel platziert. Vorsichtig wurde die Membran mit einer Pinzette luftblasenfrei auf das Gel gelegt, kleine Luftblasen wurden durch Rollen mit einer Pipettenspitze entfernt. Dem Aufbau folgte ein Filterpapier und zwei Transferpuffer-getränkte *blotting pads*. Die *blotting*-Einheit wurde in das Modul platziert, auf Dichtigkeit getestet, mit Transferpuffer aufgefüllt und der äußere Bereich zur Kühlung mit VE-Wasser befüllt. Der *blotting*-Vorgang erfolgte eine Stunde bei 35 Volt. Nach dem Auseinanderbauen wurden die transferierten Proteine auf der Membran für eine Stunde in Blockierlösung mit 5 % BSA oder Milchpulver bei RT blockiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit entsprechendem primärem Antikörper an, welcher nach Inkubation durch eine Lagerung bei -20 °C bis zur wiederholten Verwendung aufbewahrt wurde. Dreimaliges Waschen für 5 min im *Tris-Buffered Saline* (TBS)-Tween® 20 (TBS-T, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, 0,1 % Tween® 20) entfernte ungebundenen primären Antikörper. Der Cyanin-Farbstoff gelabelte CyTM3 AffiniPure Goat anti-*Rabbit* IgG (H+L) sekundäre Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde 1:2 verdünnt bei -20 °C gelagert und weiterhin in einer 1:1000-1:5000 Endverdünnung mit dem jeweiligen Puffer mit 2,5 % Blockier-Agens (BSA oder Milchpulver) für 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen im TBS-T-Puffer für 5 min wurde die Membran bei RT im Dunklen getrocknet. Anschließend wurde die trockene Membran im *Ettan DIGE Imager* (EDI, GE Healthcare, Chicago, Illinois, US) gescannt. Dafür wurde der Farbstoff Cy3 mit einer Wellenlänge von 550 nm angeregt und die Emission bei 570 nm gemessen und jeweils mit verschiedenen Expositionszeiten detektiert (75 ms–1 s). Die Pixelgröße wurde in der Software auf 40 µM eingestellt und als Matrix-Typ Membran ausgewählt. Der gleichmäßige Transfer an Proteinen auf die Membran wurde durch eine anschließende Färbung für 2 min nach kolloidaler Färbemethode und anschließender intensiver Entfärbung überprüft. Die getrockneten Membranen wurden auf einem Leuchttisch abfotografiert und für eine Normalisierung auf die aufgetragene Proteinmenge im Quantifizierungsprozess verwendet. Eine relative

Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels LabImage Software (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, Deutschland). Dafür wurden die Bilder der Antikörper-Detektionen und Hintergrundfärbung in die Software hereingeladen und sowohl die zu quantifizierende Bande als auch ein entsprechender Hintergrundbereich ausgewählt. Nach Normalisierung auf den Hintergrund wurden relative Quantitäten ermittelt, womit zum Beispiel ein Verlauf der analysierten Proben (max. 14 Stück) auf dieser Membran ermittelt werden konnte.

2D-SDS-PAGE

In der Zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgt zuerst eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt, was auch isoelektrische Fokussierung (IEF) genannt wird. Für eine IEF wurden 100-150 µg Proteinextrakt auf 7 cm langen Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten eingesetzt. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die Proteine über eine Gelmatrix im elektrischen Feld, bis der isoelektrische Punkt erreicht ist. Anschließend können die aufgetrennten Proteine auf dem Streifen in der zweiten Dimension über eine SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht getrennt werden, wobei pro Probe eine PAGE benötigt wird. Die Proteinproben wurden zuvor zweimal mit Aceton gefällt, um bei der IEF-störendes Salz zu entfernen. Ein immobilisierter pH-Gradienten (IPG)-Puffer wurde kommerziell mit den Streifen über einen nicht-linearen (NL) pH-Bereich von 3-10 (*Immobiline DryStrips*, GE Healthcare, Chicago, Illinois, US) erworben. Zum Solubilisieren des Aceton-gefällten Proteinpellets wurde je Probe 150 µl Puffer bestehend aus 1 % IPG-Puffer in 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % CHAPS (w/v) und 1 % (w/v) DTT verwendet und das Pellet durch starkes Vortexen gelöst und für 60 min bei RT und 1000 rpm inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 17.000 g bei 4 °C wurden unlösliche Komponenten im Reaktionsgefäß zurückgelassen und der Überstand zwischen den Elektroden eines Keramikschieffchens gleichmäßig verteilt. Nach der Rehydrationsmethode wurde die Schutzfolie des Gelstreifens entfernt und die Gelmatrix des Streifens direkt und luftblasenfrei auf die Proteinelösung platziert und 10 min bei RT quellen gelassen (Westermeier *et al.* 2008). Ein weiteres Überschichten mit ca. 250 µl *Cover Fluid* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, US) und Aufsetzen des Plastikdeckels verhinderte ein Austrocknen der Probe während der IEF. Die IEF erfolgte im *Strip Holder*-System (GE Healthcare, Chicago, Illinois, US), wobei zunächst eine passive Äquilibrierung ohne elektrische Spannung für 16 h durchgeführt wurde. Die Proben wurden zunächst in einem Stufengradient für eine Stunde unter 30 V fokussiert. Innerhalb von drei weiteren Gradienten-Schritten wurden 200 V innerhalb von 2,5 h, 1000 V innerhalb von einer Stunde und 2000 V innerhalb von 1,5 h erreicht. Die 2000 V wurden für weitere 4 h gehalten, so dass die IEF nach Erreichen von ca. 9000 Vh beendet wurde.

Für die zweite Dimension wurden 10 %ige SDS-Gele mit einem speziellen 2DE-Kamm ohne Sammelgel gegossen. Außerdem wurden die Proteine in dem Gelstreifen äquilibriert, reduziert und alkyliert. Dazu wurde ein Äquilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 %

(v/v) Glycerin und 2 % SDS (w/v)) angesetzt und jeweils 10 ml mit 0,1 g DTT für Puffer A und 0,4 g IAA für Puffer B supplementiert. Die Streifen wurden zunächst 15 min unter leichtem Schütteln in Puffer A inkubiert, kurz mit MilliQ-Wasser abgespült und in Puffer B weitere 15 min im Dunklen inkubiert. Die äquilibrierten Streifen wurden gleichzeitig mit erhitzter 0,5 % Agarose-Lösung in der SDS-PAGE-Kammer luftblasenfrei fixiert. 2 µl des PageRuler *Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) wurden als Größen-Standard auf ein kleines Stück Membran pipettiert und in die dafür vorgesehene, einzelne Kammer der 2D-SDS-PAGE platziert. Die Proteine wurden zunächst durch einen Vorlauf bei 150 V für 10 min und dann durch den Hauptlauf bei 200 V für ca. 50 min im Gel aufgetrennt. Das Gel wurde entweder gefärbt oder für einen Westernblot eingesetzt.

Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (Tabelle 1) wurden in einer 1:1000-1:5000 Verdünnung im TBS-T-Puffer mit 5 % BSA oder Milchpuffer angesetzt und einige Male wiederverwendet.

Tabelle 1 Übersicht über die für Westernblots verwendeten primären Antikörper und wichtige zugehörige Daten.

Name	MW [kDa]	Klonalität	Isotyp	Hersteller	Epitop
Akt	60	Polyklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #9272	Synthetisches Peptid C-terminal (<i>mouse</i>)
CBX3	22	Polyklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #2619	Synthetisches Peptid Amino-terminal
ERK1/2	44,42	Monoklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #4695	Synthetisches Peptid C-terminal
HSPA5	78	Monoklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #3177	Synthetisches Peptid um Gly584
mTOR	289	Monoklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #2972	Synthetisches Peptid um Ser2481
Phospho-ERK1/2	44,42	Monoklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #4370	Synthetisches Phosphopeptid P-Thr202/Tyr204
Phospho-Akt	60	Monoklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #13038	Synthetisches Peptid um Thr308
Phospho-eIF4B	80	Polyklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #5399	Synthetisches Peptid um Ser406
Phospho-mTOR	289	Polyklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #2971	Synthetisches Phosphopeptid P-Ser2448
Phospho-p70 S6K	70,85	Polyklonal	<i>Rabbit</i>	CST, #9205	Synthetisches Phosphopeptid P-Thr389

Sowohl die Verdünnungen als auch die kommerziell erworbenen AK-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

3.5. Probenvorbereitung Massenspektrometrie

3.5.1. Enzymatischer Verdau

Für die nachfolgend beschriebenen Methoden in der Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Messung wurde ausschließlich LiChroSolv-Wasser (Merck Millipore, Burlington, MA, US) und Reagenzien entsprechender Qualität (HPLC *grade* oder LC-MS *grade*) verwendet.

Trypsin

Für den tryptischen Verdau wurde Trypsin Gold *Mass Spec Grade* (Promega, Madison, Wisconsin, US) verwendet. 100 µg Trypsin wurden als Stock in 100 µl 50 mM Essigsäure gelöst. Mehrere Frier-Tau-Zyklen sollten vermieden werden, da diese zu einer reduzierten Aktivität des Enzyms führen würden. Trypsin wurde nach Herstellerangaben in einer 1:100 Verdünnung von Trypsin zu eingesetztem Protein angewendet. Wenn die Proteine mit Urea-haltigem Puffer solubilisiert wurden, wurden die Pufferbedingungen nach Reduktion und Alkylierung durch Verdünnung mit TE (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5)- Puffer optimal für den Verdau eingestellt, dabei sollte nach Herstellerangaben eine Urea-Konzentration von < 1 M eingehalten werden.

Lys-C

Für den Lys-C-Verdau wurde mit der Endoproteinase Lys-C *Mass Spec Grade* (Promega, Madison, Wisconsin, US) gearbeitet. Als Vorverdau wurde die Protease für ca. 12 h bei 37 °C in einer 1:200 Verdünnung von Lys-C zu eingesetztem Protein angewendet.

Lys-C hat in Lösung eine nur geringe Haltbarkeit und wurde in Aliquots á 0,5 µg (in 5 µl LiChroSolv) bei -80 °C gelagert. Für den Gesamtproteinverdau des IGF-SILAC-Experiments wurde zum Beispiel ein lyophilisiertes 5 µg Aliquot Lys-C frisch mit 50 µl LiChroSolv-Wasser angelöst, so dass der Puffer aus 50 mM HEPES (pH 8,0), 10 mM EDTA und 5 mg/ml Raffinose bestand.

In weiteren Ansätzen wurde zum Teil mit Trypsin/Lys-C-Mix (Promega, Madison, Wisconsin, US) gearbeitet.

3.5.2. Peptidaufreinigung

Eine C18-basierte Aufreinigung von Peptiden wurde für diese Arbeit mit verschiedenen Materialien und Mengen durchgeführt. Für Peptidmengen in einem sehr kleinen Maßstab (Bindekapazität < 5 µg) standen ZipTip® *Pipette Tips* (Merck Millipore, Burlington, MA, US) mit einem Arbeitsvolumen von 10 µl zur Verfügung. Über Sep-Pak™ C18-Vakuum-Säulen (Waters Corp., Milford, MA, US) mit 50 mg Material wurden bis zu 300 µg Peptide aufgereinigt, für höhere Peptidmengen wurden Säulen mit 200 mg Material verwendet. Die Chemie des C18-modifizierten Silica-Materials mit einer Partikelgröße von 55-105 µm erlaubt es auch schwach hydrophobe Peptide zu binden, da die Bindung über monofunktionale Silane erfolgt (Waters 2016). Da keine den Herstellerangaben-entsprechende Vakuum-Quelle zur Anwendung der Säulen vorhanden war, wurde die Flüssigkeit mittels Luftdruck über die Säule gepresst. Dazu wurde eine 5 ml Spritze mit einer abgeschnittenen 200 µl Pipettenspitze mittels Parafilm fest verbunden. Die jeweiligen Volumina konnten hier direkt auf das C18-Bett in die Säulchen pipettiert werden, so dass der Spritzenaufsatz nur zum Druck ausüben verwendet wurde, somit nicht in Berührung mit jeglicher Flüssigkeit kam und wiederverwendet werden konnte.

Weiterhin wurde mit den Materialien Maestro® und WWP2® von Tecan (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gearbeitet. Im Vergleich zu Sep-Pak handelt es sich bei Maestro ebenfalls um C18-modifiziertes Silica-Material, ist jedoch nicht zusätzlich *endcapped* und durch eine kleinere Partikelgröße von 10 µm charakterisiert. WWP2 hingegen, ist polymerisches Material mit einer Partikelgröße von ca. 30 µm. Diese beiden Materialien von Tecan sind sowohl im konventionellen Säulenformat erhältlich als auch in einem speziellen Zweikammer-System, auch *Narrow Bore Extraction*™ (NBE) genannt, erhältlich. Die vorhandene Luftkammer zwischen Filter und dem hydrophoben Material erlaubt eine an die iST-Methode (Kulak *et al.* 2014) angelehnte Probenvorbereitung direkt in der Säule, so dass diese Methode im Folgenden *in-cartridge*-Methode genannt wird. Eine der Vorteile, die sich hierdurch ergibt, ist der geringere Probenverlust von einem Probengefäß in das nächste, womit sich der Probenverlust potentiell verringert. Die Materialien von Tecan wurden ausschließlich in der Resolvex® A200 Workstation (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) zur Peptidaufreinigung verwendet.

Die Durchführung erfolgte für alle beschriebenen Materialien nach dem folgenden Protokoll. Zunächst wurde eine Konditionierung des C18-Materials mittels 80 % Acetonitril (ACN) in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt. Die Peptidprobe wurde zeitgleich in 0,1 % TFA gelöst und der pH-Wert überprüft. Dieser sollte für die Anwendung einer C18-basierten Aufreinigung unter pH 4 liegen. Auf die Konditionierung der Säulen folgte eine Äquilibration des Materials mit 0,1 % TFA-Lösung. Die gelösten Proben wurden daraufhin langsam beladen, wobei zusätzlich darauf geachtet wurde, dass immer etwas Flüssigkeit oberhalb des Materials verbleibt, um die Bindung der Peptide durch Luftblasen-Bildung nicht zu reduzieren. Der Durchlauf wurde aufgefangen und teilweise wiederholt beladen. Die gebundenen Peptide wurden dann mit 0,1 % TFA gewaschen und mit 50-80 % ACN in 0,1 % TFA in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die Eluate wurden in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung konnten Peptide für wenige Wochen bei -20 °C oder mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden. Unterschiede in der Durchführung ergaben sich nur im verwendeten Puffervolumen. Für Säulen ≥ 50 mg wurde mit 900 µl Konditionier-, Äquilibration- und Waschlösung gearbeitet, bei ≤ 50 mg mit jeweils 5 ml Lösung. Anstelle von 300 µl Proben- und Elutionsvolumen für ≤ 50 mg, wurde für > 50 mg Material mit einem Volumen von 1 ml gearbeitet.

3.5.3. Peptidfraktionierung

Eine orthogonale Methode der *off-line* Peptidfraktionierung komplexer Proteomproben wurde mittels *high pH Reversed Phase Peptide Fractionation Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) durchgeführt. Die Elution der Peptide von der Einwegsäule erfolgt sequentiell in acht Fraktionen, wobei die Proben ohne weitere Entsalzung für die nLC-MS/MS-Strecke eingesetzt wurden. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben, wobei für die Fraktionierung einer

CHO-K1 Probe die vorgegebene Menge von 10-100 µg Ausgangsmaterial mit dem Einsatz von 140 µg überschritten wurde. Die Arbeit unter hohem pH wird über den im Kit enthaltenen 0,1 % Triethylamin (TEA)-Puffer gewährleistet.

3.5.4. Phosphopeptid-Anreicherung

Die Anreicherung von Phosphopeptiden erfolgte für diese Arbeit über die zwei verschiedenen Verfahren MOAC und IMAC, wobei hier Titandioxid- und Eisen- Nitrioloessigsäure-basierte *single use* Säulen kommerziell erworben wurden. Größtenteils wurde eine TiO₂-basierte Anreicherung von Phosphopeptiden nach dem Protokoll von Thingholm *et al.* durchgeführt (Thingholm and Larsen 2016) und dafür Titansphere Phos-TiO Kit (GL Sciences, Nakano-ku, Tokyo, Japan) mit einer Säulengröße von 200 µl (3 mg TiO₂-Material) verwendet, wofür eine Bindekapazität von ca. 3,5 µg (phosphorylierter) Peptide angegeben wird. Im erworbenen Kit war, neben den *tip columns* mit TiO₂-Material, Milchsäure (Lösung B) enthalten. Lösung A, 2 % TFA in LiChroSolv, musste jeweils frisch angesetzt werden. Diese Lösungen wurden für gebrauchsfertige Äquilibrier- und Wasch-Puffer frisch nach Protokoll vermischt, sodass Puffer A aus 80 % ACN in 1 % TFA und Puffer B aus 20 % ACN in 0,1 % TFA zusammengesetzt waren. Der Ladepuffer zum Lösen der eingetrockneten Peptide bestand aus 80 % ACN, 5 % TFA und 0,2 M Glykolsäure. Die mittels Sep-Pak aufgereinigten Peptide wurden in je 100 µl Ladepuffer gelöst und kurz inkubiert. Die *tip columns* des Kits wurden in ein Reaktionsgefäß platziert, in welchem sie durch Zentrifugen-Adapter stabilisiert wurden. Zunächst wurden die *tip columns* durch Zugabe von 20 µl Puffer A und eine 2-minütige Zentrifugation bei 2.000 g bei RT konditioniert. Eine Äquilibrierung erfolgte dann durch Zugabe von 20 µl Puffer B und einem identischen Zentrifugationsschritt. Vor der Probenbeladung wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Die Probe wurde in die *tip column* pipettiert und das Reaktionsgefäß, in dem die Probe gelöst wurde mit 100 µl Puffer B nachgespült und dann auch in die *tip column* pipettiert. Die Probe und Puffer B wurden dann durch drei Mal hoch- und runter pipettieren gemischt und für 10 min bei 1.000 g zentrifugiert. Der gesammelte Durchlauf wurde noch mal auf die *tip column* gegeben und wieder bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert. Die *tip column* wurde, zusammen mit dem Adapter, in das erste *waste*-Reaktionsgefäß überführt und zum Waschen 20 µl Puffer B hinzugegeben und für 2 min bei 2.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt vier Mal wiederholt. Anschließend wurde ein neues Reaktionsgefäß zur Elution der Phosphopeptide verwendet. Die Elution wurde mit 20 µl frisch angesetzter 5 % Ammoniak (NH₄OH)-Lösung, hergestellt aus 25 % Ammoniakwasser (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), durchgeführt und für 10 min bei 1.000 g zentrifugiert. Die Elution wurde noch einmal auf die Säule aufgetragen und wieder für 5 min bei 1.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden noch einmal 40 µl 5 % NH₄OH auf die *tip column* gegeben und die gesamte Elution in der Vakuumzentrifuge (Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingetrocknet und die eluierten Phosphopeptide bei -20 °C gelagert.

Weiterhin wurde mit den High-Select™ TiO₂ und Fe-NTA Phosphopeptidanreicherungs Kits von (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gearbeitet, welche nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt wurden. Die Proben sollten dafür frei von Detergenzien, Salzen, EDTA und Reduzierungsmittel sein, so dass in den meisten Fällen eine C18-Aufreinigung vor Phosphopeptidanreicherung notwendig war.

Die sequentielle Durchführung der beiden Anreicherungsverfahren wurde nur selten für diese Arbeit angewendet. Für die SIMAC-Durchführung wurden der Durchfluss und der erste Waschschrift vereint und aufbewahrt. Nach weiterem Waschen mit Waschpuffer und LiChroSolv-Wasser erfolgte, abweichend vom Protokoll, eine Elution mit 100 µl saurem Puffer bestehend aus 20 % ACN/0,1 % TFA, welche ebenfalls mit dem Durchlauf und Waschschrift 1 vereint wurde. Danach wurde weiter nach Protokoll verfahren und die basische Elution getrennt aufgefangen. Nach dem Eintrocknen der beiden Proben in der Vakuumzentrifuge (Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde für die erste Fraktion nach Protokoll der TiO₂-Anreicherung verfahren.

3.5.5. Peptidquantifizierung

Die Konzentration der größtenteils in 2,5 % ACN/0,1 % TFA-gelösten Peptide wurde im NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vermessen. Zunächst erfolgt die Messung des entsprechenden Lösungsmittels als Leerprobe. Die Vermessung der Peptide erfolgt bei der Wellenlänge 205 nm. Eine Basislinienkorrektur bei 340 nm wurde aktiviert, um einen möglichen Offset zu korrigieren, der durch Lichtstreuung aufgrund von Partikeln hervorgerufen werden kann. Die für Gesamtproteom-Analytik eingestellte Methode „31“ nimmt einen Extinktionskoeffizienten von 31 ml/(mg·cm) an, da gezeigt werden konnte, dass die meisten Peptid- bzw. Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml einen Extinktionskoeffizienten $E_{205} = 30-35$ ml/(mg·cm) tragen (Goldfarb *et al.* 1951).

3.5.6. Massenspektrometrische Messung

Die durch den Protease-Verdau generierten Peptide werden mit Hilfe einer hydrophoben stationären Phase entsprechend ihrer Hydrophobizität über eine RP-LC aufgetrennt. Im Gegensatz zu einer LC wird bei einer nanoLC (nLC) mit sehr geringen Flussraten von bis zu 300 nl/min gearbeitet, was insbesondere bei geringen Probenmengen, wie enzymatisch-verdauten Peptidproben, von Vorteil ist (Westermeier *et al.* 2008). Für diese Arbeit wurde mit der UltiMate 3000 *Rapid Separation* LC (RSLC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit einer Flussrate von 300 nl/min gearbeitet. Um eventuell vorhandene Verunreinigungen abzureichern und die Hauptsäule zu schützen, wurde eine Acclaim™ PepMap™ 100 C18 Vorsäule (300 µm Durchmesser, 5 mm Länge) vor die Acclaim™ PepMap™ 100 C18 (2 µm Partikelgröße, 75 µm Durchmesser, 25 cm Länge) Hauptsäule geschaltet. Für Messungen von wenig-komplexen Proben, wie Gel-basierte Peptidproben, wurde eine kürzere, 15 cm lange Haupt- bzw. Trennsäule eingesetzt. Als

Lösungsmittel der beiden Nanofluss-Pumpen dient zum einen 0,1 % Ameisensäure (FA) in LiChroSolv (Lösung A) und 80 % ACN in 0,1 % FA (Lösung B). Durch das Anlegen eines Gradienten mit steigendem Gehalt an Lösung B werden die an die Säule gebundenen Peptide mit zunehmender Hydrophobizität eluiert. Die zu vermessende Probe wurde zuvor in 0,1 -5 % ACN in 0,1 % TFA (meist 2,5 % ACN in 0,1 % TFA) gelöst und in einem Volumen resuspendiert, so dass die Konzentration ca. 1 µg/µl betrug. Pro Probe wurden dann ca. 2-4 µg Peptide mittels *Autosampler* in ein 20 µl *loop* injiziert, mit 0,1 % TFA auf 20 µl aufgefüllt, zuerst auf die Vorsäule geladen, mit einem Ladepumpenfluss von 20 µl/min gewaschen, die Hauptsäule im Nanofluss (300 nl/min) eingeschaltet und über eine speziell auf die Probe angepassten Gradienten aufgetrennt. Zur direkten LC-basierten Qualitätskontrolle war die Anlage mit einer UV-Zelle ausgestattet, welche direkt nach der Hauptsäule verbaut war.

Die Messung der mittels nLC-aufgetrennten Peptide erfolgt *online* an dem hochauflösenden Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap™ Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die eluierten Peptide wurden über ESI an einem elektropolierten Edlestahlmitter (*stainless steel*, 30 µM Innendurchmesser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) mit einer angelegten Hochspannung von 1,6-2,6 kV in der Nanospray Flex™ Ionenquelle ionisiert und über *funnels* weiter in das Massenspektrometer geleitet. Hauptsächlich wurde während dieser Arbeit nicht mit der standardmäßig verbauten *S-lens*, sondern einer *funnel*-Konstruktion der dualen ESI/*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI)-Quelle gearbeitet (Spectrograph LL, Kennewick, Washington, US). Die Proteom-Messungen erfolgen ausschließlich im Positiv-Modus.

Für eine Massenklibrierung des Massenspektrometers wurde die Ion Max API-Quelle mit *Heated* (H)-ESI II Sonde verwendet. Die für den positiven Messmodus verwendete Kalibrierlösung Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) besteht aus *n*-Butylamin (74 m/z), Koffein (195 m/z), *L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate* H₂O (MRFA, 524 m/z) und *perfluoroalkyl triazines* („Ultramark“ mit 1621, 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 m/z) im ACN/Methanol/Essigsäure-Lösung (Chan 2004). Mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min und unter Anlegung von 4 kV-Spannung wurde diese Lösung zur Kalibrierung des Massenbereichs 74-1822 m/z verwendet.

Zur Absättigung von neuen Vor- und Hauptsäulchen, sowie zur Fehlerevaluierung wurde Cytochrom C *Digest* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) injiziert. Dazu wurden die 160 pmol in 160 µl 5 % ACN/0,1 % TFA gelöst, so dass eine Stammlösung von 10 pmol/µl vorhanden war. Diese wurde entweder direkt weiter auf gebrauchsfertige 0,5 pmol/µl-Lösungen verdünnt oder bei -20 °C gelagert. Zum Absättigen wurden jeweils 2 pmol und zur Fehlersondierung jeweils 0,5 bis 2 pmol injiziert. Die Messung von Pierce™ HeLa Protein *Digest*

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) erfolgte in regelmäßigen Abständen zur generellen Qualitätskontrolle. Der lyophilisierte Standard wurde nach Protokoll solubilisiert, so dass eine Konzentration von 0,1 µg/µl vorlag. Die Lösung wurde in 5 bzw. 10 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Es wurde hauptsächlich mit Injektionen von 200, 50 oder 100 ng HeLa-Probe gearbeitet, welche erst über variierende Gradienten, dann ab dem zweiten Quartal 2019 über eine Standardmethode in 40 min aufgetrennt und gemessen wurden.

Die Software FreeStyle 1.5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde verwendet, um die Rohdaten zu öffnen, das UV- und *Total Ion* oder *Base Peak Chromatogram* (TIC, BPC) zu beurteilen und um die Messparameter zu extrahieren.

3.6. Bioinformatik

Die über die nLC-MS/MS-Messungen generierten Rohdaten (.raw-files) wurden über verschiedene Software-Strecken ausgewertet.

3.6.1. Proteome Discoverer

Eine erste Datenbank (DB)-basierte Evaluierung zur Protein-Identifizierung (ID) erfolgte unter Verwendung der Proteome Discoverer Software Version 2.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dafür wurde für jedes Projekt eine *Study* angelegt und *Study Factors* zur Gruppierung der Daten definiert, darunter der *Biological Replicate Factor*, der *Categorical Factor* für technische Replikate und der *Numerical Factor* für z.B. Zeitreihen. Der Workflow besteht aus dem *Processing Step* zur Datenbank-Suche und dem *Consensus Step* zur Rekonstruktion von Proteinen ausgehend von identifizierten *Peptide Spectrum Matches* (PSMs), inklusive Peptid und Protein-Gruppierung und Validierung. Die einzelnen *Nodes* des Workflows wurden variiert und auf das Experiment angepasst. Aufgrund einer kostenpflichtigen Nutzung der standardmäßigen Sequest HT-Suchmaschine, wurden viele Experimente mit der frei-zugänglichen MS Amanda 2.0-Suchmaschine (Dorfer *et al.* 2014) analysiert. Hauptsächlich wurden dabei je nach Experiment die Datenbank (z.B. UniProt oder NCBI) und die variablen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung oder Methylierung) variiert. Für eine anschließende PSM-Validierung wurden die *Nodes Percolator* (für komplexe Proben mit > 500 Protein IDs) und *Fixed Value PSM Validator* (für wenig-komplexe Proben < 500 Protein IDs) verwendet. Der *Data Distribution Node* wurde als *Post-Processing Node* für eine verbesserte Datenübersicht in den Workflow eingefügt.

Eine Carbamidomethylierung an Cystein wurde als eine *fixed modification* angegeben, sofern die Reduktion und Alkylierung der Cysteine in der Probenvorbereitung durchgeführt wurde. Für komplexe *in-solution*-basierte Proben erfolgte eine Reduktion und Alkylierung standardmäßig. Für *in-gel*-basierte Verdauproben wurde häufig darauf verzichtet, da das Erhitzen mit SDS weitgehend zu einer Linearisierung der Proteine führt.

Das Einfügen neuer Modifikationen in der Proteome Discoverer Software erfolgt über die UniMod *Accession Number*. Für die Analyse von Protein-Ubiquitinylierungen (#121) wird die variable Modifikation Glycin-Glycin (GG) angegeben, da eine Diglycin-Sequenz nach dem tryptischen Verdau einer Ubiquitinylierung an der Aminosäure Lysin verbleibt (Song *et al.* 2020). Eine Analyse einer AMPylierung (auch Adenylierung) an der Aminosäure Threonin oder Serin erfolgt über die variable Modifikation Phosphoadenosin (#405). Weitere Modifikationen, die untersucht wurden, sind die ADP-Ribosylierung (#213) oder die Arginylierung (#1288).

3.6.2. MaxQuant

Eine quantitative Datenauswertung erfolgt über die Software MaxQuant mit integrierter Andromeda-Suchmaschine (Cox 2016; Tyanova *et al.* 2016), wobei verschiedene Versionen von 1.5.8.3 bis 1.6.12.0 verwendet wurden. Nach dem Hereinladen der Daten erfolgt eine Gruppierung über die Experiment-Namen, wobei technische Replikate automatisch entstehen, wenn ein identischer Experiment-Name vergeben wird.

Standardmäßig wurde als Enzym Trypsin/P mit zwei möglichen *missed cleavages* angegeben, wobei Trypsin/P bedeutet, dass auch eine potentielle *missed cleavage* entsteht, wenn ein Prolin auf die Aminosäure Lysin oder Arginin folgt (Tyanova *et al.* 2016).

Für SILAC-Ansätze erfolgte eine MS1-Level-Quantifizierung über das SILAC-Labeling (*heavy, medium, light*), welches unter *Group-specific parameters/Type/Multiplicity* angegeben wird. Die Funktion *requantify* wurde dabei aktiviert, um möglichst viele SILAC-Pärchen für die Quantifizierung zu berücksichtigen. Für Label-freie Quantifizierungsansätze wurde nur unter *Group-specific parameters* LFQ angegeben und die *requantify*-Funktion entsprechend den *default*-Einstellungen deaktiviert.

Zusätzlich zur standardmäßig-eingestellten N-terminalen Acetylierung und Oxidierung an Methionin, wurde als variable Modifikationen für Phosphoproteom-Analysen die Phosphorylierung an Serin, Threonin und/oder Tyrosin zugelassen. Eine Carbamidomethylierung an Cystein wurde standardmäßig als eine *fixed modification* angegeben.

Bei der Einstellung der globalen Parameter wurden die UniProt/TrEMBL-Datenbanken von *Mus musculus* (Stand Dezember 2017, 76.775 Einträge) und *Criceteulus griseus* (Stand Dezember 2017, 34.740 Einträge) eingesetzt, wobei als *identifier parse rule* `>.*\|(.*)\|` ausgewählt werden musste.

Weiterhin wurde mit der NCBI-Datenbank (Stand Dezember 2017, 34.925 Einträge) gearbeitet. Im Folgenden wird hauptsächlich mit den sogenannten UniProt/TrEMBL- und NCBI-Datenbanken aus Dezember 2017 gearbeitet. Die in 1.5.2 beschriebenen neueren Datenbanken wurden ausschließlich für Vergleiche, jedoch aufgrund der Aktualität nicht für quantitative Interpretationen verwendet.

Zur Proteinquantifizierung wurden nur *unique* Peptide und keine Modifikationen an Peptiden zugelassen, so dass die Proteinquantifizierung nur über unmodifizierte Peptide erfolgte. In dem Feld *advanced* sollte die Methode zur Berechnung von *occupancies* auf *normalized* eingestellt werden.

Non-normalized würde hingegen eingestellt werden, sollten große Änderung im Gesamtphosphorylierungsstatus zwischen den zwei zu vergleichenden Zuständen erwartet werden (Tyanova *et al.* 2016). Die relative Quantifizierung für die Phosphoproteom-Analyse erfolgt in der MaxQuant-Software auf Basis von möglichen einfach-, zweifach- oder dreifach-phosphorylierte Peptiden (_1,_2,_3).

Der *Match Between Run* (MBR)-Algorithmus in MaxQuant (unter *Global parameters/Identification*) wurde nur aktiviert, wenn Proben analysiert wurden, die mit demselben Protokoll vorbereitet und gemessen wurden.

Die generierten Parameter-, Peptid-, Protein- und Modifikations-Tabellen wurden automatisch im *combined*-Ordner gespeichert. Zusätzlich wurden die Parameter der MaxQuant-Session (.mqpar-file) zur möglichen Reproduktion der Analyse gespeichert.

3.6.3. Perseus

Die weitere Auswertung der mittels MaxQuant erstellten Tabellen erfolgte vor allem anhand der Software Perseus (Tyanova *et al.* 2015), wobei auch hier mit verschiedenen Versionen (1.5.6.0 - 1.6.10.43) gearbeitet wurde. Die Speicherung der prozessierten Daten erfolgt im Software-spezifischen Dateityp (.sps) und ist außerdem Versionsspezifisch, so dass das Öffnen einer Session mit neueren oder älteren Versionen nicht möglich ist. Angelehnt an publizierte Protokolle (Williams *et al.* 2016; Tyanova and Cox 2018) wurde für die Phosphoproteom-Analyse die normalisierten SILAC-Verhältnisse (*heavy/light* (H/L) je _1,_2 und _3) aus dem PhosphoSTY-Dokument in die Perseus Software hereingeladen. Für die Proteom-Analyse wurden hingegen die LFQ-Proteinintensitäten aus der ProteinGroups-Tabelle verwendet. Kontaminationen und *reverse hits* wurden durch die Funktion *filter rows* für alle Daten entfernt. Eine weitere Filterung für die Phosphoproteom-Analyse erfolgte auf Basis der Lokalisierungs-Wahrscheinlichkeiten mit $> 0,75$, den sogenannten *class I phosphosites*. Weiterhin wurde auf eine minimale Anzahl an validen Quantifizierungswerten nach der Gruppierung von biologischen Replikaten gefiltert. Der Filter für valide Werte kann zum Beispiel entsprechend der gewünschten Stringenz (z.B. 70 %) über die gesamten Messungen oder auch eine Mindestanzahl an validen Werten in mindestens einer Gruppe angegeben werden. Eine weitere Stringenz der Datenauswertung wurde durch einen Filter für eine minimale Anzahl an quantifizierten Peptiden pro Protein hervorgerufen (z.B. > 2). Nach einer \log_2 Transformation der H/L-Verhältnisse (oder LFQ-Intensitäten) wurde für regulierte Hits innerhalb der drei biologischen Wiederholungen ein t-Test durchgeführt. Der Einstichproben-t-Test testet, ob es signifikante Unterschiede zu einem festen Wert gibt. Dieser Wert wurde als 0 festgelegt, ein Verhältnis von 1 würde somit keine Änderung bedeuten. Die Signifikanz basiert auf *p-values* (zum Beispiel 0,05). Aus den signifikant veränderten Phosphorylierungsstellen wurden dann solche mit einer Änderung von mindestens 10 % (mit der Funktion *filter rows based on numerical column*) gefiltert. Die neuen Spalten für Hoch- bzw. Runterregulation wurden anschließend mit der t-test-

Signifikanz-Spalte kombiniert. Eine weitere Möglichkeit neben der Signifikanz auch die Regulierung mit einzubeziehen, ist das Einstellen eines S0-Parameters auf zum Beispiel 0,1 (Tusher *et al.* 2001).

Für SILAC-basierte Ratios wurde der Einstichproben t-Test angewendet, um Unterschiede zwischen der induzierten und Kontrollprobe zu ermitteln. Unterschiede zwischen zwei Gruppen (SILAC- oder LFQ-basiert) wurden über einen Zweistichproben t-Test ermittelt. Weiterhin wurde über die Durchführung einer Varianzanalyse (*Analysis Of Variance*, ANOVA) Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen berechnet. Die in Perseus erstellten *Volcano plots* bestehen aus dem $-\log p\text{-value}$ und der sogenannten t-Test Differenz nach folgender Rechenregel

$$\log \frac{a}{b} = \log a - \log b \quad (8)$$

Die t-Test Differenz berechnet sich aus der Differenz der zwei Gruppen nach Mittelwert-Bildung. Um daraus die *Fold Change* (FC) zu berechnen, wird vor dem Anwenden des t-Tests eine \log_2 Transformation durchgeführt und die FC aus der erhaltenen t-Test Differenz-Spalte über die Umkehrfunktion (2^x) erhalten.

Nach der statistischen Analyse können die Daten visualisiert oder für weitere Auswertungen, wie zum Beispiel für ein *Gene Ontology* (GO) Anreicherung über einen *Fisher exact* Test (Fisher 1922) oder Signalweg-Analysen verwendet werden (Williams *et al.* 2016).

Die Perseus Software wurde auch für eine Korrelation von Proteom zu Transkriptom-Daten verwendet. Die Transkripte wurden dazu über *Generic matrix upload* in eine Session hereingeladen und über die *Matching rows by name*-Funktion mit den Proteomdaten über die annotierten Gennamen verknüpft.

3.6.4. Visualisierung von Expressionsdaten

Die Visualisierung von Expressionsdaten in selbst-erstellten Pathways erfolgte in der *Fusion polyomics data integration*-Software (Brink *et al.* 2016). Dazu wurden ausgewählte Proteine bzw. Phosphorylierungsstellen in CellDesigner (Version 4.4) (Funahashi *et al.* 2008) dargestellt und die Graphik als *Scalable Vector Graphics* (SVG)-Dateiformat exportiert. In der Software Inkscape (0.92.2) wurden dann die Rechtecke der Proteine oder Phosphorylierungsstellen mit einem *identifier* annotiert. Nach dem Hereinladen der Expressionsdaten mit den entsprechenden *identifiern* und dem Pathway erfolgte dann eine automatische Abbildung der Daten innerhalb eines einstellbaren Bereichs. Für \log_2 -transformierte Daten wurde die Einstellung für einen Bereich von -1 bis 1 oder -2 bis 2 eingestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die während dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in drei Themenfelder eingeteilt. In dem ersten Teil wurden Ergebnisse zur Optimierung und Etablierung des Workflows der MS-Probenvorbereitung, der nLC-MS/MS-Messung und der Auswertung aufgeführt. Der zweite und dritte Teil behandelt jeweils die Analysen der zwei verwendeten *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zelllinien XL99 und K1. Im zweiten Teil wurden Daten zur Parentalzelllinie, sowie zu zwei Zelllinien die einen rekombinanten monoklonalen Antikörper (mAb) produzieren, analysiert, wofür Kultivierungs-, Proteom- und Phosphoproteom-Analysen durchgeführt wurden. Der dritte Teil hingegen beinhaltet CHO-K1-Proteomdaten, die aus zur Verfügung gestellten Proben von *fedbatch*- und *batch*-Bioreaktorkultivierungen für diese Arbeit vorbereitet wurden.

4.1. Optimierungsschwerpunkte des Probenvorbereitungs-Workflows

Im Folgenden wurden die für diese Arbeit durchgeführten Experimente aus dem Bereich der MS-Probenvorbereitung, der nLC-MS/MS-Messung und Datenauswertung vorgestellt und diskutiert. Für einen Teil der Experimente war die zur Verfügung stehende Messzeit aufgrund der Abhängigkeit auf externe nLC-MS/MS-Messungen begrenzt. Eine Etablierung eines sensitiven nLC-Orbitrap-Systems am *Center for Biotechnology* (CeBiTec) in Bielefeld wurde im Folgenden beschrieben, worauf ein Großteil der quantitativen Proteomanalysen (siehe 4.2 und 0) basiert.

4.1.1. Evaluierung von entscheidenden Parametern der Probenvorbereitung

Der erste Schritt der Probenvorbereitung für eine MS-basierte Proteomanalytik ist die Probennahme der jeweiligen Zellprobe, was für diese Arbeit die Zellkultur darstellte. Für die Analyse des intrazellulären Phospho-/Proteoms von Suspensionszellen wurden die Zellen zunächst gezählt, eine bestimmte Anzahl an Zellen abgenommen, zentrifugiert, gewaschen und als Pellet bei -80 °C eingefroren.

Hitzeinaktivierung als Ersatz für teure Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

Für den anschließenden Schritt der Proteinextraktion wurde dem ausgewählten Extraktionspuffer standardmäßig PMSF zur Inhibierung von Proteasen und ggf. kommerziell erhältlicher Phosphatase-Inhibitor-Cocktails hinzugefügt. Das Einbringen dieser teils kostspieligen Chemikalien bewirkt jedoch nur eine spezifische und daher unvollständige Inhibierung der unerwünschten degradierenden Enzyme. In der Literatur wird beschrieben, dass diese Zugabe durch eine Hitzebehandlung bei 95 °C für 5 min ersetzt werden kann (Humphrey *et al.* 2018), was im Folgenden für die Anwendung von CHO-Zellen evaluiert werden sollte. Die Hitzebehandlung wurde in ein TE-Puffer-basiertes Protokoll zur Proteinextraktion eingearbeitet, wobei ein Extraktionspuffer-Volumen von 200 µl verwendet und auf den Einsatz von den standardmäßig eingesetzten *glass beads* zum Aufbrechen der Zellen verzichtet wurde. Die vergleichende Durchführung zum standardmäßigen Workflow mit 500 µl Puffervolumen erfolgte jeweils für

2·10⁷ XL99- und mAb-G4 CHO-Zellen. Auf Ebene der Proteinquantifizierung konnte eine halbierte Proteinausbeute für den modifizierten Workflow bestimmt werden. Nach Einsetzen identischer Ausgangsmengen (20 µg) konnte für das standardmäßige TE-Protokoll nach Verdau, Vorbereitung, 40 min interner nLC-MS/MS-Messung und ProteomeDiscoverer (PD)-Auswertung eine Identifizierung von 3.571 und 3.995 Peptiden für XL99 und G4 erfolgen. Die modifizierte Variante führte zu erhöhten IDs von 4.166 und 4.891 Peptiden für XL99 und G4. Es wird vermutet, dass neben der effektiven Inaktivierung der gesamten Enzymaktivität besonders die Volumenreduktion zu den verbesserten Ergebnissen beigetragen hat, weshalb im Folgenden Effekte des Extraktionspuffer-Volumens evaluiert werden sollten.

Eine Puffervolumen-abhängige Proteinausbeute des ansonsten robusten Workflows

Neben der Enzym-Inaktivierung wurde die Notwendigkeit des Austauschs von PBS-basierten Zellwaschpuffer gegen Alternativen, wie TBS, für Phosphoproteom-Analysen in der Literatur beschrieben. Eine mögliche Interaktion von Phosphorylierungen mit PBS könnte zu einer reduzierten Qualität einer anschließenden Phosphoproteom-Analyse führen (Humphrey *et al.* 2018). In einem vergleichenden Ansatz sollte somit dieser sowie weitere Parameter, die möglicherweise einen Einfluss auf die Probenvorbereitung oder auf die Analyse haben, analysiert werden. Als Kontrolle diente der Standard-Workflow mit einer Zellernte von 2·10⁷ mAb-CHO-G4-Zellen und dem Waschen der Zellen in PBS-haltigem Puffer, dem Einfrieren des erhaltenen Pellets in flüssigem Stickstoff, der Proteinextraktion mittels Zugabe von 200 µl TE-Puffer unter Anwendung der Hitzeinaktivierung von Proteasen und Phosphatasen (siehe oben) sowie der Reduktion von Cysteinen und anschließender Alkylierung eines 20 µg-Proteinaliquots über DTT und IAA (Abbildung 12 A a, jeweils dicker Pfeil). Parallel zur Kontrolle wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, für die jeweils ein Parameter im Vergleich zur Kontrolle geändert wurde, darunter der Austausch des Waschpuffers zur Zellernte gegen TBS (Abbildung 12 A b), das Einfrieren der Zellen bei -80 °C (Abbildung 12 A c), das Extrahieren der Proteine mit doppelter und dreifacher Menge TE-Puffer (Abbildung 12 A d und e) und die Lagerung des Zellpellets für ein Jahr bei -80 °C (Abbildung 12 A f). Außerdem wurden für alle sechs Ansätze die Cysteine nach TCEP/CAM-Methode reduziert und alkyliert. Alle darauffolgenden Schritte wurden wieder parallel und für die 12 Ansätze identisch durchgeführt. Der weitere Workflow umfasste den tryptischen Verdau, eine semi-automatische Peptidaufreinigung über Maestro-Säulen in der Resolvex A200-Anlage (siehe 4.1.2), die Peptidkonzentrations-Bestimmung über NanoDrop (siehe Anhang 6.1.1), sowie eine 40 min interne nLC-MS/MS-Messung und eine anschließende Datenauswertung über die PD-Software (Abbildung 12 B).

Über die Proteinquantifizierung via BCA konnten wiederholt Effekte des Puffervolumens auf die Proteinausbeute beobachtet werden. Im Mittel konnte für die vier 200 µl-Ansätze 250 µg Protein

aus $2 \cdot 10^7$ Zellen extrahiert werden. Für die 400 μl - und 600 μl -Ansätze konnten hingegen 4-6-fach mehr Protein erhalten werden. Ein hohe Extraktionseffizienz ist ein wichtiger Parameter besonders für *low-input* Proben und Proben, die vor der MS-Messung angereichert werden, wie zum Beispiel Phosphoproteom-Proben.

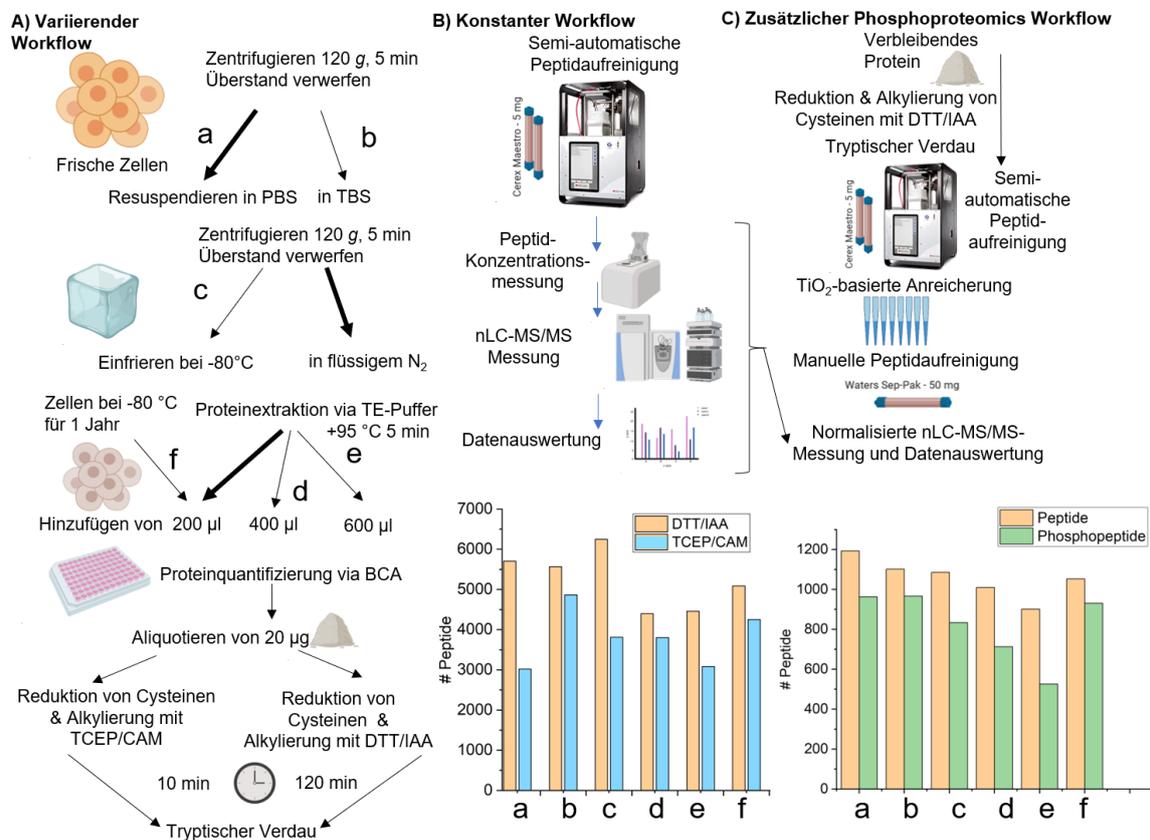


Abbildung 12 A) Variation des Probenvorbereitungs-Workflows und Evaluierung auf Basis identifizierter Peptide (B) und Phosphopeptide (C) über interne nLC-MS/MS-Messungen.

Die Proteom-Messungen der Proben mit standardmäßiger Reduktion von Cysteinen und Alkylierung über DTT und IAA ergab im Mittel der sechs Workflows eine Identifizierung von 5.243 ± 731 Peptiden. Die Verwendung der Zeit-sparenden Methode über TCEP und CAM führte hingegen zu einer deutlich reduzierten mittleren Identifizierung von 3.804 ± 701 Peptiden. Für die Proben der unterschiedlichen Puffervolumina konnte eine leicht erhöhte Anzahl an *missed cleavages* mit steigendem Volumen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund fehlender Replikate können jedoch keine statistisch abgesicherten Aussagen getroffen werden. Die geringen beobachteten Unterschiede lassen insgesamt auf eine Robustheit des Workflows schließen.

Für TE-Puffer-basierte Proteinextraktionen konnte über die TCEP/CAM-Methode deutlich reduzierte Anzahlen an Identifikationen erzielt werden. Bei weiteren Experimenten unter Anwendung einer TFE-basierten Extraktion konnten hingegen deutlich bessere Ergebnisse im

Vergleich zur DTT/IAA-Methode erreicht werden (Daten nicht gezeigt), weshalb die Methode der Reduktion und Alkylierung abhängig vom Extraktionspuffer ausgewählt werden sollte.

Kompatibilität der Phosphopeptid-Anreicherung zum Orbitrap-System

Für eine zusätzliche Analyse von Auswirkungen auf den Phosphopeptid-Anreicherungsworkflow wurden ca. 200 µg der Proben wiederholt über die DTT/IAA-Methode vorbereitet, tryptisch verdaut und für eine TiO₂-PP-Anreicherung eingesetzt (Abbildung 12 C). Die angereicherten PPs wurden anschließend über Sep-Pak-C18-Material manuell aufgereinigt, die Konzentration mit einer NanoDrop-Messung bestimmt und jeweils eine normalisierte Menge an Phosphopeptiden (3,2 µg) über eine 15 min nLC-MS/MS-Methode vermessen. Eine DB-Auswertung ergab eine mittlere Identifizierung von 1.057 ± 98 Peptiden (modifiziert und unmodifiziert) über die sechs Workflows. Durch eine Filterung auf Phosphopeptide konnten im Mittel 822 ± 174 PP identifiziert werden. Über den Vergleich der *missed cleavage*-Verteilungen konnten wiederholt leicht erhöhte Werte für die Proben in höheren Volumina berechnet werden. Es wird vermutet, dass entweder Varianzen in der Proteinquantifizierung durch die höhere Probenverdünnung dazu führten, dass ein zu geringes Verhältnis von Protein zu Trypsin eingesetzt wurde oder, dass die höhere Verdünnung des Enzyms eine geringere tryptische Aktivität bewirkte. In Zukunft könnte diese Variabilität ausgeschlossen werden, indem durch eine Acetonfällung die Arbeit mit einheitlichen Volumina gewährleistet würde. Über ein Herausfiltern der beiden Proben mit erhöhten Extraktionsvolumina konnten stabile Ergebnisse mit einer mittleren Identifizierung von 923 ± 61 PP über einen 15 min Gradienten erzielt werden. Es konnte insbesondere eine stabile Probennahme von Suspensionszellen und eine Robustheit des Workflows evaluiert werden. Aufgrund der hohen Übereinstimmung an identifizierten Phosphopeptiden zwischen dem PBS-, TBS- und -80 °C-basiertem Workflow konnte eine Beeinflussung der Phosphoproteomanalyse durch diese Parameter ausgeschlossen werden. Weiterhin sollte geprüft werden, ob das Einfrieren der vorbereiteten PP-Probe bei -20 °C einen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse hat. Außerdem sollte eine für quantitative Ansätze relevante Gradientenlänge getestet werden. Die wiederholte Messung einer eingefrorenen Peptidprobe über eine 15 min Methode (der in 600 µl TE-Puffer extrahierten Proteine, Abbildung 12 e) lieferte vergleichbare Ergebnisse zu der Messung der frischen Probe (592 bzw. 526 identifizierte PP, siehe Abbildung 12 C). Durch die Auftrennung und Messung über einen 60 min Gradienten konnten 1.935 PP identifiziert werden. Über diese vierfache Erhöhung der Trenn- und Messzeit konnten ca. 3,3-fach mehr Phosphopeptide identifiziert werden, so dass eine Skalierbarkeit des Workflows in diesem Bereich gezeigt werden konnte. Außerdem konnte eine generelle Kompatibilität des Phosphopeptid-Anreicherungsworkflows mit dem *set-up* der nLC, inklusive Ionisierung über Stahlemitter in der Nanospray Flex™-Quelle und Weiterleitung der Ionen über die duale ESI/MALDI *funnel*-Konstruktion sowie der Orbitrap-basierten MS/MS-Messung gezeigt werden (siehe auch 4.1.4).

4.1.2. Semi-automatische Peptidaufreinigung

Eine zuverlässige *high-throughput* Datengenerierung ist in vielen *omics*-Untersuchungen zu einer wesentlichen Anforderung geworden. In *Proteomics* besteht der Workflow für die Probenvorbereitung aus vielen Schritten, wobei der Probe mit jedem weiteren manuellen Schritt mehr *bias* hinzugefügt wird. Insbesondere für LFQ-Experimente behindert dies eine reproduzierbare Quantifizierung von Peptiden bzw. Proteinen (siehe 1.3.1). Um dem Ziel einer Automatisierung der Probenvorbereitung näher zu kommen, wurde eine auf dem Prinzip des Überdrucks-basierende Workstation während dieser Arbeit evaluiert und ein Teil dieser Experimente publiziert (Schelletter *et al.* 2021).

Für eine Methodenetablierung wurden extrahierte Proteine einer CHO-K1 Vorkultur verdaut, unter Verwendung der neuen semi-automatischen Probenvorbereitungsvorrichtung Resolvex® A200 aufgereinigt und mittels interner nLC-MS/MS-Messungen vermessen. Die Materialien Maestro® und WWP2® sind in herkömmlichen CereX®- und im Zweikammer-NBE™-Design erhältlich und wurden mit den standardmäßig verwendeten Sep-Pak® C18-Kartuschen über drei Versuchsansätze verglichen und evaluiert (Abbildung 13). Das Zweikammer-System basiert auf einem Lufteinschluss zwischen zwei Membranen, was eine Probenvorbereitung auf der oberen Membran inklusive tryptischen Verdau ermöglicht und die erhaltenen Peptide ohne Probenverluste (durch weitere Pipettier-Schritte) aufgereinigt werden können. Der erste Versuchsaufbau wurde verwendet um die zwei neuen Materialien innerhalb der automatisierten Vorrichtung mit der manuellen Reinigung von Peptiden mittels Sep-Pak-Kartuschen zu vergleichen (Abbildung 13 A). Im zweiten Aufbau wurden die zwei neuen Materialien direkt mit Sep-Pak innerhalb der automatisierten Vorrichtung verglichen (Abbildung 13 B). Parallel dazu wurden herkömmliche CereX- (10 mg Bettmasse) und Zweikammer-NBE- (5 mg Bettmasse) WWP2-Kartuschen verglichen. Im dritten Aufbau wurde die Probenvorbereitung einschließlich Reduktion und Alkylierung von Cysteinen und tryptischen Verdau unter Verwendung des Zweikammer-Designs auf der Membran der NBE-Säulen durchgeführt (Abbildung 13 C).

Bei einer Veränderung des Workflows im Zusammenhang einer sensitiven nLC-MS/MS-Messung muss zum Beispiel das Einbringen von *leachables* und mit der LC-MS-Strecke interferierenden Substanzen beachtet bzw. verhindert werden. Solche herauslösbaren Stoffe sind ein bekanntes Problem der Umkehrphasenreinigung von pharmazeutisch relevanten Proteinen (Pettersson *et al.* 2007). Das Einbringen solcher Stoffe sollte jedoch auch für Proteom-basierte Arbeitsabläufe im Hinblick auf eine mögliche Beschädigung des teuren Säulenmaterials, einer Ionensuppression oder der Kontamination empfindlicher und kostenintensiver MS-Komponenten überprüft und vermieden werden (Keller *et al.* 2008; Rardin 2018). Um eine Bewertung für die hier getesteten Materialien WWP2 und Maestro zu ermöglichen, wurden die beiden neuen Materialien zusätzlich mit Leerproben beladen, nach dem Peptidaufreinigungs-Protokoll eluiert und anschließend vermessen.

In den parallel zu dem ersten Ansatz (Abbildung 13 A) durchgeführten Messungen konnten weder im UV-, im *Total Ion Chromatogramm* (TIC) noch über eine DB-Suche störende Komponenten beobachtet werden, weshalb das Material ohne Einschränkungen zur Probenvorbereitung einer sensitiven nLC-MS/MS-Messung verwendet werden konnte. Der semi-automatische Workflow mit der Resolvex A200-Workstation und den beiden neuen Materialien führte zu hoch reproduzierbaren Ergebnissen innerhalb von 10 bis 300 µg Peptid-Ausgangsmaterial (Abbildung 13 D-F).

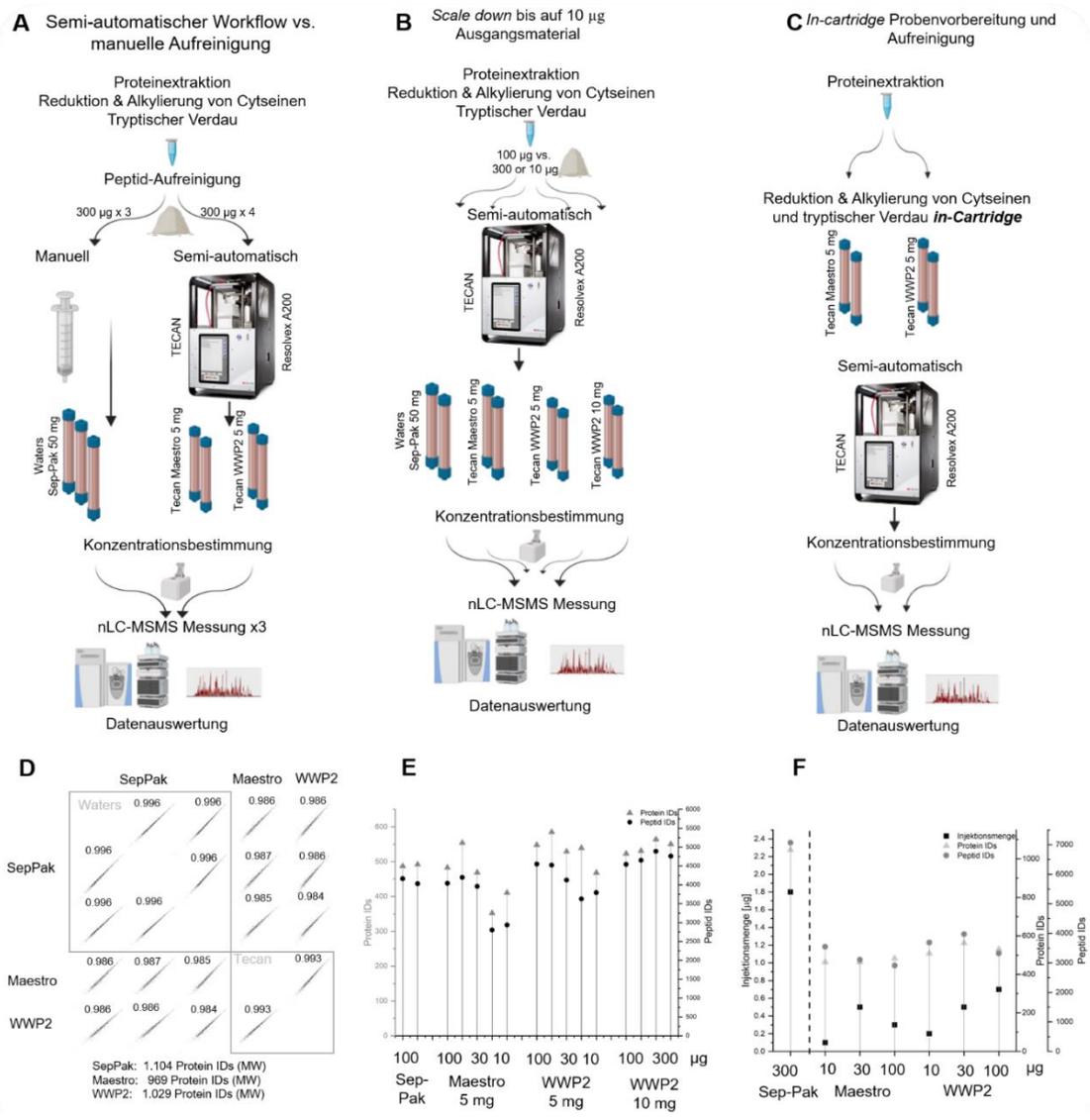


Abbildung 13 Die Workflows und Ergebnisse der Resolvex A200-Systemevaluierung für die semi-automatische Peptidaufreinigung. **A)** Ein Vergleich von manueller und semi-automatischer Peptidaufreinigung. **B)** Das Einfügen des standardmäßig-verwendeten Sep-Pak-Materials in den semi-automatischen Workflow und ein Vergleich des CereX- und Zweikammer-NBE-Materials. **C)** Eine *in-Cartridge* Probenvorbereitung innerhalb des Zweikammer-Systems der NBE-Säulen. **D)** LFQ-quantifizierte Proteine des Versuchsaufbaus A) in einem *multi-scatter* Diagramm einschließlich Pearson-Korrelationskoeffizient. **E)** Identifizierte Peptide und Proteine für den Versuchsaufbau B) mit unterschiedlicher Menge an eingesetztem Ausgangsmaterial für die verglichenen Materialien und Säulentypen. **F)** Anzahl der Identifikationen für die *in-Cartridge* Probenvorbereitung und Aufreinigung mittels Zweikammer NBE-Materialien. Für eine Interpretation der Daten ist hier außerdem die deutlich unterschiedliche Peptid-Injektionsmenge abgebildet.

Die neuen Materialien und die Verwendung der Resolvex A200-Workstation führten zu Orbitrap-basierten Peptidmessungen mit hohen Pearson Korrelationskoeffizienten von 99,3 % technischer Triplikate (Abbildung 13 D). Der Kontrollworkflow erfolgte über eine manuelle Aufreinigung mit Sep-Pak-Material in Triplikaten auf Ebene der Aufreinigung und der Messung und erbrachte ebenfalls hohe Korrelationskoeffizienten von im Mittel 99,6 %. Es konnten nur sehr geringe Unterschiede in den Anzahlen identifizierter Proteine der drei unterschiedlichen Materialien festgestellt werden.

In einem *scale down* Versuch wurde die *recovery* der Peptide von den unterschiedlichen Materialien und Säulenformaten getestet, da geringe Probenverluste besonders für *low-input* Proben essentiell ist (Humphrey *et al.* 2018; Satpathy *et al.* 2020). Es konnte eine stabile Identifizierung von Peptiden und Proteinen für Proben evaluiert werden, die ausgehend von 300 µg, 100 µg und 30 µg (jeweils über Maestro und WPP2) vorbereitet wurden. Lediglich für die 10 µg-Maestro-basierte Probe wurden deutlich geringere IDs erreicht, wobei eine fehlende Normalisierung dieser Messung auf die Peptidmenge vermutlich zu der Reduktion der IDs führte. Für die 10 µg-WPP2-basierte Probe erfolgte eine normalisierte Injektion von 1 µg, was zu nur geringen Reduzierungen der IDs im Vergleich zu der 300, 100 und 30 µg-basierten Proben führte. Die ebenfalls evaluierten Zweikammer-Säulen mit WPP2 und Maestro-Material wurden mit je 100 und 300 µg Ausgangsmaterial getestet und führten zu hohen IDs (Abbildung 13 E),.

Erste Tests für eine im Folgenden bezeichnete *in-cartridge*-basierte Probenvorbereitung und Aufreinigung führten zu reproduzierbaren Ergebnissen, jedoch zu reduzierten IDs (Abbildung 13 F). Im Vergleich zur manuellen Aufreinigung über Sep-Pak wurde jedoch eine 3-16-fach verringerte Peptidmenge in die nLC-MS/MS-Strecke injiziert. Für diese Methodik wurden die frisch-verdauten Peptide außerdem auf das trockene Säulenmaterial geladen und gebunden, so dass eine geringere *recovery* der Peptide durch eine fehlende Konditionierung und Äquilibration des NBE-Säulenmaterials möglich war. In weiteren Experimenten könnte die Konditionierung und Äquilibration entweder vor der Probenbeladung, also vor dem tryptischen Verdau durchgeführt werden bzw. eine Notwendigkeit dessen über einen direkten Vergleich evaluiert werden. Weiterhin könnten Parameter, wie Dehydratisierung, das verwendete Arbeitsvolumen sowie die Inkubationstemperatur und Inkubationszeit optimiert werden. Insgesamt scheint dies vielversprechend, da eine geringere Anzahl manueller Schritte auch das Kontaminationsrisiko mit menschlichen Proteinen senkt. Im Gegensatz zu fünf manuellen Pipettierschritten ist über die Resolvex-Anlage nur noch die Probenbeladung manuell durchzuführen. Außerdem erlaubt der Workflow im 96-*well* Format die Prozessierung von ca. 4,8-fach mehr Proben parallel im Vergleich zu dem verwendeten Standard-Vakuumgerät.

Insgesamt ergibt sich somit eine deutliche Zeitersparnis unter hoch-reproduzierbaren Bedingungen. Der neue Workflow lieferte ebenso gute Ergebnisse, wie der routinemäßig durchgeführte manuelle Workflow (mit Sep-Pak-Material) mit ähnlicher technischer Variabilität in der MS/MS-basierten

Identifizierung von Peptiden und Proteinen. Für den getesteten Bereich an Ausgangsmaterial (10-300 µg) konnten keine Unterschiede zwischen dem herkömmlichen Cerex und dem Zweikammer-System ermittelt werden, weshalb dieser simple Workflow sofort einsatzfähig war und im Folgenden für die Analyse einer 12-tägigen *fedbatch*- und 7-tägigen *batch*-Bioreaktorkultivierung eingesetzt wurde (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Für eine Etablierung der *in-cartridge*-basierten Probenvorbereitung und Aufreinigung wären hingegen weitere, jedoch vielversprechende Optimierungen notwendig.

4.1.3. Methodenetablierung für ein sensitives nLC-Orbitrap MS-System

Nach zunächst nur externen sensitiven nLC-MS/MS-Messungen für globale quantitative Phospho- und Proteom-Experimente (siehe Abbildung 16 A und B) wurde im August 2018 ein nLC-Orbitrap Q Exactive Plus MS/MS-System am CeBiTec angeschafft. Nach einer Schulung und ersten Tests wurde die standardmäßig verbaute *S-lens* gegen eine *funnel*-Konstruktion für eine duale ESI/MALDI-Quelle der Firma Spectrograph LL getauscht. Sowohl die Ion Max API-Quelle zur externen MS-Kalibrierung als auch die Nanospray Flex™-Quelle für eine Ionisierung der mittels nLC aufgetrennten Peptide konnte vor die *funnel*-Konstruktion der Firma Spectrograph LL angebracht werden (siehe Anhang Abbildung 39). Ein Vergleich der beiden *funnel*-Typen erfolgte über eine Messung eines identischen SILAC-basierten Probensets mit *funnel*-Konstruktion der dualen ESI/MALDI-Quelle sowie mit standardmäßig verbauter *S-lens* nach entsprechendem Umbau (Tabelle 2).

Tabelle 2 Vergleich der nLC-MS/MS-Messung mit *funnel*-Konstruktion für die duale ESI/MALDI-Quelle von der Firma Spectrograph LL zu der standardmäßig verbauten *S-lens* von Thermo Fisher Scientific. Über eine MaxQuant-basierte LFQ-Auswertung wurden jeweils die Anzahl an quantifizierten Proteinen zwischen den Proben verglichen.

Messung	# Proteine Spectrograph	# Proteine S-lens
Intensität 240-1	856	975
Intensität 240-2	793	893
Intensität 240-3	911	1043
Intensität 240-4	824	919

Im Mittel konnten über die *funnel*-Konstruktion für die duale ESI/MALDI-Quelle 846 ± 50 und über die *S-lens* 958 ± 65 Proteine quantifiziert werden. Da der Umbau umständlich und durch einen *bakeout*-Vorgang von mindestens 12 h auch sehr zeitintensiv ist, musste die hier evaluierte Reduktion an IDs von ca. 14 % angenommen werden. Über einen Vergleich der Pearson Korrelationskoeffizienten konnten jedoch keine Unterschiede innerhalb der Probensets ermittelt werden, so dass keine negativen Auswirkungen auf Proteomanalysen vermutet wurden. Alle intern gemessenen Datensätze für quantitative Phospho/Proteomanalysen basieren auf der dualen ESI/MALDI-Quelle (siehe 4.2.2.3, 0 und 0).

Als Qualitätskontrolle der gesamten nLC-MS/MS-Strecke wurde in regelmäßigen Abständen ein kommerziell erhältlicher HeLa *Protein Digest Standard* injiziert, aufgetrennt und vermessen. Die Messungen des HeLa-Standards wurden über die PD-Software ausgewertet (Abbildung 14). Zu Beginn erfolgte dafür eine Injektion von 200 ng HeLa-Probe mit teils variierenden nLC-Gradienten (Abbildung 14 A). Um die Sensitivität besser beurteilen zu können, wurde im weiteren Verlauf eine Injektion von 50 ng HeLa mit standardisiertem 40 min nLC-Gradient zur Qualitätskontrolle durchgeführt (Abbildung 14 B).

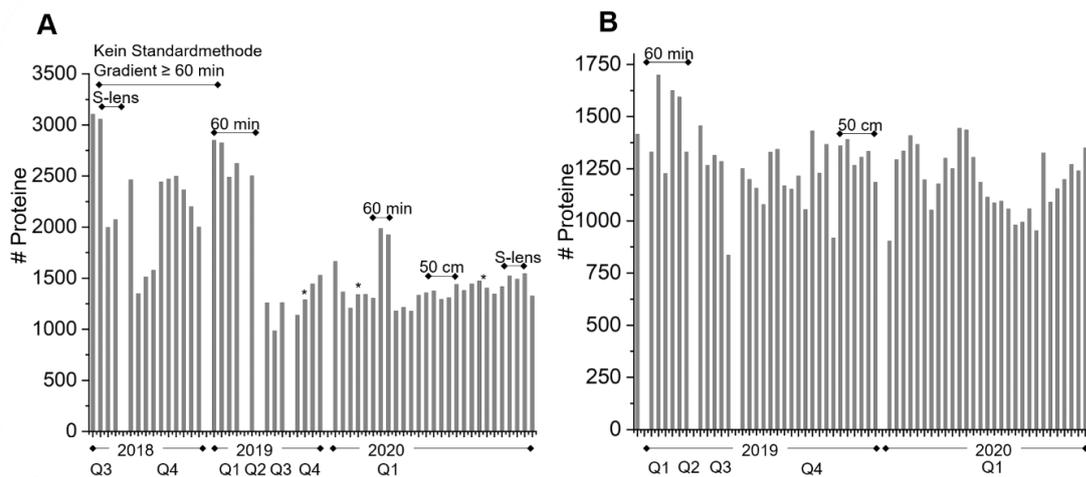


Abbildung 14 Anzahl der identifizierten Proteine aus der nLC-MS/MS-Messung von kommerziell erhältlichen HeLa-Standards für die Injektionsmengen 200 ng (A) und 50 ng (B) über den Zeitraum von 2018-2020, wobei die einzelnen Quartale (Q) markiert sind. Standardmäßig wurde die Peptidprobe mit einem 40 min nLC-Gradienten über eine 25 cm Hauptsäule getrennt und über die duale ESI/MALDI-Quelle ionisiert. Änderungen diesbezüglich wurden entsprechend gekennzeichnet. Außerdem wurden die nLC-MS/MS-Messungen, die direkt nach dem Absättigen einer neuen Hauptsäule durchgeführt wurden markiert (*).

Nach anfänglicher Mess- und Methodenetablierung konnte die Vermessung einer 200 ng HeLa-Peptidprobe über eine 40 min Standardmethode im ersten Quartal von 2020 eine stabile Identifizierung von im Mittel 1.371 ± 116 Proteinen führen. Mit Ausnahme der Messungen über eine 50 cm Hauptsäule bzw. über eine 60 min Methoden konnte für die gesamten 50 ng HeLa-Messungen eine Identifizierung von 1.207 ± 116 erreicht werden. Über die Vermessung dieser geringen Peptid-Mengen konnte ein frühzeitiger Qualitätsverlust, wie zum Beispiel in der zweiten Hälfte des ersten Quartals 2020, detektiert werden und eine neue Säule (Abbildung 14 A) eingesetzt werden.

Auswirkungen der nLC-MS/MS-Methodenparameter

Zwischen der Anzahl an identifizierten Peptiden und der verwendeten Gradientenlänge herrscht unter bestimmten Bedingungen ein Zusammenhang, wobei ein längerer Gradient tendenziell zu höheren IDs führt. Dieser Zusammenhang wird zum Beispiel gestört, wenn der Gradient zu lang angelegt wird und die Elution einer bestimmten Peptidspezies über einen zu langen Zeitraum

verdünnt wird. Die am MS ankommende Ionenintensität unterschreitet dann wohlmöglich das *Automatic Gain Control* (AGC) Target, weshalb für solche *precursor* keine MS/MS-Messung erfolgt und diese somit nicht zur DB-abhängigen Identifizierung zur Verfügung stehen. Bei einem zu kurzen Gradienten sind die MS1-Spektren so komplex, dass innerhalb der Elutionszeit der Peptide nicht für alle *precursor* MS/MS-Spektren aufgenommen werden können und so nur die intensivsten *precursor* fragmentiert und später identifiziert werden können. Für eine empirische Analyse zur Variierung des nLC-Gradienten und ausgewählter MS-Parameter auf die Anzahl identifizierter Peptide und Proteine wurde eine komplexe verdaute Gesamtproteomprobe der CHO-K1-Zelllinie verwendet, wobei die cytosolischen Proteine mittels TE-Puffer und einer *glass beads*-Methode extrahiert wurden. Die wiederholten Messungen mit verschiedenen nLC-MS/MS-Methoden wurden anschließend über parallele DB-Suchen in PD ausgewertet. Die standardmäßig verwendete Methode umfasste eine Injektion von 1 µl (entsprechend 2,3 µg Peptid), ein 40 min nLC-Gradient, eine Ionen Injektionszeit von maximal 100 ms, ein AGC Target von 200.000 und eine *dynamic exclusion* von 60 s. Diese ausgewählten Parameter wurden innerhalb von 14 Messungen variiert und die Ergebnisse der Auswertung zusammengefasst (Tabelle 3).

Tabelle 3 Ergebniszusammenfassung der ProteomeDiscoverer-basierten Auswertung von Daten, welche über verschiedenen nLC-MS/MS-Methoden gemessen wurden. Die Tabellen-Sortierung erfolgte nach zunehmender Protein-ID.

Nr	Injektionsmenge [µg]	Gradientenlänge [min]	Max. IT [ms]	AGC Target	Dynamic exclusion [s]	# Proteine	# Peptide	# PSM	# MS/MS-Spektren
1	2,3	40	100	200000	60	1037	4761	6880	19687
4	4,6	40	100	200000	60	1085	4956	7274	21054
5	4,6	60	100	200000	60	1487	6289	7992	29487
2	2,3	60	100	200000	60	1516	6818	8409	28120
12	1,15	180	400	200000	60	1577	7689	12396	29965
15	2,3	180	400	200000	60	1612	7890	13446	33694
11	1,15	180	400	200000	60	1623	7840	12756	31005
13	2,3	180	200	500000	60	1673	8079	13924	43497
14	2,3	180	300	200000	60	1737	8338	14061	29185
9	2,3	180	200	1000000	60	1770	8413	14363	46110
7	2,3	180	100	200000	60	1772	8284	14864	61123
8	2,3	180	200	200000	120	1782	7737	10788	43127
6	4,6	120	100	200000	60	1795	8272	11815	49153
10	2,3	180	200	200000	60	1803	8527	14762	48326
3	2,3	120	100	200000	60	1919	9088	12343	48626

Im Vergleich zur Kontrollmethode (Nr.1) führte eine Erhöhung des Gradienten um 50 % auf 60 min (Nr. 2) zu ca. plus 50 % Protein IDs. Eine Verdreifachung des Gradienten auf 120 min (Nr. 3) führte mit einem plus von ca. 85 % zu dem besten Ergebnis dieses Experiments. Durch identische Parameter und eine weitere Erhöhung des Gradienten auf 180 min (Nr. 7) konnte keine Steigerung der IDs bewirkt werden, was das Anpassen von MS-Parametern notwendig machte. Eine Erhöhung

der Injektionszeit auf maximal 200 ms mit einem 180 min Gradienten (Nr. 10) konnte hingegen zu ähnlich guten Ergebnissen im Vergleich zum 120 min-Gradienten führen. Eine weitere Erhöhung der IT auf maximal 300 ms (Nr. 14) führte zu leicht reduzierten, aber akzeptablen Ergebnissen. Für die Erhöhung der IT auf 400 ms (Nr. 15) konnten hingegen deutlich reduzierte IDs bestimmt werden. Das Erhöhen des AGC Targets auf 1.000.000, 5.000.000 oder die Erhöhung der *dynamic exclusion* von 60 auf 120 s für die 180 min Methode (Nr. 9, 13 bzw. 8) führte zu leicht reduzierten Ergebnissen. Die Variation des Injektionsvolumens von 0,5 – 2 µl (entsprechend 1,15 – 4,6 µg) erzielte keine deutlichen Unterschiede.

Insgesamt konnte für diese TE-Puffer-basierte CHO-K1-Peptidprobe die höchste Anzahl an IDs unter Verwendung eines 120 min nLC-Gradienten unter den standardmäßig verwendeten Parametern (Injektion von 2,3 µg, IT von 100 ms, AGC Target von 200.000 und DE von 60 s) bestimmt werden. Eine weitere Erhöhung der Gradientenlänge von 120 min auf 180 min führte zu keinen Verbesserungen, auch nicht durch Anpassung der beschriebenen MS-Parameter. Eine weitere Erhöhung der Identifizierungen auf Peptid- (und Protein-) Ebene konnte durch die Verwendung einer längeren Trennsäule von 50 cm (anstelle 25 cm) in unabhängigen Experimenten ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Auswirkungen der Messmethodik auf quantitative Daten

Im Folgenden wurden die Auswirkungen von unterschiedlichen MS-Messmethoden auf die Anzahl an Identifizierungen und Quantifizierungen analysiert. Dafür wurde ein LFQ-basiertes Probenet, bestehend aus vier biologischen Replikaten und zwei zu vergleichenden Zuständen ausgewählt, extern über zwei verschiedene MS-Messmethoden vermessen und die Methodiken und Ergebnisse im Folgenden verglichen (Tabelle 4). Die jeweilige nLC-Trennung der Peptide erfolgt mit identischem Injektionsvolumen und nach identischer Methode über 120 Minuten.

Tabelle 4 Zwei Orbitrap-MS-Messmethoden im Vergleich für eine LFQ-basierte Proteomanalytik. Die Unterschiede sind jeweils farblich gekennzeichnet.

Q Exactive Plus Methode	Messung 1	Messung 2
OVERALL METHOD SETTINGS		
<i>Global Settings</i>		
<i>Use lock masses</i>	<i>Best</i>	<i>Best</i>
<i>Chrom. peak width (FWHM)</i>	15 s	15 s
<i>Time</i>		
<i>Method duration</i>	155 min	155 min
Experiment		
<i>FULL MS / DD-MS² (TOPN)</i>		
<i>General</i>		
<i>Runtime</i>	0 to 155 min	0 to 155 min
<i>Polarity</i>	<i>Positive</i>	<i>Positive</i>
<i>In-source CID</i>	0.0 eV	0.0 eV
<i>Default charge state</i>	2	2

Full MS		
Microscans	1	1
Resolution	140000	70000
AGC target	3,00E+06	3,00E+06
Maximum IT	100 ms	100 ms
Number of scan ranges	1	1
Scan range	375 to 1675 m/z	375 to 1675 m/z
Spectrum data type	Profile	Profile
dd-MS² / dd-SIM		
Microscans	1	1
Resolution	17500	17500
AGC target	2,00E+05	1,00E+05
Maximum IT	50 ms	100 ms
Loop count	20	10
MSX count	1	1
TopN	20	10
Isolation window	1.4 m/z	1.6 m/z
Isolation offset	0.0 m/z	0.0 m/z
Scan range	200 to 2000 m/z	200 to 2000 m/z
(N)CE / stepped (N)CE	nce: 28	nce: 28
Spectrum data type	Profile	Profile
dd Settings		
Minimum AGC target	5,00E+03	8,00E+03
Intensity threshold	1,00E+05	8,00E+04
Charge exclusion	unassigned, 1, 7, 8, >8	unassigned, 1, 7, 8, >8
Peptide match	Preferred	Preferred
Exclude isotopes	On	On
Dynamic exclusion	45 s	45 s
If idle ..	do not pick others	do not pick others

Im Vergleich zu Messung 1 wurde für Messung 2 mit einer reduzierten Auflösung von 70.000 im *full MS* gemessen. Außerdem wurde mit reduziertem AGC Target im dd-MS², dafür einer erhöhten maximalen Injektionszeit (*Injection Time*, IT) von 100 ms und einer erniedrigten TopN von 10 gemessen. Zusätzlich wurde das Isolierungsfenster geringfügig erhöht, sowie das minimale AGC *Target* für die Auswahl der zu fragmentierenden Vorläuferionen erhöht und der Intensitätsgrenzwert leicht reduziert. Nach DB-Auswertung mit der MaxQuant- und Perseus-Software (Version 1.6.10.43) konnten deutliche Unterschiede in der mittleren Intensität mit $7,1 \pm 0,8 \cdot 10^7$ für Messung 1 und $20,5 \pm 2,3 \cdot 10^7$ für Messung 2 festgestellt werden, so dass ein direkter Vergleich der von der Software berechneten LRFQ *intensity* zwischen den Messmethoden nicht möglich war. Ein relativer Vergleich der zwei Zustände sollte jedoch gegeben sein und wird im Folgenden weiter diskutiert (siehe 4.2.1). Die Verringerung der Methode von Top20 zu Top10 mit gleichzeitiger Verdopplung der maximalen IT führte über eine qualitative Verbesserung der MS/MS-Spektren zu einer erhöhten Anzahl an quantifizierten Proteinen von 2.126 ± 208 für Messung 2 im Vergleich zu 1.878 ± 57 für Messung 1. Wie durch den Methodenvergleich zuvor

evaluiert, würde eine weitere qualitative Verbesserung durch Erhöhung der maximalen IT der MS/MS-Spektren wahrscheinlich nicht zu einer weiteren Erhöhung der IDs führen. Je nach Komplexität und Intensität der Peptide einer Probe konnte über die Anpassung der Messmethode eine Verbesserung der quantitativen Auswertung gezeigt werden.

4.1.4. Phosphoproteom-Messungen über verschiedenen Massenspektrometer

Vor der Anschaffung einer sensitiven nLC-MS/MS-Strecke der Universität Bielefeld wurde die Messung von Phosphoproteom-Proben an verschiedenen Massenspektrometern getestet. Für den Vergleich wurden Proben des SILAC-Experiments zur HPI4-Induktion verwendet, wobei vier biologische Replikate der CHO-Zelllinien XL99, G4 und E3 kultiviert wurden (siehe Abbildung 16 B). Es wurden jeweils Proteine von Zellproben 15 min nach HPI4-Induktion und der Kontrollkultivierung extrahiert und für den SILAC-Probenvorbereitungsworkflow vereint. Ausgehend von 270 µg verdautem Protein wurde eine TiO₂-basierten PP-Anreicherung durchgeführt, die Elution auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Die PP-Probensets der Zelllinie XL99 und G4 (basierend auf einer Anreicherung aus ca. 90 µg Ausgangs-peptidmenge) wurden jeweils verschickt und von Geräte-Experten über die Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) und über das Impact II (Bruker) vermessen. Einige Zeit später konnte ein PP-Probenset der Zelllinie E3 über eine Orbitrap Fusion Lumos Tribrid-Massenspektrometer in Düsseldorf vermessen werden.

