

„Untersuchungen zur optimalen Kultivierung
von *Leishmania tarentolae*“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

Genehmigt durch das

Zentrum für Ingenieurwissenschaften
als organisatorische Grundeinheit für Forschung und Lehre im Range einer Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von

Frau Claudia Lieselotte Ella Fritsche
Geboren am 01.02.1981 in Bad Frankenhausen

Geschäftsführender Direktor (Dekan): Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. H. Altenbach

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Pietzsch
2. Prof. Dr.-Ing. H.-D. Pohl

Halle (Saale), den 17.12.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000015283

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015283>]

INHALTSVERZEICHNIS

<u>Publikationen</u>	<u>IV</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>VI</u>
1 Einleitung	1
1.1 Eukaryotische Expressionssysteme in der Biotechnologie	1
1.2 <i>Trypanosomatidae</i> als Expressionssysteme – Grundlagen	4
1.3 Das Expressionssystem <i>Leishmania tarentolae</i>	5
1.4 <i>Leishmania</i> Spezies im Allgemeinen	7
1.5 Nährmedien für die <i>Leishmania</i> Spezies	9
1.6 Rekombinante Proteine	14
1.6.1 Hyaluronidase (Hyal-1).....	14
1.6.2 Oberflächenantigen (SAG2) von <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.6.3 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).....	16
2 Zielstellung.....	17
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Stämme von <i>L. tarentolae</i>	19
3.2 Kultivierung von <i>L. tarentolae</i>	19
3.3 Methoden zur Wachstumskontrolle.....	25
3.4 Bestimmung der Heminkonzentration	27
3.5 Gewinnung rekombinanter Proteine für die Analytik	29
3.6 Proteinanalytik	30
3.7 Methoden der faktoriellen Versuchsplanung	31
3.8 Bewertung von Modellanpassungen.....	34
4 Ergebnisse	35
TEIL A: ERMITTlung STATISCHER PROZESSPARAMETER	35
4.1 Nährmedienentwicklung – von komplex zu definiert.....	35
4.1.1 Komplexe Nährmedien mit „animal-derived“ Komponenten.....	36

Inhaltsverzeichnis

4.1.2 Faktorielle Versuchsplanung zur Reduzierung von „animal-derived“ Komponenten.....	39
4.1.3 Das komplexe YE-Medium.....	41
4.1.4 Entwicklung der definierten Nährmedien SFP(I) und (II).....	44
4.2 Primäre Energiequelle – Glukose	48
4.2.1 Ertragskoeffizienten $Y_{X/GIC}$, $Y_{N/GLC}$	50
4.2.2 Alternative C-Quellen	51
4.3 Essentielle Eisenquelle – Hemin	51
4.3.1 Heminanalytik.....	52
4.3.2 Ertragskoeffizienten $Y_{X/H}$ und $Y_{N/H}$	57
4.3.3 Heminspeicher	58
4.3.4 Alternative Eisenquellen.....	60
TEIL B: ERMITTLUNG DYNAMISCHER PROZESSPARAMETER.....	61
4.4 $\mu = f(Temperatur)$.....	61
4.4.1 $\mu(T)$ für Komplexmedium.....	61
4.4.2 Bioreaktorkultivierungen bei 26 und 30°C	63
4.4.3 Temperatureinfluss in den definierten Medien SFP(II) und SFP(III)	64
4.5 $\mu, v = f(pH)$.....	65
4.6 $\mu = f(Glukose)$	69
4.6.1 Limitationsbereich durch Kultivierung im Chemostaten	69
4.6.2 Inhibitionskonzentration der Glukose	74
4.7 $\mu = f(Hemin)$	76
TEIL C: STRATEGIEN ZUR PROZESSFÜHRUNG	79
4.8 Bioreaktorauswahl	79
4.9 pH-Regelung	80
4.10 Batch-Kultivierung mit YE-Medium	80
4.11 Zudosagestrategien für hohe Zelldichten im Komplexmedium.....	80
4.11.1 Effekte der Zudosage der primären C-Quelle Glukose	81
4.11.2 Effekte einer einmaligen Zudosage von Nährmedienkonzentrat.....	82
4.11.3 Mehrfache Zudosagen von Nährmedienkonzentrat	84
4.12 Strategien für das definierte Nährmedium.....	92
4.12.1 Ausbeutesteigerung durch Fraktion „Pool 5“.....	92
4.12.2 Ausbeutesteigerung durch Hefe-RNA	93

Inhaltsverzeichnis

TEIL D: EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN	101
4.13 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).....	101
4.14 Oberflächenantigen (SAG2) von <i>Toxoplasma gondii</i>	101
4.15 Hyaluronidase (Hyal-1)	108
5 Diskussion	113
5.1 Ermittlung statischer Prozessparameter	113
5.2 Ermittlung dynamischer Prozessparameter.....	120
5.3 Strategien zur Prozessführung	127
5.4 Expression von rekombinanten Proteinen	131
6 Zusammenfassung.....	134
7 Summary	139
8 Ausblick.....	143
9 Anhang	145
10 Literatur	166

Lebenslauf

Danksagung

Selbstständigkeitserklärung

PUBLIKATIONEN

Fritsche, C., Sitz, M., Wolf, M., Pohl, H.-D. (200X) Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. Journal of Basic Microbiology, (in press).

Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R., Pohl, H.-D. (2007) Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* – a new expression system for recombinant proteins. Journal of Basic Microbiology, 47, 384-393.

Fritsche, C., Wolf, M., Rupprecht, S., Pohl, H.-D. (2007) Cultivation of *Leishmania tarentolae* in complex nutrient media in bioreactors (lab scale). In: Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2007 in Osnabrück, Biospektrum Sonderausgabe, S. 51.

Fritsche, C. & Pohl, H.-D. (2007) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* in LEXSY-Broth YS-Medium. In: Tagungsband zur 8. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, Fachhochschule Jena, ISBN 3-932886-15-1, S. 92-96.

Pohl, H.-D., Fritsche, C., Weiland, N., Sitz, M. (2006/2007) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* in einer kontinuierlichen Prozessführung. Forschungsbericht, Fachhochschule Jena, ISBN 978-3-932886-17-1, S. 55-56.

Fritsche, C. & Pohl, H.-D. (2006) Kultivierung des Parasiten *Leishmania tarentolae* im Laborfermenter. In: Tagungsband zur 7. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz Mitteldeutscher Fachhochschulen, Fachhochschule Harz, Wernigerode, ISBN 3-00-018148-2, S. 231-232.

Pohl, H.-D., Fritsche, C., Weiland, N., Rupprecht, S. (2005) Nährmedienuntersuchungen zur Kultivierung von *Leishmania tarentolae*. Forschungsbericht, Fachhochschule Jena, S. 54.

Vorträge

Fritsche, C., Wolf, M., Rupprecht, S., Pohl, H.-D. (2007) Cultivation of *Leishmania tarentolae* in complex nutrient media in bioreactors (lab scale). Vortrag, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Osnabrück, 01.-04. April.

Fritsche, Claudia (2007) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* in LEXSY-Broth YS-Medium. Vortrag, 8. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, Fachhochschule Jena, 26. Januar.

Fritsche, C. (2005) Kultivierung des Parasiten *Leishmania tarentolae*. Vortrag, Tag der Forschung, Fachhochschule Jena, 09. November.

Publikationen

Poster

Fritsche, C. & Pohl, H.-D. (2006) Kultivierung des Parasiten *Leishmania tarentolae* im Laborfermenter. Posterbeitrag, 7. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz Mitteldeutscher Fachhochschulen, Fachhochschule Harz, Wernigerode, 20. Januar.

Patent

Titel: Nährmedium und Verfahren zur Kultivierung eines Protozoan zu hohen Zelldichten mit hohen spezifischen Wachstumsraten

Anmelder: Fachhochschule Jena

Erfinder: Fritsche, C., Pohl, H.-D., Weiland, N.

