

Diss. ETH No. 13679

**Characterization of Low Temperature Response and Cyclin A
Isoforms in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells: Implications for
Biotechnology**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Hitto Kaufmann
Dipl. Biotechnologe, Technische Universität Braunschweig
born September 20, 1970
citizen of Germany

Prof. Dr. H. M. Eppenberger, examiner
Prof. Dr. S. Werner, co-examiner
Dr. Martin Fussenegger, co-examiner

Zürich 2000

SUMMARY

Mammalian cells are widely used for production of therapeutic proteins. A major aim of this thesis was the investigation of the potential of low temperature to establish controlled proliferation production processes. In batch cultures of a Chinese hamster ovary (CHO)-derived production cell line it was shown that the specific productivity increased moderately upon shift of cells from 37°C to 30°C. Low temperature allowed extended cultivation times and resulted in a 3.4-fold higher overall product yield. The glycosylation profile of the model protein secreted alkaline phosphatase (SEAP) showed an increased degree of sialylation, pointing to a beneficial effect of low temperature on product quality.

Two-dimensional gel electrophoresis revealed up- and downregulation of a distinct set of proteins upon exposure of CHO cells to 30°C, suggesting a specific response to low temperature in mammalian cells.

The production cell lines used in this work expressed SEAP in a tetracycline repressible manner to allow separation of the controlled proliferation bioprocess in a growth and a production phase. It was demonstrated that the key regulator of the tetracycline gene regulation system tTA is dramatically induced by a temperature shift from 37°C to 30°C. This upregulation occurred at the mRNA level and is probably independent of the promoter background. These data provide evidence that mRNA stability might be involved in a specific molecular response to low temperature in mammalian cells.

Another project was focused on a novel proteolytic system capable of cleaving of cyclin A that has previously been described only in cell-free assays. In this thesis it was shown that in cultured mammalian cells cleavage of cyclin A leads to a N-terminally truncated isoform, cyclin A^t. High cell density and DMSO were demonstrated to lead to increased cyclin A^t levels. Although p27 has been shown to induce cyclin A cleavage *in vitro*, experiments in cells that conditionally express p27 upon tetracycline withdrawal indicate that it does not

play a role *in vivo*. In contrast to full length cyclin A, cyclin A^t is localized to the cytoplasm. Finally, the truncated cyclin A was shown to interact with Cdk2 and p107. A model in which cyclin A^t functions to sequester Cdk2 protein complexes to the cytoplasm was proposed.

This thesis describes the methodology of a functional genomic approach to analyze protein phosphorylation on a large scale. Antibodies specific to phosphorylation on threonine, serine and tyrosine are used to detect phosphoproteins that were separated by two-dimensional gel electrophoresis.

ZUSAMMENFASSUNG

Heute werden viele Protein-Therapeutika mit Hilfe von Säugetierzellen produziert. Ein Thema dieser Arbeit beinhaltete die Untersuchung des Potentials von Zellkultivierung bei niedrigen Temperaturen hinsichtlich der Etablierung von Produktionsprozessen in denen das Wachstum der Zellen kontrolliert wird. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die spezifische Produktivität von Chinese hamster ovary (CHO) Zellen in 'Batchkultivierungen' erhöht, wenn die Temperatur von 37°C auf 30°C gesenkt wird. Die niedrige Temperatur erlaubte längere Kultivierungen und resultierte in einer drei bis vierfach höheren insgesamten Produktmenge verglichen mit Standard Kultivierungen. Die Analyse des Glykosylierungsprofils des Modellproteins secreted alkaline phosphatase (SEAP) zeigte, dass Der Grad der Sialylierung des Proteins bei niedriger Temperatur höher ist. Dies könnte bedeuten, dass Kultivierung bei niedrigen Temperaturen einen positiven Effekt auf die Produktqualität hat.

Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese, konnte gezeigt werden, dass sich der Expressionslevel bestimmter Proteine verändert, wenn die Zellen bei 30°C kultiviert werden. Dies lässt eine spezifische molekulare Reaktion der Zellen auf die niedrige Umgebungstemperatur vermuten. In den Produktionszelllinien, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, kann die Expressionsrate von SEAP durch Tetrazyklin reguliert werden. Dies ermöglicht die Trennung von Produktions Prozessen bei denen das Wachstum der Zellen kontrolliert werden soll in eine Wachstums- und eine Produktionsphase. Es konnte gezeigt werden, dass tTA, ein Schlüsselprotein des Tetrazyklin-Genregulationssystems, stark durch senken der Temperatur von 37°C auf 30°C induziert wird. Dieser Effekt ist auf der Ebene der mRNA sichtbar und scheint nicht von einem bestimmten Promoter abzuhängen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stabilität der mRNA eine Rolle bei spezifischen intrazellulären Veränderungen aufgrund niedriger Temperatur spielt.

Inhalt eines zweiten Projektes war die Untersuchung eines neuen

proteolytischen Systems verantwortlich für die Trunkierung von cyclin A. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung von cyclin A in CHO Zellen zu einer aminoterminal trunkierten Form dieses Proteins, cyclin A^t, führt. Die intrazelluläre Menge von cyclin A^t steigt mit zunehmender Zelldichte und durch Zugabe von DMSO in das Kulturmedium an. Obwohl *in vitro* gezeigt wurde, dass p27 die N-terminale Spaltung von cyclin A induziert, zeigen Experimente mit Zellen die p27 regulierbar exprimieren, dass p27 *in vivo* kein Bestandteil des untersuchten proteolytischen Systems ist. Im Gegensatz zu cyclin A, ist cyclin A^t im Zytoplasma der Zellen zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass cyclin A^t mit den cyclin A Bindungspartnern p107 und Cdk2 interagiert. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde postuliert, dass eine mögliche Funktion des trunkierten cyclin A Proteins darin liegen könnte, Cdk2 Proteinkomplexe vom Zellkern zum Zytoplasma zu translozieren.

Diese Arbeit beschreibt abschliessend eine Methode zur funktionellen Genomanalyse. Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern und zweidimensionaler Gelelektrophorese soll die schnelle Analyse der Expressionslevel von phosphorylierten Proteinen im grossen Masstab ermöglicht werden.