Die erhaltenen Rohdaten von Bruker (BAF-Format, .d) konnten nur mit einer älteren MaxQuant (MQ)-Version (1.5.7.4) analysiert werden. Die Thermo-Rohdaten (.raw) wurden mit der MQ-Version 1.6.0.1 analysiert. Da in der Literatur eine Verdopplung der PP-Identifizierung unter Verwendung des *Match-Between-Run* (MBR)-Algorithmus beschrieben wird (Humphrey *et al.* 2018), wurden die Daten jeweils mit Aktivierung des MBR-Algorithmus getrennt in MQ analysiert. Die erhaltenen Tabellen wurden anschließend in Perseus (Version 1.6.0.7) verglichen. Die Messungen und Auswertung der Datensets der drei verschiedenen Massenspektrometer sollten im Folgenden verglichen werden (Tabelle 5 und Tabelle 6). Die Probensets von XL99 und G4 über die Q Exactive Plus und Impact II wurden jeweils über einen 120 min nLC-Gradienten aufgetrennt und bei einer Auflösung von 140.000 im *full*-MS und einer maximalen IT von 200 ms gemessen, wobei für die Orbitrap-Messung nur ca. die Hälfte der Probe injiziert wurde.

Tabelle 5 Vergleich der Messmethoden für Phosphoproteom-Proben über die verschiedenen Massenspektrometer Q Exactive Plus, Impact II und Fusion Lumos.

MS	Sets	# Proben	nLC-Gradient	MS/MS-Methode	Injektionsvolumen
Q Exactive Plus	XL99, G4	8	120	140k, IT 200 ms	5
Impact II	XL99, G4	8	120	140k, IT 200 ms	9
Lumos	E3	4	120	SILAC, 120k IT 300 ms	5

Aus den MQ-basierten *PhosphoSite*-Tabellen wurden parallel potentielle Kontaminanten, *reversed hits* und Phosphorylierungsstellen (*P-sites*) mit einer Lokalisierungswahrscheinlichkeit von über 70 % über die Perseus-Software herausgefiltert. Da die MQ-Software mögliche di- und triphosphorylierte Peptide für die Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen mit einbezieht, wurden die Daten über die Funktion ‚*Expand site table*‘ zusammengefasst und für mindestens drei von acht validen Werten gefiltert. Über die Daten der Q Exactive Plus-Messungen konnten 3.291 Phosphorylierungsstellen sicher quantifiziert werden, die Impact II-Messung und Auswertung führte hingegen nur zu 1.310 sicher quantifizierten Phosphorylierungsstellen (Tabelle 6). Eine Statistik-Berechnung über einen Einstichproben t-Test für die Evaluierung von HPI4-abhängigen Effekten über die SILAC-Ratios und über einen Zweistichproben t-Test zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Zelllinien ergab für die Thermo-Daten 464 und 342 signifikant regulierte *P-sites* für XL99 und G4, sowie 230 signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien. Entsprechend der reduzierten Ausgangsdatenmenge konnten für die Bruker-Messungen weniger signifikante Hits mit 93 und 113 für XL99 und G4, sowie 58 Unterschiede ermittelt werden. Trotz sehr ähnlicher Methodik konnten über die Orbitrap im Mittel 2.674 ± 123 PPs und über das Q-ToF hingegen nur 985 ± 267 PPs pro Probe quantifiziert werden. Diese Daten haben zur Entscheidung der Anschaffung einer Q Exactive Plus der Firma Thermo Fisher Scientific am CeBiTec beigetragen.

Tabelle 6 Vergleich von Phosphoproteom-Messungen über die verschiedenen Massenspektrometer Q Exactive Plus, Impact II und Fusion Lumos Die erhaltenen Datensets wurden einzeln über verschiedene MaxQuant (MQ)-Versionen ausgewertet und in Perseus statistisch evaluiert. Signifikant HPI4-abhängige regulierte Hits wurden über einen Einstichproben t-Test (*p-value* < 0,05) für XL99 und G4 bzw. E3 berechnet und differentiell regulierte Hits über einen Zweistichproben t-Test (*p-value* < 0,05) für XL99 vs. G4.

MS	Mittlere Quan. P-sites	# Quan. P-sites (min. 1 x)	# Quan. P-sites (min. 3 x)	Sig. reguliert XL99 und G4 bzw. E3	Differentiell reguliert XL99 vs. G4
Q Exactive Plus	2674 ± 123	3897	3291	464, 342	230
Impact II	985 ± 267	2771	1310	93, 113	58
Lumos	3539 ± 155	5085	3225	484	NaN

Über eine Vermessung des vergleichbaren CHO-E3-Probensets über das Lumos Fusion Tribrid-MS konnten im Mittel 3.539 ± 155 PP pro Probe quantifiziert werden, wobei die Verwendung einer SILAC-spezifischen DDA-Messung eine methodische Besonderheit darstellte. Dabei wurde der jeweils intensivere SILAC-*precursor* (*light* oder *heavy*) zur Fragmentierung eingesetzt und der entsprechend zweite *precursor* des Peakpärchens über die Angabe der Massendifferenz für eine Fragmentierung ausgeschlossen. Die Komplexität der Probe war somit im Vergleich zu den Messungen an Q Exactive Plus oder Impact II potentiell halbiert, was neben der verbesserten Sensitivität und Geschwindigkeit des Geräts ebenfalls zu den verbesserten Ergebnissen beigetragen hat. Trotz Bemühungen konnte dieses neue Software-Feature nicht in die vorhandene Gerätesteuerungs-Software am CeBiTec nachgerüstet werden.

Ein Vergleich der verschiedenen *setups* über den Pearson Korrelationskoeffizienten der PP-Intensitäten (aus der *modified peptides*-Tabelle des MQ-outputs) führte zur mittleren Korrelation der biologischen Replikate von $0,67 \pm 0,10$ für die Impact II-Messung. Im Gegensatz dazu konnte ein mittlerer Pearson Korrelationskoeffizient von $0,86 \pm 0,04$ für die Q Exactive Plus-Messung und $0,84 \pm 0,06$ für die Fusion Lumos-Messung bestimmt werden. Im Vergleich dazu konnte über ein 2015 publiziertes EasyPhos-Protokoll (Humphrey *et al.* 2015a) nur ein mittlerer Korrelationskoeffizient von 0,88 für technische Replikate ermittelt werden (Humphrey *et al.* 2018). Für die biologischen Replikate der CHO-Zellkultur aus der exponentiellen Phase und dem hier verwendeten Workflow konnte somit eine hohe Reproduzierbarkeit ermittelt werden. Eine optimierte Version des EasyPhos-Workflows wurde 2018 publiziert, wofür eine mittlere Korrelation von 0,95 für technische Replikaten beschrieben wurde (Humphrey *et al.* 2018). Insgesamt wird trotz der vergleichsweise guten Ergebnisse Potential in der Optimierung des hier verwendeten *Phosphoproteomics*-Workflows, vor allem hinsichtlich des verwendeten Extraktionspuffers, vermutet, weshalb teilweise ein SDC-basierter Puffer für folgende Experimente angewendet wurde (siehe 4.2.3.2).

Nach Anschaffung des Orbitrap-Systems in Bielefeld sollte zunächst eine vergleichende Messung der parallel zu den verschickten Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben erfolgen. Ein Vergleich nach Messung eines biologischen Replikats eines E3-Probensets wurde über ProteomeDiscoverer auf Basis von identifizierten Phosphopeptiden durchgeführt. Im Vergleich zu den über die Q Exactive Plus-Messungen identifizierten PP (2.674 ± 123 über 120 min) konnten über eine interne 60 min nLC-MS/MS-Methode und dualer ESI/MALDI-Quelle 2.018 PP identifiziert werden. Die gering reduzierte Anzahl an Phosphopeptiden wurde durch die reduzierte Trenn- und Messzeit begründet, weshalb das erworbene und etablierte *setup* an der Universität Bielefeld für Phosphoproteom-Analysen als geeignet erachtet wurde.

4.1.5. Datenbanken für CHO-Zellen

Die Auswahl einer geeigneten Datenbank stellt einen entscheidenden Faktor der MS-basierten Proteomforschung dar und sollte daher für die Analyse von CHO-Proben evaluiert werden. Die für die Publikationen verwendete kombinierte Datenbank von *C. griseus* und *M. musculus* (von Dezember 2017) (Schelletter *et al.* 2019; Schelletter *et al.* 2021) wurde mit aktuelleren Versionen der UniProt/TrEMBL- und NCBI-Datenbanken von 2020 (siehe 1.5.2) verglichen. Die während dieser Promotion neu publizierten Protein-Datenbanken sollten anhand des in Abschnitt 4.3.2 analysierten Probensets der CHO-K1 Bioreaktorkultivierungen verglichen werden. Dafür wurden MaxQuant-basierte Auswertungen mit identischen Suchparametern durchgeführt und die Datenbanken jeweils variiert. Neben den dualen Datenbanken von 2017 als Kontrolle, wurde die neue UniProt/TrEMBL-DB für *C. griseus* einmal in Kombination zur *M. musculus* und einmal alleine abgeglichen. Außerdem wurde die NCBI-basierte PICR-DB (Rupp *et al.* 2018) getestet. Die

erhaltenen Protein-Daten wurden nach MaxQuant-Auswertung für mindestens drei valide Quantifizierungswerte gefiltert.

Es konnten jeweils leicht reduzierte Anzahlen an quantifizierten Proteinen für die Verwendung der neuen UniProt/TrEMBL *C. griseus*-Datenbank (2020) mit 2.014 Proteinen in Kombination zu der *M. musculus*-DB sowie 2.052 Proteine nur für die *C. griseus*-Datenbank im Vergleich zu 2.238 Proteinen über die beiden Datenbanken von 2017 identifiziert werden. Unter Anwendung der PICR-Datenbank konnten ähnliche Ergebnisse mit 2.072 Proteinen erhalten werden. Weitere Auswertungen ergaben, dass für die Protein-Quantifizierungen anhand der PICR-DB von NCBI die meisten Peptide mit 35.160 identifiziert werden konnten, gefolgt von der neuen UniProt-DB mit 33.545, der neuen UniProt-DB in Kombination zur Maus-DB mit 33.423 und den dualen DB von Dezember 2017 mit 32.023 Peptiden.

Auf Basis der höheren Peptid-IDs unter Verwendung einer *C. griseus*-Datenbank sollte in zukünftigen Experimenten auf die Verwendung von dualen DB-Suchen verzichtet werden. Je nach Kompatibilität des Auswerte-Workflows im Anschluss an die Perseus-Software zum Beispiel über die Tools *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Jiao *et al.* 2012) oder STRING (Szklarczyk *et al.* 2019) sollte somit in Folgeexperimenten die NCBI-basierte PICR-Datenbank oder die UniProt/TrEMBL-DB ausschließlich für *C. griseus* verwendet werden.

4.1.6. Analyse des deep proteomes

Als Vorarbeit für mögliche, zukünftige *deep proteome* Analysen wurden 140 µg einer CHO-K1 Proteomprobe aus der exponentiellen Phase (Tag 3) mittels *high*-pH Fraktionierung in acht Fraktionen geteilt und über eine 180 min nLC-MS/MS-Methode vermessen. Die Durchführung der Fraktionierung erfolgte in Duplikaten aus derselben Ausgangs-Peptidprobe. Die insgesamt 16 Proben wurden je mit 5 von 12,5 µl Probe ohne Randomisierung der Reihenfolge gemessen. Eine PD-basierte Evaluierung (MS Amanda 2.0, TrEMBL-Datenbanken *C. griseus* und *M. musculus* 2017) führte zur Identifizierung von 6.027 *high confident* Proteinen mit 35.302 Peptiden basierend auf 202.718 PSM. Pro Probe wurden 3.857 bis 8.851 Peptide identifiziert, wobei für die erste Fraktion jeweils deutlich weniger Peptide identifiziert werden konnten (Abbildung 15 B). Insgesamt konnte durch eine Kombination der Methodik zur Peptid-Fraktionierung und einer langen nLC-basierten Auftrennung eine hohe Abdeckung des Proteoms erfolgen, was zukünftige *deep proteome* Studien von CHO ermöglicht. Heffner *et al.* verwendeten bereits eine ähnliche Methodik für einen Proteomvergleich von verschiedenen CHO-Zelllinien zu Gewebeproben des *C. griseus*, wodurch ca. 5.500 bis 6.000 Proteine aus je 48 DDA-Messungen pro Zelllinie identifiziert werden konnten (Heffner *et al.* 2017). Aktuell publizierte TMT-Studien des CHO-Proteoms führten zur Identifizierung von insgesamt 6.200 bis 6.700 Proteinen pro TMT-Experiment basierend auf 90 min-nLC-MS/MS-Messungen von je 24 HpH-Fraktionen (Heffner *et*

al. 2020). Mit ähnlich eingesetzter Messzeit konnte über den Methodentest hier vergleichbare Anzahlen an Proteinen identifiziert werden.

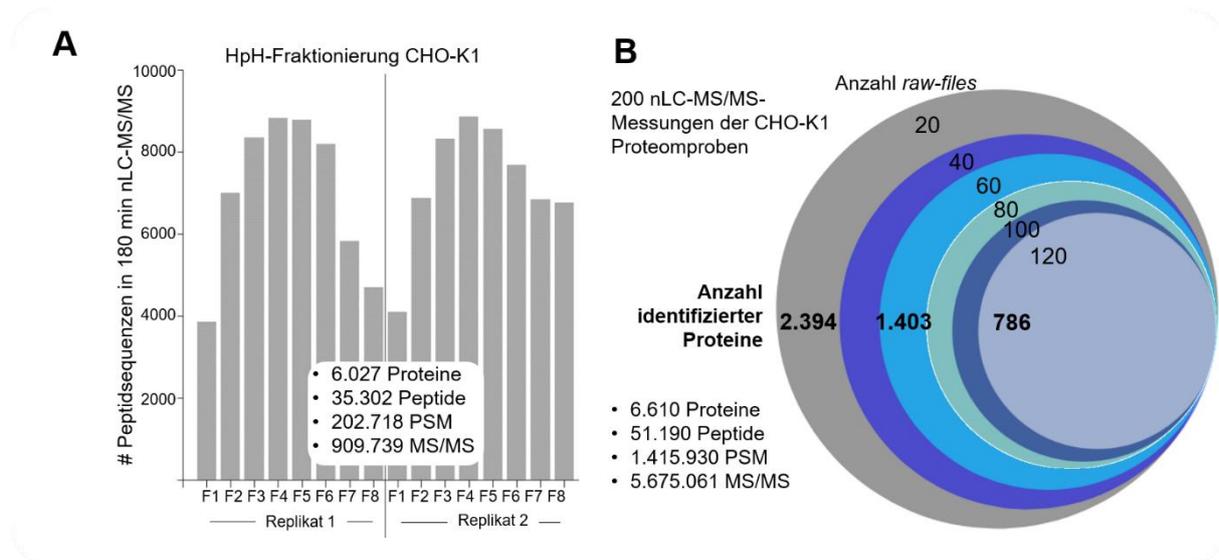


Abbildung 15 Experimente für *deep proteome* Analysen. **A)** Identifizierte Peptidsequenzen nach *High pH*-basierter Fraktionierung einer CHO-K1 Proteomprobe aus der exponentiellen Phase und Messung durch eine 180 min nLC-MS/MS-Methode. **B)** Zusammenfassende DB-Suche über Proteome Discoverer für 200 nLC-MS/MS-Datensätze der CHO-K1-Zelllinie mit Gradientenlängen von 20-180 min. Über Filterstufen auf eine minimale Anzahl an *raw-files* wurden 786 Proteine in 120 Messungen identifiziert.

Für eine generelle Charakterisierung des CHO-K1-Proteoms standen insgesamt 200 nLC-MS/MS-Messungen zur Verfügung die im Rahmen verschiedener Experimente (siehe beispielsweise 4.1.2 und 0) generiert wurden. Diese gesammelten Datensätze mit Gradientenlängen von 20-180 min wurden für eine DB-Suche über ProteomeDiscoverer (mit dualen TrEMBL-DB von 2017) eingesetzt und führten zur Identifizierung von insgesamt 6.610 Proteinen mit über 50.000 Peptiden (Abbildung 15 B). Auch über den Einsatz von Messungen aus verschiedenen Wachstumsphasen konnten nur ca. 600 Proteine mehr als über die zuvor vorgestellte, kombinierte Methodik aus Fraktionierung und hoher Messzeit, identifiziert werden. Eine weitere geringe Erhöhung der IDs wäre über die Kombination weiterer Fraktionierungstechniken möglich. So konnte nach subzellulärer Fraktionierung und zusätzlicher HpH-Fraktionierung von CHO-K1-Proben und der Vorbereitung von *Harvested Cell Culture Fluids* (HCCF)- und *Downstream Processing* (DSP)-mAb-Proben ca. 10.000 Proteinen identifiziert werden (Sim *et al.* 2020). Die Autoren verwendeten die Datensätze für eine *library*-Generierung und Analyse von SWATH-MS-Daten und konnten so ca. 4.700 Proteine quantifizieren, wobei nur ca. 1.700 Proteine im Überlapp über die drei Zelllinien K1, S und DG44 quantifiziert werden konnten (Sim *et al.* 2020). Neben der globalen Analyse wurden solche DIA-Methoden auch für spezifische Anwendungen in CHO, wie der Analyse von Histon PTMs mit ähnlich guten Ergebnissen (im Vergleich zu DDA) beschrieben (Cole *et al.* 2019). Auch für die Analyse von komplexen Phosphorylierungsgeschehen wären DIA-basierte Messungen aufgrund robusterer Quantifizierungen vorteilhaft. In anfänglichen Studien konnten durch *targeted*

DIA-Methoden bis zu 100 Targets in einer Zelllinie der Maus analysiert werden (Parker *et al.* 2015). Aktuell bestehen Limitierungen in der Datenanalyse bezüglich der Lokalisierung der Phosphorylierung innerhalb der Peptidsequenz. Über eine Entwicklung von Algorithmen, wie *Inference of Peptidofoms* (IPF), konnte diese Limitierung bereits deutlich verbessert werden (Rosenberger *et al.* 2017). Besonders durch die Entwicklung frei-zugänglicher Software-Strecken, wie Skyline (Schilling *et al.* 2012) oder EpiProfile (Yuan *et al.* 2018) ist ein vermehrter Einsatz von DIA-Methoden in Zukunft denkbar. Nach Etablierung einer *library* könnten über DIA-basierte Experimente Messzeit eingespart und die reproduzierbare Quantifizierung für komplexe Fragestellungen angewandt werden.

4.2. Proteom- und Signaltransduktions-Analysen von CHO-Kultivierungen

Die verwendeten Industrie-relevanten Zelllinien CHO-XL99-G4 und -E3 exprimieren einen rekombinanten monoklonalen Antikörper (mAb) über das Glutamin-Synthetase (GS)-Selektionssystem. Beide Zelllinien entstammen aus demselben Transfektionsansatz einer CHO-XL99-Parentalzelllinie mit dem GS-mAb-Konstrukt und wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, ebenso wie die parentale Zelllinie. Ein erster grundlegender Proteomvergleich der Zelllinien wurde durchgeführt, um das Medium gezielt mit Supplementen ergänzen zu können, die Einfluss auf Wachstum oder Produktivität der mAb-CHO haben. Um Hinweise auf Signalweiterleitungen und Regulationsmechanismen zu erhalten, wurden für diese Supplementierungen zusätzlich zur Kultivierungsanalytik Änderungen des intrazellulären Phospho/Proteoms evaluiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hautexperimente sind in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

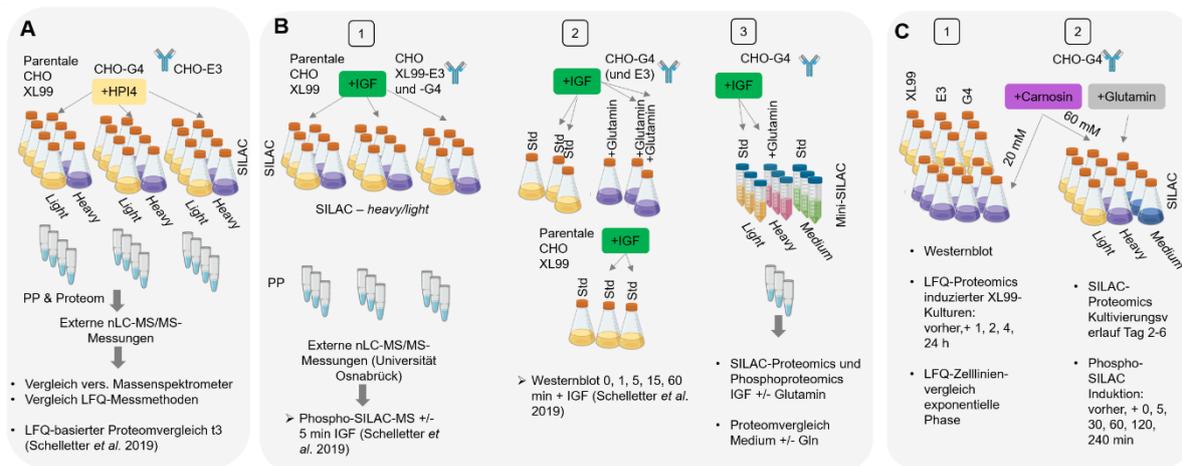


Abbildung 16 Zusammenfassung der Proteom- und Phosphoproteom-Analysen von CHO-XL99-Zelllinien. **A)** SILAC-Ansatz mit HPI4-Induktion der Zelllinien CHO-XL99, -E3 und -G4, wobei Phosphopeptid (PP)-angereicherte Proben für den Vergleich von verschiedenen Massenspektrometern verwendet wurden. Eine Proteommessung des SILAC-Experiments wurde zur differentiellen LFQ-Proteomanalyse der parentalen und mAb-G4 CHO-Zelllinien verwendet. **B)** Phospho-SILAC-Experiment mit IGF-Induktion in der exponentiellen Phase der drei Zelllinien und *Phosphoproteomics* 5 min nach IGF-Induktion (1). Kultivierung der drei Zelllinien in Standardmedium mit IGF-Induktion, sowie Vergleich von Glutamin-supplementiertem Medium für die mAb-CHO mit schneller Probennahme (0, 1, 5, 15 und 60 min) und anschließender Westernblot-Analyse von Signaling *key players* (2). „Mini“ dreifach SILAC-Experiment (mit *label-swap*) der mAb-CHO-G4 und IGF-Induktion in Glutamin-freiem und Glutamin-haltigem Medium zur Signaltransduktionsanalyse sowie für einen Proteomvergleich der beiden Medientypen vor Induktion (3). **C)** Kultivierung der drei Zelllinien in Standardmedium mit Induktion von L-Carnosin in der exponentiellen Phase und anschließender Westernblot-Analyse von P-ERK1/2. Für XL99 wurde außerdem eine LFQ-basierte Analyse einer Zeitreihe (0, 1, 2, 4, 24 h) nach Induktion durchgeführt (1). Abschließend wurde ein dreifaches SILAC-Experiment mit mAb-CHO-G4 und Induktion von L-Carnosin und L-Glutamin durchgeführt und das differentielle (Phospho-) Proteom analysiert.

Ein zweifaches SILAC-Experiment mit *Hedgehog Pathway Inhibitor 4* (HPI4)-Induktion ergab keine deutlichen Einflüsse auf die Wachstum und Produktivität, weshalb die erhobenen nLC-MS/MS-Daten für den Vergleich verschiedener Massenspektrometer (siehe 4.1.4), verschiedener

LFQ-Messmethoden (siehe 4.1.3) und für einen LFQ-basierten Zelllinienvergleich (siehe 4.2.1) über die Analyse der unbehandelten Kontrollen in der exponentiellen Phase genutzt wurden (Abbildung 16 A). Ein Teil der evaluierten Proteomunterschiede zwischen den Zelllinien war auf die mAb-CHO-Kultivierung in Glutamin-freiem Medium zurückzuführen, weshalb eine Glutamin-abhängige Phospho/Proteinexpression in weiteren Experimenten evaluiert wurde (siehe 4.2.2.3). Eine gezielte Modulierung der Proteintranslations-Maschinerie über den Signaling *key player* mTOR durch eine Aktivierung über den Wachstumsfaktor IGF für die drei XL99-Zelllinien analysiert werden (Abbildung 16 B 1). Für die IGF-induzierten mAb-CHO konnte hingegen langfristig eine reduzierte zellspezifische Produktivität ermittelt werden. Da noch keine globale IGF-abhängige Signaltransduktion in CHO-Zellen publiziert wurde, sollte dieses Signaling erstmals über *Phosphoproteomics* evaluiert werden. Aufgrund der damaligen Abhängigkeit auf externe nLC-MS/MS-Messungen wurde nur ein Zeitpunkt (5 min) nach der Induktion analysiert. Für diesen Zeitpunkt konnte wie erwartet eine Aktivierung von mTOR- und MAPK-*downstream* Targets evaluiert werden. Die Kultivierungsdaten wurden in einem unabhängigen Experiment reproduziert und die Phospho-SILAC-MS-Daten mit anschließendem Westernblot ausgewählter Targets validiert (Abbildung 16 B 2). Nach Etablierung des Orbitrap-Systems in Bielefeld wurden die SILAC-basierte Quantifizierung über ein dreifaches SILAC-Experiment zur IGF-Induktion wiederholt, wobei eine Glutamin-abhängige Proteinexpression und die Analyse einer Zeitreihe nach IGF-Induktion berücksichtigt wurde (Abbildung 16 B 3).

Aufgrund von Hinweisen auf ein bereits hoch-aktives mTOR-Signaling im exponentiellen Wachstum von CHO-Zellen sollte weiterhin evaluiert werden, ob eine Inhibierung von mTOR positive Auswirkungen auf die Prozessparameter dieser mAb-CHO hat. Über die Zugabe des Dipeptids L-Carnosin sollte eine mögliche Rapamycin-ähnliche Wirkweise evaluiert werden (Abbildung 16 C). Zunächst erfolgte eine LFQ-Kultivierung der drei XL99-Zelllinien mit Induktion von 20 mM in der exponentiellen Phase und anschließender Westernblot- und LFQ-basierter Proteomanalyse für die parentale XL99-Zelllinie. Da nur geringe Auswirkungen auf Wachstum und Produktivität beobachtet wurden, erfolgte in einem dreifachen SILAC-Experiment eine Induktion von mAb-CHO-G4 mit 60 mM L-Carnosin und anschließender Phospho/Proteomanalyse. Die Zugabe von Carnosin in der exponentiellen Phase führte zu einer Wachstumsinhibierung, Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität in der stationären und Absterbephase sowie über eine verlängerte Prozessdauer zu einer erhöhten Produktausbeute. Über Phospho/Proteomanalysen konnten erstmals Hypothesen zum größtenteils unbekanntem Carnosin-Wirkmechanismus entwickelt werden. Über eine Verbindung der erhobenen *omics*-Daten zu der beobachteten Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität konnten neue Targets für die Zelllinienoptimierung identifiziert werden.

4.2.1. Proteomcharakterisierung von CHO-XL99-Zelllinien

Für ein zelluläres Verständnis zur Entwicklung gezielter Prozessoptimierungsstrategien und zur Analyse von mAb-CHO-spezifischen Signaltransduktionen war zunächst eine Proteomcharakterisierung der Zelllinien erforderlich.

Unterschiede in der Kultivierung zwischen mAb-CHO und der parentalen Zelllinie

Für einen Proteomvergleich der mAb-produzierenden Zelllinie G4 (und E3) und der parentalen XL99-Zelllinie musste berücksichtigt werden, dass sich das Kultivierungsmedium durch Zugabe von L-Glutamin unterschied, da die endogene GS-Aktivität der XL99-Zelllinie für ein Überleben in Glutamin-freiem Medium nicht ausreichend war. Die rekombinanten Zelllinien, die auf dem GS-Selektionssystem basieren, müssen durch Expression der GS Glutamin aus Glutamat und Ammonium *de novo* synthetisieren, wodurch sich ein Selektionsdruck auf die Expression des GS-mAb-Konstrukts ergibt. Um den Selektionsdruck weiter zu steigern und die stabile Expression des Produktgens zu gewährleisten, wurde die Vorkultur zusätzlich mit dem GS-Inhibitor Methioninsulfoximin (MSX) kultiviert. MSX inhibiert neben der GS auch die *Glutamate-Cysteine Ligase* (GCL), das erste Enzym des Glutathion (GSH)-Syntheseweges (siehe 1.5.5) (Fan *et al.* 2013). Damit eine effektive Abreicherung von MSX nicht durchgeführt bzw. behördlich belegt werden muss, erfolgen industrielle Kultivierungsprozesse ohne Zugabe von MSX. Die Hauptkulturen der mAb-CHO dieser Arbeit wurden daher nicht mit MSX, aber standardmäßig ohne Glutamin-Supplementierung kultiviert, so dass ein einfacher Selektionsdruck während der kurzen unregelmäßigen *batch*-Kultivierungen erhalten blieb. Über vergleichende Kultivierungen konnte unter diesen Bedingungen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit von Tag 2 auf Tag 3 (in der exponentiellen Phase) für die mAb-CHO-G4 mit $0,48 \pm 0,01$ pro Tag im Vergleich zur parentalen Zelllinie mit $0,32 \pm 0,01$ pro Tag berechnet werden. Außerdem konnte für die mAb-CHO-G4 kein Wechsel von der Laktatakkumulation zur Laktatverstoffwechslung beobachtet werden, wie für die nah-verwandten Zelllinien E3 und XL99 (siehe 4.2.2.1).

Kultivierung der Zellen für den Proteomvergleich

Über einen Zelllinienvergleich auf Proteomebene sollten daher zunächst Unterschiede zwischen XL99 und G4 ermittelt werden. Für den Vergleich wurden jeweils Daten der Kontrollkultivierungen des HPI4-SILAC-Experiments (siehe Abbildung 16 A) der XL99- und G4-Zellen verwendet. Die unregelmäßige *batch*-Kultivierung erfolgte in 50 ml Arbeitsvolumen mit je vier biologischen Replikaten pro Bedingung und Zelllinie. An Tag 3 wurden die *heavy*-SILAC-Kulturen mit $10 \mu\text{M}$ HPI4 induziert und 15 min nach Induktion Zellen geerntet. Außerdem wurden Zellen der Kontrollkulturen, die gleichzeitig mit DMSO supplementiert wurden, geerntet und separat bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Zellen wurden parallel nach IP-Puffer-basierter Methode aufgeschlossen, die erhaltenen Proteine quantifiziert und je $150 \mu\text{g}$ zufällig gewählter SILAC-Paare für den folgenden

MS-Probenvorbereitungs-Workflow vereint. Je 10 µg der aufgereinigten SILAC-Peptidproben wurden für Proteommessungen in drei Aliquots bei -80 °C gelagert. Ausgehend von ca. 270 µg Peptidprobe wurde außerdem eine TiO₂-basierte Phosphopeptidanreicherung durchgeführt, welche für den Vergleich der Massenspektrometer Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific), des Impact II Qq *Time-of-Flight* (ToF) (Bruker) und später auch der Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) verwendet wurden (siehe 4.1.4). Die 10 µg Peptidproben für die Gesamtproteom-Analyse der Zelllinien G4 und XL99 wurden als Testmessung zu Experten der Firma Thermo Fisher Scientific geschickt und anhand von zwei verschiedenen nLC-MS/MS-Methoden vermessen (Abbildung 17 A). Die erhaltenen Datensätze wurden über die MaxQuant-Software mit den TrEMBL-basierten Datenbanken für *C. griseus* und *M. musculus* (von Dezember 2017) abgeglichen, eine label-freie Quantifizierung durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet und statistisch verglichen.

LFQ-basierter Proteomvergleich der Zelllinien XL99 und G4

Über die erste Messmethode der acht unangereicherten Peptidproben konnten nach MaxQuant-Auswertung 2.312 Proteine mit mindestens drei Peptiden quantifiziert werden (Schelletter *et al.* 2019). Über die Berechnung eines Zweistichproben t-Tests (Permutation-basierte FDR < 0,05) konnten 268 signifikant differentiell exprimierte Proteine zwischen der Zelllinie CHO-XL99 (parental) und CHO-G4 (mAb-produzierend) ermittelt werden. Die quantifizierten Proteine wurden über die Datenbanken *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes* (KEGG) und *Gene Ontology Biological Process* (GO BP) annotiert und signifikant angereicherte Annotationen zwischen den Zelllinien über einen *Fisher exact* Test (Benjamini-Hochberg FDR < 0,05) berechnet. Für den Zelllinienvergleich konnten die KEGG-Signalwege ‘*Lysosome*’, ‘*Glutathione metabolism*’, ‘*Protein processing in ER*’ und ‘*Carbon fixation*’ und die GO BP-Annotationen ‘*Carbohydrate metabolic process*’, ‘*Cellular homeostasis*’, ‘*Response to stress*’ und ‘*RNA metabolic process*’ als signifikant angereichert berechnet werden. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde eine Übersicht erstellt, welche auf Proteinen basiert, die mit einem KEGG *identifier* annotiert werden konnten (Abbildung 17 B).

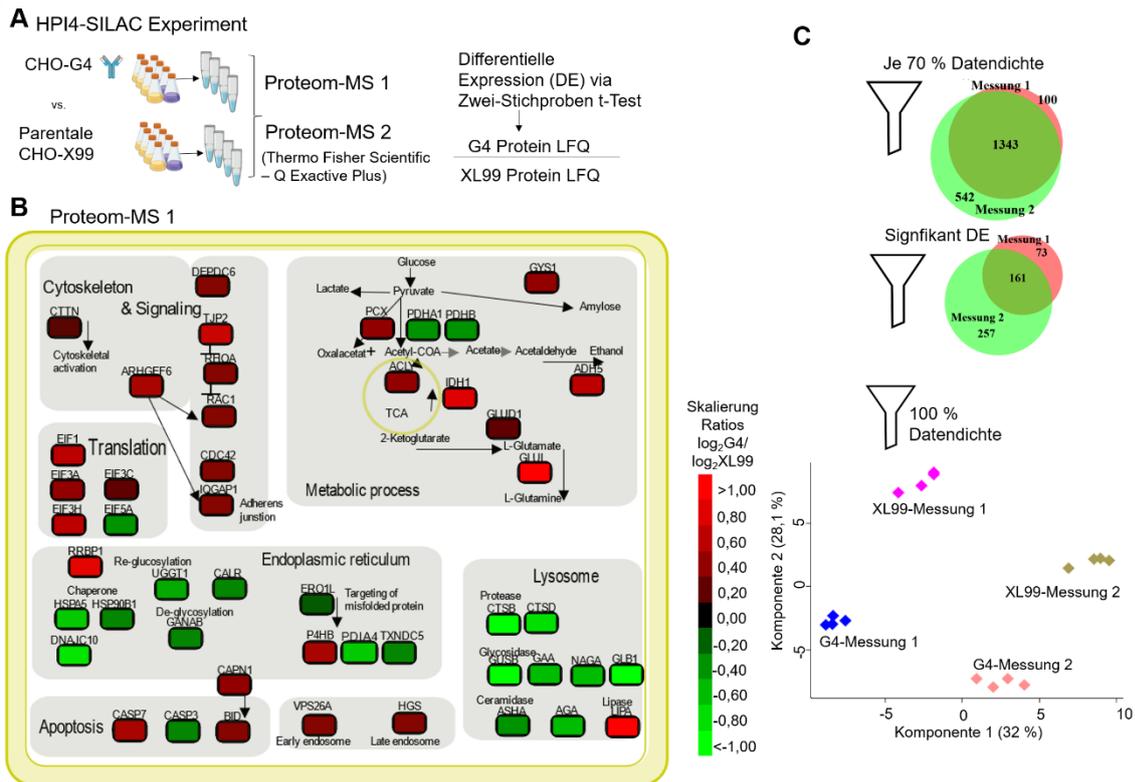


Abbildung 17 Proteomvergleich von mAb-CHO-G4 und der parentalen XL99-Zelllinie in der exponentiellen Phase. **A**) Übersicht zu den externen Proteommessungen von Proben des HPI4-SILAC-Experiments. **B**) LFQ-Auswertung der Kontrollkulturen und Visualisierung einer KEGG-basierten Auswahl signifikant differentiell exprimierter Proteine zwischen CHO-G4 und -XL99 in der exponentiellen Phase (ohne Induktion). **C**) Auswertung von zwei technischen Mess-Replikaten über zwei Venn-Diagramme nach Filterung für jeweils 70 % valide Quantifizierungswerte bzw. signifikant differentiell exprimierte Proteine (Zweistichproben t-Test, FDR < 0,05; S0: 0,1). Außerdem wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) nach Filterung für 100 % quantitative Werte durchgeführt und dargestellt.

Für die mAb-produzierenden G4-Zellen konnte eine überwiegend niedrigere Proteinexpression für Proteine berechnet werden, welche als lysosomal- und ER-lokalisiert beschrieben werden bzw. in Verbindung zur Proteinfaltung, Glykosylierung und der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase stehen. Im Gegenteil dazu konnte eine höhere Expression für die meisten cytoskeletalen Proteine und für essentielle Proteine des Kohlenhydrat-Metabolismus bestimmt werden. Außerdem konnten eine differentielle Expression für Proteine der Translationsmaschinerie berechnet werden, darunter die Hochregulierung von Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF3A, eIF3C und eIF3H und die Herunterregulierung von eIF5A.

Diese ersten Hinweise eines differentiellen Proteoms sollten über wiederholte nLC-MS/MS-Messungen (mit unterschiedlicher Methodik, siehe 4.1.3) der acht Peptidproben abgesichert werden.

Eine reproduzierbare Messung und Quantifizierung zur Absicherung des differentiellen Proteoms

Eine wiederholte Messung der Proteomproben aus der exponentiellen Phase für CHO-XL99 und -G4 mit veränderten Messparametern und eine kombinierte DB-Auswertung der 16 Rohdaten über MaxQuant (1.6.10.43) wurde zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit der Methodik und Absicherung der differentiellen Proteinexpression verwendet. Insgesamt konnten 3.307 Proteine in mindestens einer Messung quantifiziert werden. Im Vergleich dazu wurden in aktuell publizierter Literatur des CHO-Proteoms 3.281 Proteine identifiziert (Chevallier *et al.* 2020).

Eine Filterung der Daten der beiden Messrunden für jeweils 70 % valide Quantifizierungswerte ergab einen Überlapp von 1.343 Proteinen und 100 bzw. 542 weiteren quantifizierten Proteinen für jeweils Messung 1 und 2 (Abbildung 17 C). Eine weitere Filterung auf Proteine ohne *missing values* (100 % valide Quantifizierung) erlaubte die Berechnung und Darstellung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) in Perseus (Abbildung 17 C). Sowohl die Messrunden als auch die Zelllinien konnten über die PCA eindeutig geclustert werden. Das distinkte Clustern nach Messmethodik bedeutet, dass die Protein LFQ-Intensitäten der beiden Messrunden nicht direkt miteinander verglichen werden können (siehe 4.1.3). Daher wurden Ratios zwischen den beiden Zelllinien (innerhalb der Messrunden) berechnet und durch einen Vergleich der Ratios die Reproduzierbarkeit der relativen Quantifizierung überprüft. Es wurden Verhältnisse zwischen mAb-produzierender Zelle und parentaler Zelle für vier biologische Replikate gebildet und aus dem Median der resultierenden Verhältnisse wiederum das Verhältnis von Messrunde 1 zu 2 berechnet. Im Mittel konnte eine Korrelation von $1,04 \pm 0,23$ für 1.343 Werte der relativen Quantifizierung berechnet werden. Detektierte Ausreißer von minimal 0,15 bis maximal 5,0 korrelieren mit einer geringen Anzahl identifizierter Peptide, die eine unsichere Quantifizierung begründen (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von 3.573 identifizierten und 3.307 quantifizierten Proteinen konnte über einen Zweistichproben t-Test (FDR < 0,05, S0: 0,1) der beiden Zelllinien 234 signifikant differentiell exprimierte Proteine für Messung 1 und 418 Proteine für Messung 2 mit einem Überlapp von 161 Proteinen bestimmt werden (Abbildung 17 C). Für die überlappenden 161 signifikant differentiell exprimierten Proteine wurden ausschließlich positive Korrelationen berechnet. Über die Messung von vier biologischen Replikaten und jeweils zwei technischen Replikaten auf nLC-MS/MS-Ebene konnte eine hohe Reproduzierbarkeit evaluiert werden, weshalb die Daten im Folgenden diskutiert werden.

Das lactate switch-inhibierende Proteom

In Übereinstimmung zu den Unterschieden im Laktatstoffwechsel der G4- und XL99-CHO-Zellen (siehe Abbildung 19) konnten, wie von Hartley *et al.* vorgeschlagen, erstmals Hinweise auf Proteomebene für bzw. gegen einen effizienten Shift gefunden werden.

In der Glykolyse entsteht über die Verstoffwechslung von Glukose Pyruvat und Laktat, wobei letzteres durch den *lactate switch* bzw. Shift unter bestimmten Bedingungen wieder als Energiequelle genutzt werden kann. Dieser Phänotyp wird in CHO-Zellen prozesstechnisch mit einer erhöhten Produktivität in Zusammenhang gebracht (Le *et al.* 2012) und die Aktivierung dieses Phänotyps über verschiedene Methodiken erreicht, darunter *metabolic engineering* sowie Medien- und Prozessdesign (Hartley *et al.* 2018). Unter Kontroll-Bedingungen konnte für die mAb-CHO-G4 kein Laktatstoffwechsel-Shift beobachtet werden (siehe 4.2.2.1). Für die nahe verwandten E3- und die parentale XL99-Zelllinie erfolgte dieser Shift ca. an Tag 3 der unregulierten *batch*-Kultivierung. Über eine Proteomanalyse sollten Hinweise auf „Biomarker“ oder Bedingungen evaluiert werden, die einen effektiven Shift bedingen. Diese könnten zum Beispiel als Selektionskriterium in der Zelliniengenerierung verwendet werden oder zur Prozessoptimierung genutzt werden.

Das durch Glykolyse produzierte Pyruvat wird über den mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) zu Acetyl-CoA und CO₂ umgewandelt, welches anschließend im TCA unter ATP-Generierung abgebaut werden kann. Der PDC besteht aus den Komponenten E1, E2 und E3, welche wiederum aus verschiedenen Untereinheiten (UE) zusammengesetzt sind. Die UE PDHA und PDHB der E1-Komponente konnten über den Proteomvergleich als in mAb-CHO-G4 signifikant herunterreguliert berechnet werden (siehe Abbildung 17 B). Die darüber reduzierte direkte Verbindung von Glykolyse und TCA in mAb-CHO-G4 kann zu einem Proteom-Ungleichgewicht beitragen, welches einen effizienten Stoffwechselshift verhindert. Der Pentose Phosphat Pathway (PPP) ist eine Abzweigung der Glykolyse und dient der Synthese von Substraten für die Nucleotid- bzw. DNA-Synthese sowie der NADPH-Generierung für die Redox-Homöostase (siehe Abbildung 8). NADPH dient dabei neben dem direkten Puffern von ROS auch indirekt der ROS-Neutralisierung über die Regenerierung von GSH. Das dritte Enzym des PPP, die *6-phosphogluconate dehydrogenase* (PGD, 6PGDH) konnte in mAb-CHO-G4 als hochreguliert berechnet werden, ebenso wie ein Enzym des TCA (OGDH). Die Hochregulierung des PPP in Verbindung mit der beobachteten reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit dient somit vermutlich der ROS-Neutralisierung und weniger der Nucleotid-Synthese.

Glukose kann von den Zellen neben der Glykolyse und dem PPP auch zur Glykogen-Synthese verwendet werden. Die in der Glykogen-Synthese involvierten Enzyme *Glycogen synthase* (GYS1) und *UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase* (UGP2) sind jeweils in G4 signifikant höher exprimiert als in XL99. Ein leicht erhöhter Fluss der Glukose in die Glykogen-Synthese und die Ribose-Synthese über den PPP anstelle in die Pyruvat-Produktion führt zur einer möglichen geringeren Energie-Produktion der mAb-CHO-G4. Eine weitere Evaluierung des vermuteten ineffizienten Stoffwechsels sollte über die Analyse der Top-regulierten Proteine in mAb-CHO-G4 erfolgen.

Die Top-regulierten Proteine von mAb-CHO

Ein Überlapp an jeweils Top10 hoch- und herunterregulierten Proteinen des Proteomvergleichs von G4- und XL99-Zellen für Messung 1 und 2 ergab eine Liste von 27 Proteinen, welche in Tabelle 7 zusammengefasst wurden.

Tabelle 7 Eine Zusammenstellung der jeweils Top10 hoch- und herunterregulierten Proteine zwischen G4- und XL99-Zellen in der exponentiellen Phase aus zwei Messrunden ergab eine Liste an 27 Proteinen.

Genname	Proteinname	Log ₂ Ratio G4/XL99 Messung 1	Log ₂ Ratio G4/XL99 Messung 2	Bereich
Cwf19l2	<i>CWF19-like protein 1</i>	-2,48	-2,69	Spliceosom
Plbd2	<i>Phospholipase B-like</i>	-2,31	-1,87	Lipid-Metabolismus
Gusb	<i>Beta-glucuronidase</i>	-1,38	-2,28	Kohlenstoff-Metabolismus
Nucb2	<i>Nucleobindin-2-like protein</i>	-1,57	-1,72	Calcium-Homöostase, GEF
Fkbp10	<i>Peptidylprolyl isomerase Chitinase domain-containing protein 1</i>	-1,57	-1,47	Proteinfaltung
Chid1		-2,51	-0,86	Kohlenstoff-Metabolismus
Grn	<i>Progranulin</i>	-1,76	-2,12	Wachstumsfaktor, Lysosomen
Prdx4	<i>Peroxiredoxin-4</i>	-1,25	-1,36	Redox-Homöostase
Fkbp9	<i>Peptidylprolyl isomerase</i>	-1,26	-1,36	Proteinfaltung
				Oligosaccharid- Metabolischer Prozess, Lysosomen
Gla	<i>Alpha-galactosidase</i>	-1,28	-1,37	Tumor-Suppressor, <i>Stress response</i>
Ndrp1	<i>N-myc downstream-regulated gene 1 protein</i>	-0,96	-1,47	
Aga	<i>N(4)-(beta-N-acetylglucosaminyl)- L-asparaginase</i>	-0,97	-1,43	Proteinglykosylierung
Dpp7	<i>Dipeptidyl peptidase 2 10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	-1,62	-0,81	Proteolyse
Hspe1		-1,54	-0,83	Co-Chaperon, Proteinfaltung
Glul	<i>Glutamine synthetase</i>	3,21	2,46	Glutamin-Biosynthese Glutathion-Metabolischer Prozess
Gsta1	<i>Glutathione transferase Structural maintenance of chromosomes protein</i>	1,62	1,19	
Smc3		1,21	1,11	Zellzyklus
H671_5g15 167	<i>Perilipin-4-like protein</i>	0,95	0,91	Semaphorin- Rezeptorbindung
Smc1a	<i>Structural maintenance of chromosomes protein</i>	1,21	0,95	Zellzyklus
Lipm	<i>Lipase</i>	1,08	0,92	Lipid-Metabolismus
Uso1	<i>General vesicular transport factor p115</i>	0,89	0,97	Proteintransport
Septin9	<i>Septin-9</i>	0,93	1,08	Cytoskellek, GTPase
Cald1	<i>Non-muscle caldesmon</i>	1,00	0,87	Actin und Myosin-Bindung
I79_00187 6	<i>Ribosome-binding protein 1 Ribonucleoside-diphosphate reductase</i>	1,02	0,83	Endoplasmatisches Reticulum
Rrm1		1,26	0,85	DNA-Replikation
Fam107b	<i>Protein FAM107B</i>	0,95	0,94	Gewebespezifisch
Septin11	<i>Septin-11</i>	1,02	0,61	Cytoskellek, GTPase

Eine GS-abhängige Kultivierung von mAb-CHO bedingt einen höheren Glutathion-Metabolismus

Es konnte eine signifikante Hochregulierung der Glutamin Synthetase (GS, GLUL) mit jeweils log₂ Ratios von 3,21 bzw. 2,46 für Messung 1 und 2 im Vergleich zur parentalen Zelllinie berechnet

werden. Die Kultivierung der mAb-produzierenden G4-Zellen in Glutamin-freiem Medium führte also zur 5-10-fachen erhöhten Expression der GS im Vergleich zur endogenen GS der parentalen Zelllinie, welcher Glutamin im Überschuss zur Verfügung stand. Bei einer ausreichenden Glutamin-Versorgung erfolgt über die Hydrolyse von Glutamat eine Energiegewinnung über die sogenannte Glutaminolyse. Da über Glutamat, Cystein und Glycin GSH synthetisiert werden kann, steht der Glutamin-Metabolismus in enger Verbindung zum Glutathion-Metabolismus, für welchen auch signifikante Hochregulierungen berechnet wurden. Eine höhere Expression der Glutathion S-Transferase A1, aber auch der Transferasen Mu 5 und P, sowie der Glutathion Synthetase (GSS, GSTA1, GSTM5, GSTP1) konnte für die G4-Zellen bestimmt werden, was in Übereinstimmung zu anderen publizierten Zelllinien-Proteomvergleichen steht (Orellana *et al.* 2015; Sommeregger *et al.* 2016). Aufgrund dieses erhöhten Glutathion-Metabolismus wird auch das Vorliegen einer erhöhten GSH-Konzentration vermutet, welche ebenfalls für andere *high-producer* (DHFR-basierte) CHO-Zelllinien gezeigt wurde (Chong *et al.* 2012). Über eine erhöhte GSH-Produktion kann dem für *high-producer* CHO-Zellen vermuteten erhöhten oxidativen Metabolismus und damit begründetem ROS-Stress entgegengewirkt werden (Chong *et al.* 2012; Orellana *et al.* 2015; Pereira *et al.* 2018). Der in G4-Zellen erhöhte Glutathion-Metabolismus basiert also teils auf der geringeren Glutamin-Konzentration und teils aufgrund des erhöhten ROS-Stress der mAb-Synthese.

Ein potentielles *bottleneck* in der Proteinfaltungs-Maschinerie von mAb-CHO-G4

Eine deutliche Herunterregulierung konnte für Peptidyl-Prolyl Isomerasen (PPIasen), den sogenannten *FK506-Binding Proteins* FKBP9 und FKBP10 berechnet werden. Diese Proteine sind im ER lokalisiert und haben Funktionen in der Proteinfaltung während der Proteinsynthese. Für weitere Proteine, die mit der Proteinprozessierung im ER assoziiert sind, konnte ebenfalls eine differentielle Expression ermittelt werden, darunter signifikante Hochregulierungen von RRBP1, PPIB und P4HB und weitere Herunterregulierungen von GANAB, UGGT1, PDIA4, PDIA5, PRKCSH und TXNDC5 und den Chaperonen HYOU1, HSP90B1, HSPA5, HSBP1 und HSPE1 (siehe Abbildung 17 B). Für PPIB und P4HB konnte durch weitere Experimente eine Glutamin-abhängige erhöhte Expression ermittelt werden (siehe 4.2.3.1) und so eine Abhängigkeit von der mAb-Synthese ausgeschlossen werden. Die hier ermittelte verringerte Expression von Proteinfaltungs-Proteinen in den G4-Zellen ließ ein vermindertes UPR-Signaling in der exponentiellen Phase vermuten. Bei ausreichenden Nährstoffkonzentrationen in der exponentiellen Phase führte die rekombinante Proteinexpression noch nicht zu einem vermuteten erhöhten ER-Stress. Eine mögliche Begründung wäre, dass die Zellen über eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit eine Homöostase der potentiell verminderten Proteinfaltungskapazität bewahren. In *cellular engineering*-Ansätzen der mAb-CHO-G4 könnte eine Überexpression dieser Proteine zu positiven Auswirkungen auf die Produktausbeute bzw.

Produktglykosylierung führen. Dieses potentiell verminderte UPR-Signaling hat vermutlich Auswirkungen auf die Regulierung der Autophagie.

Herunterregulierung von lysosomalen Proteinen in mAb-CHO

Ein Autophagie-vermittelter Abbau von zellulärem Material erfolgt in Lysosomen und wird zum Beispiel durch UPR- oder *Amino Acid Response* (AAR)-Signaling aktiviert. Für CHO-Zellen wird eine Autophagie-Aktivierung nach Glutamin-Limitierung und Reduzierung der zellspezifischen Produktivität beschrieben (Jardon *et al.* 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Glutamin- oder Asparagin-Limitierung zur AAR-Aktivierung in CHO-Zellen führt (Fomina-Yadlin *et al.* 2014). Insgesamt konnten aber keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die geringe Verfügbarkeit von *de novo* synthetisiertem Glutamin in GS-CHO ein dauerhaftes AAR-Signaling aktiviert.

Die Phospholipase *B-like* (PLBD2 oder auch p76) trägt eine Mannose 6-Phosphat (M6P)-Markierung, welches eine Bindung an M6P-Rezeptoren und eine Lokalisierung innerhalb von Lysosomen bedingt (Jensen *et al.* 2007). Es konnte eine Herunterregulierung von PLBD2, sowie weitere signifikante Herunterregulierungen lysosomaler Proteine, wie Cathepsin B, D und Z (CTSB/D/Z), Peptidasen (TPP1, DPP7, LGMN), α -Glukosidase (GAA), α -Galaktosidase (GLA) und β -Glucuronidase (GUSB) für die mAb-CHO berechnet werden. Eine geringere Aktivität der letzteren drei Enzyme ist der Grund für lysosomale Speichererkrankungen im Menschen, wobei phänotypisch eine Akkumulierung von zum Beispiel Lipiden und Oligosacchariden beobachtet werden kann (Ohira *et al.* 2018). Außerdem wurde Progranulin (GRN), ein sekretierter Wachstumsfaktor, der Proliferation und lysosomale Funktion reguliert (Russell *et al.* 2017), über den intrazellulären LFQ-Proteom-Vergleich als in G4-Zellen signifikant herunterreguliert berechnet. Diese Herunterregulierung wurde in Übereinstimmung zu den signifikant geringer exprimierten lysosomalen Proteinen berechnet.

Differentielle Expression von cytosolischen Dipeptidasen

Weiterhin konnte eine signifikante Herunterregulierung der cytosolischen *non-specific* Dipeptidase (CNDP2), auch als Carnosin Dipeptidase II bekannt, in G4-Zellen ermittelt werden. CNDP2 hat Funktionen in der Hydrolyse von Dipeptiden, wie L-Carnosin (β -*alanyl-L-histidine*). Außerdem wurde eine Tumorsuppressoraktivität von CNDP2 in der Literatur beschrieben, wobei vermutet wird, dass ein epigenetisches Silencing des *Cndp2*-Gens zur erhöhten Proliferation von Krebszellen führt. Es konnte eine Zunahme von phosphoryliertem, aktiviertem MAPK/ERK1/2 nach Überexpression gezeigt wurde (Zhang *et al.* 2014b). Obwohl die genauen Mechanismen einer CNDP2-abhängigen MAPK-Regulierung nicht bekannt sind, wird vermutet, dass auch diese Herunterregulierung zu einem differentiellen Signaling in G4-Zellen beiträgt. Für zwei weitere cytosolische Peptidasen konnte hingegen eine Hochregulierung berechnet werden, darunter die

Dipeptidyl Peptidase 3 (DPP3) und das *Insulin-Degrading Enzyme* (IDE). DPP3 schneidet und degradiert Peptide, wie zum Beispiel Angiotensin. Es konnte außerdem eine DPP3-vermittelte Bindung des Transkriptionsfaktor (TF)-Inhibitors KEAP1 festgestellt werden, was zu einer Akkumulierung des TFs (NFE2L2) und zu einer *Antioxidant Response* (ARE)-abhängigen Expressionssteigerung von cytoprotektiven Genen führt (Liu *et al.* 2007). Diese cytoprotektiven Gene umfassen GSTs (A4, A2, P1, P2, Mu 1/2/3), GCLm, GCLc, G6PDH, TXNRD1, HMOX1, NQO1 und das *Malic Enzyme* (ME) (Lee *et al.* 2005). DPP3 hat somit Funktionen in der Regulierung von oxidativem Stress (Hast *et al.* 2013). Der für mAb-CHO vermutete erhöhte ROS-Stress kann somit zum Teil über eine DPP3-abhängige Expression der signifikant hochregulierten, cytoprotektiven Gene GSTA1, GSTP1 und vermutlich auch GSTM5 kompensiert werden.

mTOR-Signaling in Verbindung zur Autophagie

Da Lysosomen als Knotenpunkt der mTOR-C1-vermittelten Signaltransduktion gelten (Rabanal-Ruiz and Korolchuk 2018) und aktives mTOR-C1-Signaling die Lysosomen-Biogenese inhibiert (Laplante and Sabatini 2012) wurde aufgrund der herunterregulierten lysosomalen Proteine ein erhöhtes aktives mTOR-C1-Signaling in mAb-CHO vermutet. Außerdem könnte ein verringertes Recycling von Proteinen durch die Sekretion des mAbs ins Zellkulturmedium zu einer verringerten Expression lysosomaler Proteine beitragen. Die differentielle Expression von vielen lysosomalen Proteinen zwischen den nah-verwandten Zelllinien in der exponentiellen Phase lässt ebenfalls eine differentielle mTOR-vermittelte Autophagie-Regulierung vermuten. Eine inhibierte Autophagie wird in CHO in Zusammenhang mit einer reduzierten Viabilität gebracht (Kim *et al.* 2013b; Jossé *et al.* 2016). Eine potentiell inhibierte Autophagie (durch zum Beispiel aktiveres mTOR-C1-Signaling) in CHO-G4-Zellen steht in Übereinstimmung zu der reduzierten Kultivierungszeit von 6 Tagen (im Vergleich zu 7 Tagen für XL99) trotz deutlich reduzierter IVCD. Da ähnlich wie für die Modulierung von mTOR direkt sowohl eine vermeintliche Aktivierung als auch Inhibierung der Autophagie in CHO-Zellen bisher zu positiven Auswirkungen auf die Prozessperformance führte, wird vermutet, dass die mTOR-vermittelte Autophagie-Regulierung ein sensibles regulatives Netzwerk darstellt, welches zum Beispiel durch Einbringen (multipler) rekombinanter Gensequenzen in unbekannte Bereiche des Genoms aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann. Die Datenlage für die mAb-CHO-G4 hier lässt vermuten, dass eine Modulierung der Autophagie zu einer Verlängerung der Prozessdauer und somit Prozessausbeute führen könnte.

Auch für das Protein NDRG1 konnte eine signifikante Herunterregulierung berechnet werden, NDRG1 wird über eine mTOR-C2 aktivierte *Serine/threonine-protein kinase* SGK1 phosphoryliert und ist in vielen Krebszelllinien vermehrt exprimiert und phosphoryliert (Rad *et al.* 2018). Das als Tumorsuppressor charakterisierte Protein wird in Folge von zellulärem Stress exprimiert und hat Funktionen in der Regulierung des Zellzyklus (McCaig *et al.* 2011). Für CHO-Zellen konnte eine erhöhte Expression von NDRG1 sowie Phosphorylierung nach Temperaturshift (Henry *et al.*

2017b) und nach einer Adaptierung an Glutamin-freies Medium nach 17 Passagen beobachtet werden (Kaushik *et al.* 2020). Die geringere Expression in dieser mAb-CHO steht vermutlich in Zusammenhang zu der geringeren Wachstumsrate der Zellen.

Hochregulierung von MAPK-, STAT- und Semaphorin-Signaling

Weiterhin konnte für den Signaling *key player* ERK1/MAPK3 eine Hochregulierung in CHO-G4 im Vergleich zu CHO-XL99 berechnet werden (ca. 1,9-fach). Auch für weitere Signaling-Komponenten wurde eine differentielle Expression berechnet, darunter eine Hochregulierung von STAT3 und der GEFs 2 und 6 (ARHGEF2 und 6), sowie eine Herunterregulierung des *Endoplasmic reticulum resident protein 29* (ERP29). Die Kinase STAT3 ist ein direktes *downstream*-Target von mTOR-C1. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung erfolgt eine erhöhte Transkription von HIF1 mRNA (Rad *et al.* 2018). Für über Cytokine aktiviertes STAT3 konnte in Krebszellen eine Verbindung zur Cathepsin-Expression und vor allem Sekretion ermittelt werden (Yan *et al.* 2016). Eine Verbindung der STAT3-Hochregulierung zu der signifikanten Herunterregulierung von Cathepsinen nach Carnosin-Induktion wurde vermutet. Obwohl CHO keine Krebszellen sind, werden oft parallelen (vor allem bezüglich des glykolytischen Phänotyps) gezogen (Montégut *et al.* 2020). Über eine Proteomanalyse ohne spezifische Phosphoproteomanalyse bleibt für die Zellen hier jedoch ungeklärt, ob der Zelle durch eine Hochregulierung von MAPK3 und STAT3 auch eine erhöhte Menge aktiver Kinase für die Regulierung von Proliferation und HIF1-vermittelter Transkription zur Verfügung steht.

Weitere Proteine mit signifikant erhöhter Expression für CHO-G4 sind im Semaphorin-Signaling beteiligt, darunter FLNA, ARHGDI, DPYSL2 und das *Perilipin-4-like* Protein. Eine mAb-spezifische und Glutamin-unabhängige Regulierung des *Dihydropyrimidinase-related protein 2* (DPYSL2) konnte über weitere Experimente in dieser Arbeit evaluiert werden (siehe 4.2.3.1). Semaphorine sind eine große Proteinfamilie, die entweder sekretiert, an der Zelloberfläche angeheftet oder Membran-gebunden vorliegen und eine ca. 500 Aminosäuren-länge extrazelluläre „Sema“-Domäne tragen. Das Semaphorin-Signaling ist noch zu großen Teilen unbekannt, wird aber in menschlichen Zellen in Verbindung der Regulierung von Zelladhäsion und der Cytoskelett-Organisation gebracht (Alto and Terman 2017). Die Berechnungen von überwiegend hochregulierten Signalingkomponenten führte zu der Vermutung, dass eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Änderungen der Medienzusammensetzung in diesen mAb-CHO-G4-Zellen vorliegt.

Zusammenfassung

Neben der wiederholten Darstellung des experimentellen *setups* wurden die diskutierten Unterschiede schematisch in einer Übersicht (Abbildung 18) dargestellt.

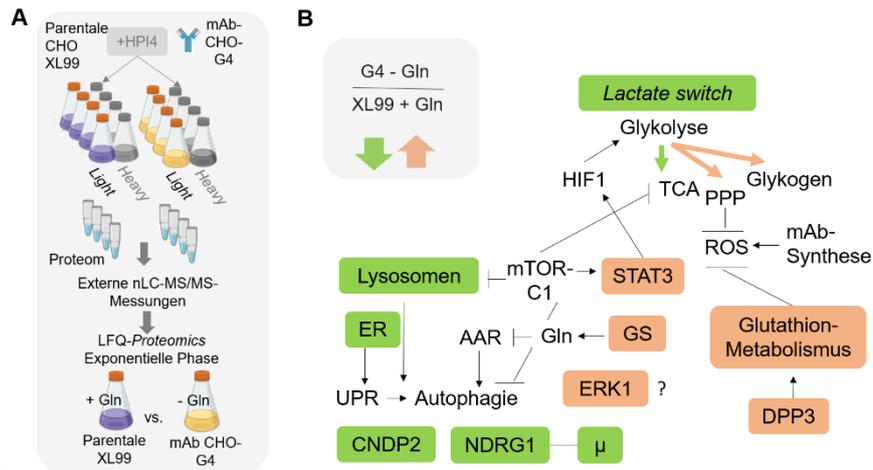


Abbildung 18 Zusammenfassung der diskutierten differenziell exprimierten Proteine zwischen mAb-CHO-G4 und parentaler XL99-Kultivierung in der exponentiellen Phase bei standardmäßiger Kultivierung der GS-mAb-CHO ohne Glutamin. **A)** Experimentelles *setup* der SILAC-basierten Probenzubereitung und Messung sowie LFQ-basierte Auswertung der beiden Kontrollkulturen. **B)** Schematische Darstellung von Proteinen oder zellulären Bereiche die in mAb-CHO-G4 im Vergleich zur parentalen Zelllinie über LFQ-MS signifikant hoch- (grün) oder herunterreguliert (hellrot) berechnet wurden.

Das differentielle Proteom der mAb-CHO-G4 basiert zum einen auf der Glutamin-freien Kultivierung im Vergleich zur parentalen Zelllinie, aber vermutlich auch auf einer mAb- bzw. Zelllinien-spezifischen Proteinexpression (siehe 4.2.3.1). Ein vermuteter erhöhter ROS-Stress durch die mAb-Synthese konnte einerseits über die Hochregulierung der NADPH-Produktion über den Pentose Phosphat Pathway (PPP) und andererseits über die Hochregulierung des DPP3-abhängigen cytoprotektiven Glutathion-Anabolismus bestätigt werden. Für CHO-Zellen wurde beschrieben, dass eine Glutamin-Limitierung zur AAR- und Autophagie-Aktivierung und Inhibierung von mTOR führt (Ghaffari 2011). Da die reduzierte lysosomale Proteinausstattung der mAb-CHO auf eine Inhibierung von Autophagie-Prozessen deutet, wird davon ausgegangen, dass die GS-basierten Zellen hier in der exponentiellen Phase in der Lage waren ausreichend Glutamin ohne AAR-Aktivierung zu synthetisieren. Da eine Autophagie-Aktivierung auch über ein UPR-Signaling ausgelöst werden kann, steht auch die reduzierte Proteinfaltungsmaschinerie in Übereinstimmung zu der vermuteten inhibierten Autophagie an Tag 3 der Kultivierung von der mAb-CHO-G4. Dieses führte auch zu der Annahme, dass wohlmöglich ein *bottleneck* in der ER-Proteinausstattung dieser mAb-CHO vorliegt, so dass sich Potential der Zelllinienoptimierung hinsichtlich von ER-Faltungsproteine ergibt. Die geringere basale Expression von FKBP10 und HSPE1 im Vergleich zu den anderen differenziell exprimierten Chaperonen bedingen ein höheres Potential für Überexpressions-Experimente.

Auf Basis der evaluierten differentiellen Expression von mTOR-C1 *downstream* Targets wird eine erhöhte mTOR-C1-Aktivität in dieser mAb-CHO-G4-Zelllinie vermutet. In Übereinstimmung dazu konnte über einen Vergleich von *high-* zu *low-producer* Zelllinien auf Transkriptebene in der Literatur eine Korrelation der Expression des mTOR-Pathway Proteins PIK3CD zur Produktivität

ermittelt werden (Edros *et al.* 2014). Neben dem reduzierten AAR- und UPR-abhängigen Autophagie-Signaling wird vermutet, dass eine erhöhte Expression wichtiger Signalingkomponenten, wie MAPK3 und STAT3 die hier analysierte mAb-CHO-G4 zu einem sensiblen und sensitiven System machen, welches auf äußere Einflüsse schnell und deutlich reagieren kann. Über eine parallele Analyse einer IGF-vermittelten mTOR- und MAPK-Signaltransduktion sollten weitere Hinweise auf Zelllinien-spezifische Mechanismen gefunden werden.

4.2.2. IGF-Signaling in CHO-Zellen

Um die Proteintranslation der mAb-CHO zu erhöhen wurde eine Aktivierung des mTOR-Signalings über den Wachstumsfaktor IGF in CHO-Zellen evaluiert. Die zuvor diskutierten Proteomunterschiede zwischen mAb-produzierender und entsprechender parentaler CHO-XL99-Zelllinie, vor allem in den Bereichen der ROS-Neutralisierung und Signaltransduktion ließen Zelllinien-spezifische Effekte durch die Supplementierung von Wachstumsfaktoren vermuten. Um dies zu prüfen wurde ein paralleles Phospho-SILAC-Experiment für die drei Zelllinien XL99, E3 und G4 durchgeführt und verglichen, wobei die mAb-CHO standardmäßig ohne Glutamin kultiviert wurden. Da tierische Zellen die Proteintranslationsrate über mTOR an die aktuellen Nährstoffbedingungen anpassen, darunter auch an die Glutamin-Verfügbarkeit (Nicklin *et al.* 2009), wurden Unterschiede basierend auf der Glutamin-freien mAb-CHO-Kultivierung vermutet. Daher wurde in weiteren Experimenten ein möglicher Einfluss von Glutamin auf das IGF-Signaling evaluiert.

4.2.2.1. Phospho-SILAC-Experiment mit IGF-Induktion

Über ein zweifaches SILAC Experiment sollten die Effekte der Mediensupplementierung mit IGF auf die Kultivierungsparameter und die intrazelluläre Signaltransduktion analysiert werden. Dafür wurden die drei Zelllinien, darunter zwei mAb-produzierende Zelllinien CHO-XL99-G4 und -E3, sowie die parentale Zelllinie XL99, in Triplikaten in einem parallelen dualen SILAC Ansatz kultiviert, wobei Zellen im *heavy* Medium in der exponentiellen Phase mit IGF induziert wurden und Zellen im *light* Medium als Kontrolle fungierten. Das Medium der parentalen Zelllinie XL99 wurde standardmäßig mit 8 mM Glutamin supplementiert. Die IGF-Induktion erfolgte in der exponentiellen Phase an Tag 3, so früh wie möglich, um deutliche Effekte auf die Prozessperformance zu beobachten (Shen *et al.* 2010) und so spät wie möglich, um möglichst wenig SILAC-Medium in Form von Überstand direkt zu verwerfen. Aufgrund der Abhängigkeit von externen sensitiven nLC-MS/MS-Messungen wurde ein einzelner Erntezeitpunkt für die Phosphoproteom-Analyse nach IGF-Induktion in Vorexperimenten ermittelt (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abbildung 23). Die IGF-Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von $40\text{-}60 \cdot 10^5$ Z/ml. 5 min nach Induktion wurden Zellen für die Signaltransduktionsanalyse geerntet und direkt mit

Zellen der Kontrollkultur für die weitere SILAC-basierte Phosphoproteom-Probenvorbereitung vereint.

In unabhängigen Experimenten konnte eine Einbauzeit der schweren Aminosäuren innerhalb von vier Tagen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt der Zellernte an Tag 3 der Hauptkultivierung konnte durch die Adaptationsphase während der Vorkultur eine Zeit von sieben Tagen zum Einbau der schweren Aminosäuren gewährleistet werden, so dass von einem vollständigen Einbau ausgegangen wurde. In Abbildung 19 wurde die Analytik der Kultivierung bezüglich Wachstum, Viabilität, Glukose- und Laktat-Metabolismus, Zellzyklus und zellspezifische Antikörper-Produktion dargestellt.

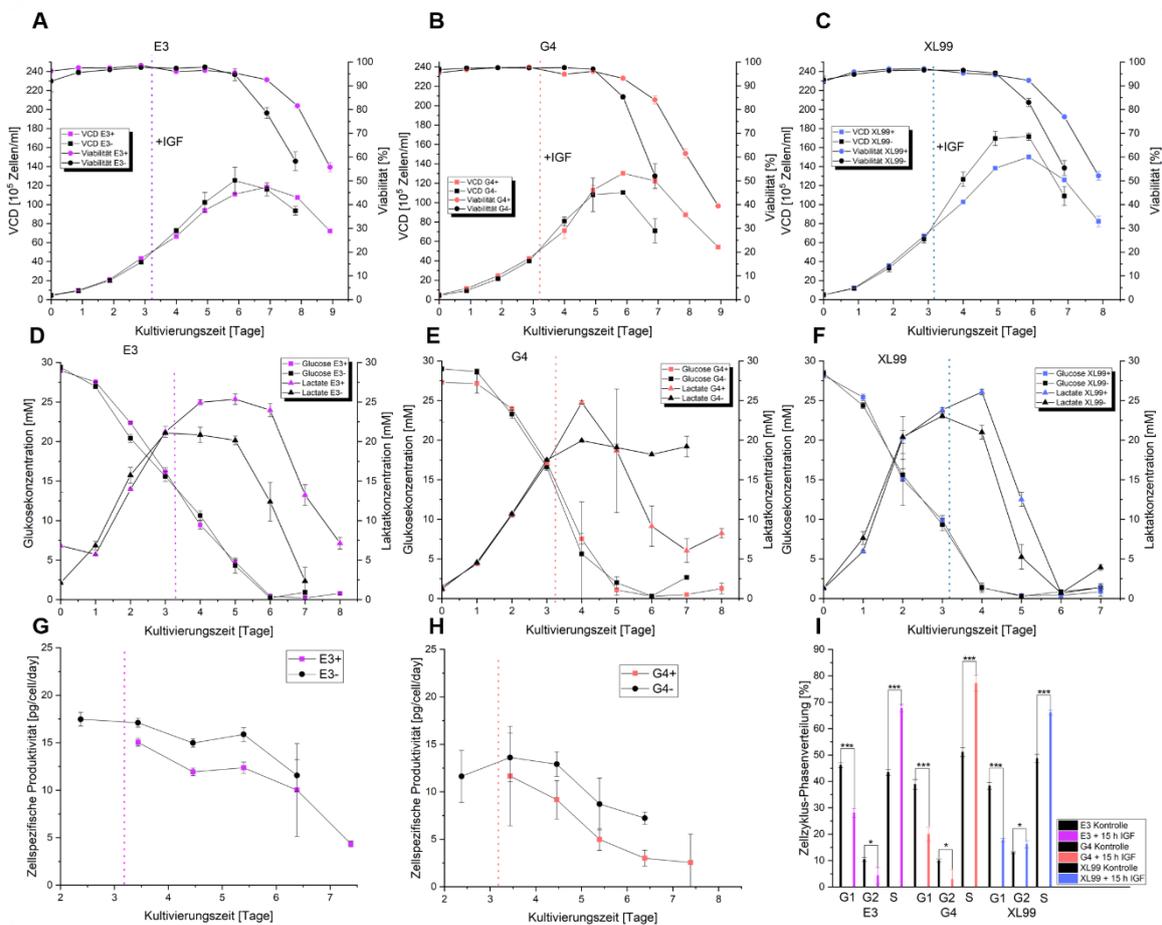


Abbildung 19 Zweifaches SILAC-Experiment der CHO-Zelllinien XL99, E3 und G4 mit IGF-Induktion nach 3,25 Tagen Kultivierung. **A-C)** Auftragung der gemessenen viablen Zelldichte (VCD) und Viabilität gegen die Kultivierungszeit für die Zelllinien E3, G4 und XL99. **D-F)** Auftragung der Glukose- und Laktatkonzentrationen über den Kultivierungsverlauf für die drei Zelllinien. Für A-F) wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung der drei biologischen Replikate abgebildet, mit Ausnahmen für E3+IGF und G4+/-IGF, wofür nur zwei biologische Replikate für die Erstellung der Abbildung verwendet wurden. **G-H)** Verlauf der zellspezifischen Produktivität für E3 und G4, dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung von drei Replikaten. **I)** Zellzyklus-Phasenverteilung vor Induktion im Vergleich zu 15 h nach IGF-Induktion für die drei Zelllinien. Über einen Zweistichproben t-Test wurden signifikante Unterschiede berechnet, wobei die Signifikanzniveaus $p\text{-value} < 0,001$ (***) und $p\text{-value} < 0,05$ (*) markiert wurden. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Durch die Weiterverwendung eines Schüttelkolbens der Vorkultur für ein biologisches Replikat der Hauptkultur ergaben sich geringe Unterschiede in der Startzelldichte dieses Replikats. Daher wurden nur zwei biologische Replikate für die Darstellung der IGF-supplementierten Kulturen von E3 und G4 und der G4-Kontrollkultur des Wachstumsverlaufs verwendet. Durch eine entsprechende Verschiebung der x-Achse des jeweils dritten biologischen Replikats zeigten die Daten jedoch einen sehr ähnlichen Verlauf (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte eine länger anhaltende hohe Viabilität der IGF-supplementierten CHO-Zellen beobachtet werden, so dass die Prozessdauer um einen Tag verlängert werden konnte (Abbildung 19 A-C). Für die E3-Zellen konnte keine eindeutige Veränderung in der maximalen Zelldichte durch die Supplementierung mit IGF in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt werden, wenn auch eine geringe Verzögerung des Wachstums gemessen wurde. In Vorexperimenten konnte eine deutliche Inhibierung des Wachstums der E3-Zellen durch Zugabe in der frühen exponentiellen Phase beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Effekt-Abhängigkeiten vom Zugabe-Zeitpunkt der Kultivierung wurden in der Literatur auch für Butyrat-Induktionen von CHO-Zellen beschrieben (Allen *et al.* 2008). Die parentale Zelllinie XL99 zeigte eine reduzierte maximale Zelldichte der IGF-induzierten Kulturen (Abbildung 19 C). Im Gegenteil dazu war die maximale Zelldichte der G4-Zellen nach IGF-Induktion im Vergleich zu den Kontrollkulturen erhöht (Abbildung 19 B).

Durch eine Messung der extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen konnten keine deutlichen IGF-abhängigen Effekte beobachtet werden (siehe Anhang Abbildung 40). Durch die Messung der Glukosekonzentrationen konnten ebenfalls keine großen Unterschiede, weder zwischen der induzierten und Kontrollkulturen noch zwischen den drei Zelllinien, beobachtet werden (Abbildung 19 D-F). Die Laktatkonzentrationen zeigten jedoch unterschiedliche Profile auf beiden Ebenen, der Induktion und in bestimmten Wachstumsphasen auch zwischen den Zelllinien. Wie erwartet akkumulierte Laktat zunächst in allen Kultivierungen. Erst in der späten exponentiellen Phase konnten Zelllinien-spezifische Effekte beobachtet werden. In E3-Zellen konnte eine Reduzierung der Laktatkonzentration im Laufe der Kultivierung festgestellt werden, welche in den IGF-induzierten Kulturen zu einem späteren Zeitpunkt eintrat und damit deutlich höhere maximale Laktatkonzentration von bis zu 25 mM zur Folge hatten. Ein ähnlicher Verlauf wurde für die parentale Zelllinie XL99 beobachtet. Für die G4-Kontrollkulturen konnte keine Reduzierung der Laktatkonzentration beobachtet werden, wobei Unterschiede dieses Phänotyps basierend auf dem differentiellen Proteom zuvor diskutiert wurden (siehe 4.2.1). Interessanterweise konnte für die IGF-induzierten G4-Kulturen eine Reduzierung der Laktatkonzentration gemessen werden. Der IGF-vermittelte Stoffwechselshift sollte im Folgenden über *Phosphoproteomics* detaillierter analysiert werden. Der IGF-abhängige verspätete Stoffwechselshift in E3 und XL99 gab bereits auf Ebene der Kultivierungsanalytik Hinweise einer mTOR-PDK-vermittelten Phosphorylierung und Inhibierung von PDHA1, also einer Verringerung des TCA-Flusses und Erhöhung des glykolytischen Phänotyps bzw. Warburg-Effekts (Cairns *et al.* 2011).

In den IGF-induzierten Kulturen konnte für beide mAb-CHO im Vergleich zur Kontrolle ein reduzierter finaler Produkttiter ermittelt werden. Für G4 konnte im Mittel ein Produkttiter von 493 mg/l für die Kontrollkulturen im Vergleich zu 381 mg/l der IGF-induzierten Kulturen ermittelt werden. Für E3 konnten im Mittel jeweils leicht erhöhte Produkttiter mit 638 bzw. 538 mg/l für die Kontroll- und induzierten Kulturen bestimmt werden. Die Berechnung der mittleren zellspezifischen Produktivität über die exponentielle Wachstumsphase (Tag 3-5, Abbildung 19 G-H) resultierte in reduzierten q_{ps} für die IGF-supplementierten E3- (13,5 vs. 16,4 pcd in der Kontrolle) und G4-Zellen (8,6 vs. 11,7 pcd in der Kontrolle). Für die G4-Zellen konnte der größte Unterschied in der zellspezifischen Produktivität von Tag 6 bis 7, also drei bis vier Tage nach IGF-Supplementierung, berechnet werden. In Anlehnung an einen publizierten Zelllinienvergleich können diese mAb-GS-CHO-Zelllinien über die hier ermittelten zellspezifischen Produktivitäten als „*high-producer*“ klassifiziert werden (Jossé *et al.* 2016).

Untersuchungen der Zellzyklus-Verteilung über den Kultivierungsverlauf (Daten nicht gezeigt) ergaben große Unterschiede für Tag vier der Kultivierung, ca. 15 Stunden nach IGF-Induktion (Abbildung 19 I). Für alle drei Zelllinien konnte ein signifikanter Anstieg an S-Phase-Zellen, einhergehend mit einer Reduktion von Zellen in der G1-Phase beobachtet werden. Für die beiden mAb-produzierenden Zelllinien konnte an Tag 4 eine signifikante Reduktion von G2-Phase-Zellen und für die parentale XL99-Zelllinie hingegen eine Zunahme der G2-Phase-Zellen bestimmt werden. Durch die Analysen der Zellzyklus-Verteilung zu späteren Kultivierungszeitpunkten konnten nach IGF-Induktion Zelllinien-spezifische Effekte ermittelt werden. Drei Tage nach Induktion (Tag 6) konnten signifikant weniger G1-Phase-Zellen für XL99 berechnet werden, für E3 konnte ein identischer Trend festgestellt werden (nicht signifikant). Für die G4-Zellen, die im Gegenteil zu E3 und XL99 eine deutliche Zunahme im Wachstum nach IGF zeigten, konnten signifikant höhere Anteile an G1-Phase drei Tage nach IGF-Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet werden. Die IGF-abhängigen Langzeiteffekte auf die Zellzyklusverteilung waren somit Zelllinien-spezifisch. Für IGF-supplementierte E3-Zellen konnte gleichzeitig zu der leichten Reduktion an G1-Zellen an Tag 6 eine geringere Wachstumsrate und zelluläre Produktivität bestimmt werden. Eine höhere G1-Phasenverteilung der G4-Zellen korrelierte dabei interessanterweise mit einer geringeren Produktgen-Synthese und höherem Wachstum, obwohl eine Akkumulierung in der G1-Phase häufig im Zusammenhang einer Wachstumsinhibierung gesehen wird (Du *et al.* 2015).

Die SILAC-basierte Analyse des Phosphoproteoms

Für eine umfassende Analyse der IGF-abhängigen Kurzzeiteffekte wurde eine Quantifizierung von Phosphopeptiden innerhalb des Phospho-SILAC-MS-Ansatzes durchgeführt. Dafür wurden 5 min nach IGF-Induktion Zellen geerntet und jeweils mit Zellen aus der Kontrollkultur vereint. Die Pärchen wurden dabei zufällig gewählt. Ausgehend von 100 µg IP-Puffer-basierten Proteinextrakts erfolgte die Probenvorbereitung mit TiO₂-basierter Phosphopeptid-Anreicherung, wobei ein Drittel

für eine externe 40 min nLC-Auftrennung mit EASY-spray Ionisierung und Messung über ein Q Exactive Plus Orbitrap-MS in Osnabrück eingesetzt wurde (Abbildung 20 A). Der erhaltene Datensatz, bestehend aus drei biologischen Replikaten der drei Zelllinien, wurde zur Etablierung der SILAC-basierten Quantifizierung in MaxQuant verwendet.

Im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen LFQ-Methodik (Henry *et al.* 2017b; Kaushik *et al.* 2018; Kaushik *et al.* 2020) haben SILAC-MS-Experimente, neben der robusten Quantifizierung durch eine frühe Probenvereinigung, den Vorteil einer möglichen Quantifizierung von Phosphorylierungsstöchiometrien von scheinbaren *on/off*-Phosphorylierungsmechanismen der Signaltransduktion. Trotz geringer Intensität der Phosphorylierung ohne Reiz (Humphrey *et al.* 2013) können für diese Phosphorylierungsstellen Ratios berechnet, da jeweils ein *precursor* für die Identifizierung ausreicht und (durch Aktivierung der *requantify*-Funktion in MaxQuant) die entsprechende weitere *precursor*-Intensität für eine MS1-basierte Quantifizierung bzw. Ratio-Berechnung aus den Rohdaten extrahiert wird. Aus diesem experimentellen *setup* ergeben sich jedoch mögliche Limitierungen durch potentielle Expressionsunterschiede der parallelen Kulturen in *heavy*- und *light*-SILAC-Medium. Diese Limitierung sollte in zukünftigen Experimenten über die Messung der entsprechenden Proteom-Probe, aus der die Anreicherung durchgeführt wurde, analysiert bzw. berücksichtigt werden (siehe 4.2.2.3).