Meldung: 29.08.2006 beim Deutschen Patentamt

Offenlegung: 20.03.2008

Sonstiges

Titelbild, Journal of Basic Microbiology, Vol. 47, 2007.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemeine Abkürzungen

konst. konstant

Beschreibung des Wachstums

t	Zeit [h]
Δt	Zeitintervall [h]
t_{exp}	Zeitspanne des exponentiellen Wachstums [h]
V	Volumen [ml; l]
T	Temperatur [°C]
$\text{OD}_{600\text{nm}}$	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge [-]
TBM	Trockenbiomasse, berechnet aus der Optischen Dichte [g]
X	Biomassekonzentration [g/l TBM]
X_0	Biomassekonzentration zum Startzeitpunkt [g/l TBM]
X_{max}	maximale Biomassekonzentration [g/l TBM]
ΔX	Biomassekonzentrationsänderung [g/l TBM]
N	Zelldichte [Zellen/ml]
N_0	Zelldichte zum Startzeitpunkt [Zellen/ml]
N_{exp}	maximale Zelldichte während des exponentiellen Wachstums [Zellen/ml]
N_{max}	maximale Zelldichte [Zellen/ml]
ΔN	Zellzahländerung [Zellen/ml]
μ	spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
ν	spezifische Zellteilungsrate [h^{-1}]
ν_{max}	maximale spezifische Zellteilungsrate [h^{-1}]
g_{exp}	Anzahl der Generationen während des exponentiellen Wachstums [-]
g_{ges}	Gesamtanzahl der Generationen [-]
t_D	Verdopplungszeit [h]
GLC	Glukosekonzentration [g/l]
GLC_{zu}	Glukosekonzentration in der Vorlage [g/l]
H	Heminkonzentration [g/l]
$Y_{N/\text{GLC}}$	Ertragskoeffizient Zellzahländerung pro Massenänderung Glukose für ein definiertes V [Anzahl der Zellen / g Glukose], Nebenbedingung: $\nu = \text{konstant}$
$Y_{X/\text{GLC}}$	Ertragskoeffizient Biomasseänderung pro Massenänderung Glukose für ein definiertes V [g TBM / g Glukose], Nebenbedingung: $\mu = \text{konstant}$

Abkürzungsverzeichnis

$Y_{X/H}$	Ertragskoeffizient Biomasseänderung pro Heminmasseänderung für ein definiertes V [g TBM / g Hemin], Nebenbedingung: $\mu = \text{konstant}$
D	Verdünnungsrate [h^{-1}]
F_{zu}	Zuflussvolumenstrom des Nährmediums aus der Vorlage [ml/h]
V_R	Reaktorvolumen [ml]
k_{L^*a}	maximalen spezifischen Sauerstofftransportkoeffizienten [h^{-1}]

Heminanalytik

PA_{korr}	korrigierte Peakfläche nach Kompensation der Basislinie [$\text{A}^* \text{nm}$]
λ	Wellenlänge [nm]

Faktorielle Versuchsplanung und Bewertung der Modellanpassung

x_n	Einflussgrößen, experimentelle Werte
\hat{Y}	Modell, errechnet aus den experimentellen Werten x_n
a_n	Parameter zum Modell \hat{Y}
e_n	normierte Einflussgrößen
\hat{Y}	Modell, errechnet aus den normierten Werten e_n
b_n	Parameter zum Modell \hat{Y}
S_e	Restsumme der Fehlerquadrate
φ_e	Freiheitsgrad zur Schätzung der Versuchsstreuung
n	Anzahl der Versuche an der Stelle i
\hat{y}^i	Einzelmesswert an der Stelle i
\bar{y}^i	Mittelwert der Messungen
\hat{y}^i	der Modellwert an der Stelle i
S_D	Defektquadratsumme
φ_D	Freiheitsgrad zur Bestimmung der Modell
N	Anzahl der Versuche des Versuchsplanes
k	Anzahl der geschätzten Parameter des Modells
P	Signifikanzniveau
F_{krit}	kritischer Wert der F-verteilten zufälligen Veränderlichen zur Überprüfung der Adäquatheitshypothese des Modells
R	Korrelationskoeffizient [-]

1 Einleitung

1.1 Eukaryotische Expressionssysteme in der Biotechnologie

Im Jahre 1982 wurde mit humanem Insulin, hergestellt in *Escherichia coli* (*E. coli*), das erste gentechnisch hergestellte Medikament zugelassen. Seitdem ist die Produktion von humanen Proteinen in Bakterien, Hefen oder Zellkulturen eine etablierte und anerkannte Verfahrensweise in der modernen Biotechnologie.

Je nach Komplexität der rekombinanten Proteine kommen unterschiedliche Expressionssysteme zur Anwendung. Die Prokaryoten, insbesondere das Bakterium *E. coli*, zeichnen sich durch geringe Anforderungen an Nährmedien, sowie hohe Wachstums- und Expressionsraten, aus. Nachteilig ist das Fehlen geeigneter Mechanismen zur posttranslationalen Modifikation, vor allem der Glykosilierung. Problematisch ist der Mangel an Disulfidbrücken bei zytoplasmatisch exprimierten Proteinen, welche erst nach Sekretion ins Periplasma gebildet werden können. Weiterhin schwierig ist die Bildung von Einschlusskörpern (Inclusion bodies). Erst durch verschiedene Methoden der Proteinrückfaltung können die Proteine wieder in die aktive Form gebracht werden. Sind diese Modifikationen für die Funktionalität des rekombinanten Proteins erforderlich, kommen meist Eukaryoten wie beispielsweise CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) oder Hefen zum Einsatz.

Tab. 1-1: Allgemeiner Vergleich eukaryotischer Expressionssysteme, nach Sodoyer [1], modifiziert und übersetzt aus dem Englischen.

System	Vorteile	Nachteile	Scale-up-Möglichkeiten	Kosten-effektivität	Entwicklungsstatus
Hefen	- Biomasse - Sekretion	- Glykosilierungsprofil	sehr gut	gering bis moderat	Produktion
Säugerzellen	- Sekretion - verwendbar für komplexe Moleküle	- Additive - geringer Ertrag	gut	hoch bis sehr hoch	Produktion
Insektenzellen	- hoher Ertrag - einfache Medien - virussicher	- Glykosilierungsprofil	gut	hoch	Produktion/Entwicklung
Pflanzen	- Biomasse - Sekretion - virussicher	- Glykosilierungsprofil	unbegrenzt	gering	Produktion/Entwicklung
Transgene Tiere	- verwendbar für komplexe Moleküle	- zeitaufwendig - begrenzt auf Mehrwertprodukte	abhängig von der Tiergröße	sehr teuer	Forschung/Entwicklung
Unkonventionelle Hefen	- Wachstum unter extremen Bedingungen/ auf Abfallstoffen	- Genetik muss noch untersucht werden	gut (noch zu bestätigen)	gering bis moderat (noch zu bestätigen)	Forschung
Trypanosomatidae	- Glykosilierung entspricht dem Säugertyp	- Genetik muss noch untersucht werden	mittlere (noch zu bestätigen)	hoch bis sehr hoch	Entwicklung

Einleitung

Der Review-Artikel von Sodoyer [1] beschäftigt sich mit dem Unterfangen, einen Überblick über konventionelle und alternative Expressionssysteme zu geben. Als Auszug ist die Tabelle (Tab. 1-1) gezeigt. Die Aufstellung einer solchen Liste ist schwierig, da die Entwicklung und Optimierung von Expressionssystemen ein sehr dynamisches Feld darstellt. Im Labormaßstab wird eine Vielzahl von Systemen verwendet, z. B. die Amöbe *Dictyostelium discoideum* oder die Ciliaten-Spezies *Tetrahymena*, jedoch sind im Produktionsmaßstab nur wenige von Bedeutung und etabliert. Darüber hinaus wird an der Nutzung zellfreier Expressionssysteme geforscht.

Die rekombinante Herstellung von Glykoproteinen ist eine komplizierte Aufgabe in der Biotechnologie. Wie in Tab. 1-1 deutlich wird, ist das Glykosilierungsprofil eines der Hauptprobleme der verwendeten Expressionssysteme. Die Glykosilierung ist eine der wichtigsten Proteinmodifizierungen im Anschluss an die Translation. Das Glykosilierungsmuster kann entscheidend sein für die biologische Aktivität und die Vermeidung von schwerwiegenden Entzündungs- und allergischen Reaktionen des Menschen [2, 3]. Weiterhin können die pharmakokinetischen Parameter des Glykoproteins negativ beeinflusst werden [3], so haben beispielsweise Glykoproteine ohne endständige Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure) eine verkürzte Halbwertszeit im Blut [4].

Glykoproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle durch enzymatische Verknüpfung von Oligosacchariden an die Polypeptidkette hergestellt [5]. Die Kopplung erfolgt entweder O-glykosidisch an die Hydroxyl-Gruppe der Aminosäuren L-Serin oder L-Threonin oder N-glykosidisch an den Amid-Stickstoff des L-Asparagins. Bei der N-glykosidischen Bindung ist stets das N-Acetyl- β -D-Glucosamin (GlcNAc) der erste auftretende Zuckerbaustein an der Peptidsignalstruktur [6]. Anschließend werden weitere Zucker wie Mannose, Glukose und GlcNAc kovalent gebunden. Im weiteren Prozess im ER und Golgi-Apparat können einige dieser Zucker wieder abgespalten und auch Fucose und Sialinsäure übertragen werden. Diese Reaktionen führen zu einer erheblichen Mikroheterogenität und Diversität der Glykosilierungsreaktion [5]. Die Glykosilierung ist darüber hinaus spezies-, gewebs-, zelltyp- und proteinspezifisch [6].

Bei diesen Betrachtungen wird deutlich, dass die Glykosilierung einen sehr komplexen Prozess darstellt, der unterschiedlich von den Expressionssystemen ausgeführt wird. Hefen verfügen über Glykosilierungsmechanismen, jedoch werden N-Glykane vom „High-Mannose“-Typ erzeugt, d. h., neben zwei GlcNAc sind nur Mannose-Moleküle angehängt (siehe Abb. 1-1). Insektenzellen erzeugen einfache Strukturen mit meist terminalen Mannose-Resten und offenbaren eine große Vielfalt an O- und N-verknüpften Glykanen [7]. Eine Anheftung von Sialinsäure ist nicht möglich [3]. Das Glykosilierungsprofil von Pflanzen variiert gegenüber Säugerzellen durch zusätzliche Fucose- und β -verknüpfte Xylose-Reste,

Einleitung

jedoch ohne endständige Sialinsäure-Reste [2, 4]. Eine konsistente N-Glykosilierung mit Oligomannose konnte für die Ciliaten-Spezies *Tetrahymena* nachgewiesen werden [8]. *Dictyostelium discoideum*, Vertreter der Schleimpilze, ist ein weiteres alternatives Expressionssystem. Bei N-Glykanen wird Fucose eingebaut, jedoch konnte der komplexe N-Glykosilierungstyp nicht nachgewiesen werden. Gegenüber Säuerzellen fehlen bei der N-Glykosilierung die Galactose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure [9].

Zellkulturen wie CHO-Zellen oder BHK-Zellen (*Baby Hamster Kidney*) können Strukturen des komplexen Typs mit mehreren Antennen unter Anheftung von Sialinsäure erzeugen. Dies entspricht humanen Glykosilierungsstrukturen.

Im Bereich des Glykoengineering werden Anstrengungen unternommen, um z. B. gentechnisch den N-Glykosilierungsweg in Insektenzellen [3, 7] oder Hefezellen [2] zu verändern, durch Enzymmodifikationen die Glykosilierung von Zellkulturen zu optimieren [2] oder *in-vitro*-Glykosilierungen mit synthetischen Oligosacchariden durchzuführen [2].

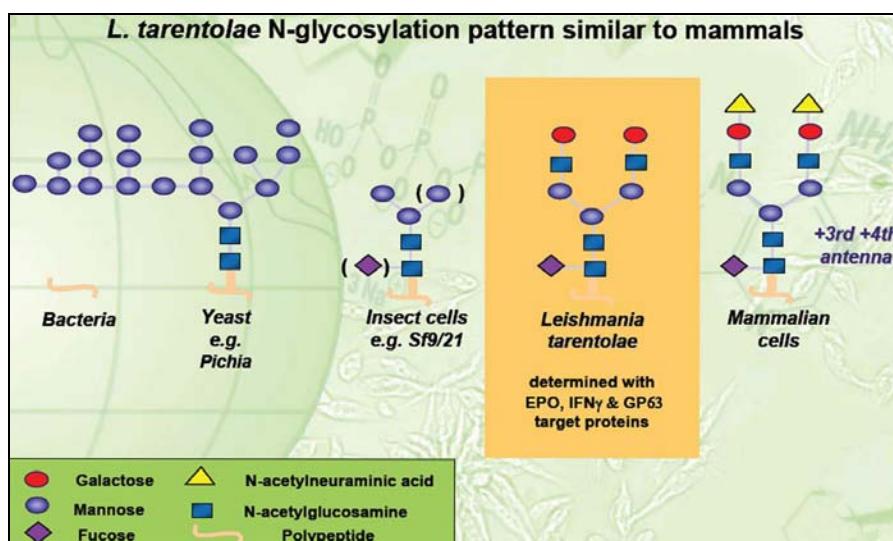


Abb. 1-1: Vergleich der N-Glykosilierung verschiedener Expressionssysteme, [Quelle: Jena Bioscience]

Trypanosomatidae sind alternative Expressionssysteme für Glykoproteine. Mit einem Anteil von über 10 % des Gesamtproteins sind Glykoproteine reichlich vorhanden [10]. Die erzeugten Oligosaccharidantennen der Glykoproteine sind oft ähnlich zu den Säugetierstrukturen, in einzelnen Fällen konnten Oligosaccharide vom komplexen Typ mit gebundener α -Galactosidase, Frucone und Sialinsäure nachgewiesen werden [11].

Als Vertreter der Trypanosomatidae wurde *L. tarentolae* zur Expression von Erythropoietin (Epo) eingesetzt. Wie Breitling *et al.* [12] zeigten, exprimierten die Zellen biologisch aktives Epo und sekretierten es in das Nährmedium. Epo war nahezu nativ am N-Terminus prozessiert und mit höheren, eukaryotentypischen diantennären N-Glykanen versehen. Das

Einleitung

N-Glykosilierungsprofil war außergewöhnlich homogen. Die $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Kernstruktur (drei Mannosen und zwei GlcNAc) war vorhanden, welche bei mehr als 90% der Glykane vorkommt. Am rekombinanten EPO fehlten Sialinsäure und höher verzweigte Antennen.

Mit der Fähigkeit zur säugetierähnlichen Glykosilierung humaner Proteine stellen die Trypanosomatidae, insbesondere *L. tarentolae*, eine Alternative zu tierischen Zellkulturen dar [1]. Zur Etablierung dieses Expressionssystems sind die gentechnischen Grundlagen als auch die prozesstechnische Beschreibung des Systems beispielsweise hinsichtlich Nährmedien, Wachstumsraten und Produktbildung entscheidend.

1.2 Trypanosomatidae als Expressionssysteme – Grundlagen

Trypanosomatidae weisen einzigartige genetische Fähigkeiten auf, z. B. das RNA-Editing von verschiedenen mitochondrialen Transkripten und die Arrangierung von Genen in Tandem Arrays [13]. Ungewöhnlich ist die polycistronische Transkription von mRNA durch RNA-Polymerase I oder ähnlichen Enzymen, die anschließend durch Trans-Splicing und Polyadenylierung in Einzel-mRNA gespalten wird. Vorteilhaft ist die fast ausschließliche Regulierung der Genexpression auf der posttranskriptionalen Ebene [14]. Ungewöhnlich ist die mitochondriale DNA-Struktur des zusätzlichen Organells (Kinetoplasten), der Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker membrangebundener Proteine, die Existenz des Glykosomens und die Atmungskette mit ungewöhnlichem Cytochrom c [11]. *Leishmania* Zellen sind fähig zur Phosphorylierung und korrekten Faltung von komplizierten, höheren eukaryotischen Proteinen [15].