Es konnten ca. 4.000 Phosphopeptide von 2.623 Phosphoproteinen über eine duale MQ-basierte DB-Suche der Phospho-SILAC-Daten quantifiziert werden. Dies führte zur Identifizierung von 5.523 Phosphorylierungsstellen (*P-sites*), wobei 4.429 *P-sites* mit SILAC-Ratios versehen werden konnten. Für jede Zelllinie wurden ca. 3.500 *class I* Phosphorylierungsstellen in mindestens einem biologischen Replikat quantifiziert, so dass 2.925 Phosphorylierungsstellen im Überlapp für alle drei Zelllinien quantifiziert werden konnten. Insgesamt dienen 3.586 *unique* Phosphorylierungsstellen als „Universum“ für weitere Analysen. Das hieraus berechnete Verhältnis der phosphorylierten Aminosäuren Ser:Thr:Tyr entspricht ca. 200:20:1 und ca. 80 % der Phosphorylierungsstellen wurden durch einfach phosphorylierte Peptide sicher quantifiziert (Multiplizität von 1). Für die restlichen 20 % wurden zwei- oder dreifach phosphorylierte Peptide für die Quantifizierung der *P-sites* verwendet (Multiplizität von 2 bzw. 3). Eine Verrechnung von verschiedenen phosphorylierten Peptidvarianten bewirkt Unsicherheiten in der korrekten Quantifizierung der einzelnen Phosphorylierungsstelle. Viele Studien arbeiten daher mit differentiellen Daten auf Ebene des gemessenen Phosphopeptides. Häufig stellen nahe aufeinander folgende Phosphorylierungen jedoch interessante biologische Mechanismen dar, wie die Aktivierung der S6K1-Aktivität durch T389-Phosphorylierung nach Phosphorylierung von S411, S418, T421, S424 (Hannan *et al.* 2003). Wird nur eine von mehreren *P-sites* eines Phosphopeptides differentiell reguliert, ist eine biologisch korrekte Interpretation durch Auswertung auf Peptidebene nicht möglich, weshalb in dieser Arbeit eine Interpretation auf Ebene der Phosphorylierungsstellen erfolgte.

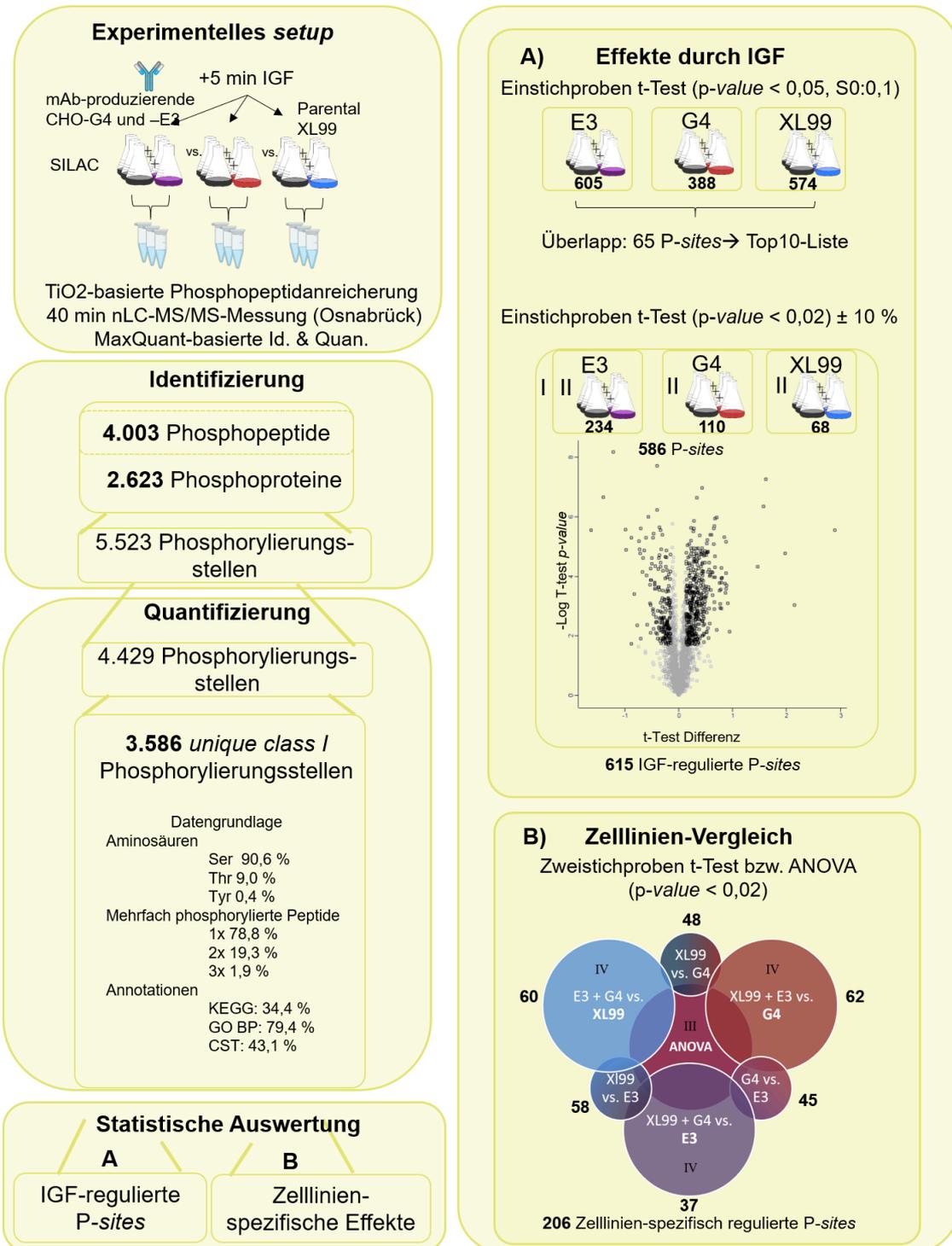


Abbildung 20 Übersicht der Identifizierung und Quantifizierung von Phosphopeptiden zur Analyse von Phosphorylierungsstellen im Phospho-SILAC-MS-Experiment. **A)** 5 min nach IGF-Induktion konnten signifikant regulierte P-sites für die Zelllinien CHO-XL99, -G4 und -E3 über einen Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,05$, $S0:0,1$) ermittelt werden, wobei der Überlapp an signifikanten Hits zur Diskussion der Top10-regulierten P-sites genutzt wurde. Außerdem wurde eine stringenter Statistik ($p\text{-value} < 0,02$) und das Herausfiltern von ± 10 % regulierten P-sites für jede Zelllinie einzeln und gemeinsam durchgeführt. **B)** Zelllinien-spezifische Effekte wurden über Zweistichproben t-Tests bzw. die Durchführung einer ANOVA ($p\text{-value} < 0,02$) berechnet.

Globale Phosphorylierungsänderungen 5 min nach IGF-Induktion

Für eine *non-hypothesis limited*-Herangehensweise sollten statistisch abgesicherte Regulierungen extrahiert werden. Die Berechnung eines Einstichproben t-Tests mit Korrektur für das *multiple-hypothesis testing* Problem führte zu keinen signifikanten Hits, vermutlich aufgrund einer zu geringen Anzahl an Replikaten (drei biologische, keine technischen Replikate). Durch die Abhängigkeit auf externe nLC-MS/MS-Messungen war die Anzahl an Replikaten und Messungen begrenzt. In Annäherung wurden daher über einen Einstichproben t-Test (*p-value* < 0,05; *S0*: 0,1) statistisch abgesicherte Regulierungen für jede Zelllinie extrahiert und diese im Folgenden als signifikant bezeichnet. Es konnten jeweils 574, 388 und 605 signifikante Phosphorylierungsänderungen für XL99, G4 und E3 berechnet werden. Ein stringentes Filtern für Phosphorylierungsstellen, die in allen drei Zelllinien als signifikant reguliert berechnet wurden, ergab eine Liste von 65 Phosphorylierungsstellen (Abbildung 20 A). Eine Zusammenfassung der jeweils Top10 hoch- und herunterregulierten Targets für die drei Zelllinien ergab eine Liste an 26 *P-sites* (Tabelle 8).

Tabelle 8 Daten des Phospho-IGF-SILAC Experiments in der exponentiellen Phase von CHO-Zellen. Jeweils Top10 hoch- und herunterregulierte signifikante Phosphorylierungsstellen 5 min nach IGF-Induktion in den CHO-Zelllinien E3, G4 und XL99 dargestellt als median \log_2 Ratio im Vergleich zur Kontrollkultivierung. Phosphopeptide (PP) die mit einer Multiplizität von 2 identifiziert wurden, sind in gold markiert.

Gen-name	Proteinname	+/- IGF E3	+/- IGF G4	+/- IGF XL99	P-Site	P-site human	Peptidsequenz inkl. Wahrscheinlichkeit
Dnajc2	<i>DnaJ homolog subfamily C member 2</i>	-1,32	-1,16	-1,17	S47	S47	NAS(1)T(0.008)S(0.992)FQELEDKK
Rgs12	<i>Regulator of G-protein signaling 12</i>	-1,07	-1,65	-1,83	S171	S172	SLS(1)ESAALR
Psip1	<i>PC4 and SFRS1-interacting protein-like isoform 2</i>	-0,92	-1,00	-0,53	S525	S562	EAELSLKES(1)PLDN
Dhx16	<i>Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16</i>	-0,73	-0,65	-0,70	S381	S160	TGDSKS(0.997)PT(0.003)EEKPAS(1)EDEWER
Raph1	<i>Ras-associated pleckstrin-like domains-containing protein 1</i>	-0,72	-0,63	-0,65	S192	S192	TAS(1)AGTVSDAEVR
Larp1	<i>La-related protein 1</i>	-0,59	-0,53	-0,66	S389	S766	S(1)LPTTVPES(1)PNYR
Arhgap21	<i>Rho GTPase-activating protein 21</i>	-0,55	-0,42	-0,41	S1665	S1669	RNS(0.993)EGS(0.007)EASCTEGSLTPSLDSR
Bag3	<i>BAG family molecular chaperone regulator 3</i>	-0,37	-0,41	-0,39	S270	S268	AAS(1)PFRS(1)PVR
Bag3	<i>BAG family molecular chaperone regulator 3</i>	-0,37	-0,41	-0,39	S266	S264	AAS(1)PFRS(1)PVR
Arhgef40	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 40</i>	-0,41	-0,27	-0,41	S959	S961	RIQQQLGEEAS(1)PR
Map1b	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	-0,46	-0,51	-0,39	S1689	S1785	SDIS(1)PLT(1)PR
Chrac1	<i>Chromatin accessibility complex protein 1</i>	-0,39	-0,44	-0,37	S123	N.A.	REEEEEEDDDGES(1)DI GEVLA
Sash1	<i>SAM and SH3 domain-containing protein 1</i>	-0,38	-0,37	-0,20	S482	S721	LLVDNQGLS(0.002)GCS(0.998)PR
Pfkfb3	<i>6-phosphofructo-2-kinase</i>	0,67	0,55	0,52	S441	S461	RNS(1)VTPLASPEPTK
Synj1	<i>Synaptojanin-1</i>	0,69	0,59	0,49	S592	S1565	GS(0.998)PT(0.002)LDFT ER

Ahnak	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK-like protein</i>	0,69	1,58	0,60	S169	S135	S(1)EDGVEGDLGETQSR
Dnajc2	<i>DnaJ homolog subfamily C member 2</i>	0,85	0,61	0,59	S49	S49	NAS(0.999)T(0.001)S(1)FQELEDKK
Dnajc2	<i>DnaJ homolog subfamily C member 2</i>	0,85	0,61	0,57	S47	S47	NAS(1)T(0.008)S(0.992)FQELEDKK
Ugdh	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	0,87	0,93	0,71	T415	T474 (Maus)	IPYT(1)PGEIPK
Stmn1	<i>Stathmin</i>	1,90	1,47	1,38	S16	S16	RAS(1)GQAFELILS(1)PR
Stmn1	<i>Stathmin</i>	1,90	1,47	1,38	S25	S25	RAS(1)GQAFELILS(1)PR
Def6	<i>Differentially expressed in FDCP 6</i>	0,60	0,39	0,45	S192	S606	S(1)LNGGDETPILASASQEDKLDPAPEP
Tnik	<i>Traf2 and NCK-interacting protein kinase</i>	0,36	0,30	0,42	S556	S640	QNS(1)DPTSENPPLPTR
Atg2b	<i>Autophagy-related protein 2-like B</i>	0,48	0,59	0,39	S496	S497	SVS(1)VDESRPEFICR
Vwa5a	<i>von Willebrand factor A domain-containing protein 5A</i>	0,59	0,69	0,36	T626	N.A.	ILGT(1)GLK
Ylpm1	<i>YLP motif-containing protein 1</i>	0,61	0,43	0,36	S579	N.A.	SGGPLPES(1)PR

Wenige Minuten nach IGF-Zugabe konnten für alle drei Zelllinien ähnliche Phosphorylierungsänderungen berechnet werden. Die Signaltransduktion führte innerhalb von 5 min zu differentiellen Phosphorylierungen von *DnaJ homolog subfamily C member 2* (DNAJC2), Signaltransduktionskomponenten (LARP1, DEF6, RGS12), Cytoskelett-Komponenten (STMN1), metabolischen Proteinen (UGDH, PFKFB3) und Proteinen der Autophagie (ATG2B). Für Krebszellen konnten Funktionen einer Akt-abhängige Phosphorylierung von S461 der humanen *6-phosphofructo-2-kinase* (PFKFB3) in der Regulierung der Glykolyse nachgewiesen werden (Bando *et al.* 2005). Die Hochregulierung dieser Phosphorylierung 5 min nach IGF-Induktion steht in Übereinstimmung zu dem verlängerten glykolytischen Phänotyp, der für IGF-induzierte Kulturen über die Metabolit-Analytik beobachtet wurde (siehe Abbildung 19 D-F).

Außerdem konnte 5 min nach IGF-Induktion eine signifikante Herunterregulierung eines einfach phosphorylierten Peptids (S47 und/oder S49) von DNAJC2 und eine signifikante Hochregulierung der S47- und S49-P über ein zweifach phosphoryliertes Peptid berechnet werden. Für DNAJC2 (auch ZRF1) sind Funktionen als Co-Chaperon im Cytosol und zur Chromatin-Regulierung im Zellkern beschrieben (Barilari *et al.* 2017). Es wird vermutet, dass ohne Induktion eine einfache Phosphorylierung an entweder S47 oder S49 vorlag und die Zugabe von IGF eine Hochregulierung der zweiten Phosphorylierung bewirkte. Obwohl eine stetige Entwicklung und Kosten-freie Verfügbarkeit der MaxQuant-Software die Analyse von Phosphorylierungsgeschehen bereits erheblich verbesserte (Cox *et al.* 2009; Cox and Mann 2008; Cox 2016; Tyanova *et al.* 2016), konnten diese beispielhaft aufgeführten Schwierigkeiten der Software-technischen Darstellung eines komplexen Phosphorylierungsgeschehen in einer globalen Analyse hervorgehoben werden. In der Literatur konnte eine mTOR/S6K-vermittelte Aktivierung der S47-Phosphorylierung mit Funktionen in der Seneszenz-Regulierung in Mäusen festgestellt werden, wobei die Möglichkeit

besteht, dass über die Verwendung des Antikörpers (CST, #12397) (Barilari *et al.* 2017) ebenfalls die S49-Phosphorylierung detektiert wurde. Ein *knock-down* von DNAJC2/ZRF1 führte zur verminderten Seneszenz bzw. Alterung der Zellen (Barilari *et al.* 2017). Auch in verschiedenen anderen Studien konnte eine Erhöhung der Lebenszeit nach mTOR-Inhibierung beobachtet werden (Laplane and Sabatini 2012). Trotz der berechneten Hochregulierung der S47- oder S49-Phosphorylierung innerhalb von 5 min nach IGF-Induktion in CHO-Zellen wurde eine erhöhte Lebensdauer der induzierten Kulturen beobachtet. Es wurde vermutet, dass das mTOR-C1-Signaling über *feedback loops* zeitnah beendet wurde und ein aktives mTOR-C2-Signaling eine langfristig hohe Viabilität bewirkte.

Eine Phosphorylierung von LARP1, einem *downstream* Target des mTOR-C1 (Stavraka and Blagden 2015), führt zur Erhöhung der Translationsmaschinerie (siehe 1.1.1). Für LARP1 konnte (wie für DNAJC2) ebenfalls eine Herunterregulierung der einzelnen P-sites S766 (siehe Tabelle 8) und S774 (human) sowie eine signifikante Hochregulierung des zweifach phosphorylierten Peptids berechnet werden. Über die Hochregulierung der mTOR-abhängigen Phosphorylierungen (Hsu *et al.* 2011) konnte eine frühe mTOR-C1-vermittelte Aktivierung der Proteinsynthese-Kapazität in CHO-Zellen nach IGF-Induktion nachgewiesen werden.

Ein weiteres Protein mit IGF-regulierten P-sites ist Stathmin, ein cytosolisches Microtubuli-destabilisierendes Phosphoprotein. Die Inhibierung der Microtubuli-Polymerisation führt zur Microtubuli-Katastrophe, wobei diese Aktivität durch Phosphorylierung an S16, S25, S38 und S63 reguliert wird. Die S16-Phosphorylierung wird über die STK p21-Activated Kinase (PAK) katalysiert, welche selbst über die GTPasen RAC1 und CDC42 aktiviert und über *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF) reguliert wird (Kwon *et al.* 2020). Weitere Phosphorylierungen von STMN werden über die *cAMP-dependent protein kinase* (PKA), CDK, ERK1/2 oder p38 MAPK oder über JNK nach zellulärem Stress katalysiert (Ng *et al.* 2010). Stathmin wurde außerdem als potentielles Target der miRNA-7 evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Zellzyklus-regulierende Protein bei miRNA-7-Überexpression herunterreguliert wird. Insgesamt konnte eine Wachstumsinhibierung und Erhöhung der zellspezifischen Produktivität dieser CHO-Zellen beschrieben werden (Meleady *et al.* 2012a). Die hochregulierten Phosphorylierungsstellen an S16 und S25 nach IGF-Induktion geben Hinweise auf ein direktes differentielles Zellzyklus-modulierendes Signaling, wobei zunächst eine uniforme Inhibierung der Microtubuli-Polymerisation für alle drei Zelllinien bestimmt werden konnte. Dieses frühe und uniforme Zellzyklus-Regulierung wurde für alle drei Zelllinien in Übereinstimmung mit einem signifikanten Anstieg an S-Phase Zellen ca. 15 h nach IGF-Induktion beobachtet (siehe Abbildung 19 I). Durch die Analyse von Top-regulierten Phosphorylierungsstellen nach IGF-Induktion konnte ein einheitliches aktiviertes mTOR-Signaling sowie eine uniforme frühe Zellzyklus-Regulierung für die drei CHO-Zelllinien gezeigt werden, was schematisch in Abbildung 22 B zusammengefasst wurde.

Analyse des IGF-Signalings via KEGG

Eine Proteinannotierung mit *Gene Ontology*- oder KEGG-Annotationen ist für die Berechnung von Anreicherungsstatistiken (z.B. *Fisher exact Test* (Fisher 1922)) und für die Visualisierung von großer Bedeutung. Die KEGG-Annotierungsrate von identifizierten Hamster- bzw. Maus-Proteinen der dualen DB-Suche konnte in Perseus von 14 auf 35 % gesteigert werden, indem die Maus-basierten Annotationen auf äquivalente Hamster Proteine innerhalb einer deNBI-Kooperation transferiert wurden. Diese Annotationen wurden für eine *hypothesis-limited*-Herangehensweise der Datenanalyse genutzt und direkte Komponenten des Insulin-Signalings via KEGG in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Phosphorylierungsänderungen 5 min nach IGF-Induktion für Proteine des Insulin-Signalings (via KEGG). Dargestellt wurde jeweils der \log_2 -transformierte Mittelwert aus den drei biologischen Replikaten der IGF-SILAC-Kultivierung mit den Zelllinien E3, G4 und XL99 berechnet über MaxQuant und Perseus. Phosphorylierungsstellen mit einer Multiplizität von 2 oder 3 wurden in gold markiert.

Gen-name	Proteinname	+/- IGF E3	+/- IGF G4	+/- IGF XL99	P-site	Sequenz +/- 6 AS
Akt1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	0,15	0,22	0,23	S129	GSPSDNSGAEEME
Akt1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	0,15	0,30	0,18	S124	MDFRSGSPSDNSG
Akt1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	-0,29	0,16	0,05	S124	MDFRSGSPSDNSG
Bad	<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>	0,24	0,32	0,30	S52	RELRRMSDEFEGS
Camk2d	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta</i>	0,42	0,24	0,34	T141	TESSNTTIEDEDV
Erk1	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>	-1,86	NaN	-1,69	T88	DHTGFLTEYVATR
Erk1	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>	-1,86	NaN	-1,69	Y90	TGFLTEYVATRWY
Erk2	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	0,48	0,40	0,21	T183	DHTGFLTEYVATR
Erk2	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	0,48	0,40	0,21	Y185	TGFLTEYVATRWY
Gys1	<i>Glycogen [starch] synthase</i>	0,50	0,46	0,24	S485	TPTEPLSPTSSVG
Irs1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>	0,59	0,50	0,81	S3	___MASPPDTDG
Irs2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>	-0,05	-0,39	-0,41	S1165	KRHNSASVENVSL
Prkar1a	<i>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</i>	0,29	0,30	0,21	S83	SREDEISPPPPNP
Raf1	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>	0,37	0,47	0,25	S140	ACTLTTSPRLPVF
Rapgef1	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1</i>	0,39	0,21	0,23	S337	TGKLSRSDEQLSS
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>	NaN	1,75	1,70	S253	SVKEKFSFEPKIR
S6K2	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-2</i>	0,17	0,76	NaN	S139	SPRRLNSSPRTPPI
S6K2	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-2</i>	0,17	0,76	NaN	S146	SPRTPISPLKFSP
S6K2	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-2</i>	0,17	0,76	NaN	T143	LNSSPRTPISPLK
Trip10	<i>Cdc42-interacting protein 4</i>	0,17	0,10	0,16	S296	VMNRVPSDSSLGT
Tsc1	<i>Hamartin</i>	0,64	0,45	0,26	S901	ELFRNKSESQCDE
Tsc1	<i>Hamartin</i>	-0,35	-0,04	-0,32	S314	PRGGFDSPFYRDS
Tsc2	<i>Tuberin</i>	-0,43	0,15	-0,53	S1150	ADLGRLSPESKVR

Die in in Tabelle 9 zusammengefassten Phosphorylierungsänderungen nach IGF-Induktion sollten außerdem visualisiert werden. Dafür wurden die Inhalte der KEGG-, *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA)- und GO BP-Annotationen auf die Schlagwörter „Insulin“- oder „IGF“ gefiltert und entsprechende Proteine in Abbildung 21 mit den berechneten Phosphorylierungsänderungen dargestellt. Die Erstellung von KEGG-unabhängigen eigenen Signaling-Pathways erfolgte in CellDesigner (Funahashi *et al.* 2008). Ein automatisches *mapping* der berechneten Expressionsdaten konnte über die Omics Fusion-Software durchgeführt werden (Brink *et al.* 2016).

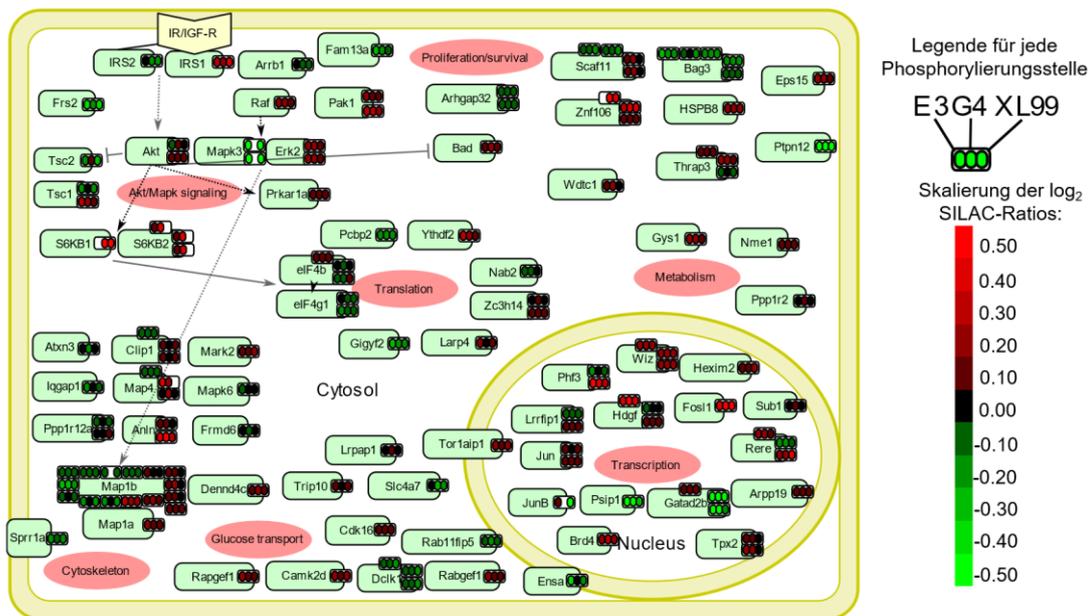


Abbildung 21 IGF-Signaling in CHO-XL99-Zelllinien 5 min nach Induktion. Dargestellt sind Proteine mit signifikant regulierten Phosphorylierungsstellen, welche über die Auswertung des Phospho-SILAC-MS-Ansatz in MaxQuant berechnet wurden. Eine IGF-induzierte Hochregulierung der Phosphorylierung ist dabei (für jede Zelllinie einzeln) in rot und eine Herunterregulierung in grün dargestellt.

Es konnte eine uniforme, also für alle drei Zelllinien geltende, Hochregulierung der Phosphorylierungsstellen der IGF-Signaling-Komponenten Akt, BAD, ERK2, IRS1, RAF1 und PRKAR1A berechnet werden. Für den mTOR-Inhibitor *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC1) konnten sowohl hoch-, als auch herunterregulierte Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Außerdem konnten Herunterregulierungen der Phosphorylierungen von ERK1 und IRS2 bestimmt werden. Die Herunterregulierung der ERK1-Phosphorylierung 5 min nach IGF-Induktion steht im Gegensatz zu publizierten Literaturdaten. Das gut-untersuchte Insulin- bzw. IGF-Signaling führt in tierischen Zellen unter anderem zur Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion (siehe 1.1.1), also zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach Phosphorylierung an T202 und Y204 bzw. T185 und Y187 (für die jeweils humane Proteinsequenz) (Jung and Suh 2014). Über weitere unabhängige Kultivierungen, die Analyse von Zeitreihen und der Verwendung der orthogonalen Methode Westernblot konnte eine hohe Dynamik der Phosphorylierung bestimmt werden. Nach einer

bestätigten kurzfristigen Herunterregulierung konnte die aus anderen Zellen bekannte Hochregulierung der MAPK-Aktivität nach IGF-Induktion für CHO-Zellen gezeigt werden (siehe 4.2.2.2 und 4.2.2.3).

Verbindung von IGF-Signaling, Metabolismus und PTMs

Neben den langfristigen Effekten von IGF auf den Laktatstoffwechsel (siehe Abbildung 19 D-F) konnte über den Phospho-SILAC-Ansatz bereits 5 min nach Induktion eine Regulierung von Glykogen und der Fettsäuresynthese bestimmt werden. Es konnten für alle Zelllinien signifikant regulierte Phosphorylierungsstellen für GYS1, die ATP-citrate synthase (ACLY) und die E3 ubiquitin-protein ligase UBR4, welche über ACLY-Ubiquitinylierung dessen Degradierung katalysiert, detektiert werden. Die Funktion der hochregulierten GYS1-Phosphorylierung ist nicht bekannt. Es konnte jedoch eine leichte reduzierte Hochregulierung für XL99 (siehe Tabelle 9) in Übereinstimmung zur geringeren Expression der GYS1 in XL99 (siehe 4.2.1) bestimmt werden. ACLY spaltet Citrat in Oxalacetat und Acetyl-CoA, welches neben der Fettsäuresynthese auch für die Protein-Acetylierung beispielsweise in der epigenetischen Regulierung benötigt wird (Wellen *et al.* 2009; Narita *et al.* 2019). Für die Akt-abhängige Phosphorylierung von ACLY-S455 (human) wurde ein Transport in den Zellkern und Funktionen in der Histon-Acetylierung beschrieben (Sivanand *et al.* 2017). Die direkte und schnelle Verbindung der Wachstumsfaktor-vermittelten Signaltransduktion über Phosphorylierung zum Metabolismus und der Acetylierung von Proteinen (siehe auch Abbildung 2) konnte somit über den SILAC-Ansatz hier für CHO-Zellen gezeigt werden (siehe Abbildung 22 B). Weitere Regulierungen auf Ebene der Epigenetik wurden für Phosphorylierungen der Histon Lysin Demethylase PHF8 (uniforme Hochregulierung) und Histon Lysin Methyltransferase KMT2D (Herunterregulierung) nachgewiesen. Außerdem wurde ein *crosstalk* zu anderen Signalwegen festgestellt, darunter Verbindungen zum Wnt-Signaling über TNIK (siehe Tabelle 8), die Regulierung des cytoplasmatischen β -Catenin Degradierungskomplex (APC, CTTNA1, NHERF1) und des nuklearen DNA-Bindekomplex von β -Catenin (TLE3, BCL9L, BCL9, BRG1, TRERF1, CITED1). NHERF1 (SLC9A3R1) konnten als *scaffold* Protein inhibierende Effekte auf Wnt/ β -Catenin- und EGFR-Signaling, aber auch Signaling-verstärkende Effekte über die Bindung von *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) nachgewiesen werden. Die Aktivität von NHERF1 wird hauptsächlich über Phosphorylierungen reguliert (Vaquero *et al.* 2017). Für eine NHERF1-S117-Phosphorylierung (Maus) konnte eine signifikante Zelllinien-spezifische Hochregulierung für G4-Zellen berechnet werden, so dass erste Hinweise auf ein differentielles Signaling zwischen den Zelllinien ermittelt werden konnten.

Ein frühes anti-Apoptose-Signaling nach IGF-Induktion

Ein anti-apoptotisches Signaling in Richtung zellulärem Überleben konnte über differentielle Phosphorylierungsstellen für Bad, BCL2L12, DPF2, FOXK2 und Proteine des Tumorsuppressor

p53-Signalwegs, wie das Oncoprotein MDM2 und TP53BP1 analysiert werden. Eine berechnete Hochregulierung der aktivierenden Phosphorylierung von MDM2 (entsprechend S166 in human) führte vermutlich zur Inhibierung durch Ubiquitinylierung von p53 (Mayo and Donner 2001). Ein *pro-survival* Signaling konnte so bereits 5 min nach Zugabe des Wachstumsfaktors für alle drei Zelllinien in Übereinstimmung zu der IGF-erhöhten Lebensdauer der Kulturen analysiert werden. Teilweise konnten jeweils für eine Zelllinie kein Ratio bestimmt werden, wie beispielsweise für S6K β 1 für E3 und S6K β 1 für XL99 (siehe Tabelle 9). Allgemein sind *missing values* jedoch nicht unbedingt durch das Fehlen dieser Phosphorylierung, sondern durch die stochastische Natur der DDA-Messung zu begründen. Für dieses Beispiel hier konnte eine schnelle Aktivierung der S6K über die Verwendung eines anti-P-S6K (T389)-Antikörpers im Westernblot für alle drei Zelllinien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnten vielen Übereinstimmungen des frühen IGF-Signalings in CHO zu dem Insulin-Signaling in Maus-Adipocyten in den Bereichen Glykolyse, Glykogensynthese, Autophagie und Apoptose (Humphrey *et al.* 2013) evaluiert werden (Abbildung 22 B). In der Literatur beschriebene Hinweise auf ein CHO-spezifisches Signaling in der Verarbeitung von ER-Stress (DuRose *et al.* 2006) konnten über die Phosphoproteomanalyse nach Mediensupplementation mit dem Wachstumsfaktor IGF hier nicht direkt beobachtet werden.

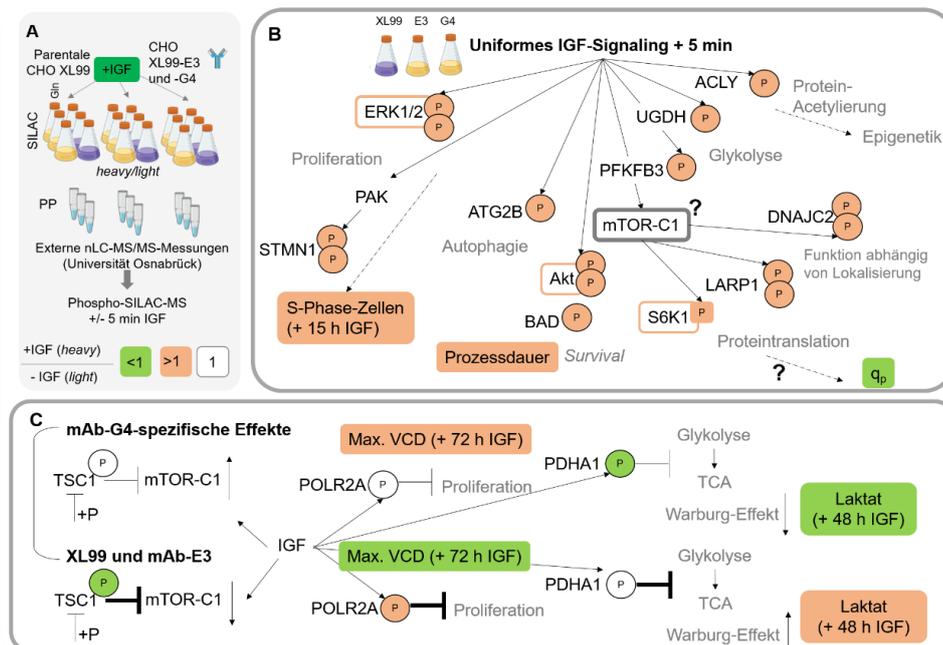


Abbildung 22 Modell des IGF-Signalings in CHO-Zellen evaluiert über Analyse des Wachstums (über Zelldichte und Zellzyklus-Phasenverteilung), Metabolit-Analytik (Glukose und Laktat), Westernblot und SILAC-MS-basierter *Phosphoproteomics* 5 min nach Induktion. **A**) Experimentelles *setup* des parallelen dualen SILAC-Experiments. **B**) Uniformes frühes IGF-Signaling in Übereinstimmung zur späten Zellzyklus-Phasenverteilung und Auswirkungen auf die Prozessdauer. Das frühe aktivierte mTOR-Signaling führte über ungeklärte Mechanismen zu einer späten Reduktion der zellspezifischen Produktivität (q_p). Die via Westernblot detektierten Targets wurden entsprechend einer aktivierenden Hochregulierung farblich umrandet (siehe 4.2.2.2). **C**) Beispiele an spezifischen Regulierungen für mAb-CHO-G4 im Vergleich zur mAb-CHO-E3 und parentalen XL99-Zelllinie.

Es wurde außerdem vermutet, dass die Kultivierung der Zelllinien XL99 in Glutamin-haltigem Medium bzw. der mAb-produzierenden Zelllinien in Glutamin-freiem Medium Effekte auf das IGF-Signaling hatte. In einer Studie an humanen und Mäuse-Zellen wurde die Rolle von Glutamin in der Aktivierung von mTOR-C1 untersucht und herausgefunden, dass bei Aminosäure-Mangel allein eine Supplementierung von Glutamin zur Autophagie-abhängigen Reaktivierung von mTOR-C1 ausreicht (Tan *et al.* 2017). Sowohl der LFQ-Proteomvergleich zuvor ließ ein inaktives AAR-Signaling trotz geringerer Glutamin-Konzentration in mAb-CHO vermuten (siehe 4.2.1) und auch über Westernblot konnte ein aktives mTOR-Signaling in der exponentiellen Phase für alle drei Zelllinien ermittelt werden (siehe 4.2.2.2). Für eine Analyse von spezifischen IGF-Effekten auf die mAb-produzierenden Zellen erfolgte hier eine Gruppierung von E3 und G4 vs. der parentalen XL99. Da über die Kultivierungsdaten und Zellzyklusverteilungen hingegen stärkere Effekte von IGF auf die G4 einerseits und außerdem größere Unterschiede zu E3 und XL99 festgestellt wurden, wurden im Folgenden auch eine G4 vs. E3 und XL99-Gruppierung jeweils über Zweistichproben t-Tests ($p\text{-value} < 0,01$) evaluiert.

Spezifische IGF-Effekte von mAb-produzierenden Zelllinien in Gln-freiem Medium

Für die mAb-produzierenden Zelllinien konnte eine gegenteilige Regulierung (im Vergleich zur parentalen Zelllinie) für Phosphorylierungen der Proteine MCM2, WDR44, SYNM, DOCK5 und SON berechnet werden. Über einen *Fisher exact* Test ($p\text{-value} < 0,01$) wurden die GO BP-Annotierungen ‚*Transcription elongation*‘, ‚*RNA biosynthetic processes*‘ und ‚*Mitochondrion transport*‘ als signifikant angereichert berechnet. Dabei konnten für die ersten beiden Annotierungen mAb-spezifische Herunterregulierungen für das *transcriptional repressor protein lin-54 homolog* (LIN54), den *General Transcription Factor IIF subunit 1* (GTF2F1) und das *NGFI-A-binding protein 2* (NAB2) berechnet werden. Die Herunterregulierung der GTF2F1 T389-Phosphorylierung, welche für Autophosphorylierung bekannt ist und vermutlich an der Regulierung der Transkriptions-Elongation beteiligt ist (Rossignol *et al.* 1999), führte vermutlich zu einer Inaktivierung des Transkriptionsfaktors in den mAb-produzierenden Zellen nach IGF-Behandlung. Insgesamt steht diese potentielle Inaktivierung der Transkriptions-Elongation in Zusammenhang mit der bestimmten reduzierten zellspezifischen Produktivität nach IGF-Induktion. Für die signifikant angereicherte Annotation ‚*Mitochondrion transport*‘ konnte zum Beispiel eine Hochregulierung der S1057-Phosphorylierung des mitochondriale Transportprotein KIF1B für die mAb-produzierenden Zelllinien bestimmt werden. Neben Funktionen im COPI-abhängigen Transport von Golgi zum ER sind keine Auswirkungen einer Phosphorylierung bekannt, aber intrazelluläre Transportproteine konnten zuvor als hochreguliert in *high-producer* CHO-Zellen bestimmt werden (Orellana *et al.* 2015). Außerdem konnten Phosphorylierungen weiterer Transportproteine mit Funktionen in der *Clathrin-Mediated Endocytosis* (CME) als spezifisch für mAb-produzierende CHO-Zelllinien reguliert berechnet werden, darunter ITSN1, DAB2 und

FCHD1. Ein weiterer Bereich, der für die mAb-produzierenden Zelllinien im Vergleich zur parentalen Zelllinie als differentiell reguliert identifiziert wurde, ist der Signaling *crossstalk* zu anderen Signalwegen, darunter Proteine des Wnt-Signalings, wie BCL9 und LEO1 und der *transcriptional activator* GLI3 des Hedgehog-Signalings. Für die S664-GLI3-Phosphorylierung wurde eine signifikante Herunterregulierung in der XL99-Zelllinie und keine Regulierung für die mAb-produzierenden CHO-Zelllinien berechnet. Über eine Phosphorylierung von GLI3 wird die Aktivität als Repressor oder Aktivator reguliert (Niewiadomski *et al.* 2014). Eine Verbindung des Hedgehog- und IGF-Signalings wurde über eine S6K1-katalysierte, aktivierende Phosphorylierung von GLI3 evaluiert (Wang *et al.* 2012). Auch im Bereich des Wnt-Signalings wurde eine Hochregulierung der S301-Phosphorylierung für die XL99-Zelllinie und keine Regulierung für die mAb-produzierenden Zelllinien des *RNA polymerase-associated protein* LEO1 berechnet. Für den Transkriptionsfaktor BCL9, der β -Catenin aktiviert, konnte eine stärkere Herunterregulierung für XL99 als für E3 und G4 berechnet werden. Insgesamt lassen die Daten vermuten, dass in mAb-produzierenden Zelllinien ein geringer IGF-Signaling *crossstalk* vorliegt. Obwohl phänotypisch nach IGF-Induktion wenig Übereinstimmungen zwischen den beiden mAb-CHO-Zelllinien beobachtet werden konnte, wurde teilweise ein spezifisches Signaling in den Bereichen der Transkription, des Signaling *crossstalks* und des Proteintransports evaluiert. Aufgrund der Glutamin-freien Kultivierung der beiden mAb-CHO-Zellen wurde in anschließenden Experimenten eine Glutamin-Abhängigkeit des IGF-Signalings analysiert (siehe 4.2.2.3), wobei jedoch nur geringe Unterschiede im frühen Signaling evaluiert werden konnten.

CHO-G4 spezifische Effekte der IGF-Induktion

Eine auf dem beobachteten Phänotypen-basierende Gruppierung für E3 und XL99 vs. G4-Zellen lieferte ein signifikant differentielles G4-spezifisches IGF-Signaling. Aus 63 signifikant unterschiedlichen IGF-vermittelten Phosphorylierungsänderungen zwischen den Gruppierungen G4 vs. E3 und XL99 führte eine Evaluierung der Top10-Hits zu verschiedenen Clustern, darunter eine entgegengesetzte Regulierung von Phosphorylierungen für PPIL4, UTP3, ABCF1, DEPC6, NPM1 und HMGA1. Weiterhin konnte keine Regulierung für G4 in Kombination zu einer signifikanten Hoch- oder Herunterregulierung für E3 und XL99 für POLR2A, ENSA, RBM25 bzw. umgekehrt für SH3PXD2B, GAPVD1, NPM1 und LARP1 (T503) berechnet werden. Als weiteres Cluster wurde ein allgemein erhöhter Phosphorylierungsstatus für G4 nach IGF-Induktion für die Proteine NHERF1, AHNAK und ARHGEF28 berechnet. Über einen *Fisher exact* Test (p -value < 0,01) konnten die signifikant angereicherten GO BP-Annotierungen ‚*Regulation of dephosphorylation*‘ und ‚*Regulation of RNA splicing*‘ neben anderen ermittelt werden, wobei für ersteres TSC1, ENSA, PPP1R2 und PPP1R12A als differentiell reguliert zwischen G4 vs. E3 und XL99 bestimmt wurden. Ein darüber vermuteter differentieller Dephosphorylierungs-Mechanismus in G4 könnte zu dem insgesamt erhöhten Einfluss von IGF auf die G4-Zellen

beitragen. TSC1 als mTOR-Inhibitor, wird durch S487- und S511-Phosphorylierung inhibiert (Lee *et al.* 2007). Die detektierte herunterregulierte TSC1-Phosphorylierung für E3 und XL99 (und das berechnete \log_2 -Ratio von 0 für G4) ist zwischen den bekannten inhibierenden Phosphorylierungen lokalisiert, so dass eine mögliche geringere Inhibierung von TSC1 zu einer erhöhten Inhibierung von mTOR und darüber zu einer reduzierten mTOR-Aktivität in E3 und XL99 führen könnte (Abbildung 22 C). Eine ektopische Expression von humanen mTOR in CHO-Zellen konnte zu einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsfaktor-Mangel führen (Dreesen and Fussenegger 2011). Im Gegensatz dazu konnte über das differentielle Proteom eine erhöhte mTOR-Aktivität in G4 vermutet werden (siehe Abbildung 18). Über eine Westernblot-basierte Analyse der S2448-Phosphorylierung von mTOR konnten keine Zelllinien-Unterschiede evaluiert werden (siehe 4.2.2.2), worüber jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass andere Phosphorylierungsstellen (Acosta-Jaquez *et al.* 2009) differentiell reguliert vorliegen. Außerdem trägt das hier evaluierte differentielle mTOR-Signalingnetzwerk für G4 vermutlich über unbekannte Mechanismen zur höheren Reaktion dieser Zelllinie auf den Wachstumsfaktor bei.

Das Protein *alpha-endosulfine* (ENSA) ist ein Phosphatase-Inhibitor, dessen Zellzyklus-regulierende Aktivität selbst über spezifische Phosphorylierungen reguliert wird. Die signifikante Herunterregulierung der ENSA-Phosphorylierung in XL99 und E3 (im Vergleich zu keiner Regulierung für G4) führte vermutlich zu einer Deaktivierung und Inhibierung des Voranschreitens im Zellzyklus, was in Übereinstimmung zu der Wachstumsinhibierung in der späten Kultivierungsphase dieser beiden Zelllinien steht. Außerdem konnte für eine aktivierende Phosphorylierung des Protein Phosphatase Inhibitor 2 (PPP1R2) und die zwei Phosphorylierungen S212 und S396 des PP1 *regulatory subunit* 12A (PPP1R12A) ein differentielles Phosphorylierungsprofil für G4 im Vergleich zu E3 und XL99 nach IGF-Induktion berechnet werden. Die aktivierende PPP1R2 S73-Phosphorylierung wird im Menschen von CK2 katalysiert (Korrodi-Gregório *et al.* 2013) und wurde im Zusammenhang zu DNA *damage stress response* gestellt (Tang *et al.* 2008). PPP1R12A, als Bestandteil des Akt-Signalings, hat Funktionen der Regulierung von inhibierender IRS1-Phosphorylierungen über Dephosphorylierung in einem positiven *feedback loop* zur Aufrechterhaltung des IGF-Signalings (Geetha *et al.* 2012). Allgemein konnten große Unterschiede im Dephosphorylierungs-Geschehen und in Signaling-*feedback loops* für die mAb-CHO-G4 ermittelt werden, so dass eine veränderte Signaling-Dauer als Ursache der G4-spezifischen Signaltransduktion vermutet wird.

Die höchsten Unterschiede konnten allerdings für die PPIase PPIL4 mit einer Herunterregulierung der S50-Phosphorylierung für G4 bzw. einer Hochregulierung für E3 und XL99 berechnet werden. PPIL4 hat Funktionen im Splicing und der Stabilisierung von Protein-Interaktionen und der Proteinfaltung, aber auch mögliche Funktionen in der Interaktionen zur RNA Pol II C-terminalen Domäne (Gullerova *et al.* 2006; Thapar 2015), wobei Auswirkungen einer Phosphorylierung nicht bekannt sind. Eine dahingegen gut untersuchte Phosphorylierung ist am S410 der DNA-*directed* RNA

Polymerase II *subunit* RPB1 (POLR2A) lokalisiert. Diese Proliferations-inhibierende Phosphorylierung (Yi *et al.* 2016) konnte für E3 und XL99-Zellen als hochreguliert berechnet werden und trägt somit ebenfalls zur IGF-vermittelten Wachstumsinhibierung dieser Zellen bei. Obwohl sich die IGF-vermittelten proliferativen Effekte von G4-Zellen erst wenige Tage nach Supplementierung zeigen, konnten neben einem uniformen Signaling bereits frühe Hinweise auf ein differentielles sekundäres Signaling zwischen den Zelllinien gefunden werden (Abbildung 22 C).

Über die Metabolit-Analytik konnte ein IGF-induzierter effizienter Shift von der Laktatakkumulation zur Verstoffwechslung für die G4-Zellen ermittelt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die erhöhte Proliferation nach Induktion teils durch diesen Shift basierte. In Übereinstimmung dazu konnte für die gut untersuchte inhibierende Phosphorylierung von PDHA1 (Li *et al.* 2016) eine differentielle Regulierung berechnet werden. Eine Aktivierung von PDHA1 und ein darüber erhöhter TCA-Fluss kann zu einem verringertem Warburg-Effekt führen (Cairns *et al.* 2011; Xu *et al.* 2017b). Eine signifikante Herunterregulierung der Phosphorylierung in G4 nach IGF-Induktion führte in Übereinstimmung zu den Kultivierungsdaten (siehe Abbildung 19) zu einem verringerten glykolytischen Phänotyp (Abbildung 22 C). Auch über LFQ-basierte Proteomdaten konnten deutliche Unterschiede in der Regulierung des PDC bestimmt werden (siehe 4.2.1). Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass Unterschiede im Metabolismus zwischen den Zelllinien in Interaktion zu einem differentiell regulierten Signaling stehen, konnte somit verstärkt werden. Die Phänotypisch-basierte Gruppierung von G4 vs. E3 und XL99 nach IGF-Induktion lieferte Hinweise auf ein differentiell reguliertes Signaling mit Auswirkungen auf Proliferation, Laktatstoffwechsel und der generellen Dauer des Signalings über Dephosphorylierungs-Mechanismen.

4.2.2.2. Kultivierung von drei CHO-XL99 Zelllinien mit IGF-Induktion zur Westernblot-Analyse

Um ausgewählte IGF-regulierte Targets des Phospho-SILAC-MS-Ansatzes über Westernblot zu validieren, wurde die Kultivierung in Standardmedium wiederholt und dabei zusätzlich zur 5 min-Probe eine Zeitreihe an Proben geerntet, darunter vor Induktion (0 min), nach 1, 15 und 60 min sowie 24, 48, 72 und 96 h nach IGF-Induktion. Die zuvor evaluierten Kurzzeiteffekte sollten über eine orthogonale Methode geprüft und die Expression der ausgewählten Phosphoproteine über Westernblot im Kultivierungsverlauf beobachtet werden. Die Auswahl der dafür notwendigen spezifischen Antikörper war bzw. ist limitiert, da kommerziell erhältliche Antikörper gegen Proteine der Maus oder des Menschen gerichtet sind und leichte Unterschiede in der Sequenz zu *C. griseus* bzw. CHO (unvorhersehbar) die Bindungsaffinität des Antikörpers herabsetzen können. Diese Limitierung ist für die Auswahl von phosphorylierten Targets noch deutlicher ausgeprägt, so dass drei Signaling *key player* Akt, mTOR und ERK1/2 ausgewählt wurden. Für diese Kinasen

konnte eine Änderungen im Phosphorylierungszustand kurze Zeit nach Serum-, IGF- oder Insulin-Induktionen gezeigt werden eine Zunahme an Phosphorylierung jeweils als Aktivitäts-fördernd beschrieben werden (Humphrey *et al.* 2015b). Die aktivierenden Phosphorylierungen sind dabei an den Aminosäuren Thr308 von Akt, Thr185/Thr202 und Tyr187/Tyr204 von ERK2/1 und Ser2448 von mTOR der jeweils humanen Proteinsequenz lokalisiert. Im Vergleich zu den Sequenzen von Hamster und Maus ergeben sich Unterschiede in der Lokalisierung der homologen Phosphorylierung. Die entsprechenden UniProt-*identifier* wurden aus dem Phospho-SILAC-MS-Experiment (siehe 4.2.2.1) extrahiert und für CHO bzw. *C. griseus* homologe P-sites an Thr198-Akt (P68180), Thr231/Tyr233-ERK2 (G3I4H1) (oder D3Z6D8 Thr88 und Tyr90 für die entsprechende Maus-Sequenz) und Ser2419-mTOR (G3IEE8) identifiziert.

Die Kultivierung und IGF-Induktion in Standardmedium lieferte reproduzierbare Ergebnisse zum Experiment in SILAC-Medium, wobei die Kultivierungsdaten nur für G4-Zellen in Abbildung 24 A dargestellt wurden. Die Proteine der Proben vor Induktion, sowie die Proben kurzer Zeit (1, 5, 15 und 60 min) und langer Zeit (24, 48, 72 und 96 h) nach IGF-Induktion wurden parallel extrahiert und jeweils zweimal 20 µg Proteinaliquots pro Zelllinie über eine SDS-PAGE und anschließenden Westernblot analysiert. Die Anwendung von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern (Abbildung 23 A) erfolgte über eine getrennte Analyse zur Detektion des totalen Proteins (Abbildung 23 B). Da die Molekulargewichte der Targtes mit ca. 289 kDa (mTOR), 60 kDa (Akt) und 44/42 kDa (ERK1/2) deutlich unterschiedlich sind und für die ausgewählten Antikörper eine geringe Kreuzreaktivität gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die drei Antikörper-Detektionen jeweils auf einer Membran durchgeführt. Ein direkter Vergleich der drei detektierten Targtes ist somit aussagekräftig. Die Coomassie-Nachfärbung der Membran als Ladekontrolle erlaubte Aussagen über eine gleichmäßige Beladung der Gele bzw. Membranen. Um darüber hinaus die Zelllinien miteinander zu vergleichen und gleichzeitig technische Replikate durchzuführen, wurde jeweils die 5 min-Probe der drei Zelllinien für jede Membran mit aufgetrennt.

Obwohl zuvor signifikante IGF-abhängige Hochregulierungen von Phosphorylierungen bekannter mTOR-Targets, wie S6K1 und LARP1, berechnet wurden (siehe 4.2.2.1), konnte interessanterweise für die ausgewählte Phosphorylierungsstelle von mTOR eine gleichbleibende Intensität vor und nach IGF-Induktion über Westernblot ermittelt werden (Abbildung 23 A). Es konnte eine leichte Reduktion der Intensität der Bande von phosphoryliertem mTOR für die mAb-CHO-Zelllinien beobachtet werden, wobei zunächst unklar war, ob eine verminderte Qualität des Westernblots oder die Kultivierung der GS-basierten Zelllinien in Glutamin-freiem Medium Ursache war. In einer vergleichenden IGF-Induktion von G4-Zellen in Medium mit und ohne zusätzlicher Glutamin-Supplementierung konnte jedoch phosphoryliertes mTOR vor Induktion für beide Medientypen ermittelt werden (siehe 4.2.2.3).

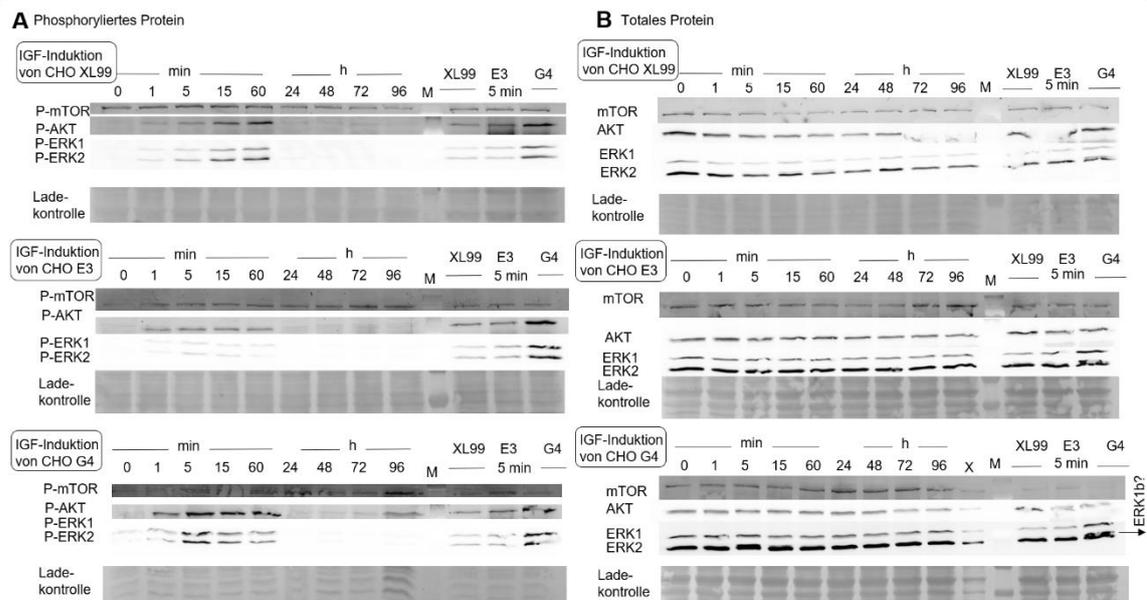


Abbildung 23 Westernblot-Analyse der IGF-Induktion einer Kultivierung der Zelllinien XL99, G4 und E3 in Standardmedium. Die Signaling *key player* mTOR, Akt und ERK1/2 wurden über die Verwendung Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper (A) und Antikörper gegen das totale Protein gerichtet (B) in einer Zeitreihe von 0, 1, 5, 15 und 60 min, sowie 24, 48, 72 und 96 h nach IGF-Induktion analysiert. Die Membranen wurden jeweils für die Detektion der drei Targets (jeweils phosphoryliert und total getrennt) eingesetzt und anschließend für die Bestimmung der Ladekontrolle mit Coomassie nachgefärbt. Für einen Vergleich über verschiedene Membranen wurden jeweils die 5 min Probe der drei Zelllinien (wiederholt) aufgetragen. Insbesondere für G4 konnte eine leichte Doppelbande der ERK1/2-Detektion ermittelt werden. Durch weitere Experimente wurde vermutet, dass es sich um eine alternative Splice-Variante ERK1b handelt (siehe 4.2.2.4), weshalb diese hier entsprechend markiert wurde.

Generell wird in der Literatur beschrieben, dass Phosphorylierungsstöchiometrien von Signalingkomponenten ohne externen Reiz durch zum Beispiel Serum- oder Wachstumsfaktoren nicht berechnet werden können, da die Intensität für einen Nachweis zu gering sei (Humphrey *et al.* 2013), was in etwa einem *on/off*-Mechanismus entspricht. Für CHO-Zellen konnte hier jedoch schon vor IGF-Supplementierung eine aktivierende Phosphorylierung von mTOR nachgewiesen werden. In Übereinstimmung dazu wurde in einer Analyse des Phosphoproteoms von CHO-Zellen über den Kultivierungsverlauf die höchste Abundanz des S2448-Phosphopeptids für Tag 3 berechnet (Kaushik *et al.* 2018). Das hier evaluierte aktivierte mTOR-Signaling in der exponentiellen Phase könnte zum Beispiel durch die ausreichenden Nährstoffbedingungen (Saxton and Sabatini 2017), sekretierte autokrine Wachstumsfaktoren (Lim *et al.* 2013) oder Krebszell-ähnliche Mutationen (Cairns *et al.* 2011) begründet werden.

Die Bande der Phosphorylierung von Akt zeigt eine starke Intensitätszunahme mit variierenden Maxima für die drei Zelllinien. Einen Tag nach der Induktion liegen die Intensitäten der Phosphorylierung im Bereich der Proben vor IGF-Induktion. Der Verlauf der Banden für die Phosphorylierungen an ERK1/2 nach IGF-Induktion ähnelt den Detektionen für die Akt-Phosphorylierung. Eine gleichmäßige Beladung des Gels und der Membran konnte über die

Ladekontrolle beobachtet werden und gewährleistet eine direkte Interpretation der detektierten Banden ohne Software-basierte Normierungsprozesse. Die über das Phospho-SILAC-Experiment berechnete Herunterregulierung für ERK1/MAPK3 (siehe 4.2.2.1) konnte über dieses unabhängige Kultivierungsexperiment und über die Verwendung einer orthogonalen Methode nicht bestätigt werden. Durch ein weiteres SILAC-Experiment konnte eine Herunterregulierung für sehr frühe Zeitpunkte wiederholt berechnet werden, gefolgt von der erwarteten Hochregulierung und damit Aktivierung von ERK1 (siehe 4.2.2.3). Für die IGF-vermittelte Regulierung der aktivierenden Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 konnte auch für CHO eine hohe Dynamik gezeigt werden. Die Detektionen für die totalen Proteinmengen zeigten keine eindeutigen Änderungen im Verlauf der Kultivierung nach IGF-Induktion (Abbildung 23 B). Über die drei Proben des Zelllinienvergleichs (rechts) konnte eine leicht erhöhte Bandenintensität für ERK1 in Proben der G4-Zellen beobachtet werden. Die in Abschnitt 4.2.1 über LFQ-*Proteomics* berechnete signifikante Hochregulierung von ERK1/MAPK3 in G4-Zellen im Vergleich zur parentalen XL99-Zelllinie konnte somit über Westernblot in diesem unabhängigen Kultivierungsexperiment tendenziell bestätigt werden.

Insgesamt konnte nach wiederholter IGF-Kultivierung und unter Anwendung der orthogonalen Methode zur Analyse von Phosphorylierungsänderungen eine Zunahme der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 5 min nach IGF-Induktion gezeigt werden und die ERK1/MAPK3-Hochregulierung in G4-Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie (siehe 4.2.1) bestätigt werden. Zusätzlich konnte über die Analyse der Zeitreihe ein aktives Signaling bis 60 min nach Induktion nachgewiesen werden, wobei neben der stetigen Zunahme der Phosphorylierung in XL99 für die beiden mAb-produzierenden Zelllinien tendenziell eine Abnahme der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 nach wenigen Minuten detektiert werden konnte. Über einen Zelllinienvergleich konnte für die G4-Zellen eine deutlich intensivere Bandenintensität der Phosphorylierungen von Akt und ERK1/2 ermittelt werden. Die Detektion des ERK2-Proteins der Zelllinie G4 erfolgt als leichte Doppelbande, welche deshalb über einen 2D-Westernblot detaillierter analysiert wurde (siehe 4.2.2.4). Außerdem konnte ein aktiviertes mTOR-Signaling in der exponentiellen Phase ohne zusätzliche Wachstumsfaktor-Zugabe festgestellt werden. Im Folgenden sollte evaluiert werden, ob die Supplementierung des Mediums der parentalen Zelllinien einen Einfluss auf das IGF-Signaling in der frühen Kultivierungsphase hat.

4.2.2.3. Westernblot- und SILAC-Experimente zur Analyse des Glutamin-abhängigen IGF-Signaling

Aus den Daten des Phospho-SILAC-IGF-Experiments ließen sich neben weitreichenden Phosphorylierungsänderungen von mTOR- und MAPK-*downstream* Targets auch Unterschiede zwischen den analysierten CHO-Zellen beobachten (siehe 4.2.2.1). Neben spezifischen Effekten für mAb-CHO-G4 wurden Zelllinien-Unterschiede basierend auf der Kultivierung mit Glutamin

(für die parentale CHO-XL99) bzw. ohne zusätzliches Glutamin (mAb-CHO-E3 und -G4) vermutet. Um zu evaluieren, inwieweit diese Unterschiede auf das im Überschuss-vorhandene Glutamin zurückzuführen sind, wurden Experimente zur Interaktion von IGF und Glutamin für die mAb-CHO-G4 durchgeführt.

Inverse Effekte von IGF auf die Proliferation in Medium mit und ohne Glutamin

Zeitgleich zur IGF-Induktion in Standardmedium (siehe 4.2.2.2) wurden Kulturen mit Glutamin kultiviert und die IGF-Induktion in Glutamin-haltigen Medium durchgeführt. Dafür wurden doppelt-negative Kontrollen (w/o IGF, w/o Gln), eine Glutamin-Kontrolle (w/o IGF) sowie IGF-induzierte Kulturen in Glutamin-haltigen Medium durchgeführt. Neben der Analyse des Wachstumsverlaufs wurden außerdem Zellpellets für eine Westernblot-Analyse und Metabolit-Proben für die Bestimmung der finalen mAb-Konzentration geerntet (Abbildung 24). Da keine Replikate zur Mittelwertberechnung durchgeführt wurden und die Berechnung der zellspezifischen Produktivität (vor allem für frühe Zeitpunkte bzw. geringe mAb-Titer) eine hohe Abhängigkeit an konsistente Messungen aufweist, wurde nur der finale mAb-Titer bestimmt und als Richtwert zur Interpretation genutzt.

Die Kultivierungsdaten der wiederholten IGF-Induktion für die Zelllinie G4 in Standardmedium (Abbildung 24 A) zeigen reproduzierbar zu dem in 4.2.2.1 vorgestellten SILAC-Ansatz eine erhöhte maximale VCD durch Zugabe von IGF in der exponentiellen Phase und eine verlängerte hohe Viabilität. Die Zugabe von 8 mM L-Glutamin in das Medium zu Beginn der unregelmäßigen *batch*-Kultivierung der mAb-produzierenden CHO-G4-Zelllinie, welche auf GS-Selektionssystem basiert, führte zu einer erhöhten maximalen VCD ohne Verlängerung der Prozessdauer (Abbildung 24 B). Die Verfügbarkeit von Glutamin im Medium führt vermutlich über eine verminderte *de novo* Glutamin-Synthese zu einer erhöhten Energieverfügbarkeit und damit zu einer gesteigerten Proliferation. Dahingegen wird das schnellere Wachstum der Zellen in Glutamin-haltigen Medium weniger auf einen Genkopienverlusts (aufgrund des Ausbleibens des Selektionsdrucks) zurückgeführt, da bis zur Inokulierung des Experiments mit doppeltem Selektionsdruck (MSX und Glutamin) kultiviert wurde und die Stabilität der rekombinanten Genexpression über einige wenige Tage Voraussetzung für industrielle Prozesse ist.

Über eine parallele Kultivierung mit IGF-Induktion in Glutamin-haltigen Medium konnte eine reduzierte maximale VCD in Kombination zu einer verlängerten hohen Viabilität im Vergleich der Glutamin-haltigen Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 24 C). Die erreichte maximale VCD mit Glutamin und IGF von ca. $80 \cdot 10^5$ Zellen/ml ähnelt der VCD der doppelt-negativen Kontrolle.

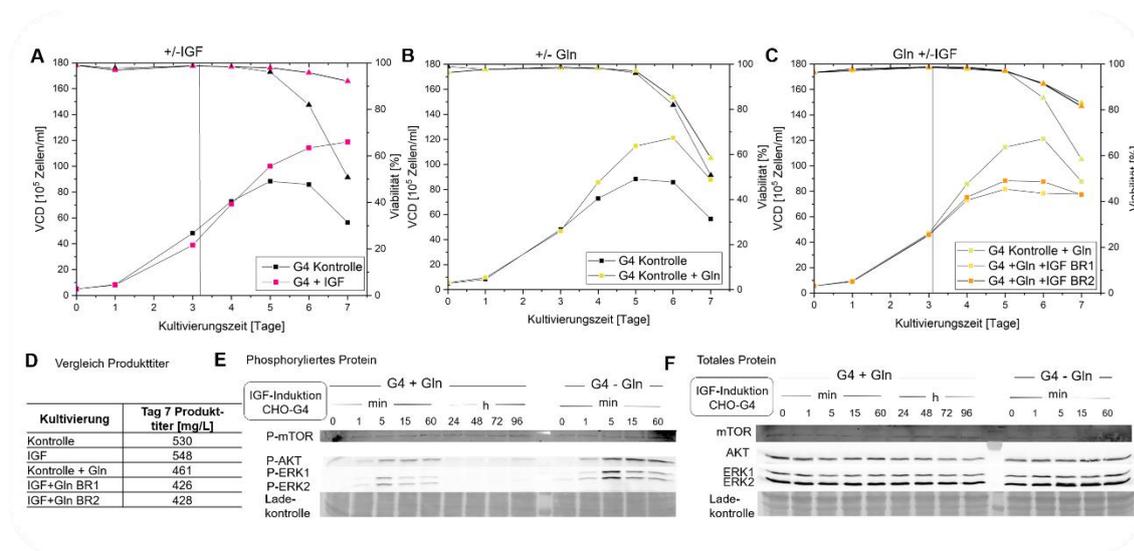


Abbildung 24 Parallele Kultivierung von CHO-G4-Zellen zur Analyse einer IGF-Induktion in Glutaminhaltigen oder -freien Medium mit Bestimmung des finalen mAb-Titers. **A)** Standardmäßige Kultivierung der mAb-CHO ohne Glutamin jeweils mit und ohne IGF-Induktion in der exponentiellen Phase. **B)** Vergleich der Kultivierung mit und ohne Glutamin als wiederholte Auftragung der jeweiligen Kontrollen aus A) und C). **C)** Kultivierung der GS-Selektionssystem-basierten CHO-G4 in Glutamin-haltigem Medium und IGF-Induktion in zwei biologischen Replikaten (BR). **D)** Vergleich der Prozessausbeute über die ermittelten Produkttiter an Tag 7 der Kultivierungen. **E)** Westernblot-basierte Analyse der phosphorylierten Targets mTOR, Akt und ERK1/2 im Kultivierungsverlauf der IGF-induzierten Kulturen ohne Glutamin (aus A) und mit Glutamin (aus B). **F)** Westernblot-basierte Überprüfung der totalen Proteinmenge der drei Targets für die Kultivierungen mit IGF-Induktion in Glutamin-haltigem und -freiem Medium.

Um Rückschlüsse auf die industrielle Relevanz der Kultivierungen zu ziehen, erfolgte ein Vergleich der bestimmten mAb-Produkttiter an Tag 7 der Kultivierungen (Abbildung 24 D). Für die Kultur mit IGF-abhängiger erhöhter maximaler VCD konnte ein geringfügig erhöhter mAb-Titer von 548 mg/l im Vergleich zur Kontrolle im Standardmedium mit 530 mg/l bestimmt werden. Die Kultivierung in Glutamin-haltigen Medium führte hingegen zu einem reduzierten Titer von 461 mg/l und darüber zu einer reduzierten zellspezifischen Produktivität (Daten nicht gezeigt). Eine IGF-Induktion in Medium mit Glutamin führte über eine tendenzielle Erhöhung der zellspezifischen Produktivität zu Produkttitern von 426-428 mg/l für zwei biologische Replikate im Vergleich zu der Kontrollkultivierung in Glutamin-haltigem Medium ohne Wachstumsfaktor-Zugabe.

Unterschiede in der Phosphorylierungs-Intensität aber nicht im Aktivierungsmechanismen

Die Signaling-Mechanismen der beobachteten Proliferationseffekte von IGF auf mAb-CHO-G4 in Glutamin-haltigem und Glutamin-freiem Medium wurden zunächst über eine Westernblot-basierte Analyse von Signaling *key players* evaluiert. Dafür erfolgte eine schnelle Probennahme mit anschließendem Westernblot gegen mTOR, ERK1/2 und Akt sowie gegen die entsprechenden aktivierenden Phosphorylierungen der drei Proteine. Über die Analyse von phosphoryliertem mTOR konnte eine gleichbleibende Intensität vor und nach IGF-Induktion für beide Medientypen

beobachtet werden. Durch Verwendung Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper konnte für 5 min nach IGF-Induktion die stärkste Bande für ERK1/2 für beide Medien detektiert werden (Abbildung 24 E). Eine jeweils schwächere Bande konnte außerdem für die Zeitpunkte 1, 15 und 60 min nach Induktion detektiert werden. Für die Detektion von phosphoryliertem Akt konnte eine Zunahme von 1 bis 5 min und etwa gleichbleibender Intensität für 15 und 60 min nach Induktion für beide Medien bestimmt werden. Über die Auftragung der Proben auf einem Gel bzw. einer Membran konnte ein Unterschied in der Intensität der Phosphorylierung zwischen den zwei Medientypen beobachtet werden, wobei für Zellen aus Medium mit Glutamin eine deutliche geringere Intensität der Phosphorylierung vorlag. Auf Basis der Detektion der totalen Proteinmenge konnte eine leicht erhöhte Proteinexpression von ERK2 in Medium ohne Glutamin vermutet werden (Abbildung 24 F). Über ein weiteres SILAC-Experiment sollte evaluiert werden, ob ein vermutetes differentielles Expressionslevel der Proteine zu den unterschiedlichen Intensitäten der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 und Akt nach IGF-Induktion und zu den inversen Proliferations-Effekten führte. Dabei sollte außerdem geprüft werden, ob die via Westernblot beobachteten, ähnlichen IGF-vermittelten Aktivierungsmechanismen am Beispiel von Akt und ERK1/2 auch global detektiert werden können.

SILAC-basierte Quantifizierung des Phospho/Proteoms

Die entgegengesetzten Effekte von IGF auf die Proliferation in Medium mit bzw. ohne Glutamin sollten mittels quantitativer Phospho/Proteom-Analytik näher analysiert werden. Dafür wurde ein „mini“-dreifach SILAC-Ansatz in 50 ml-Kultivierungsröhrchen und 20 ml Arbeitsvolumen mit je drei biologischen Replikaten durchgeführt, um benötigtes Volumen des teuren SILAC-Mediums einzusparen. Die SILAC-Medien wurden frisch mit den entsprechenden Aminosäuren (siehe 3.1.2) supplementiert. Das *medium*-Medium wurde zu Beginn der Kultivierung mit 8 mM Glutamin supplementiert, die *heavy*- und *light*-Kulturen wurden standardmäßig ohne Supplemente inokuliert und eine IGF-Induktion für *medium* und *light*-Kulturen in der exponentiellen Phase durchgeführt.

Die IGF-Induktion erfolgt bei einer Zelldichte von $58,7$ und $68,0 \cdot 10^5$ Z/ml von mAb-G4-Zellen in *light*- bzw. *medium*-Medium. Die Zugabe von Glutamin in das *medium*-SILAC-Medium führte zu höheren Wachstumsgeschwindigkeiten und damit zu einer höheren Zelldichten zum Zeitpunkt der IGF-Induktion. Die *heavy*-Kontrollkultur wies an Tag 3 eine mittlere Zelldichte von $56,8 \cdot 10^5$ Z/ml, vergleichbar zu dem bis dahin parallelen *light*-Ansatz auf und diente in diesem Experiment als doppelt-negative Kontrolle (w/o Gln, w/o IGF, Abbildung 25 A). Für eine anschließende Proteomanalyse wurden vor der IGF-Induktion (0 min) und 1,5; 5; 15 und 60 min nach Induktion Zellen geerntet, diese für die Probenvorbereitung vereint, Proteine entsprechend des TE-Pufferbasierten Proteinextraktionsprotokolls (mit Einsatz von Protease- und Phosphataseinhibitoren) extrahiert, verdaut und zusätzlich für eine TiO_2 -basierte PP-Anreicherung eingesetzt. Für die

Kultivierungsdaten konnte eine deutlich verminderte Reproduzierbarkeit und ein Einbruch der Viabilität nach der Induktion an Tag 3 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass neben der veränderten Geometrie des Kultivierungsgefäßes vor allem das Restvolumen in den Kultivierungsröhrchen nach Induktion und häufiger Probennahme für ein reproduzierbares Wachstum zu gering war.

Das differentielle Proteom von mAb-CHO in Medium mit und ohne Glutamin

Für einen Proteomvergleich der mAb-CHO-G4 in Gln-haltigen und Gln-freien Medium wurden Messungen der drei biologischen Replikate des „mini“ dreifach SILAC-Experiments vor IGF-Induktion ausgewertet. Die Ratios M/H und M/L stellten hier zwei technische Replikate des Vergleichs von Gln-haltigen und -freiem Medium dar. Das Ratio L/H konnte außerdem für eine Überprüfung von gleichen Kultivierungsbedingungen in der exponentiellen Phase genutzt werden (Abbildung 25 B). Für den Proteomvergleich der Zellen aus Glutamin-haltigem Medium im Vergleich zur Kontrolle konnten im Überlapp der beiden technischen Replikate 36 Proteine über jeweils einen Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,01$, $S0:0,1$) als signifikant differentiell exprimiert berechnet werden (siehe Anhang Tabelle 20). Durch statistische Absicherungen konnten die Proteine DNA Topoisomerase 2- α (TOP2A), *Heat Shock Protein* β -1 (HSPB1), *Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase* (HMGCS1), AHCYL1 und UBAP2L als Top5-hochregulierte Proteine in Glutamin-haltigem Medium und GLUL, CTSB, AHNAK, CAT und GSTM5 als entsprechend herunterreguliert berechnet werden. Für ERK konnten jeweils nur quantitative Werte für ein biologisches Replikat berechnet werden, weshalb keine abgesicherten Aussagen zu einer möglichen Glutamin-abhängigen Expression getroffen werden konnten.

Substraktive Herangehensweise führt zur Evaluierung einer mAb-spezifischen Proteinexpression

Im Vergleich zu der über LFQ berechneten differentiellen Proteinexpressionen zwischen XL99 und G4 (siehe 4.2.1) konnte eine übereinstimmende Hochregulierung von HSPB1 und Herunterregulierung von GLUL und GSTM5, sowie weiteren Proteinen, wie GSTP1, AHNAK und TES für die Kultivierung in Glutamin-haltigem Medium bestimmt werden. Signifikant gegensätzliche Regulierungen der beiden experimentellen *setups* wurden jedoch für die Proteine CTSB, PRDX1 und Cornifin-A (SPRR1A) beobachtet (hochreguliert in XL99 (+ Gln) und herunterreguliert in G4 + Gln), weshalb Glutamin-unabhängige Zelllinienunterschiede für diese Proteine vermutet wurden. PRDX1 konnte zum Beispiel in vielen Studien an CHO-Zellen als signifikant reguliert berechnet werden (Meleady *et al.* 2012a; Orellana *et al.* 2015; Wingens *et al.* 2015; Sommeregger *et al.* 2016; Darja *et al.* 2016). Da sowohl für PRDX1 als auch GSTP1 beschrieben wird, einen direkten Einfluss auf das MAPK-Signaling zu haben, konnten Hinweise für eine Gln-abhängige und Gln-unabhängige, also Zelllinien-spezifische Signaltransduktion gefunden werden.

Identische Signalingmechanismen trotz differentieller Phosphoproteinexpression

Im Vergleich zu dem zweifachen Phospho-SILAC-IGF-Experiment (siehe 4.2.2.1) erfolgte für dieses „mini“ dreifach-SILAC-IGF-Experiment ein *label-swap* von *heavy*- und *light*-Medium und eine zusätzliche IGF-Induktion in *medium*-Medium, welches zu Beginn mit Glutamin supplementiert wurde (Abbildung 25 A). Die zu evaluierenden Ratios L/H, M/L und M/H wurden über die *default* Ratios der MaxQuant-Software mittels 1/x-Transformation in Perseus berechnet (Abbildung 25 A). Im Mittel konnten beispielsweise für den L/H-Vergleich pro Zeitpunkt 1.678 ± 402 Phosphorylierungsstellen quantifiziert werden. Insgesamt konnten für 3.364 Phosphorylierungsstellen quantitative Daten in diesem Experiment ermittelt werden.

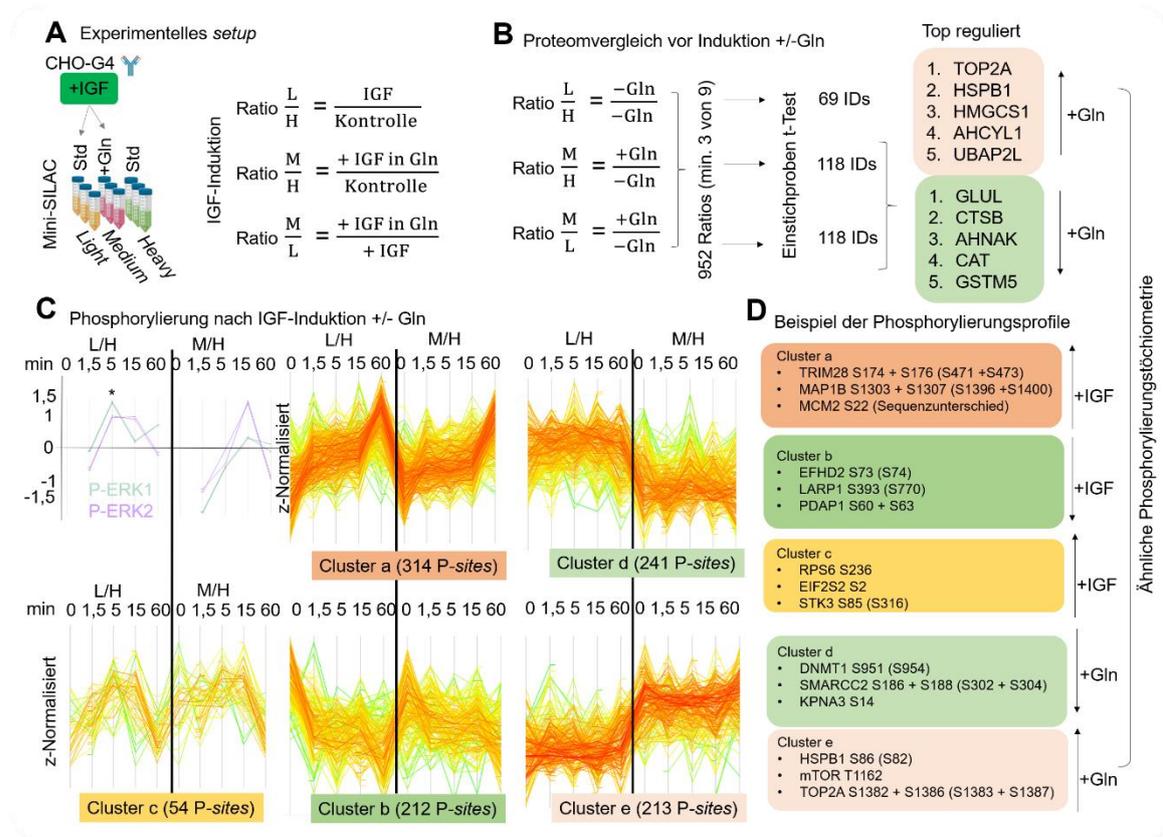


Abbildung 25 Dreifaches „mini“ SILAC-Experiment der CHO-G4-Zellen zur Analyse der Interaktion von Glutamin und IGF. **A)** Experimentelles *setup* mit IGF-Induktion an Tag 3 in Glutamin-freiem (*light*) und Glutamin-haltigem (*medium*) Medium im Vergleich zur Kontrolle ohne Induktion (im *heavy*-SILAC-Medium). **B)** Proteomvergleich in der exponentiellen Phase in Medium mit und ohne Glutamin jeweils über einen Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,05$, $S0:0,1$) und Extraktion von überlappend signifikant exprimierten Proteinen aus den Ratios M/H und M/L. **C)** Phosphoproteomanalysen vor Induktion (0 min), 1,5, 5, 15 und 60 min nach IGF-Induktion beispielhaft anhand der dualen aktivierenden Phosphorylierung für ERK1/2. Nach Median-Berechnung, Filterung für 70 % valide Werte und Normalisierung über *z-scoring* wurde eine *unbiased* hierarchisches Clustering der Ratios durchgeführt und die fünf von sechs prominentesten Cluster abgebildet. **D)** Beispielhafte Phosphorylierungs-Profile der in C) dargestellten Cluster inklusive Angabe der Lokalisierung der Phosphorylierung im identifizierten Phosphoprotein und ggf. Lokalisierung in der humanen Proteinsequenz in Klammern.

Für die aktivierenden dualen Phosphorylierungen von ERK1/2 konnte, wie erwartet, eine signifikante Hochregulierung 5 min nach IGF-Induktion in Glutamin-freiem Medium ermittelt werden. Für den Vergleich der jeweiligen P-ERK1/2-Profile der IGF-Induktion in Glutamin-freiem (L/H) und Glutamin-haltigem (M/H) Medium konnten leichte Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 25 C). Wie bereits über Westernblot beobachtet (siehe Abbildung 24), konnten tendenziell schwächere Phosphorylierungsänderungen von ERK1/2 nach IGF-Induktion in Gln-haltigen Medium berechnet werden. Insgesamt konnte eine schnelle Regulierung der Phosphorylierungen nach IGF-Induktion festgestellt werden und für sehr kurze Zeitpunkte auch negative Ratios, also Herunterregulierungen, berechnet werden. Die über das erste Phospho-SILAC-Experiment ermittelte Herunterregulierung der aktivierenden MAPK3/ERK1-Phosphorylierung 5 min nach IGF-Induktion (siehe 4.2.2.1) konnte somit über diese Analyse der dynamischen Zeitreihe mit einer leichten zeitlichen Verzögerung reproduziert werden.

Für eine globale Darstellung der berechneten Phosphorylierungsänderungen nach IGF-Induktion dienten 1.044 Phosphorylierungsstellen nach einer Filterung auf mindestens 70 % valide Quantifizierungsdaten. Nach Berechnung von Median-Ratios der drei biologischen Replikate wurden die Daten über *z-scoring* normalisiert, ein *unbiased* hierarchisches Clustering der Ratios berechnet und mit einem *distance threshold* von 3,7 sechs Cluster für die Phosphorylierungs-Profile extrahiert. Die fünf frequentiertesten Cluster wurden in Abbildung 25 C dargestellt. Über einen Einstichproben t-Test (*p-value* < 0,01, *S0*:0,1) wurden außerdem signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (w/o IGF, w/o Gln) ermittelt. In Cluster a wurden Phosphorylierungs-Profile dargestellt, die für beide Medientypen eine tendenzielle Hochregulierung nach IGF-Induktion zeigten. Für die analysierten Zeitpunkte nach IGF-Induktion (1,5, 5, 15 und 60 min) konnte überwiegend eine kontinuierliche Zunahme mit einem Maximum nach 60 min ermittelt werden. Beispiele dieser IGF-vermittelten Hochregulierung sind die S174- und S176-Phosphorylierung von TRIM28, die MAP1B S1303- und S1307-Phosphorylierung und eine S22-Phosphorylierung von MCM2, für die aufgrund von Sequenzunterschieden zum homologen humanen Protein keine entsprechend humane *P-site* angegeben werden konnte. TRIM28 (TIF1B/KAP1) gilt als *key factor* der Genomintegrität, wobei die S473-Phosphorylierung (hier S176) als notwendig beschrieben wird, um nach der Zellteilung entsprechende Heterochromatin-Markierungen wiederherzustellen (Jang *et al.* 2018). In publizierten Phosphoproteom-Analysen von CHO-DP12-Zellen konnte eine signifikante Abnahme von Tag 2 auf Tag 3, gefolgt von einer Zunahme der Abundanz dieses PP im Kultivierungsverlauf nachgewiesen werden, wobei für das entsprechende unphosphorylierte Peptid im Kultivierungsverlauf keine Änderungen beobachtet wurden (Kaushik *et al.* 2018). Die Verbindung von TRIM28 zum mTOR-C1-Signaling wurde von den Kaushik *et al.* nicht diskutiert. In Inhibitor-Studien an humanen Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Heterochromatin-induzierende Aktivität von TRIM28 über eine Phosphorylierung

von mTOR inhibiert wird (Rauwel *et al.* 2015). Die späte signifikante Hochregulierung nach IGF-Induktion für beide Medientypen gibt Hinweise auf ein sekundäres IGF-Signaling mit potentiell inhibierenden Auswirkungen auf die Chromatin-Zugänglichkeit. Für die IGF-abhängige Hochregulierung der MAP1B-Phosphorylierung S1303 und S1307 konnten hingegen leichte Unterschiede zwischen Glutamin-freiem (H/L) und Glutamin-haltigem (M/H) Medium beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In PSP wurden die entsprechenden Phosphorylierungsstellen an S1396 und S1400 der humanen Proteinsequenz mit 73 bis 91 *High-Throughput-Paper* (HTP) zitiert. In SEAP-CHO-Zellen wurde eine signifikante Herunterregulierung von vier anderen MAP1B-PP nach Temperaturshift beschrieben und in Zusammenhang einer komplexen cytoskeletalen Reorganisation gebracht (Henry *et al.* 2017b). Eine differentielle IGF-abhängige Organisation des Cytoskeletts in den zwei Medientypen gibt frühe Hinweise auf die beobachteten Unterschiede auf Kultivierungsebene.

Profile mit einer Herunterregulierung der Phosphorylierung nach IGF-Induktion wurden in Cluster b zusammengefasst, darunter beispielsweise die P-S393 des LARP1 (T770 human) und P-S60 sowie -S63 des 28 kDa *heat- and acid-stable phosphoprotein* PDAP1. Insgesamt konnte über den mini-dreifach-SILAC-Ansatz 13 Phosphorylierungsstellen von LARP1, einem *key regulator* der Proteintranslation (Tcherkezian *et al.* 2014), identifiziert und davon 6 *P-sites* quantifiziert werden, darunter S250, S254, S389, S393, S397 und S447. Einzeln konnte für die Stellen S389, S393 und S397 jeweils eine Herunterregulierung (teilweise signifikant) über eine identische Peptidsequenz (SLPTTVPESPNYR) berechnet werden. Für eine zweifach phosphorylierte Form des Peptids, welches die drei Stellen abdeckt, konnte hingegen eine signifikante Hochregulierung bestimmt werden, weshalb diese Phosphorylierung dem Cluster a zugeordnet wurde. Die gute Qualität der MS/MS-Spektren ließ eine Lokalisierung der Phosphorylierungen an S389 und S397 mit 99 % Wahrscheinlichkeit zu. In dem dualen Phospho-IGF-SILAC-Experiment konnte neben einer uniformen Herunterregulierung einzelnen Phosphorylierungen ebenfalls eine Hochregulierung von zweifach phosphorylierten Peptiden und auch eine Zelllinien-spezifische Hochregulierung der P-T503-LARP1 nur für die G4-Zelle berechnet werden (siehe 4.2.2.1). Eine berechnete schnelle Herunterregulierung eines einfach phosphorylierten Peptids kann über zwei biologisch gegensätzlich Mechanismen zurückgeführt werden, entweder beruht die Herunterregulierung auf einer aktiven Dephosphorylierung durch Phosphatasen oder auf einer Zunahme von mehrfach-phosphorylierten Peptiden. Die insgesamt schnelle und bis mindestens 60 min ansteigende beobachtete IGF-abhängige Phosphorylierung von LARP1 und Aktivierung der mRNA-Translation konnte somit erstmals für CHO-Zellen gezeigt werden. LARP1 reguliert beispielweise die mRNA von HSPA5 und MDM2 (Stavraka and Blagden 2015) und konnte in HEK293-Zellen nach Angiotensin-Behandlung als vermehrt phosphoryliert identifiziert werden (Christensen *et al.* 2010).

Insgesamt stellen Proteine der *La-Related Proteins* (LARP) (Stavraka and Blagden 2015) interessante Targets für eine gezielten Aktivierung zur CHO-Prozessoptimierung dar.

Cluster c enthält Phosphorylierungs-Profile mit einer IGF-abhängigen Zunahme innerhalb weniger Minuten und einer anschließenden Abnahme der Phosphorylierung 60 min nach IGF-Induktion. Beispielhafte kurzzeitige Phosphorylierungsänderungen sind RPS6 S236, eIF2S2 S2 und STK3/MST2 S85 (bzw. S316). Obwohl andere Komponenten des eIF2-Komplexes durch Phosphorylierung inhibiert werden, konnte hier eine IGF-abhängige signifikante Hochregulierung der S2-Phosphorylierung von eIF2S2 für 15 min nach IGF-Induktion in Glutamin-haltigem Medium bestimmt werden. Über einen Vergleich von ER-Stress-Reaktionen in CHO und Maus 3T3-Zellen wurde in der Literatur das Vorliegen eines CHO-spezifische Mechanismus zur eIF2 α -Phosphorylierung vermutet (DuRose *et al.* 2006), weshalb weitere Experimente notwendig wären, um die Funktion dieser Phosphorylierungen zu evaluieren.

Eine signifikante Hochregulierung der RPS6-S236-Phosphorylierung 5 min nach IGF-Induktion in beiden Medientypen gibt weitere Hinweise auf ähnliche Signaltransduktionsmechanismen, die zuvor Anhand von ERK1/2 und Akt über Westernblot beobachtet wurden. Diese Phosphorylierungsstelle ist sehr gut erforscht und wurde mit 164 LTP- und über 1.000 HTP in der PSP-Datenbank zitiert. In einer *batch*-Kultivierung von mAb-CHO konnte ein höhere Phosphorylierung in der exponentiellen Phase nachgewiesen werden (Jossé *et al.* 2016). Eine via mTOR-C1 aktivierte S6K kann RPS6 an vier Stellen phosphorylieren, darunter S235, S236, S240 und S244. Eine ERK-aktivierte RSK phosphoryliert hingegen mTOR-unabhängig die ersten beiden genannten Stellen des RPS6 C-Terminus. Über einen spezifischen Antikörper gegen die insgesamt vorkommenden fünf P-sites des RPS6 C-Terminus wurde eine Herunterregulierung nach *Amino Acid Response* (AAR)-Signaling in HEK293-Zellen gezeigt (Acosta-Jaquez *et al.* 2009). Obwohl die Hochregulierung hier entweder über S6K1 oder RSK katalysiert wurde, führt eine erhöhte Phosphorylierung vermutlich zur Assemblierung von 40S Ribosomen an der mRNA und somit zu einer erhöhten Proteintranslation. Die beobachtete schnelle Herunterregulierung innerhalb von 60 min lässt auf schnelle *feedback loops* schließen, die zur Beendigung der Signaltransduktion führten. Auch eine Phosphorylierung von STK3 wies eine schnelle Hoch- und Herunterregulierung auf. STK3 ist eine pro-apoptotische Kinase, wobei für die hier regulierte S316-Phosphorylierung (human) Funktionen auf das Voranschreiten im Zellzyklus beschrieben wurden (Mardin *et al.* 2011). Über die SILAC-basierte Analyse einer Zeitreihe nach IGF-Induktion konnte eine Reversibilität des IGF-abhängigen mTOR-Signalings evaluiert werden. Eine vermutete langfristige Inhibierung des mTOR-Signalings wird in Zusammenhang zu den reduzierten zellspezifischen Produktivitäten der mAb-CHO im weiteren Kultivierungsverlauf nach IGF-Zugabe gebracht.

Neben der deutlichen IGF-abhängigen Regulierung mancher Phosphorylierungsstellen konnten mit Cluster d und e zwei Cluster extrahiert werden, die eine Glutamin-abhängige Herunter- bzw. Hochregulierung der Phosphorylierungen ohne deutliche IGF-abhängige Effekte zeigte. Dabei kann entweder die Proteinexpression oder der Phosphorylierungsgrad in den zwei Medientypen differentiell reguliert vorliegen. In Glutamin-haltigem Medium konnte im Vergleich zum Glutamin-freien Medium ein reduziertes Ratio für die Phosphorylierungen S951-DNA (*cytosine-5*)-*methyltransferase* 1 (DNMT1), S186- und S188-SMARCC2 und S14-KNPA3 und ein erhöhtes Ratio für S86-HSPB1, T1162-mTOR und S1383- und S1387-TOP2A im Verlauf vor bzw. nach IGF-Induktion ermittelt werden. Für DNMT1 konnte aufgrund sehr variabler Protein-Ratios keine Phosphorylierungs-Stöchiometrie berechnet werden. Für die Proteine mTOR, SMARCC2 und KNPA3 konnten, vermutlich aufgrund einer zu geringen Abundanz, keine quantitativen Daten im Proteomansatz bestimmt werden, so dass auch keine Aussagen über die Phosphorylierungs-Stöchiometrien gemacht werden konnten. Für TOP2A und HSPB1 konnte hingegen ein erhöhtes Protein-Ratio (Abbildung 25 B) ermittelt werden. In Zusammenhang zu dem ebenfalls erhöhten Ratio der Phosphorylierung konnte für TOP2A und HSPB1 eine Hochregulierung auf Proteinebene durch die höhere Konzentration an Glutamin im Medium der mAb-CHO nachgewiesen werden.

Über einen Vergleich der IGF-Induktion von mAb-GS-CHO in Medium mit und ohne zusätzliche Supplementierung von Glutamin konnten vor allem Unterschiede in der Phosphoprotein-Expression ermittelt werden. Es wird vermutet, dass diese differentielle Expression zu einer veränderten Signaling-Intensität führte, welche wiederum vermutlich in Verbindung zu den beobachteten inversen proliferativen Effekten steht. Obwohl ein größtenteils einheitliches frühes IGF-Signaling beobachtet werden konnte, führte ein intensiveres MAPK-Signaling zur Aktivierung der Proliferation und ein schwächeres MAPK-Signaling zur Inhibierung der Proliferation. Die Mechanismen, die von einem ähnlichem frühen Signaling zu späten inversen Effekten auf die Proliferation führten, bleiben jedoch ungeklärt und müssten in an diese Arbeit anschließende Experimente, zum Beispiel über Proteom- und Metabolomanalysen des weiteren Kultivierungsverlaufs, evaluiert werden.

4.2.2.4. Charakterisierung von ERK1/2 in CHO

Für das in Menschen oder Mäusen gut-untersuchte MAPK-Signaling liegen kaum Daten für CHO-Zellen vor. Sowohl die differentielle Expression von MAPK3 zwischen den Zelllinien G4 und XL99 als auch das dynamische MAPK-Signaling erforderten daher eine spezifische Analyse des Signalings in CHO-Zellen. Die beiden humanen Kinasen ERK1 und ERK2 weisen eine Sequenzübereinstimmung von 84 % auf, wobei ERK1 durch eine C- und N-terminale Verlängerung ein höheres Molekulargewicht als ERK2 aufweist (Buscà *et al.* 2016). Für die Spezies *M. musculus* und *C. griseus* ergibt eine Literaturrecherche unterschiedlich annotierte Molekulargewichte. Die

für Maus in UniProt hinterlegten Sequenzen führen zu einem geschätzten Molekulargewicht von 43,1 kDa und 41,3 kDa für ERK1 und ERK2. Für *C. griseus* ist nur für ERK1 eine Sequenz mit einem geschätzten MW von 46,6 kDa in der UniProt-Datenbank enthalten. Die NCBI-Datenbank listet hingegen eine ERK1 Isoform X2 mit 37,7 kDa und ein ERK2 *like-protein* mit 39,3 kDa. Es soll daher im Folgenden geprüft werden, ob in CHO eine zum Menschen umgekehrte Größenverteilung der beiden Proteine vorliegt.

Für eine MS-basierte Validierung der mittels Westernblot-detektierten Banden (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24) wurde aus einer SDS-PAGE-Spur einer 5 min IGF-Induktionsprobe von CHO-XL99-G4 drei Banden ausgeschnitten (Abbildung 26 A), in-Gel tryptisch verdaut und die Hälfte der Probe (5 µl) in einer 15 min Methode über die nLC-MS/MS-Strecke vermessen. Nach erfolgter DB-Auswertung über Proteome Discoverer (PD) mit MS Amanda 2.0-Suchmaschine und *Fixed Value PSM Validator* wurde die Messung unter Verwendung einer *exclusion list* mit 4,5 µl Probe (ca. die Hälfte) wiederholt. Trotz ähnlicher Injektionsvolumina lassen sich insgesamt deutlich mehr Peptide für die Daten der zweiten Messrunde identifizieren. Ein Vergleich der UV-Spektren zeigt ähnliche Intensitäten auf Basis der nLC-Trennung der Peptide. Die *Base Peak Chromatogram* (BPC)-Intensitäten der Orbitrap unterscheiden sich dahingegen deutlich von maximal $3,4 \cdot 10^8$ zu $1,5 \cdot 10^9$ für die beiden Messrunden. Es ist eine deutlich bessere Gesamtperformance der Orbitrap während der zweiten Messrunde anzunehmen, so dass die Ergebnisse der Messung mit und ohne *exclusion list* nur bedingt verglichen werden konnten.

In einer zusammengefassten Analyse der Datensätze konnte eine Sequenzabdeckung von 32 % für MAPK1/ERK2 für die unteren beiden Gelbereiche und 37 % für MAPK3/ERK1 für die Probe des oberen Gelbereichs erreicht werden (Abbildung 26 A). Die Identität, der im Westernblot detektierten Banden, konnte somit über die Methodik des präzisen in-Gel-Verdaus mit anschließender nLC-MS/MS-Messung bestätigt werden. Basierend auf diesen Daten wird davon ausgegangen, dass auch in CHO-Zellen die Molekulargewichte von ERK1 > ERK2 (analog zur Maus und Human) gelten.

In der Literatur wird beschrieben, dass aktiviertes, phosphoryliertes ERK1/2 aus dem Cytosol in den Zellkern transportiert wird, wo es Substrate, wie Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und so zu einer Transkriptionsregulierung führt. ERK1/2 wird daraufhin dephosphoryliert und die Signalkaskade terminiert (Buscà *et al.* 2016). Über eine Phosphoproteom-Studie konnte eine Vielzahl von ERK-Substraten identifiziert und validiert werden, darunter zum Beispiel der transkriptionale Regulator JunB (Courcelles *et al.* 2013).

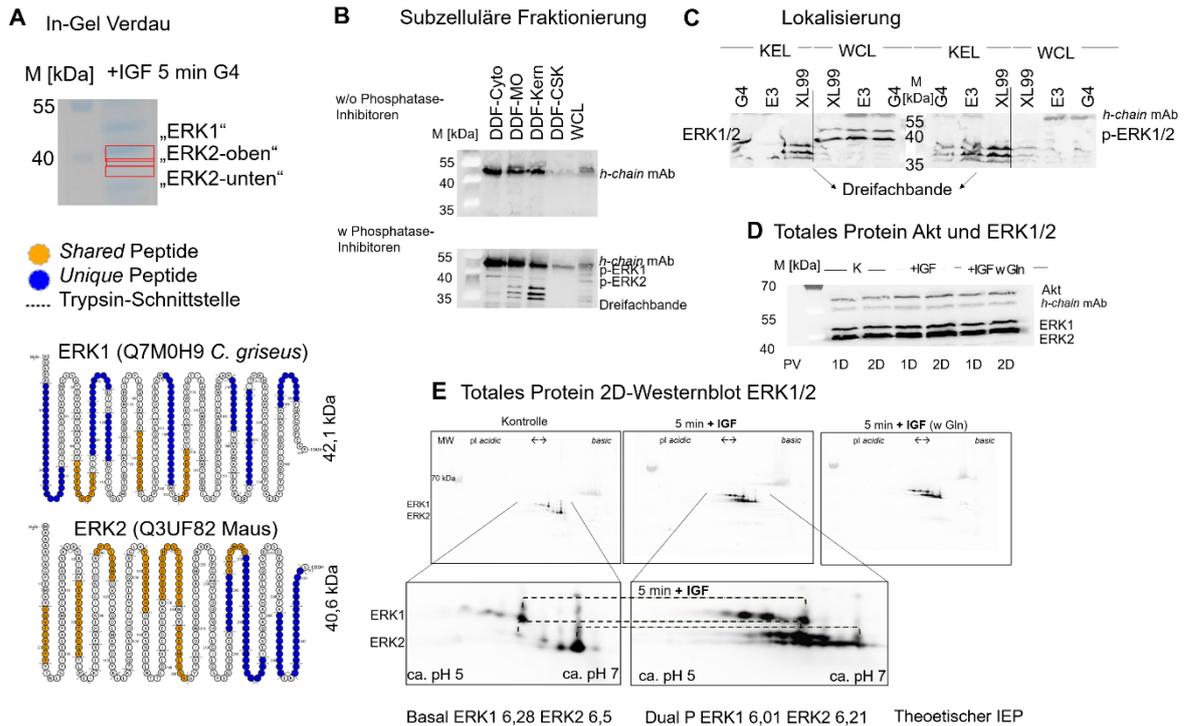


Abbildung 26 Zusammenfassung von Ergebnissen zu den Proteinen ERK1/2 in CHO-XL99-Zelllinien. **A)** In-Gel Verdau von ERK1 und ERK2 (aufgeteilt in die Banden „oben“ und „unten“), nLC-MS/MS-Messung und PD-basierte DB-Auswertung führt zur Identifikation vieler ERK1/2-Peptide. Die gemeinsamen Peptide für ERK1 und ERK2 (*shared*) sind in orange und die *unique* Peptide in blau in der jeweiligen Proteinsequenz (über Protter) visualisiert. **B)** Differentielle Detergens Fraktionierung (DDF) von CHO-G4-Zellpellets in die cytosolische (Cyto), Membran-Organell (MO)-, Kern- und Cytoskelett (CSK)-Fraktion im Vergleich zum *Whole Cell Lysate* (WCL). Anti-P-ERK1/2 Westernblot für Fraktionen ohne und mit Zusatz von Phosphataseinhibitoren in den jeweiligen Extraktionspuffern. **C)** Weitere parallele Fraktionierung von Zellpellets in Kern-Proben (KEL) und Gesamtproteomproben (WCL) und Westernblot gegen totales (links) und phosphoryliertes ERK1/2 (rechts). In den Kern-Proben konnte mit beiden Antikörper-Detektionen eine auffallende Dreifachbande dargestellt werden. **D)** 1D-Westernblot mit anti-Akt und anti-ERK1/2 zur Detektion des totalen Proteins von Kontrollproben (K) und Proben 5 min nach IGF-Induktion in Standardmedium (+IGF) und in Medium supplementiert mit Glutamin (+IGF w Gln). Außerdem wurde die 1D- bzw. 2D-Probenvorbereitung (PV) als möglicher Einflussfaktor auf die Antikörperbindung getestet. **E)** Mini-2D-Westernblot (Parallel zu E) zur Detektion von totalem ERK1/2-Proteinen für Kontrollproben, sowie Proben 5 min nach IGF-Induktion in Standardmedium und Glutamin-supplementiertem Medium (5 min + IGF, w Gln), wobei die Detektionen jeweils vergrößert wurden, um die Molekulargewichtsverschiebungen genauer analysieren zu können. Die theoretischen IEPs wurden mit dem ExPASy tool „Compute pI/MW“ berechnet.

Um die Lokalisierung von aktiviertem, phosphorylierten ERK in CHO-Zellen zu überprüfen, wurden verschiedene Proteinextraktionsmethoden und ein entsprechender Westernblot zur gezielten Detektion von ERK1/2 durchgeführt, wofür Zellpellets von CHO-XL99-G4 aus der exponentiellen Phase verwendet wurden. Die Methode der Gesamtzelllyse (*Whole Cell Lysate*, WCL) wurde mit der Durchführung einer Differentiellen Detergens Fraktionierung (DDF) verglichen, wobei die Methoden jeweils mit und ohne Einsatz von Phosphataseinhibitoren durchgeführt wurden. Da in den Proben ohne Phosphataseinhibitoren nur eine Bande auf ca. 50 kDa identifiziert wurde, welche der Höhe der schweren Kette des rekombinant produzierten mAbs

entspricht, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den detektierten Banden der Proben mit Phosphataseinhibitoren um phosphorylierte Proteine handelt. Phosphoryliertes ERK1/2 konnte über schwache Banden in der cytosolischen Fraktion der DDF und der Gesamtzelllyse für Proben der exponentiellen Phase ohne Wachstumsfaktor-Zugabe detektiert werden (Abbildung 26 B). Innerhalb dieses Ansatzes konnten außerdem eine auffallende dreifach Bande im Molekulargewichtsbereich von 37-37 kDa in der Kern-Probe der DDF detektiert werden. Die im Kern detektierte dreifach-Bande konnte über eine unabhängige Kultivierung unter zusätzlicher Berücksichtigung der Zelllinien E3 und XL99 bestätigt werden (Abbildung 26 C). Es ist zu vermuten, dass es sich bei den Massenshifts von ca. 2,5-5 kDa um alternative Splice-Varianten/Isoformen der Erk1/Erk2-Gene handelt. In der Literatur werden Splice-Varianten beschrieben die zusätzliche Funktionen (Aebersold *et al.* 2004) und Massenverschiebungen von ERK1 zu ERK1b von -0,6 in Mäusen oder +2,7 kDa in Ratten aufweisen (Buscà *et al.* 2016). Für CHO-Zellen konnten somit erstmals Kern-lokalisierte, phosphorylierte Isoformen mit reduziertem Molekulargewicht identifiziert werden. Die Identität der sowohl über den totalen anti-ERK1/2 als auch über den Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper detektierten drei Phosphoproteine im Zellkern konnten in dieser Arbeit über In-Gel-Verdau-Experimente nicht geklärt werden. Über den direkten Vergleich der Zelllinien XL99, E3 und G4 wurde eine erhöhte Phosphorylierung der Kern-lokaliserten verkürzten ERK1/2-Isoformen für XL99 beobachtet, was zu weiteren Hinweisen einer Zelllinien-spezifischen Signaltransduktion (siehe 4.2.2.1) führte.

Eine detektierte Doppelbanden in Proben der Experimente zur Interaktion von Glutamin und IGF (siehe 4.2.2.3) wurde weiterhin über einen 1D- und 2D-Westernblot und anti-ERK1/2-Detektion analysiert. Der 1D-Westernblot zeigt eine vergleichbare Proteinexpression von ERK1/2 und Akt zwischen den parallelen mAb-CHO-G4-Kulturen (Abbildung 26 D). Über einen Vergleich der Probenvorbereitungen für 1D und 2D-Westernblots konnte kein Einfluss auf die Detektion von ERK1/2 evaluiert werden, weshalb ein 2D-Westernblot durchgeführt wurde, um die ERK2-Doppelbande weiter zu analysieren.

Eine leicht-intensivere Bande für ERK2 im Vergleich zu ERK1 deutet außerdem auf eine mögliche höhere Expression von ERK2 in CHO-G4-Zellen hin, was für die meisten Säugetieren gilt und durch die Stärke des proximalen Promotors begründet wird (Buscà *et al.* 2016). Um zu prüfen, ob ein Expressionsunterschied vorlag oder ob die Antikörperspezifität für ERK2 höher als für ERK1 war, wurden Daten des LFQ-Proteomvergleichs (siehe 4.2.1) dahingehend analysiert. Eine Sortierung der quantifizierten Proteine nach der Intensität führte zu einer Rangierung von ERK2/MAPK1 auf Platz 510 und ERK1/MAPK3 auf Platz 958 von 3.307 Proteinen. Auf Basis von Westernblot- und LFQ-Proteom-Daten konnte für CHO-Zellen eine höhere Expression von ERK2 nachgewiesen werden.

Um die Phosphorylierungsänderungen nach IGF-Induktion für ERK1/2 genauer zu analysieren, wurden Proben der Kontrolle mit Proben 5 min nach IGF-Induktion (mit und ohne zusätzliche Glutamin-Supplementierung) über ein „mini“-2D-Westernblot mit anti-ERK1/2-Detektion verglichen (Abbildung 26 E). Durch jede zusätzliche Phosphorylierung verschiebt sich der isoelektrischen Punkt (IEP) eines Proteins. Eine *in silico*-Schätzung einer IEP-Verschiebung erfolgte über das *Swiss Bioinformatics Resource Portal* ExPasy tool „Compute pI/MW“ (Walker 2005). Der basale IEP liegt demnach für humanes ERK1 bei 6,28. Nach dualer Phosphorylierung wäre ca. ein IEP von 6,01 zu erwarten. In UniProt sind zwei weitere Phosphorylierungen aufgelistet, die eine weitere Verringerung auf ca. 5,79 zur Folge hätten. Für humanes ERK2 liegt der basale IEP bei 6,5. Eine duale Phosphorylierung würde schätzungsweise zu einem IEP von 6,21 bzw. eine insgesamt 7-fache Phosphorylierung, die auf UniProt angegeben ist, zu einem IEP von 5,69. Auch ohne IGF-Induktion konnte in Übereinstimmung zum 1D-Westernblot ein leichtes Perlenkettenmuster für ERK1 und ERK2 im Westernblot detektiert werden. Für die Proben 5 min nach IGF-Induktion erfolgte eine intensivere Detektion der phosphorylierten Protein-*spots* für ERK1 und ERK2. Für ERK1 konnten nach IGF-Induktion hauptsächlich zwei *spots* mit Intensitätszunahme detektiert werden. Es wird vermutet, dass neben der unphosphorylierten Proteinform eine dual-phosphorylierte und eine vierfach-phosphorylierte Proteinform vorlag. Für ERK2 konnte nach IGF-Induktion mehrere *spots* mit IEP-Shifts detektiert werden, wobei vermutet wird, dass neben der unphosphorylierten eine duale und bis zu 7-fache phosphorylierte Proteinform über den anti-ERK1/2-Antikörper detektiert wurde. Die dualen, aktivierenden Phosphorylierungen konnten hier über das zweifache Phospho-SILAC- (siehe 4.2.2.1), über Westernblot nach LFQ-Kultivierung (siehe 4.2.2.2) und teilweise über das dreifache „mini“-SILAC-Experiment (siehe 4.2.2.3) bestimmt werden.

Entsprechend der leichten Doppelbande im 1D-Blot konnte außerdem ein weiteres Perlenkettenmuster mit zu ERK2 erhöhtem Molekulargewicht oder zu ERK1 reduziertem Molekulargewicht beobachtet werden. Die Identität dieses Proteins konnte jedoch über spezifische In-Gel-Verdau-Experimente nicht geklärt werden. Es wird vermutet, dass es sich um eine modifizierte oder alternativ-gesplicte ERK1/2 Protein-Variante, wie zum Beispiel ERK1b, einer Maus-spezifischen Splicevariante mit einem übereinstimmenden Massenshift von -0,6 kDa (Buscà *et al.* 2016). Für ERK1b konnte sowohl eine differentielle intrazelluläre Verteilung als auch eine geringere Interaktion zur entsprechenden Phosphatase und darüber längere Aktivierung durch Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (MacCORMICK *et al.* 2005). Über den Westernblot-basierten Zelllinienvergleich kann eine erhöhte Expression der vermeintlichen ERK1b-Isoform in der mAb-CHO-G4-Zelle vermutet werden (siehe Abbildung 23), was jedoch in unabhängigen Kultivierungen und spezifischen Analysen validiert werden sollte.

Insgesamt konnte die Identität der im Westernblot detektierten ERK1/2 über in-Gel-Verdau und nLC-MS/MS-Experimente für G4-Zellen bestätigt werden. Nach MAPK-Aktivierung über IGF und Gel-basierter Protein-Analytik konnten für die im Cytosol lokalisierten ERK1/2-Proteine (mit voller Sequenz) eine Phosphorylierung und Aktivierung bestätigt werden. Außerdem konnten interessanterweise mögliche Splice-Varianten der Phosphoproteine im Cytosol und im Kern lokalisiert werden, wobei letzteres für die zwei weiteren Zelllinien XL99 und E3 über ein unabhängiges Kultivierungsexperiment und eine andere Kernextraktions-Methode bestätigt werden konnte. Für die im Kern-lokalisierten Isoformen konnte außerdem eine intensive Phosphorylierung in der exponentiellen Phase beobachtet werden, was vermuten lässt, dass in CHO-Zellen im exponentiellen Wachstum ein basales Proliferations-förderndes MAPK-Signaling über diese Splice-Varianten vorliegt.

4.2.3. Effekte einer L-Carnosin-Supplementierung auf CHO-Zelllinien

In der Literatur werden durch mTOR-Modulierung positive Auswirkungen auf die CHO-Prozessperformance beschrieben, wie zum Beispiel durch Überexpression (Dreesen and Fussenegger 2011). Eine IGF-vermittelte Aktivierung von mTOR führte in dieser Arbeit zu negativen Entwicklungen von Prozessausbeute und zellspezifischen Produktivitäten der verwendeten XL99-basierten mAb-CHO-Zelllinien. Über eine gleichbleibende Intensität der aktivierenden mTOR-Phosphorylierung vor und nach IGF-Induktion konnte ein bereits aktives mTOR-Signaling in der exponentiellen Phase vermutet werden. Um das mTOR-Signaling für weitere Prozessoptimierungs-Experimente zu evaluieren sollte im Folgenden eine Inhibierung erfolgen, was zum Beispiel über den natürlichen mTOR-Inhibitor Rapamycin erfolgen könnte. In der Literatur wird beschrieben, dass die Supplementierung von Rapamycin während der Kultivierung von DG44-basierten mAb-CHO zu einer verlängerten Prozessdauer führte (Lee and Lee 2012b). Die immunsupprimierenden Eigenschaften von Rapamycin (auch Sirolimus) (Sehgal 2003) verhindern aber wahrscheinlich den industriellen Einsatz durch die Notwendigkeit einer spezifischen Rapamycin-Abreicherung im *Downstream Processing* (DSP) zur Anwendung des mAbs als Therapeutikum im Menschen. Eine alternative Industrie-kompatible mTOR-Inhibierung könnte über das Dipeptid L-Carnosin, als potentiell Rapamycin *mimic* (Hipkiss 2011) erfolgen. Darüber hinaus führte eine differentielle Expression von Dipeptidasen zwischen parentaler XL99- und mAb-CHO-G4 (siehe 4.2.1) zu der Hypothese, dass neben der erwarteten positiven Auswirkung auf die Prozessperformance auch Zelllinien-spezifische Effekte einer L-Carnosin-Induktion beobachtet werden können. Neben der Hochregulierung der Peptidase DPP3 konnte eine signifikante Herunterregulierung der cytosolischen *non-specific* Peptidase CNDP2 in mAb-CHO ermittelt werden. Für die CNDP2 sind neben der Hydrolyse von Dipeptiden, wie L-Carnosin (β -*alanyl-L-histidine*), auch Tumorsuppressoraktivitäten und ein Einfluss auf das MAPK-Signaling nachgewiesen worden (Zhang *et al.* 2014b). Die Herunterregulierung des Signaling- und Metabolismus-assoziierten Proteins CNDP2 in G4-Zellen stellt somit ein interessantes Target der Prozessoptimierung zur industriellen mAb-Produktion dieser CHO-Zellen dar. Die Auswirkungen des differentiellen Proteoms auf die Zugabe des CND2-Substrats L-Carnosin sollten daher evaluiert werden und Hinweise dafür gefunden werden, ob Carnosin einen Rapamycin-ähnlichen Wirkmechanismus in CHO-Zellen aufweist.

4.2.3.1. Zelllinien-spezifische MAPK-Aktivierung durch 20 mM Carnosin

Aufgrund der beschriebenen Konzentrations-Abhängigkeit der Zugabe von Antioxidantien in das Medium von mAb-produzierenden CHO-Zellen (Toronjo Urquiza *et al.* 2019) wurde die Supplementierung mit L-Carnosin als Antioxidans zunächst für verschiedene Konzentrationen getestet. Eine Induktion von drei CHO-Zelllinien, darunter die parentale XL99 sowie die mAb-

CHO-E3 und -G4, wurde zunächst mit 20 mM L-Carnosin in der exponentiellen Phase mit je einem biologischen Replikat durchgeführt. Es wurden sowohl vor Induktion, 15 min, 1, 4 und 24 h nach Induktion Zellpellets geerntet, die Proteine extrahiert und Aliquots für eine anschließende Westernblot-Analyse mit anti-P-ERK1/2-Detektion eingesetzt (Abbildung 27 A). Trotz Luftblasen, die teilweise den Transfer auf die Blotmembran behinderten, konnte eine deutliche Zunahme von phosphoryliertem ERK1/2 nach 1 und 4 h für XL99 und nach 4 h für E3 beobachtet werden. Für G4 konnte nur eine leichte P-ERK1/2-Bande nach Induktion detektiert werden. Diese Beobachtungen sollten zunächst über eine erneute Kultivierung in Triplikaten wiederholt werden (siehe Abbildung 28 A). Neben der Aufnahme von Wachstumsdaten wurde ebenfalls der Produkttititer der vergleichenden Kultivierungen bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 mittels Westernblot für ausgewählte Proben und ein zufällig gewähltes biologisches Replikat. Die Induktion erfolgte in der exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von ca. $40\text{-}50 \cdot 10^5$ Z/ml (für XL99 Kultivierungstag 2, für E3 und G4 je Kultivierungstag 3). Es wurden jeweils vorher und 15, 30 und 60 Minuten, sowie 2 und 4 Stunden nach Induktion Zellen geerntet und eingefroren. Auf Wachstums- und Produktivitätsebene konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Über die Messung der extrazellulären Aminosäure-Konzentrationen konnten hingegen Unterschiede ermittelt werden. Einen Tag nach Supplementierung des Dipeptids wurde eine deutlich höhere L-Alanin-Konzentration im Medium der drei Zelllinien gemessen, was zum Teil durch die Zusammensetzung des Dipeptids aus β -Alanin und L-Histidin begründet wurde. Für die Ergebnisse der extrazellulären Histidin-Konzentrationsverläufe konnten hingegen Zelllinien-spezifische Effekte beobachtet werden, wobei für XL99 eine späte Zunahme, für E3 und G4 hingegen eine Abnahme im Vergleich zur Kontrollkultivierung gemessen wurde (Daten nicht gezeigt). Sowohl ein Vergleich der intra- und extrazellulären Aminosäurekonzentrationen als auch eine Evaluierung möglicher Transportproteine (Geoghegan *et al.* 2018) oder globale *Metabolomics*-Experimente sollten in an diese Arbeit anschließenden Experimenten durchgeführt werden.

Für eine Westernblot-basierte Evaluierung der zuvor beobachteten MAPK-Aktivierung wurde eine Proteinextraktion im *batch* für ein biologisches Replikat von E3 und G4 und für alle drei biologischen Replikate von XL99 durchgeführt. Je ein biologisches Replikat pro Zelllinie wurde als Zeitreihe über eine SDS-PAGE getrennt und Westernblots gegen totales ERK1/2 (Abbildung 27 B) und gegen die phosphorylierte ERK1/2-Menge durchgeführt (Abbildung 27 C und D).

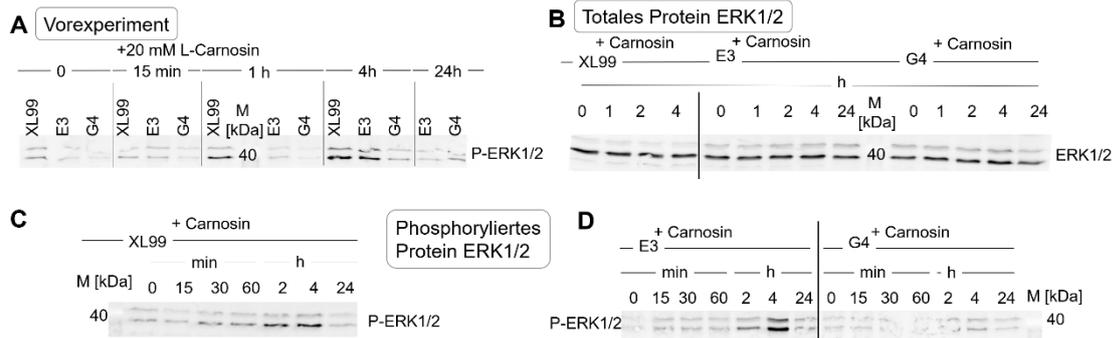


Abbildung 27 Westernblot-basierte Analyse von ERK1/2 nach 20 mM L-Carnosin-Induktion in der exponentiellen Phase der Kultivierung von CHO-XL99-, E3- und G4-Zellen. **A)** Vorexperiment zur Carnosin-Induktion in XL99, E3 und G4 (je ein biologisches Replikat) mit Probennahme vor Induktion, 15 min, 1, 4 und 24 h nach Induktion und anti-P-ERK1/2-Westernblot. **B)** Wiederholte Kultivierung in Triplikaten mit Carnosin-Induktion und exemplarischer Westernblot mit anti-ERK1/2-Detektion der Proben vor (0 min) und 1, 2, 4 bzw. 24 h nach Induktion für die drei Zelllinien. **C)** Anti-P-ERK1/2-Detektion für die Zeitreihe (0, 15, 30 und 60 min, sowie 2, 4 und 24 h nach Induktion) der Zelllinie XL99. **D)** Anti-P-ERK1/2-Detektion für die Zeitreihen der Zelllinien E3 und G4 nach Carnosin-Induktion.

Über die Detektion des totalen ERK1/2-Proteins (über den anti-ERK1/2-Westernblot) konnten keine Expressionsunterschiede für den zeitlichen Verlauf von 0 bis 4 für XL99 bzw. 0 bis 4 und 24 h für E3 und G4 ermittelt werden (Abbildung 27 B). Eine Normalisierung des Phosphorylierungslevels auf die ERK1/2-Proteinexpression war nicht notwendig, die Phosphorylierungsänderungen konnten somit direkt interpretiert werden. Die Westernblot-basierte Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte eine kontinuierliche Zunahme der aktivierenden Phosphorylierung in XL99-Zellen ab 30 min bis mindestens 4 h nach Induktion (Abbildung 27 C). Auch für die Zelllinien E3 konnte eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung bis 4 Stunden nach Induktion detektiert werden (Abbildung 27 D). Für die Zelllinie G4 hingegen konnte wiederholt nur eine schwache Zunahme der Bandenintensität für P-ERK1/2 festgestellt werden (Abbildung 27 D). Für alle drei Zelllinien wurde 24 h nach Induktion eine geringe Bandenintensität ermittelt, die ca. der Intensität der Probe vor Induktion gleicht. Ein Dipeptid-vermittelte MAPK-Signaling erfolgte somit deutlich langsamer als das Wachstumsfaktor-vermittelte Signaling (siehe 4.2.2.2), führte aber ebenfalls innerhalb von 24 h zur Beendigung der Signaltransduktion über MAPK. In der Literatur wird für andere Dipeptide nach Supplementierung in das Zellkulturmedium eine Abnahme der extrazellulären und Zunahme der intrazellulären Dipeptid-Konzentration beschrieben, weshalb ein spezifischer Import und nicht ein extrazellulärer Peptidase-Verdau dieser Dipeptide angenommen wird (Sánchez-Kopper *et al.* 2016).

Über die Westernblot-Detektionen konnte erstmals eine Signalaktivierung in CHO-Zellen durch Induktion mit 20 mM L-Carnosin nachgewiesen werden, welche jedoch keine deutlichen Änderungen der Prozessperformance bewirkte.

LFQ-Proteomics der parentalen XL99-Zelllinie nach Carnosin-Induktion

Über sensitive Proteom-Messungen der für die Westernblot-Analysen extrahierten Proben sollten globale Expressionsunterschiede nach Carnosin-Induktion ermittelt werden. Dafür wurden jeweils Daten für die drei biologische Replikate von XL99 und jeweils ein biologisches Replikat für E3 und G4 erhoben (Abbildung 28 A). Da es sich bei Änderungen auf Proteomebene um sekundäre Effekte handelt, wurde auf die Analyse der 15 und 30 min Proben verzichtet. Die Proben vor, sowie 1, 2, 4 und 24 h nach Induktion wurden für die nLC-MS/MS-Strecke vorbereitet und in einem 60 min Gradienten vermessen, wobei nur 23 der 25 vorbereiteten Proben fortlaufend vermessen werden konnten. Die weiteren zwei Proben wurden mit einem Tag Abstand (nach MALDI-Imaging-Experimenten) gemessen. Die LFQ-basierte DB-Auswertung erfolgte über die TrEMBL-Datenbanken von *C. griseus* und *M. musculus* (Version Dezember 2017) in der MaxQuant-Software. Für die beiden Messungen, die nicht in einer Messequenz gemessen wurden (4 h-Proben für E3 und G4), konnten deutliche Intensitäts-Unterschiede festgestellt werden, weshalb diese Messungen für weitere Analysen herausgefiltert wurden. Insgesamt konnten 1.839 Proteine identifiziert werden, wobei nach der Filterung für mind. 3 valide quantitative Werte noch 912 Proteine für die statistische Analyse zur Verfügung standen. Pro Messung konnten nach diesen Filterschritten 631 ± 67 Proteine mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $97,1 \pm 1,2$ % quantifiziert werden. Über ein *unbiased* hierarchisches Clustering konnten Unterschiede zwischen der parentalen XL99 zu den mAb-CHO-E3 und -G4 ermittelt werden (Abbildung 28 B).

Das Minimalkriterium von drei Replikaten für eine statistische Analyse lag nur für Proben der XL99-Zelllinie vor. Die Zeitpunkte nach Induktion wurden jeweils über einen Zweistichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,01$, $S0:0,1$) mit der Probe vor Induktion als Kontrolle verglichen. Es wurden 7, 8, 23 und 12 Proteine nach 1, 2, 4 und 24 h Carnosin-Induktion mit signifikanten Expressionsunterschieden zur Kontrolle berechnet. Insgesamt konnte eine differentielle Expression von Proteinen aus den Bereichen der Chromatin-Regulierung, für Splicesomen- und Translations-assoziierte Proteine, Signaling-Komponenten und für mitochondriale Stoffwechselproteine nach Carnosin-Induktion in XL99-Zellen bestimmt werden, wobei die entsprechenden Profile als hierarchisches Clustering abgebildet wurden (Abbildung 28 C).

Insgesamt wurden für wenige Stunden bis einen Tag nach 20 mM Carnosin-Induktion 42 signifikante Expressionsunterschiede für die parentale CHO-Zelllinie XL99 ermittelt. Da keine Messung und Auswertung einer Kontrollkultur nach 24 h durchgeführt wurde, können die für diesen Zeitpunkt berechneten Änderungen entweder durch Carnosin oder durch das Voranschreiten in der Kultivierung begründet werden. Im Vergleich dazu konnte für ein weiteres LFQ-Experiment der *batch*-Bioreaktorkultivierung von CHO-K1-Zellen (siehe 4.3.2) für das hier verwendete Signifikanzniveau eine signifikante Änderung von 25 Proteinen von Tag 2 bis 3 ermittelt werden, wobei die deutlich höhere Ausgangsdatenlage des CHO-K1-Experiments auch einen Einfluss auf die Anzahl berechneter signifikanter Änderungen hat.

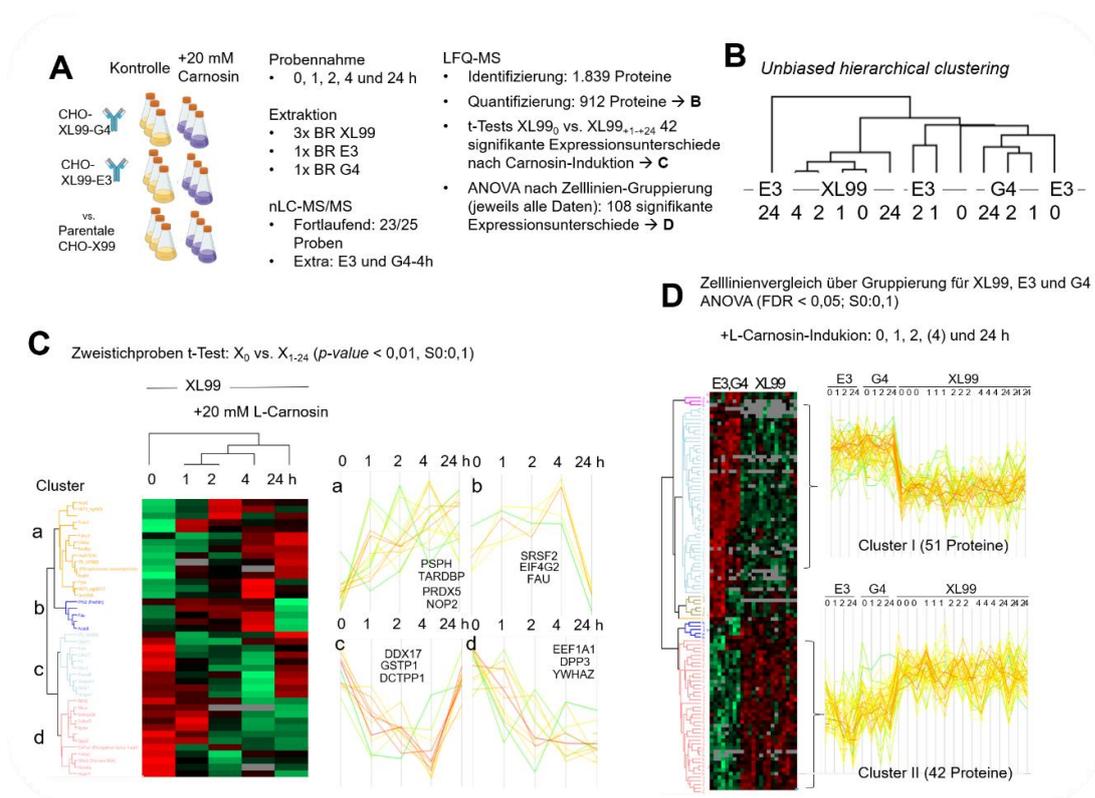


Abbildung 28 20 mM L-Carnosin Induktion in CHO-Zellen. **A)** Experimentelles *setup* der LFQ-basierten Kultivierung mit L-Carnosin-Induktion in der exponentiellen Phase und Zusammenfassung der Datenlage. **B)** *Unbiased* hierarchisches Clustering der in einer Messsequenz gemessenen Proben. **C)** Signifikante Proteomunterschiede nach L-Carnosin-Induktion in XL99-Zellen als hierarchisches Clustering nach Filterung auf signifikante Hits (Zweistichproben t-Test, p -value < 0,01, $S_0:0,1$) und Abbildung vier extrahierter Cluster inklusive Beispielproteine. **D)** LFQ-MS-basierter Zelllinienvergleich durch Gruppierung der Daten für die drei Zelllinien und Darstellung von ANOVA (FDR < 0,05, $S_0:0,1$)-basierten signifikanten Expressionsunterschieden über ein hierarchisches Clustering und Extraktion der zwei prominentesten Cluster.

Eine hierarchische Clusteranalyse der zumindest teilweise auf Carnosin-basierenden differentiell exprimierten Proteine hier führte zu vier Clustern (Abbildung 28 C). Neben einer Hochregulierung (a) und Herunterregulierung (d) bis 24 h nach Induktion sind zwei Cluster entstanden, die Profile einer kurzzeitigen Hochregulierung (b) und einer kurzzeitigen Herunterregulierung (c) beinhalten. Spät bzw. langfristig hochregulierte Proteine sind beispielsweise PSPH, NOP2, PRDX5 und TARDBP (Cluster a) und entsprechend herunterregulierte Proteine sind DPP3, EEF1A1, YWHAZ und HSPB1 (Cluster b). Kurzzeitige Regulierung konnten beispielsweise für EIF4G2, FAU und SRSF2 (hochreguliert, Cluster b) und DCTPP1, GSTP1, DDX17 (herunterreguliert, Cluster c) bestimmt werden. Die signifikant differentiell exprimierten Proteine wurden mit den entsprechenden \log_2 -Ratios der vier Zeitpunkte nach Carnosin-Induktion im Vergleich zur Kontrolle im Anhang aufgelistet (siehe Tabelle 21). Obwohl auf Kultivierungsebene keine deutlichen Unterschiede beobachtet werden konnten, konnte über die Proteomanalyse einer Zeitreihe von wenigen Stunden (1, 2 und 4 h) und 24 h nach Carnosin-Induktion in der parentalen

Zelllinie wenige signifikant differentiell exprimierte Proteine berechnet werden. Insbesondere die kurzzeitig regulierten Proteine sind dabei auf die Carnosin-Induktion und nicht auf das generelle Voranschreiten der Kultivierung zurückzuführen.

Die Dipeptidase DPP3 wies eine über 2, 4 und 24 h stetige und deutliche Herunterregulierung nach Induktion auf. Für die 24 h-Probe konnte für DPP3 die insgesamt stärkste Regulierung mit einem Ratio von ca. 0,55, also einer in etwa halbierten Expression im Vergleich zu vor der Induktion, berechnet werden. Über den Proteom-Zelllinienvergleich wurde zuvor bereits eine signifikant geringere Expression im Vergleich zur mAb-CHO-G4 ermittelt (siehe 4.2.1), wobei eine Carnosin-Supplementierung zu einer weiteren intrazellulären Reduktion der DPP3-Expression führte. Für die Carnosin-spezifische Dipeptidase CNDP2 konnte ebenfalls eine tendenzielle Herunterregulierung für 2 und 4 h nach Induktion bestimmt werden (nicht signifikant). Eine berechnete Herunterregulierung dieser beiden cytosolischen Peptidasen kann zum Beispiel auf einer verminderten Expression oder auf einer erhöhten Sekretion der Enzyme in das Zellkulturmedium beruhen. Der Anstieg der extrazellulären Alanin-Konzentration innerhalb von 24 h gibt Hinweise darauf, dass eine extrazelluläre Degradierung und weniger ein schneller Transport in die Zelle mit Degradierung und Ausschleusung von überschüssigem Alanin erfolgte. Obwohl für andere Dipeptide ein spezifischer Import in CHO-Zellen belegt werden konnte (Sánchez-Kopper *et al.* 2016), wird in dieser Arbeit über die Herunterregulierungen der Peptidasen die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Carnosin-vermittelte erhöhte Sekretion von Peptidasen zur extrazellulären Degradierung von Carnosin führte. Die Zelllinien-spezifischen Konzentrationsverläufe von Histidin, als Bestandteil des Dipeptids, gaben erste Hinweise auf Unterschiede in Nährstoffbedürfnissen der verschiedenen Zelllinien und sollten über eine Wiederholung mit spezifischer Analytik bestätigt werden.

Eine kontinuierliche Hochregulierung über die betrachtete Zeitreihe konnte für die Phosphoserin Phosphatase PSPH berechnet werden. Nach 24 h wurde ein Ratio von 1,72 im Vergleich zur Kontrolle vor Induktion berechnet. Ein ähnliches Profil wurde für die Phosphoserin Aminotransferase PSAT1 bestimmt. Eine hochregulierte Serin-Biosynthese (PSPH, PSAT1 und PHGDH) über den Transkriptionsaktivator ATF4 ist für hoch-proliferative Krebszellen beschrieben und trägt über die Produktion von Cystein und Glutathion zur antioxidativen Regulierung bei (Santis *et al.* 2018). Die Datenlage hier ließ vermuten, dass die bekannten anti-oxidativen Eigenschaften von Carnosin zum Teil über die ATF4-abhängige Hochregulierung der Serin- und darüber Glutathion-Biosynthese in CHO-Zellen bedingt sind. Eine Verbindung des vermutlich über Carnosin-aktivierten ATF4 und mTOR ist Gegenstand aktueller Forschung, wobei eine post-transkriptionale Regulierung von ATF4 über mTOR-C1 vermutet wird (Park *et al.* 2017). Als Ergänzung zu der über Westernblot detektierten aktivierten MAPK-Signaltransduktion konnten über den LFQ-Proteom-Ansatz (mit identischer Ausgangsprobe) einige wenige signifikante

Proteinexpressionsunterschiede innerhalb weniger Stunden und auch noch 24 h nach Carnosin-Induktion für die Zelllinie XL99 ermittelt werden, darunter Targets des Transkriptionsaktivators ATF4 und cytosolische Dipeptidasen (siehe Abbildung 31 A).

Proteomcharakterisierung von mAb-CHO-E3

Da nur wenige Expressionsunterschiede für frühe Proben nach Carnosin-Induktion berechnet werden konnten, wurden die Daten der drei Zelllinien weiterhin verwendet, um erstmals das Proteom der von XL99 abstammenden mAb-CHO-E3 zu charakterisieren. Über eine Gruppierung aller Zeitreihen-Proteomdaten für jede Zelllinie und der Durchführung einer ANOVA-Analyse (Permutation-basierte FDR < 0,05, S0: 0,1) konnten 108 Proteine als signifikant differentiell exprimiert zwischen den drei Gruppen bzw. Zelllinien berechnet werden. Diese signifikanten Hits wurden für anschließende Cluster-Analysen verwendet (Abbildung 28 D). Für die Expressionsmuster von E3 und G4 konnte eine höhere Übereinstimmung zueinander, als zu der parentalen Zelllinie XL99 beobachtet werden. Nach einem Clustering der Proteinprofile zeigten 51 Proteine eine Hochregulierung in den beiden mAb-produzenten Zelllinien im Vergleich zur parentalen Zelle und 42 Proteine eine entsprechende Herunterregulierung. Aufgrund dieser statistisch evaluierten hohen Gemeinsamkeit von E3 und G4 wurden die Proben der mAb-CHO zusammen gruppiert und mit der parentalen CHO-XL99-Zelllinie über einen Zweistichproben t-Test (Permutation-basierte FDR < 0,05, S0: 0,1) verglichen, wobei 67 Proteine eine signifikant differentielle Expression aufwiesen. Ob die Proteine signifikant mAb-spezifisch exprimiert wurden oder auf die Supplementierung der XL99-Kulturen mit Glutamin zurückzuführen sind, sollte über einen Vergleich zu den bisher vorgestellten Experimente (4.2.1 und 4.2.2.3) erfolgen (Tabelle 10).

Tabelle 10 Differentielle Proteinexpression von mAb-CHO vs. XL99. Die Ratios aus den einzelnen Experimenten sind jeweils \log_2 -transformiert. Das mAb-CHO/XL99-Ratio wurde über die LFQ-Auswertung von Proben vor und nach 20 mM L-Carnosin-Induktion berechnet (4.2.3.1). Eine Glutamin-abhängige Expression wurde über das „mini“ dreifach SILAC für mAb-CHO-G4 evaluiert (4.2.2.3). Der Vergleich von G4 vs. XL99 basiert auf dem Mittelwert aus zwei Messrunden und LFQ-Auswertung (4.2.1).

Genname	Proteinname	mAb-CHO/XL99	-Gln/+Gln mAb CHO-G4	mAb-CHO-G4/XL99
Fkbp9	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9</i>	-0,62	NaN	-1,35
Rcn3	<i>Reticulocalbin-3</i>	-0,60	0,57	-0,83
Cndp2	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	-0,54	-0,02	-0,32
Pdia4	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	-0,52	NaN	-0,76
Tjp2	<i>Tight junction protein ZO-2</i>	0,45	-0,11	0,70
Anxa6	<i>Annexin A6</i>	0,47	0,08	0,51
Anxa1	<i>Annexin A1</i>	0,50	0,01	0,70
Gstp1	<i>Glutathione S-transferase P</i>	0,60	0,28	0,78
Tes	<i>Testin</i>	0,66	0,16	0,36
Lgals1	<i>Galectin</i>	0,71	0,13	0,37
Casp7	<i>Caspase-7</i>	0,75	-0,20	0,51
P4hb	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	0,85	0,19	0,52

Dpysl2	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	0,91	0,12	0,53
Pdlim1	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>	0,99	0,02	0,63
Dpp3	<i>Dipeptidyl peptidase 3</i>	1,02	0,19	0,34
Ppib	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	1,11	0,32	0,36
Rrbp1	<i>Ribosome-binding protein 1</i>	2,94	NaN	0,90

Im Vergleich zu der in Abschnitt 4.2.1 evaluierten Unterschiede konnte über dieses unabhängige Kultivierungsexperiment eine Hochregulierung für P4HB, TJP2, RRBP1, PPIB, ANXA1, ANXA6, TES, DPYSL2, PDLIM1, DPP3, GSTP1, LGALS1 und CASP7 und eine Herunterregulierung für PDIA4, FKBP9, CNDP2 und RCN3 erstmals für beide mAb-produzierenden Zelllinien im Vergleich zur parentalen Zelllinie evaluiert bzw. für G4-Zellen bestätigt werden. Da für diese Proteine ebenfalls eine mögliche Glutamin-abhängige Expression vermutet werden konnte, wurden diese Daten dem „mini“-dreifachen SILAC-Experiment in Tabelle 10 mit angegeben (siehe 4.2.2.3). PDIA4, FKBP9 und RRBP1 konnten über das SILAC-MS-Experiment nicht quantifiziert werden, weshalb keine Aussage über eine Gln-Abhängigkeit möglich war. Eine Gln-Abhängigkeit konnte jedoch für die Proteine PPIB, DPP3, TES, P4HB, und GSTP1 evaluiert werden. Für die Caspase 7 (CASP7) und das Chaperon Reticulocalbin-3 (RCN3) konnten hingegen interessanterweise eine gegensätzliche Regulierung berechnet werden. Die höhere Expression von CASP7 steht in Verbindung zur kürzeren Kultivierungszeit von mAb-CHO im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Eine geringere Expression in Glutamin-freiem Medium deutet dementsprechend auf eine potentiell verlängerte Kultivierungszeit durch die Supplementierung von zusätzlichen Nährstoffen (in Form von Glutamin). Für RCN3 konnte eine Herunterregulierung in der exponentiellen Phase und eine Hochregulierung in der stationären bzw. Absterbe-Phase einer CHO-K1 *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung bestimmt werden (siehe 4.3.1). Die höhere Expression in Glutamin-freiem Medium einerseits, aber geringere Expression in mAb-CHO im Vergleich zur parentalen Zelllinie gibt Hinweise auf einen mAb-spezifischen Regulationsmechanismus dieses Chaperons. Für weitere Proteine konnte jeweils kein signifikanter Expressionsunterschied in Medium mit bzw. ohne Glutamin berechnet werden. Die Expression dieser „verbleibenden“ Proteine TJP2, ANXA1, ANXA6, DPYSL2, PDLIM1, LGALS1 und CNDP2 könnte somit möglicherweise ebenfalls für mAb-CHO spezifisch reguliert vorliegen. Neben reproduzierbaren Unterschieden in cytoskeletalen Proteinen und Signaling-Komponenten konnte auch für die Carnosin-spezifische Peptidase CNDP2 eine Gln-unabhängige, mAb-CHO-spezifische Expression gezeigt werden. Über ein anschließendes SILAC-Experiment sollten Hinweise auf den Wirkmechanismus von Carnosin auf CHO-Zellen generell und ein Carnosin-abhängiges Signaling evaluiert werden.

4.2.3.2. Phospho-/Proteomänderungen nach 60 mM L-Carnosin

Um die Anwendung von L-Carnosin in der Prozessoptimierung von CHO-Zellen weiter zu analysieren, wurde eine Induktion von G4-Zellen mit höheren Konzentrationen durchgeführt. Ein Teil der Stammhaltungskultur wurde dazu genutzt, um vier Kultivierungsröhrchen mit 15 ml Zellsuspension zu inokulieren und diese mit verschiedenen Konzentrationen von Carnosin zu induzieren und das Wachstum zu vergleichen. Neben einer Kontrolle ohne Supplementierung wurden die Zellen jeweils mit 30, 50 und 60 mM L-Carnosin induziert und täglich die Zelldichte bestimmt. Die gewählten Konzentrationen überschreiten deutlich die physiologische intrazelluläre Konzentration von Carnosin in beispielsweise menschlichen Muskelzellen von 5-8 mM. Für Muskelzellen von Tieren, die schnellere und spontanere Bewegungen ausführen (wie zum Beispiel Vollblut-Rennpferde), konnten Konzentrationen von bis zu 50 mM Carnosin nachgewiesen werden (Harris *et al.* 1990). Für die mAb-CHO-Zellen konnte durch das Erhöhen der L-Carnosin-Konzentration eine deutliche Reduktion der maximalen VCD beobachtet werden (siehe Anhang Abbildung 41). Für die drei getesteten Konzentrationen (30-60 mM) konnte ein zunehmender wachstumsinhibierender Effekt mit höherer L-Carnosin-Konzentration gezeigt werden, weshalb die Dipeptid-vermittelte zelluläre Signaltransduktion nach Induktion mit 60 mM L-Carnosin analysiert werden sollte.

Experimentelles *setup* des SILAC-Carnosin-Experiments

Basierend auf der differentiellen Expression der CNDP2 wurde zunächst ein paralleles dreifaches SILAC-Experiment mit den Zelllinien CHO-G4 und XL99 geplant. Allerdings musste die Vorkultur der XL99-Zelllinie aufgrund von Schwangerschaft und der COVID-19-Pandemie abgebrochen werden. Die mAb-CHO-G4 wurden dreieinhalb Passagen kultiviert, bevor die Zellen nach Zentrifugation in das SILAC-Medium überführt wurden. Das flüssige *light* (L)-, *medium* (M)- und *heavy* (H)-SILAC-Medium wurde ca. 10 Monate vor der Durchführung dieses Experiments mit den entsprechenden Aminosäuren supplementiert (für das „mini“-dreifache SILAC-Experiment, siehe 4.2.2.3) und anschließend bei 4 °C gelagert. Nach einer weiteren Passage in diesem SILAC-Medium wurden die Zellen bei einer Zelldichte von ca. $50 \cdot 10^5$ Z/ml für das Ansetzen der Hauptkultur verwendet und die restliche Zellsuspension weiter kultiviert, um die Qualität der drei gelagerten Medien zu vergleichen (Abbildung 29 A). Die maximale VCD der Vorkultur in frischem Standardmedium betrug ca. $150 \cdot 10^5$ Zellen/ml (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu wurde mit den gelagerten *heavy* und *light*-SILAC-Medien eine leicht reduzierte maximale VCD von ca. $120-130 \cdot 10^5$ Z/ml erreicht. Für Zellen im *medium*-SILAC-Medium konnte nur eine deutlich reduzierte maximale VCD von $107 \cdot 10^5$ Z/ml erreicht werden. Ein Vergleich der Aminosäurekonzentrationen der drei Medien führte zu nur geringen Abweichungen von ca. $\pm 5\%$. Neben Aminosäuren haben vor allem Vitamine eine geringe Stabilität und bedingen eine geringe Lagerfähigkeit von CDM (Schnellbaecher *et al.* 2019). Es wird vermutet, dass trotz identischer

Lagerungszeit und -Ort differentielle Nährstoffkonzentrationen, beispielsweise an Vitaminen vorlagen, und zu den Unterschieden im Wachstum führten. Eine mögliche Reduktion der Nährstoffkonzentrationen in dem *medium*-SILAC-Medium musste bei der Interpretation dieser Daten im Folgenden berücksichtigt werden.

Die unregelmäßige *batch*-Kultivierung des SILAC-Experiments erfolgte mit einem Arbeitsvolumen von 60 ml in Schüttelkolben mit je vier biologischen Replikaten. Die Induktion wurde an Tag 3 der Kultivierung durchgeführt, wobei das *heavy*-Medium mit 60 mM L-Carnosin (3,6 ml einer 1 M Stammlösung), das *light*-Medium, als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen an PBS (3,6 ml) und das *medium*-Medium mit 8 mM L-Glutamin (2,4 ml L-Glutamin und 1,2 ml PBS) versetzt wurde. Die Probennahme von Zellpellets erfolgte täglich aus 900 µl Zellsuspension, sowie $2 \cdot 10^7$ Zellen jeweils vor sowie 5, 30, 60, 120 und 240 min nach Induktion. Die Kultivierungsverläufe wurden in Abbildung 29 B als viable Zelldichte und Viabilität gegen die Kultivierungszeit als Mittelwert mit Standardabweichung der vier biologischen Replikate skizziert. Aus dem zellfreien Überstand wurde der Produkttiter und die Aminosäure-Konzentrationen bestimmt und für die Berechnungen von zellspezifischer Produktivität (q_p) und Aminosäure-Bildungsraten, dargestellt in Abbildung 29, verwendet.

Wachstumsinhibierung nach L-Carnosin-Zugabe

Für die Kontrollkultivierung im *light*-Medium konnte ein reproduzierbares Wachstum bis zur Zelldichte von ca. $130 \cdot 10^5$ Z/ml an Tag 6 beobachtet werden, gefolgt von einem schnellen Einbruch der Viabilität und Zelldichte an Tag 7 (Abbildung 29 B). Der Übergang der Zellen aus der exponentiellen Phase erfolgte direkt in die Absterbephase, ohne eine erkennbare stationäre Phase. Für die Zellen im *medium*-Medium konnte zunächst ein reduziertes Wachstum bis Tag 3 festgestellt werden, was vermutlich durch die zuvor beschriebene, verminderte Qualität des Mediums bedingt wurde. Nach L-Glutamin-Supplementierung an Tag 3 konnte ein zur Kontrolle ähnliches Wachstum bis zu einer maximalen Zelldichte von ca. $130 \cdot 10^5$ Z/ml beobachtet werden. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen blieb die Viabilität hingegen einen Tag länger stabil, so dass eine kurze stationäre Phase von Tag 6 bis 7 erkennbar war. Für die Zellen im *heavy*-Medium zeigte sich nach 60 mM L-Carnosin-Induktion eine deutlich reduzierte maximale VCD mit ca. $80 \cdot 10^5$ Z/ml an Tag 5 und 6, gefolgt von einer langsamen Reduzierung der Viabilität bis auf unter 60 % an Tag 8. Für die Supplementierung von Glutamin in der exponentiellen Phase von GS-Selektionssystem basierten mAb-CHO-Zellen konnte in dem *medium*-SILAC-Medium mit verminderter Qualität nur indirekt die zuvor gezeigte Steigerung der Proliferation (siehe 4.2.2.3) bestätigt werden. Die Proliferations-inhibierende Wirkung von L-Carnosin mit einer Konzentration von 60 mM auf CHO-G4-Zellen konnte hingegen wiederholt gezeigt werden.

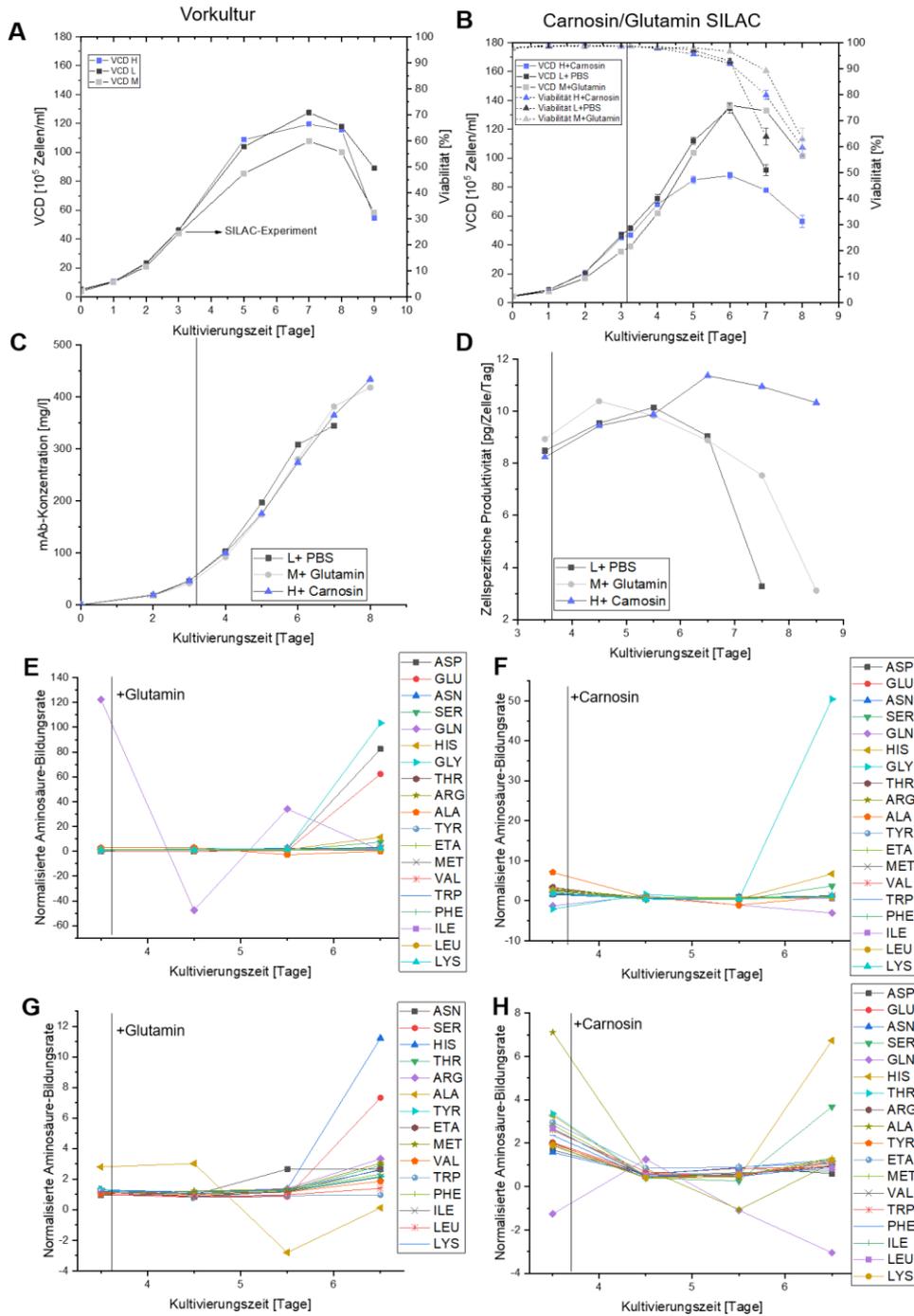


Abbildung 29 Dreifaches SILAC-Experiment zur Induktion von mAb-produzierenden CHO-G4-Zellen mit 60 mM L-Carnosin (*heavy*) und 8 mM L-Glutamin (*medium*) im Vergleich zur Kontrolle, welche mit PBS supplementiert wurde (*light*). **A**) Kultivierung der Vorkultur in den SILAC-Medien *light* (L), *medium* (M) und *heavy* (H) zur Überprüfung der Qualität der Medien. **B**) Viable Zelldichte und Viabilität des SILAC-Experiments gegen die Kultivierungszeit, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung für die vier biologischen Replikate der Kontrolle (*light*), der Glutamin-Induktion (*medium*) und Carnosin-Induktion (*heavy*). **C**) Auftragung des mittleren Produktiters gegen die Kultivierungszeit für die drei parallelen Ansätze. **D**) Berechnung und Darstellung der mittleren zellspezifischen Produktivität im Kultivierungsverlauf. **E**) Normalisierte spezifische Aminosäure-Bildungsrate der Glutamin-induzierten Kulturen. **F**) Normalisierte spezifische Aminosäure-Bildungsrate der Carnosin-induzierten Kulturen. **G**) und **H**) Darstellung der Bildungsrate mit einer reduzierten Y-Achsen-Skalierung.

Carnosin-abhängige Stabilisierung der q_p im späten Kultivierungsverlauf

Die Messung des Produkttiters ergab ein kontinuierliches Ansteigen über den Kultivierungsverlauf für die drei parallelen Ansätze (Abbildung 29 C). Für die Glutamin- und Carnosin-induzierten Kulturen wurde ein mittlerer Produkttiter mit 418 und 434 mg/l an Tag 8 bestimmt. Für die Kontrolle konnte an Tag 7 ein Titer von 345 mg/l bestimmt werden. Der höhere Produkttiter der beiden induzierten Kulturen basierte daher zum einen auf der längeren Kultivierungszeit. Durch die Berechnung der mittleren zellspezifischen Produktivitäten jeweils nach Induktion (ab 4,5 Tage) konnte eine Reduktion der q_p für die Kontrollkulturen und die Glutamin-haltigen Kulturen im Kultivierungsverlauf berechnet werden, wobei die verlängert hohe Viabilität der Glutamin-induzierten Kulturen zu einer verlängerten „Produktionszeit“ der Zellen hier führte. Für die Carnosin-induzierten Kulturen wurde demgegenüber eine deutliche Zunahme der q_p über den Kultivierungsverlauf berechnet, wobei auch trotz der niedrigen Viabilität an Tag 8 noch eine q_p von 10,3 pg/Zelle von Tag 7 auf 8 berechnet werden konnte. Im Vergleich dazu konnte für die Kontrollen und Glutamin-haltigen Kulturen q_{ps} von 3,3 und 3,1 pcd in der Absterbephase bestimmt werden. Es konnte eine deutliche Carnosin-induzierte Inhibierung des Wachstums einhergehend mit einer Erhöhung und Aufrechterhaltung der zellspezifischen Produktivität in CHO-G4-Zellen gezeigt werden.

Aminosäure-Bildungsraten geben Hinweise auf schnelle Metabolom-Änderungen

Über die Berechnung der zellspezifischen Aminosäure-Bildungsraten und Normalisierung auf die Kontrollkultur wurden Änderungen durch die Mediensupplementierungen in Abbildung 29 E-F bzw. G-H dargestellt. Für die Glutamin-supplementierten Zellen konnten neben erwarteten frühen Änderungen in der Glutamin-Bildungsrate auch Änderungen in den Alanin-Verläufen beobachtet werden. Einen Tag nach der Supplementierung der G4-Zellen im *medium*-Medium mit 8 mM Glutamin konnte eine Konzentration von ca. 4,7 mM Glutamin gemessen werden. Zwei Tage später (Tag 5) lag die Konzentration von extrazellulärem Glutamin nur noch bei ca. 1,4 mM, weshalb ein schneller Import von Glutamin über zum Beispiel den Aminosäure-Transporter SLC1A5 (siehe Abbildung 9) (Geoghegan *et al.* 2018) vermutet wurde. Spätere Änderungen in den Aminosäure-Bildungsraten wurden nicht weiter diskutiert, da diese in Zusammenhang zur Viabilitäts-Abnahme in den Kontrollkulturen stehen und über nekrotische Zellen die extrazellulären Aminosäurekonzentration möglicherweise beeinflusst werden.

Für die Carnosin-supplementierten Zellen konnten größere Unterschiede in den Aminosäure-Bildungsraten beobachtet werden. Obwohl in die Berechnung der Bildungsrate von Tag 3 auf Tag 4 auch Daten der parallelen Kultivierung mit einfließen, konnten für die meisten Aminosäuren veränderte normalisierte Raten berechnet werden. Neben frühen Unterschieden in den Alanin- und Glutamin-Bildungsraten konnten im weiteren Verlauf vor allem eine erhöhte normalisierte Histidin- und Serin-Bildungsrate festgestellt werden. Die Aminosäure Leucin spielt eine wichtige

Rolle in der Regulierung von mTOR (Saxton and Sabatini 2017). In den Kontrollkulturen nimmt die Leucin-Konzentration im Verlauf der Kultivierung von 5 mM bis auf ca. 1,3 mM ab. Nach Carnosin-Supplementierung an Tag 3 konnte eine sprunghafte Halbierung der Leucin-Konzentration im Medium an Tag 4 gemessen werden. Besonders durch das inhibierte Wachstum konnte somit eine deutlich erhöhte entsprechende Verbrauchsrate von Leucin berechnet werden. Ob die deutlichen Unterschiede der Leucin-Konzentration zu einer Modulierung der mTOR-Aktivität führten, sollte in an diese Arbeit anschließenden Experimenten geklärt werden.

Die Aminosäure Alanin akkumuliert zum Beispiel während der Glutaminolyse (Ahn and Antoniewicz 2012) oder entsteht durch Pyruvat (Ma *et al.* 2009). Ein Anstieg der extrazellulären Alanin-Konzentration über den Kultivierungsverlauf einer *fedbatch*-CHO-Kultivierung wird in der Literatur beschrieben (Fan *et al.* 2015) und konnte auch in dieser Arbeit für CHO-K1-Zellen beobachtet werden (siehe 4.3.1). Für die Kontrollkulturen der mAb-CHO-G4 konnte hier eine Konzentration von 1,7 mM an Tag 4 und eine maximale Konzentration von 3,4 mM an Tag 5 gemessen werden. Für die Carnosin-induzierten Kulturen konnte an Tag 4 eine Konzentration von 8,7 und eine maximale Konzentration von 11 mM Alanin an Tag 6 quantifiziert werden, was größtenteils durch die Spaltung des Dipeptids Carnosin in Histidin und Alanin begründet werden wurde. Auch die Glutamin-Induktion führte zu einer zur Kontrollkultur deutlich erhöhten Alanin-Akkumulierung bis 10 mM an Tag 6. Die maximal gemessenen Konzentrationen lagen jedoch nicht mehr im linearen Bereich der Aminosäure-Konzentrationsbestimmung. Insgesamt kann über die Alanin-Akkumulierung der beiden induzierten Kulturen eine potentiell erhöhte Proliferation nach Glutamin-Supplementierung über eine gesteigerte Energiegewinnung durch Glutaminolyse begründet werden und auch die Hypothese, dass ein Teil des extrazellulären Carnosins gespalten wird und die Aminosäuren Alanin und Histidin einzeln und nach Bedarf in die Zelle transportiert werden, konnte verstärkt werden.

Um die Industrie-relevanz einer Carnosin-Supplementierung weiter zu evaluieren, müssten ebenfalls Analysen der Produktqualität erfolgen. In der Literatur wurde zum Beispiel eine reduzierte Produkt-Galaktosylierung nach Supplementierung des Mediums mit Zn^{2+} festgestellt (Prabhu *et al.* 2018). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Produktglykosylierung hat. Ein in der Absterbephase geernteter monoklonaler Antikörper wies geringere *core*-fucosylierte Glykane und mehr *high mannose*-Strukturen auf (Klaudia Grunwald 2019), weshalb die Produktqualität der Carnosin-induzierten Kulturen in an diese Arbeit anschließenden Experimenten geprüft werden sollte.

Proteomänderungen stabilisieren die zellspezifische Produktivität nach Carnosin-Induktion

Um Hinweise auf die Mechanismen einer Carnosin-spezifischen zellulären Signaltransduktion bis zur Wachstumsinhibierung und Aufrechterhaltung der Produktivität zu erhalten, sollte eine Analyse des Proteoms und Phosphoproteoms erfolgen. Dafür wurden geerntete Zellaliquots aufgeschlossen, die Proteine extrahiert und quantifiziert. Erst danach wurden die SILAC-Proben (*light, medium,*

heavy) durch Bildung zufälliger Pärchen vereint. Für eine quantitative Proteomanalytik wurden die Proben des Kultivierungsverlaufs mit TE-Puffer unter Erhitzung aufgeschlossen. Die Induktionsproben wurden mit TE- und SDC-Puffer basierter Proteinextraktion aufgeschlossen. Für eine Phosphoproteom-Analyse wurde eine TiO₂-basierte Anreicherung der Induktions-SDC-Proben durchgeführt. Nach Vermessung über die nLC-MS/MS-Strecke wurden die Ratios der SILAC-Daten in MaxQuant (Version 1.6.10.43) ausgewertet, wobei H/L dem Verhältnis zwischen Carnosin und der Kontrolle und M/L dem Verhältnis von Glutamin zur Kontrolle entspricht (Abbildung 30 A). Die Daten wurden anschließend in der Software Perseus (Version 1.6.10.43) analysiert.

Im Mittel konnten für die Proteomproben der Kultivierungstage 2-6 für 1.313 ± 102 Proteine quantitative Daten in Form von Ratios (jeweils zur Kontrolle) berechnet werden. Insgesamt konnten so 2.378 Proteine quantifiziert werden. Eine statistische Absicherung signifikanter Expressionsunterschiede über eine *multiple hypothesis*-korrigierte Methode wie der Permutations-basierten FDR-Berechnung (siehe 1.3.3) führte zu 2 bzw. 63 Hits für Tag 5 und 6 über den H/L-Vergleich, also 48 bzw. 72 h nach Carnosin-Supplementierung im Vergleich zur Kontrollkultivierung zur gleichen Kultivierungszeit. Ein *Fisher exact*-Test (Benjamini-Hochberg FDR < 0,05) führte zur signifikanten Anreicherung der GO Molecular Function (MF) ‚*Carboxylic acid binding*‘, darunter die signifikante Hochregulierung von CAD, GOT1, KARS und AARS sowie eine signifikante Herunterregulierung des *Sterol carrier protein 2* (SCP2) und *Acyl-CoA-binding protein* (DBI, ACBP) (siehe teilweise Tabelle 11).

Über die Hochregulierung von CAD und der Lysin und Alanin tRNA-Ligasen KARS und AARS sowie der Tyrosin tRNA (YARS) konnten zwei *downstream* Bereiche eines aktiven mTOR-C1 72 h nach Carnosin-Supplementierung ermittelt werden. CAD ist ein multifunktionales Protein, welches die ersten drei Schritte der Pyrimidin-Biosynthese katalysiert und durch mTOR-C1 aktivierte S6K1 phosphoryliert und ebenfalls aktiviert wird (Rad *et al.* 2018). Die mTOR-vermittelte Erhöhung der Proteinsynthese erfolgt über eine transkriptionale Regulierung von ATF4, worüber die Expression von Aminosäure-Transportern und Enzymen, wie tRNA-Ligasen, reguliert wird (Park *et al.* 2017). Neben Protein- und Pyrimidin-Synthese konnte außerdem eine signifikante Hochregulierung der cytosolischen C-1-Tetrahydrofolat (THF)-Synthase (MTHFD1) berechnet werden. Die Expression der mitochondrialen Isoform MTHFD2 hat Funktionen in der Purin-Biosynthese und wird ebenfalls von ATF4 stimuliert (Ben-Sahra *et al.* 2016), weshalb eine Hochregulierung der Purin-Synthese vermutet wird. Auf Basis der Hochregulierung von Pyrimidin- und Purin-Synthese sowie der erhöhten Bereitstellung von *precursors* für die Translationsmaschinerie 72 h nach 60 mM Carnosin-Induktion, wird vermutet, dass ein aktives mTOR-C1-Signaling inklusive Aktivierung des Transkriptionsaktivators ATF4 in den mAb-CHO-G4 vorlag (siehe Abbildung 31 B).

Für eine Analyse weiterer Effekte erfolgte eine Auflistung der Top10 hoch- bzw. herunterregulierten Proteine für Tag 6 sowie der beiden signifikanten Expressionsunterschiede für Tag 5 in Tabelle 11.

Tabelle 11 Auflistung der beiden signifikant regulierten Proteine für Tag 5, 48 h nach Carnosin-Induktion in mAb-CHO-G4, sowie die Top10 hoch- und herunterregulierten Proteine an Tag 6, 72 h nach Induktion. Außerdem sind auch die gemittelten log₂-transformierten Ratios für die anderen Kultivierungstage und die parallele Glutamin-Induktion mit aufgelistet. Signifikante Ratios (über einen Einstichproben t-Test, FDR < 0,05, S0:0,1) sind fett markiert.