Tab. 1-2: Heterolog exprimierte Proteine in Trypanosomatidae (Auswahl)

Fremdprotein	Trypanosomatidae	Literaturstelle
Maus-Interferon- γ	<i>L. major</i>	[16]
Maus-Interferon- γ	<i>T. cruzi</i>	[17]
Maus-Interleukin-2	<i>T. cruzi</i>	[17]
humanes p53 Protein	<i>L. donovani</i>	[15]
β -Galactosidase	<i>L. major, L. mexicana</i>	[18]
Green Fluorescent Protein (GFP)	<i>L. major, L. mexicana</i>	[18]
Rinder-Interleukin-4	<i>T. brucei</i>	[19]
Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	<i>L. major</i>	[20]

Die Methoden zur gentechnischen Manipulation von Trypanosomatidae sind sehr gut etabliert [12] und wurden schon für die heterologe Expression verschiedener Proteine eingesetzt, siehe Tab. 1-2. Die Expressionsstabilität und -höhe der heterologen Proteine kann besonders durch die Integration in eine „Silent“ Region des Genoms verbessert bzw. erhöht werden [21]. Die *Leishmania* Spezies kann außerdem mit großen Episomen

Einleitung

transformiert werden [21]. Förderlich für die mRNA-Stabilität ist die Flankierung des Fremdgens mit nicht translatierten Regionen eines hochexprimierten Gens („Intergenic Untranslated Regions“, UTR). Höhere Expressionsraten können durch die Verwendung von Fremdpromotoren (z. B. T7-Promotor des T7-Bakteriophagen) und von Fremd-RNA-Polymerase erzielt werden. Zum Beispiel weist die T7-RNA-Polymerase eine ca. 10x höhere Ableserate als die Polymerase I in Trypanosomatidae auf [22, 23]. Auch die Verwendung des RNA-Polymerase II-Promotors ist möglich, da spezifische Kontrollsiegel in Trypanosomatidae fehlen. Dies ermöglicht die unkontrollierte Herstellung von mRNA. Erfolgreich konnte die Verwendung des bakteriellen Tetracyclin-Repressors (TET-Repressor) gezeigt werden [14, 21].

1.3 Das Expressionssystem *Leishmania tarentolae*

Leishmania tarentolae ist ein neues Expressionssystem für rekombinante Produkte (LEXSY), patentiert durch die Firma Jena Bioscience GmbH [24]. Der Organismus bietet die Möglichkeit der Herstellung biantennärer, vollständig galactosierter, core- α -fucosierter N-Glykane. Rekombinante Proteine werden außergewöhnlich homogen N-terminal glykosiliert und Strukturen vom Säugertyp erzeugt [12], siehe Abschnitt 1.1. Bei dem System stehen DNA-Vektoren für eine konstitutive oder induzierte Expression mit einer intrazellulären oder sekretierten Lokalisation des Fremdproteins zur Verfügung. Die Expressionskassette wird durch homologe Rekombination („Double Cross-Over“) in den chromosomalen 18S rRNA-Locus (ssu), den Ornithidecarboxylase-Locus (odc) oder den Tubulin-Gencluster (tub) von *L. tarentolae* integriert. Der odc- und tub-Locus wird von der Polymerase II transkribiert, der ssu-Locus von der RNA-Polymerase I [12, 18]. Die Expressionskassette wird unter die Kontrolle der entsprechenden RNA-Polymerase gestellt.

Die Expressionskassette ist begrenzt durch zwei Fragmente des entsprechenden Locus und besteht aus 1.) UTR's von *L. tarentolae*, die maßgeblich die Genregulation beeinflussen, z. B. aus Teilen des Calmodulin Clusters (*camCBA*), dem Dihydrofolat-Reduktase-Thymidylat-Synthase-Locus von *L. major* und/oder dem Adenin-Phosphoribosyl-Transferase-Gene (*apr*). Weiterhin aus 2.) einer Multicloning Site für den Einbau des Fremdgens und 3.) einem Antibiotika-Resistenzgen. An die Expressionskassette schließen sich ein Ampicillin-Resistenzgen und ein bakterieller Replikationsstartpunkt (origin of replication) an, wodurch der Expressionsvektor in *E. coli* vervielfältigt werden kann, jedoch keine Transkription oder Translation erfolgt. Vor der Transfektion von *L. tarentolae* durch Elektroporation wird der Vektor durch Verdau mit Restriktionsenzymen linearisiert und die *E. coli*-spezifischen Sequenzen entfernt. Die Selektion erfolgt mit Antibiotikum z. B. Nourseothricin [12] entsprechend des Resistenzgens.

Einleitung

Beispielhaft ist der konstitutive Expressionsvektor in Abb. 1-2 gezeigt. Bei dem konstitutiven, sekretorischen System ist zusätzlich das Gen für das LMSAP-Signalpeptid eingebaut, welches aus dem Gen für die sekretierte, saure Phosphatase von *L. mexicana* (*lmsap1*) stammt [25], und mit dem Fremdgen ein Fusionsprotein bildet.

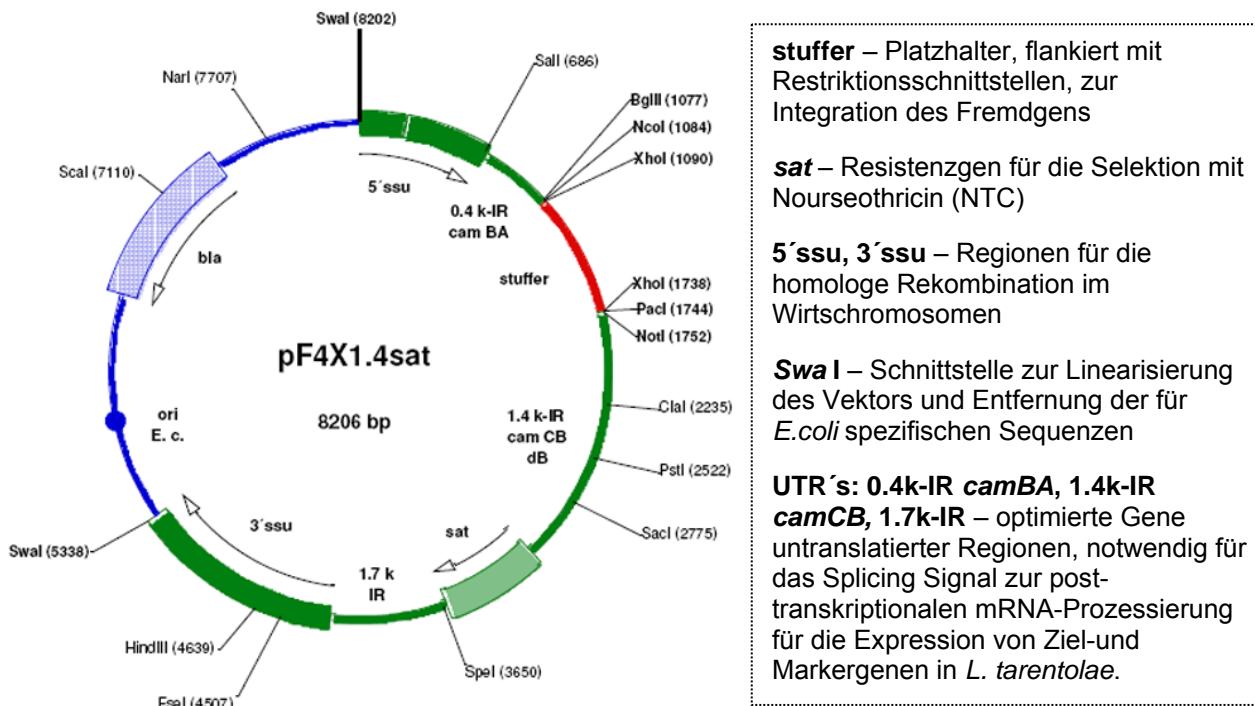


Abb. 1-2: Konstitutiver Expressionsvektor für *L. tarentolae* [Quelle: Jena Bioscience]

Im induzierbaren System finden der T7-Promotor und die T7-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen in Kombination mit dem bakteriellen TET-Repressor Anwendung [26]. Dieses System wurde bereits erfolgreich in *T. brucei* und *L. donovani* etabliert [21]. Sowohl T7-RNA-Polymerase als auch TET-Repressor werden konstitutiv in das Genom integriert und unter die Kontrolle der RNA-Polymerase I gestellt. Der Expressionsvektor ist verbessert im Gegensatz zum konstitutiv exprimierenden Vektor, da eine Antibiotika-Resistenz in „Sense“-Richtung und die T7-kontrollierte Transkriptionseinheit in Anti-„Sense“-Orientierung enthalten ist. Dies erhöht Induktions- und Repressionslevel. Nach Integration des Fremdgens in das Genom wird die Expression durch die Zugabe von Tetracyclin induziert.

Weitere Untersuchungen wurden in Richtung der Optimierung der Translationsinitiation durchgeführt [27]. Gegenwärtig wird an bicistronischen Vektoren gearbeitet, bei denen die erfolgreiche Induktion durch Co-Expression eines Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht und die Selektion von Klonen erleichtert wird.