Genname	Proteinname	Parallele Kultivierung			Nach Carnosin-Induktion			Parallele Kultivierung			Nach Glutamin-Induktion		
		H/L 1	H/L 2	H/L 3	H/L 4	H/L 5	H/L 6	M/L 1	M/L 2	M/L 3	M/L 4	M/L 5	M/L 6
Pfkl	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type</i>	-0,10	-0,07	-0,01	-0,08	0,22	0,75	-0,05	0,01	0,09	0,00	0,05	-0,12
Ipo7	<i>Importin-7</i>	0,10	0,03	-0,01	0,10	0,19	0,66	0,10	0,11	0,09	0,12	0,20	0,10
Sbsn	<i>Suprabasin</i>	NaN	NaN	NaN	NaN	-1,44	-1,97	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,78	-0,15
Atp6v1f	<i>V-type proton ATPase subunit F</i>	NaN	NaN	NaN	NaN	-1,20	-1,33	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,64	-0,14
Scp2	<i>Sterol carrier protein 2</i>	0,38	-0,12	0,02	-0,17	-0,89	-1,15	-1,45	0,10	0,05	-0,15	-0,21	-0,06
Luzp1	<i>Leucine zipper protein 1</i>	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,99	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,36
Ahnak	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK-like protein AHNAK</i>	0,09	-0,48	NaN	-0,89	-1,26	-0,93	0,26	0,19	NaN	-0,76	-1,22	-0,39
Ahnak	<i>nucleoprotein (desmoyokin)</i>	0,43	-0,20	NaN	-0,96	-1,34	-0,94	0,60	0,79	NaN	-0,27	-1,20	-0,33
Ndufv3	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial</i>	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	-0,73	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	0,08
Bag3	<i>BAG family molecular chaperone regulator 3</i>	NaN	-0,05	-0,16	-0,12	-0,55	-0,63	NaN	-0,02	0,03	-0,18	-0,12	0,07
Svep1	<i>Sushi, von Willebrand factor type A</i>	0,00	0,02	-0,03	-0,04	-0,36	-0,62	0,02	-0,04	-0,07	-0,01	-0,11	-0,24
Lmo7	<i>LIM domain only protein 7</i>	NaN	NaN	-0,26	0,10	-0,18	-0,57	NaN	NaN	-0,13	-0,29	-0,69	-1,07
Ndr1	<i>Protein NDRG1</i>	0,08	0,17	-0,14	-0,01	0,33	1,24	0,14	0,44	0,16	0,15	-0,04	0,20
Cad	<i>CAD protein</i>	0,09	-0,02	-0,02	0,22	0,47	1,32	0,13	0,00	0,08	0,14	0,11	0,44
Mybbp1a	<i>Myb-binding protein 1A</i>	-0,04	-0,04	0,00	0,06	0,53	1,26	-0,03	-0,06	-0,04	0,13	0,35	-0,19
Rpl9	<i>60S ribosomal protein L9</i>	0,05	0,03	-0,01	0,05	0,52	1,27	0,01	0,06	0,03	-0,04	0,45	0,15
Rpl26	<i>60S ribosomal protein L26</i>	-0,08	-0,16	-0,09	-0,03	0,43	1,33	-0,03	-0,07	-0,05	-0,08	0,29	-0,15
Aars	<i>Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic</i>	0,16	0,21	0,15	0,15	0,28	1,38	0,12	0,16	0,07	0,06	0,16	0,15
Rps3a1	<i>40S ribosomal protein S3a</i>	-0,08	-0,06	-0,05	-0,01	0,50	1,40	-0,12	-0,06	-0,02	-0,03	0,34	-0,07
Rps9	<i>40S ribosomal protein S9</i>	-0,35	-0,02	-0,09	-0,05	0,47	1,34	-0,22	-0,05	-0,05	-0,04	0,13	-0,20
Acly	<i>ATP-citrate synthase</i>	0,00	-0,04	0,02	0,03	0,38	1,45	0,01	0,00	0,08	0,10	0,19	0,27
Rps14	<i>40S ribosomal protein S14</i>	0,00	-0,07	-0,04	0,00	0,58	1,63	-0,06	-0,07	-0,06	-0,06	0,37	-0,08

Für viele der als an Tag 6, 72 h nach Carnosin-Zugabe, signifikant herunterregulierten Proteine wurde hier auch eine verminderte Expression nach Glutamin-Zugabe berechnet, weshalb keine direkte Verbindung zur erhöhten Produktivität der Carnosin-Kulturen hergestellt wurde. Es konnte aber eine signifikante Hochregulierung der *ATP-dependent 6-phosphofructokinase liver type* (PFKL) 48 und 72 h nach Carnosin-Supplementierung im Vergleich zur Kontrollkultivierung (entsprechend an Tag 5 bzw. 6) berechnet werden. Die PFK katalysiert den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse (siehe Abbildung 8), wobei eine mTOR-C1-HIF1-abhängige Expressionsregulierung in der Literatur beschrieben wird (Düvel *et al.* 2010). Die HIF1-abhängige Hochregulierung des mTOR-C1 *downstream* Targets gibt Hinweise auf eine Reaktivierung in der späten Kultivierungsphase.

Für eine Untereinheit des mTOR-C1 *upstream* Targets *Vacuolar (V)-ATPase* (Saxton and Sabatini 2017) konnte hingegen eine signifikante Herunterregulierung berechnet werden. Die V-ATPase, lokalisiert an der lysosomalen Membran, dient der Ansäuerung über eine Aktivität als Protonenpumpe und wird bei ausreichender Verfügbarkeit von Aminosäuren aktiviert, was zur weiteren Aktivierung der GEF-Proteine des *Ragulator complex* (LAMTOR) führt. Nach Konvertierung von Rag-GDP zu Rag-GTP kann dieses mTOR-C1 binden und aktivieren (Pan *et al.* 2019). Die Mechanismen der ATPase-Expressionsregulierung, die zu der hier evaluierten Herunterregulierung der Untereinheit F (ATP6V1F) führten, sind jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte außerdem eine Hochregulierung der Untereinheiten A, C, D, E und F der V-ATPase in pH- und Sauerstoff-geregelten *fedbatch*-Kultivierungen (und teilweise *batch*-Kultivierungen) der CHO-K1-Zelllinie bestimmt werden (beispielhaft dargestellt in Abbildung 34).

Neben der Hochregulierung von tRNA-Ligasen konnten in der Top10-Liste für Tag 6 (72 h nach Carnosin-Induktion) eine Vielzahl an Translations-regulierenden Proteinen identifiziert werden. Insgesamt konnte eine signifikante Expressions-Hochregulierung der 40S Proteine RPS3, RPS3A1, RPS9, RPS14, RPS27L, RPS28 und der 60S Proteine RPL9 und RPL26 sowie der Translationsinitiations-Faktoren eIF2S1 und eIF5A berechnet werden (siehe Abbildung 31 B). Für RPS9 und AARS sowie weitere 40S und 60S ribosomale Proteine wurde über eine veraltete *spectral counting*-Quantifizierungsmethode eine differentielle Expression in verschiedenen Parentalzelllinien beschrieben (Xu *et al.* 2017a). Die Autoren vermuten, dass die ACLY ein gutes Target zur Überexpression darstellen könnte, da eine signifikant höhere Expression in der schneller wachsenden CHO-S detektiert wurde (Xu *et al.* 2017a). Eine Hochregulierung von ACLY wurde ebenfalls nach Produktivitäts-steigernder Butyrat-Behandlung von CHO-Zellen identifiziert (Anna Wippermann 2016). Die ca. 2,75-fache Hochregulierung 72 h nach Carnosin-Induktion hier konnte parallel mit einer Hochregulierung der mAb-Produktivität berechnet werden. Aufgrund eines vermuteten Zusammenhangs zur zellspezifischen Produktivität wird eine Überexpression oder Aktivierung der ACLY auch für die Verwendung dieser mAb-CHO-G4 als sinnvoll erachtet.

Außerdem konnte über eine signifikante Hochregulierung von NDRG1 eine mTOR-C2-Aktivierung (McCaig *et al.* 2011) vermutet werden. Im Proteomvergleich zur entsprechenden parentalen Zelllinie konnte bereits eine Herunterregulierung des Tumorsuppressor-Proteins NDRG1 berechnet werden (siehe 4.2.1). Über die Hochregulierung nach Carnosin-Induktion hier und nach Temperaturshift (Henry *et al.* 2017b) konnte insgesamt ein Zusammenhang zur Proliferationsinhibierung verdeutlicht werden. Über die signifikanten Expressionsänderungen für Tag 6, also 72 h nach Carnosin-Supplementierung, konnte indirekt eine Reaktivierung von mTOR-C1 und -C2 identifiziert werden. Es bleibt ungeklärt, ob spezifische Mechanismen oder die generelle Verfügbarkeit von Aminosäuren, besonders Alanin, Histidin und Leucin, für die mTOR-Reaktivierung nach Carnosin-Supplementierung verantwortlich sind.

Für die Glutamin-Supplementierung in der exponentiellen Phase konnte über die FDR-basierte Statistik keine signifikanten Proteinexpressionsänderungen ermittelt werden, was jedoch auch durch die verminderte Qualität des *medium*-SILAC-Mediums begründet werden könnte. Um trotzdem tendenzielle Proteomunterschiede nach Glutamin-Supplementierung beobachten zu können, wurde zusätzlich ein Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,01$, $S0: 0,1$) ohne Korrektur des *multiple hypothesis testing* Problems berechnet. Für die Proben der Carnosin-Supplementierung konnte, parallel zur zuvor dargestellten FDR-basierten Statistik, eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl an „signifikanten“ Hits mit der Kultivierungszeit bestimmt werden (Abbildung 30 B). Für die Glutamin-supplementierten Kulturen konnte einen Tag nach Induktion die höchste Anzahl differentiell exprimierter Proteine (im Vergleich zur Kontrolle) mit 103 Proteinen berechnet werden, gefolgt von reduzierten Anzahlen an „signifikanten“ Hits für den Vergleich der restlichen Kultivierungstage (Abbildung 30 B). Insgesamt konnten für 679 Proteine „signifikante“ Expressionsänderungen zu einem Zeitpunkt der Kultivierungen berechnet werden. Eine Darstellung der Profile dieser Proteine (Abbildung 30 C) zeigt deutliche Unterschiede besonders für Tag 6 des Vergleichs von Carnosin zur Kontrolle. Über einen Vergleich zu den Glutamin/Kontroll-Ratios konnte ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Viabilität der Kontrollkultur Ursache der starken Expressionsunterschiede im Vergleich zur Carnosin-Induktion war. Jedoch wird vermutet, dass die geringere Anzahl an Zellen in den Kulturen der Carnosin-Induktion höhere Nährstoffkonzentrationen im Medium an Tag 6 im Vergleich zu Kulturen mit höheren Zelldichten oder IVCDs (wie den Glutamin-induzierten- und Kontroll-Kulturen) bedingt. Diese tertiär-Effekte der Carnosin-Induktion sind nicht für den primären Wirkmechanismus des Carnosin-Signalings relevant, stehen jedoch möglicherweise in Verbindung zu der hohen zellspezifischen Produktivität der Zellen und sollten daher weiter analysiert werden.

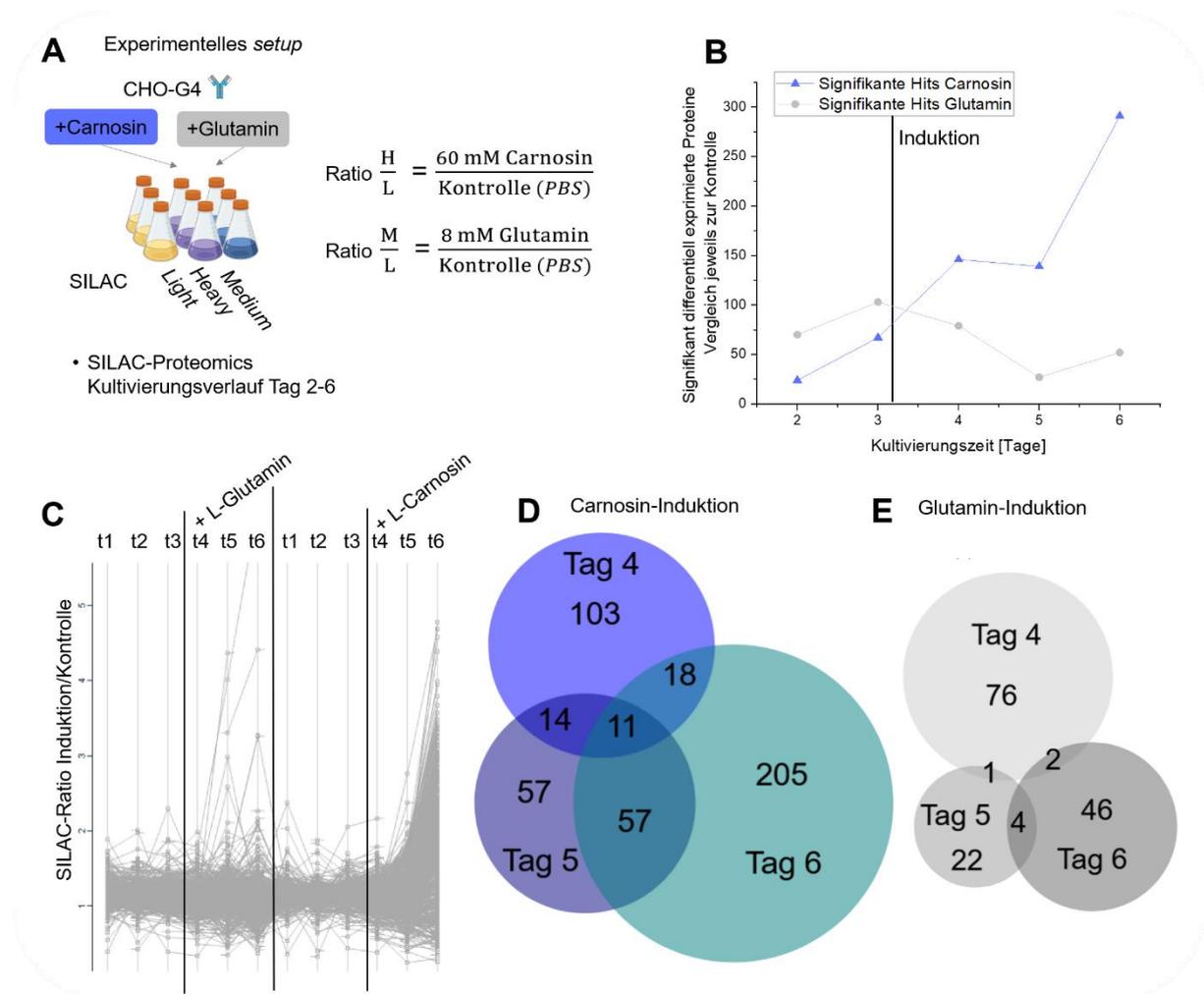


Abbildung 30 SILAC-Proteomics über den Kultivierungsverlauf des Carnosin- und Glutamin-SILAC-Experiments von mAb-CHO-G4. **A)** Experimentelles *setup* mit vier biologischen Replikaten der G4-Kultur und Induktion von Glutamin und Carnosin in der exponentiellen Phase. **B)** Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,01$; $S0:0,1$) für die Berechnung „signifikanter“ SILAC-Ratios Carnosin/Kontrolle (H/L) und Glutamin/Kontrolle (M/L). **C)** 679 Proteinprofile über den Kultivierungsverlauf gefiltert für mindestens eine signifikante differentielle Expression im Vergleich zur Kontrollkultivierung. **D)** Venn-Diagramm signifikante Hits jeweils nach Induktion mit Carnosin für die Kultivierungstage 4-6. **E)** Venn-Diagramm signifikanter Hits nach Induktion mit Glutamin für die Kultivierungstage 4-6.

Durch die Zusammenfassung „signifikanter“ Hits nach Carnosin-Induktion in einem Venn-Diagramm (Abbildung 30 D) konnten zum Teil hohe Übereinstimmungen differentiell exprimierter Proteine über mehrere Tage nach Induktion abgebildet werden. Eine Zusammenfassung der Glutamin-Induktionsdaten zeigte weniger Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Tagen nach Induktion bei generell reduzierter Anzahl signifikanter Hits (Abbildung 30 E). Durch Erhöhung des statistischen Signifikanzniveaus des Einstichprobentests ($p\text{-value} < 0,001$, $S0:0,1$) wurde die Anzahl an signifikanten Hits reduziert. Diese Daten wurden außerdem auf die am stärksten regulierten Proteine gefiltert und im Folgenden aufgelistet und diskutiert.

Für die Glutamin-Induktion wurden dazu in Tabelle 12 Daten der Top3 hoch- und herunterregulierten Proteine für Tag 4 (24 h nach Induktion) zusammengefasst.

Tabelle 12 Zusammengefasste log₂-Ratios der Top3 hoch- und herunterregulierten Targets an Tag 4, 24 h nach Glutamin-Induktion von mAb-CHO-G4. Außerdem sind auch die Mittelwerte der restlichen Kultivierungstage und der parallelen Carnosin-Induktion mit aufgelistet. Die über einen Einstichproben t-Test (*p-value* < 0,001, S0:0,1) berechneten signifikanten Hits sind in fett markiert.

Gen-name	Proteinname	Parallele Kultivierung			Nach Glutamin-Induktion			Parallele Kultivierung			Nach Carnosin-Induktion		
		M/L Tag 1	M/L Tag 2	M/L Tag 3	M/L Tag 4	M/L Tag 5	M/L Tag 6	H/L Tag 1	H/L Tag 2	H/L Tag 3	H/L Tag 4	H/L Tag 5	H/L Tag 6
Glul	<i>Glutamine synthetase</i>	-0,07	-0,07	0,15	-1,15	-1,25	-0,87	-0,11	-0,05	-0,07	-0,34	-0,39	0,00
Tars	<i>Threonyl-tRNA synthetase</i>	0,04	0,30	0,04	-0,21	0,12	0,30	0,24	0,16	0,07	0,17	0,12	1,17
Rpa1	<i>Replication protein A subunit</i>	-0,01	0,09	-0,07	-0,17	0,06	-0,31	0,07	-0,02	-0,09	-0,13	0,13	0,67
Hmgcs1	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic</i>	-0,27	-0,10	-0,09	0,46	0,42	1,51	0,09	0,02	0,01	-0,04	-0,30	1,50
Kpna2	<i>Importin subunit alpha</i>	0,00	0,00	0,08	0,35	0,02	0,07	0,06	0,01	0,08	0,00	0,22	1,13
Kxd1	<i>60S ribosomal protein L40</i>	NaN	0,08	NaN	0,34	NaN	0,98	NaN	0,04	NaN	0,33	NaN	0,88

Einen Tag nach Glutamin-Supplementierung in der exponentiellen Phase der GS-basierten mAb-CHO-G4 konnte eine starke Herunterregulierung der GS mit einem Ratio von ca. 0,5 (log₂ Ratio - 1,15) zur Kontrolle berechnet werden. Durch die Verfügbarkeit von Glutamin im Medium wurde die Expression der GS innerhalb von 24 h halbiert. In dieser Arbeit konnte erstmals eine sofortige Reduktion der GS-Expression bei hohen Glutamin-Konzentrationen gezeigt werden. Außerdem konnte eine leichte Herunterregulierung von TARS, einer in der Proteintranslation involvierten tRNA Synthetase und RPA1, welches Funktionen in der DNA *damage reponse* hat, berechnet werden. Die tendenziell erhöhte Proliferation nach Glutamin-Induktion war auf den erhöhten Nährstoffgehalt zurückzuführen, was vermutlich zu weniger DNA-Stress führte und eine reduzierte RPA1-Expression begründete. Außerdem konnte wiederholt eine Hochregulierung der HMG-CoA Synthase (HMGCS1), einem Protein aus der Cholesterol-Synthese, in Glutamin-haltigem Medium bestimmt werden (siehe Abbildung 25 B). Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil der Membran, essentiell für dessen Fluidität und über die Bildung von Vesikeln auch an der Proteinsekretion beteiligt. In Übereinstimmung zu anderen CHO-Studien (Kantardjieff *et al.* 2010; Carlage *et al.* 2012) konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine signifikante Herunterregulierung der HMGCS1 im *batch*- und *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungsverlauf (siehe Abbildung 33 D, Cluster a) berechnet werden. Diese Herunterregulierung konnte in der Literatur unter Produktivitätssteigernden Bedingungen (Temperaturshift und Butyrat-Behandlung) verstärkt beobachtet werden (Kantardjieff *et al.* 2010). Für CHO-Zellen mit reduzierter Produktivität (nach GSH-Inhibierung) konnte hingegen eine generelle Herunterregulierung der Cholesterol-Synthese auf Proteomebene beobachtet werden (Chevallier *et al.* 2020). Die hier ermittelte Hochregulierung nach Glutamin-Induktion steht in Zusammenhang zu einer erhöhten Proliferation und der dadurch erhöhten benötigten Menge an Cholesterol.

Das nach Glutamin-Induktion signifikant hochregulierte KXD1-Protein hat ebenfalls Funktionen im Vesikel-abhängigen Transport, wie der Bewegung von Lysosomen (Pu *et al.* 2017), wurde jedoch auch nach Carnosin-Induktion als signifikant hochreguliert berechnet und steht somit wahrscheinlich nicht im Zusammenhang zur Proliferation oder Produktivität. KPNA2 ist eine Importin-Untereinheit und ein Adapterprotein des nuklearen Rezeptors KPNB1, worüber KPNA2 am Import nuklearer Signale beteiligt ist. Es konnte eine Hochregulierung von KPNA2 und ein darüber aktiviertes NF- κ B-Signaling in Krebszellen festgestellt werden, weshalb es als pro-tumor Protein und potentiell therapeutisches Target angesehen wird (Yang *et al.* 2020a). Ein potentiell aktiviertes NF- κ B-Signaling nach Glutamin-Supplementierung kann über die Expression von anti-Apoptose Proteinen zur verlängerten Lebensdauer der Kulturen beigetragen haben. Für die innerhalb von 24 h nach Carnosin-Induktion ermittelte Inhibierung des NF- κ B/STAT-Signalings in Krebszellen (Lee *et al.* 2018) hingegen konnten hier insofern Hinweise gefunden werden, dass erst für 48 h nach Induktion eine tendenzielle Hochregulierung von KPNA2 und damit ein potentiell aktiviertes NF- κ B-Signaling im Vergleich zur Kontrolle berechnet werden konnte. Der in vielen Studien evaluierte Zeitraum von 24 h wurde in der Analyse für CHO-Zellen hier erweitert, worüber langfristige gegenteilige Signalingmechanismen vermutet werden konnten.

Der Stoffwechsel der GS-mAb-CHO ist an eine geringe Verfügbarkeit bzw. die Synthese von Glutamin adaptiert. Eine Supplementierung von hohen Glutamin-Konzentrationen hier führte über eine vergleichsweise langsame und geringe Anpassung des Proteoms zu einer erhöhten Lebensdauer der Kulturen. Vermutlich konnten aufgrund des qualitativ verschlechterten *medium-SILAC*-Mediums keine erhöhte Wachstumsrate und maximale VCD, wie zuvor wiederholt beobachtet (siehe beispielsweise 4.2.2.3), erreicht werden, weshalb auch eine Phospho- und Proteomanalyse diskutiert wurde.

Über die FDR-basierte Statistik konnten keine signifikanten Expressionsänderungen 24 h nach Carnosin-Supplementierung berechnet werden. Zuvor diskutierte Proteomänderungen lassen eine späte Reaktivierung von mTOR vermuten. Um Hinweise auf den frühen Wirkmechanismus zu finden, sollten die Top5 „signifikant“ hoch- bzw. herunterregulierten Proteine 24 h nach Carnosin-Induktion (Tag 4) analysiert werden (Tabelle 13). Außerdem erfolgte auch eine Zusammenfassung für „signifikante“ Hits an Tag 5 (48 h nach Induktion), wobei nur die Top5 hochregulierten Targets aufgelistet wurden, da kaum Herunterregulierungen berechnet werden konnten (siehe Abbildung 30 C).

Tabelle 13 Zusammengefasste log₂-Ratio der hoch- und herunterregulierten Targets an Tag 4 und 5 (24 bzw. 48 h nach Carnosin-Induktion von mAb-CHO-G4 an Tag 3). Außerdem sind auch die Mittelwerte der restlichen Kultivierungstage und der parallelen Glutamin-Induktion mit angegeben. Die über einen Einstichproben t-Test (p-value < 0,001, S0:0,1) berechneten „signifikanten“ Hits sind in fett dargestellt.

		Parallele Kultivierung			Nach Glutamin-Induktion			Parallele Kultivierung			Nach Carnosin-Induktion		
Gen-name	Proteinname	M/L Tag 1	M/L Tag 2	M/L Tag 3	M/L Tag 4	M/L Tag 5	M/L Tag 6	H/L Tag 1	H/L Tag 2	H/L Tag 3	H/L Tag 4	H/L Tag 5	H/L Tag 6
mAb	<i>Anti-dectin-1 15E2 light chain</i>	0,29	0,28	0,38	0,27	0,13	0,87	-0,01	-0,06	0,02	-0,59	-0,54	0,72
Ptrf, Cavin1	<i>Caveolae-associated protein 1</i>	NaN	-0,31	-0,33	-0,46	-0,37	-0,23	NaN	-0,34	-0,46	-0,51	-0,31	-0,43
Nup54	<i>Nucleoporin p54</i>	NaN	0,10	-0,35	-0,11	NaN	NaN	NaN	0,29	-0,27	-0,42	NaN	NaN
Manf	<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>	0,43	0,28	0,13	0,13	-0,01	-0,02	0,02	-0,02	0,09	-0,38	-0,52	-0,16
Add1	<i>Alpha-adducin</i>	-0,64	0,03	0,12	0,06	-0,17	-0,64	-0,24	0,01	0,08	-0,21	-0,36	-0,58
Ociad1	<i>OCIA domain-containing protein 1</i>	NaN	0,26	-0,04	0,10	-0,24	NaN	NaN	0,68	0,46	0,51	0,19	NaN
Hnrnpr	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R</i>	0,19	-0,04	0,17	0,21	0,04	-0,47	-0,05	-0,04	0,20	0,39	0,54	1,16
Rrp12	<i>RRP12-like protein</i>	0,10	0,03	0,20	0,11	0,08	-0,35	0,15	0,04	0,15	0,38	0,32	0,97
Kxd1	<i>60S ribosomal protein L40</i>	NaN	0,08	NaN	0,34	NaN	0,98	NaN	0,04	NaN	0,33	NaN	0,88
Hspd1	<i>60 kDa chaperonin</i>	0,09	0,02	0,13	0,54	0,25	-0,01	0,07	-0,33	0,14	0,34	0,50	1,08
Bud31	<i>Protein BUD31 homolog</i>	0,08	-0,04	0,01	0,19	0,33	NaN	0,02	0,06	0,21	0,26	0,88	NaN
Parp1	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase</i>	-0,12	0,14	0,20	0,22	0,09	-0,10	-0,38	0,05	0,17	0,13	0,66	1,02
Hnrmpu	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	NaN	0,20	0,06	0,29	0,24	NaN	NaN	-0,10	0,06	0,30	0,61	NaN
Abcf1	<i>ATP-binding cassette subfamily F member 1-like protein</i>	0,07	-0,04	0,03	-0,09	0,15	-0,36	0,11	-0,09	-0,04	-0,03	0,59	1,27
Mars1	<i>Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	-0,09	0,12	0,02	-0,07	0,22	-0,14	-0,11	0,09	0,07	0,01	0,50	1,27

Die stärkste signifikante Herunterregulierung 24 h nach 60 mM Carnosin-Induktion in mAb-CHO-G4 konnte für das Protein *Anti-dectin-1 15E2 light chain* berechnet werden. Dieser *identifier* entspricht vermutlich der leichten Kette des rekombinanten mAbs, da die (korrekte) Sequenz des mAbs nicht in der TrEMBL-DB enthalten war. Die hohe Übereinstimmung des intrazellulären mAb-H/L-Ratios vor Induktion korreliert mit dem ähnlichen Wachstumsverlauf der *heavy*- und *light*-Kulturen (Abbildung 29 B). Die innerhalb von 24 h nach Carnosin-Induktion verminderte *light chain*-Abundanz basierte vermutlich auf einer frühen reduzierten Produktgenexpression. Im

weiteren Kultivierungsverlauf konnte eine weitere tendenzielle Herunterregulierung für Tag 5 (48 h nach Induktion) und eine tendenzielle Hochregulierung für Tag 6 bestimmt werden (beide Ratios nicht signifikant). Die Umkehrung des Ratios von Tag 5 auf 6 in der intrazellulären *light chain*-Konzentration wurde gleichzeitig mit der deutlichen Zunahme der auf extrazellulären Messungen-basierenden q_p s detektiert. Die späte Zunahme der q_p einige Tage nach Carnosin-Induktion konnte also auf Basis der intrazellulären Proteom-Daten bestätigt werden.

Neben deutlichen Effekten der Supplementierungen konnten auch deutliche Expressionsunterschiede bereits vor Induktion für Proteine, wie zum Beispiel PTRF (oder CAVIN1), NUP54, oder OCIA1 bestimmt werden. Diese unspezifisch differentiell exprimierten Proteine zwischen den parallelen Ansätzen tragen nicht zum zellulären Verständnis bei und wurden daher nicht weiter diskutiert. Die Notwendigkeit der Analyse von Zeitpunkten vor der Induktion konnte über diese SILAC-Kultivierung hervorgehoben werden. Proteine, für die eine signifikante und Induktions-abhängige Herunterregulierung berechnet werden konnte waren MANF und ADD1. Unter normalen Bedingungen ist der Wachstumsfaktor MANF mit dem Chaperon HSPA5 assoziiert. In Folge von Sauerstoffmangel oder ER-Stress erfolgt eine Hochregulierung und Sekretion von MANF (Glembotski *et al.* 2012). Eine geringere MANF-Expression in Carnosin-induzierten Kulturen kann also auf einem verringertes Stresslevel oder auf einer erhöhten MANF-Sekretion beruhen, wobei die verminderte hier Proliferation und dadurch höheren Nährstoffkonzentration sowie das antioxidative Proteom (siehe 4.2.3.1) der Carnosin-Kulturen eher auf ersteres hinweisen. Um die hier aufgestellten Hypothesen zu testen, sollten in Folgeexperimenten außerdem Sekretom-Analysen durchgeführt werden.

Für einige der signifikant hochregulierten Proteine konnte ebenfalls eine tendenzielle Hochregulierung vor Induktion bestimmt werden, für HSPD1 und RRP12 war diese jedoch mit einem $\log_2 FC \leq 0,15$ relativ gering. Eine tendenzielle Hochregulierung dieses Chaperons und des ribosomalen Faktors konnte für den Vergleich der weiteren Kultivierungstage nach Carnosin-Induktion ebenfalls berechnet werden (nicht signifikant). Für ABCF1 und MARS1 konnte eine deutliche Induktions-abhängige Hochregulierung erst 48 h nach Carnosin-Supplementierung bestimmt werden. Die späte Aufrechterhaltung der q_p in der Absterbephase durch Carnosin-Supplementierung stellt einen besonders interessanten Mechanismus für die Prozessoptimierung dar, wobei ein Zusammenhang zur Reaktivierung des mTOR-Signalings über die FDR-basierte Statistik zuvor bereits diskutiert wurde. Es wird vermutet, dass diese verspäte Hochregulierung des Translations-Initiationsfaktors ABCDF1 und der Methionin tRNA-Ligase (MARS) sowie die andauernde Hochregulierung von HSPD1 und RRP12 eine frühe Grundlage der erhöhten Proteinproduktion bei vermindertem Wachstum war.

Über die TE-Puffer basierte Proteinextraktion der Proben des Kultivierungsverlaufs konnten keine quantitativen Daten von Aminosäuretransportern ermittelt werden. Um den Import von Carnosin bzw. Alanin und Histidin in weiteren Experimenten analysieren zu können, sollte ein Extraktionspuffer gewählt werden, welcher eine Solubilisierung von hydrophoben Membranproteinen gewährleistet.

Für die hier indirekt ermittelte späte ATF4-Aktivierung nach Supplementierung von 60 mM Carnosin konnte bereits im Vorexperiment zur Induktion mit 20 mM-Carnosin der parentalen XL99-Zelllinie Hinweise gefunden werden. Über die Proteomanalyse wenige bis 24 h nach Induktion konnte eine Hochregulierung der Serin-Biosynthese, vermutlich über ATF4, identifiziert werden (siehe 4.2.3.1). In dem SILAC-Experiment der mAb-CHO-G4 hier konnte eine „signifikante“ Hochregulierung der PSPH erst für Tag 6, also 72 h nach Induktion, berechnet werden. Parallel zu der differentiellen MAPK-Aktivierung (siehe Abbildung 27 D) können aufgrund der deutlichen Verzögerung der vermeintlichen ATF4-Aktivierung Unterschiede im Wirkmechanismus von Carnosin auf diese mAb-CHO in Glutamin-freiem Medium im Vergleich zu der parentalen Zelllinie XL99 (Kultivierung mit Glutamin) oder in der erhöhten Carnosin-Konzentration vermutet werden (siehe Abbildung 31). Ein vergleichendes SILAC-Experiment mit der XL99-Zelllinie konnte hier jedoch nicht durchgeführt werden.

Über die Proteomanalyse des Kultivierungsverlauf der mAb-CHO-G4 konnten deutliche Langzeiteffekte der Supplementierung von 60 mM L-Carnosin identifiziert werden, welche in einen Zusammenhang einer späten mTOR-Reaktivierung und erhöhten rekombinanten Proteinproduktion der Zellen in der späten Wachstumsphase gestellt werden konnten. Wie vermutet, konnte eine spezifische Supplementierung von Carnosin, als vermuteter wirksamer Inhaltsstoff von Hydrolysaten (Azarian *et al.* 2017), zu einem gewünschten Phänotyp führen. Obwohl der beschriebene Zellzyklusarrest nach Carnosin-Supplementierung (Lee *et al.* 2018) hier über eine Inhibierung der Zellproliferation bestätigt werden konnte, wurde für die Induktion in der exponentiellen Phase von CHO-Zellen keine Apoptose-Induktion, wie für Krebszellen (Lee *et al.* 2018), beobachtet. Da in den vielen Signaling-Studien an Krebszellen jedoch nur einen Zeitraum von 24 h analysiert bzw. beschrieben wird und die Effekte auf das Proteom und die rekombinante Proteinproduktion hier erst nach 72 h deutlich erkennbar waren, sollte eine Signaltransduktion kurze Zeit nach Carnosin-Zugabe über *Phosphoproteomics* analysiert werden.

Phosphorylierungsänderungen nach Carnosin-Supplementierung

Über die Analyse des Phosphoproteoms sollten erste Hinweise auf Signaltransduktions-Mechanismen nach Carnosin-Supplementierung in der exponentiellen Phase von mAb-CHO gefunden werden. Die Glutamin-Supplementierung des vermeintlich qualitativ schlechteren *medium*-Mediums wurde parallel mit analysiert, aber mit einer größeren Unsicherheit diskutiert.

Zunächst wurde ein in der Phosphoproteom-Literatur beschriebener SDC-basierter Puffer für die Proteinextraktion (Masuda *et al.* 2011; Humphrey *et al.* 2018) mit anschließendem standardmäßigen Verdau und TiO₂-basierter Phosphopeptid-Anreicherung für ein Induktions-Zellpellet (120 min nach Zugabe) getestet. Nach nLC-MS/MS-Messung über einen 60 min Gradienten konnten 2.151 PP und über einen 120 min Gradienten 2.615 PP mit einer hohen Anreicherungseffizienz von je 97,4 bzw. 97,5 % durch eine einfache PD-basierte Auswertung (ohne Angabe der *medium*- und *heavy*-label) identifiziert werden. Aufgrund der vermeintlichen Kompatibilität des Puffers mit dem Probenvorbereitungs- und Messworkflow wurde dieser verwendet, um die Proteine der verbleibenden drei bzw. vier biologischen Replikate der Induktionsproben (0, 5, 60, 120 und 240 min) zu extrahieren. Anschließend wurden jeweils 500 µg Protein über den Probenvorbereitungs-Workflow inklusive TiO₂-PP-Anreicherung (mit 20 µl Elutionsvolumen) vorbereitet. Über eine Nanodrop-basierte Konzentrationsbestimmung der Elutionen konnte eine mittlere Konzentration von $0,395 \pm 0,052 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt werden. Die geringen Schwankungen ließen auf einen reproduzierbaren Verlauf der Probenvorbereitung schließen. Entsprechend freier Orbitrap-Messzeit wurden die Induktionsproben teilweise über 60 min bzw. 120 min nLC-MS/MS-Methoden vermessen. Die Messung der Phosphopeptidangereicherten Proben führte jedoch zu großen Schwankungen in der Qualität der Datensätze, so dass einige Messungen nicht für eine Quantifizierung verwendet werden konnten und für andere nur eine geringe Korrelation zwischen biologischen Replikaten berechnet wurde. Aufgrund der stabilen HeLa-Identifizierungen von 1.441 ± 75 Proteine basierend auf 200 ng HeLa als Qualitätskontrolle der nLC-MS/MS-Strecke über den Zeitraum der Messungen Anfang bis Mitte März 2020 (siehe 4.1.3), konnten allgemeine Problem mit dem System ausgeschlossen werden. Schwankungen im pH-Wert der Probe könnten zu einer verminderten Bindung der Phosphopeptide ans Säulenmaterial geführt haben (Ondrej *et al.* 2020). Außerdem wird vermutet, dass die Verwendung von *stainless steel*-Emittern und das Anlegen von hohen Spannungen zu einer irreversiblen Bindung von Phosphopeptiden an den Emitter führte (Henry *et al.* 2017a). Obwohl hoch-qualitative Phosphoproteom-Studien beschreiben, mit Stahlemittern gemessen zuhaben (Reimann *et al.* 2020), sollten in Zukunft Glasemitter in Anlehnung an das aktuelle EasyPhos-Protokoll verwendet werden (Humphrey *et al.* 2018).

Eine MQ-basierte Auswertung der PP-Messungen führte zur Quantifizierung von insgesamt 4.372 P-sites. Für die Proben der Zeitpunkte 0, 5 und 120 min nach Induktion mit Carnosin bzw. Glutamin standen vier biologische Replikate für eine Statistik-Berechnung zur Verfügung. Da nur zwei Replikate für die Proben nach 60 und 240 min verwendbar waren, konnte für diese Zeitpunkte keine Statistik berechnet werden. Über einen Einstichproben t-Test ($p\text{-value} < 0,01$, $S0:0,1$) wurden signifikante Regulierungen der H/L- und M/L-Ratios zur Evaluierung von Effekten durch Carnosin bzw. Glutamin berechnet. Durch Auswertung der Datensätze der Glutamin-Zugabe (M/L) wiesen

jeweils 28, 83 und 101 P-sites signifikante Regulierungen vor (0 min) und 5 bzw. 120 min nach Induktion auf. Für die Carnosin-Induktion (H/L) konnten 14, 157 und 201 P-sites vor (0 min) und 5 bzw. 120 min nach Supplementierung als im Vergleich zur PBS-induzierten Kontrollkultur signifikant reguliert berechnet werden. Aufgrund der hohen Variabilität der Phosphoproteom-Messungen konnten keine signifikante Anreicherungsstatistiken berechnet werden, welche für eine globale Analyse hilfreich wäre. Ein Filterschritt auf signifikante Hits 5 oder 120 min nach Carnosin-Zugabe ergab eine Liste an 330 Phosphorylierungsstellen, die nach Substraktion hoch-variabler Quantifizierungen in der Kontrolle (0 min) für eine Zusammenfassung der Top-regulierten Hits in Tabelle 14 diente.

Tabelle 14 Top-regulierte und signifikante Phosphorylierungsänderungen 5 bzw. 120 min nach 60 mM Carnosin-Supplementierung in der exponentiellen Phase von mAb-CHO-G4-Zellen. Dargestellt sind jeweils die mittleren log₂-Ratios H/L (Carnosin vs. Kontrolle) und M/L (Glutamin vs. Kontrolle) für die Zeitpunkte vor (0), 5, 60, 120, und 240 min nach Induktion. Für die Zeitpunkte 0, 60 und 120 wurde der Mittelwert aus vier biologischen Replikaten gebildet und signifikante Hits (Einstichproben t-Test, p-value < 0,01, S0:0,1) in fett dargestellt. Die Mittelwert-Bildung für die Zeitpunkte 60 und 240 min erfolgte auf Basis von zwei biologischen Replikaten. Quantitative Daten basierend auf einer Multiplizität von 2 wurden im *Sequence Window* goldfarben hervorgehoben.

Gen-name	Protein-name	P-site	H/L 0	H/L 5	H/L 60	H/L 120	H/L 240	M/L 0	M/L 5	M/L 60	M/L 120	M/L 240	Sequence window
Cad	CAD Protein	S73	0,11	-0,46	0,12	-1,49	-1,24	-0,34	-0,43	-0,03	0,03	0,09	LPDGRFHLPP RIHRASDFGLP AEEPKEKPSR
Eml4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	S141	-0,02	-0,82	-1,98	-1,32	-0,94	0,08	0,17	-0,44	0,01	0,13	ESHNSDQSPQ MRASPPQPS SQPLQINRQTP
Larp1	La-related protein 1	S144	-0,08	-0,22	-0,86	-0,93	-1,02	-0,16	-0,39	-0,61	-0,23	-0,37	VPRQHYQKET ESAPGSPRAV TPVPTKTEEVS FPDRLADDEG DSDSESVGQS RGRRKQK__
Baz1b	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	S1380	0,10	-0,77	-1,16	-0,92	0,05	0,33	-1,02	-0,65	-0,17	-0,32	— KRRKFPDLRA DDEGSDSE VGQSRGRRQ KK
Baz1b	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	S1376	0,03	-0,59	-1,16	-0,91	0,02	0,27	-0,91	-0,65	-0,11	-0,23	— KRRKFPDLRA DDEGSDSE VGQSRGRRQ KK
Dock1	Dedicator of cytokinesis protein 1	S775	-0,08	-0,15	-0,26	-0,88	-0,97	-0,40	-0,30	-0,82	-0,36	-0,30	KTPPPPPPKTT RKQTSVDSGIV Q
Pkp4	Plakophilin-4	S324	0,14	-0,25	-1,12	-0,87	NaN	-0,31	-0,29	-0,72	-0,15	NaN	VGSPLTLTDA QTRVASPSQG QVGS SSPKRS G
Utp18	Putative U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 like protein	S59	0,10	-0,37	NaN	-0,84	-1,25	-0,04	-0,41	NaN	-0,44	-0,32	KPSKSKGHLH GSSDDSEVED EAKDTLPSQK K
Utp18	Putative U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 like protein	S56	0,10	-0,38	NaN	-0,81	-1,25	-0,04	-0,38	NaN	-0,42	-0,32	AFYKPSKSKG HLHGSSDDSE VEDEAKDTLP S
Kmt2a	Histone-lysine N-methyltransferase MLL	S752	-0,03	-0,42	NaN	-0,81	-0,49	-0,69	-0,29	NaN	-0,12	0,19	DESMDTKKER ASGPESPVQG PRIKHVCRHAA
Ahnak	Periaxin	S1631	0,15	-0,90	-0,07	-0,80	-0,17	-0,38	-0,02	-0,75	-0,07	0,14	KFNFSKPKGK GGVTGSPEASI SGSKGDLKSS
Afap1	Actin filament-associated protein 1	S669	0,05	-0,98	-0,95	-0,64	-0,08	-0,11	-0,12	0,07	-0,29	-0,09	LGLAIEPKSGT SSPQSPVFRH RTLENSPISS
Ahnak	Periaxin	S1639	0,11	-0,82	-0,54	-0,58	-0,09	-0,45	-0,27	-0,65	-0,03	0,12	GKGGVTGSPE ASISGSKGDLK SSKASLGSLE KGVGPKETP PGGNLSPAPR LRRDYSYERV G
Prrc2a	Protein PRRC2A	S997	-0,05	-0,93	-0,79	-0,32	0,75	-0,22	0,27	-0,12	0,23	0,29	

Ubxn7	UBX domain-containing protein 7	S245	-0,14	-0,75	NaN	-0,24	0,65	0,07	0,51	NaN	-0,21	0,01	KKCARSESLID ASEDSQLEAAI RASLQETHF
NdrG1	Protein NDRG1	T366	-0,07	-0,91	-0,62	-0,16	-0,58	0,32	0,59	0,21	0,43	0,24	RSRSHTSEGS RSRSHTSEDA RLNITPNSGAT KGGGVTGSPE ASISGSKGDLK SSKASLGSLE
Ahnak	Periaxin	S1639	NaN	-0,68	NaN	-0,03	0,77	NaN	0,22	NaN	0,05	0,04	ALLRECSTGLD SNEMSPQEKA DKNRNSIESI
Heatr3	HEAT repeat-containing protein 3	S123	0,02	0,79	0,14	0,10	-0,07	0,16	0,21	0,02	0,16	0,09	LENQHQAQD TSDLMSPKR NSQYIIIEGLT
Ints10	Integrator complex subunit 10 Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	S118	-0,04	0,32	0,07	0,20	-0,68	0,35	0,24	0,40	0,20	0,07	VSSEKEAAPD TGAEPSPVDS DPTYSSKVL
Ccar2	Bcl-2-associated transcription factor 1	S298	0,03	0,87	0,08	0,35	0,14	1,05	1,22	0,61	0,90	0,56	SAKNTPSQHS HSIQHSPEHS GSGSVGNSS R
Bclaf1	Coiled-coil domain-containing protein 12	S267	-0,15	0,39	0,55	0,38	0,39	-0,13	0,02	0,10	-0,30	-0,02	LASAVDATTG QEACDSD
Ccdc12	Interleukin-6 receptor subunit beta	S165	0,10	0,30	0,47	0,63	0,81	0,09	0,60	0,26	0,24	0,55	ANPDISHFERS NQVSSGSEED FVRLKQQQVS
Il6st	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	S834	-0,09	-0,13	0,32	0,76	1,04	0,61	1,29	0,07	0,62	0,53	GKRRYCNTEE CLQTGSPGKK EDRTKSKELLC
Arid4b	Protein CUSTOS	S710	0,02	0,44	0,42	0,80	-0,40	0,75	0,68	1,44	0,62	0,29	KKKKRKKKAK KAREASPCCP AGRVSVAEPEN
Custos	Fasciculation and elongation protein zeta-2	S246	0,12	0,22	0,96	0,82	0,62	-0,37	0,29	0,49	-0,07	0,01	RLSMLSQEIQT LKRSSMSSEY ERVKRLSVSE
Fez2	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma	S104	0,01	0,29	NaN	0,85	NaN	0,59	0,44	NaN	0,15	NaN	PSLSAGANSK GPPDFSSDEE REPTPVLGSGT
Tmpo	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma	S66	-0,05	0,01	0,84	0,89	1,25	0,01	-0,18	0,00	-0,15	-0,12	SLSAGANSKG PPDFSSDEER EPTPVLGSGTS
Tmpo	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK-like protein	S67	-0,05	0,01	0,85	0,89	1,25	0,01	-0,18	0,04	-0,14	-0,14	WTHEVFSSRS SEVLVSGDDE DYRRIYTTKIK
Ahnak	Rab GTPase-binding effector protein 1	S149	0,00	0,31	0,87	0,91	1,53	-0,35	-0,22	0,04	-0,26	-0,31	KSDSDMFKDG LRRAGSTDSL GTSSSLQSKAL
Rabep1	Rab GTPase-binding effector protein 1	S316	0,04	0,44	1,26	0,91	0,61	0,10	0,09	1,08	0,01	0,02	SDMFKDGLRR AQSTDSLGT SSLQSKALGYN
Rabep1	Eukaryotic translation initiation factor 4B	S319	0,04	0,43	1,25	0,93	0,62	0,04	0,10	1,06	0,02	0,11	AWVKRSSNPP ARSQSSDTEQ QSPTSGGGKVA
Eif4b		S503	0,04	0,35	0,90	0,97	0,88	-0,05	0,55	0,27	-0,12	0,11	

Neben einer hohen Dynamik im Phosphorylierungsgeschehen sowohl für Carnosin- als auch für Glutamin-supplementierte CHO-Zellen konnten einige wenige Carnosin-spezifische Phosphorylierungsänderungen ermittelt werden, darunter eine langanhaltende P-site Hochregulierung für TMPO, eIF4B, RABEP1 und BCLAF1 und eine P-site Herunterregulierung für CAD, EML4, PRRC2A und NDRG1.

Das Protein *Lamina-associated polypeptide 2 Isoform α* (TMPO) hat Funktionen im Zellzyklus über die Verankerung des Zellzyklus-regulierenden Tumorsuppressors *Retinoblastoma-associated protein* (RB1) im Zellkern. Die hier berechnete TMPO-Hochregulierung von den P-sites S66 und S67 für 60 bis 240 min nach Carnosin-Induktion wurde in der Literatur für Krebszellen nach 15 min Rapamycin-Induktion beschrieben (Chen *et al.* 2009). Über diese Parallelen konnten erste Hinweise auf einen Rapamycin-ähnlichen Wirkmechanismus von Carnosin gefunden werden. Für das *Bcl-2-associated transcription factor* (BCLAF1) werden Funktionen in dem *DNA Damage Response* und einer Förderung der TP53-Transkription beschrieben. Neustens wurde BCLAF1 als *downstream* Target des NF- κ B-Signalings evaluiert und darüber eine Beteiligung in der Seneszenz-Regulierung nachgewiesen (Shao *et al.* 2016). Eine generelle Regulierung der Phosphorylierung von BCLAF1 konnte über *nocodazole*-synchronisierte Zellen in der Mitose-Phase ermittelt werden (Olsen *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass die Zugabe von Carnosin über ungeklärte Mechanismen zur Aktivierung des DNA *damage* Pathways führte und die hier ermittelte Hochregulierung der BCLAF1 S267-Phosphorylierung (S268 human) in Zusammenhang zu einem vermuteten Zellzyklusarrests (über die beobachtete Wachstumsinhibierung) gebracht. Insgesamt konnten Parallelen bezüglich des in der Literatur beschriebenen Zellzyklus-Arrests und der Verbindung zum NF κ B-Signaling vermutet werden. Die beschriebene Apoptose-Induktion von Krebszellen (Lee *et al.* 2018) konnte hingegen nach Carnosin-Induktion für CHO-Zellen nicht beobachtet werden.

Der Translationsinitiations-Faktor eIF4B wird entweder über die mTOR-aktivierte p70 *ribosomal S6 kinase* (S6K) oder die ERK-aktivierte p90 *ribosomal S6 kinase* (RSK) an S422 phosphoryliert, was zu einer Assemblierung des Translations-Initiationskomplexes mit eIF4A und eIF3 führt und darüber Signale von mTOR- und MAPK-Signaling an diesem Protein zusammenlaufen (Kuang *et al.* 2011; Shahbazian *et al.* 2006). Für eine eIF4B-Phosphorylierung an S406 wurden ebenfalls Funktionen auf die Proteinsynthese während der Mitose beschrieben, wobei diese Phosphorylierung von der *Maternal Embryonic Leucine zipper Kinase* (MELK) katalysiert wird (Wang *et al.* 2016). Nach Carnosin-Supplementierung konnte eine Hochregulierung der eIF4B S503 (S498, human)-Phosphorylierung nach bereits 5 min, jedoch mit der höchsten Regulierung (ca. zweifach) nach 120 min, berechnet werden. Weder Kinase noch Funktion der durch Carnosin regulierten eIF4B-S498-Phosphorylierung sind bekannt. Da die Proliferations- und Proteintranslations-assoziierte Phosphorylierung an S406 in diesem Experiment nicht identifiziert und quantifiziert werden konnte, sollte eine Westernblot-basierte Validierung durchgeführt werden. Trotz Übereinstimmung der Sequenzen des Proteins von *C. griseus* und *Homo Sapiens* im Bereich der S406-Phosphorylierung konnte über die Verwendung des P-eIF4B (S406)-Antikörpers keine Bande für das CHO-Zelllysate detektiert werden und somit keine Validierung erfolgen.

Außerdem konnte eine Herunterregulierung der S73-Phosphorylierung von CAD (S1859 human) 120 bis 240 min nach Carnosin-Induktion berechnet werden. Diese in der Literatur häufig beschriebene Phosphorylierung wird über mTOR-C1-aktivierte S6K1 katalysiert und steigert die

de novo Pyrimidin Synthese (Ben-Sahra *et al.* 2013). Über die signifikante Herunterregulierung 120 min nach Carnosin-Induktion konnte ein inhibiertes mTOR-Signaling in CHO-Zellen nachgewiesen werden.

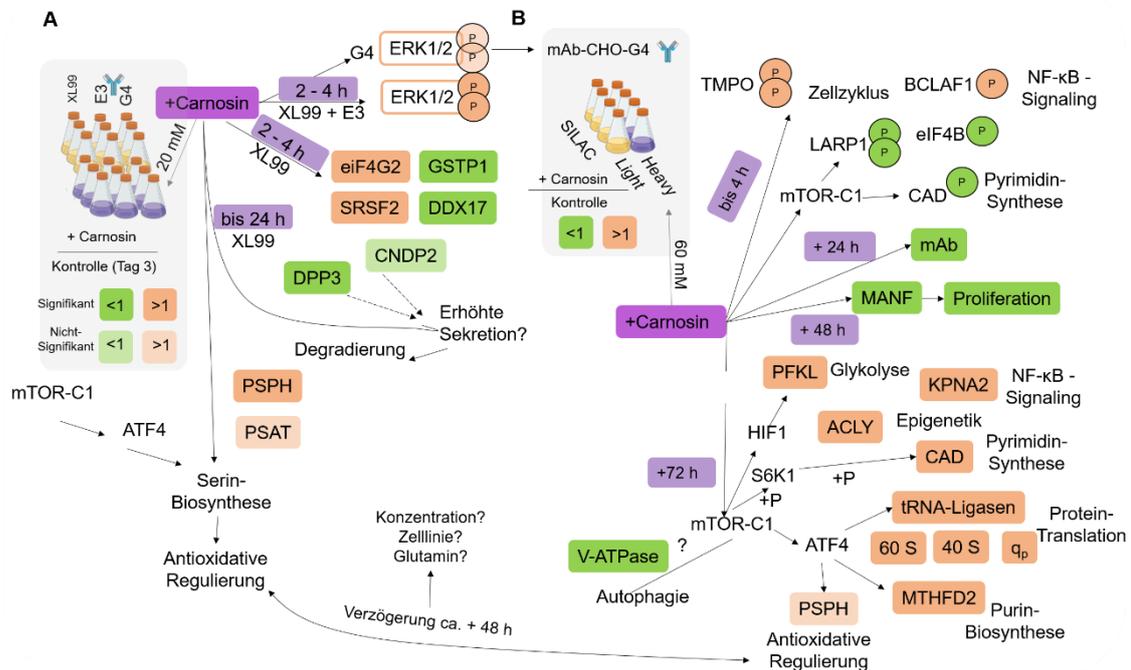


Abbildung 31 Zusammenfassung der erhobenen Ergebnisse zur Carnosin-Induktion auf CHO-Zellen. **A)** Eine LFQ-Kultivierung mit 20 mM Carnosin-Induktion von drei Zelllinien (XL99, E3 und G4) führte zu keinen Auswirkungen auf Wachstum (und Produktivität). Über Westernblot konnte eine Zunahme an aktivierender P-ERK1/2 für die Zelllinien XL99 und E3 detektiert werden. Eine statistisch abgesicherte LFQ-Analyse führte zu signifikanten Expressionsänderungen von ATF4-Targets und cytosolischen Dipeptidasen (siehe 4.2.3.1). **B)** SILAC-MS-Experiment mit Phospho- und Proteomanalyse nach 60 mM L-Carnosin-Induktion von mAb-CHO-G4 in der exponentiellen Phase. Über *Phosphoproteomics* konnte eine mTOR-Inhibition und eine frühe Wachstumsinhibierung vermutet werden. Über Proteomanalysen des weiteren Kultivierungsverlaufs konnten Hinweise auf eine Reaktivierung von mTOR-C1 72 h nach Carnosin-Induktion gefunden werden, die in Verbindung zu der stabilisierten zellspezifischen Produktivität gebracht wurden. Eine beobachtete zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Experimenten könnte auf Unterschieden der Carnosin- oder Glutamin-Konzentration sowie auf einem zellspezifischen Mechanismus beruhen.

Aufgrund der Variabilität der PP-Messungen einerseits und der Vielzahl an regulierten Phosphorylierungsstellen mit bislang ungeklärter Funktion andererseits konnten keine exakten Mechanismen der Carnosin-Wirkung evaluiert werden konnten. Es konnten allerdings Hinweise auf den in der Literatur beschriebenen Zellzyklus-Arrest, eine frühe Rapamycin-ähnliche Wirkung und einen Einfluss auf das NF-κB-Signaling gefunden werden. Die Supplementierung von Carnosin, dem β-Alanin und L-Histidin-Dipeptid, führte über eine schnelle Signaltransduktion zu einer mTOR- und Wachstumsinhibierung sowie einer Proteomänderung in der späten Wachstumsphase. Obwohl der Kultur durch Carnosin Nährstoffe zur Verfügung gestellt wurden, konnte gezeigt werden, dass eine direkte mTOR-Inhibierung nach Induktion erfolgte. Über die Proteom-Analyse der stationären und Absterbephase konnte eine späte mTOR-Reaktivierung in

Verbindung zu der erhöhten Produkt-Proteintranslation evaluiert werden. Insgesamt konnten positive Effekte von der L-Carnosin-Induktion auf den Kultivierungsprozess der mAb-CHO-G4-Zelle hier evaluiert werden. Aufgrund der späten Stabilisierung der q_p sollte der Einsatz des Dipeptids auf *fedbatch*-Kultivierungen evaluiert werden. In weiteren Experimenten dieser Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob eine vermeintliche mTOR-Aktivierung über das Konstanthalten von Nährstoffen erfolgen kann, weshalb die Zugabe von *feed*-Medium in *fedbatch*-Kultivierungen im Folgenden über *Proteomics* analysiert wurde.

4.3. Das CHO-K1 Proteom im Bioreaktorkultivierungs-Verlauf

Für eine prozessrelevante Analyse des Proteoms einer CHO-K1-Zelllinie wurden Proben von *batch*- und *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen, durchgeführt in biologischen Triplikaten von Herrn Oliver Hertel, vorbereitet, gemessen und ausgewertet. Obwohl *omics*-Daten zu *fedbatch*- und *batch*-Kultivierungen in der Literatur zu finden sind, wurde noch kein Proteomvergleich der beiden Kultivierungsformen publiziert. Neben der spezifischen Analyse zuvor diskutierter Proteine sollte eine *non-hypothesis limited*-Herangehensweise zur Identifizierung von Targets für die Zelllinien- und Prozessoptimierung über den Vergleich der beiden Kultivierungsformen entwickelt werden. Außerdem wurde die LFQ-basierte Proteomanalyse komplexer Proben in Folgeexperimenten auf Basis von Gel-basierten *Proteomics* geprüft und darüber entwickelte Hypothesen zum sogenannten *chaperone code* (Nitika *et al.* 2020) über weitere nLC-MS/MS-Nachmessungen bekräftigt. Obwohl Chaperone schon häufig Ziel von CHO-Zelllinienoptimierungen waren, wurde hier erstmals der *chaperone code* in CHO-Zellen entdeckt und darüber neue potentielle Herangehensweisen zur Prozessoptimierung diskutiert.

4.3.1. Proteomanalyse von CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen

Die Vorkulturen der CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen wurden von Herrn Oliver Hertel aus drei Aliquots einer WCB parallel aufgetaut und vor Inokulation von 2 L-Glasbioreaktoren für drei Passagen (jeweils drei bis vier Tage und Verdopplungen) kultiviert. Eine Ausnahme war hier das zweite biologische Replikat, welches eine Passage länger als Vorkultur kultiviert wurde. Die Zugabe von *feed*-Medium erfolgte insgesamt viermal jeweils nach der Probennahme an Tag 3 bis 6. Die tägliche Analytik der *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen umfasste die Bestimmung der Zelldichten und Viabilitäten, sowie der Probennahme von zellfreiem Überstand zur Glukose-, Laktat-, und Aminosäure-Konzentrationsbestimmung. Diese Metabolit-Proben wurden täglich eingefroren und im Anschluss an die Kultivierung in einer Sequenz vermessen. Eine tägliche Probenahme von Zellen für die Proteomanalyse erfolgte von Tag 3 bis einschließlich Tag 12, wobei die eingefroren Zellpellets im Anschluss an die Kultivierung mittels TE-Puffer-Extraktion aufgeschlossen, Proteinaliquots vorbereitet, tryptisch verdaut, über die Resolvex-Anlage aufgereinigt (siehe 4.1.2) und anschließend über die nLC-MS/MS-Strecke vermessen wurden.

Die Ergebnisse der Kultivierung zur Berechnung der viablen Zellzahl über die Kultivierungszeit, inklusive Skizzierung der Volumenzunahme im Bioreaktor und die Ergebnisse der Metabolit-Analytik wurden nicht selbst erhoben und sind daher im Anhang abgebildet (siehe Anhang Abbildung 42). Für einen Vergleich zu den Proteom-Daten wurden die Ergebnisse im Folgenden kurz zusammengefasst. Das Wachstum der drei biologischen Replikate verlief sehr reproduzierbar, wobei keine großen Abweichungen in der *lag*-Phase (Tag 0-2, 10-14 % Standardabweichung, SD), der exponentiellen Phase (Tag 3-6, 2-9 % SD), der stationären Phase (Tag 7-10, 1-9 % SD) und der Absterbephase (ab Tag 11, 15-19 % Sd) festgestellt wurden (siehe Anhang Abbildung 42 A). Auch

die Metabolit-Analytik führte zu reproduzierbaren Ergebnissen mit geringen Fehlerbalken (siehe Anhang Abbildung 42 B). Die Glukosekonzentration im Medium sank bis zu Tag 6, an dem keine Glukose mehr detektiert werden konnte. Die Bestimmung der Laktatkonzentration zeigte einen kontinuierlichen Anstieg bis Tag 7 auf 58 mM, gefolgt von einer Abnahme bis 2,5 mM an Tag 12. Zeitgleich mit der fast vollständigen Verwertung des akkumulierten Laktats sank die Viabilität der Kultur unter 40 %. Die genaue Zusammensetzung an Vitaminen und Aminosäuren des kommerziell erworbenen *feed*-Mediums ist bis auf die Glukose- und Glutamin-Konzentration nicht bekannt. Es konnte jedoch trotz der Zufütterung des *feed*-Mediums ab Tag 6 keine Glukose im Überstand detektiert werden, was auf den Inhalt einer weiteren Zucker-Quelle schließen lässt. Nachdem Glukose als Energiequelle aufgebraucht war, erfolgte ein metabolischer Shift der Zellen zur Verstoffwechselung von Laktat (Hartley *et al.* 2018). Das schnelle Überschreiten von inhibitorischen Laktatkonzentrationen ab Tag 4, sowie der Glukosemangel ab Tag 6 trugen vermutlich zur Beendigung des exponentiellen Wachstums bei. Für die CHO-K1 als Parentalzelllinie erscheinen Optimierungen hinsichtlich einer Reduzierung der Laktatakkumulation, durch zum Beispiel *knock-down* der LDHA oder PDK sinnvoll (Kim and Lee 2007; Zhou *et al.* 2011; Hartley *et al.* 2018). Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der Laktatakkumulation wird in der Verwendung von *small molecules* zur spezifischen Aktivierung von des PDC gesehen, um den Fluss von Pyruvat in den TCA zu erhöhen. Für Krebszellen konnte gezeigt werden, dass Butyrat über eine Inaktivierung von Sirtuin 3 (SIRT3) zur Hyperacetylierung von PDHA1 und damit zur Aktivierung des PDC und Inhibierung des Warburg-Effekts führt (Xu *et al.* 2017b). Die bekannten Produktivitäts-steigernden Effekte von Butyrat auf CHO gehen jedoch mit einer frühen Apoptose-Induktion einher (Jiang and Sharfstein 2008; Camire *et al.* 2017), weshalb eine spezifische Inhibierung von SIRT3 über aktuell entdeckte spezifische *small molecules* erfolgen könnte (Loharch *et al.* 2021).

Aus der Analyse der Aminosäure-Konzentrationsverläufe (siehe Anhang Abbildung 42 C und D) lässt sich eine stetige Akkumulierung von Alanin (Ala, auf über 30 mM) und Glycin (Gly, auf 12 mM) feststellen. Eine stetiger Anstieg von Alanin konnte bereits in publizierten *fedbatch*-Kultivierungen beobachtet werden (Fan *et al.* 2015). Eine erhöhte Akkumulierung konnte außerdem in GSH-inhibierten CHO-Zellen beobachtet werden (Chevallier *et al.* 2020). Alanin kann zum Beispiel in Folge einer Energiegewinnung über die Glutaminolyse akkumulieren und Glycin durch den Abbau von Serin synthetisiert werden. In Übereinstimmung dazu ist eine Reduktion der Glutamin (Gln)- und der Serin (Ser)-, aber auch der Asparagin (Asn)-Konzentration im Medium zu beobachten. Nach Zugabe von *feed*-Medium konnte ein Anstieg der Konzentrationen der drei Aminosäuren detektiert werden. Ab Tag 7, einen Tag nach der letzten pulsartigen Zufütterung, wurden wieder sinkende Konzentrationen für die drei Aminosäuren Gln, Ser und Asn bestimmt. Ein detektierter Mangel der Aminosäure Asparagin ab Tag 9 liegt zeitgleich zu einer beginnenden

Abnahme der Viabilität der Kulturen vor. Der Energiebedarf kann zu diesem Zeitpunkt weder durch Glukose noch durch Aminosäuren gedeckt werden und die vorhandene, kontinuierlich sinkende Laktatmenge reicht vermutlich nicht aus, um den Bedarf der Zellen zu decken. Um die stationäre Phase dieses Prozesses zu verlängern, könnte zum Beispiel die Asparaginkonzentration im *feed*-Medium erhöht werden.

Weitere Prozessoptimierungs-Strategien sollen über die Analyse des intrazellulären Proteoms evaluiert werden. Die parallel-vorbereiteten Gesamtproteom-Proben der drei Kultivierungen über zehn Zeitpunkte wurden mit einem effektiven Gradienten von 60 min pro Probe über die nLC-MS/MS-Strecke vermessen. Die Rohdaten und Auswertungen über die MaxQuant-Software wurden über das PRIDE-Partner Repository mit der Datensatz-Identifikation PXD018439 im ProteomeXchange-Konsortium hinterlegt (Vizcaíno *et al.* 2015) und wurden nach erfolgreicher Publikation der Daten (Schelleter *et al.* 2021) öffentlich freigegeben. Die Auswertung über die MaxQuant Version 1.6.2.10 umfasste den Datenbankabgleich mit TrEMBL-Daten der Spezies *C. griseus* und *M. musculus* (Version Dezember 2017, siehe 3.6.2) und eine LFQ-Quantifizierung unter Verwendung des *Match-Between-Run* Algorithmus ausschließlich über *unique* Peptide.

Durch die Auswertung der erfassten Daten (30 Messungen) konnte nur eine sehr geringe Korrelation der Daten von Tag 12 festgestellt werden, weshalb diese Daten für Zellen aus der Absterbephase für folgende Analysen, dargestellt in Abbildung 32, herausgefiltert wurden. Ausgehend von ca. 2.500 quantifizierten Proteinen insgesamt verblieben nach verschiedenen Filterstufen noch 1.683 Proteine mit mindestens drei validen, quantitativen Werten, ca. 1.200 Proteine für mindestens 70 % und 823 Proteine nach Filterung für 100 % valide Werte (also quantitative Daten für Proben von Tag 3-11). Für die analysierten 27 Proben ergab sich ein mittlerer Pearson-Korrelationskoeffizient von $93,7 \pm 4 \%$ mit einer höheren Korrelation zwischen biologischen Replikaten als zwischen weit-entfernten Zeitpunkten (Abbildung 32 A). Für die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) in Perseus ist das Filtern für quantitative Daten über alle Proben (100 %) notwendig, so dass 823 Proteine für die Berechnung zur Verfügung standen. Über die PCA konnte „Komponente 1“ (53,5 %) die verschiedenen Zeitpunkte weitestgehend chronologisch trennen, wobei nur die exponentielle Wachstumsphase (Tag 3 bis 6) nicht unterscheidbar war (Abbildung 32 B). Durch die PCA konnte außerdem beobachtet werden, dass ein biologisches Replikat (Abbildung 32 B, rundes Symbol, Replikat 3) einen größeren Unterschied zu den beiden anderen biologischen Replikaten aufweist. Die beobachtete Tendenz der Datenpunkte des Replikats zu dem jeweiligen Cluster des Folgetages lässt vermuten, dass die Zellen etwas schneller wuchsen. Bereits durch die PCA sind zunehmende Unterschiede von Tag zu Tag mit fortschreitender Zeit durch die deutlicheren Cluster zum Ende der Kultivierung ersichtlich. Diese Beobachtung konnte zusätzlich durch eine Heatmap gestützt werden, welche die

zusammengestellten Ergebnisse der statistischen Analyse zeigt (Abbildung 32 C). Die jeweils paarweisen Zweistichproben t-Tests wurden mit einer FDR < 0,05 und S0 von 0,1 nach Benjamini-Hochberg berechnet. Für direkt aufeinanderfolgende Proben der exponentiellen Phase (Tag 3 bis 6) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression ermittelt werden, für Tag 10 vs. Tag 11 hingegen konnten 126 signifikant differentiell exprimierte Proteine berechnet werden. Die stärkere Proteomänderung im späten Verlauf der Kultivierung korreliert mit mangelnden Nährstoffkonzentrationen, weshalb der zelluläre Metabolismus vermutlich über Änderungen im Proteom angepasst wurde.

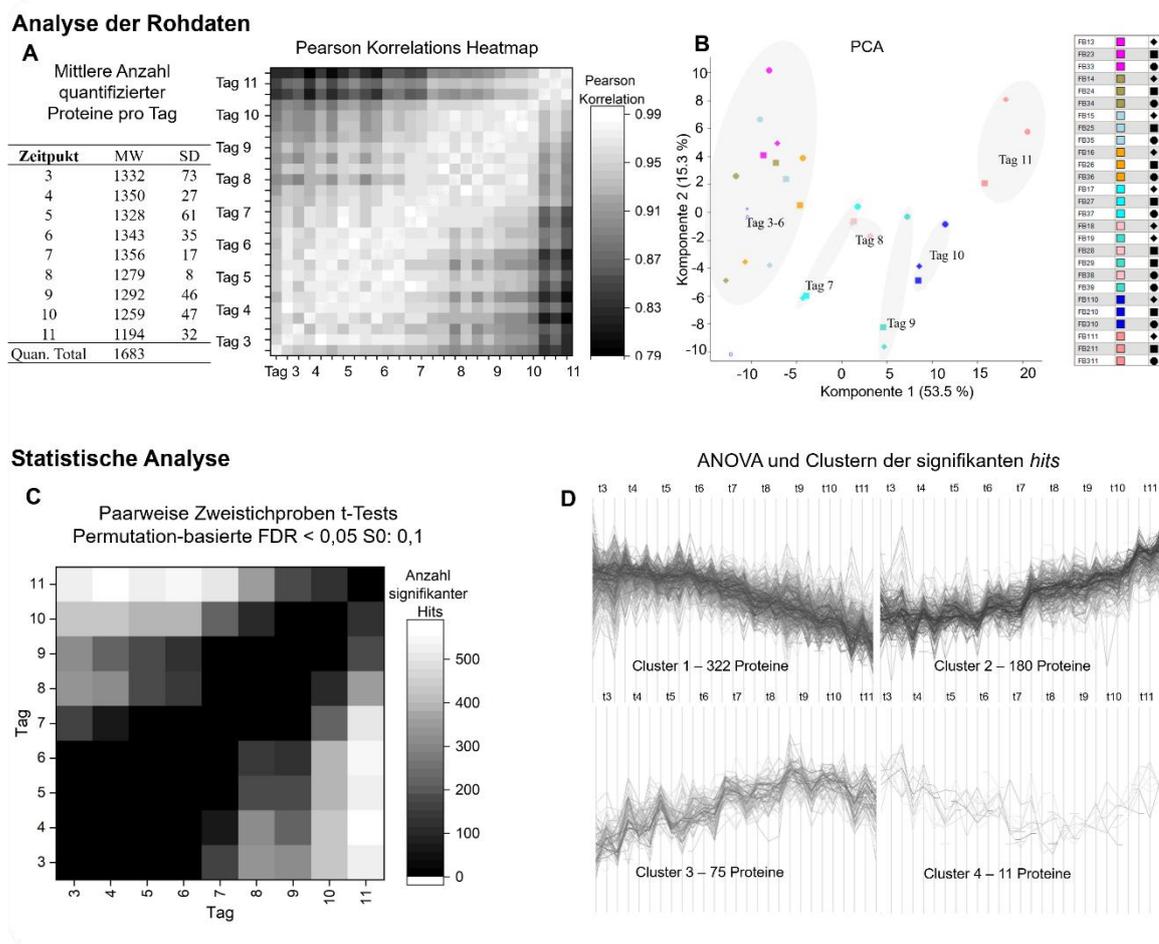


Abbildung 32 Proteomdaten der CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen. **A)** Eine tabellarische Übersicht über die mittleren Anzahlen der quantifizierten Proteine pro Tag. Nach Filterung für mindestens drei valider Werte konnten insgesamt 1683 Proteine quantifiziert werden. Die nebenstehende Pearson-Korrelations Heatmap der 27 nLC-MS/MS-Messungen zeigt hohe Korrelationen zwischen biologischen Replikaten und zwischen direkt benachbarten Zeitpunkten. **B)** Die Filterung für 100 % valide quantitative Werte (in allen Proben) erlaubt die Durchführung einer PCA, die ein nahezu chronologisches Clustern der Daten zeigt. **C)** Zusammenfassung der statistischen Analyse zur differentiellen Expression von Proteinen zwischen den jeweiligen Zeitpunkten, berechnet über einen Zweistichproben t-Test (Permutation-basierte FDR < 0,05, S0:0,1). **D)** ANOVA (Permutation-basierte FDR < 0,05, S0:0,1)-basierte signifikant differentiell exprimierte Proteine in Clustern, bestimmt über den Euklidischen Abstand und die *average linkage* Methode der hierarchische Clusteranalyse. Die vier von sechs prominentesten Cluster wurden als zeitliche Verläufe dargestellt (Schelleter *et al.* 2021).

Im Vergleich zu Tag 3 konnten folgende steigenden Anzahlen an differentiell exprimierten Proteine über den Kultivierungsverlauf berechnet werden: 1, 1, 16, 170, 335, 311, 431 und 518 für Tag 4-11. Die größte Anzahl an unterschiedlichen Expressionsniveaus konnte für den Vergleich von Tag 4 zu Tag 11 mit 571 Proteinen ermittelt werden. Es ist anzunehmen, dass durch den Start der Zufütterungsstrategie nach der Probennahme an Tag 3 die Bedingungen für die Zellen für einen langen Zeitraum konstant gehalten werden konnten, so dass keine deutlichen Anpassungen im Proteom für die zelluläre *maintenance* und die Protein-Homöostase, auch Proteostase, notwendig waren. Danach wurde über die Änderung des Proteoms das Metabolom auf die zunehmenden Nährstofflimitierungen und den metabolischen Shift zur Laktatverstoffwechslung angepasst und das Wachstum der Zellen vermindert. Basierend auf der statistischen Auswertung der Proben für Tag 3 vs. Tag 6 bis 11 wurden die signifikant angereicherten *Gene Ontology Biological Process* (GO BP)-Annotationen in Tabelle 15 unter Angabe des Anreicherungsfaktors aufgelistet. Sowohl der Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase an Tag 6 als auch in die Absterbephase ab 9/10, gehen mit einer deutlichen Änderung des Proteoms einher.

Tabelle 15 Fisher exact- Testergebnisse für signifikant angereicherte Proteinannotationen (Benjamini-Hochberg FDR < 0,05) basierend auf signifikant regulierten Proteinen von t3 vs. t6-11 (Zweistichproben t-Test, Permutation-basierte FDR > 0,05, S0: 0,1). Angegeben ist jeweils der Anreicherungsfaktor. Es wurde für GO BP Annotationen gefiltert. Zusätzlich wurde für einen minimalen Anreicherungsfaktor von ≥ 2 in mindestens einem Vergleich gefiltert. Für #NV konnte kein signifikantes Ergebnis errechnet werden. Zur verbesserten Übersicht wurde die Farbskala-Option in Excel angewendet.

Gene Ontology Biological Process (GO BP)	t6 vs. t3	t7 vs. t3	t8 vs. t3	t9 vs. t3	t10 vs. t3	t11 vs. t3
<i>Cellular ketone metabolic process</i>	5,9	2,3	1,8	1,9	1,7	#NV
<i>Organic acid metabolic process</i>	5,9	2,4	1,8	1,9	1,8	#NV
<i>Oxoacid metabolic process</i>	6,0	2,4	1,8	1,9	1,8	#NV
<i>Carboxylic acid metabolic process</i>	6,0	2,4	1,8	1,9	1,8	#NV
<i>Amine metabolic process</i>	7,2	2,6	1,8	#NV	1,7	#NV
<i>Cellular amine metabolic process</i>	7,8	2,8	2,0	2,0	1,8	#NV
<i>Cellular amino acid metabolic process</i>	8,3	3,0	2,0	2,1	1,8	#NV
<i>Amino acid activation</i>	25,9	6,2	4,0	4,1	3,1	#NV
<i>tRNA aminoacylation</i>	25,9	6,2	4,0	4,1	3,1	#NV
<i>tRNA aminoacylation for protein translation</i>	26,8	6,4	4,1	4,3	3,2	#NV
<i>Cofactor catabolic process</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	2,9	#NV
<i>Coenzyme catabolic process</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	3,2	2,9
<i>Response to endoplasmic reticulum stress</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	3,2	2,9
<i>Acetyl-CoA metabolic process</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	3,2	2,7
<i>Acetyl-CoA catabolic process</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	3,3	3,0
<i>Tricarboxylic acid cycle</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	3,3	3,0
<i>Isocitrate metabolic process</i>	#NV	#NV	#NV	#NV	5,8	#NV

Für den Vergleich von t3 zu t6 konnten GO BP-Annotationen im Bereich der metabolischen Prozesse (Ketone, organische Säuren, Oxosäuren, Carbonsäuren, Amine und Aminosäuren) mit einer Anreicherung von ca. sechs bis acht-fach als signifikant reguliert bestimmt werden. Deutlich

höhere Anreicherungsfaktoren mit ca. 26 wurden für die Annotationen im Bereich der Aminosäure-Aktivierung berechnet. Für die weiteren Vergleiche zwischen t3 und t7-10 konnten dieselben Kategorien als signifikant angereichert identifiziert werden, jedoch mit abnehmenden Anreicherungsfaktoren. Für den Vergleich zu t10 konnten außerdem weitere Kategorien als signifikant angereichert gefunden werden, darunter ‚*response to ER stress*‘, ‚*acetyl-CoA metabolic/catabolic process*‘, ‚*TCA cycle*‘, ‚*cofactor* und ‚*coenzyme catabolic process*‘. Diese wurden teilweise auch für den Vergleich von t3-Proben zu t11 bestimmt wurden, jedoch mit abnehmendem Anreicherungsfaktor.

Über eine statistische ANOVA-Analyse (Permutation-basierte FDR < 0,05, S0:0,1) sollte eine *unsupervised* Datenanalyse erfolgen. Durch Filtern auf signifikante Expressionsunterschiede und eine anschließende Clusteranalyse konnte neben der stetigen Herunter- und Hochregulierung von Proteinen (Cluster 1 bzw. 2) über den Kultivierungsverlauf auch zwei Cluster mit einem Hoch- bzw. Tiefpunkt der Expression an Tag 9 (Cluster 3) bzw. an Tag 8 (Cluster 4) ermittelt werden (Abbildung 32 D). Um die in den Clustern enthaltenen Proteine zu charakterisieren, wurde ein *Fisher exact* Anreicherungstest (Benjamini-Hochberg FDR < 0,02) angewendet. Cluster 4 war mit nur 11 Proteinen zu klein, um eine signifikante Anreicherung zu berechnen. Für Cluster 1, die 322 herunterregulierten Proteine, konnten die Annotationen *regulation of RNA splicing* und *regulation of translation*, sowie die KEGG Pathways *Ribosome*, *Splicosome* und *Proteasome* als signifikant angereichert berechnet werden, darunter Splicing-Faktoren (SF1, SF3A3/B1/B3/B5, SRSF1/2/4/5/6/7/10), Translations-Initiations-Faktoren (eIF3B/F/G/U, eIF4A/B/G1/G2/H, eIF5A, eIF6), aber auch Signaling-Faktoren (MAPK1 oder STAT1) oder Faktoren der epigenetischen Regulierung (CBX3 oder RBBP7). Die signifikante Herunterregulierung im Bereich des Splicosomes mit fortschreitender Kultivierungszeit und vermindertem Nährstoffangebot kann ein Hinweis auf eine generelle verminderte Proteinsynthese sein, die das zelluläre Wachstum und die Zellteilung verlangsamt.

Für Cluster 2, mit 180 hochregulierten Proteinen, wurden neben dem *TCA cycle* (KEGG), die GO BP-Annotationen *peptidyl-proline modification* (i), *acetyl-CoA catabolic process* (ii) und *glucose metabolic process* (iii) als signifikant angereichert identifiziert. Beispiele für die drei Annotationen sind die PPIasen FKBP2/7/10/14, PPIB oder die Disulfid-Isomerase P4HB für (i) bzw. Isocitrate Dehydrogenasen IDH2/3B/3G oder Malat Dehydrogenasen MDH1/2 für (ii) bzw. GPI, PGK1 und GAPDH aus der Glykolyse, G6PDX aus dem Pentose-Phosphat Pathway oder PCX aus der Gluconeogenese für (iii). Außerdem wurde die GO *Chemical Compartment (CC)*-Annotation ‚*ER lumen*‘ als signifikant angereichert berechnet, wobei HSPA5, HSP90B, HYOU1, PDIA3/4/6 oder CALR neben der in (i) genannten Beispielproteine hierfür sind. Für viele dieser Proteine führte eine Überexpression in Prozessoptimierungs-Ansätzen zur verbesserten Prozessperformance, wie zum Beispiel CALR (Chung *et al.* 2004), PDIs (Borth *et al.* 2005) und MDH2 (Chong *et al.* 2010).

Für das Cluster 3, dem kurvenförmigen zu- und wieder abnehmenden Verlauf mit 75 Proteinen wurde die Annotation ‚*tRNA aminoacylation*‘ mit höchstem Anreicherungsfaktor bestimmt, darunter die tRNA-Ligasen für die Aminosäuren Leucin, Aspartat, Threonin, Phenylalain, Methionin, Alanin und Glycin (LARS, DARS, TARS, FARSA, MARS, AARS und GARS). Die hohe Expression der tRNA-Ligasen korreliert mit einer hohen Verfügbarkeit der entsprechenden Aminosäuren im Medium (siehe Anhang Abbildung 42 C und D).

Ein weiteres Beispielprotein des dritten Clusters ist LDHA, welches bereits durch *knock-out*-Experimente zu einer verbesserten Prozessperformance führte (Kim and Lee 2007). Über eine Oxidierung von Laktat zu Pyruvat durch die Laktat Dehydrogenase (LDH) können die Zellen akkumuliertes Laktat wieder verstoffwechseln. Durch die hier beobachtete schnelle und hohe Bildung von bis ca. 58 mM Laktat erscheinen für die CHO-K1 als Parentalzelllinie Optimierungen hinsichtlich einer Reduzierung der Laktatakkumulation sinnvoll. Dafür könnten zum Beispiel in der Literatur beschriebene Methoden, wie durch *knock-down* der LDHA oder PDK angewandt werden (Kim and Lee 2007; Zhou *et al.* 2011; Hartley *et al.* 2018). Da die LDHA-Aktivität über PTMs reguliert wird, wird neben den bekannten Methoden Potential in *small molecule*-basierten spezifischen Inhibierungen vermutet. In Krebszellen konnte gezeigt werden, dass eine K5-Acetylierung die LDHA-Aktivität inhibiert und SIRT2 die spezifische Deacetylase dieser Modifikation ist (Di Zhao *et al.* 2013). Über eine spezifische Inhibierung von SIRT2, zum Beispiel über AGK2 (Outeiro *et al.* 2007), könnte somit die LDHA-Aktivität in der exponentiellen Phase der Kultivierung reduziert werden (siehe Abbildung 38 B). Eine Reduzierung der Laktatakkumulation könnte außerdem über die Aktivierung des PDC erfolgen, um den Fluss von Pyruvat in den TCA zu erhöhen. Für Krebszellen konnte gezeigt werden, dass Butyrat über eine Inhibierung von SIRT3 zur Hyperacetylierung von PDHA1 und damit zur Aktivierung des PDC und Reduzierung des Warburg-Effekts führte (Xu *et al.* 2017b). Die bekannten Produktivitätssteigernden Effekte von Butyrat, was unter anderem SIRT3 inhibiert, gehen jedoch mit einer frühen Apoptose-Induktion einher (Jiang and Sharfstein 2008; Camire *et al.* 2017), weshalb eine spezifische Inhibierung von SIRT3 über aktuell publizierte spezifische *small molecules* erfolgen könnte (Loharch *et al.* 2021).