Das konstitutive System wurde zur Expression von intrazellulärer T7-Polymerase, Cu/Zn-Superoxiddismutase, Protoonkogen Myc und dem membranassoziierten Protein small GTPase Rab7 verwendet [12]. Das EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“)

Einleitung

diente zum Expressionsnachweis im konstitutiven als auch im induzierbaren System [12,26]. Weiterhin wurde das HIV-1 Gag Protein in *L. tarentolae* exprimiert, um einen Lebendvektor gegen HIV herzustellen und die Immunantwort zu stimulieren [28]. Humaner t-PA (Tissue Plasminogen Activator) konnte mit *L. tarentolae* in höheren Konzentrationen als mit bisherigen Systemen hergestellt werden [29]. Das Expressionssystem eignet sich auch zur Produktion von isotopmarkierten Proteinen [30].

Mit der Fähigkeit zur posttranslationalen N-Glykosilierung stellt *L. tarentolae* ein Konkurrenzsystem zu tierischen Zellkulturen dar. *L. tarentolae* ist in relativ kostengünstigen Nährmedien kultivierbar und weist eine relativ hohe spezifische Wachstumsrate im Vergleich zu Zellkulturen auf. Weiterhin können Zelldichten von 4×10^8 Zellen/ml erreicht werden [31]. *L. tarentolae* besitzt eine natürliche Auxotrophie gegenüber Methionin [12]. Die Stammhaltung ist ähnlich zu Säugerzellen, ein CO₂-Inkubator ist aber nicht erforderlich. Der Zellaufschluss kann beispielsweise durch milde Detergenzien oder Ultraschall erfolgen.

Gegenwärtig besteht der größte Nachteil des Systems darin, dass eine biotechnologische Charakterisierung im Hinblick auf Wachstumsparameter wie die spezifische Wachstumsrate (μ), spezifische Zellteilungsrate (v), Verdopplungszeit (t_D) und Nährmedienbedürfnisse bisher nur unzureichend in der Literatur erfolgt ist. Bisher wurde vernachlässigt, dass für den potentiellen Einsatz des Systems für die Produktion von therapeutisch oder diagnostisch relevanten Produkten auch die regulatorischen Rahmenbedingungen beachtet werden müssen. Hierbei ist besonders auf Verwendung von Nährmedien hinzuweisen, die frei von tierischen Zusätzen sind („animal-free“). Auch liegen keine systematischen Untersuchungen vor, die eine Kultivierung in Bioreaktoren in Verbindung mit essentiellen Nährstoffquellen beschreiben.

1.4 *Leishmania* Spezies im Allgemeinen

Die *Leishmania* Spezies sind Mensch und Tier befallende Parasiten. Die Eukaryoten gehören im Reich der Protozoen zum Unterstamm der *Kinetoplasta* und werden als Gattung *Leishmania* der Familie der *Trypanosomatidae* zugeordnet [32]. Die *Kinetoplasta* zeichnen sich durch ein zusätzliches Zellorganell mit DNA aus. Die humanpathogenen Stämme (z. B. *L. brasiliensis*, *L. tropica*, *L. major*) sind Auslöser verschiedener Krankheiten wie Kalar-Azar, Leishmaniasis oder Orientbeule in den tropischen und subtropischen Gebieten der Erde.

Ein Lebenszyklus mit zwei Zellstadien (Promastigoten und Amastigoten) und einem Wirtswechsel zwischen der Sandmücke (englisch: sand fly) und einem Wirbeltier, z. B. dem Menschen, kennzeichnet die *Leishmania* Spezies, siehe Abb. 1-3. *L. tarentolae* ist ein Parasit der Eidechse *Tarentolae annularis* [31, 33] und wird als Parrot-Stamm [12, 26] in der promastigoten Form kultiviert (siehe Abb. 1-4). Promastigoten sind einfach begeißelte,

Einleitung

bewegliche, spindelförmige Zellen mit einer starken Zellteilung. Amastigoten sind dagegen rund, unbegeißelt und weisen einen veränderten Stoffwechsel zu den Promastigoten auf.

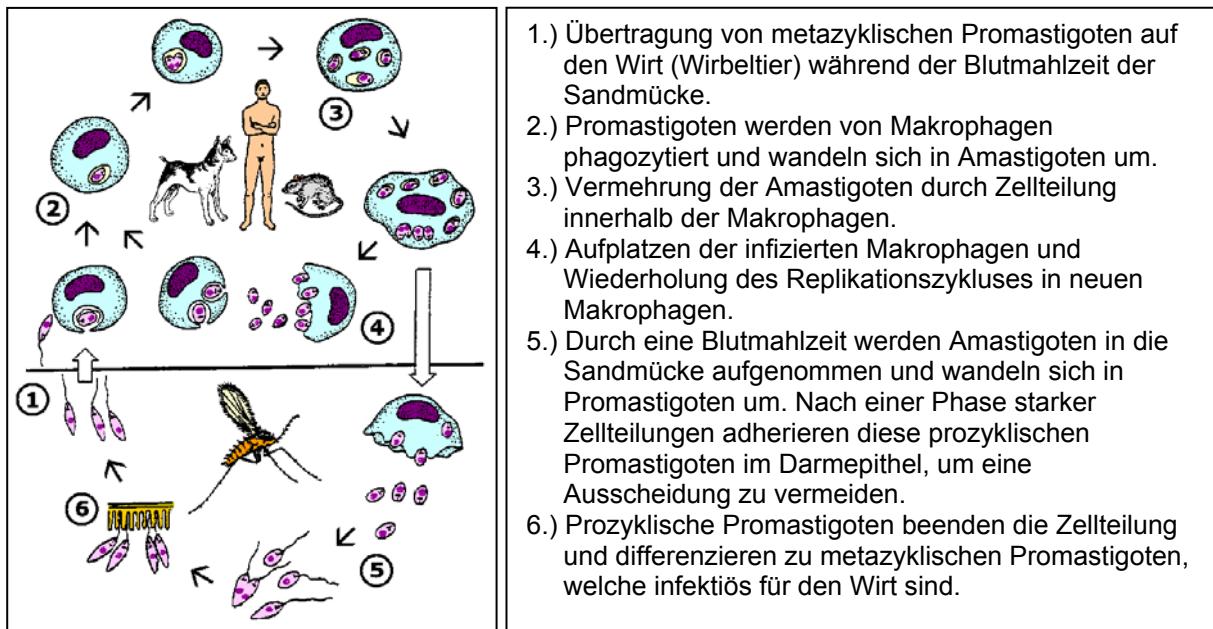


Abb. 1-3: Lebenszyklus der *Leishmania* Spezies mit Erklärungen.

[Quelle: Wiser, Tulane University [34], aus dem Englischen übersetzt und modifiziert]

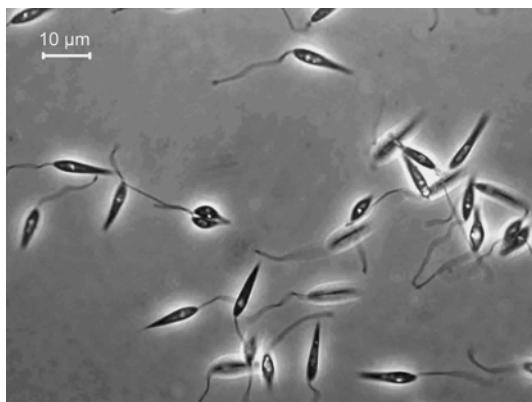


Abb. 1-4: Promastigoten von *L. tarentolae* im Lichtmikroskop, Phasenkontrast 2.