Neben der diskutierten Herangehensweise zur Modulierung von PTMs Literatur-bekannter Targets zur Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung, sollten neue Targets aus den vorliegenden Daten extrahiert werden. Viele der signifikant regulierten Proteine sind im ER lokalisiert und wurden bereits in *cellular engineering*-Ansätzen zur Steigerung der rekombinanten Proteinproduktion eingesetzt (Prashad and Mehra 2015). Es wird somit vermutet, dass weitere interessante Targets im ER lokalisieren und im Kultivierungsverlauf signifikant reguliert exprimiert werden. Im Folgenden wurden Proteine, via GO *Chemical Compartment* (CC)-Annotierung und Signifikanz gefiltert, nach

zunehmender Gesamtproteinintensität sortiert und die entsprechenden Daten in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 ER-lokalisierte signifikant regulierte Proteine während der *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung der CHO-K1-Zelllinie. Die \log_2 FC wurden jeweils im Vergleich zu Tag 3 berechnet und sind als Median dargestellt. Für fett-gedruckte Ratios konnte eine signifikante Proteinexpressionsänderung berechnet werden. Die Hits wurden nach ansteigender Gesamtproteinintensität des LFQ-Experiments sortiert.

Genname	Proteinname	\log_2 FB4/ FB3	\log_2 FB5/ FB3	\log_2 FB6/ FB3	\log_2 FB7/ FB3	\log_2 FB8/ FB3	\log_2 FB9/ FB3	\log_2 FB10/ FB3	\log_2 FB11/ FB3
Fkbp14	<i>Peptidylprolyl isomerase</i>	NaN	0.59	1.08	0.99	2.43	0.44	2.95	3.60
Lrpap1	<i>Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein</i>	-0.17	-0.85	-0.64	-1.08	-0.20	-0.10	0.12	1.35
Fkbp7	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	-0.34	0.24	0.92	1.42	1.41	0.30	2.37	3.32
Sdf2l1	<i>Stromal cell-derived factor 2-like protein 1</i>	0.22	0.17	0.82	0.31	0.52	0.83	1.22	2.41
Pdia	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	-0.03	-0.02	0.16	0.06	0.95	0.63	1.24	1.72
P4ha1	<i>Procollagen-proline 4-dioxygenase</i>	-0.06	-0.09	0.22	1.53	2.37	2.78	2.80	3.05
Ces1d	<i>Liver carboxylesterase 1-like protein</i>	-0.42	-0.75	-2.22	-0.29	-1.37	-0.98	-0.42	0.92
Ppib	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	-0.11	-0.11	-0.01	0.02	0.65	0.93	1.14	1.44
Erp44	<i>Endoplasmic reticulum resident protein ERp44</i>	0.12	-0.03	0.04	0.12	0.75	0.92	0.98	1.71
Calr	<i>Calreticulin</i>	0.34	0.11	0.54	0.38	0.88	1.10	1.39	1.93
Txndc5	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>	-0.45	-0.54	-0.54	-0.90	-0.02	-0.13	0.21	1.16
Erp29	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	-0.13	-0.13	-0.03	-0.06	0.34	0.48	0.59	1.33
Ugtg1	<i>UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1</i>	0.13	-0.21	0.21	0.37	0.80	1.46	1.49	2.24
Rcn3, Calu	<i>Calumenin</i>	-0.27	-0.54	-0.31	-0.64	-0.19	0.03	0.18	0.41
Pdia	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	-0.19	0.09	0.13	-0.43	0.96	0.47	1.12	2.22
Hyou1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>	0.24	0.24	0.49	0.53	1.04	1.50	1.67	1.88
Pdia6	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	-0.11	-0.01	0.31	0.17	1.09	1.32	1.54	2.33
Pdia4	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	0.05	0.08	0.37	0.34	1.23	1.33	1.65	2.59
Serpinh1	<i>Serpin H1</i>	-0.06	0.14	0.21	0.40	0.60	0.69	0.42	0.53
Hsp90b1	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	0.12	0.09	0.37	0.10	0.82	1.03	1.48	2.32
Hspa5	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	0.00	0.10	0.42	0.32	1.47	1.39	1.93	2.81

Die extreme Hochregulierung von HSPA5 (GRP78, BIP) ab Tag 8 konnte zeitlich wenige Tage nach einer deutlichen Glukoselimitierung im Medium bestimmt werden. Vorherige Arbeiten der AG Zellkulturtechnik konnten ebenfalls Proteomänderungen in Folge einer Glukoselimitierung in

Bereichen des Energie- und Kohlenhydratstoffwechsels und in Stress-assoziierten Proteinen und Chaperonen, wie auch HSPA5 identifizieren. Außerdem wurden für die Bereiche des Cytoskeletts und der Translationskontrolle, sowie auf Ebene der epigenetischen Regulation viele im Kultivierungsverlauf differentiell exprimierte Proteine der MUC1-IgG-produzierenden CHO-Zelllinie identifiziert (Wingens *et al.* 2015). Ein detaillierter Vergleich dieser CHO-Zelllinie, die in einer Perfusionskultivierung ein rekombinantes Fusionsprotein produziert mit der hier analysierten CHO-K1 Parentalzelllinie in einer *fedbatch*-Kultivierung ist jedoch nicht aussagekräftig. Eine Überexpression von HSPA5 führte entweder zu reduzierten Produkt-Sekretionsraten einer mAb-produzierenden CHO-Zelllinie (Borth *et al.* 2005) oder im Gegensatz zu erhöhten volumetrischen Produkttitern von „*difficult-to-express*“-mAbs in CHO-K1 (Pybus *et al.* 2014).

Insgesamt konnte über die Sortierung der Tabelle 16 nach Proteinabundanz festgestellt werden, dass besonders hoch-exprimierte Proteine häufig Ziel von Optimierungsansätzen waren. Durch die Anwendung von sensitiven *Proteomics*-Methoden konnte in diesem Ansatz auch eine deutliche Regulierung von weniger-abundanten ER-lokalisierten Proteinen bestimmt werden, die als Überexpressions-Targets vielversprechender erscheinen, darunter beispielsweise die FK506-Binding Proteins (FKBP) 14 und 7 und SDF2L1. Die Mitglieder der FKBP-Proteinfamilie tragen alle ein *Peptidyl-Prolyl Isomerase* (PPIase)-Motiv und haben als Co-Chaperone Funktionen in Proteinfaltung, teilweise aber auch in der Signaltransduktion (Ghartey-Kwansah *et al.* 2018). Das *Stromal cell-derived factor 2-like protein 1* (SDF2L1) ist neben ERdj3 eine Komponente des HSPA5-Chaperon-Komplexes und hat somit ebenfalls Funktionen in der ER-Qualitätskontrolle. Die Kombination der geringeren Expression und hoher Regulierung von FKBP14, FKBP7 und SDF2L1 lässt vermuten, dass eine Überexpression positive Auswirkungen auf die rekombinante Proteinproduktion einer CHO-Zelllinie hätte. Für die Identifizierung von Targets sollte die Entwicklung von *non-hypothesis-limited* Herangehensweisen erfolgen, wofür zunächst ein Vergleich zu einer *batch*-Bioreaktorkultivierung durchgeführt wurde.

4.3.2. Vergleich von *batch*- und *fedbatch*-Kultivierungen auf Proteomebene

Um die *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen mit einer entsprechenden *batch*-Prozessführung einer CHO-K1-Zelllinie zuvergleichen, wurden diese ebenfalls von Herrn Oliver Hertel durchgeführt und Zellpellets für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Aufgrund einer Kontamination eines Bioreaktors konnten nur für zwei der geplanten drei biologischen Replikate Zellproben über den Kultivierungsverlauf beginnend ab Tag 2 gesammelt werden. Eine Auftragung der Wachstumsdaten der Replikate der *batch*-Bioreaktorkultivierungen zeigte höhere Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten (siehe Anhang Abbildung 43). Um dies auszugleichen, wurden je zwei technische Replikate im Anschluss an die TE-Puffer-basierte Proteinextraktion vorbereitet, wobei jeweils ein Replikat des Peptidverdaus über Maestro- und ein Replikat über das WWP2-Material in der Resolvex A200-Anlage aufgereinigt wurde. Die erhaltenen Proben (Tag 2

– 7) wurden über eine 60 min nLC-MS/MS-Methode vermessen. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Kultivierungsformen auf Proteomebene zu evaluieren, wurde eine kombinierte DB-Suche der *fedbatch*- und *batch*-Proben in MaxQuant durchgeführt, wofür 27 *fedbatch*-Messungen (ohne t12-Proben, siehe 4.3.1), 31 *batch*-Messungen (inklusive technischer Replikate), sowie 8 Messungen einer Exosomen-Charakterisierung (Keysberg *et al.* 2021, *accepted*) aus der *batch*-Kultivierung eingesetzt wurden. Für alle Proben wurde eine identische 60 min nLC-MS/MS-Methode verwendet, so dass der MBR-Algorithmus in MaxQuant aktiviert werden konnte.

Insgesamt konnte eine Quantifizierung von 2.236 Proteinen (in mindestens drei Messungen) erreicht werden. Nach Filterung der Daten für die *batch*-Proben (sechs Zeitpunkte, zwei biologische Replikate, zwei technische Replikate, sowie fünf weitere Messwiederholungen) konnte über die Label-freie Quantifizierung eine mittlere Pearson-Korrelation von 0,88 berechnet werden, wobei Korrelationen von max. 0,97 für nahe Zeitpunkte und dem gleichen Aufreinigungsmaterial erreicht werden konnten. Ein weiterer Filterschritt der *batch*-Daten für mindestens drei valide Werte ergab quantitative Informationen für ca. 1.700 Proteine. Um die Reproduzierbarkeit der *batch*- und *fedbatch*-Kultivierungen über die zwei Proben-Sets zu evaluieren, wurde zunächst ein statistischer Vergleich der Tag 3 *batch*-Proben zu den Tag 3 *fedbatch*-Proben (also vor Zufütterung) durchgeführt. Es konnten 237 Proteine als differentiell exprimiert berechnet werden, welche in einem *Volcano Plot* in Abbildung 33 A hervorgehoben wurden. Die beobachtete Heterogenität kann zum Beispiel durch den Start der Kultivierungen durch verschiedene WCB-Aliquots oder durch den nicht-parallel durchgeführten Probenvorbereitungs-Workflow entstanden sein. Generell wurden für die Probenvorbereitung und Messung identische Protokolle verwendet (bis auf eine *batch*-Peptidaufreinigung teilweise auch über das Maestro-C18-Material). Besonders Unterschiede in der Performance der nLC-MS/MS-Strecke wirken sich auf die berechneten Proteinintensitäten aus (siehe 4.1.3), weshalb für einen weiteren Vergleich Ratios zwischen den beiden Kultivierungsformen für die einzelnen Zeitpunkte berechnet werden sollten. Zunächst sollte über ein stringentes Herausfiltern von Proteinen mit vielen *missing values* eine konsistente Auswertung und Interpretation ermöglicht werden. Für die Bestimmung des Überlapps an quantifizierten Proteinen wurden beide Probensets daher separat stringent für jeweils 70 % valide Werte gefiltert (entsprechend 18 bzw. 21 validen Werten für *fedbatch* und *batch*-Proben). Über ein Venn-Diagramm (Abbildung 33 B) konnte ein Überlapp an 886 quantifizierten Proteinen extrahiert werden, mit jeweils 274 bzw. 254 Proteinen die nur in *batch*- bzw. *fedbatch*-Proben umfassend analysiert werden können. Innerhalb der *batch*-Proben ergab die Berechnung einer Statistik über einen Zweistichproben t-Test (Permutation-basierte FDR < 0,05; S0 0,1) für einen paarweisen Vergleich jeweils zu Tag 3 nur geringe signifikante Expressionsunterschiede (6, 1, 21, 56, 126 Proteine für Tag 2 und 4-7). Trotz Vorbereitung von nur zwei biologischen Replikaten (und zwei

technischen Replikaten) konnten für die drei biologischen Replikate der *fedbatch*-Daten (siehe 4.3.1) ähnliche Anzahlen an signifikanten Hits ermittelt werden, so dass eine generelle Vergleichbarkeit der Daten gegeben war.

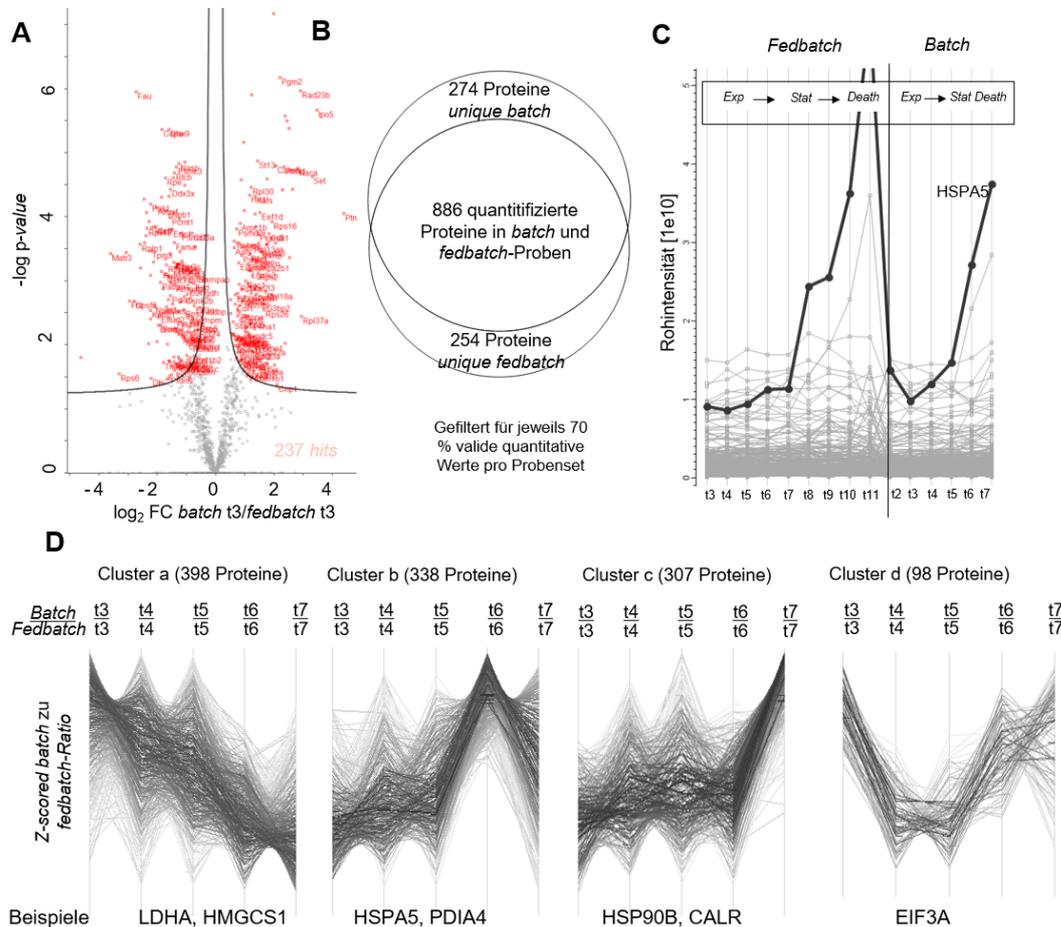


Abbildung 33 Vergleich der *fedbatch*- und *batch*-Bioreaktorkultivierungen von CHO-K1 auf Proteomebene über eine kombinierte Datenbanksuche aller nLC-MS/MS-Proben in MaxQuant. Die Statistik und dazugehörige Abbildungen wurden in Perseus angefertigt. **A**) *Volcano Plot* (FDR > 0,05; S0: 0,1) zur Visualisierung der 129 signifikant differentiell exprimierten Proteine der *batch*-Kultivierung von Tag 3 zu Tag 7 durch Auftragung der $\log_2 FC_{t7/t3}$ gegen den $-\log p\text{-value}$. **B**) Venn-Diagramm zur Extraktion übereinstimmend quantifizierter Proteine für die beiden Probenansätze, wobei beide Listen zuvor für 70 % valide Werte gefiltert wurden, um zuverlässig quantifizierte Proteine miteinander zu vergleichen. **C**) Auftragung der MS-basierten Rohintensität der *fedbatch*- und *batch*-Proben als Median über den Kultivierungsverlauf. Hervorgehoben wurde die LFQ-Quantifizierung des Beispielproteins HSPA5. **D**) Median *z-scored* und geclusterte Ratios der Proteinexpression von *batch*- und *fedbatch*-Proben über den zu vergleichenden Zeitraum von Tag 3 bis Tag 7 (gefiltert für drei valide Werte). Die vier Cluster a-d wurden unter Anwendung eines *distance thresholds* von 2,6 erhalten.

Außerdem wurde ein Vergleich auf Basis der Rohintensitäten visualisiert, um die beiden Kultivierungsformen zu analysieren (Abbildung 33 C). Über das Hervorheben der mittleren HSPA5-Proteinintensität im Verlauf der beiden Kultivierungsformen lässt sich beobachten, dass die Intensitäten im *batch* an Tag 7 vergleichbar mit denen im *fedbatch* an Tag 11 sind. Diese

Verzögerung der Proteinregulation soll über weitere, globale Analysen validiert werden. Hierfür wurde nach Berechnung der Mediane über die biologischen und technischen Replikate jeweils Verhältnisse von *batch* (B) zu *fedbatch* (FB) für Tag 3 bis 7 berechnet (Ratio B/FB). Weiterhin wurden die Daten für valide Werte von mindestens drei der fünf Ratios gefiltert und die erhaltenen Profile geclustert (Abbildung 33 D). Ein überwiegend ansteigendes Profil, wie Cluster b in Abbildung 33 D, bedeutet beispielsweise, dass eine erhöhte Proteinexpression in den *batch*-Kulturen in Relation zur gleichen Kultivierungszeit der *fedbatch*-Kulturen berechnet werden konnte. Diese Beobachtung ist ebenfalls aus der Abbildung 33 C für HSPA5 ersichtlich. Beispielproteine der weiteren Cluster sind LDHA für das Cluster a mit absteigenden Profilen, PDIA4 (neben HSPA5) für Cluster b mit überwiegend ansteigen Profilen, HSP90B und CALR für Cluster c mit großem Unterschied der Tag 7-Proben und EIF3A für Cluster d. Über die Cluster (mit ca. 1.100 Proteinen) können deutliche Unterschiede des *batch*- und *fedbatch*-Proteoms visualisiert werden. Insgesamt konnte für viele Proteine eine zeitliche verzögerte Regulierung beobachtet werden, die vor allem auf die Zugabe des *feed*-Mediums und das weitere Konstanthalten der Nährstoffkonzentrationen zurückgeführt werden kann. Der Vergleich der Proteinprofile der Industrie-relevanten *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung zur *batch*-Kultivierung sollte erstmals für eine Extraktion von Targets für die Prozessoptimierung oder Parentalzelllinien-Optimierung genutzt werden. Die Beeinflussung einiger Proteine der Cluster a bis c (Abbildung 33 D) führte in Zelllinien bzw. Prozessoptimierungen bereits zu positiven Ergebnissen (Hwang *et al.* 2003; Chung *et al.* 2004; Borth *et al.* 2005; Kim and Lee 2007; Zhou *et al.* 2011). Basierend auf den in der Literatur verwendeten Targets und Methoden wird hier die Hypothese aufgestellt, dass Proteine des Clusters a durch *knock-out* oder *knock-down* und Proteine des Clusters b oder c durch Überexpression zur verbesserten Prozessperformance führen könnten. Zunächst sollte ein detaillierter Vergleich der Proteinprofile erfolgen.

Verzögerte Proteinexpressionsregulierung durch feed-Zugabe für hoch-abundante Proteine

Für den Vergleich von *batch*- und *fedbatch*-Proteinexpressionen wurden zunächst die am höchsten exprimierten Proteine analysiert. Dafür wurden die log₂ FC von t3 vs. t5 und t7 im *batch* und t3 vs. t7 und t11 im *fedbatch* berechnet und die Top20-intensivsten Proteine, die in mindestens einem dieser Vergleiche als signifikant reguliert bestimmt wurden, jeweils in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 Proteine mit hoher Intensität und mindestens einem signifikant regulierten Ratio innerhalb der Proteomanalyse (t5/t3 und t7/t3 im *batch* und t7/t3 und t11/t3 im *fedbatch*) von Bioreaktorkultivierungen der CHO-K1-Zelllinie. Signifikante Hits sind in fett dargestellt.

Genname	Proteinname	Log ₂ 5/t3 <i>batch</i>	Log ₂ t7/t3 <i>batch</i>	Log ₂ t7/t3 <i>fedbatch</i>	Log ₂ t11/t3 <i>fedbatch</i>
Hspa5	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	0,60	1,95	0,33	2,72
Hsp90b1	<i>Endoplasmin</i>	-0,22	1,59	0,15	2,31
Hsp90ab1	<i>Heat shock protein 84b</i>	-0,29	-0,76	0,44	-0,53

P4hb	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	-0,21	1,25	-0,22	0,98
Aars	<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	0,68	0,86	1,05	1,12
Tubb5	<i>Tubulin beta chain</i>	-0,30	-0,68	-0,12	-1,29
Rplp2	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	0,67	0,68	-0,31	-0,38
Hnrnpa2b1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	-0,04	-0,91	-0,44	-1,12
Pebp1	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	0,23	0,75	-0,11	0,13
Pdia4	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	0,32	1,24	0,39	3,82
Phgdh	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	0,34	-0,09	0,55	0,54
Hyou1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>	0,10	1,91	0,69	2,14
Rpl7a	<i>60S ribosomal protein L7a</i>	0,36	-0,21	0,29	-0,67
Tmsb10	<i>Thymosin beta</i>	0,41	-0,48	-0,43	-0,91
Tagln2	<i>Transgelin</i>	-0,31	-0,66	-0,33	-1,16
Tpi1	<i>Triosephosphate isomerase</i>	0,34	0,69	0,29	0,47
Hmgcs1	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase</i>	-1,43	-5,00	-0,48	-4,45
Rps3a	<i>40S ribosomal protein S3a</i>	0,21	-0,21	0,03	-0,58
Ptma	<i>Prothymosin alpha</i>	-0,27	-1,57	-0,54	-1,90
Mdh2	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	-0,30	1,57	0,20	2,02

Durch einen Vergleich des \log_2 Ratio von t7/t3 im *batch* zu den \log_2 Ratios im *fedbatch* konnten vor allem hohe Übereinstimmungen zum Ratio t11/t3 für zum Beispiel die Proteine HSPA5, HSP90B1, HSP90AB1, P4HB, HNRNPA2B1, PDIA4, HYOU1, HMGCS1 und MDH2 beobachtet werden (Tabelle 17). Diese Verzögerung der Expressionsregulierung von Proteinen kann größtenteils auf die *feed*-Zugabe und damit verbesserte Nährstoffversorgung zurückgeführt werden. Außerdem konnte eine konstante Hochregulierung der AARS berechnet werden. Wie zuvor für die *fedbatch*-Kulturen beobachtet (siehe 4.3.1), korreliert die Hochregulierung von AARS auch für die *batch*-Kulturen mit einem Überschuss an extrazellulärem Alanin (siehe Anhang Abbildung 43 C und D). Die *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase* (PHGDH) als Teil der Serin-Biosynthese hat Funktionen in der antioxidativen Regulierung, indem die Glutathion-Bildung gefördert wird (Santis *et al.* 2018). Eine Hochregulierung steht in Zusammenhang zur deutlich höheren Zelldichte der *fedbatch*-Kulturen mit ca. $200 \cdot 10^5$ Z/ml im Vergleich zu den *batch*-Kulturen mit ca. $120-140 \cdot 10^5$ Z/ml. Für das *Phosphatidylethanolamine-binding protein 1* (PEBP1, RKIP) konnte nur eine signifikante Hochregulierung im *batch* beobachtet werden. Für die *fedbatch*-Kulturen konnte durch eine höhere Variabilität der Quantifizierung des Proteins zu Beginn der Kultivierung keine signifikante Regulierung berechnet werden. Das 23 kDa kleine Protein hat inhibierende Funktionen auf MAPK-, Wnt/ β -Catenin- und NF- κ B-Signaling (Mendoza-Viveros and Cheng 2018) und stellt auch aufgrund der hohen Expression ein potenzielles Target zur Prozessoptimierung über *knock-down* oder *knock-out* Methoden dar.

Differentielle Regulierung von schwach-abundanten Proteinen in *batch*- vs. *fedbatch*-Kulturen

Neben den größtenteils bekannten stark-exprimierten Proteinen sollte über den hier vorgestellten sensitiven *Proteomics*-Ansatz außerdem weniger in der (CHO-)Literatur beschriebene Proteine analysiert werden. Dazu wurden die Daten nach aufsteigender Intensität sortiert, für mindestens zwei signifikante regulierte Ratios ($t3$ vs. $t5$ und $t7$ *batch*, $t3$ vs. $t7$ und $t11$ *fedbatch*) gefiltert und die Daten für 20 schwach-abundante Proteine in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18 Proteine mit niedriger Intensität und mindestens zwei signifikant regulierten Ratios innerhalb der Proteomanalyse ($t5/t3$ und $t7/t3$ im *batch* und $t7/t3$ und $t11/t3$ im *fedbatch*) von Bioreaktorkultivierungen der CHO-K1-Zelllinie. Signifikante Hits sind in fett dargestellt. Die Auflistung erfolgte nach ansteigender berechneter Gesamtintensität der Proteine.

Genname	Proteinname	Log ₂ t5/t3 <i>batch</i>	Log ₂ t7/t3 <i>batch</i>	Log ₂ t7/t3 <i>fedbatch</i>	Log ₂ t11/t3 <i>fedbatch</i>
Srsf5	Serine/arginine-rich splicing factor 5	NaN	NaN	-0,79	-1,71
Dkc1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1	0,29	0,45	-1,55	-0,55
Tpr	Nucleoprotein TPR	-0,16	-0,43	-1,06	-0,68
Acss2	Acetyl-coenzyme A synthetase	-0,05	-0,23	0,74	0,50
Ncapd2	Condensin complex subunit 1	-0,49	-1,12	-1,04	-2,06
Atp6v1e1	V-type proton ATPase subunit E 1	0,40	0,70	0,82	1,39
Eif4a2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	0,52	0,45	0,97	0,84
Kpna2	Importin subunit alpha	-2,32	-1,30	-1,70	NaN
Zyx	Zyxin	-0,40	0,19	-0,97	-0,82
P4ha1	Procollagen-proline 4-dioxygenase	-0,34	1,27	1,59	3,05
Plin3	Perilipin	0,23	0,84	1,21	0,69
Fau	40S ribosomal protein S30	0,18	-0,39	-0,83	-1,71
Akr7a2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	0,99	0,49	1,51	1,71
Ube2c	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	-2,87	NaN	-1,58	NaN
I79_003354	DNA helicase	-0,42	-1,99	-1,48	NaN
Cbx3	Cbx3 protein	-0,72	-1,59	-1,18	-1,72
Cs	Citrate synthase	0,73	0,07	1,44	2,77
I79_015744	Annexin	1,42	1,63	0,95	1,13
I79_003606	Alpha-mannosidase	0,01	0,59	0,87	1,35
Pck2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	0,90	1,34	1,30	2,19

Durch die Analyse von weniger abundanten Proteinen konnte eine geringere Übereinstimmung von zum Beispiel $t7/t3$ *batch*- und $t11/t3$ *fedbatch*-Ratios beobachtet werden. Allgemein konnte eine Herunterregulierung der Proteine TPR, NCAPD2 und CBX3 für beide Prozessstrategien berechnet werden. Für das *Nucleoprotein* TPR sind Funktionen in der Translokation von aktiviertem ERK2 beschrieben (Vomastek *et al.* 2008). Es konnte eine deutlich stärkere Herunterregulierung im *fedbatch*-Kultivierungsverlauf beobachtet werden. Über eine Überexpression oder Aktivierung von TPR könnte vermutlich ein erhöhtes MAPK-Signaling und darüber eine erhöhte Proliferation der Zellen bewirkt werden.

Eine Hochregulierung konnte hingegen für Annexin, PCK2, EIFA2, AKR7A2 und ATP6V1E1 bestimmt werden. Die *Phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PCK2) katalysiert den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Laktatverstoffwechslung in der Glukoneogenese. Durch die deutlich längere und höhere Laktatakkumulierung in den *fedbatch*-Kulturen konnte über eine stärkere Hochregulierung der PCK2 in den *fedbatch*-Kulturen mehr Laktat verstoffwechselt. Eine signifikante und andauernde Hochregulierung der *Citrate Synthase* (CS) konnte nur für die *fedbatch*-Kultivierung beobachtet werden. Aus Acetyl-CoA synthetisiertes Citrat kann entweder im TCA weiter oxidiert werden oder für die Fettsäuresynthese verwendet werden. Da die Expression von CS über STAT3 reguliert wird (MacPherson *et al.* 2017), wurde ein differentielles (STAT-) Signaling und Unterschiede im Acetyl-CoA-Metabolismus in Zellen aus höherer Zelldichte vermutet. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Prozessführungen konnte interessanterweise für die *Acetyl-coenzyme A synthetase* (ACSS2) berechnet werden. Über eine Visualisierung der beschriebenen Proteine (Abbildung 34) wurden Unterschiede im Bereich der Protein-Acetylierung sowie der Signaltransduktion hervorgehoben.

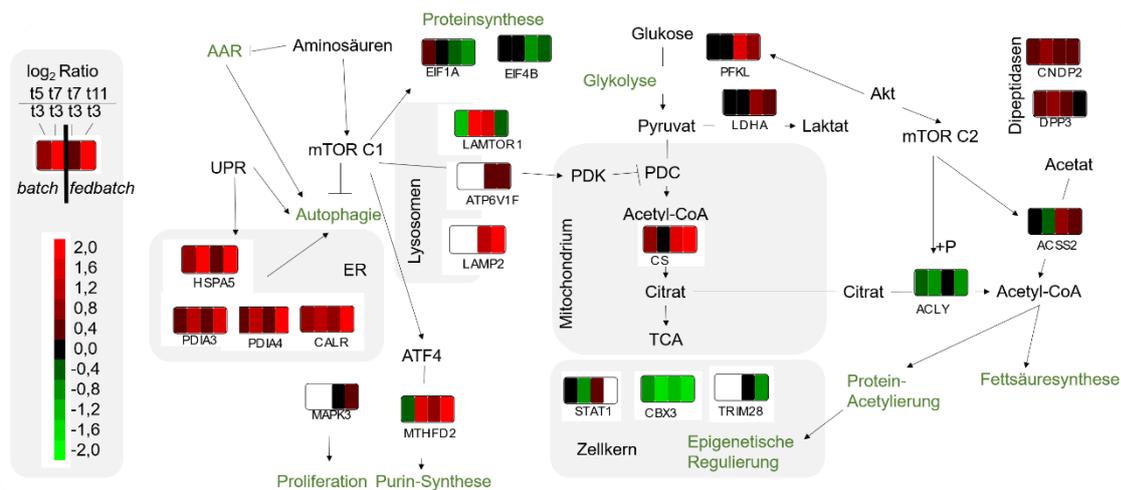


Abbildung 34 Visualisierung von ausgewählten Proteinen und schematischen Zusammenhängen mit entsprechenden LFQ-basierten \log_2 -Ratios für *batch*- (t5/t3 und t7/t3) und *fedbatch* (t7/t3 und t11/t3)-Bioreaktorkultivierungen der parentalen CHO-K1-Zelllinie.

Neben der ACLY, die über Glukose im TCA Acetyl-CoA aus Citrat synthetisiert (siehe auch 4.2.2.1), katalysiert ACSS2 Acetyl-CoA aus zum Beispiel Acetat. Für *batch*-Kulturen wurde eine tendenzielle Herunterregulierung der ACSS2 bestimmt. Im *fedbatch*-Verlauf konnte hingegen eine signifikante Hochregulierung von ACSS2 im Kultivierungsverlauf berechnet werden. Obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, wurden neben der Phosphorylierung von ACLY durch Akt/mTOR-C2 auch eine Aktivierung der ACSS2 über mTOR-C2 in der Literatur beschrieben (Martinez Calejman *et al.* 2020). ACLY und ACSS2 sind zwei Targets, die nach Produktivitätssteigernder Butyrat-Behandlung in CHO-Zellen als hochreguliert identifiziert wurden (Anna

Wippermann 2016) und vermutlich dazu dienen, Acetyl-CoA als Substrat für die epigenetische Regulierung der Histon-Acetylierung bereitzustellen. Die ACSS2-Aktivität wird neben Phosphorylierungen über Sirtuine reguliert, wobei eine Deacetylierung durch SIRT3 zur Aktivierung von ACSS2 führt (Hallows *et al.* 2006). Sowohl eine Aktivierung bzw. Überexpression der hier berechnete Herunterregulierung von ACLY und der Hochregulierung von ACSS2 (nur in *fedbatch*) wird, neben der CHO-XL99-G4, auch für die Zelllinie CHO-K1 als sinnvoll erachtet. Eine Aktivierung der Proteinaktivität könnte durch Aktivierung von SIRT3 zu einer positiven Prozessperformance führen (siehe Abbildung 38 B und 4.3.4). Für viele hoch-abundante Proteine konnten insbesondere verzögerte Proteinprofile über die *feed*-Zugabe evaluiert werden. Über die gezielte Analyse von geringer exprimierten Proteinen konnten neue Targets zur Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung ermittelt werden, darunter das Protein TPR. Neben der Detektion von *feed*-abhängigen Unterschieden über die *batch* zu *fedbatch*-Ratio-Cluster, wie von zum Beispiel TPR, konnten *feed*-unabhängige Proteinregulierungen insbesondere von schwächer abundanten Proteinen identifiziert werden, darunter ACSS2, welche vielversprechende Targets zur Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung darstellen. Im Weiteren sollten die Industrie-relevanten *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen der häufig eingesetzten CHO-K1-Parentalzelllinie für eine detailliertere Auswertung ausgewählter Proteine verwendet werden.

4.3.3. Spezifische Auswertung von Proteinprofilen im Kultivierungsverlauf

Neben der zuvor diskutierten globalen Herangehensweise wurden auch spezifische Targets detailliert analysiert. In einer älteren Transkriptanalyse von Wong *et al.* über eine *fedbatch*-Kultivierung einer *human interferon gamma*-produzierende CHO-Zelllinie konnte eine Hochregulierung von Caspasen in der Absterbephase identifiziert werden. Außerdem fanden die Autoren heraus, dass Apoptose-spezifische Gene in der exponentiellen Phase unverändert oder herunterreguliert vorlagen. In der stationären Phase hingegen konnte eine Hochregulierung von Initiator-Apoptose-Genen beobachtet werden (Wong *et al.* 2006a). Basierend auf diesen Daten wurden Zelllinien mit erhöhter Apoptose-Resistenz durch Überexpression der anti-apoptotischen Gene Faim und Fadd bzw. durch *knock-down* der pro-apoptotischen Gene Alg-2 und Requiem erreicht (Wong *et al.* 2006b). Vermutlich konnte aufgrund einer zu geringen Intensität für die hier quantifizierten Caspasen 3, 7 und 8, sowie DNase1 keine signifikante Expressionsänderung ermittelt werden. Anstelle von Caspasen und DNAsen konnte jedoch eine Hochregulierung von Proteinasen (wie Cathepsin B und D, CTSB und CTSD) und eine Herunterregulierung von MAPK1/ERK2 und des Transkriptionsfaktors und Chaperons BTF3 beobachtet werden. Obwohl eine gleichzeitige Aktivierung von MAPK- und mTOR-Signaling über IGF in mAb-XL99-CHO über vermutete *feedback loops* zur Reduktion der finalen Prozessausbeute führte (siehe 4.2.2.1), wird vermutet, dass eine spezifische Aktivierung von MAPK1 im Kultivierungsverlauf der CHO-K1 zu einer Erhöhung der Proliferation führen könnte. Für das Protein mTOR konnte in dieser

LFQ-Proteomanalyse der *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung nur zwei Peptiden für eine Probe von Tag 9 quantifiziert werden, so dass keine Berechnung einer Regulierung möglich war. Für unregelmäßige *batch*-Kultivierungen einer CHO-DP12-Zelllinie wurde eine Hochregulierung von mTOR im Kultivierungsverlauf beschrieben, aber die höchste Aktivität des Proteins an Tag 3 (basierend auf Phosphoproteom-Analysen) vermutet (Kaushik *et al.* 2018). Um Aussagen über die mTOR-Aktivität in der hier analysierten *fedbatch*-Kultivierung zu treffen, sollte eine Analyse von mTOR-C1 *downstream* Targets erfolgen. Ein aktives mTOR-C1-Signaling, ausgelöst durch ausreichend Nährstoffe, führt zur Inhibierung von Autophagie-Prozessen (Laplante and Sabatini 2012) und konnte in dieser Arbeit bereits über eine Proteomanalyse der stationären Phase nach Carnosin-Induktion ermittelt werden (siehe 4.2.3.2). Im Vergleich zu den *batch*-Kultivierungen hier konnte zum Beispiel eine differentielle Regulierung von mTOR-Targets, wie der Purin-Synthese (MTHFD2), der Proteintranslation (eIF1A, eIF4B), sowie mTOR- bzw. Lysosomen-assoziierte Proteine, wie LAMTOR1, berechnet werden, wobei für V-ATPase und LAMP2 nur quantitative Daten für *fedbatch*-Proben ermittelt werden konnten (siehe Abbildung 34). Die beobachtete teils differentielle mTOR-Regulierung über die zugeführten Nährstoffe im *fedbatch*-Kultivierungsverlauf der parentalen CHO-K1-Zelllinie lassen generell deutliche Abhängigkeiten der zellspezifischen Produktivität von der Prozessführung vermuten. In weiteren *fedbatch*-Kultivierungen von rekombinant-produzierenden CHO-Zellen könnte in der frühen stationären Phase eine Induktion mit L-Carnosin durchgeführt werden und darüber die Interaktion von *feed*-Medium und mTOR-Regulierung zur Prozessoptimierung weiter analysiert werden.

Für das *Lysosome-Associated Membrane glycoprotein 2* (LAMP2) konnte eine deutliche signifikante Hochregulierung über den *fedbatch*-Kultivierungsverlauf berechnet werden. LAMP2 hat Funktionen in der Chaperon-vermittelten Autophagie über den Abbau von cytosolischem Material. Bei Verfügbarkeit von Aminosäuren, also inaktivem AAR-Signaling, ist eine Lokalisierung von mTOR-C1 an LAMP2-positive Vesikel für ein aktiviertes mTOR-C1-Signaling erforderlich (Sancak *et al.* 2010). Eine Lamp2 mRNA-Hochregulierung wurde zuvor für *fedbatch*-Kultivierungen von CHO-Zellen gezeigt (Jardon *et al.* 2012). In anderen Studien zur *batch*- und *fedbatch*-Kultivierung von CHO-Zellen führte eine Autophagie-Induktion in der frühen Kultivierung über ein spezifisches Beclin-Peptid zu erhöhten zellspezifischen Produktivitäten und Produkttitern (Braasch *et al.* 2021). Die hier detektierte signifikante Hochregulierung des *late-stage* Autophagie-Markers LAMP2 ab Tag 8 bei einer bereits sinkenden Viabilität lässt vermuten, dass über eine frühere Autophagie-Aktivierung die Viabilität der CHO-K1-Zellen (als Parentalzelllinie) länger stabil gehalten werden könnte. Eine generelle Validierung der LFQ-Proteomdaten sollte über Westernblot erfolgen. Der verfügbare LAMP2-Antikörper (CST, #49067) ist gegen den N-Terminus des humanen Proteins gerichtet. Aufgrund hoher Sequenzunterschiede dieses Bereichs

zu dem Protein in *C. griseus* sollten daher weitere Targets für eine Westernblot-basierte Validierung der Daten gefunden werden.

4.3.3.1. Westernblot-Analyse als orthogonale Methode

Für die Validierung der erhobenen LFQ-Proteom-Daten wurden parallel Proteinproben über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf die Expression von zwei ausgewählten Proteinen untersucht. Für die Auswahl der beiden Zielproteine zur Validierung wurden folgende Kriterien aufgestellt: Neben einer signifikanten Regulierung (i) sollte ein Zielprotein eine deutlich hohe Expression und eines eine deutlich niedrigere Expression (ii) aufweisen, um die Sensitivität der Methodik prüfen zu können. Zusätzlich zu den vorgestellten biologischen Voraussetzungen der Zielproteine musste außerdem eine hohe Sequenzidentität der CHO-Proteine zu den Proteinen in Maus oder Human vorhanden sein (iii), da die kommerziell erhältlichen Antikörper für diese Spezies entwickelt und validiert wurden. Für diese Westernblot-basierte Validierung der LFQ-Proteom-Daten wurden HSPA5 und CBX3 ausgewählt.

Für das Protein HSPA5 (BIP, GRP78) wurde mittels MaxQuant mit $1,14 \cdot 10^{11}$ die höchste Proteinintensität im *shotgun* Proteom-Experiment berechnet. Die statistische Analyse ergab, dass HSPA5 im Vergleich vor Beginn der Zufütterungsstrategie (Tag 3) ab Tag 8 bis einschließlich Tag 11 signifikant hochreguliert war. Aufgrund der hohen Expression des Proteins und der eindeutigen Veränderung über den Kultivierungsverlauf wurde dieses Protein zur Validierung der LFQ-Proteomanalyse mittels Westernblot ausgewählt. Außerdem wurde dieses Protein in vorherigen Arbeiten bereits im Zusammenhang mit einer Glukoselimitierung von CHO-Zellen als hochreguliert identifiziert und im Bereich der epigenetischen Regulierung als eine Ursache einer erhöhten Proteinproduktion diskutiert (Wingens *et al.* 2015). HSPA5 ist als Chaperon für die korrekte Faltung von Proteinen verantwortlich und eine Induktion im Kultivierungsverlauf oder durch ER-Stress konnte in mehreren Arbeiten festgestellt werden (Ha *et al.* 2018; Ha *et al.* 2019). Im Zuge einer Glukose-Limitierung soll es zu erhöhter Anzahl falsch-gefalteter Proteinen kommen, so dass die Zellen mit einer erhöhten Expression von HSPA5 die Rückfaltung der Proteine unterstützt und eine Aggregatbildung verhindert (siehe 1.1.2).

Die aufgestellten Kriterien für ein weiteres Zielprotein wurden unter anderem von dem Protein CBX3 (auch HPI γ), einem epigenetischen Repressor, mit einer berechneten Proteinintensität von $4,7 \cdot 10^8$ erfüllt. Die mittlere Intensität aller quantifizierten Proteine (Filter mind. drei valide Werte) liegt mit $1,38 \cdot 10^9$ drei Mal so hoch wie die Intensität von CBX3, wobei der Median mit $3,1 \cdot 10^8$ leicht unter der Intensität von CBX3 liegt. Für CBX3 ergab die statistische Analyse eine Herunterregulierung ausgehend von Tag 3 ab Tag 7 bis einschließlich Tag 11. In *Drosophila* konnte für CBX3 eine Bindung von H3K9me identifiziert werden (Kaustov *et al.* 2011). Strukturell enthält CBX3 eine N-terminale Chromodomäne, welche die Bindung an methylierten Histonen vermittelt

(Ruan *et al.* 2012), variable Gelenkbereiche, eine C-terminale Chromoschattendomäne und ein heterochromatisches Adaptermolekül zur Beeinflussung der Chromatinstruktur. Histon H3.3 und CBX3 tragen zusammen, als zwei funktionale Komponenten des Chromatins zur Regulierung der Gentranskription bei, wobei zum Beispiel eine Hitzeschock-vermittelte Transkription von humanen HSP70-Genen (HSPA1 und HSPA6) durch diese beiden Proteine reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Histon H3 und CBX3 innerhalb kurzer Zeit nach Hitzeschock am HSP70-Promotor angereichert vorliegen. Außerdem konnte eine Überexpression von CBX3 in Krebszelllinien ermittelt werden, wobei ein *knock-down* zu einer verminderten Proliferation der Zellen führte (Kim *et al.* 2011).

Die Ergebnisse, die über die beiden Methodiken der MS-basierten Proteomanalyse und der Westernblot-basierten Detektion ermittelt wurden, werden im Folgenden verglichen (Abbildung 35). Die Auftragung der Rohdaten der LFQ-basierten Quantifizierung von HSPA5 und CBX3 zeigen, dass HSPA5 bereits zu Beginn ein Protein mit hohem Expressionsniveau darstellt, welches im Laufe der Kultivierung zu dem am höchsten exprimierten Protein der Kultivierung wurde, und CBX3 ein Protein mit einem geringen Expressionsniveau ist (Abbildung 35 A). Die Expression von HSPA5 betrug am Tag 11 das > 7-fache der Expression an Tag 3 (\log_2 FC t11/t3 von 2,8). Nach \log_2 -Transformation und *z-scoring* ist neben der Hochregulierung von HSPA5 eine Herunterregulierung von CBX3 aus der Abbildung 35 A ersichtlich, wobei es hier ca. zu einer 2.5-fachen Reduktion in der Expression kam (\log_2 FC t11/t3 von -1,36).

Die Westernblot-basierten Ergebnisse für HSPA5 korrelieren nicht mit den LFQ-Proteomdaten. Eine deutliche, klare Bande für HSPA5 mit hoher Intensität ab Tag 3 verändert sich bis Tag 7 kaum, wobei eine leicht-reduzierte Intensität festzustellen ist. Ab Tag 8 erscheint die Bande weniger intensiv, jedoch über einen größeren Molekulargewichtsbereich verteilt. Für die Proben der folgenden Tage (Tag 8 bis 11/12) steigt die Intensität der Bande über den verbreiterten Molekulargewichtsbereich stark an. Es ist zu vermuten, dass eine Proteinmodifikation Ursache für die Ausweitung im Molekulargewicht der Detektion von HSPA5 war. In der UniProt-Datenbank sind eine Vielzahl an möglichen Modifikationen von HSPA5 aufgelistet, darunter Phosphorylierung (0,08 kDa), Acetylierung (0,04 kDa), Methylierung (0,014 kDa), Nitrosylierung (0,03 kDa), Succinyllysine (ca. 0,2 kDa), AMP Threonin (0,33 kDa) und Sumoylierung (ca. 10 kDa). Weitere Literaturrecherchen ergaben eine mögliche O-Glykosylierung (GalNac, Thr) und Ubiquitinylierung (Lys), welche über *High-Throughput-Paper* (HTP) in der Datenbank PhosphoSitePlus zitiert werden, sowie Arginylierung (0,15 kDa) (Jiang *et al.* 2016) und ADP-Ribosylierungen (ca. 0,55 kDa) (Nitika *et al.* 2020). Ein Teil dieser Modifikationen ist in Abbildung 35 D schematisch dargestellt. Aufgrund der komplexen post-translationalen Modifikation von HSPA5 und anderen Chaperonen wurde in der Literatur der Begriff *chaperone code* etabliert

(Nitika *et al.* 2020). Vor allem die Bindung des anti-HSPA5-Antikörpers im Bereich von Gly584 und einer möglichen Methylierung, Dimethylierung oder Trimethylierung von Lys585 führt zu der Hypothese, dass eine solche Modifizierung zu einer verminderten Bindungsaffinität vom Antikörper zum Protein im Westernblot führen könnte, wodurch die fehlende Korrelation von relativer Proteinquantifizierung über LFQ-MS und Westernblot begründet werden könnte. Im Folgenden wurde dies durch Messwiederholungen und entsprechende DB-Auswertungen mit variablen Modifikationen weiter analysiert (siehe 4.3.3.2).

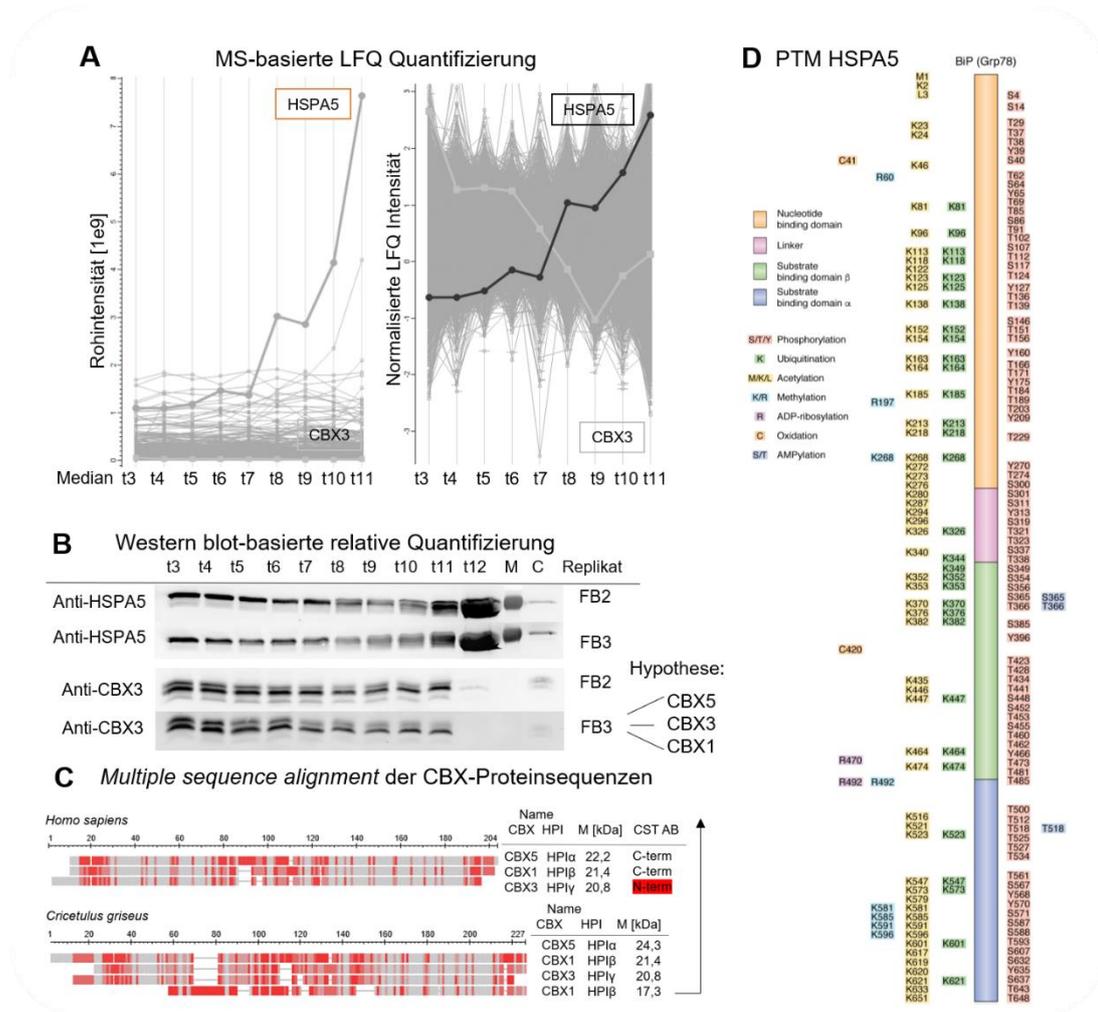


Abbildung 35 Vergleich der Methodiken der MS-basierten Proteomanalyse und Westernblot für die zwei ausgewählte Proteine HSPA5/BIP (hohe Expression und Hochregulierung) und CBX3/HP1 γ (mittlere Expression und Herunterregulierung). **A)** Darstellung der mittels MaxQuant-errechneten Rohintensitäten und normalisierten \log_2 -transformierten Daten über die Zeit, jeweils dargestellt als Mittelwert von drei biologischen Replikaten. **B)** Westernblot-basierte anti-HSPA5- und anti-CBX3-Detektionen von jeweils zwei biologischen Replikaten der *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen von CHO-K1. Die intensivere Bandenintensität der oberen CBX3-Bande führt zu der Hypothese, dass CHO-Zellen eine verkürzte CBX1-Isoform exprimieren und sich somit, entgegen anderer Spezies, die folgende Annotation der Banden mit absteigendem Molekulargewicht ergibt: CBX5, CBX3, CBX1. **C)** *Multiple sequence alignment* der CBX-Proteinsequenzen für *Homo sapiens* und *Cricetulus griseus*. Der von CellSignalingTechnology erworbene anti-CBX3-Antikörper ist gegen den N-terminus gerichtet und rot markiert. **D)** Schematische Übersicht der post-translationalen Modifikationen des Proteins HSPA5 (Nitika *et al.* 2020).

Die Farbintensitäten der mittels anti-CBX3 detektierten Banden nehmen kontinuierlich mit der Kultivierungszeit ab (Abbildung 35 B). Dies ist besonders für die beiden oberen, der drei detektierten Banden deutlich ausgeprägt. Das Protein CBX3 gehört zur Familie der Heterochromatin Proteine 1 (HP1), einer Gruppe an hochkonservierten Heterochromatin-assoziierten *non-histone* chromosomalen Proteinen mit Funktionen in Gen-Aktivierung oder -Reprimierung im Zellkern (Nielsen *et al.* 2001). Es gibt insgesamt drei paraloge Proteine: CBX5, CBX1 und CBX3 (auch HPI α , β , γ) (Eissenberg and Elgin 2000), wobei das entsprechende Molekulargewicht für die humanen Proteine absteigend für HPI α > β > γ dokumentiert ist (22.2 – 20.8 kDa). Die Sequenzidentität zwischen den *Cricetulus griseus*-Sequenzen im Vergleich zu humanen Sequenzen liegt bei 97 % für HPI α , 99 % für β und 100 % für γ , wobei es für CBX3/HPI β einen weiteren Datenbank-Eintrag mit einer deutlich verkürzten Sequenz gibt (Abbildung 35 C). Die über CellSignalingTechnology kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die paraloge Proteine sind jeweils polyklonal und binden Amino-terminal für γ , mittig der Proteinsequenz für β und Carboxy-terminal für α , wobei jeweils eine Kreuzreaktivität untereinander vom Hersteller ausgeschlossen wird. Insgesamt liegt eine Sequenzidentität von γ zu β und α von 75-78 % vor.

Obwohl der anti-CBX3/HPI β -Antikörper (entwickelt für humane Proteine) keine paraloge Kreuzreaktivität aufweisen soll, kann für die analysierten CHO-Proben nur vermutet werden, dass es sich bei den drei Banden um die paraloge Proteine handelt. Aufgrund der deutlich höheren Bandenintensität der oberen beiden Banden wird vermutet, dass in CHO nicht die Molekulargewichts-Reihenfolge wie in *H. sapiens* vorliegt, sondern die Expression der verkürzten CBX1-Sequenz erfolgt. Demnach wäre die Zuordnung der mittels anti-CBX3-detektierten Banden von unten nach oben: CBX5, CBX3 und CBX1 (Abbildung 35 B). Die beiden Proteine CBX1 und CBX5 konnten im Proteom-Ansatz weder quantifiziert noch identifiziert werden. Dies kann zum Beispiel entweder durch die stochastische Natur der DDA-Proteommessung, durch eine Peptidquantität unterhalb der Detektionsgrenze oder eine Abreicherung der Proteine/Peptide im Probenvorbereitungs-Workflow begründet werden. Die ähnlich-hohe Bandenintensität von CBX3 und CBX5 müssen nicht auf Expressionsunterschiede zurückgeführt werden, sondern können auch durch unterschiedliche Antikörper-Bindungsaffinitäten verursacht worden sein. Zusammenfassend spricht die Abnahme der oberen beiden, intensiv-detektierten Banden für eine Herunterregulierung dieser Proteine und somit für eine zuverlässige Quantifizierung mittels MS-basierter Proteomanalyse. Die Sensitivität der nLC-MS/MS-Strecke konnte somit über dieses mittel-stark exprimierte Protein unter Beweis gestellt werden. In der CHO-Zellforschung ist das CBX3 bekannt, da das Einfügen eines *Ubiquitous Chromatin Opening Elements* (UCOE) des CBX3 und HNRPA2B1-Lokus zum reduzierten Transgen-Silencing in CHO-K1-Zellen führte (Skipper *et al.* 2019). In humanen Stammzellen konnte eine Hypomethylierung und eine Anreicherung von H3K4me3 in diesem Bereich bestimmt werden (Müller-Kuller *et al.* 2015). In Verbindung zu dem

in CHO-Zellen vorliegendem veränderten Epigenom (Wippermann and Noll 2017) könnte eine Überexpression dieses im Kultivierungsverlauf herunterregulierten Proteins möglicherweise zu einem verminderten Gensilencing führen.

4.3.3.2. Identifizierung von HSPA5-Methylierungen

Die mittels MS-Proteomanalytik quantifizierte Hochregulierung von HSPA5 von Tag 3 auf Tag 8-11 konnte über Westernblot nicht eindeutig belegt werden, jedoch wird vermutet, dass reduzierte Bindungsaffinitäten des gegen die Gly584-Sequenz gerichteten anti-HSPA5-Antikörpers durch Protein-Modifikationen, vor allem in der Binderegion, Grund für die fehlende Korrelation der Daten ist.

Eine PD-basierte Evaluierung der LFQ-MS-Daten unter Einbeziehung von variablen Modifikationen führte zur Identifizierung von nur einer Methylierungsstelle (Daten nicht gezeigt), weshalb weitere nLC-MS/MS-Messungen mit längeren Gradienten (180 anstatt 60 min) für die biologischen Replikate 1 und 2 durchgeführt wurden. Aufgrund der Vielzahl in der Literatur beschriebenen Modifizierungen für HSPA5 (Abbildung 35 D) mit Methylierung, Dimethylierung, Trimethylierung, Ubiquitinylierung, AMPylierung, ADP-Ribosylierung, Phosphorylierung, Thiol Oxidierung, Acetylierung und Arginylierung wurden die DB-Suchen zur Reduktion der Rechenleistung und -dauer ohne Quantifizierung in PD durchgeführt. Über das Aufsummieren von MS/MS-Spektren pro Peptid, einer veralteten Quantifizierungsmethode (*spectral counting*), konnte jedoch eine Tendenz der Peptidintensitäten ermittelt werden.

Die Auswertung der Nachmessung (mit Originalmessungen kombiniert) unter Einbeziehung der PTMs (m1/m2/m3 (K, R), GG (K), Phosphoadenosine (S, T), Phospho (S, T, Y), ADP-Ribosyl (R), Acetyl (K), Arg (Peptid N-Terminus)) als variable Modifikationen ergab eine Identifizierung von 3.350 Proteinen, darunter HSPA5 als Top1-Treffer (sortiert nach MS Amanda 2.0 *score*) mit 193 Peptiden. Ein Filtern für modifizierte Peptide mit insgesamt mindestens zwei PSM ergab 30 verschiedene Peptidsequenzen mit ein oder mehreren PTMs, wobei durch Vorkommen von *missed cleavages* einige PTMs über mehrere Peptidsequenzen identifiziert wurden. Insgesamt konnten über 30 Methylierungsstellen sicher identifiziert und lokalisiert werden. Außerdem konnte über zwei weitere modifizierte Peptide eine AMPylierung von vermutlich T124 und T166 und eine Phosphorylierung von Y127 und T171 identifiziert werden (mindestens 3 PSM). In Abbildung 36 A wurden identifizierte Peptide und die ermittelten Modifizierungsstellen über die Software Protter (Omasits *et al.* 2014) in der humanen HSPA5-Proteinsequenz visualisiert. Im Vergleich zur SwissProt-basierten *C. griseus* HSPA5-Proteinsequenz (eines von 239 *reviewed* Proteinen des Hamsters), ergeben sich lediglich Sequenzunterschiede in der Signalpeptidsequenz mit insgesamt 99 % Sequenzübereinstimmung.

Viele der in Abbildung 36 A markierten Methylierungen von HSPA5 (identifiziert über die *in-solution*-basierte Proteomanalyse) wurden jeweils am Peptid-C-terminus lokalisiert, darunter Mono-, Di- und auch Trimethylierungen an beispielsweise K96 und K163. Entgegen der Annahme einer sterischen Behinderung der Trypsin-Schnittstelle durch Methylgruppen kann über diesen Datensatz eine Aktivität von Trypsin C-terminal von mono, di- und auch trimethylierten Lysinen gezeigt werden.

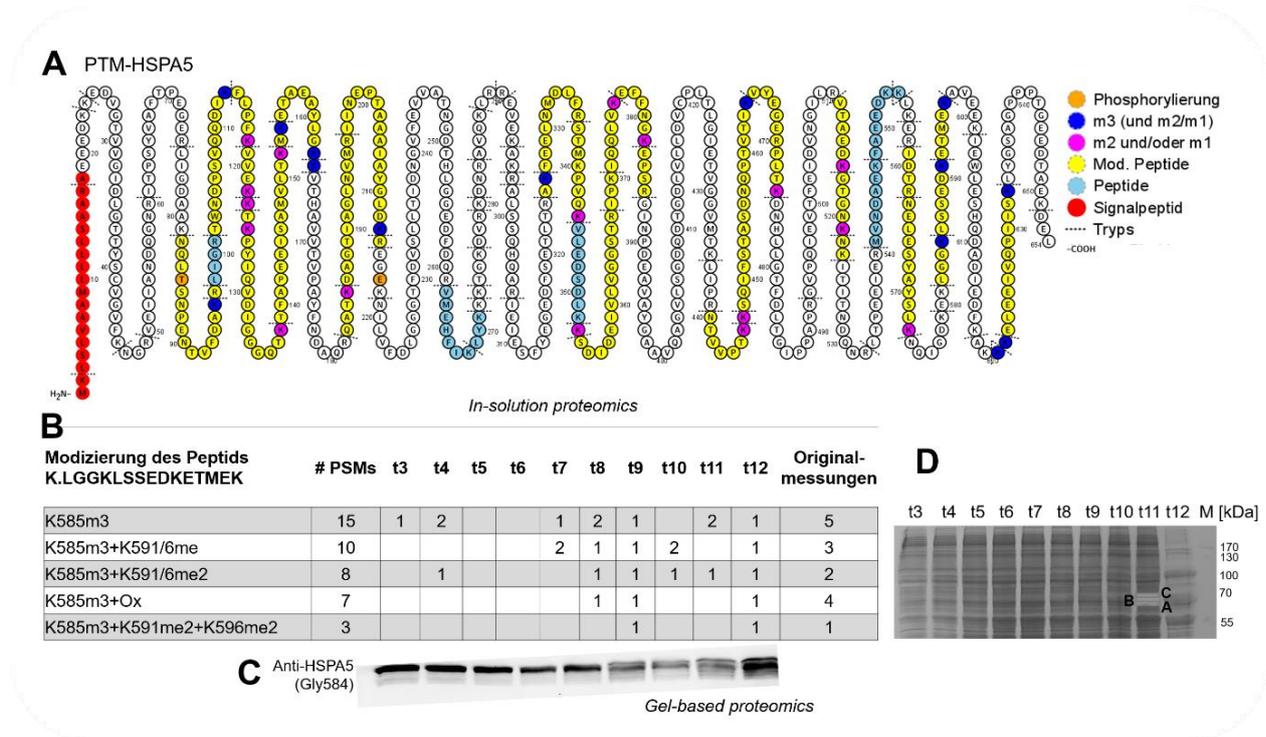


Abbildung 36 Weitere Proteomanalyse der CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen der biologischen Replikate 1 und 2. **A)** Markierung der über nLC-MS/MS Nachmessungen identifizierten Peptide inklusive PTMs und potentiellen tryptischen Schnittstellen in der humanen HSPA5-Proteinsequenz. Im Vergleich zum Hamster liegen Sequenzunterschiede ausschließlich in der Signalpeptid-Sequenz vor. **B)** Modifizierungs-Varianten des Peptids K.LGGKLSSEDKETMEK inklusive Angabe, ob es in Messungen von einem (1) oder in beiden (2) biologischen Replikaten identifiziert wurde. **C)** Wiederholte Abbildung des anti-HSPA5-Westernblots aus Abbildung 35 für den Vergleich zu den Methylierungs-Profilen in B). **D)** 1D-SDS-PAGE der Kultivierungsproben (biologisches Replikate 2) für den in-Gel-Verdau auf Höhe der im Westernblot detektierten Banden für HSPA5, wobei der Bereich in je drei Banden aufgeteilt wurde. Entsprechend der Proteinregulierung wurde für HSPA5 eine späte Kultivierungsprobe (Tag 11) ausgewählt.

Um die beobachtete steigende Molekulargewichtsverteilung der anti-HSPA5-Westernblot-Detektion mit zunehmender Kultivierungsdauer zu begründen (siehe auch Abbildung 35), sollten Hinweise gefunden werden, welche für Modifikationsänderungen von HSPA5 im Kultivierungsverlauf sprechen. Für die aufgestellte Hypothese der Modifikations-abhängigen Reduktion der Bindungsaffinität des anti-HSPA5-Antikörpers sollten außerdem vor allem Modifikationen in der Nähe der Binderegion des Antikörpers (Gly584) analysiert werden. Allein für die Trimethylierung an K585 sind auf der PhosphoSitePlus (PSP)-Datenbank zwei *Low-Throughput Paper* (LTP) und 10 HTP zitiert. Eine Auswertung von *Ion Trap*-Messungen führte

zunächst zu der Annahme, dass eine Acetylierung an K585 vorliegt (Kahali *et al.* 2010). Die jedoch sehr ähnlichen Massen von Trimethylierung (42.0106 Da) und Acetylierung (42.0470 Da) können über Orbitrap-Messungen genauer unterschieden werden, wobei eine LTP-Studie zum Einfluss von Methyltransferasen auf konservierte HSP70-Proteine (darunter HSPA5) herausfand, dass eine K585-Trimethylierung durch die Protein N-Lysin Methyltransferase METTL21A katalysiert wird (Jakobsson *et al.* 2013). Die Analyse der Nachmessungen führt zu einer sicheren Identifikation der K585-Trimethylierung, unter anderem in Kombination mit weiteren Modifikationen Sequenz-naher Aminosäuren. So konnten für das Peptid K.LGGKLSSEDKETMEK (K581-K596, HSPA5, human) mit absteigender Anzahl an *Peptide-Spectrum Matches* (PSMs) folgende Modifikationen identifiziert werden: K585m3, K585m3 und K591m1 oder K596m1, K585m3 und K591m2 oder K596m2, K585m3 mit einer Methionin-Oxidierung und K585m3 mit K591m2 und K596m2 (Abbildung 36 B). Die in Abbildung 36 B gelisteten mehrfachen Methylierungen im Bereich 585-596 wurden tendenziell eher in Proben der späten Kultivierung identifiziert, darunter vier verschiedenen Varianten für Tag 9. Ein Vergleich zur anti-HSPA5-Detektion, wiederholt dargestellt in Abbildung 36 C (siehe auch Abbildung 35), zeigt eine verminderte Bandenintensität für die Tag 8- und 9-Proben, zeitgleich zur Identifizierung der verschiedenen K585 und K591- oder K596-Di- bzw. Methylierungen. Ein Einfluss dieser Methylierungen auf die Bindung des gegen die Gly584-gerichteten anti-HSPA5-Antikörpers wird für sehr wahrscheinlich gehalten. Das vermehrte Identifizieren von verschiedenen PTMs korreliert zwar mit der steigenden HSPA5-Proteinexpression im Kultivierungsverlauf, eine konstante Stöchiometrie der HSPA5-PTMs würde jedoch nicht zur Abnahme der Bindungsaffinität des anti-HSPA5-Antikörpers führen. Für korrekte und sensitive Quantifizierungen der verschiedenen Peptid-Varianten wären *targeted* MS-Methoden, wie PRM, und eine anschließende Normalisierung auf unmodifizierte Peptide notwendig. Die unmodifizierten Peptide sollten dabei nicht in unmittelbarer Nähe einer Modifizierung liegen, damit die Effizienz des tryptischen Verdau keinen Einfluss auf die Peptidintensität hat. In diesem Ansatz konnten nur zwei unmodifizierten Peptide identifiziert werden, die für eine Normalisierung verwendet werden könnten. In Folgeexperimenten sollten diese unmodifizierten, sowie modifizierte Peptide über *targeted* MS-Messungen über Proben des Kultivierungsverlaufs quantifiziert werden. Zunächst sollte jedoch ausgeschlossen werden, dass über den anti-HSPA5-Westernblot ein falsches Protein detektiert wurde. Über einen spezifischen in-Gel-Verdau von verschiedenen Fraktionen auf Höhe des detektierten HSPA5-Bereichs sollten außerdem weitere Hinweise auf einen PTM-basierten Shift der detektierten Bande gefunden werden.

4.3.3.3. Validierung der Westernblot-Detektionen mittels In-Gel-Verdau

Um die Identität der mittels Westernblot detektierten Banden zu bestätigen, wurde spezifisch auf der detektierten Höhe aus einer gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten, die Proteine im Gel verdaut, extrahiert und die wenig-komplexe Probe über die nLC-MS/MS-Strecke mit einer 15 min-Methode

gemessen. Die Gelbereiche für HSPA5 wurden in drei Banden aufgeteilt (Abbildung 36 D). Entsprechend der detektierten Hochregulierung von HSPA5 im Kultivierungsverlauf wurden Proben mit steigendem Molekulargewicht $A < B < C$ aus der Auftrennung der Tag 11-Probe vorbereitet. Eine PSM-Validierung der PD-basierten DB-Auswertung erfolgte mittels Percolator-Node. Diese bevorzugte Peptid-Validierung auf Basis eines *machine learning*-Algorithmus setzt eine Mindestmaß an Identifikationen voraus (The *et al.* 2016), das hier, trotz geringer Probenkomplexität, gegeben war. Es konnten ca. 850 bis 1450 Peptide und damit ca. 130 bis 190 Proteine identifiziert werden. In allen drei Proben konnte eindeutig HSPA5 identifiziert werden, wobei das Protein in Probe B und C den Top1-Datenbanktreffer darstellt (sortiert nach dem MS Amanda 2.0 *score*). In dieser ersten DB-Suche konnten 34, 44 und 46 Peptide für HSPA5 in Messung A, B und C identifiziert werden. Um einen noch tieferen Einblick in die Daten zu erhalten, sollten die Messung unter Berücksichtigung einer *exclusion list* wiederholt werden. Dabei wurden anhand der Datenbank-Suche 1047 Einträge (PSMs) für A, 639 für B und 544 für Probe C während der Messung mit einem Retentionszeitfenster von ± 1 Minute ausgeschlossen. Die erneuten Messungen ergaben die Identifizierung von 28 HSPA5-Peptide für A, 46 für B und 40 für C. Eine zusammengefasste Datenbanksuche für Originalmessungen und *exclusion list*-Nachmessungen zeigte, dass für A 7, für B 4 und für C 3 neue unmodifizierte Peptide identifiziert werden konnten.

Eine weitere DB-Suche unter Einbeziehung von (Tri/Di-) Methylierungen führte zur Identifizierung von modifizierten Varianten zum Beispiel des K.LGGKLSSEDKETMEK-Peptids (Tabelle 19), welche auch schon über die Proteomanalyse des Kultivierungsverlaufs identifiziert werden konnten (siehe 4.3.3.2).

Tabelle 19 Modifizierungs-Varianten des Peptids K.LGGKLSSEDKETMEK identifiziert durch die Messung von In-Gel-Verdau-Proben von Tag 11, sowie *exclusion list* (*ex*)-Messungen, wobei das Molekulargewicht $A < B < C$ gilt.

Top-Hit	Modifizierung des Peptids K.LGGKLSSEDKETMEK (582-596)	# PSM	A	A - ex	B	B - ex	C	C - ex
1	K585m3 und M594-Ox	53						
2	K585m3	48						
3	K585m3 und K591/596m2	13						
4	K585m1	12						
5	K585m2	10						
6	K585m3 und K591/596m1 und M594-Ox	8						
7	K585m2 und M594-Ox	6						
8	K585m1 und M594-Ox	4						

Die K585-Trimethylierung konnte in allen drei Banden identifiziert werden, weitere Modifizierungs-Varianten jedoch nur in den oberen beiden Banden (B und C). Die im Westernblot beobachtete Vergrößerung des detektierten Molekulargewicht-Bereichs um ca. 1-2 kDa im Kultivierungsverlauf (siehe 4.3.2) konnte aufgrund des geringen Massenshifts von Methylgruppen

(0,014 kDa) nicht alleine mit Methylierungsänderungen begründet werden, gibt aber erste Hinweise auf eine Zunahme von unterschiedlich modifizierten HSPA5-Varianten im Bioreaktorkultivierungsverlauf. In Summe könnte über die ca. 30 identifizierten Methylierungsstellen, die teilweise zwei- bzw. dreifach methyliert vorlagen und über die mindestens zwei-fache AMPylierung und Phosphorylierung (siehe 4.3.3.2) der beobachtete Massenshift im Gel für die Proben aus der stationären Phase begründet werden. Allerdings wären auch viele weitere Kombinationen der Modifikationen möglich. Eine abschließende Zusammenfassung und Diskussion erfolgt in Abschnitt 4.3.4.

4.3.3.4. Transkriptom-Analyse von CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen

Zusätzlich zu den Proteom-Daten liegen Transkriptom-Daten einer Masterarbeit zu *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen der CHO-K1 für ausgewählte Zeitpunkte vor. Diese „älteren“ Kultivierungen wurden nur mit einem biologischen Replikat durchgeführt, wobei neben einer *fedbatch*-Kontrollkultivierung, jeweils ein Reaktor mit Temperatur- und pH-Shift betrieben wurde. Eine zur Verfügung gestellte relative Quantifizierung der Transkripte wurde für die Kontrolle und den pH-Shift für Tag 3 vs. Tag 7 und für den Temperaturshift für Tag 3 vs. Tag 6 und 11 durchgeführt. Die ausgewerteten Daten enthielten neben dem Feature (Gen-Name), einen *baseMean*-Wert, einen *baseMeanA* und *baseMeanB*-Wert, sowie die daraus berechnete \log_2 *Fold Change* (\log_2 FC). Für die jeweiligen Vergleiche der Kontrolle t_7/t_3 , pH-shift t_7/t_3 , Temperaturshift t_6/t_3 und t_{11}/t_3 konnten im Mittel 21.714 Transkripte quantifiziert werden. Über die \log_2 FC konnte eine Änderung der Expressionsstärke über den Kultivierungsverlauf evaluiert werden, wobei Werte > 0 aus dem Ratio t_7/t_3 eine Hochregulierung bzw. Werte < 0 eine Herunterregulierung des Transkripts bedeuteten. Transkripte mit einem hohen *baseMeanB* werden beispielsweise über einen starken endogenen Promotor des entsprechenden Gens transkribiert.

Die entsprechenden Transkriptom-Daten wurden nur mit einem technischen Replikat gemessen, so dass keine statistische Absicherung der Daten möglich war. Trotzdem wurden die Daten für eine Korrelation zu den hier erhobenen Proteomdaten der „neueren“ Kultivierungen eingesetzt. Über die Transkriptom-Analyse konnte beispielsweise eine Hochregulierung von Hspa5 und Hyou1 in der *fedbatch*-Kontrollkultivierung berechnet werden. Für die Temperaturshift-Kultivierung wurden zum Beispiel die Transkripte der Gene Col3a1, LgalS3bp und Hmox1 als hochreguliert identifiziert. In den Proteom-Daten konnten diese Targets jedoch nur identifiziert werden, wobei vermutet wird, dass die Expressionsstärke ohne Temperaturshift für eine Detektion mit der gewählten Proteom-Methodik nicht ausreichte.

Um neben einzelnen Beispielen einen umfassenden Vergleich durchzuführen, wurden mit 18.902 Features und den Gennamen der über den Proteomansatz quantifizierten 2.491 Proteine der tripplikat *fedbatch*-Kultivierungen (siehe 4.3.1) eine erste Korrelation in der Software Perseus

berechnet. Für Transkript-basierte Features und Proteom-basierte Gennamen konnten direkte *alignments* für 1.975 Features durchgeführt werden. (Um die fehlenden ca. 600 Proteine mit entsprechenden Transkripten zu korrelieren wären weitere (manuelle) Arbeiten notwendig.)

Nach dem Filtern für quantitative Daten der Tag 3- und Tag 7-Proteomproben und Berechnung des Median \log_2 FC t7/t3 blieben 1.114 Gennamen/Features für eine Korrelation zu den Transkript-Daten (Abbildung 37).

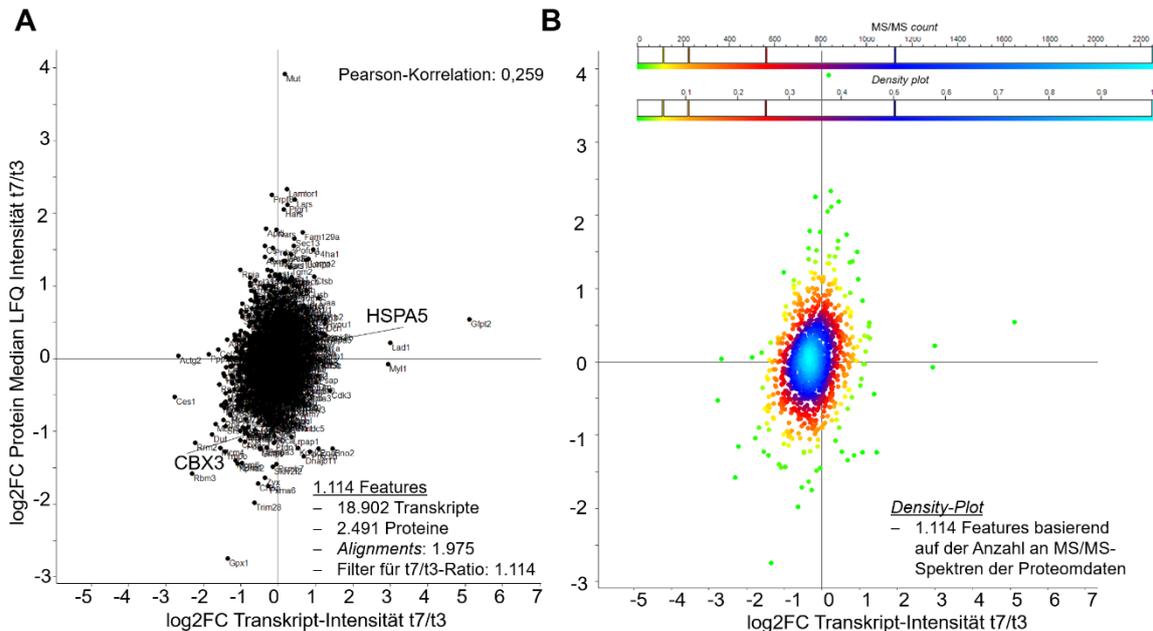


Abbildung 37 Korrelation der \log_2 Fold Change (FC) von Tag 7 vs. Tag 3 der Proteom- und Transkript-Daten von *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen der CHO-K1-Zelllinie. Es handelt sich hierbei um zwei unabhängige Kultivierungen, wobei die Proben zur Proteomanalyse und die Transkriptom-Daten für diesen Vergleich von Herrn Oliver Hertel und Herrn Dominik Krüger zur Verfügung gestellt wurden. **A)** Korrelation von 1.114 Features basierend auf identisch annotierten Gennamen der 18.902 quantifizierten Transkripte und 2.491 quantifizierten Proteine. **B)** Über einen *Density*-Plot (basierend auf der Anzahl an MS/MS-Spektren) kann beobachtet werden, dass Ausreißer mit hohen FCs auf Proteinebene nur über wenige MS/MS-Spektren quantifiziert wurden.

Die Korrelation (der 1.114 Features in Abbildung 37 A) ergibt nur einen geringen Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,259. Dabei muss beachtet werden, dass die Transkriptom-Daten nur aus einem Replikat analysiert wurden und somit Ausreißer einen starken Einfluss auf die Korrelation haben.

Durch das weitere Hervorheben von auf LFQ-*Proteomics*-basierten signifikanten Expressionsänderungen in Abbildung 37 B kann besonders eine Vielzahl an positiv-korrelierenden Features beobachtet werden. Ein Beispiel mit positiver Korrelation ist HSPA5, wobei über die relative Quantifizierung von HSPA5 im Westernblot Unsicherheiten aufgetreten sind (siehe 4.3.2). Für die mittels LFQ-MS berechnete Expressionsänderung von HSPA5 konnte im Vergleich zu den Transkript-Daten mit \log_2 FC t7/t3 von 1,27 nur eine \log_2 FC t7/t3 von 0,318 (nicht signifikant)

berechnet werden. Diese leichte Diskrepanz könnte in dem Vorhandensein von post-translationalen Modifikationen begründet sein, wobei eine Zunahme von Modifikationen zu einer Abnahme des entsprechend unmodifizierten Peptids führt, welches über den LFQ-MS-Ansatz zur Quantifizierung genutzt wurde.

Für das ebenfalls mittels orthogonaler Methode analysierte Protein CBX3 konnten über die Transkript-Daten ein \log_2 FC t7/t3 von -1,01 berechnet werden. Verglichen zu dem Protein \log_2 FC t7/t3 von -1,12 ergibt sich eine gute Übereinstimmung für CBX3. Mit einem *baseMean*-Wert von 2.140 liegt das CBX3-Transkript gering unter dem mittleren *baseMean* von 2.327, so dass auch die mittels LFQ-MS berechnete mittlere Expression im Transkriptom-Ansatz bestätigt werden konnte. Zu den Unsicherheiten in der Transkript-Quantifizierung über nur ein Replikat sind weitere Unsicherheiten in der Protein-Quantifizierung möglich. Eine Vermutung, dass besonders schwach-abundante Proteine wenig akkurat und präzise quantifiziert werden können, konnte durch die Berechnung eines *Density-Plots* basierend auf der Anzahl an MS/MS-Spektren (Abbildung 37 B), verstärkt werden. Mit steigender Anzahl identifizierter MS/MS-Spektren (maximal 2.200) verläuft die mittlere \log_2 FC t7/t3 vermehrt gegen Null. Besonders Ausreißer-Proteine mit einer extremen \log_2 FC t7/t3 (positiv und negativ) wurden auf Basis von weniger als 200 MS/MS-Spektren identifiziert. Weitere Variabilitäten beruhen auf post-transkriptionalen und post-translationalen Regulationsmechanismen, welche zuvor beispielsweise anhand der HSPA5-PTM diskutiert wurden (siehe 4.3.3.2 und 4.3.3.3). Trotz großer Unsicherheiten konnten über diese erste Korrelation eine Übereinstimmung von Proteom- und Transkriptom-Änderungen im CHO-K1 *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungsverlauf beobachtet werden.

4.3.4. PTM-basierte Optimierungsstrategien einer CHO-Kultivierung

Über die Durchführung einer Proteomanalyse von *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungen der CHO-K1-Parentalzelllinie (siehe 4.3.1) konnte der sogenannte *chaperone code* (Nitika *et al.* 2020) in dieser Arbeit erstmals und anfänglich für CHO-Zellen analysiert werden. In dem *review* von Nitika *et al.* wird der aktuelle Stand möglicher Funktionen der post-translationalen Modifikationen von HSPA5 diskutiert. Generell wird angenommen, dass die HSPA5-Proteinaktivität in Faltungs- und Rückfaltungsprozessen teilweise durch Methylierungen reguliert wird. HSPA5, welches zum Beispiel an K585-trimethyliert ist, wird nach ER-Stress lysosomal abgebaut und durch unmodifiziertes Protein ersetzt (Sieber *et al.* 2017). Es wird daher eine geringere Stöchiometrie der K585-Trimethylierung unter ER-Stress vermutet (Nitika *et al.* 2020), was zum Beispiel für CHO-Zellen in der stationären Phase (siehe 4.3.1) zutreffen könnte. In Anlehnung an die Terminologie aus dem Bereich der Analyse von Proteinglykosylierungen konnten erste Hinweise auf eine mögliche Zunahme an Mikro- und Makroheterogenität des post-translational modifizierten HSPA5-Proteins im *fedbatch*-Bioreaktorkultivierungsverlauf gefunden werden. Für eine korrekte Interpretation sollten in an diese Arbeit anschließenden Experimenten die Profile der PTM-

Varianten zunächst über robuste Quantifizierungsmethoden, wie PRM, analysiert werden. Weiterhin spielt die Methylierung zum Beispiel in der Regulation der Genexpression eine Rolle, wobei HSP70-Chaperone, parallel zu Histonen durch zum Beispiel Protein Arginine N-Methyltransferase-4 (PRMT4) methyliert werden und so die Chromatin-Interaktion regulieren. Eine RAR-abhängige Initiierung der Genexpression konnte nach Arg469-Methylierung von HSP70 gezeigt werden (Gao *et al.* 2015).

Die Verbindung dieses hoch-modifizierten Proteins zur Genregulation und die hier evaluierte Hochregulierung auf Transkript- und Proteomebene ergibt ein vielversprechendes Target, welches in Zellkulturtechnik-Optimierungsansätzen gezielt beeinflusst werden könnte. Eine Überexpression von HSPA5/BIP im *cellular engineering*-Ansatz führte bereits zur Steigerung des volumetrischen Produkttiters eines „difficult-to-express“ mAb in einer CHO-K1-Zelllinie (Pybus *et al.* 2014), in anderen Studien jedoch nicht zu erhöhten Protein-Sekretionsraten (Borth *et al.* 2005). Neben der Möglichkeit zur Überexpression des bereits stark exprimierten Proteins erscheint eine Modulierung der PTMs in Richtung eines aktivierten Protein-Zustands erfolgsversprechender. Mögliche inhibierende Modifikationen, wie die Methylierungen, AMPylierung, spezifische Phosphorylierungen und Ubiquitylierungen oder die generelle Homodimerisierung des Proteins könnte über den Einsatz von spezifischen *small molecules* vermindert werden und möglicherweise zu einer verbesserten Prozessperformance führen. Sowohl das direkte Inhibieren von HSPA5 durch *small molecules* (Huang *et al.* 2013), als auch das Inhibieren HSPA5-modifizierender Enzyme, wie zum Beispiel NAD⁺-dependent protein deacetylase sirtuin-1 (SIRT1) (Mu *et al.* 2019) sind aus der Krebsforschung bekannt. Ein Mechanismus der SIRT- bzw. HDAC-abhängigen Deacetylierung von Lysin ist in Abbildung 38 A schematisch abgebildet (Narita *et al.* 2019). Es konnte gezeigt werden, dass eine *Salermide*-abhängige SIRT1/2-Inhibierung in Krebszellen über HSPA5-Acetylierung zu ER-Stress-Auslösung, Autophagie- und Apoptose-Induktion führte (Mu *et al.* 2019). Eine Inhibierung von SIRT1/2 im späten CHO-Kultivierungsprozess könnte, über Autophagie-Aktivierung, zur verlängerten Prozessdauer führen (siehe 4.3.1 und Abbildung 38 B).

Eine Deacetylierung von LDHA über SIRT2 wird zum Beispiel mit einer erhöhten Proteinaktivität in Verbindung gebracht (Di Zhao *et al.* 2013). Es wird vermutet, dass nach SIRT2-Inhibierung, vor allem in der frühen Kultivierungsphase, eine verringerte Laktatakkumulation erfolgen könnte und demnach eine Wachstumsinhibierung über eine verminderte Ansäuerung des Mediums inhibiert würde. Eine Deacetylierung von PDHA über SIRT3 führt zur Inhibierung des PDC. Eine SIRT3-Inhibierung könnte über PDC-Aktivierung einen verminderten Warburg-Effekt (Xu *et al.* 2017b) zur verbesserten Prozessperformance führen. Durch Inhibierung von SIRT1/2 über *Salermide* wurde eine Autophagie-Aktivierung beschrieben (Mu *et al.* 2019), welche in der stationären Phase möglicherweise zu einer verlängert hohen Viabilität des CHO-K1-Kultivierungsprozesses beitragen könnte. Eine Deacetylierung von LDHA über SIRT2 wird zum Beispiel mit einer

erhöhten Proteinaktivität in Verbindung gebracht (Di Zhao *et al.* 2013). Es wird vermutet, dass nach SIRT2-Inhibierung, vor allem in der frühen Kultivierungsphase, eine verringerte Laktatakkumulation erfolgen könnte und demnach eine Wachstumsinhibierung über eine verminderte Ansäuerung des Mediums inhibiert würde. Eine Deacetylierung von PDHA über SIRT3 führt zur Inhibierung des PDC. Eine SIRT3-Inhibierung könnte über PDC-Aktivierung einen verminderten Warburg-Effekt (Xu *et al.* 2017b) zur verbesserten Prozessperformance führen. Durch Inhibierung von SIRT1/2 über *Salermide* wurde eine Autophagie-Aktivierung beschrieben (Mu *et al.* 2019), welche in der stationären Phase möglicherweise zu einer verlängert hohen Viabilität des CHO-K1-Kultivierungsprozesses beitragen könnte.

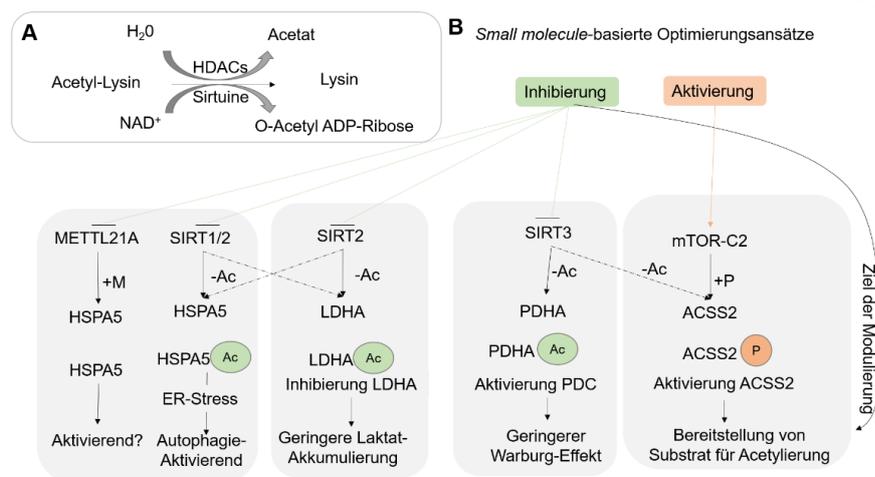


Abbildung 38 Modell zur möglichen Anwendung von *small molecules* für die Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung von CHO-K1-Zellen. **A**) Schematische Darstellung der Deacetylierung von Lysin durch HDACs oder Sirtuine (SIRT) (Narita *et al.* 2019). **B**) Zusammenfassung von möglichen Optimierungsansätzen über die Modulation von beispielsweise Sirtuinen. In der Literatur wird für Krebszellen beschrieben, dass *Salermide* über die Inhibierung der Deacetylase SIRT1/2 zur erhöhten Menge an acetyliertem HSPA5 und darüber zur Autophagie-Aktivierung führt (Mu *et al.* 2019). Eine weitere Aktivierung von HSPA5 könnte wohlmöglich über die Inhibierung der METTL21A Methyltransferase erfolgen. Eine SIRT1/2-Inhibierung in der stationären Phase könnte zur verlängerten CHO-Prozessdauer führen. Eine spezifische Inhibierung von SIRT2 könnte über Acetylierung von LDHA eine verringerte LDHA-Aktivität bewirken und demnach zu einer reduzierten Laktat-Akkumulation führen. Außerdem könnte eine SIRT3-Inhibierung über Acetylierung von PDHA1 und Aktivierung von PDC zu einem verringerten Warburg-Effekt führen.

Ein ähnlicher Mechanismus ist in der CHO-Zellforschung aus der Butyrat-Behandlung bekannt, wobei neben anderen HDACs auch SIRT3 inhibiert wird (Xu *et al.* 2017b). Aufgrund der direkten Apoptose-Induktion durch Butyrat sollte geprüft werden, ob spezifischere Methoden zur SIRT-Inhibierung zu weniger Nebenwirkungen führen. Eine Aktivierung von SIRT1/2 erfolgt hingegen vermutlich über Resveratrol (Baek *et al.* 2016). Die Zugabe dieses Phenols in der frühen exponentiellen Phase führte in neusten Studien an mAb-CHO-DG44-Zellen zu gesteigerten zellspezifischen Produktivitäten und Produkttitern (Toronjo-Urquiza *et al.* 2020). Obwohl die Ursachen der Resveratrol-vermittelten erhöhten Proteinsynthese und verminderten Proliferation in

der Publikation nicht diskutiert wurden, kann vermutet werden dass eine Aktivierung der Deacetylase SIRT1 erfolgte, HSPA5 dementsprechend deacetyliert wurde und dies zu einer Autophagie-Inhibierung und mTOR-Aktivierung führte. Durch diese Studie wurde möglicherweise indirekt eine Verbesserung der Prozessperformance durch Modulierung von HSPA5-modifizierender Enzyme in einer bestimmten Wachstumsphase gezeigt. Da über die ProteomeDiscoverer-basierte Auswertung der Daten hier jedoch keine Acetylierung sicher identifiziert wurde, wird vermutet, dass die SIRT-Aktivität über den Kultivierungsverlauf sehr hoch vorlag und eine weitere Aktivierung nicht vorteilhaft wäre.

Auch eine Modulierung von Methyltransferasen zur Aktivierung der HSPA5-Proteinaktivität wäre für zukünftige Prozessoptimierungen möglich. Aufgrund des lysosomalen Abbaus K585-trimethylierten HSPA5 könnte eine Inhibierung der Methyltransferase METTL21A zur erhöhten Proteinaktivität führen (Abbildung 38 B). Durch die zuvor vorgeschlagene Quantifizierung der PTM sollte zunächst eine optimale Wachstumsphase zur METTL21A-Inhibierung evaluiert werden. Neben der Vielzahl an Methylierungen wurden ebenfalls phosphorylierte und AMPylierte Peptide identifiziert. Eine HSPA5-AMPylierung an Thr518 wird als reversibler „off“-Schalter beschrieben (Preissler *et al.* 2015). Zu den hier identifizierten AMPylierungsstellen sind jedoch keine Funktionen bekannt. Außerdem konnte neben der Chaperon-vermittelten Regulierung von MAPK/ERK zuletzt auch eine ERK-vermittelte Phosphorylierung von HSP70 in Verbindung zu einer erhöhten Proteinaktivität und Zellproliferation von Krebszellen gebracht werden (Lim *et al.* 2019). In älteren Studien zur Regulierung des Zellzyklus über Chaperon-Phosphorylierungen wird vermutet, dass eine Phosphorylierung eine dimere, inaktive HSPA5-Konformation unterstützt. Unter ER-Stress wird das Protein dephosphoryliert und die homodimere Formation aufgehoben (Satoh *et al.* 1993). Auch eine Modifikation von Cysteinen, wie zum Beispiel die Glutathionylierung, wird für HSP70 in der Literatur beschrieben (Yang *et al.* 2020b). Über *in vitro*-Studien konnte über die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken eine erhöhte Aktivität und Stress-Resistenz beobachtet werden (Wei *et al.* 2012). Neben HSP70 werden darüber auch für HSPA5 Funktionen in der direkten Antwort auf oxidativen Stress vermutet (Nitika *et al.* 2020). Die biologischen Funktionen weiterer Modifikationen, wie Succinylierung und SUMOylierung, sind bisher nicht beschrieben. Funktionen der Chaperon-Ubiquitinylierung wurden hingegen mit gegensätzlichen Ergebnisse beschrieben (Nitika *et al.* 2020). Eine in dem *review* nicht erwähnte Arginylierung des Proteins soll zum Transport des Proteins in das Cytosol führen, wo es falschgefaltete Proteine bindet und anschließend ein proteosomaler Abbau erfolgt (Jiang *et al.* 2016). Eine zukünftige detaillierte Analyse der HSPA5-PTMs im Kultivierungsverlauf und eine Evaluierung der entsprechenden Enzyme könnte zu weiteren neuen Targets für *small molecules*-Anwendungen in der Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung führen.

5. Fazit und Ausblick

5.1. Der *Phospho/Proteomics*-Workflow als Basis für aussagekräftige Analysen

Da es keinen Goldstandard zur Anreicherung von Phosphopeptiden und der verwendeten Algorithmen zur Phosphoproteom-Analyse gibt (Locard-Paulet *et al.* 2020) wurden für die Interpretation des *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Phospho/Proteoms hier zunächst einige Schritte des Workflows evaluiert und etabliert. Das dem Phosphoproteom zugrunde liegende Proteom von CHO-Zellen wurde über verschiedene Protein-Extraktionsmethoden, variierende Vorbereitungs-Workflows, Messmethoden und anhand verschiedener Datenbanken analysiert. Nach der Anschaffung des Orbitrap-Systems an der Universität Bielefeld konnten größere Messreihen durchgeführt werden, wobei Workflow-Schritte mit Potential für eine weitere Verbesserung quantitativer Studien in dieser Arbeit hervorgehoben wurden.

Über erste *deep proteome*-Analysen konnten mit zur aktuellen Literatur vergleichbarem Messaufwand ähnliche Ergebnisse mit einer Identifizierung von über 6.000 Proteinen erzielt werden. Eine zusätzliche subzelluläre Fraktionierung, neben der hier angewendeten HpH-Fraktionierung, würde vermutlich nur zu einer geringfügigen Erhöhung der identifizierten Proteine führen. Die in verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit beschriebene Kompartiment-abhängige Proteinfunktion könnte hingegen über eine subzelluläre Fraktionierung zu einem verbesserten zellulären Verständnis beitragen.

Für eine SILAC-basierte MS-Datenaufnahme konnten drastische Verbesserungen über den Einsatz eines Software-Features zur spezifischen Fragmentierung von jeweils einem SILAC-*precursor* beobachtet werden, welches jedoch nicht für das bestehende System nachgerüstet werden konnte. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von SILAC-Proben weisen somit immer eine potentielle doppelt so hohe Komplexität im Vergleich zu LFQ-Messungen auf. Ein aktueller Vergleich der verfügbaren Datenbanken zur Auswertung der erhobenen Messdaten führte zu hohen Peptid-Identifikationen bei Verwendung der aktuellen *C. griseus* TrEMBL- oder NCBI PICR-Datenbank. Der für diese Arbeit durchgeführte duale Datenbank-Abgleich über Proteinsequenzen von *C. griseus* und *M. musculus* zur Analyse des CHO-Proteoms könnte somit in Zukunft durch Verwendung einer Datenbank nur für *C. griseus* ersetzt werden. Durch den verkleinerten Suchraum können die Daten dann schneller, spezifischer und mit geringerem Risiko für Duplikate ausgewertet werden.

Die Zugabe von teuren Protease- und Phosphataseinhibitoren, die außerdem nur einen Teil von zellulären Protein- bzw. PTM-abbauenden Enzymen inhibiert, konnte über einen Schritt der Hitzeinaktivierung ersetzt werden. Weiterhin konnten Hinweise gegen eine in der Literatur beschriebene Verschlechterung der Phosphoproteom-Analyse durch die Verwendung von PBS-Puffer zum Waschen der Zellen gefunden werden. Eine Abhängigkeit der Proteinausbeute vom eingesetzten Extraktions-Puffervolumen wurde ermittelt, was insbesondere bei hohen benötigten

Ausgangsmengen für eine Anreicherung von zum Beispiel Phosphopeptiden entscheidend sein kann. Trotz genereller Kompatibilität des Phosphoproteom-Workflows mit dem vorhandenen Orbitrap-System inklusive dualer ESI/MALDI-Quelle konnten Schwankungen der Workflow-Performance festgestellt werden, die eine LFQ-basierte Anwendung verhindern. Eine Automatisierung des Phosphoproteom-Workflows könnte zum höheren Durchsatz und zur höheren Reproduzierbarkeit beitragen. Über die Etablierung einer semi-automatischen Peptidaufreinigung komplexer Proteomproben konnten in dieser Arbeit die durchzuführenden Pipettierschritte und damit das potentielle Kontaminationsrisiko mit humanen Proteinen reduziert und eine Automatisierung des Standardworkflows erhöht werden. Neben den in der Literatur häufig als differentiell exprimiert beschriebenen Proteinen konnten so auch Expressionsänderungen von gering abundanten Proteinen statistisch erfasst werden und neue vielversprechende Targets der Zelllinienoptimierung identifiziert werden (siehe 5.2).

Optimierungen des nLC- und Quellen-*setups* für Phosphopeptid-Messungen

Eine Möglichkeit zur weiteren Optimierung der für diese Arbeit verwendeten nLC-MS/MS-Strecke besteht in dem Packen eigener nLC-Säulen, da neben der enormen Kosteneinsparung auch verbesserte Ergebnisse in der Literatur beschrieben wurden. Mit dem FlashPack-Protokoll zur schnellen und einfachen Herstellung von nano-Säulen konnten über eine sogenannte *pressure bomb* mit relativ geringem Druck (100 bar) hohe Material-Konzentrationen mit $< 2 \mu\text{m}$ Partikelgröße erreicht werden. Anstelle der Präparation über Nacht werden nur wenige Minuten (für 15 und 25 cm) oder 1 Stunde für 50 cm Ultra-HPLC (UHPLC) Säulen benötigt (Kovalchuk *et al.* 2019). Über einen Vergleich zu dem *setup* des nLC-Orbitrap-Systems hier konnten bis auf die Verwendung einer EASY-SprayTM (anstelle der dualen ESI/MALDI-Quelle mit Nanospray FlexTM-Quelle) viele Parallelen festgestellt werden, weshalb das Protokoll in an diese Arbeit anschließenden Experimenten getestet werden könnte. Sowohl mit der EASY-Spray als auch mit der Nanospray Flex-Quelle können, die für diese Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen PepMap-Säulen verwendet werden. Im EASY-Spray *setup* sind die geheizten PepMap-Säulen direkt vor dem MS positioniert, was laut Hersteller zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit führen soll.

Insgesamt konnte über die externe Messung in Osnabrück die höchste Anzahl an Phosphopeptiden pro Minute Gradient bzw. Messzeit ermittelt werden, wobei ein hauptsächlichlicher Unterschied ebenfalls in der Verwendung der EASY-SprayTM-Quelle lag. Es wird vermutet, dass insbesondere die Verwendung von Glas-Emittern (*fused silica*) anstelle von *stainless steel*-Emittern deutliche Auswirkungen auf die Ergebnisse hatte. Bei hohen angelegten Spannungen kann eine irreversible Bindung von Phosphopeptiden am *stainless steel*-Emitter erfolgen (Henry *et al.* 2017a). Obwohl in anderen hoch-qualitativen Phosphoproteom-Studien (Reimann *et al.* 2020) mit Stahlemittlern

gearbeitet wurde, sollten in Zukunft Glasemitter in Anlehnung an das aktuelle EasyPhos-Protokoll verwendet werden (Humphrey *et al.* 2018).

In einer aktuellen Studie von Bian *et al.* konnte eine qualitative Verschlechterung der kommerziell erworbenen PepMap-Säulen bemerkt werden, weshalb die Autoren die aktuelle Studie mit gelagerten Säulen aus dem Jahr 2013 durchgeführt haben (Bian *et al.* 2020). Die zuvor vorgeschlagene Herstellung eigener Säulen konnte somit nochmals hervorgehoben werden. Neben den Vorteilen von eigens-gepackten Säulen oder anderer Materialien für *nano-flow* LC-Auftrennungen konnten auch alternative Systeme mit einer höheren Flussrate, der sogenannten *micro-flow* LC zu Verbesserungen der Robustheit von Proteom-Analysen führen (Bian *et al.* 2020).

Für die teilweise manuelle Auswertung relevanter, regulierter Phosphorylierungsstellen wäre ein CHO-spezifische Phosphoproteom-Datenbank, wie PhosphoSitePlus, hilfreich. Ein Angebot die für diese Arbeit ermittelten Daten an PhosphoSitePlus weiterzuleiten und zu integrieren wurde von Herrn Hornbeck (Cell Signaling Technology) jedoch nicht angenommen. Um neben den bekannten Modifikationen neue Proteinmodifikationen innerhalb der gemessenen DDA-Datensätze zu evaluieren, wurden in dieser Arbeit sowohl die Mascot-basierte *Error-Tolerant* DB-Suche als auch die *dependent peptides*-Funktion in MaxQuant verwendet (Daten nicht gezeigt). Die Software TagGraph stellt eine neuste Entwicklung in diesem Bereich dar und dient der *de novo* Sequenzierung mit *open search*-Funktion für die Identifizierung von PTM. Es handelt sich um einen schnellen Algorithmus zum Abgleich von Peptiden mit der Protein-Sequenzdatenbank ohne eine Priorität vorwegzunehmen, so dass weder Protease, Modifikationen oder Variationen der Aminosäuren spezifiziert werden (Devabhaktuni *et al.* 2019). Über diese Algorithmen könnten die in dieser Arbeit analysierten post-translationalen Modifikationen, insbesondere Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung, um neue Modifikationen erweitert werden und so weitere globale Regulationsmechanismen analysiert werden.

5.2. Charakterisierung und Anwendung des Phospho/Proteoms von CHO-Zellen

Besonders die Auswertung von *big data*, die über globale Proteom-Analysen generiert werden, stellt ein *bottleneck* der Proteomforschung dar (Foster and DeMarco 2017). In dieser Arbeit wurde daher zunächst (basierend auf externen sensitiven nLC-MS/MS-Messungen) eine Evaluierung und Etablierung von Software-basierten Auswertestrecken durchgeführt. Als dann durch die Universität Bielefeld ein Orbitrap-System erworben wurde, konnten nach Optimierung der Probenvorbereitung und Messmethoden (siehe 5.1) zeitliche Verläufe und so aussagekräftige Protein-Regulierungen über quantitative *Phospho*- und *Proteomics* analysiert werden. Die gewonnenen Daten der differentiellen Proteom- und Phosphoproteom-Analysen wurden in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie und der Medienzusammensetzung diskutiert. Insgesamt konnte ein aktives mTOR-Signaling in den drei CHO-Zelllinien XL99, E3 und G4 in der exponentiellen Phase ohne Zugabe

von Wachstumsfaktoren ermittelt werden. Im Gegensatz zu einer kurzzeitigen Aktivierung von mTOR-*downstream* Targets über den Wachstumsfaktor IGF konnte eine mTOR-Inhibierung über L-Carnosin eine späte mTOR-Reaktivierung bewirken und darüber ein wünschenswerter Phänotyp der stabilisierten zellspezifischen Produktivität erreicht werden.

Proteomvergleich zur Evaluierung einer differentiellen Redox- und Autophagie-Regulierung

Über einen LFQ-Proteomvergleich der mAb-produzierenden CHO-G4-Zelllinie und der entsprechenden parentalen XL99-Zelllinie konnte ein höherer Glutamin- und Glutathion-Metabolismus festgestellt werden, der einerseits in der Glutamin-freien Kultivierung der mAb-GS-Zelllinie, andererseits in einem vermuteten höheren ROS-Stress durch die Produktsynthese begründet wurde. Die detektierte reduzierte lysosomale Proteinausstattung der mAb-CHO basiert vermutlich entweder auf einem erhöhten mTOR-Signaling oder teilweise auf einem verminderten Protein-Recycling durch die finale Sekretion des mAbs ins Kulturmedium. Ein potentielles *bottleneck* der Protein-Faltungsmaschinerie der mAb-CHO-G4 liefert klassische Ansatzpunkte für eine Zelllinienoptimierung. Insgesamt korreliert die leicht höhere Proteinsyntheselast der mAb-CHO mit einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit, worüber vermutlich eine UPR-vermittelte Autophagie-Aktivierung in der exponentiellen Phase dieser mAb-CHO inhibiert wird. Im Gegensatz zu den mAb-CHO-E3 und XL99 liegt in den mAb-CHO-G4 unter Standard-Kultivierungsbedingungen eine Inhibierung des Laktatstoffwechsel-Shifts vor. Der unerwünschte Phänotyp (des ausbleibenden Shifts) konnte erstmals auf Proteomebene analysiert werden und mit hochregulierten alternativen Glukose-Stoffwechselwegen (PPP und Glykogensynthese) in Verbindung gebracht werden. Die Verbindung des Proteoms, bestimmten Metaboliten und der Signaltransduktion konnte somit in dieser Arbeit verdeutlicht werden, weshalb in an diese Arbeit anschließenden Experimente neben globalen *Proteomics* auch *Metabolomics*-Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien und zur Prozessoptimierung angewendet werden könnten.

IGF-Signaling mit direkter Verbindung zum Metabolismus

Eine Aktivierung des mTOR-Signalings über IGF führte zu Effekten auf die Laktatverstoffwechslung in allen drei CHO-Zelllinien, wobei für G4 ein IGF-vermittelter Stoffwechselshift in Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation beobachtet wurde. Über *Phosphoproteomics* 5 min nach IGF-Induktion konnte insgesamt sowohl einheitlich aktivierte Signaling-Pathways für die drei nah-verwandten XL99-Zelllinien analysiert werden, aber auch Unterschiede ermittelt werden. Die evaluierten Unterschiede im IGF-Signaling zwischen den beiden mAb-produzierenden Zelllinien in der Regulierung von Proliferation, Metabolismus und Dephosphorylierungs-Mechanismen basieren neben dem differentiellen Proteom vermutlich auf dem (unterschiedlichen) Integrationsort des rekombinanten Gens (Barnes *et al.* 2003). Weitere G4-spezifische Unterschiede können außerdem auf der generellen genetischen Instabilität (Feichtinger

et al. 2016) und dadurch bedingter zellulärer (Davies *et al.* 2013) und intra-klonaler Heterogenität beruhen (Pilbrough *et al.* 2009; Schmitz *et al.* 2019).

Glutamin-abhängiges Proteom bedingt differentielle Prozessperformance nach IGF-Induktion

Die proliferativen Effekte von IGF auf die mAb-CHO in Glutamin-freiem Medium wurden im Gegensatz zu anti-proliferativen Effekten von IGF auf die parentale Zelllinie XL99 in Glutamin-haltigem Medium beobachtet. Über Experimente zur IGF-Induktion der mAb-CHO in Glutamin-haltigem Medium konnten ebenfalls anti-proliferative Effekte von IGF evaluiert werden und so eine Interaktion des Glutamin-abhängigen Proteoms und des IGF-Signalings bewiesen werden. Über einen weiteren Proteomvergleich der mAb-CHO in Medium mit und ohne Glutamin und dem Vergleich zur Proteinexpression der XL99-Zelllinie konnte eine vermutete Glutamin-abhängige Proteinexpression bestätigt, aber auch Glutamin-unabhängige mAb-CHO-spezifische Proteinexpressionen von cytoskeletalen und Signalingkomponenten ermittelt werden.

Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität über eine späte mTOR-Aktivierung

Neben der frühen bzw. direkten Aktivierung von mTOR über IGF wurden die Effekte einer vermeintlichen Inhibierung über die Zugabe von L-Carnosin in das CHO-Zellkulturmedium evaluiert. Auch basierend auf der differentiellen Expression von Dipeptidasen wurden Zelllinien-spezifische Effekte einer Carnosin-Supplementierung erwartet. Eine parallele Supplementierung der drei Zelllinien (XL99, E3 und G4) mit 20 mM Carnosin ergab erste Hinweise auf eine geringere MAPK-Aktivierung in G4. Das aktivierte Signaling führte jedoch zu keinen deutlichen Unterschieden auf Kultivierungsebene der drei Zelllinien. Die Dipeptid-abhängige Signaltransduktion sollte daher über einen sensitiven SILAC-MS-Ansatz analysiert werden. Die Zugabe einer erhöhten L-Carnosin-Konzentration von 60 mM in der exponentiellen Phase von mAb-CHO-G4 führte zu einer Wachstumsinhibierung und einer späten Erhöhung und Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität. Über die Analyse des differentiellen frühen Phosphoproteoms wurden Hinweise auf eine Inhibierung von mTOR gefunden. Eine Analyse des differentiellen Proteoms im späten Kultivierungsverlauf führte hingegen zur Hochregulierung von mTOR-*downstream* Targets und darüber Hinweisen auf eine Reaktivierung von mTOR in Verbindung zu dem wünschenswerten Phänotyp der Stabilisierung der zellspezifischen Produktivität. Obwohl eine schnelle Signalweiterleitung auf den Import des Dipeptids deutet, wurde vermutet, dass eine erhöhte Sekretion der Carnosin-spezifischen Dipeptidase ins Medium erfolgte (basierend auf einer berechneten Herunterregulierung auf Proteomebene) und die Aminosäuren dementsprechend einzeln importiert wurden. Insgesamt konnte eine positive Auswirkung von Carnosin als Zellkultursupplement gezeigt werden und neben offenen Fragen die in der Literatur beschriebene Hypothese zum Carnosin-Wirkmechanismus als Rapamycin *mimic* (Hipkiss 2011) in

dieser Arbeit verstärkt werden. In Folgenden Experimenten könnten die Vorteile der stabilisierten zellspezifischen Produktivität durch Carnosin in *fedbatch*-Kultivierungen evaluiert werden.

Optimierungsstrategien einer *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung

Die erstmals durchgeführte LFQ-basierte Proteomanalyse von CHO-K1-Bioreaktorkultivierungen (als *fedbatch*- und *batch*-Prozessstrategie) führte zur Offenlegung einer hohen Dynamik, die im Ansatz bereits in publizierten Transkriptom-Analysen (Wong *et al.* 2006a; Pan *et al.* 2019) zu erkennen war. Über die angewandten globalen *Proteomics*-Methoden konnten hier jedoch erstmals aussagekräftige Interpretationen unter Berücksichtigung post-transkriptionaler Regulierung getätigt werden.

Die über Transkriptom-Analyse berechnete Hochregulierung des Hspa5-Transkripts in CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungen wurde über eine wiederholte Kultivierung in Triplikaten und anschließender LFQ-Proteomanalyse auf Proteinebene bestätigt. Die im Westernblot beobachteten Massenshifts der HSPA5-Detektion für Proben der stationären Phase der *fedbatch*-Kultivierung wurden auf post-translationale Modifikationen zurückgeführt, was beispielhaft durch das Vorliegen verschiedener Methylierungszustände in unterschiedlichen Molekulargewichtsabschnitten gezeigt werden konnte. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Modifikationen zu einer verminderten Bindungsaffinität des anti-HSPA5-Antikörpers führten. Eine erneute Vermessung der nLC-MS/MS-Proben mit längeren Gradienten erlaubte einen tieferen Einblick in die Daten und das Messen von unterschiedlich modifizierten HSPA5-Peptiden. Diese identifizierten PTM-Varianten von HSPA5 (Tri/di/methyliert, phosphoryliert, AMPyliert) sind unter anderem Gegenstand aktueller Forschung des *chaperone codes* (Nitika *et al.* 2020). Um robuste Quantifizierungen der modifizierten Peptidvarianten über den Kultivierungsverlauf zu ermitteln, könnten *targeted MS*, wie PRM-Methoden, in Folgeexperimenten angewendet werden. Zusätzlich zu den hier analysierten Kultivierungs- und Proteomdaten stehen zu diesem Datensatz auch *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP)- und Transkriptom-Sequenzierungen zur Verfügung, die sich zur Zeit in der detaillierten Auswertung durch Herrn Oliver Hertel befinden und zu einer weiteren Vertiefung der Ergebnisse beitragen werden. Über den Vergleich von ChIP-Daten der Kultivierungstage 3 und 7 könnte über die Analyse von Protein- und DNA-Modifikationen der *chaperone code* in CHO-Zellen generell, aber auch erstmals spezifisch Funktionen von HSPA5 als HSP70-Protein in der Regulierung der Genexpression (Gao *et al.* 2015) evaluiert werden.

Über die Proteomanalyse der *fedbatch*-Bioreaktorkultivierung konnten einerseits klassische Targets für die Optimierung dieser CHO-K1-Zelllinie identifiziert werden. Eine zunächst hochregulierte LDHA sollte zur Reduzierung der Laktatakkumulierung inhibiert werden. Das deutlich hochregulierte Chaperon HSPA5 könnte nach klassischer Herangehensweise überexprimiert werden. Da HSPA5 ohnehin hoch-abundant vorliegt, wurde über die Auswertung der sensitiven

Proteomics-Daten hier die Verwendung von weniger stark exprimierten Proteinen der Proteinfaltungs-Maschinerie für Überexpressions-Experimente, wie FKBP14, FKBP7 oder SDF2L1, als Teil des HSPA5-Chaperon-Komplexes, vorgeschlagen.

Durch die Kombination der Proteomanalyse und Literaturrecherche konnten Gemeinsamkeiten in Regulationsmechanismen von Targets zur Zelllinien- bzw. Prozessoptimierung über Sirtuin-Deacetylasen evaluiert werden, darunter HSPA5 (BIP, GRP78), LDHA und PDHA1 bzw. der Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDC). Eine SIRT-abhängige Deacetylierung dieser (und weiterer) Proteine führt zur Regulierung der Proteinaktivität. Die Entwicklung einer PTM-basierten Prozessoptimierungsstrategie in dieser Arbeit führte zu neuen Targets bzw. Herangehensweisen (siehe Abbildung 38 B). Um neben Supplementen, wie Butyrat, eine spezifische Inhibierung der SIRT-abhängigen Deacetylierung zu bewirken, könnten aktuell publizierte spezifische Moleküle verwendet werden (Loharch *et al.* 2021).

Über einen Vergleich der *fedbatch*- zur *batch*-Bioreaktorkultivierungen konnten insgesamt viele verzögerte Proteinregulierungen identifiziert werden und auf die verlängerte Versorgung mit Nährstoffen zurückgeführt werden. Unterschiede in der Intensität der Regulierung konnten zum Beispiel für das MAPK-regulierende Protein TPR berechnet werden, wobei eine Überexpression möglicherweise eine weitere Zellproliferation fördern würde. Noch extremere Prozessstrategie-spezifische Unterschiede konnten hingegen in der Expression von Signaling-Komponenten, wie STAT1 oder LAMTOR1, und metabolischen Proteinen im Acetyl-CoA-Stoffwechsel, wie ACSS2 mit möglichen Auswirkungen auf die Epigenetik, identifiziert werden. Für zukünftige Prozessoptimierungen könnte die ACSS2-Aktivität sowohl über Sirtuin-Deacetylasen als auch über mTOR-C2 moduliert werden. Neben den hier evaluierten Targets zur Optimierung eines pH- und Sauerstoff-geregelten Zellkulturprozesses über *Proteomics*-Methoden könnten über weitere Methoden- und Software-Entwicklungen weitere neue Targets, auch aus den hier erhobenen Daten, identifiziert werden.

5.3. Erweiterung der Methoden zur Protein- oder Proteom-Analytik

Eine wichtige Software-Entwicklung stellt die Vorhersage der Peptidfragmentierung durch *machine learning*-Algorithmen dar (Gessulat *et al.* 2019; Tiwary *et al.* 2019). Die Algorithmen werden dabei entweder über echte Peptid-Massenspektren mit über 60 Millionen MS2-Spektren aus 25 öffentlich-zugänglichen Proteomdatensätzen (Gessulat *et al.* 2019) oder über Spektren synthetisch hergestellter tryptischer Peptide (Tiwary *et al.* 2019) mit über 20 Millionen MS2-Spektren der ProteomeTools *synthetic peptide library* (Zolg *et al.* 2017) trainiert. Vor allem die Vorhersage der Intensität der Fragment-Ionen im MS2-Spektrum führte bereits zu einer erhöhten Zuverlässigkeit in der Identifizierung des entsprechenden Peptids. Mit Hilfe dieser Information konnte die Identifizierungsrate in DDA-basierten *Proteomics* erhöht oder verbesserte *spectral*

libraries für die DIA-basierte Analyse angelegt werden. Limitierungen liegen bislang in dem Training ausschließlich mit tryptischen Peptiden, wobei eine Ausweitung auf weitere Verdauenzymen laut Gessulat *et al.* kein Problem darstellen würde. Die Algorithmen wurden außerdem mit Orbitrap-MS-Daten trainiert, so dass eine höhere Genauigkeit für Daten dieses Instrumententyps vorliegt. Da in dieser Arbeit an mehreren Stellen die Bedeutung der Analyse von modifizierten Peptiden hervorgehoben wurde, wäre eine Einbeziehung der bisher noch nicht verwendeten modifizierten Peptide in das Training der Algorithmen essenziell für eine zukünftige Anwendung.

Eine weitere Methode mit deutlicher Zukunftsperspektive für *Proteomics* ist die Verwendung von *Nanopore sequencing*. Dabei werden einzeln Aminosäuren durch ein Membrantransporter-Protein, der „Nanopore“, geleitet. Die Nanopore ist in einer Lipiddoppelschicht lokalisiert, an die ein Strom auf einer Seite der Doppelschicht angelegt wird. Jede einzelne AS, die durch die Nanopore wandert, erzeugt eine Blockade im Strom. Über die Messung des sogenannten „*residual currents*“, der trotz Blockade verbleibt und *unique* für 13 von 20 Aminosäuren ist, kann mit hoher Zuverlässigkeit die Aminosäure bestimmt werden. Die weitere Identifizierung von Methionin und Tyrosin wäre nach chemischer Modifizierung möglich. Die potentiellen Vorteile dieser Methoden bestehen in der geringen benötigten Probenmenge, der schnellen, robusten Analyse. Außerdem wird nur eine kleine benötigte Grundfläche für das Gerät benötigt, da dieses die Größe eines gewöhnlichen *Universal Serial Bus* (USB)-Sticks hat. Limitierungen sind in der Notwendigkeit eines polykationischen Carriers zu sehen, welcher aus sieben Argininen besteht und zum Durchschleusen durch die Pore benötigt wird. In Zukunft werden Methoden angestrebt, für die zunächst eine Befestigung des Proteins oder Peptids am Terminus nahe der Pore erfolgt, gefolgt von einem Schneiden der terminalen Aminosäure und einem erneuten Verankern und enzymatischen Anhängen des Carriers mit anschließender Sequenzierung. Es werden keine Beschränkungen in Komplexität oder sterischer Interaktionen und außerdem einen hohen dynamischen Bereich beschrieben (Ouldali *et al.* 2020). Trotz des hohen Potentials der Methodik für die Protein-Analytik wurden viele, für die *Proteomics*-Forschung wichtige Aspekte, wie die Probenvorbereitung, der Durchsatz und die Quantifizierung noch nicht beschrieben.

Die Entwicklung von *machine* oder *deep learning*-Algorithmen für die Datengenerierung und Verarbeitung in der Proteomforschung nimmt immer weiter zu (Wen *et al.* 2020). In Zukunft wird ein hohes Potential in der Anwendung von *Convolutional Neural Networks* (CNNs)-basierten Methoden zur Identifizierung von Zelllinien- bzw. Prozessoptimierungstargets vermutet. Ein Training der Algorithmen würde dabei anhand von (Proteom-) Daten verschiedener produktivitätssteigernder Bedingungen oder verschiedener Wachstumsraten erfolgen, wofür unter anderem die in dieser Arbeit beschriebenen Daten verwendet werden könnten und so eine zusätzliche Identifikation neuer Targets ermöglicht würde.

6. Anhang

6.1. Weitere Daten

6.1.1. Peptidkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop One

Mitte des Jahres 2019 (ca. 1,5 Jahre nach Beginn der Doktorarbeit) wurde das NanoDrop One Photometer angeschafft und für die Peptidkonzentrationsbestimmung von komplexen Proben getestet. Eine dreifach-Messung einer hoch-komplexen 100 ng/μl HeLa-Standardverdau-Probe, welche frisch aus einem kommerziell erworbenen 20 μg Aliquot resuspendiert wurde, ergab die Messwerte 0,120, 0,117 und 0,124 mg/ml. Im Mittel mit 120 ± 4 ng/μl ergibt sich eine Abweichung von 20 % zu den Herstellerangaben, die zum Teil durch das Resuspendieren des lyophilisierten Pellets zustande gekommen ist. Die hohe Reproduzierbarkeit der technischen Replikate lässt hingegen auf eine zuverlässige Messmethode schließen. Auch die Messung von weniger komplexen Proben wurde über die Messung von Cytochrom c in zwei verschiedenen für die nLC-MS/MS-Messung relevanten Konzentrationen getestet. Eine 8 pmol/μl Stammlösung entspricht einer theoretischen Konzentration von 0,096 mg/ml, wobei Messungen jeweils 0,084 mg/ml und 0,083 mg/ml ergaben. Eine 0,5 pmol/μl Cytochrom c Lösung entspricht einer Konzentration 0,006 mg/ml, welche zum Absättigen neuer Vor- oder Hauptsäulen durch Injektion von 2 pmol, also mit 4 μl Injektionsvolumen, verwendet wurde. Die Konzentrationsmessung ergab die Werte 0,0004 mg/ml und -0,0002 mg/ml. Es wird vermutet, dass die vorliegende Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze der Methodik lag. Außerdem wurde eine CHO-Peptidprobe, welche zuvor für zwei Wochen bei 4 °C gelagert wurde, getestet. Eine unverdünnte Messung ergab eine Konzentration von 6,735 mg/ml, eine 1:2-Verdünnung ergab 2,759 mg/ml, eine 1:5-Verdünnung 1,499 mg/ml und eine abschließende 1:10-Verdünnung ergab eine Konzentration von 1,153 mg/ml. Da die Verdünnungen in einem geringen Maßstab von nur 10 μl angesetzt wurden, kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Pipettierfehler nicht ausgeschlossen werden. Generell ergeben sich jedoch vertrauenswürdige Ergebnisse, so dass diese Methodik für die Injektion normalisierter Peptidmengen für vergleichbare Ergebnisse der nLC-MS/MS-Strecke verwendet wurde.

6.1.2. PRIDE-Datensicherung und Veröffentlichung

Teile der für die Arbeit verwendeten nLC-MS-Daten wurden innerhalb der einzelnen Projekte über ProteomeXChange in der *Proteomics Identifications Database* (PRIDE) zur Speicherung hochgeladen. Nach akzeptierter Publikation der Daten wurden/werden die Daten veröffentlicht.

- PXD010537 Phospho and expression proteomics in chinese hamster ovary cells
- PXD018439 Time-resolved proteomic profiling for CHO-K1 fedbatch cultivations
- PXD018444 TECAN Resolvex A200 positive pressure workstation for semi-automated peptide purification of complex proteomic samples

6.2. Weitere Abbildung und Tabellen

6.2.1. Probenvorbereitung



Abbildung 39 Umgebaute *funnel*-Konstruktion der Firma Spectrograph LL für eine duale ESI/MALDI-Quelle der Q Exactive Plus Orbitrap-MS am CeBiTec in Bielefeld.

6.2.2. CHO-XL99

6.2.2.1. IGF-Induktion

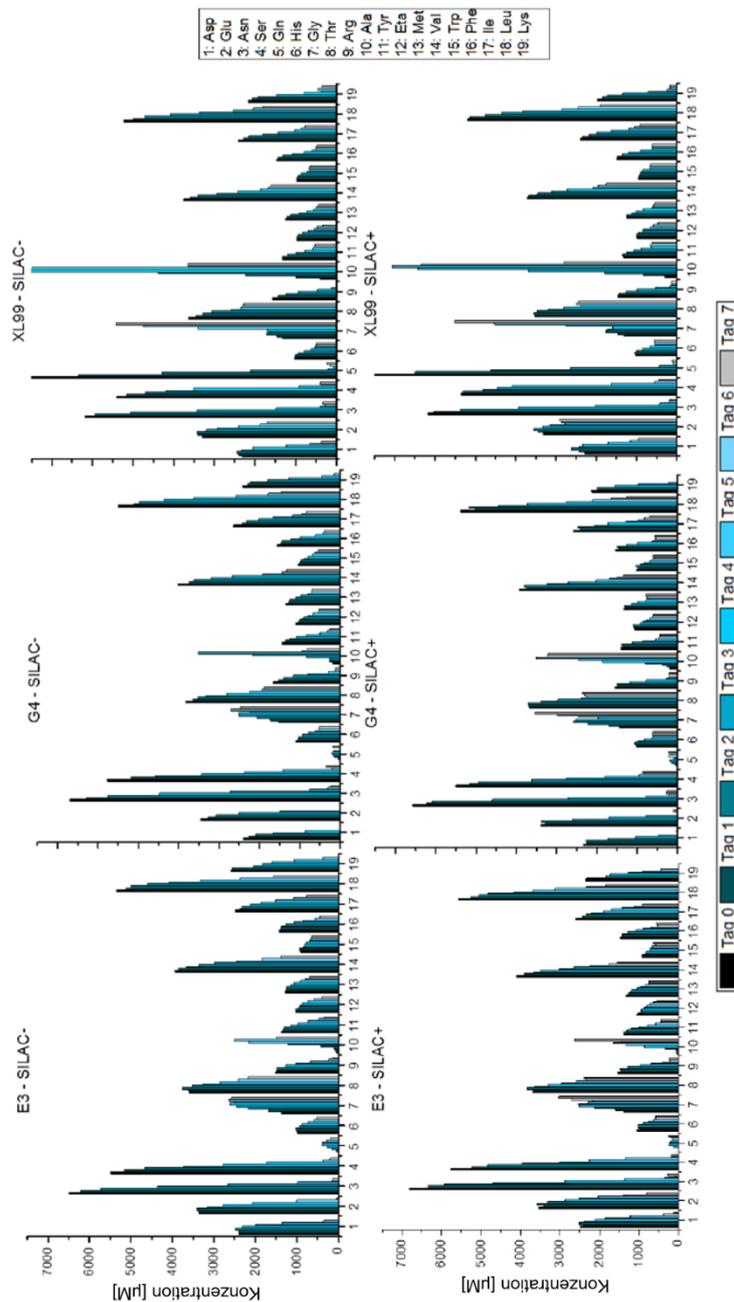


Abbildung 40 Aminosäurekonzentrationen [µM] für die drei Zelllinien E3, G4 und XL99 in dem Medium SILAC- (Kontrolle, oben) und SILAC+ (IGF-induziert, unten) über den Kultivierungszeitraum von 7 bzw. 8 Tagen. Für XL99+/- und E3- wurden jeweils zwei biologische Replikate gemittelt, für E3+ und G4+/- jeweils nur zwei. Die Zahlen der x-Achse stehen für die jeweils gemessenen Aminosäuren, wobei 1: Asp (Asparaginsäure), 2: Glu (Glutaminsäure), 3: Asn (Asparagin), 4: Ser (Serin), 5: Gln (Glutamin), 6: His (Histidin), 7: Gly (Glycin), 8: Thr (Threonin), 9: Arg (Arginin), 10: Ala (Alanin), 11: Tyr (Tyrosin), 12: Eta (Ethanolamin), 13: Met (Methionin), 14: Val (Valin), 15: Trp (Tryptophan), 16: Phe (Phenylalanin), 17: Ile (Isoleucin), 18: Leu (Leucin) und 19: Lys (Lysin). (siehe 4.2.2.1).

6.2.2.2. Proteomvergleich in Gln-haltigem und Gln-freiem Medium

Tabelle 20 Dreifaches „mini“ SILAC-Experiment von mAb-CHO-G4-Zellen zur Proteomcharakterisierung in Medium mit (*medium*) und ohne Glutamin (*heavy, light*). Überlapp an signifikant Gln-abhängig exprimierten Proteinen (Einstichproben t-Test, *p-value* < 0,01, S0:0,1) für die technischen Replikate (M/L und M/H) vor IGF-Induktion an Tag 3.

		+/- Gln	-/- Gln	+/- Gln
Genname	UniProt	Log₂ Ratio M/L	Log₂ Ratio H/L	Log₂ Ratio M/H
Glul	G3HG36	-1,50	0,12	-1,47
Ctsb	G3H0L9	-0,42	-0,02	-0,37
Ahnak	A0A061I743	-0,39	-0,07	-0,23
Cat	G3GYY6	-0,37	-0,05	-0,26
Gstm5	G3ILF1	-0,35	-0,02	-0,30
Galm	G3HSZ6	-0,35	0,04	-0,25
Gstp1	G3I3Y6	-0,31	-0,02	-0,26
Prdx1	G3GYP9	-0,30	-0,05	-0,28
Sprr1a	A0A061IKQ2	-0,29	0,05	-0,36
Ahnak	E9Q616	-0,27	-0,05	-0,27
G6pdx	G4Y369	-0,24	-0,05	-0,15
Stmn1	Q9DCP3	-0,23	0,05	-0,18
Tes	G3H9I6	-0,22	-0,03	-0,14
Pcna	G3H412	-0,21	0,00	-0,16
S100a6	Q545I9	-0,18	0,02	-0,22
Rad23a	Q3TJ52	-0,11	0,07	-0,14
Ptma	Q3U6E4	-0,09	-0,04	-0,06
Rars	G3GW47	-0,08	0,06	-0,09
Prdx2	G3HCW9	-0,07	0,01	-0,10
Ran	Q3ULW0	0,04	-0,02	0,06
Eef1a1	Q58E64	0,07	-0,01	0,10
Capzb	Q923G3	0,07	0,09	0,06
Cct8	Q3UL22	0,09	-0,07	0,15
Ppp2r2a	Q9CWU3	0,09	-0,13	0,14
Cct8	A0A061IBK9	0,10	-0,09	0,18
Impdh2	A0A061I4E3	0,12	0,02	0,11
Acat3	G3HGP4	0,15	0,01	0,15
Pcbp1	G3HXL1	0,16	0,10	0,08
Psmc1	Q542I9	0,16	-0,01	0,19
Api5	Q3UYQ4	0,18	-0,07	0,34
Ubap2l	A0A0H2UH17	0,23	0,01	0,20
Ahcy1l	A0A061IMQ1	0,28	0,00	0,33
Hmgcs1	G3HMY0	0,31	0,05	0,31
Hspb1	Q545F4	0,32	-0,01	0,30
Hspb1	A0A061I4R8	0,41	0,03	0,40
Top2a	G3I5N5	0,47	-0,01	0,48

6.2.2.3. Carnosin-Induktion

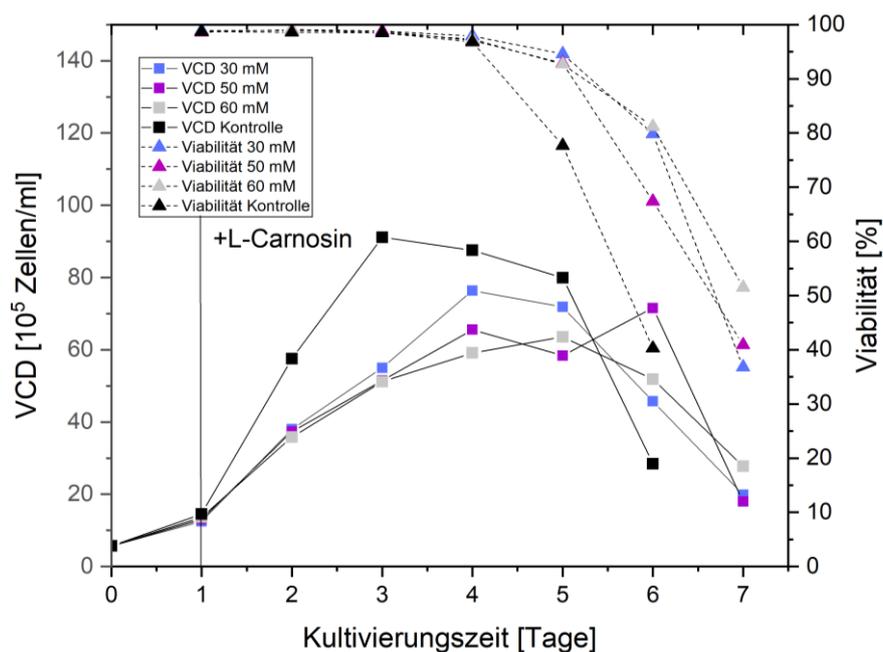


Abbildung 41 Experiment zur Evaluierung einer L-Carnosin-Induktion mit höheren Konzentrationen (30, 50 und 60 mM) in der frühen exponentiellen Phase von CHO-G4-Zellen.

Tabelle 21 LFQ-basierte Proteomanalyse einer 20 mM L-Carnosin-Induktion in der exponentiellen Phase (Tag 2) von XL99-CHO-Zellen. Die \log_2 -Ratios wurden als median von drei biologischen Replikaten für die Zeitpunkte 1, 2, 4 und 24 h nach Induktion zu vor Induktion (0 h) berechnet.

Genname	Proteinname	UniProt	XL99 \log_2 1/0	XL99 \log_2 2/0	XL99 \log_2 4/0	XL99 \log_2 24/0	Bereich	Cluster
Dpp3	Dipeptidyl peptidase 3	G3I2H0	-0.04	-0.83	-0.70	-0.87	Proteolyse, Cytosol	d
Rbm8a	RNA-binding protein 8A	G3H2S5	-0.69	-0.92	NaN	-0.81	Spliceosom, RNA- Bindung	d
Tbca	Tubulin-specific chaperone A	G3H319	0.03	NaN	NaN	-0.78	Tubulin-Faltung	d
H2A	Histone H2A	G3H2T7	-0.46	-0.75	-0.55	-0.50	Chromatin- Organisation, Silencing	d
Eef1a1	Elongation factor 1-alpha	Q58E64	-0.36	-0.16	-0.33	-0.39	Translation	d
Fh	Fumarate hydratase, mitochondrial	G3H6M5	-0.40	-0.55	-0.76	-0.36	TCA	c
Hspb1	Heat shock protein Hsp20 containing protein	A0A06114 R8	-0.18	-0.27	-0.16	-0.32	Proteinfaltung	d
Sdhaf2	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial	G3IER1	0.34	-0.18	-0.44	-0.32	TCA	d
Srsf2	Serine/arginine- rich splicing factor 2	Q8C671	0.29	0.15	0.52	-0.28	Spliceosom	b
Hspb1	Heat shock protein beta-1	Q545F4	-0.11	-0.24	-0.25	-0.25	Proteinfaltung	d
Pfn2	Profilin	G3IA72	0.05	0.01	0.01	-0.25	Cytoskell- Organisation	b

Ttl12	<i>Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12</i>	G3HXU0	-0.11	-0.10	-0.28	-0.25	Tubulin-Bindung, Histon-Bindung	d
Snrnp200	<i>U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase</i>	G3H037	0.04	-0.07	-0.20	-0.25	Spliceosom	d
Ywhaz	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	G3HKZ1	-0.27	-0.45	-0.18	-0.21	Signaltransduktion	d
Tyms	<i>Thymidylate synthase</i>	G3IFY1	0.05	-0.13	-0.22	-0.19	Mitochondriale dTTP-Biosynthese	d
Kars	<i>Lysine--tRNA ligase</i>	G3I4N3	-0.25	-0.21	-0.25	-0.18	Translation, Aktivierung MAPK	c
Acadl	<i>Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	A0A0611JV6	0.03	0.07	0.26	-0.16	Mitochondriale Dehydrogenase, Carnitin-Metabolismus	b
Eif4g2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>	A0JNY7	0.40	0.39	0.34	-0.15	Translation	b
Dbn1	<i>Drebrin-like protein</i>	A0A0611EF1	-0.26	-0.44	-0.43	-0.12	Cytoskellat-Organisation	c
Fau	<i>40S ribosomal protein S30</i>	Q642K5	0.19	0.37	0.50	-0.08	Translation	b
Ddx17	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17</i>	Q3U741	-0.33	-0.34	-0.10	-0.06	DNA-Replikation, Transkription, Translation, Silencing, miRNA/piRNA	c
Cdc37	<i>Hsp90 chaperone protein kinase-targeting subunit</i>	G3H6C5	-0.13	-0.11	-0.17	-0.03	Co-Chaperon, UPR	c
Gstp1	<i>Glutathione S-transferase P</i>	G3I3Y6	0.00	-0.26	-0.50	0.03	Glutathion-Metabolismus	c
Psm6	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</i>	G3HIS0	-0.15	-0.07	-0.38	0.04	Proteasome, Singaling	c
Dctpp1	<i>dCTP pyrophosphatase 1</i>	A0A06118E5	-0.10	-0.42	-0.58	0.06	DNA-Schutz	c
Serpinh1	<i>Serpin H1</i>	G3IDD4	-0.20	-0.28	-0.54	0.10	Collagen-Bindung, Chaperon	c
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	G3GRE4	0.15	0.26	0.55	0.12	Proteinfaltung	a
Set	<i>Protein SET</i>	A2BE93	0.19	0.54	0.46	0.19	Histon-Bindung	a
Eprs1	<i>Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase</i>	G3GRE1	-0.26	-0.13	-0.14	0.21	Translation, mTOR-Signaling	c
Nop2	<i>Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2</i>	G3GUM9	0.12	0.38	0.24	0.22	RNA-Methylierung	a
Nolc1	<i>Nucleolar phosphoprotein p130</i>	G3HXV5	0.18	0.19	0.51	0.22	Translation	a
Dhx9	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	A0A087WPL5	0.08	0.44	0.09	0.28	DNA-Replikation, Transkription, Translation, Silencing	a
Hsd17b10	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	G3H7U0	0.19	0.07	0.25	0.30	Mitochondriale Dehydrogenase	a
Rpl36a	<i>60S ribosomal protein L36a</i>	Q5M9P1	0.10	0.31	0.67	0.34	Translation	a
Khsrp	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	G3HCK9	-0.23	-0.11	0.20	0.36	mRNA-Transport	a

Tardbp	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>	Q544R5	0.06	0.28	0.45	0.45	Splicing, RNA-Bindung	a
Prdx5	<i>Peroxiredoxin-5</i>	G3I887	0.90	0.66	0.47	0.57	ROS-Signaling	a
Tceb1 oder Eloc	<i>Elongin-C</i>	A0A087WQE6	0.41	0.35	0.46	0.59	Transkriptionsfaktor, Ubiquitylierung	a
Blvrb	<i>Flavin reductase (NADPH)</i>	Q3U6G1	0.95	0.57	0.72	0.66	Oxidoreduktase	a
Chtop	<i>Chromatin target of PRMT1 protein</i>	D3YZA1	0.06	0.21	0.47	0.66	Methylosom-Complex, Histon-Methylierung	a
Psat1	<i>Phosphoserine aminotransferase</i>	Q543K5	0.47	0.37	NaN	0.67	Serin-Biosynthese	a
Psph	<i>O-phosphoserine phosphohydrolase</i>	G3I2M2	NaN	0.31	0.39	0.78	Serin-Biosynthese	a

6.2.3. CHO-K1

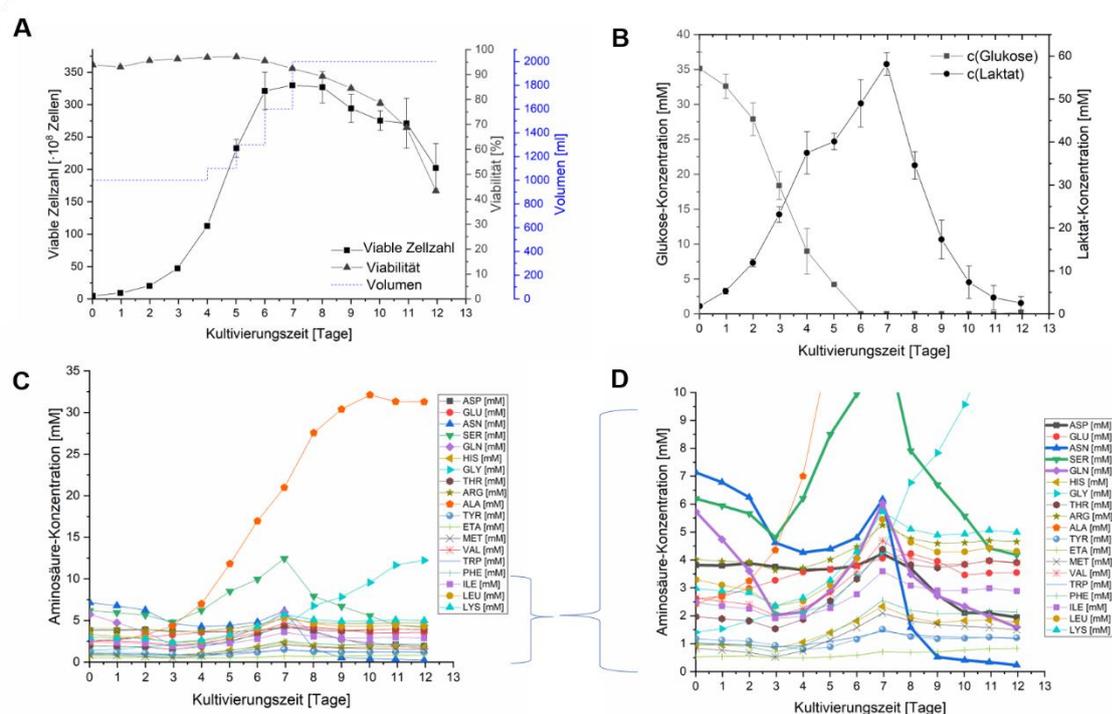


Abbildung 42 Die CHO-K1 *fedbatch*-Kultivierungsdaten und Metabolit-Analysen. **A)** Auftragung der viablen Zellzahl und des Reaktorvolumens gegen die Kultivierungszeit, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung der drei biologischen Replikate. **B)** Darstellung der Glukose- und Laktatkonzentration gegen die Kultivierungszeit, ebenfalls als Mittelwert mit Standardabweichung. **C)** Die Konzentrationen von 18 Aminosäuren und Ethanolamin aufgetragen gegen die Kultivierungszeit, dargestellt als Mittelwert. **D)** Vergrößerter Bildausschnitt von C) auf eine Skalierung der Aminosäurekonzentrationen von 0-10 mM.

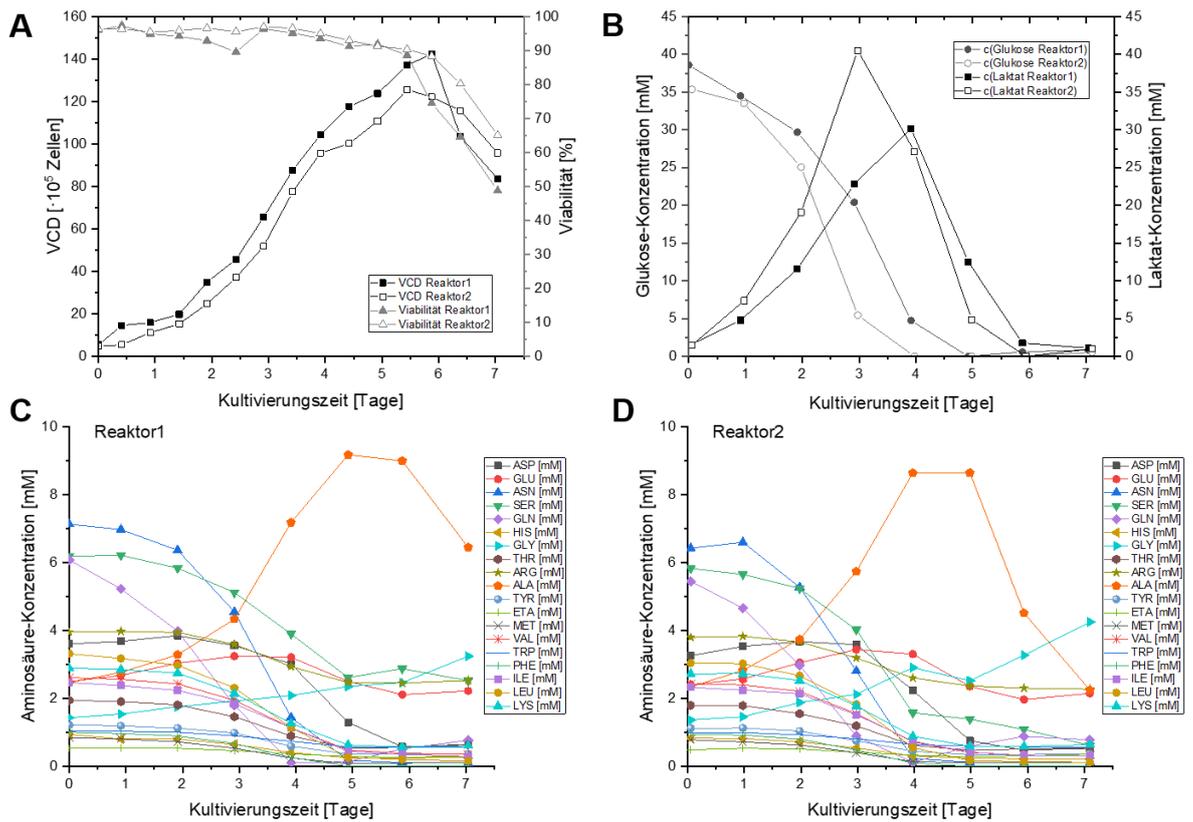


Abbildung 43 Die CHO-K1 *batch*-Kultivierungsdaten und Metabolit-Analysen. **A**) Auftragung der viablen Zelldichte (VCD) gegen die Kultivierungszeit, dargestellt für die beiden biologischen Replikate. **B**) Darstellung der Glukose- und Laktatkonzentration gegen die Kultivierungszeit für die beiden Replikate. **C**) Die Konzentrationen von 18 Aminosäuren und Ethanolamin aufgetragen gegen die Kultivierungszeit für Reaktor 1 und **D**) für Reaktor 2.

Abkürzungsverzeichnisse

Tabelle 22 Abkürzung und Gruppierung der Aminosäuren. Außerdem wurde vermerkt, welche Aminosäuren in der Kultivierungsanalytik enthalten waren.

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	Gruppe	Kultivierungsanalytik
Glycin	G	GLY	Unpolar	Ja
Alanin	A	ALA	Unpolar	Ja
Valin	V	VAL	Unpolar	Ja
Leucin	L	LEU	Unpolar	Ja
Isoleucin	I	ILE	Unpolar	Ja
Cystein	C	CYS	Unpolar	Nein
Methionin	M	MET	Unpolar	Ja
Phenylalanin	F	PHE	Unpolar	Ja
Tryptophan	W	TRP	Unpolar	Ja
Prolin	P	PRO	Unpolar	Nein
Serin	S	SER	Polar	Ja
Threonin	T	THR	Polar	Ja
Tyrosin	Y	TYR	Polar	Ja
Asparagin	N	ASN	Polar	Ja
Glutamin	Q	GLN	Polar	Ja
Glutamat	E	GLU	Geladen	Ja
Aspartat	D	ASP	Geladen	Ja
Histidin	H	HIS	Geladen	Ja
Lysin	K	LYS	Geladen	Ja
Arginin	R	ARG	Geladen	Ja

Tabelle 23 Allgemeines Abkürzungsverzeichnis.

Beschreibung	Abkürzung	Beschreibung Teil 2	Abkürzung Teil 2
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	<i>Knock-out</i>	KO
2-Chloracetamid	CAA	Kohlenstoffdioxid	CO ₂
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat	CHAPS	Komplex 1 und Komplex 2 von mTOR	mTOR-C1, -C2
3-Methyl Adenine	3-MA	Kupfer	Cu ²⁺
5-Phenylvaleric Acid	5-PVA	<i>Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes</i>	KEGG
Acetonitril	ACN	Label-Free Quantification	LFQ
Adenosindiphosphat	ADP	Laktat Dehydrogenase A	LDHA
Adenosinmonophosphat	AMP	<i>La-Related Protein 1</i>	LARP
Adenosintriphosphat	ATP	Lebendzellichte, Viable Cell Density	X, VCD
<i>Advanced Glycation End products</i>	AGE	<i>Light</i>	L
Akt-Substrat	AS160, TBC1D4	Linksdrehend	L
Ameisensäure	FA	<i>Liquid Chromatography</i>	LC
Amino	N	L-Methioninsulfoximin	MSX
<i>Amino Acid Response</i>	AAR	<i>L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate H₂O</i>	MRFA
Ammoniak	NH ₄ OH	<i>Low-Throughput-Paper</i>	LTP
AMP-Activated Protein Kinase	AMPK	<i>Lyso-Phosphatidic Acid</i>	LPA
AMPK-Liver Kinase B1	LKB1	<i>Lysosome-Associated Membrane glycoprotein 2</i>	LAMP2
<i>Analysis Of Variance</i>	ANOVA	Malat-Dehydrogenase II	MDH2

Anzahl	#	Mammalian Lethal with Sec-13 protein 8	mLST8
Arbeitsgruppe	AG	Mammalian Target Of Rapamycin	mTOR
Asparagin Synthetase	ASNS	Mannose 6-Phosphat	M6P
<i>Atmospheric Pressure Ion source</i>	API	Mascot <i>generic file</i>	MGF
<i>Aurin Tricarboxylic Acid</i>	ATA	Massachusetts	MA
<i>Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology</i>	AIBN	Massenspektrometrie	MS
<i>Automatic Gain Control</i>	AGC	<i>Match Between Run</i>	MBR
<i>B-cell lymphoma-extra large</i>	Bcl-XI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>	MALDI
Bicinchoninsäure-Assay	BCA	<i>Medium</i>	M
<i>Biological Process</i>	BP	Membran-Organell	MO
BIP <i>Inducer X</i>	BIX	<i>Messenger RNA</i>	mRNA
<i>Bovine Serum Albumin</i>	BSA	Messung Fragmentionen	MS2, MS/MS
Buthioninsulfoximin	BSO	Messung intakter <i>precursor</i>	MS1
Calnexin	CNX	<i>Metal Oxide Affinity Chromatography</i>	MOAC
Calreticulin	CRT	Methylierung	me1
Carboxy-Terminus	C	<i>Microtubule-Associated Protein 1B</i>	MAP1B
Catalase	CAT	Mirco RNA	miRNA
<i>Catalytic GCL</i>	GCLc	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	MAPK, ERK
<i>Center for Biotechnology</i>	CeBiTec	<i>Modifier GCL</i>	GLCm
<i>Chemical Compartment</i>	CC	Modifiziertes Silica-Gel mit Octadecan Kohlenwasserstoff	C18
Chemisch-Definiertes Medium	CDM	Molar	M
<i>Chinese Hamster Ovary</i>	CHO	Molekulargewicht	MW
CHO-Zelllinie namens DG44	CHO-DG44	Monoklonaler Antikörper	mAb
CHO-Zelllinie namens DP12	CHO-DP12	Mucin1-IgG-Fusionsprotein produzierenden CHO-Zelllinie	MUC1-CHO
CHO-Zelllinie namens E3 (XL99)	CHO-E3	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	MRM
CHO-Zelllinie namens G4 (XL99)	CHO-G4	Mus musculus	M. musculus
CHO-Zelllinie namens K1 (parental)	CHO-K1	<i>NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1</i>	SIRT1
CHO-Zelllinie namens PGC (XL99)	CHO-PGC	NanoLC	nLC
CHO-Zelllinie namens S	CHO-S	Narrow Bore Extraction™	NBE
CHO-Zelllinie namens XL99 (parental)	CHO-XL99	Natriumchlorid	NaCl
<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>	ChIP	Natriumdesoxycholat	SDC, DOC
<i>Clathrin-Mediated Endocytosis</i>	CME	Natriumfluorid	NaF
<i>Clonally-Derived Cell Lines</i>	CDCL	New York	NY
<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	CRISPR	Nicht-Linear	NL
<i>COat Protein complex II</i>	COPII	<i>Non-coding RNA</i>	ncRNA
Coenzym A	CoA	<i>Nonidet P-40</i>	NP40
<i>Corona Virus Disease 2019</i>	COVID-19	<i>NUAK family SNF1-like kinase 1</i>	NUAK1
<i>Cricetulus griseus</i>	<i>C. griseus</i>	<i>Nuclear Factor κB</i>	NF-κB
<i>Cyclic AMP-dependent Transcription Factor</i>	ATF	Osmotische Konzentration	Osmol
<i>Cyclic AMP-dependent Transcription Factor 2</i>	ATF2, CREB2	Oxidierter dimerer GSH	GSSG
<i>Cyclic AMP-Responsive Element-Binding protein</i>	CREB	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>	PRM
<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>	CDK	<i>Peptide Spectrum Match</i>	PSM

Cytosin und Guanin di-Nukleotid	CpG	Peptidyl-Prolyl Isomerasen	PPlase
Cytoskelett	CSK	Pg/Zelle/Tag, pg/cell/day	pcd
Cytosolische <i>non-specific</i> Dipeptidase	CNDP2	Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF
Dalton	Da	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	PBS
<i>Data-Dependent Acquisition</i>	DDA	Phosphoinositol 3-Kinase	PI3K
<i>Data-Independent Acquisition</i>	DIA	Phosphopeptid	PP
Datenbank	DB	Phosphorylierung	p
<i>De Novo</i> Methyltransferase	DNMT	Phosphoserin Aminotransferase	PSAT1
<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	DNA	Phosphoserin Phosphatase	PSPH
<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>	DEPTOR	PhosphoSitePlus	PSP
Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie	DGMS	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	PIPES
<i>Dexter-Zuckerstruktur</i>	D	<i>Pleckstrin-like domain-containing family G member 6</i>	PLEKHG6
Differentielle Detergens Fraktionierung	DDF	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	PAGE
Dihydrofolatreduktase	DHFR	<i>Polyadenylate-Binding Protein</i>	PABP
Dimethylsulfoxid	DMSO	Post-translationale Modifikation	PTM
Dimethylierung	me2	<i>Probability of type I error</i>	p-value
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Phosphorylierung	P
<i>Dipeptidyl Peptidase 3</i>	DPP3	<i>Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa</i>	PRAS40
<i>Dissolved Oxygen Tension</i>	DOT	<i>Proline-rich Receptor-like Kinase</i>	PERK
Dithiothreitol	DTT	Protein Disulfid-Isomerase	PDI
<i>DNA replication licensing factors</i>	MCM	Protein Kinase B	PKB, Akt
<i>Downstream Process</i>	DSP	<i>Protein Observed with rictor 1/2</i>	PROTOR1/2
Downstream Processing	DSP	ProteomeDiscoverer	PD
<i>Dual specificity Tyrosine-phosphorylation-Regulated Kinase 3</i>	DYRK3	Pyruvat Dehydrogenase Kinase	PDK, PDHK
EIF4E-Binding Protein 1	4E-BP1	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex	PDC
Eisen-Nitriloessigsäure	Fe-NTA	Pyruvate Dehydrogenase E1 component subunit Alpha	PDHA1
<i>Electro Spray Ionisation</i>	ESI	<i>RA Responsive Element</i>	RARE
<i>Emergency Use Authorization</i>	EUA	RA Rezeptoren	RAR
Endonuklease	Cas9	<i>Radio-Immune Precipitation Assay</i>	RIPA
Endoplasmatischen Reticulum	ER	<i>Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR</i>	RICTOR
<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP, Binding Immunoglobulin Protein, Glucose-Regulated Protein 78</i>	BIP, HSPA5, GRP78	<i>Rapid Communications in Mass Spectrometr</i>	RCM
Erdanziehung	g	<i>Rapid Separation LC</i>	RSLC
<i>Error-Tolerant</i>	ET	Ras and rab Interactor 2	RIN2
Erythropoetin	EPO	Raumtemperatur	RT
<i>Et alii, et aliae oder et alia</i>	<i>et al.</i>	<i>Reactive Carbonyl Species</i>	RCS
Ethanolamin	ETA	<i>Reactive Oxygen Species</i>	ROS
Ethylendiamin-Tetraessigsäure	EDTA	<i>Receptor Tyosine Kinase</i>	RTK
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	EGTA	Regulatory-Associated Protein of mammalian Target Of Rapamycin	RAPTOR
<i>Ettan DIGE Imager</i>	EDI	<i>Retinoic Acid</i>	RA
<i>Eukaryotic translation initiation factor</i>	eIF	<i>Retionic X Rezeptoren</i>	RXR
European Medicines Agency	EMA	<i>Reversed Phase</i>	RP

<i>European Society of Animal Cell Technology</i>	ESACT	Ribonucleic Acid	RNA
<i>Extracellular Matrix, Extrazelluläre Matrix</i>	ECM	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>	S6K1
<i>Extracellular signal-Regulated Kinase, Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	ERK, MAPK	<i>Rounds per minute</i>	rpm
Extraktion von Zellkernen und Lyse	KEL	Ruhephase Zellzyklus	G0
<i>False Discovery Rate</i>	FDR	Salzsäure	HCl
<i>Fetal Calf Serum</i>	FCS	Sauerstoffpartialdruck	pO ₂
<i>Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry</i>	FAMIS	<i>Scalable Vector Graphics</i>	SVG
<i>Filter-Aided Sample Preparation</i>	FASP	<i>Selected Reaction Monitoring</i>	SRM
<i>FK506-Binding Proteins</i>	FKBP	<i>Sequential Elution from IMAC</i>	SIMAC
<i>Fold Change</i>	FC	<i>Sequential Elution from MOAC</i>	SMOAC
<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>	FSH	<i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical spectra</i>	SWATH
<i>Food and Drug Administration</i>	FDA	Serin/Threonin Kinase	STK
<i>Fourier Transform ion cyclotron</i>	FT	Serin/Threonin Kinase IRE1	ERN1
Gap-1-Phase des Zellzyklus	G1	<i>Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease</i>	IRE
<i>Gas Chromatography</i>	GC	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>	STAT
<i>Gene Of Interest</i>	GOI	Signifikanzwert	p-value
<i>Gene Ontology</i>	GO	<i>Simple and Integrated Spintip-based Proteomics Technology</i>	SISPROT
<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>	GSEA	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	SNP
Glukose Transporter	GLUT	<i>Small Molecule Inhibitor</i>	SMI
<i>Glutamate-Cysteine Ligase</i>	GCL	Small-interfering RNA	siRNA
Glutamin Synthetase	GS, GLS, GLUL	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	SDS
Glutathion	GSH	<i>Solid Phase Extraction</i>	SPE
Glutathion S-Transferase A1	GSTA1	Spezifische	
Glutathione S-Transferase Mu 5	GSTM5	Wachstumsgeschwindigkeit	μ
Glutathione S-Transferase P1	GSTP1	Splicing-Faktoren	SF
<i>Glutathione Synthase</i>	GSS	<i>Src Homology and Collagen</i>	SHC
Glycin-Glycin	GG	<i>Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture</i>	SILAC
Glycogen Synthase Kinase-3 beta	SK3β	Standardabweichung	SD
<i>G-Protein-Coupled Receptors</i>	GPCR	Standardisierung	z
Gramm	g	Stathmin	STMN
Guanidinhydrochlorid	GdmCl	<i>Stress-activated MAPK-Interacting protein</i>	SIN1
Guanosintriphosphat	GTP	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>	SAPK
<i>Harvested Cell Culture Fluid</i>	HCCF	<i>Strong Cation eXchange chromatography</i>	SCX
Hauptkomponentenanalyse	PCA	Synthese-Phase des Zellzyklus	S-Phase
<i>Heavy</i>	<i>H</i>	<i>Tandem Mass Tag</i>	TMT
<i>Hedgehog Pathway Inhibitor 4</i>	HPI4	TBS-Tween	TBS-T
Heterochromatin Protein 1	CBX3, HPIy	<i>TELO2-interacting protein 1 homolog</i>	TTI1
<i>Hexamethylene Bis(Acetamide)</i>	HMBA	<i>Telomere Maintenance 2</i>	TEL2
<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	HPLC	<i>Time-Of-Flight</i>	TOF
<i>Highger energy C-trap Dissociation</i>	HCD	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>	tPA
<i>High-pH</i>	HpH	Titandioxid	TiO ₂
		<i>Total Ion Chromatogramm</i>	TIC

<i>High-Throughput-Paper</i>	HTP	<i>Transcription Intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28, TIF1B, KAP1
Histon 1, 2, 3, 4	H1, H2, H3, H4	<i>Transcriptional repressor protein lin-54 homolog</i>	LIN54
Histon Acetyltransferasen	HAT	<i>Transfer RNA</i>	tRNA
Histon Methyltransferasen	HMT	<i>Transforming Growth Factor β</i>	TGF- β
Histondeacetylasen	HDAC	<i>Translated EMBL</i>	TrEMBL
<i>Host Cell Protein</i>	HCP	Tricarbonsäurezyklus	TCA
<i>Human Embryonic Kidney 293</i>	HEK293	Triethylamin	TEA
<i>Human Proteome Organization</i>	HUPO	Trifluoressigsäure	TFA
<i>Human secreted alkaline</i>	SEAP	Trifluorethanol	TFE
<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>	HILIC	Trimethylierung	me3
Hydroxy-Gruppe	O	Tris(2-carboxyethyl)phosphin	TCEP
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	HMGCS1	Tris-Buffered Saline	TBS
<i>Hyper Reaction Monitoring</i>	HRM	Tris-EDTA	TE
<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>	HYOU1; GRP170	tRNA-Ligasen	ARS
<i>Hypoxia-Indicible Factor 1</i>	HIF1	<i>Two Dimensional-Differential In Gel Electrophoresis</i>	2D-DIGE
Identifizierung	ID	<i>Ubiquitous Chromatin Opening Elements</i>	UCOE
<i>IGF Binding Proteins</i>	IGFBPs	UHPLC	Ultra HPLC
IGF-1 Rezeptor	IGF-1R	Ultra-HPLC	UHPLC
immobilisierter pH-Gradienten	IPG	Ultraviolett	UV
<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>	IMAC	<i>Unfolded-Protein Response</i>	UPR
Immunglobulin	Ig	<i>UniProt KnowledgeBase</i>	UniProtKB
Immunglobulin G	IgG	Unites States	US
Immunopräzipitation	IP	<i>Universal Protein Resource</i>	UniProt
<i>Inference of Peptidoforms</i>	IPF	<i>Universal Serial Bus</i>	USB
Injektionszeit, <i>Injection Time</i>	IT	Untereinheit	UE
<i>In-Stage Tip</i>	iST	<i>Untranslated Region</i>	UTR
<i>Insulin Receptor Substrates</i>	IRSs	<i>Valosin-Containing Protein</i>	VCP
Insulin Rezeptor	IR	Viable Zelldichte	VCD
<i>Insulin-like Growth Factor</i>	IGF	Volt	V
<i>International Mass Spectrometry Conference</i>	IMSC	Voltstunden	Vh
Iodacetamid	IAA	Volumen	v
<i>Ion Mobility Spectrometry</i>	IMS	<i>Weight</i>	w
<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation</i>	iTRAQ	<i>Whole Cell Lysate</i>	WCL
Isoelektrische Fokussierung	IEF	<i>Without, ohne</i>	w/o
Isoelektrischer Punkt	IEP	<i>Working Cell Bank</i>	WCB
Isotopen Markierung Stickstoff	¹⁵ N	<i>X-box Binding Protein</i>	XBP1
Janus Kinase	JAK	<i>Yeast Extract, Hefeextrakt</i>	YE
<i>Jun-amino-terminal Kinase</i>	JNK	Zellen	Z
Kaliumchlorid	KCl	Zellspezifische Produktbildungsrate	qp
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	<i>Zell-Zeit-Integral, Integral of Viable Cell Density/Concentration</i>	IVCD, IVCC
Kaliumhydroxid	KOH	Zweidimensionale Elektrophorese	2DE

Persönliche Daten

Name **Louise Schelletter, geb. Brachtvogel**
Adresse Brackweder Str. 97, 33335 Gütersloh
Telefon +49 15753314215
E-Mail louise.schelletter@gmail.com
Geburtsort und -Datum 11.05.1992 in Gütersloh/Deutschland
Familienstand Verheiratet
Nationalität Deutsch



Ausbildung

08/2020 - heute Elternzeit
08/2017 - heute **Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotionsstudentin**
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, AG Zellkulturtechnik
02/2017 - 08/2017 **Brückenstipendium Master-Promotion**
Universität Bielefeld, Bielefelder Nachwuchsfond
10/2014 - 01/2017 **Master of Science - Molekulare Biotechnologie**
Universität Bielefeld, 33615 Bielefeld/Deutschland
10/2011 - 09/2014 **Bachelor of Science - Molekulare Biotechnologie**
Universität Bielefeld, 33615 Bielefeld/Deutschland
08/2002 - 07/2011 **Allgemeine Hochschulreife - Abitur**
Anne-Frank Gesamtschule, Gütersloh/Deutschland

Veröffentlichungen als Erstautor

06/2020 Schelletter *et al.* A Positive Pressure Workstation for Semi Automated Peptide Purification of Complex Proteomic Samples. RCM (online ahead of print). doi: 10.1002/rcm.8873.
10/2019 Schelletter *et al.* Clonal variations in CHO IGF-signaling investigated by SILAC-based phosphoproteomics and LFQ-MS. Appl Microbiol Biotechnol. 103 (19), S.8127-8143.
03/2018 Brachtvogel *et al.* MS-SILAC approach for phosphoproteomics of IGF signaling in producer CHO cells. BMC Proc. 2018; 12(Suppl 1): 3.

Vorträge

09/2019 6th CeBiTec retreat, Bad Sassendorf/Deutschland
09/2018 5th CeBiTec retreat, Bad Sassendorf/Deutschland
09/2018 10th Protein rainbow workshop protein mass spectrometry, Düsseldorf/Deutschland
09/2017 4th CeBiTec retreat, Bad Sassendorf/Deutschland

Zusätzliche Publikationen

- 03/2021 Wedde, Severin; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Sproß, Jens; Gröger, Harald: *Adding in vivo Protein Circularization to the Toolbox of Protein Engineering of Oxidoreductases (in preparation)*.
- 03/2021 Romanova, Nadiya; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Noll, Thomas (2020): *Hyperosmolality in CHO Culture: Effects on Proteome*. In: Applied Microbiology and Biotechnology (in preparation).
- 03/2021 Herrmann, Leonie; **Schelleter, Louise**; Hoffrogge, Raimund; Niehaus, Karsten; Rudolph, Volker; Farr, Martin (2020): *Human Coxsackie- and adenovirus receptor is a putative target of neutrophil elastase-mediated shedding*. In: Molecular and Cellular Biochemistry (resubmitted).
- 03/2021 Keysberg, Christoph; Hertel, Oliver; **Schelleter, Louise**; Busche, Tobias; Sorchart, Chiara; Kalinowski, Jörn; Hoffrogge, Raimund; Otte, Kerstin; Noll, Thomas (2021): *Initial Characterization of CHO Exosomes: Evaluating Separation Techniques, Protein and Small ncRNA Content*. In: Applied Microbiology and Biotechnology (accepted).
- 07/2020 Blifernz-Klasse, Olga; Berger, Hanna; Mittmann, Birgit Gerlinde Katharina; Klassen, Viktor; **Schelleter, Louise**; Buchholz, Tatjana; Baier, Thomas; Soleimani, Maryna; Wobbe, Lutz; Kruse, Olaf (2021): *A gene regulatory network for antenna size control in carbon dioxide-deprived Chlamydomonas cells*. In: The Plant Cell, koab012.