In der Fachliteratur wird kontrovers über die Frage diskutiert, inwieweit die eidechsenparasitischen Stämme („Saurian *Leishmania*“) und die humanpathogenen Stämme von *Leishmania* verwandt sind. Dies ist essentiell für die Übertragbarkeit bisher publizierter Forschungsergebnisse besonders im Hinblick auf die Nährmedienbedürfnisse. In der Vergangenheit wurde hauptsächlich mit den *L. tarentolae* Stämmen UC, Parrot oder LEM gearbeitet. Der ursprüngliche Stamm wurde von Wenyon 1921 isoliert [33]. Wallbanks *et al.* [35] stellten die These auf, dass die verwendeten *L. tarentolae* Stämme *Trypanosoma platydactyli* sind und nicht zu der *Leishmania* Spezies gehören. Dies wurde an identischen Isoenzymmustern und der Morphologie der Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse von Membranlipiden und der Phospholipid-Acyl-Komposition eine eindeutige

Einleitung

Abgrenzung zu den „Stericorarian“ *Trypanosomen*. Zudem wird vermutet, dass die „Saurian“ *Leishmanien* eine Untergruppe der Gattung *Leishmania* sind [36, 37]. Briones *et al.* [38] bestätigten diese Untersuchungen durch Analyse der 18S rRNA-Sequenzen und von intergenen rDNA-Spacern und wiesen eine direkte Verwandtschaft von *L. tarentolae* und *L. donovani* sowie eine große evolutionäre Distanz zu den *Trypanosomen* nach.

Festzuhalten ist, dass ein direktes Verwandtschaftsverhältnis innerhalb der *Leishmania* Spezies besteht, die einzelnen Stämme und Spezies aber sehr stark in z. B. ihren Nährmedienbedürfnissen variieren und sich unterscheiden [51, 53, 54]. Deshalb ist eine direkte Übertragung bisheriger Forschungsergebnisse problematisch.

1.5 Nährmedien für die *Leishmania* Spezies

Nährmedien werden im Allgemeinen zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendet. Dabei kommen sowohl zweiphasige Medien, bestehend aus einer festen Grundmasse und einer darüber stehenden Flüssigkeitsschicht, als auch flüssige Nährmedien zum Einsatz. Wegen des breiten Anwendungsgebietes, der leichten Handhabbarkeit, höheren Biomasse- und Produktkonzentrationen, der leichten Zellseparation und Scale-up-Möglichkeiten werden in der Biotechnologie hauptsächlich flüssige Nährmedien verwendet.

Die Einteilung erfolgt entsprechend der Komplexität der Inhaltsstoffe in:

- **Komplexe Nährmedien:** Bestandteile chemisch nicht definiert, komplexes Substanzgemisch, Verwendung von komplexen Quellen wie Fleisch- und Hefeextrakt, Pepton oder Kaseinhydrolysat.
- **Semi-definierte Nährmedien:** Mischung von chemisch definierten Substanzen mit Zusätzen aus komplexen Quellen z. B. 20%iges fötales Kälberserum oder Pepton.
- **Definierte Nährmedien:** Alle Inhaltsstoffe des Nährmediums sind bekannt, Substanzen wurden teilweise synthetisch hergestellt, teils tierischen Ursprungs.
- **Synthetische Nährmedien:** Alle Inhaltsstoffe sind definiert und synthetisch hergestellt, keine Substanzen tierischen Ursprungs enthalten.
- **Minimale Nährmedien:** Alle Inhaltsstoffe sind definiert, synthetisch hergestellt, reduziert auf die minimal notwendigen Substanzen und Konzentrationen, keine Substanzen tierischen Ursprungs enthalten.

Grundsätzlich verfolgt die Nährmedienentwicklung das Ziel, definierte, möglichst synthetische Nährmedien zu erzeugen. In Nährmedien dieser Art können gezielter die Nährstoffbedürfnisse von Organismen untersucht werden, da Komponenten selektiv verändert werden können. In komplexen Nährmedien ist dies aufgrund des Nährstoffüberflusses nur eingeschränkt möglich. Komplexmedien und komplexe Zusätze haben

Einleitung

weiterhin den Nachteil, dass sie chargeabhängig sind. Dadurch kann eine gleichbleibende Qualität nur schwer gewährleistet werden. Neben den hohen Kosten für Additive, z. B. für fetales Kälberserum, besteht die Gefahr der Kontamination durch Viren und Prionen, wenn Substanzen aus tierischen Quellen („animal-derived“) verwendet werden. Prionen sind die Auslöser für die Krankheit BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy, Mad Cow's Disease) [39, 40] und potentiell gefährlich für den Menschen. Weiterhin vereinfacht sich das Downstream-Processing (Aufarbeitung) von sekretierten Produkten bei der Kultivierung im synthetischen Nährmedium im Vergleich zum Komplexmedium. Verschiedene Prozessführungen, wie beispielsweise der glukoselimitierte FedBatch, erfordern eine gezielte Zugabe der Kohlenstoffquelle unter der Voraussetzung, dass keine weiteren C-Quellen im Nährmedium vorhanden sind. Dies ist nur im definierten bzw. synthetischen Nährmedium gewährleistet.

Für die Kultivierung der promastigoten Form der *Leishmania* Spezies sind verschiedene, hauptsächlich flüssige Nährmedien in der Literatur beschrieben, siehe Tab. 1-3. Ein vollständig synthetisches Nährmedium ist für die *Leishmania* Spezies nicht beschrieben, da Hemin als essentielle Substanz dem Medium zugesetzt werden muss. Hemin ist die chlorierte Form des roten Blutfarbstoffes Häm und wird aus Rinderblut oder Schweineblut gewonnen. Somit ist diese Substanz definiert (Reinheitsgrad >80%), aber nicht synthetisch. Produkte mit einer Reinheit $\geq 98\%$ sind erhältlich. Handelsübliche, synthetisch hergestellte Produkte sind gegenwärtig nicht verfügbar.

Hemin ist der essentielle Wachstumsfaktor im Nährmedium, da die *Leishmania* Spezies einen unvollständigen Biosyntheseweg für Häm besitzen [41]. Deshalb wird Blut, Serum oder Hemin in das Nährmedium gegeben [42]. Die genaue Funktion des Hemins in der Zelle ist gegenwärtig noch unbekannt. Wahrscheinlich dient es als prosthetische Gruppe vieler Proteine und als Eisenquelle. Weiterhin gilt Hemin als intrazellulärer Regulator für eine Vielzahl von Stoffwechselwegen der Atmung und der Proteinsynthese [42, 42].

Promastigoten der *Leishmania* Spezies werden vorwiegend in flüssigen Komplexmedien kultiviert, welche entweder tierischen Ursprungs sind oder tierisches Blut oder Serum als Additiv enthalten [43]. Hauptsächlich wird das BHI-Medium (Brain Heart Infusion) verwendet, teilweise ergänzt durch einen Zusatz an Serum. Dieses Medium ist komplett tierischen Ursprungs und deshalb ein Kontaminationsrisiko für das rekombinante Produkt. Verschiedene andere Nährmedien wurden bisher für die *Leishmania* Kultivierung beschrieben [43, 44]. Einen Überblick bietet Tab. 1-3. Deutlich wird, dass nur das BHI-Medium hohe Zelldichten unterstützt.

Einleitung

Eine Kultivierung in definierten Nährmedien wurde für verschiedene humanpathogene *Leishmania* Spezies beschrieben [43, 44]. Wie Tab. 1-3 zeigt, wurden maximale Zelldichten von 8×10^7 Zellen/ml erzielt. Hervorzuheben ist das Medium C nach Trager [57], welches speziell für *L. tarentolae* entwickelt wurde. Jedoch stellten Merlen *et al.* [51] fest, dass das Medium C das Wachstum von anderen *Leishmania* Spezies nicht unterstützte. Generell kann festgehalten werden, dass reine anorganische Nährmedien, wie z. B. bei Bakterienkulturen, nicht anwendbar sind.

Einleitung

Tab. 1-3 Zusammenfassung der wichtigsten Nährmedien aus Literaturquellen für die *Leishmania* Spezies. N_{max} – maximal erzielte Zelldichte; v - spezifische Zellteilungsrate; t_D – Verdoppelungszeit, g_{ges} – Gesamtanzahl der Generationen; T – Temperatur; * eigene Berechnungen aus Literaturdaten; — nicht spezifiziert durch die Literaturstelle.

Medientyp	Autor	Jahr	Spezies	Inhaltsstoffe	Form der Kultivierung	N_{max} [Zellen/ml]	v [h^{-1}]	t_D [h]	g_{ges} [-]	T [$^{\circ}$ C]
Zwei-phasige Medien	Gupta & Saran [45]	1991	<i>L. donovani</i>	Pepton, Leberhydrolysat, Hefeextrakt, Hemin, Agar	Agarplatte	3×10^7	0,033*	21*	11,6*	24±1
	Limoncu et al. [46]	2004	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	Trypticase, Rinderextrakt, Hefeextrakt, Pepton, Leberextrakt, Rinderhämoglobin, Salze	Standkultur	$2,7 \times 10^6$	~ 0,02*	~ 35*	4,2*	25
				Pepton, Hefeextrakt, Trypticase, Rinderhämoglobin, Salze	Standkultur	$\sim 2 \times 10^6$	~ 0,02*	~ 35*	3,7*	25
				BHI + Rinderhämoglobin	Standkultur	$2,6 \times 10^6$	~ 0,02*	~ 35*	4,1*	25
Komplexe, flüssige Medien	Meehan et al. [47]	2000	<i>L. tarentolae</i>	BHI + Hemin	—	$1-2 \times 10^8$	~ 0,116*	~ 6	—	27
	Ali et al. [48]	1998	<i>L. major</i>	Pepton, Kaseinhydrolysat, Rinderextrakt, Hefeextrakt, Salze, Prolin	Standkultur	$2,4 \times 10^7$	0,039*	17,8*	~ 8*	22
	Limoncu et al. [49]	1997	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	Pepton, Hefeautolysat, Salze, 10% FKS	Standkultur	$2,2 \times 10^7$	0,025*	27,7*	7,8*	27
	Palomino [50]	1982	<i>L. brasiliensis</i>	Pepton, Hefeautolysat, Salze, 10% FKS	Standkultur	4×10^7	0,024*	~ 28,9*	5,8*	25
	Ali et al. [48]	1998	<i>L. major</i>	M199+10% Serum+2%Urin	Standkultur	$2,2 \times 10^7$	~ 0,057*	~ 12,2*	7,9*	22
Semi-definierte, flüssige Medien	Limoncu et al. [49]	1997	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	RPMI 1640+10% FKS	Standkultur	$2,1 \times 10^7$	0,025*	27,7*	7,7*	27

Einleitung

Fortsetzung Tab. 1-3: Zusammenfassung der wichtigsten Nährmedien aus Literaturquellen für die *Leishmania* Spezies

Medientyp	Autor	Jahr	Spezies	Inhaltsstoffe	Form der Kultivierung	N_{\max} [Zellen/ml]	v [h $^{-1}$]	t_D [h]	g_{ges} [-]	T [°C]
Definierte, flüssige Medien	Merlen et al. [51]	1999	<i>L. donovani</i>	Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin, Nukleotide	Standkultur	$\sim 7,9 \times 10^7$	0,023*	$\sim 30^*$	7,3*	25
			<i>L. brasiliensis</i>							
			<i>L. mexicana</i>							
			<i>L. infantum</i>							
			<i>L. tropica</i>							
			<i>L. major</i>							
	Mc Carthy -Burke et al. [52]	1991	<i>L. donovani</i>	M199+HEPES, Folsäure, Hemin, Basal Medium mit Eagle's Vitaminen	Standkultur	4×10^7	0,077	$8,9 \pm 0,1$	$\sim 6,3^*$	26
				RPMI 1640+HEPES, Glutamin, Folsäure, Hemin, Basal Medium mit Eagle's Vitaminen, Adenosin	Standkultur	4×10^7	0,043	$15,9 \pm 0,05$	$\sim 5,3^*$	26
	O'Daly & Rodriguez [53]	1988	<i>L. donovani</i> <i>L. brasiliensis</i> <i>L. mexicana</i>	Aminosäuren, Nukleotide, Vitamine, Salze, Hemin	Standkultur	$\sim 7 \times 10^7$	0,03*	23,1*	6,6*	26
	Melo et al. [54]	1985	<i>L. tarentolae</i>	MD-29: Fruktose, Hemin, Aminosäuren, Vitamine, Salze	Standkultur	$3,5 \times 10^7$	$\sim 0,008^*$	86,6*	2,5*	25
	Steiger & Black [55]	1980	<i>L. donovani</i>	RE IX: Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin	Standkultur	$3,5 \times 10^7$	$\sim 0,036^*$	$19,2 \pm 2,0$	5,2*	27-28
	Steiger & Steiger [56]	1977	<i>L. donovani</i> <i>L. brasiliensis</i>	RE III: Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin	Standkultur	2×10^7	$\sim 0,04^*$	$17,3 \pm 2,4$	4,3*	27±1
	Trager [57]	1957	<i>L. tarentolae</i>	Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin, Purine, Pyrimidine	Standkultur	5×10^7	—	—	—	26-27

1.6 Rekombinante Proteine

1.6.1 Hyaluronidase (Hyal-1)

Die Hyaluronidasen (Hyal) sind Enzyme, die das Proteoglykan Hyaluronsäure spalten. Hyaluronsäure, bestehend aus N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure, ist ein unverzweigtes Molekül mit 2000-3000 Disaccharideinheiten pro Kette. Hyaluronsäure ist ein wichtiger Bestandteil der Grundsubstanz des Bindegewebes und ist z. B. im Glaskörper des Auges und in der Haut zu finden. Ein großer Umsatz an Hyaluronsäure tritt bei den Prozessen der Wundheilung, Zellteilung und Zellmigration sowie der Angiogenese auf [58]. Die Hyaluronidase wirkt als Ausbreitungsfaktor („Spreading Factor“), d. h., die Kittsubstanz der Haut und des Bindegewebes wird durch die depolymerisierende Wirkung zerstört. Dadurch können Fremdsubstanzen in die Haut eingebracht werden, aber auch pathogene Bakterien eindringen [59].

Hyaluronidasen spalten bevorzugt Hyaluronsäure, aber auch Chondroitin und Chondroitinsulfat, durch unterschiedliche Mechanismen. Die bakteriellen Hyaluronidasen arbeiten als Eliminasen bzw. Lyasen, spalten durch β -Elimination und sind sehr gut charakterisiert [60]. Eukaryotische Hyaluronidasen sind Endo- β -N-Acetyl-Hexosaminidasen und spalten durch Hydrolyse, wobei der enzymatische Prozess im Detail noch nicht genau untersucht ist. Gegenwärtig liegen kaum Strukturinformationen der Enzyme vor, da die Hyaluronidasen nur in geringen Konzentrationen in natürlichen Quellen wie Wirbeltiergeweben oder im Humanserum vorkommen [60].

Für das menschliche Genom sind sechs *hyal*-Sequenzen bekannt: *hyal-1* bis *hyal-4*, *PH-20/Spam-1* und Pseudogen *Phyal1*. Dosisabhängig kann das *hyal-1* Gen als ein Tumor-Suppressor-Gen (Anti-Onkogen) wirken, besonders bei tabakassoziierten Krebsformen, oder als Onkogen z. B. Prostatakrebs [60]. Hyal-1 wird auch als ein potentielles Krebsmarkerprotein für bösartige urogenitale Krebsarten betrachtet, jedoch ist die Rolle von Hyal-1 in der Tumorprogression umstritten [61]. Die Rolle der Hyaluronidasen beim Krebswachstum, der Angiogenese und der Metastasierung ist gegenwärtig im Fokus intensiver Forschungen, wofür ausreichende Enzymmengen notwendig sind [62]. Hofinger *et al.* [61] haben versucht, Hyal-1 rekombinant herzustellen. Bei der Expression in *E. coli* traten *Inclusion bodies* auf und nach Rückfaltung waren nur geringe Enzymaktivitäten messbar. Durch Verwendung von Insektenzellen (*Drosophila Schneider-2*) konnte reines und aktives Enzym gewonnen werden. Bei den Untersuchungen wurde deutlich, dass die absolute Aktivität durch die Glykosilierung des Proteins beeinflusst wurde.

Einleitung

Hyal-1 ist ein lösliches, säureaktives, lysosomales Enzym [61] und N-terminal glykosiliert, was es interessant für eine Herstellung mit dem *L. tarentolae* Expressionssystem macht. Die integrierte *hyal-1* Gensequenz wurde mit einem His₆-Tag versehen. Laut der Proteindatenbank EXPASY [69] besteht das resultierende Protein aus 447 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 49,5 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 6,9. Die Datenbank NetNGlyc [63] sagt für die Hyal-1-Proteinsequenz drei N-Glykosilierungsstellen mit hoher Genauigkeit voraus.