Erstautorenschaft von Posterbeiträgen auf öffentlichen Konferenzen

- 03/2020 53. DGMS Jahrestagung, Münster/Deutschland
- 09/2019 18th HUPO World Congress, Adelaide/Australien → **Reisestipendium** der DGPF
- 05/2019 26th European Society of Animal Cell Technology (ESACT) Meeting, Kopenhagen/Dänemark
→ **Stipendium** des ESACT-Komitees
- 03/2019 XIII. Annual congress of the EuPA, Proteomic forum, Potsdam/Deutschland
- 08/2018 22nd International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Florenz/Italien
- 07/2017 9th MaxQuant summer school, Berlin/Deutschland
- 05/2017 25th European Society of Animal Cell Technology (ESACT) Meeting, Lausanne/Schweiz
- 11/2016 Conference on biomolecule analysis, MPI, Münster/Deutschland → **Posterpreis**

Sonstige Qualifikationen

Ersthelfer (spezialisiert auf Laborarbeit)

Erwerb der Sachkunde als Projektleiter bzw. als Beauftragter für biologische Sicherheit gem. § 15 GenTSV

Prüfung der eingeschränkten Sachkunde nach § 5 der Chemikalien-Verbotsordnung von 2003

Prüfung zur Erlangung der grundlegenden Kenntnisse und Fähigkeiten in der tierschutzgerechten wissenschaftlichen Arbeit mit Tieren (nach Vorgaben der FELASE, Kat. B)

MS instrument user meetings: Bruker 2016 and 2017, Thermo Fisher Scientific 2017 and 2018

MS instrument installation training: Thermo Fisher Scientific 2018 and 2019

Teilnahme an de.NBI (German Network for Bioinformatics Infrastructure) Workshops: 2017-2019

Mitgliedschaft in nationalen Proteom- bzw. MS-Gemeinschaften DGPF und DGMS

Wissenschaftliche Hilfskraft von 2015 – 2017 in den Bereichen Proteomics, Zellkulturtechnik und Glykoanalytik

Hobbys: Internationales Vielseitigkeitsreiten, landwirtschaftliche Arbeit

Louise Schelleter

Bielefeld, 12.04.2021

Danksagung

Als aller erstes möchte ich dem deutschen Staat danken, dass ich mich über das Gebühren-freie Studium und Stipendium überhaupt so weit ausbilden konnte, um dann bei Prof. Dr. Noll meine Dissertation anfertigen zu können.

Vielen Dank Thomas für die Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen immer mit dem ‚Ziel‘ im Blick, für die vielen spannenden Konferenzteilnahmen und vieles mehr!

Auch bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Karsten Niehaus für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten, insbesondere aber auch für die Möglichkeit die Orbitrap-Plattform mit etablieren zu dürfen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Raimund Hoffrogge bedanken, der meine Arbeit während der Masterarbeit und Promotion mit unzähligen wertvollen Tipps bereichert und ungelogen hunderte Korrekturen von *Abstracts*, Postern, Vorträgen und Publikationen vorgenommen hat. Auch die große Verantwortung im Umgang mit der Orbitrap habe ich dir und deinen Bemühungen zu verdanken, mich in die Anschaffung, Pflege und Optimierung mit einzubeziehen. Danke dafür!

An Larissa Lessmann geht ein großes Dankeschön besonders für die wunderschönen Westernblots, die Unterstützung und tolle Zeit auf F0 und zuletzt auch für die Hilfe meinen Schreibstil zu verbessern.

Insgesamt möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik, aber besonders Angela, Ulrike, Heino für die schöne Zeit und für die Hilfe im Labor bzw. mit dem Computer danken.

Eine weitere große Hilfe war die Zusammenarbeit mit Stefan Albaum hinsichtlich aller bioinformatischen Fragestellungen und mit Oliver Rupp für die Unterstützung aus Gießen bei der Protein-Annotierung. Danke euch!

Außerdem danke ich Julia Hahn (geb. Voss), die mir auch mitten in der Nacht geholfen hat, die Orbitrap wieder ans Laufen zu bringen, die mich das ein oder andere Mal mit Labor-Material versorgt hat, wenn unsere Vorräte mal wieder aufgebraucht waren und mir in der Schwangerschaft gefährliche Arbeiten abgenommen hat.

Meinen Bacheloranden möchte ich für die Mitarbeit im Projekt danken, darunter Tim Schulze (mTOR-Analyse), Marina Simunovic (ERK1/2-Analyse), Isabell Bleile (Carnosin-Induktion), Pascal Lucas (Phospho-SILAC-Analyse). Auch meinen Projektanden danke ich ganz besonders für die interessanten Ergebnisse, darunter Daniel Becker (Rapamycin-Induktion), Christoph Keysberg (SMI-Induktion), Heribert Helgers (Bioreaktorkultivierung, Temperatur- und pH-Shift) und Antonia Pries (Phospho-Workflow).

Nicht zu vergessen sind alle Mitglieder des E2-153-Büros, Olli, René, Antonia, Alena und Lena für die konstruktive und superlustige Zeit. Ich vermisse die Zeit so sehr! Danke besonders an Antonia für das Lesen meiner Arbeit!

Dann danke ich ganz besonders meiner Schwiegermutter Barbara, ohne die ich wahrscheinlich noch in Jahren mit Arno auf dem Schoß vor den gefühlt 1.000 Tabellen dieser Arbeit sitzen würde. Außerdem danke ich auch meiner restlichen Familie. Danke Oma Annie in England für den besten tüfteligsten Opa der Welt und die Weitergabe seines Forschergens.

Meiner Mama danke ich einfach für alles. Danke, dass du mich immer unterstützt. Unfassbar, dass du meine Leidenschaft zur Biotechnologie schon so früh entdeckt und diese gefördert hast, ohne dass ich es wahrgenommen habe. Auch der superschöne Start in den Tag (mit Kaffee) hat die ein oder andere kreative Idee für diese Arbeit hervorgebracht. Opa fehlt dabei sehr, aber umso glücklicher bin ich, dass wir diese Tradition aufrechterhalten können.

Last but not least: Heiko. Zum Glück muss ich nicht in Worte fassen, was ich dir zuverdanken habe. Kaum zu glauben, dass du mich jetzt die dritte (und wahrscheinlich) letzte Abschlussarbeit aushalten musst. Ob du mich wohl wieder erkennst, ohne eine *deadline* im Kopf?

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Rahmenpromotionsordnung der Technischen Fakultät und der Universität Bielefeld bekannt ist. Ich versichere, dass ich das Thema und die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Hilfe Dritter erarbeitet habe. Es wurden ausschließlich die genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet, wobei wörtliche und sinngemäße Zitate, sowie andere aus Publikationen entnommene Abbildungen als solche gekennzeichnet wurden. Diese Arbeit wurde weder ganz noch in Teilen einer Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Louise Schelletter

Gütersloh, 12.04.2021

Literaturverzeichnis

- Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Foster KG, Ekim B, Soliman GA, Feener EP, Ballif BA, Fingar DC (2009) Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Mol Cell Biol* 29:4308–4324
- Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2004) Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol Cell Biol* 24:10000–10015
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198–207
- Ahmadi S, Winter D (2019) Identification of Unexpected Protein Modifications by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Methods Mol Biol* 1871:225–251
- Ahn WS, Antoniewicz MR (2012) Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnol J* 7:61–74
- Albrecht S, Kaisermayer C, Gallagher C, Farrell A, Lindeberg A, Bones J (2018) Proteomics in biomanufacturing control: Protein dynamics of CHO-K1 cells and conditioned media during apoptosis and necrosis. *Biotechnol Bioeng* 115:1509–1520
- Allen MJ, Boyce JP, Trentalange MT, Treiber DL, Rasmussen B, Tillotson B, Davis R, Reddy P (2008) Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 100:1193–1204
- Alto LT, Terman JR (2017) Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods Mol Biol* 1493:1–25
- Anna Wippermann (2016) DNA methylation in CHO cells. Characterization of epigenetic phenomena under process conditions. Dissertation
- Azarian B, Sajedin SM, Azimi A, Raigani M, Vaziri B, Davami F (2017) Proteomics Profiling of Chimeric-Truncated Tissue Plasminogen activator Producing- Chinese Hamster Ovary Cells Cultivated in a Chemically Defined Medium Supplemented with Protein Hydrolysates 21:154–166
- Baek E, Kim CL, Kim MG, Lee JS, Lee GM (2016) Chemical inhibition of autophagy: Examining its potential to increase the specific productivity of recombinant CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 113:1953–1961
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11:5784–5792
- Barilari M, Bonfils G, Treins C, Koka V, Villeneuve D de, Fabrega S, Pende M (2017) ZRF1 is a novel S6 kinase substrate that drives the senescence programme. *EMBO J* 36:736–750
- Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ (2003) Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 81:631–639
- Bath TS, Francavilla C, Olsen JV (2014) Off-line high-pH reversed-phase fractionation for in-depth phosphoproteomics. *J Proteome Res* 13:6176–6186
- Baycin-Hizal D, Tabb DL, Chaerkady R, Chen L, Lewis NE, Nagarajan H, Sarkaria V, Kumar A, Wolozny D, Colao J, Jacobson E, Tian Y, O'Meally RN, Krag SS, Cole RN, Palsson BO, Zhang H, Betenbaugh M (2012) Proteomic analysis of Chinese hamster ovary cells. *J Proteome Res* 11:5265–5276
- Beck S, Michalski A, Raether O, Lubeck M, Kaspar S, Goedecke N, Baessmann C, Hornburg D, Meier F, Paron I, Kulak NA, Cox J, Mann M (2015) The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 14:2014–2029
- Becker E, Florin L, Pfizenmaier K, Kaufmann H (2008) An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes 135:217–223
- Becker J, Hackl M, Rupp O, Jakobi T, Schneider J, Szczepanowski R, Bekel T, Borth N, Goesmann A, Grillari J, Kaltschmidt C, Noll T, Puhler A, Tauch A, Brinkrolf K (2011) Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing 156:227–235

- Becker J, Timmermann C, Rupp O, Albaum SP, Brinkrolf K, Goesmann A, Pühler A, Tauch A, Noll T (2014) Transcriptome analyses of CHO cells with the next-generation microarray CHO41K: development and validation by analysing the influence of the growth stimulating substance IGF-1 substitute LongR(3.) 178:23–31
- Beckmann TF (2012) Differentielle Proteomanalyse tierischer Zellkulturen zur Charakterisierung von Hochproduzenten. Dissertation
- Bekker-Jensen DB, Martínez-Val A, Steigerwald S, Rüter P, Fort KL, Arrey TN, Harder A, Makarov A, Olsen JV (2020) A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients. *Mol Cell Proteomics* 19:716–729
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing 57:289–300
- Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD (2013) Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* 339:1323–1328
- Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD (2016) mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* 351:728–733
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669–681
- Bevan S, Schoenfelder S, Young RJ, Zhang L, Andrews S, Fraser P, O'Callaghan PM (2020) High-resolution three-dimensional chromatin profiling of the Chinese hamster ovary cell genome. *Biotechnol Bioeng.*
- Beyter D, Lin MS, Yu Y, Pieper R, Bafna V (2018) ProteoStorm: An Ultrafast Metaproteomics Database Search Framework. *Cell Syst* 7:463–467.e6
- Bian Y, Zheng R, Bayer FP, Wong C, Chang Y-C, Meng C, Zolg DP, Reinecke M, Zecha J, Wiechmann S, Heinzlmeir S, Scherr J, Hemmer B, Baynham M, Gingras A-C, Boychenko O, Kuster B (2020) Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS. *Nat Commun* 11:157
- Bilbao A, Varesio E, Luban J, Strambio-De-Castillia C, Hopfgartner G, Müller M, Lisacek F (2015) Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry. *Proteomics* 15:964–980
- Birch JR, Mainwaring DO, Racher AJ (2005) Use of the Glutamine Synthetase (GS) Expression System for the Rapid Development of Highly Productive Mammalian Cell Processes. In: Knblein J (ed) *Modern Biopharmaceuticals*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp 809–832
- Boning D, Maassen N (1983) Blood osmolality in vitro: dependence on PCO₂, lactic acid concentration, and O₂ saturation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54:118–122
- Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H (2005) Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog* 21:106–111
- Braasch K, Kryworuchko M, Piret JM (2021) Autophagy-inducing Peptide Increases CHO Cell Monoclonal Antibody Production in Batch and Fed-batch Cultures. *Biotechnol Bioeng.*
- Brachtvogel L, Walter S, Noll T, Hoffrogge R (2018) Abstracts from the 25th European Society for Animal Cell Technology Meeting: Cell Technologies for Innovative Therapies. *BMC Proc* 12
- Brink BG, Seidel A, Kleinbölting N, Nattkemper TW, Albaum SP (2016) Omics Fusion – A Platform for Integrative Analysis of Omics Data 13:43–46
- Büntemeyer H, Lütkemeyer D, Lehmann J (1991) Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production. *Cytotechnology* 5:57–67
- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P (2016) ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol* 4:53
- Cain K, Peters S, Hailu H, Sweeney B, Stephens P, Heads J, Sarkar K, Ventom A, Page C, Dickson A (2013) A CHO cell line engineered to express XBP1 and ERO1- α has increased levels of transient protein expression. *Biotechnol Prog* 29:697–706
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:85–95

- Camire J, Kim D, Kwon S (2017) Enhanced production of recombinant proteins by a small molecule protein synthesis enhancer in combination with an antioxidant in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Bioprocess Biosyst Eng* 40:1049–1056
- Cararo JH, Streck EL, Schuck PF, Ferreira GdC (2015) Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders. *Aging Dis* 6:369–379
- Carlage T, Hincapie M, Zang L, Lyubarskaya Y, Madden H, Mhatre R, Hancock WS (2009) Proteomic profiling of a high-producing Chinese hamster ovary cell culture. *Anal Chem* 81:7357–7362
- Carlage T, Kshirsagar R, Zang L, Janakiraman V, Hincapie M, Lyubarskaya Y, Weiskopf A, Hancock WS (2012) Analysis of dynamic changes in the proteome of a Bcl-XL overexpressing Chinese hamster ovary cell culture during exponential and stationary phases. *Biotechnol Prog* 28:814–823
- Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ (2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol* 7:512–518
- Cell Signaling Technology (2016) CST Guide: Pathways and Protocols
- Chambers MC, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak M-Y, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A, Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30:918–920
- Chan CC (2004) *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, 1st edn. Wiley-Interscience, S.I.
- Chen R-Q, Yang Q-K, Lu B-W, Yi W, Cantin G, Chen Y-L, Fearn C, Yates JR, Lee J-D (2009) CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res* 69:2663–2668
- Chen W, Wang S, Adhikari S, Deng Z, Wang L, Chen L, Ke M, Yang P, Tian R (2016) Simple and Integrated Spintip-Based Technology Applied for Deep Proteome Profiling. *Anal Chem* 88:4864–4871
- Chevallier V, Schoof EM, Malphettes L, Andersen MR, Workman CT (2020) Characterization of glutathione proteome in CHO cells and its relationship with productivity and cholesterol synthesis. *Biotechnol Bioeng*.
- Chiverton LM, Evans C, Pandhal J, Landels AR, Rees BJ, Levison PR, Wright PC, Smales CM (2016) Quantitative definition and monitoring of the host cell protein proteome using iTRAQ - a study of an industrial mAb producing CHO-S cell line. *Biotechnol J* 11:1014–1024
- Chong WPK, Reddy SG, Yusufi FNK, Lee D-Y, Wong NSC, Heng CK, Yap MGS, Ho YS (2010) Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II 147:116–121
- Chong WPK, Thng SH, Hiu AP, Lee D-Y, Chan ECY, Ho YS (2012) LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 109:3103–3111
- Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngsø C, Sarwar U, Bøgebo R, Sheikh SP, Gammeltoft S, Olsen JV, Hansen JL (2010) Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics* 9:1540–1553
- Chu L, Robinson DK (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 12:180–187
- Chun C, Heineken K, Szeto D, Ryll T, Chamow S, Chung JD (2003) Application of factorial design to accelerate identification of CHO growth factor requirements. *Biotechnol Prog* 19:52–57
- Chung JY, Lim SW, Hong YJ, Hwang SO, Lee GM (2004) Effect of doxycycline-regulated calnexin and calreticulin expression on specific thrombopoietin productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 85:539–546
- Clarke C, Henry M, Doolan P, Kelly S, Aherne S, Sanchez N, Kelly P, Kinsella P, Breen L, Madden SF, Zhang L, Leonard M, Clynes M, Meleady P, Barron N (2012) Integrated miRNA,

- mRNA and protein expression analysis reveals the role of post-transcriptional regulation in controlling CHO cell growth rate. *BMC Genomics* 13:656
- Cole J, Hanson EJ, James DC, Dockrell DH, Dickman MJ (2019) Comparison of data-acquisition methods for the identification and quantification of histone post-translational modifications on a Q Exactive HF hybrid quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33:897–906
- Coleman O, Costello A, Henry M, Lao NT, Barron N, Clynes M, Meleady P (2018) A proteomic profiling dataset of recombinant Chinese hamster ovary cells showing enhanced cellular growth following miR-378 depletion. *Data Brief* 21:2679–2688
- Coleman O, Suda S, Meiller J, Henry M, Riedl M, Barron N, Clynes M, Meleady P (2019) Increased growth rate and productivity following stable depletion of miR-7 in a mAb producing CHO cell line causes an increase in proteins associated with the Akt pathway and ribosome biogenesis. *J Proteomics* 195:23–32
- Colombo M, Raposo G, Théry C (2014) Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles 30:255–289
- Conlon JM (2007) Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. *Nat Protoc* 2:191–197
- Coronel J, Klausung S, Heinrich C, Noll T, Figueredo-Cardero A, Castilho LR (2016) Valeric acid supplementation combined to mild hypothermia increases productivity in CHO cell cultivations. *Biochem Eng J* 114:101–109
- Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J (2014) Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol* 34:281–299
- Costello A, Coleman O, Lao NT, Henry M, Meleady P, Barron N, Clynes M (2018) Depletion of endogenous miRNA-378-3p increases peak cell density of CHO DP12 cells and is correlated with elevated levels of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 288:30–40
- Courcelles M, Frémin C, Voisin L, Lemieux S, Meloche S, Thibault P (2013) Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Mol Syst Biol* 9:669
- Cox J (2016) MaxQuant. <http://www.biochem.mpg.de/5111795/maxquant>. Accessed 21 November 2016
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372
- Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4:698–705
- Dahodwala H, Kaushik P, Tejwani V, Kuo C-C, Menard P, Henry M, Voldborg BG, Lewis NE, Meleady P, Sharfstein ST (2019) Increased mAb production in amplified CHO cell lines is associated with increased interaction of CREB1 with transgene promoter. *Curr Res Biotechnol* 1:49–57
- Darja O, Stanislav M, Saša S, Andrej F, Lea B, Branka J (2016) Responses of CHO cell lines to increased pCO₂ at normal (37 °C) and reduced (33 °C) culture temperatures 219:98–109
- Davies SL, Lovelady CS, Grainger RK, Racher AJ, Young RJ, James DC (2013) Functional heterogeneity and heritability in CHO cell populations. *Biotechnol Bioeng* 110:260–274
- Devabhaktuni A, Lin S, Zhang L, Swaminathan K, Gonzalez CG, Olsson N, Pearlman SM, Rawson K, Elias JE (2019) TagGraph reveals vast protein modification landscapes from large tandem mass spectrometry datasets. *Nat Biotechnol* 37:469–479
- Di Zhao, Zou S-W, Liu Y, Zhou X, Mo Y, Wang P, Xu Y-H, Dong B, Xiong Y, Lei Q-Y, Guan K-L (2013) Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 23:464–476
- Dietmair S, Hodson MP, Quek L-E, Timmins NE, Chrysanthopoulos P, Jacob SS, Gray P, Nielsen LK (2012) Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics. *Biotechnol Bioeng* 109:1404–1414

- Domalain V, Hubert-Roux M, Tognetti V, Joubert L, Lange CM, Rouden J, Afonso C (2014) Enantiomeric differentiation of aromatic amino acids using traveling wave ion mobility-mass spectrometry 5:3234
- Doolan P, Clarke C, Kinsella P, Breen L, Meleady P, Leonard M, Zhang L, Clynes M, Aherne ST, Barron N (2013) Transcriptomic analysis of clonal growth rate variation during CHO cell line development 166:105–113
- Doolan P, Meleady P, Barron N, Henry M, Gallagher R, Gammell P, Melville M, Sinacore M, McCarthy K, Leonard M, Charlebois T, Clynes M (2010) Microarray and proteomics expression profiling identifies several candidates, including the valosin-containing protein (VCP), involved in regulating high cellular growth rate in production CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 106:42–56
- Dorai H, Kyung YS, Ellis D, Kinney C, Lin C, Jan D, Moore G, Betenbaugh MJ (2009) Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture. *Biotechnol Bioeng* 103:592–608
- Dorai H, Liu S, Yao X, Wang Y, Tekindemir U (2013) Proteomic Analysis of Bioreactor Cultures of an Antibody Expressing CHO-GS Cell Line that Promotes High Productivity 06
- Dorfer V, Pichler P, Stranzl T, Stadlmann J, Taus T, Winkler S, Mechtler K (2014) MS Amanda, a universal identification algorithm optimized for high accuracy tandem mass spectra. *J Proteome Res* 13:3679–3684
- Dreesen IAJ, Fussenegger M (2011) Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 108:853–866
- Drogaris P, Villeneuve V, Pomiès C, Lee E-H, Bourdeau V, Bonneil É, Ferbeyre G, Verreault A, Thibault P (2012) Histone Deacetylase Inhibitors Globally Enhance H3/H4 Tail Acetylation Without Affecting H3 Lysine 56 Acetylation. *Sci Rep* 2
- Du Z, Treiber D, McCarter JD, Fomina-Yadlin D, Saleem RA, McCoy RE, Zhang Y, Tharmalingam T, Leith M, Follstad BD, Dell B, Grisim B, Zupke C, Heath C, Morris AE, Reddy P (2015) Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 112:141–155
- DuRose JB, Tam AB, Niwa M (2006) Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 17:3095–3107
- Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39:171–183
- Dwivedi RC, Spicer V, Harder M, Antonovici M, Ens W, Standing KG, Wilkins JA, Krokhin OV (2008) Practical implementation of 2D HPLC scheme with accurate peptide retention prediction in both dimensions for high-throughput bottom-up proteomics. *Anal Chem* 80:7036–7042
- Edros R, McDonnell S, Al-Rubeai M (2014) The relationship between mTOR signalling pathway and recombinant antibody productivity in CHO cell lines. *BMC Biotechnol* 14:15
- Eisenberg JC, Elgin SCR (2000) The HP1 protein family: getting a grip on chromatin 10:204–210
- El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJA (2012) Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc* 7:2112–2126
- Emmott E, Goodfellow I (2014) Identification of protein interaction partners in mammalian cells using SILAC-immunoprecipitation quantitative proteomics. *J Vis Exp*
- Eskelinen E-L, Saftig P (2009) Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1793:664–673
- Fan L, Frye CC, Racher AJ (2013) The use of glutamine synthetase as a selection marker: recent advances in Chinese hamster ovary cell line generation processes 1:487–502

- Fan L, Kadura I, Krebs LE, Hatfield CC, Shaw MM, Frye CC (2012) Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnol Bioeng* 109:1007–1015
- Fan Y, Jimenez Del Val I, Muller C, Wagtberg Sen J, Rasmussen SK, Kontoravdi C, Weilguny D, Andersen MR (2015) Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 112:521–535
- Feichtinger J, Hernández I, Fischer C, Hanscho M, Auer N, Hackl M, Jadhav V, Baumann M, Krempl PM, Schmidl C, Farlik M, Schuster M, Merkel A, Sommer A, Heath S, Rico D, Bock C, Thallinger GG, Borth N (2016) Comprehensive genome and epigenome characterization of CHO cells in response to evolutionary pressures and over time. *Biotechnol Bioeng* 113:2241–2253
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64–71
- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 20:301–305
- Fisher RA (1922) On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P 85:87
- Fomina-Yadlin D, Gosink JJ, McCoy R, Follstad B, Morris A, Russell CB, McGrew JT (2014) Cellular responses to individual amino-acid depletion in antibody-expressing and parental CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng* 111:965–979
- Foster LJ, DeMarco ML (2017) At the Intersection of Proteomics and Big Data Science. *Clin Chem* 63:1663
- Funahashi A, Matsuoka Y, Jouraku A, Morohashi M, Kikuchi N, Kitano H (2008) CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks 96:1254–1265
- Gao W-w, Xiao R-q, Peng B-l, Xu H-t, Shen H-f, Huang M-f, Shi T-t, Yi J, Zhang W-j, Wu X-n, Gao X, Lin X-z, Dorrestein PC, Rosenfeld MG, Liu W (2015) Arginine methylation of HSP70 regulates retinoid acid-mediated RAR β 2 gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3327-36
- Geetha T, Langlais P, Caruso M, Yi Z (2012) Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A and catalytic subunit δ , new members in the phosphatidylinositol 3 kinase insulin-signaling pathway. *J Endocrinol* 214:437–443
- Geoghegan D, Arnall C, Hatton D, Noble-Longster J, Sellick C, Senussi T, James DC (2018) Control of amino acid transport into Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 115:2908–2929
- Gershon PD (2014) Cleaved and missed sites for trypsin, lys-C, and lys-N can be predicted with high confidence on the basis of sequence context. *J Proteome Res* 13:702–709
- Gessulat S, Schmidt T, Zolg DP, Samaras P, Schnatbaum K, Zerweck J, Knaute T, Rechenberger J, Delanghe B, Huhmer A, Reimer U, Ehrlich H-C, Aiche S, Kuster B, Wilhelm M (2019) Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat Methods* 16:509–518
- Ghaffari N (2011) Effect of amino acid limitation and supplementation in *chinese hamster ovary* fed-batch cultures. Master of applied science, Canada
- Gharvey-Kwansah G, Li Z, Feng R, Wang L, Zhou X, Chen FZ, Xu MM, Jones O, Mu Y, Chen S, Bryant J, Isaacs WB, Ma J, Xu X (2018) Comparative analysis of FKBP family protein: evaluation, structure, and function in mammals and *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev Biol* 18:7
- Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, Heck AJR (2016) Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat Protoc* 11:993–1006
- Gille JJ, Pasman P, van Berkel CG, Joenje H (1991) Effect of antioxidants on hyperoxia-induced chromosomal breakage in Chinese hamster ovary cells: protection by carnosine. *Mutagenesis* 6:313–318
- Gleiser I, Yaish, Pnina, Barnea-Gedalyahu, Efrat, Zharhary D (o.J.) Phosphatase Inhibitor Cocktail. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biowire/phosphatase-inhibitor.html>. Accessed 2 December 2016

- Glembotski CC, Thuerauf DJ, Huang C, Vekich JA, Gottlieb RA, Doroudgar S (2012) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *J Biol Chem* 287:25893–25904
- Goldfarb AR, Saidel LJ, Mosovich E (1951) The ultraviolet absorption spectra of proteins 193:397–404
- Graaf EL de, Kaplon J, Mohammed S, Vereijken LAM, Duarte DP, Redondo Gallego L, Heck AJR, Peeper DS, Altelaar AFM (2015) Signal Transduction Reaction Monitoring Deciphers Site-Specific PI3K-mTOR/MAPK Pathway Dynamics in Oncogene-Induced Senescence. *J Proteome Res* 14:2906–2914
- Gudermann F, Ziemeck P, Lehmann J (1997) CeDEX: Automated Cell Density Determination. In: Carrondo MJT, Griffiths B, Moreira JLP (ed) *Animal Cell Technology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 301–305
- Guilbault GG, Lubrano GJ (1973) An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose 64:439–455
- Gullerova M, Barta A, Lorkovic ZJ (2006) AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12:631–643
- Gutierrez JM, Feizi A, Li S, Kallehauge TB, Hefzi H, Grav LM, Ley D, Baycin Hizal D, Betenbaugh MJ, Voldborg B, Fastrup Kildegaard H, Min Lee G, Palsson BO, Nielsen J, Lewis NE (2020) Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nat Commun* 11:68
- Ha TK, Hansen AH, Kildegaard HF, Lee GM (2019) BiP Inducer X: An ER Stress Inhibitor for Enhancing Recombinant Antibody Production in CHO Cell Culture. *Biotechnol J*:e1900130
- Ha TK, Hansen AH, Kol S, Kildegaard HF, Lee GM (2018) Baicalein Reduces Oxidative Stress in CHO Cell Cultures and Improves Recombinant Antibody Productivity. *Biotechnol J* 13:e1700425
- Halbach S, Dengjel J, Brummer T (2016) Quantitative Proteomics Analysis of Leukemia Cells. *Methods Mol Biol* 1465:139–148
- Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10230–10235
- Han S, Rhee WJ (2018) Inhibition of apoptosis using exosomes in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Bioeng* 115:1331–1339
- Hannan KM, Thomas G, Pearson RB (2003) Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem J* 370:469–477
- Harper JW, Bennett EJ (2016) Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature* 537:328–338
- Harris RC, Marlin DJ, Dunnett M, Snow DH, Hultman E (1990) Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 97:249–251
- Hartley F, Walker T, Chung V, Morten K (2018) Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 115:1890–1903
- Hast BE, Goldfarb D, Mulvaney KM, Hast MA, Siesser PF, Yan F, Hayes DN, Major MB (2013) Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res* 73:2199–2210
- Heffner K, Hizal DB, Majewska NI, Kumar S, Dhara VG, Zhu J, Bowen M, Hatton D, Yerganian G, Yerganian A, O'Meally R, Cole R, Betenbaugh M (2020) Expanded Chinese hamster organ and cell line proteomics profiling reveals tissue-specific functionalities. *Sci Rep* 10:15841
- Heffner KM, Hizal DB, Yerganian GS, Kumar A, Can Ö, O'Meally R, Cole R, Chaerkady R, Wu H, Bowen MA, Betenbaugh MJ (2017) Lessons from the Hamster: *Cricetulus griseus* Tissue and CHO Cell Line Proteome Comparison. *J Proteome Res* 16:3672–3687
- Henry M, Coleman O, Prashant, Clynes M, Meleady P (2017a) Phosphopeptide Enrichment and LC-MS/MS Analysis to Study the Phosphoproteome of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *Methods Mol Biol* 1603:195–208

- Henry M, Gallagher C, Kelly RM, Frye CC, Osborne MD, Brady CP, Barron N, Clynes M, Meleady P (2018) Clonal variation in productivity and proteolytic clipping of an Fc-fusion protein in CHO cells: Proteomic analysis suggests a role for defective protein folding and the UPR 281:21–30
- Henry M, Power M, Kaushik P, Coleman O, Clynes M, Meleady P (2017b) Differential Phosphoproteomic Analysis of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Following Temperature Shift. *J Proteome Res* 16:2339–2358
- Henry MN, MacDonald MA, Orellana CA, Gray PP, Gillard M, Baker K, Nielsen LK, Marcellin E, Mahler S, Martínez VS (2020) Attenuating apoptosis in Chinese hamster ovary cells for improved biopharmaceutical production. *Biotechnol Bioeng* 117:1187–1203
- Hilger D, Masureel M, Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 25:4–12
- Hipkiss AR (2011) Energy metabolism, proteotoxic stress and age-related dysfunction - protection by carnosine. *Mol Aspects Med* 32:267–278
- Ho SCL, Wang T, Song Z, Yang Y (2015) IgG Aggregation Mechanism for CHO Cell Lines Expressing Excess Heavy Chains. *Mol Biotechnol* 57:625–634
- Holliday R, McFarland GA (2000) A role for carnosine in cellular maintenance. *Biochemistry (Mosc)* 65:843–848
- Holman JD, Tabb DL, Mallick P (2014) Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Curr Protoc Bioinformatics* 46:13.24.1–9
- Hornbeck PV, Kornhauser JM, Latham V, Murray B, Nandhikonda V, Nord A, Skrzypek E, Wheeler T, Zhang B, Gnad F (2019) 15 years of PhosphoSitePlus®: integrating post-translationally modified sites, disease variants and isoforms. *Nucleic Acids Res* 47:D433–D441
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* 332:1317–1322
- Hu D, Sun Y, Liu X, Liu J, Zhang X, Zhao L, Wang H, Tan W-S, Fan L (2015) Understanding the intracellular effects of yeast extract on the enhancement of Fc-fusion protein production in Chinese hamster ovary cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8429–8440
- Hu D, Zhao L, Wang J, Fan L, Liu X, Wang H, Tan W-S (2018) Physiological responses of Chinese hamster ovary cells to a productivity-enhancing yeast extract. *J Biosci Bioeng* 126:636–643
- Huang M, Li Z, Li D, Walker S, Greenan C, Kennedy R (2013) Structure-based design of HSPA5 inhibitors: from peptide to small molecule inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 23:3044–3050
- Hughes CS, McConechy MK, Cochrane DR, Nazeran T, Karnezis AN, Huntsman DG, Morin GB (2016) Quantitative Profiling of Single Formalin Fixed Tumour Sections: proteomics for translational research. *Sci Rep* 6:34949
- Hughes CS, Sorensen PH, Morin GB (2019) A Standardized and Reproducible Proteomics Protocol for Bottom-Up Quantitative Analysis of Protein Samples Using SP3 and Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* 1959:65–87
- Humphrey SJ, Azimifar SB, Mann M (2015a) High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nat Biotechnol* 33:990–995
- Humphrey SJ, James DE, Mann M (2015b) Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* 26:676–687
- Humphrey SJ, Karayel O, James DE, Mann M (2018) High-throughput and high-sensitivity phosphoproteomics with the EasyPhos platform. *Nat Protoc* 13:1897–1916
- Humphrey SJ, Yang G, Yang P, Fazakerley DJ, Stockli J, Yang JY, James DE (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab* 17:1009–1020
- Hwang SO, Chung JY, Lee GM (2003) Effect of doxycycline-regulated ERp57 expression on specific thrombopoietin productivity of recombinant CHO cells. *Biotechnol Prog* 19:179–184
- Inazuka F, Sugiyama N, Tomita M, Abe T, Shioi G, Esumi H (2012) Muscle-specific knock-out of NUA family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance. *J Biol Chem* 287:16379–16389

- Insuasty-Cepeda DS, Pineda Castañeda HM, Rodríguez Mayor AV, García Castañeda JE, Maldonado Villamil M, Fierro Medina R, Rivera Monroy ZJ (2019) Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules* 24
- Iovine B, Oliviero G, Garofalo M, Orefice M, Nocella F, Borbone N, Piccialli V, Centore R, Mazzone M, Piccialli G, Bevilacqua MA (2014) The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS One* 9:e96755
- Jakobsson ME, Moen A, Bousset L, Egge-Jacobsen W, Kernstock S, Melki R, Falnes PØ (2013) Identification and characterization of a novel human methyltransferase modulating Hsp70 protein function through lysine methylation. *J Biol Chem*:27752–27763
- Jang SM, Kauzlaric A, Quivy J-P, Pontis J, Rauwel B, Coluccio A, Offner S, Duc J, Turelli P, Almouzni G, Trono D (2018) KAP1 facilitates reinstatement of heterochromatin after DNA replication. *Nucleic Acids Res* 46:8788–8802
- Jardon MA, Sattha B, Braasch K, Leung AO, Côté HCF, Butler M, Gorski SM, Piret JM (2012) Inhibition of glutamine-dependent autophagy increases t-PA production in CHO cell fed-batch processes. *Biotechnol Bioeng* 109:1228–1238
- Jersie-Christensen RR, Sultan A, Olsen JV (2016) Simple and Reproducible Sample Preparation for Single-Shot Phosphoproteomics with High Sensitivity. *Methods Mol Biol* 1355:251–260
- Jiang L, He L, Fountoulakis M (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* 1023:317–320
- Jiang Y, Lee J, Lee JH, Lee JW, Kim JH, Choi WH, Yoo YD, Cha-Molstad H, Kim BY, Kwon YT, Noh SA, Kim KP, Lee MJ (2016) The arginylation branch of the N-end rule pathway positively regulates cellular autophagic flux and clearance of proteotoxic proteins. *Autophagy* 12:2197–2212
- Jiang Z, Sharfstein ST (2008) Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol Bioeng* 100:189–194
- Jiao X, Sherman BT, Huang DW, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA (2012) DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* 28:1805–1806
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415–428
- Jossé L, Xie J, Proud CG, Smales CM (2016) mTORC1 signalling and eIF4E/4E-BP1 translation initiation factor stoichiometry influence recombinant protein productivity from GS-CHOK1 cells. *Biochem J* 473:4651–4664
- Jung HJ, Suh Y (2014) Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet* 5:472
- Kahali S, Sarcar B, Fang B, Williams ES, Koomen JM, Tofilon PJ, Chinnaiyan P (2010) Activation of the unfolded protein response contributes toward the antitumor activity of vorinostat. *Neoplasia* 12:80–86
- Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 4:923–925
- Kang S, Mullen J, Miranda LP, Deshpande R (2012) Utilization of tyrosine- and histidine-containing dipeptides to enhance productivity and culture viability. *Biotechnol Bioeng* 109:2286–2294
- Kantardjieff A, Jacob NM, Yee JC, Epstein E, Kok Y-J, Philp R, Betenbaugh M, Hu W-S (2010) Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment 145:143–159
- Kao Y-H, Hewitt DP, Trexler-Schmidt M, Laird MW (2010) Mechanism of antibody reduction in cell culture production processes. *Biotechnol Bioeng* 107:622–632
- Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M, Bailey JE (1999) Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 63:573–582
- Kaushik P, Curell RV-B, Henry M, Barron N, Meleady P (2020) LC-MS/MS-based quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of CHO-K1 cells adapted to growth in glutamine-free media. *Biotechnol Lett* 42:2523–2536

- Kaushik P, Henry M, Clynes M, Meleady P (2018) The Expression Pattern of the Phosphoproteome Is Significantly Changed During the Growth Phases of Recombinant CHO Cell Culture. *Biotechnol J* 13:e1700221
- Kaustov L, Ouyang H, Amaya M, Lemak A, Nady N, Duan S, Wasney GA, Li Z, Vedadi M, Schapira M, Min J, Arrowsmith CH (2011) Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *J Biol Chem* 286:521–529
- Keller BO, Sui J, Young AB, Whittall RM (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry 627:71–81
- Kelly PS, Breen L, Gallagher C, Kelly S, Henry M, Lao NT, Meleady P, O’Gorman D, Clynes M, Barron N (2015a) Re-programming CHO cell metabolism using miR-23 tips the balance towards a highly productive phenotype. *Biotechnol J* 10:1029–1040
- Kelly PS, Gallagher C, Clynes M, Barron N (2015b) Conserved microRNA function as a basis for Chinese hamster ovary cell engineering. *Biotechnol Lett* 37:787–798
- Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA (2011) Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 1
- Kim DY, Chaudhry MA, Kennard ML, Jardon MA, Braasch K, Dionne B, Butler M, Piret JM (2013a) Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol Prog* 29:165–175
- Kim H, Heo K, Choi J, Kim K, An W (2011) Histone variant H3.3 stimulates HSP70 transcription through cooperation with HP1 γ . *Nucleic Acids Res* 39:8329–8341
- Kim JY, Kim Y-G, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:917–930
- Kim SH, Lee GM (2007) Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:152–159
- Kim YJ, Baek E, Lee JS, Lee GM (2013b) Autophagy and its implication in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Lett* 35:1753–1763
- Klaudia Grunwald (2019) Glykosylierung rekombinant erzeugter Pharmazeutika in Abhängigkeit der Kultivierungsphasen
- Klausing S (2013) Optimierung von CHO Produktionszelllinien. RNAi-vermittelter Genknockdown und Untersuchungen zur Klonstabilität. Univ., Diss.--Bielefeld, 2013. Logos Verl., Berlin
- Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, Hansen AH, Jensen TL, Gutierrez JM, Chiang AWT, Masson HO, Palsson BO, Voldborg BG, Pedersen LE, Kildegaard HF, Lee GM, Lewis NE (2020) Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat Commun* 11:1908
- Koraishy FM, Silva C, Mason S, Wu D, Cantley LG (2014) Hepatocyte growth factor (Hgf) stimulates low density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) 5/6 phosphorylation and promotes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 289:14341–14350
- Korke R, Rink A, Seow TK, Chung MCM, Beattie CW, Hu W-S (2002) Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering 94:73–92
- Korrodi-Gregório L, Ferreira M, Vintém AP, Wu W, Muller T, Marcus K, Vijayaraghavan S, Brautigan DL, da Cruz E Silva OAB, Fardilha M, da Cruz E Silva EF (2013) Identification and characterization of two distinct PPP1R2 isoforms in human spermatozoa. *BMC Cell Biol* 14:15
- Kovalchuk SI, Jensen ON, Rogowska-Wrzesinska A (2019) FlashPack: Fast and Simple Preparation of Ultrahigh-performance Capillary Columns for LC-MS. *Mol Cell Proteomics* 18:383–390
- Krämer O, Klausing S, Noll T (2010) Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:425–436
- Kuang E, Fu B, Liang Q, Myoung J, Zhu F (2011) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4B (EIF4B) by open reading frame 45/p90 ribosomal S6 kinase (ORF45/RSK) signaling axis facilitates protein translation during Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic replication. *J Biol Chem* 286:41171–41182

- Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* 11:319–324
- Kumar A, Baycin-Hizal D, Wolozny D, Pedersen LE, Lewis NE, Heffner K, Chaerkady R, Cole RN, Shiloach J, Zhang H, Bowen MA, Betenbaugh MJ (2015) Elucidation of the CHO Super-Ome (CHO-SO) by Proteoinformatics. *J Proteome Res* 14:4687–4703
- Kumar N, Gammell P, Clynes M (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology* 53:33–46
- Kurano N, Leist C, Messi F, Kurano S, Fiechter A (1990) Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products 15:113–128
- Kwon Y, Jeon YW, Kwon M, Cho Y, Park D, Shin JE (2020) β Pix-d promotes tubulin acetylation and neurite outgrowth through a PAK/Stathmin1 signaling pathway. *PLoS One* 15
- Lakshmanan M, Kok YJ, Lee AP, Kyriakopoulos S, Lim HL, Teo G, Poh SL, Tang WQ, Hong J, Tan AH-M, Bi X, Ho YS, Zhang P, Ng SK, Lee D-Y (2019) Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits. *Biotechnol Bioeng* 116:2117–2129
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293
- Larsen MR, Graham ME, Robinson PJ, Roepstorff P (2004) Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry: evidence for in vivo doubly phosphorylated dynamin I and dynamin III. *Mol Cell Proteomics* 3:456–465
- Lavoie RA, Di Fazio A, Williams TI, Carbonell R, Menegatti S (2020) Targeted capture of Chinese hamster ovary host cell proteins: Peptide ligand binding by proteomic analysis. *Biotechnol Bioeng* 117:438–452
- Le H, Kabbur S, Pollastrini L, Sun Z, Mills K, Johnson K, Karypis G, Hu W-S (2012) Multivariate analysis of cell culture bioprocess data--lactate consumption as process indicator 162:210–223
- Lee D-F, Kuo H-P, Chen C-T, Hsu J-M, Chou C-K, Wei Y, Sun H-L, Li L-Y, Ping B, Huang W-C, He X, Hung J-Y, Lai C-C, Ding Q, Su J-L, Yang J-Y, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai F-J, Tsai C-H, Hung M-C (2007) IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130:440–455
- Lee J, Park J-R, Lee H, Jang S, Ryu S-M, Kim H, Kim D, Jang A, Yang S-R (2018) L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- κ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 54:505–512
- Lee J-M, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA (2005) Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 19:1061–1066
- Lee JS, Lee GM (2012a) Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods* 56:375–382
- Lee JS, Lee GM (2012b) Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. *Biotechnol Bioeng* 109:3093–3102
- Leitner A (2016) Enrichment Strategies in Phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 1355:105–121
- Leitner A, Sturm M, Lindner W (2011) Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review 703:19–30
- Lenz C, Dihazi H (2016) Introduction to Proteomics Technologies. *Methods Mol Biol* 1362:3–27
- Lewis AM, Abu-Absi NR, Borys MC, Li ZJ (2016) The use of 'Omics technology to rationally improve industrial mammalian cell line performance. *Biotechnol Bioeng* 113:26–38
- Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, Bordbar A, Roth AM, Rosenbloom J, Bian C, Xie M, Chen W, Li N, Baycin-Hizal D, Latif H, Forster J, Betenbaugh MJ, Famili I, Xu X, Wang J, Palsson BO (2013) Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol* 31:759–765

- Ley D, Seresht AK, Engmark M, Magdenoska O, Nielsen KF, Kildegaard HF, Andersen MR (2015) Multi-omic profiling -of EPO-producing Chinese hamster ovary cell panel reveals metabolic adaptation to heterologous protein production. *Biotechnol Bioeng* 112:2373–2387
- Li S, Cha SW, Heffner K, Hizal DB, Bowen MA, Chaerkady R, Cole RN, Tejwani V, Kaushik P, Henry M, Meleady P, Sharfstein ST, Betenbaugh MJ, Bafna V, Lewis NE (2019) Proteogenomic Annotation of Chinese Hamsters Reveals Extensive Novel Translation Events and Endogenous Retroviral Elements. *J Proteome Res* 18:2433–2445
- Li X, Jiang Y, Meisenhelder J, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, Xia Y, Aldape K, He J, Hunter T, Wang L, Lu Z (2016) Mitochondria-translocated phosphoglycerate kinase 1 functions as a protein kinase to coordinate glycolysis and TCA cycle in tumorigenesis. *Mol Cell* 61:705–719
- Lim S, Kim DG, Kim S (2019) ERK-dependent phosphorylation of the linker and substrate-binding domain of HSP70 increases folding activity and cell proliferation. *Exp Mol Med* 51:1–14
- Lim UM, Yap MGS, Lim YP, Goh L-T, Ng SK (2013) Identification of autocrine growth factors secreted by CHO cells for applications in single-cell cloning media. *J Proteome Res* 12:3496–3510
- Liu C-H, Chen L-H (2007) Promotion of recombinant macrophage colony stimulating factor production by dimethyl sulfoxide addition in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng* 103:45–49
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2
- Liu Y, Kern JT, Walker JR, Johnson JA, Schultz PG, Luesch H (2007) A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5205–5210
- Liu Z, Dai S, Bones J, Ray S, Cha S, Karger BL, Li JJ, Wilson L, Hinckle G, Rossomando A (2015) A quantitative proteomic analysis of cellular responses to high glucose media in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 31:1026–1038
- Locard-Paulet M, Bouyssié D, Froment C, Burlet-Schiltz O, Jensen LJ (2020) Comparing 22 Popular Phosphoproteomics Pipelines for Peptide Identification and Site Localization. *J Proteome Res* 19:1338–1345
- Loharch S, Chhabra S, Kumar A, Swarup S, Parkesh R (2021) Discovery and characterization of small molecule SIRT3-specific inhibitors as revealed by mass spectrometry. *Bioorg Chem* 110:104768
- Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R (2018) Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 14
- Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J, Santuray R, Hudson T, Amanullah A, Li F (2012) Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol Bioeng* 109:146–156
- Ma N, Ellet J, Okediadi C, Hermes P, McCormick E, Casnocha S (2009) A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnol Prog* 25:1353–1363
- MacCORMICK M, Modersheim T, van der Salm LWM, Moore A, Pryor SC, McCAFFREY G, Grimes ML (2005) Distinct signalling particles containing ERK/MEK and B-Raf in PC12 cells. *Biochem J* 387:155–164
- MacPherson S, Horkoff M, Gravel C, Hoffmann T, Zuber J, Lum JJ (2017) STAT3 Regulation of Citrate Synthase Is Essential during the Initiation of Lymphocyte Cell Growth. *Cell Rep* 19:910–918
- Maia TM, an Staes, Plasman K, Pauwels J, Boucher K, Argentini A, Martens L, Montoye T, Gevaert K, Impens F (2020) Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control. *ACS Omega* 5:6754–6762
- Mandal SS (ed) (2017) Gene regulation, epigenetics and hormone signaling. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Mardin BR, Agircan FG, Lange C, Schiebel E (2011) Plk1 controls the Nek2A-PP1 γ antagonism in centrosome disjunction. *Curr Biol* 21:1145–1151

- Martínez VS, Buchsteiner M, Gray P, Nielsen LK, Quek L-E (2015) Dynamic metabolic flux analysis using B-splines to study the effects of temperature shift on CHO cell metabolism 2:46–57
- Martinez Calejman C, Trefely S, Entwisle SW, Luciano A, Jung SM, Hsiao W, Torres A, Hung CM, Li H, Snyder NW, Villén J, Wellen KE, Guertin DA (2020) mTORC2-AKT signaling to ATP-citrate lyase drives brown adipogenesis and de novo lipogenesis. *Nat Commun* 11
- Masuda T, Sugiyama N, Tomita M, Ishihama Y (2011) Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines. *Anal Chem* 83:7698–7703
- Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11598–11603
- McCraig C, Potter L, Abramczyk O, Murray JT (2011) Phosphorylation of NDRG1 is temporally and spatially controlled during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 411:227–234
- McVey D, Aronov M, Rizzi G, Cowan A, Scott C, Megill J, Russell R, Tirosh B (2016) CHO cells knocked out for TSC2 display an improved productivity of antibodies under fed batch conditions. *Biotechnol Bioeng* 113:1942–1952
- Meier F, Geyer PE, Virreira Winter S, Cox J, Mann M (2018) BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nat Methods* 15:440–448
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'Sullivan F, Clarke C, Gammell P, Melville MW, Leonard M, Clynes M (2011) Sustained productivity in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol* 11:78
- Meleady P, Gallagher M, Clarke C, Henry M, Sanchez N, Barron N, Clynes M (2012a) Impact of miR-7 over-expression on the proteome of Chinese hamster ovary cells 160:251–262
- Meleady P, Hoffrogge R, Henry M, Rupp O, Bort JH, Clarke C, Brinkrolf K, Kelly S, Muller B, Doolan P, Hackl M, Beckmann TF, Noll T, Grillari J, Barron N, Puhler A, Clynes M, Borth N (2012b) Utilization and evaluation of CHO-specific sequence databases for mass spectrometry based proteomics. *Biotechnol Bioeng* 109:1386–1394
- Mendoza-Viveros L, Cheng H-YM (2018) PEBP-1. In: Choi S (ed) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer International Publishing, Cham, pp 3853–3860
- Menon K, Mousa A, Courten B de (2018) Effects of supplementation with carnosine and other histidine-containing dipeptides on chronic disease risk factors and outcomes: protocol for a systematic review of randomised controlled trials. *BMJ Open* 8:e020623
- Metallo CM, Vander Heiden MG (2010) Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes Dev* 24:2717–2722
- Michalski A, Damoc E, Hauschild J-P, Lange O, Wieghaus A, Makarov A, Nagaraj N, Cox J, Mann M, Horning S (2011) Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 10:M111.011015
- Miki H, Takagi M (2015) Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media. *Cytotechnology* 67:689–697
- Miyata Y, Badolato M, Neamati N (2018) HSPA5. In: Choi S (ed) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer International Publishing, Cham, pp 2429–2451
- Montégut L, Martínez-Basilio PC, da Veiga Moreira J, Schwartz L, Jolicoeur M (2020) Combining lipoic acid to methylene blue reduces the Warburg effect in CHO cells: From TCA cycle activation to enhancing monoclonal antibody production. *PLoS One* 15:e0231770
- Mosser M, Kapel R, Chevalot I, Olmos E, Marc I, Marc A, Oriol E (2015) Fractionation of yeast extract by nanofiltration process to assess key compounds involved in CHO cell culture improvement. *Biotechnol Prog* 31:875–882
- Mu N, Lei Y, Wang Y, Wang Y, Duan Q, Ma G, Liu X, Su L (2019) Inhibition of SIRT1/2 upregulates HSPA5 acetylation and induces pro-survival autophagy via ATF4-DDIT4-mTORC1 axis in human lung cancer cells. *Apoptosis* 24:798–811
- Müller B, Heinrich C, Jabs W, Kaspar-Schönefeld S, Schmidt A, Rodrigues de Carvalho N, Albaum SP, Baessmann C, Noll T, Hoffrogge R (2017) Label-free protein quantification of sodium butyrate treated CHO cells by ESI-UHR-TOF-MS 257:87–98

- Müller-Kuller U, Ackermann M, Kolodziej S, Brendel C, Fritsch J, Lachmann N, Kunkel H, Lausen J, Schambach A, Moritz T, Grez M (2015) A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 43:1577–1592
- Nagaraj N, D'Souza RCJ, Cox J, Olsen JV, Mann M (2010) Feasibility of large-scale phosphoproteomics with higher energy collisional dissociation fragmentation. *J Proteome Res* 9:6786–6794
- Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M (2011) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 7:548
- Narita T, Weinert BT, Choudhary C (2019) Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:156–174
- Needham EJ, Parker BL, Burykin T, James DE, Humphrey SJ (2019) Illuminating the dark phosphoproteome. *Sci Signal* 12
- Nelson J (2008) *Structure and function in cell signalling*. John Wiley & Sons, Chichester, England, Hoboken, NJ
- Ng DCH, Zhao TT, Yeap YYC, Ngoei KR, Bogoyevitch MA (2010) c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of stathmin confers protection against cellular stress. *J Biol Chem* 285:29001–29013
- Nguyen LN, Baumann M, Dhiman H, Marx N, Schmieder V, Hussein M, Eisenhut P, Hernandez I, Koehn J, Borth N (2019) Novel Promoters Derived from Chinese Hamster Ovary Cells via In Silico and In Vitro Analysis. *Biotechnol J* 14:e1900125
- Ni M, Zhou H, Wey S, Baumeister P, Lee AS (2009) Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One*:e6868
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136:521–534
- Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R (2001) Heterochromatin Formation in Mammalian Cells. *Mol Cell* 7:729–739
- Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, Teruel MN, Novitch BG, Rohatgi R (2014) Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep* 6:168–181
- Nishina H, Wada T, Katada T (2004) Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* 136:123–126
- Nissom PM, Sanny A, Kok YJ, Hiang YT, Chuah SH, Shing TK, Lee YY, Wong KTK, Hu W-S, Sim MYG, Philp R (2006) Transcriptome and proteome profiling to understanding the biology of high productivity CHO cells. *Mol Biotechnol* 34:125–140
- Nitika, Porter CM, Truman AW, Truttmann MC (2020) Post-translational modifications of Hsp70 family proteins: Expanding the chaperone code. *J Biol Chem* 295:10689–10708
- O'Donovan C, Apweiler R (2011) A guide to UniProt for protein scientists. *Methods Mol Biol* 694:25–35
- Ogata M, Hino S-i, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26:9220–9231
- Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M (2007) Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* 4:709–712
- Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 3:ra3
- Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30:884–886
- Ondrej M, Rehulka P, Rehulkova H, Kupcik R, Tichy A (2020) Fractionation of Enriched Phosphopeptides Using pH/Acetonitrile-Gradient-Reversed-Phase Microcolumn Separation in Combination with LC-MS/MS Analysis. *Int J Mol Sci* 21

- Oppermann H, Alvanos A, Seidel C, Meixensberger J, Gaunitz F (2019) Carnosine influences transcription via epigenetic regulation as demonstrated by enhanced histone acetylation of the pyruvate dehydrogenase kinase 4 promoter in glioblastoma cells. *Amino Acids* 51:61–71
- Oppermann H, Birkemeyer C, Meixensberger J, Gaunitz F (2020) Non-enzymatic reaction of carnosine and glyceraldehyde-3-phosphate accompanies metabolic changes of the pentose phosphate pathway. *Cell Prolif* 53:e12702
- Orellana CA, Marcellin E, Schulz BL, Nouwens AS, Gray PP, Nielsen LK (2015) High-antibody-producing Chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis. *J Proteome Res* 14:609–618
- Orellana CA, Martínez VS, MacDonald MA, Henry MN, Gillard M, Gray PP, Nielsen LK, Mahler S, Marcellin E (2020) 'Omics driven discoveries of gene targets for apoptosis attenuation in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*.
- Orre LM, Vesterlund M, Pan Y, Arslan T, Zhu Y, Fernandez Woodbridge A, Frings O, Fredlund E, Lehtiö J (2019) SubCellBarCode: Proteome-wide Mapping of Protein Localization and Relocalization. *Mol Cell* 73:166-182.e7
- Osella M, Riba A, Testori A, Corà D, Caselle M (2014) Interplay of microRNA and epigenetic regulation in the human regulatory network. *Front Genet* 5:345
- Ouldali H, Sarthak K, Ensslen T, Piguet F, Manivet P, Pelta J, Behrends JC, Aksimentiev A, Oukhaled A (2020) Electrical recognition of the twenty proteinogenic amino acids using an aerolysin nanopore. *Nat Biotechnol* 38:176–181
- Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet J-C, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317:516–519
- Pan X, Alsayyari AA, Dalm C, Hageman JA, Wijffels RH, Martens DE (2019) Transcriptome Analysis of CHO Cell Size Increase During a Fed-Batch Process. *Biotechnol J* 14:e1800156
- Pappireddi N, Martin L, Wühr M (2019) A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *Chembiochem* 20:1210–1224
- Park Y, Reyna-Neyra A, Philippe L, Thoreen CC (2017) mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep* 19:1083–1090
- Parker BL, Yang G, Humphrey SJ, Chaudhuri R, Ma X, Peterman S, James DE (2015) Targeted phosphoproteomics of insulin signaling using data-independent acquisition mass spectrometry. *Sci Signal* 8:rs6
- Pavitt GD (2018) Regulation of translation initiation factor eIF2B at the hub of the integrated stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9:e1491
- Peach M, Marsh N, Miskiewicz EI, MacPhee DJ (2015) Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods Mol Biol* 1312:49–60
- Pelullo M, Zema S, Nardoza F, Checquolo S, Screpanti I, Bellavia D (2019) Wnt, Notch, and TGF- β Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer. *Front Genet* 10:711
- Pereira S, Kildegaard HF, Andersen MR (2018) Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnol J* 13:e1700499
- Pettersson SW, Collet E, Andersson U (2007) Chemical stability of reversed phase high performance liquid chromatography silica under sodium hydroxide regeneration conditions. *J Chromatogr A* 1142:93–97
- Picotti P, Rinner O, Stallmach R, Dautel F, Farrah T, Domon B, Wenschuh H, Aebersold R (2010) High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat Methods* 7:43–46
- Pilbrough W, Munro TP, Gray P (2009) Intracloonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. *PLoS One* 4:e8432
- Prabhu A, Gadre R, Gadgil M (2018) Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:5989–5999

- Prashad K, Mehra S (2015) Dynamics of unfolded protein response in recombinant CHO cells. *Cytotechnology* 67:237–254
- Preissler S, Rato C, Chen R, Antrobus R, Ding S, Fearnley IM, Ron D (2015) AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *eLife* 4
- Pu J, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS (2017) A Ragulator-BORC interaction controls lysosome positioning in response to amino acid availability. *J Cell Biol* 216:4183–4197
- Puck TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108:945–956
- Puck TT, Sanders P, Petersen D (1964) LIFE CYCLE ANALYSIS OF MAMMALIAN CELLS. II. CELLS FROM THE CHINESE HAMSTER OVARY GROWN IN SUSPENSION CULTURE. *Biophys J* 4:441–450
- Pybus LP, Dean G, West NR, Smith A, Daramola O, Field R, Wilkinson SJ, James DC (2014) Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 111:372–385
- Rabanal-Ruiz Y, Korolchuk VI (2018) mTORC1 and Nutrient Homeostasis: The Central Role of the Lysosome. *Int J Mol Sci* 19
- Rad E, Murray JT, Tee AR (2018) Oncogenic Signalling through Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): A Driver of Metabolic Transformation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 10
- Rahimi-Zarchi M, Shojaosadati SA, Amiri MM, Jeddi-Tehrani M, Shokri F (2018) All-trans retinoic acid in combination with sodium butyrate enhances specific monoclonal antibody productivity in recombinant CHO cell line. *Bioprocess Biosyst Eng* 41:961–971
- Rahimpour A, Vaziri B, Moazzami R, Nematollahi L, Barkhordari F, Kokabee L, Adeli A, Mahboudi F (2013) Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1s genes. *J Microbiol Biotechnol* 23:1116–1122
- Rardin MJ (2018) Rapid Assessment of Contaminants and Interferences in Mass Spectrometry Data Using Skyline. *J Am Soc Mass Spectrom* 29:1327–1330
- Rasmussen B, Davis R, Thomas J, Reddy P (1998) Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO: A serum-free CHO host cell line. *Cytotechnology* 28:31–42
- Rauwel B, Jang SM, Cassano M, Kapopoulou A, Barde I, Trono D (2015) Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *eLife* 4
- Ravikumar V, Macek B, Mijakovic I (2016) Resources for Assignment of Phosphorylation Sites on Peptides and Proteins. *Methods Mol Biol* 1355:293–306
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117:1281–1283
- Reimann L, Schwäble AN, Fricke AL, Mühlhäuser WWD, Leber Y, Lohanadan K, Puchinger MG, Schäuble S, Faessler E, Wiese H, Reichenbach C, Knapp B, Peikert CD, Drepper F, Hahn U, Kreutz C, van der Ven PFM, Radziwill G, Djinić-Carugo K, Fürst DO, Warscheid B (2020) Phosphoproteomics identifies dual-site phosphorylation in an extended basophilic motif regulating FILIP1-mediated degradation of filamin-C. *Commun Biol* 3:253
- Reis ES, Mastellos DC, Yancopoulou D, Risitano AM, Ricklin D, Lambris JD (2015) Applying complement therapeutics to rare diseases. *Clin Immunol* 161:225–240
- Repligen (2020) LONG® R3 IGF-I Cell Culture Supplement. <https://www.repligen.com/technologies/cell-culture-media-supplements/long-r3-igf-i>. Accessed 1 January 2021
- Riley NM, Coon JJ (2016) Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. *Anal Chem* 88:74–94
- Ronda C, Pedersen LE, Hansen HG, Kallehauge TB, Betenbaugh MJ, Nielsen AT, Kildegaard HF (2014) Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnol Bioeng* 111:1604–1616
- Ronsein GE, Pamir N, Haller PD von, Kim DS, Oda MN, Jarvik GP, Vaisar T, Heinecke JW (2014) Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit

- comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *J Proteomics* 0:388–399
- Rosenberger G, Liu Y, Röst HL, Ludwig C, Buil A, Bensimon A, Soste M, Spector TD, Dermitzakis ET, Collins BC, Malmström L, Aebersold R (2017) Inference and quantification of peptidofoms in large sample cohorts by SWATH-MS. *Nat Biotechnol* 35:781–788
- Rossignol M, Keriel A, Staub A, Egly JM (1999) Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor 274:22387–22392
- Roux PP, Thibault P (2013) The coming of age of phosphoproteomics--from large data sets to inference of protein functions. *Mol Cell Proteomics* 12:3453–3464
- Ruan J, Ouyang H, Amaya MF, Ravichandran M, Loppnau P, Min J, Zang J (2012) Structural basis of the chromodomain of Cbx3 bound to methylated peptides from histone h1 and G9a. *PLoS One* 7:e35376
- Rupp O, MacDonald ML, Li S, Dhiman H, Polson S, Griep S, Heffner K, Hernandez I, Brinkroff K, Jadhav V, Samoudi M, Hao H, Kingham B, Goesmann A, Betenbaugh MJ, Lewis NE, Borth N, Lee KH (2018) A reference genome of the Chinese hamster based on a hybrid assembly strategy. *Biotechnol Bioeng* 115:2087–2100
- Russell JJ, Theriot JA, Sood P, Marshall WF, Landweber LF, Fritz-Laylin L, Polka JK, Oliferenko S, Gerbich T, Gladfelter A, Umen J, Bezanilla M, Lancaster MA, He S, Gibson MC, Goldstein B, Tanaka EM, Hu C-K, Brunet A (2017) Non-model model organisms. *BMC Biol* 15:55
- Samaj J, Baluska F, Hirt H (2004) From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J Exp Bot* 55:189–198
- Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141:290–303
- Sánchez-Kopper A, Becker M, Pfizenmaier J, Kessler C, Karau A, Takors R (2016) Tracking dipeptides at work-uptake and intracellular fate in CHO culture. *AMB Express* 6:48
- Santis MC de, Porporato PE, Martini M, Morandi A (2018) Signaling Pathways Regulating Redox Balance in Cancer Metabolism. *Front Oncol* 8:126
- Sarbassov DD, Bulgakova O, Bersimbaev RI, Shaiken T (2012) Isolation of the mTOR complexes by affinity purification. *Methods Mol Biol* 821:59–74
- Satoh M, Nakai A, Sokawa Y, Hirayoshi K, Nagata K (1993) Modulation of the phosphorylation of glucose-regulated protein, GRP78, by transformation and inhibition of glycosylation. *Exp Cell Res* 205:76–83
- Satpathy S, Jaehnig EJ, Krug K, Kim B-J, Saltzman AB, Chan DW, Holloway KR, Anurag M, Huang C, Singh P, Gao A, Namai N, Dou Y, Wen B, Vasaiakar SV, Mutch D, Watson MA, Ma C, Ademuyiwa FO, Rimawi MF, Schiff R, Hoog J, Jacobs S, Malovannaya A, Hyslop T, Clauser KR, Mani DR, Perou CM, Miles G, Zhang B, Gillette MA, Carr SA, Ellis MJ (2020) Microscaled proteogenomic methods for precision oncology. *Nat Commun* 11:532
- Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976
- Schelleter L, Albaum S, Walter S, Noll T, Hoffrogge R (2019) Clonal variations in CHO IGF signaling investigated by SILAC-based phosphoproteomics and LFQ-MS. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:8127–8143
- Schelleter L, Hertel O, Antar SJ, Scherling C, Lättig J, Noll T, Hoffrogge R (2021) A positive pressure workstation for semi-automated peptide purification of complex proteomic samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 35:e8873
- Schilling B, Rardin MJ, MacLean BX, Zawadzka AM, Frewen BE, Cusack MP, Sorensen DJ, Bereman MS, Jing E, Wu CC, Verdin E, Kahn CR, MacCoss MJ, Gibson BW (2012) Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 11:202–214
- Schmidt A, Gehlenborg N, Bodenmiller B, Mueller LN, Campbell D, Mueller M, Aebersold R, Domon B (2008) An integrated, directed mass spectrometric approach for in-depth characterization of complex peptide mixtures. *Mol Cell Proteomics* 7:2138–2150

- Schmidt A, Wippermann A, Hoffrogge R, Noll T (2015) RNAi-mediated knockdown of Dnmt3a enhances antibody titer in CHO cells up to 200 percent. *BMC Proc* 9
- Schmitz J, Noll T, Grünberger A (2019) Heterogeneity Studies of Mammalian Cells for Bioproduction: From Tools to Application. *Trends Biotechnol* 37:645–660
- Schnellbaecher A, Binder D, Bellmaine S, Zimmer A (2019) Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnol Bioeng* 116:1537–1555
- Schubert OT, Gillet LC, Collins BC, Navarro P, Rosenberger G, Wolski WE, Lam H, Amodei D, Mallick P, Maclean B, Aebersold R (2015) Building high-quality assay libraries for targeted analysis of SWATH MS data. *Nat Protoc* 10:426–441
- Seewoster T, Lehmann J (1995) Influence of targeted asparagine starvation on extra- and intracellular amino acid pools of cultivated Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:344–350
- Sehgal SN (2003) Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 35:7S-14S
- Seta KA, Roth RA (1997) Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 231:167–171
- Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JWB, Blenis J, Pende M, Sonenberg N (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25:2781–2791
- Shanmugam AK, Nesvizhskii AI (2015) Effective Leveraging of Targeted Search Spaces for Improving Peptide Identification in Tandem Mass Spectrometry Based Proteomics. *J Proteome Res* 14:5169–5178
- Shao A-w, Sun H, Geng Y, Peng Q, Wang P, Chen J, Xiong T, Cao R, Tang J (2016) Bclaf1 is an important NF- κ B signaling transducer and C/EBP β regulator in DNA damage-induced senescence. *Cell Death Differ* 23:865–875
- Sharma K, D'Souza RCJ, Tyanova S, Schaab C, Wiśniewski JR, Cox J, Mann M (2014) Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep* 8:1583–1594
- Sharma V, Tripathi M, Mukherjee KJ (2016) Application of System Biology Tools for the Design of Improved Chinese Hamster Ovary Cell Expression Platforms
- Shen D, Kiehl TR, Khatkhat SF, Li ZJ, He A, Kayne PS, Patel V, Neuhaus IM, Sharfstein ST (2010) Transcriptomic responses to sodium chloride-induced osmotic stress: a study of industrial fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Prog* 26:1104–1115
- Siddle K (2011) Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 47:R1-10
- Sieber J, Wieder N, Ostrosky-Frid M, Dvela-Levitt M, Aygün O, Udeshi ND, Carr SA, Greka A (2017) Lysine trimethylation regulates 78-kDa glucose-regulated protein proteostasis during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 292:18878–18885
- Sim KH, Liu LC-Y, Tan HT, Tan K, Ng D, Zhang W, Yang Y, Tate S, Bi X (2020) A comprehensive CHO SWATH-MS spectral library for robust quantitative profiling of 10,000 proteins. *Sci Data* 7:263
- Sivanand S, Rhoades S, Jiang Q, Lee JV, Benci J, Zhang J, Yuan S, Viney I, Zhao S, Carrer A, Bennett MJ, Minn AJ, Weljie AM, Greenberg RA, Wellen KE (2017) Nuclear Acetyl-CoA Production by ACLY Promotes Homologous Recombination. *Mol Cell* 67:252-265.e6
- Skipper KA, Hollensen AK, Antoniou MN, Mikkelsen JG (2019) Sustained transgene expression from sleeping beauty DNA transposons containing a core fragment of the HNRPA2B1-CBX3 ubiquitous chromatin opening element (UCOE). *BMC Biotechnol* 19
- Slade PG, Hajivandi M, Bartel CM, Gorfien SF (2012) Identifying the CHO secretome using mucin-type O-linked glycosylation and click-chemistry. *J Proteome Res* 11:6175–6186
- Sommeregger W, Mayrhofer P, Steinfellner W, Reinhart D, Henry M, Clynes M, Meleady P, Kunert R (2016) Proteomic differences in recombinant CHO cells producing two similar antibody fragments. *Biotechnol Bioeng* 113:1902–1912
- Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M (2008) Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine* 42:265–276

- Song Y, Shi X, Zou Y, Guo J, Huo N, Chen S, Zhao C, Li H, Wu G, Peng Y (2020) Proteome-wide identification and functional analysis of ubiquitinated proteins in peach leaves. *Sci Rep* 10:2447
- Stavraka C, Blagden S (2015) The La-Related Proteins, a Family with Connections to Cancer. *Biomolecules* 5:2701–2722
- Stolfa G, Smonskey MT, Boniface R, Hachmann A-B, Gulde P, Joshi AD, Pierce AP, Jacobia SJ, Campbell A (2018) CHO-Omics Review: The Impact of Current and Emerging Technologies on Chinese Hamster Ovary Based Bioproduction. *Biotechnol J* 13:e1700227
- Svozil J, Baerenfaller K (2017) A Cautionary Tale on the Inclusion of Variable Posttranslational Modifications in Database-Dependent Searches of Mass Spectrometry Data. In: *Proteomics in Biology, Part B*. Elsevier, pp 433–452
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering C von (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47:D607-D613
- Tan HWS, Sim AYL, Long YC (2017) Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. *Nat Commun* 8:338
- Tang X, Hui Z-g, Cui X-l, Garg R, Kastan MB, Xu B (2008) A Novel ATM-Dependent Pathway Regulates Protein Phosphatase 1 in Response to DNA Damage ∇ †. *Mol Cell Biol* 28:2559–2566
- Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin EL, Lavoie G, Gygi SP, Roux PP (2014) Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation. *Genes Dev* 28:357–371
- Thapar R (2015) Roles of Prolyl Isomerases in RNA-Mediated Gene Expression. *Biomolecules* 5:974–999
- Tharmalingam T, Ghebeh H, Wuerz T, Butler M (2008) Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Mol Biotechnol* 39:167–177
- Thaysen-Andersen M, Kolarich D, Packer NH (2020) Glycomics & Glycoproteomics: From Analytics to Function. *Mol Omics*.
- The M, MacCoss MJ, Noble WS, Käll L (2016) Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0. *J Am Soc Mass Spectrom* 27:1719–1727
- Thermo Fisher Scientific (2015) Thermo Scientific Cold Storage Tubes and Accessories. Everything you need to protect your samples. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Cryopreservation-Cryo-tubes-BRLSPCRYOCOMB-EN.pdf>. Accessed 1 January 2021
- Thingholm TE, Larsen MR (2016) The Use of Titanium Dioxide for Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides. *Methods Mol Biol* 1355:135–146
- Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AKA, Hamon C (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 75:1895–1904
- Tiwarly S, Levy R, Gutenbrunner P, Salinas Soto F, Palaniappan KK, Deming L, Berndl M, Brant A, Cimercancic P, Cox J (2019) High-quality MS/MS spectrum prediction for data-dependent and data-independent acquisition data analysis. *Nat Methods* 16:519–525
- Torkashvand F, Mahboudi F, Vossoughi M, Fatemi E, Moosavi Basri SM, Vaziri B (2018) Quantitative Proteomic Analysis of Cellular Responses to a Designed Amino Acid Feed in a Monoclonal Antibody Producing Chinese Hamster Ovary Cell Line 22:385–393
- Toronjo Urquiza L, James DC, Nagy T, Falconer RJ (2019) Screening Naturally Occurring Phenolic Antioxidants for Their Suitability as Additives to CHO Cell Culture Media Used to Produce Monoclonal Antibodies. *Antioxidants (Basel)* 8
- Toronjo-Urquiza L, Acosta-Martin AE, James DC, Nagy T, Falconer RJ (2020) Resveratrol addition to Chinese hamster ovary cell culture media: The effect on cell growth, monoclonal antibody synthesis, and its chemical modification. *Biotechnol Prog* 36:e2940
- Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-Uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H, Müller D (2006) Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT,

- pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 94:1033–1044
- Tubaon RM, Haddad PR, Quirino JP (2017) Sample Clean-up Strategies for ESI Mass Spectrometry Applications in Bottom-up Proteomics: Trends from 2012 to 2016. *Proteomics* 17
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116–5121
- Tyanova S, Cox J (2018) Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. *Methods Mol Biol* 1711:133–148
- Tyanova S, Temu T, Carlson A, Sinitcyn P, Mann M, Cox J (2015) Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics* 15:1453–1456
- Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11:2301–2319
- UniProt Consortium T (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 46:2699
- Vaquero J, Nguyen Ho-Bouloires TH, Clapéron A, Fouassier L (2017) Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance. *Oncogene* 36:3067–3079
- Verity Software House (o. J.) ModFit LT Version 4.1.
<http://www.vsh.com/products/mflt/mfTrialVersions.asp>. Accessed 15 October 2016
- Vishnyakova KS, Babizhayev MA, Aliper AM, Buzdin AA, Kudryavzeva AV, Yegorov YE (2014) Stimulation of cell proliferation by carnosine: Cell and transcriptome approaches 48:718–726
- Vizcaíno JA, Csordas A, del-Toro N, Dianas JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q-W, Wang R, Hermjakob H (2015) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 44:D447-56
- Vodopivec M, Lah L, Narat M, Curk T (2019) Metabolomic profiling of CHO fed-batch growth phases at 10, 100, and 1,000 L. *Biotechnol Bioeng* 116:2720–2729
- Vomastek T, Iwanicki MP, Burack WR, Tiwari D, Kumar D, Parsons JT, Weber MJ, Nandicoori VK (2008) Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (ERK2) Phosphorylation Sites and Docking Domain on the Nuclear Pore Complex Protein Tpr Cooperatively Regulate ERK2-Tpr Interaction ∇ . *Mol Cell Biol* 28:6954–6966
- Walker JM (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press Inc, Totowa, NJ
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36:1136–1145
- Wang Y, Begley M, Li Q, Huang H-T, Lako A, Eck MJ, Gray NS, Mitchison TJ, Cantley LC, Zhao JJ (2016) Mitotic MELK-eIF4B signaling controls protein synthesis and tumor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:9810–9815
- Wang Y, Ding Q, Yen C-J, Xia W, Izzo JG, Lang J-Y, Li C-W, Hsu JL, Miller SA, Wang X, Lee D-F, Hsu J-M, Huo L, Labaff AM, Liu D, Huang T-H, Lai C-C, Tsai F-J, Chang W-C, Chen C-H, Wu T-T, Buttar NS, Wang KK, Wu Y, Wang H, Ajani J, Hung M-C (2012) The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* 21:374–387
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16:1090–1094
- Waters (2016) Sep-Pak C18 1 cc Vac Cartridge.
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT054955>. Accessed 6 September 2016
- Wei P-C, Hsieh Y-H, Su M-I, Jiang X-J, Hsu P-H, Lo W-T, Jeng Y-M, Wang J-M, Chen P-I, Chang Y-C, Lee K-F, Tsai M-D, Shew J-Y, Lee W-H (2012) Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease. *Mol Cell* 48:747–759
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324:1076–1080
- Wen B, Zeng W-F, Liao Y, Shi Z, Savage SR, Jiang W, Zhang B (2020) Deep Learning in Proteomics. *Proteomics* 20:e1900335

- Westermeier R, Naven T, Höpker H-R (2008) *Proteomics in Practice. A Guide to Successful Experimental Design*. Wiley-VCH, Hoboken
- Widbiller M, Schweikl H, Bruckmann A, Rosendahl A, Hochmuth E, Lindner SR, Buchalla W, Galler KM (2019) Shotgun Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. *Sci Rep* 9:4457
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 14:61–65
- Williams GR, Bethard JR, Berkaw MN, Nagel AK, Luttrell LM, Ball LE (2016) Exploring G protein-coupled receptor signaling networks using SILAC-based phosphoproteomics. *Methods* 92:36–50
- Wilson GM, Blanco R, Coon JJ, Hornberger TA (2018) Identifying Novel Signaling Pathways: An Exercise Scientists Guide to Phosphoproteomics. *Exerc Sport Sci Rev* 46:76–85
- Wingens M, Gätgens J, Schmidt A, Albaum SP, Büntemeyer H, Noll T, Hoffrogge R (2015) 2D-DIGE screening of high-productive CHO cells under glucose limitation—Basic changes in the proteome equipment and hints for epigenetic effects *201:86–97*
- Wippermann A, Klausing S, Rupp O, Albaum SP, Buntmeyer H, Noll T, Hoffrogge R (2014) Establishment of a CpG island microarray for analyses of genome-wide DNA methylation in Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:579–589
- Wippermann A, Noll T (2017) DNA methylation in CHO cells *258:206–210*
- Wippermann A, Rupp O, Brinkrolf K, Hoffrogge R, Noll T (2015) The DNA methylation landscape of Chinese hamster ovary (CHO) DP-12 cells *199:38–46*
- Wippermann A, Rupp O, Brinkrolf K, Hoffrogge R, Noll T (2016) Integrative analysis of DNA methylation and gene expression in butyrate-treated CHO cells
- Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L (2013) Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell* 152:791–805
- Wisniewski JR (2016) Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal Chem* 88:5438–5443
- Wisniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M (2014) A "proteomic ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol Cell Proteomics* 13:3497–3506
- Wisniewski JR, Rakus D (2014) Multi-enzyme digestion FASP and the 'Total Protein Approach'-based absolute quantification of the *Escherichia coli* proteome. *J Proteomics* 109:322–331
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6:359–362
- Wlaschin KF, Hu W-S (2006) Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 101:43–74
- Wong DCF, Wong KTK, Lee YY, Morin PN, Heng CK, Yap MGS (2006a) Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 94:373–382
- Wong DCF, Wong KTK, Nissom PM, Heng CK, Yap MGS (2006b) Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 95:350–361
- Wu CI, Li WH (1985) Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1741–1745
- Wurm FM, Jesus M de (2016) Manufacture of Recombinant Therapeutic Proteins Using Chinese Hamster Ovary Cells in Large-Scale Bioreactors. In: Liu C, Morrow KJ (ed) *Biosimilars of Monoclonal Antibodies*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 327–353
- Xie Z, Baba SP, Sweeney BR, Barski OA (2013) Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: from chemistry to clinical implications. *Chem Biol Interact* 202:288–297
- Xu N, Ma C, Ou J, Sun WW, Zhou L, Hu H, Liu XM (2017a) Comparative Proteomic Analysis of Three Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cells. *Biochem Eng J* 124:122–129

- Xu S, Liu C-X, Xu W, Huang L, Zhao J-Y, Zhao S-M (2017b) Butyrate induces apoptosis by activating PDC and inhibiting complex I through SIRT3 inactivation. *Signal Transduct Target Ther* 2:16035
- Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* 29:735–741
- Yan D, Wang H-W, Bowman RL, Joyce JA (2016) STAT3 and STAT6 signaling pathways synergize to promote cathepsin secretion from macrophages via IRE1 α activation. *Cell Rep* 16:2914–2927
- Yang F, Li S, Cheng Y, Li J, Han X (2020a) Karyopherin α 2 promotes proliferation, migration and invasion through activating NF- κ B/p65 signaling pathways in melanoma cells. *Life Sci* 252:117611
- Yang F, Shen Y, Camp DG, Smith RD (2012) High-pH reversed-phase chromatography with fraction concatenation for 2D proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 9:129–134
- Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE (2015) A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* 12:937–943
- Yang J, Zhang H, Gong W, Liu Z, Wu H, Hu W, Chen X, Wang L, Wu S, Chen C, Perrett S (2020b) S-Glutathionylation of human inducible Hsp70 reveals a regulatory mechanism involving the C-terminal α -helical lid. *J Biol Chem* 295:8302–8324
- Yi J-M, Huan X-J, Song S-S, Zhou H, Wang Y-Q, Miao Z-H (2016) Triptolide Induces Cell Killing in Multidrug-Resistant Tumor Cells via CDK7/RPB1 Rather than XPB or p44. *Mol Cancer Ther* 15:1495–1503
- Yuan Z-F, Sidoli S, Marchione DM, Simithy J, Janssen KA, Szurgot MR, Garcia BA (2018) EpiProfile 2.0: A Computational Platform for Processing Epi-Proteomics Mass Spectrometry Data. *J Proteome Res* 17:2533–2541
- Zagari F, Jordan M, Stettler M, Broly H, Wurm FM (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol* 30:238–245
- Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11–18
- Zhang C, Liu Y, Andrews PC (2013) Quantification of histone modifications using 15N metabolic labeling. *Methods* 61:236–243
- Zhang C, Wang Y, Zhu Y, Liu C, Gu C, Xu S, Wang Y, Zhou Y, Wang Y, Han W, Hong X, Yang Y, Zhang X, Wang T, Xu C, Hong Q, Wang S, Zhao Q, Qiao W, Zang J, Kong L, Wang F, Wang H, Di Qu, Lavillette D, Tang H, Deng Q, Xie Y, Cong Y, Huang Z (2021) Development and structural basis of a two-MAb cocktail for treating SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* 12:264
- Zhang Z, Miao L, Wu X, Liu G, Peng Y, Xin X, Jiao B, Kong X (2014a) Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells by Retarding Akt/mTOR/p70S6K Signaling. *J Cancer* 5:382–389
- Zhang Z, Miao L, Xin X, Zhang J, Yang S, Miao M, Kong X, Jiao B (2014b) Underexpressed CNDP2 participates in gastric cancer growth inhibition through activating the MAPK signaling pathway. *Mol Med* 20:17–28
- Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AFJ, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K, Joly J, Snedecor B, Shen A (2011) Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases 153:27–34
- Zolg DP, Wilhelm M, Schnatbaum K, Zerweck J, Knaute T, Delanghe B, Bailey DJ, Gessulat S, Ehrlich H-C, Weininger M, Yu P, Schlegl J, Kramer K, Schmidt T, Kusebauch U, Deutsch EW, Aebersold R, Moritz RL, Wenschuh H, Moehring T, Aiche S, Huhmer A, Reimer U, Kuster B (2017) Building ProteomeTools based on a complete synthetic human proteome. *Nat Methods* 14:259–262
- Zubarev RA, Makarov A (2013) Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem* 85:5288–5296