1.6.2 Oberflächenantigen (SAG2) von *Toxoplasma gondii*

Das Oberflächenantigen SAG2 stammt von dem Parasit *T. gondii*, dem Verursacher der Krankheit Toxoplasmose. In Europa sind ca. 50-80% der Menschen infiziert. Bei gesunden Menschen verläuft Toxoplasmose meist ohne Symptome, gefährlich sind die Krankheit für immunsuppressive Menschen, AIDS-Patienten und schwangere Frauen. Eine Erstinfektion mit *T. gondii* in der Schwangerschaft führt bei Neugeborenen zu einer eingeschränkten Sehfähigkeit, in schwerwiegenden Fällen zur Erblindung, Gehirnverkalkungen und zur Wasserkopfbildung. Bei immunsuppressiven Menschen verursacht eine *T. gondii* Infektion hauptsächlich eine Gehirnhautentzündung, bei AIDS-Patienten treten Kopfschmerzen, Ermüdungserscheinungen, Hirnhautentzündungen bis hin zum Koma auf. In Europa sterben ca. 30% der AIDS-Patienten an Toxoplasmose. Hauptüberträger von *T. gondii* ist die Hauskatze. Die Übertragung erfolgt als Oozyst in verunreinigtem Wasser oder Gemüse oder als Gewebezysten in ungenügend gekochtem Essen [64].

SAG2 ist ein Hauptantigen von *T. gondii* und ein wichtiger Anheftungsligand bei der Invasion in die Wirtszelle [65]. SAG2 wird zur Detektion von Toxoplasmose eingesetzt. Dabei sind verschiedene Methoden wie z. B. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), LAT (Latex Agglutination Test), Immunochromatographischer Test (ICT) in der Literatur beschrieben [66, 67, 68].

Der rekombinante *L. tarentolae* mit dem SAG2-Antigen stammt von dem Forschungszentrum fzmb GmbH. Dort wird das Ziel verfolgt, mit dem Oberflächenantigen einen ELISA-Test zum Nachweis von *T. gondii* in Tier- und Menschenseren aufzubauen, nachdem SAG2 erfolgreich in *L. tarentolae* exprimiert und aufgereinigt wurde. Bei dem integrierten Gen handelt es sich um eine verkürzte Form, denn der GPI-Anker, das Signalpeptid und die Transmembran-Domäne des nativen Proteins sind nicht enthalten, ein zusätzlicher „Tag“ mit 6 Histidinen (His₆-Tag) ist angehängt. Damit ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 19 kDa und ein isoelektrischer Punkt von pH 7,4 [69].

SAG2 wurde bisher heterolog in dem Bakterium *E. coli* [67, 70], der Hefe *Pichia pastoris* [71] und dem Baculovirus-Insektenzellen-Expressionssystem [68] hergestellt. Dabei wurde

Einleitung

deutlich, dass die korrekte Faltung des Proteins entscheidenden Einfluss auf die Antigenität und Immunogenität hat.

1.6.3 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und wurde erstmals 1962 von Shimomura *et. al* beschrieben [72, 73]. Da die Fluoreszenz nur durch die Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht auftritt, findet das GFP große Anwendung als Fusionsprotein, Markerprotein und genetischer Reporter in der Biologie, Gentechnik und Biotechnologie. Eine Glykosilierung findet nicht statt. Das Chromophor des GFP ist intrinsisch zu der Primärstruktur des Proteins (p-Hydroxybenzylideneimidazolinon) und wird aus den Aminosäuren (Serin-Tyrosin-Glycin) im nativen Protein gebildet [74]. Die GFP-Fluoreszenz ist stabil, speziesunabhängig und kann nicht invasiv beobachtet werden z. B. durch Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie [75].

Eine der vielen modifizierten Varianten ist das „enhanced“ GFP (EGFP), eine humanisierte Version der Firma Clontech Laboratories, USA. Durch Insertion und Mutation ist EGFP eine codonoptimierte Variante bezüglich der Translationsinitiation, der Faltung bei 37°C, der Chromophoren-Ionisierung und der Löslichkeit, da Codone von hoch exprimierten Säugerproteinen an Stelle der „Quallen-Codone“ eingebaut wurden. Dies führte zu höheren Expressionsleveln in Säugerzellen und 35mal höheren Fluoreszenzhelligkeiten im Vergleich zum nativen Protein [74, 75].

2 Zielstellung

Leishmania tarentolae weist gegenüber anderen Expressionssystemen eine Reihe von Vorteilen auf. Besonders herausragend ist die Fähigkeit zur säugetierähnlichen N-Glykosilierung. Damit stellt dieser Eukaryot ein mögliches Alternativsystem zu tierischen Zellkulturen dar. Die Methoden zur gentechnischen Manipulation sind bereits sehr gut untersucht bzw. etabliert. Kommerziell sind zwei Typen von Expressionsvektoren mit jeweils drei unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen verfügbar (Quelle: Jena Bioscience GmbH).

Nachteilig ist, dass das Wachstumsverhalten und die Kultivierungsbedingungen des Wirtsorganismus bisher nur unzureichend untersucht und beschrieben sind. In der Literatur finden sich Angaben zu Verdopplungszeiten (t_D) oder maximalen Zeldichten (N_{max}) (z. B. $t_D = 6 - 9$ h und $N_{max} = 4 \times 10^8$ Zellen/ml, [31]), jedoch ohne eine grundlegende Betrachtung der Kultivierungsbedingungen und physiologischen Parameter. Zur Etablierung des neuen Expressionssystems muss dessen Leistungsfähigkeit gezeigt werden, um gegenüber anderen eukaryotischen Systemen bestehen zu können.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, das biotechnologische Potential des *L. tarentolae* Expressionssystems genauer zu untersuchen, um es damit für die Produktion von therapeutisch oder diagnostisch relevanten Produkten verfügbar zu machen. Für eine optimale Kultivierung von *L. tarentolae* ist es entscheidend, die wichtigsten statischen und dynamischen Prozessparameter des Wirtssystems zu identifizieren. Dazu ist eine Nährmedienentwicklung unter Beachtung von regulatorischen Anforderungen, d. h., Nährmedien frei von tierischen („animal-derived“) Inhaltsstoffen [1] und die Charakterisierung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von *L. tarentolae* in diesen Medien erforderlich. Von außerordentlicher Wichtigkeit sind die Stabilität der Kultivierung und die Verwendbarkeit für Bioreaktorkultivierungen.

Ein weiterer Fokus liegt auf der Bestimmung bevorzugter Nährstoffquellen. Glukose ist beispielsweise die primäre Energiequelle und deren Einfluss auf die spezifische Wachstums- und Zellteilungsrate von besonderem Interesse. Wichtig ist weiterhin die Abgrenzung der physiologischen Bereiche in Form von den Parametern Temperatur und pH-Wert, um optimale Kultivierungsbedingungen zu ermöglichen.

Besonders interessant ist die essentielle Eisenquelle Hemin, die eine vielversprechende Steuergröße darstellt. Als Grundlage dazu muss zuerst eine analytische Möglichkeit für Hemin geschaffen und etabliert werden. Auch an alternativen Eisenquellen wird geforscht, um Hemin als Substanz tierischen Ursprungs zu ersetzen.

Zielstellung

In der Literatur gibt es nur wenige Untersuchungen zu Bioreaktorkultivierungen mit *Leishmania* [76, 77, 78]. Die Fragestellungen, ob eine Kultivierung von *L. tarentolae* im Rührkesselreaktor möglich ist und wie hohe Biomassedichten im Fermenter erreicht werden können, haben deshalb besondere Relevanz. Dazu sollten unterschiedliche FedBatch-Strategien für das Komplexmedium und das definierte Medium entwickelt werden. Weiterhin sollte eine Optimierung von Prozessparametern und Prozessbedingungen im Bioreaktor erfolgen.

Mit den Untersuchungen am Wildtyp-Stamm sollen grundlegende Parameter und Strategien für eine optimale Kultivierung von *L. tarentolae* herausgearbeitet werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen auf die Expression der Modellproteine Hyaluronidase-1, Oberflächenantigen SAG2 von *T. gondii* und EGFP übertragen werden. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die entwickelten Nährmedien die Expression von Fremdproteinen unterstützen. Ziel dieser Arbeit ist es weiterhin, das Wachstumsverhalten der verschiedenen Wirts-Vektor-Systeme zu charakterisieren. Besonders interessant ist die Produktbildung, wobei zum einen ein sekretierender, konstitutiver und zum anderen ein sekretierender, induzierbarer Stamm betrachtet wird.

3 Material und Methoden

3.1 Stämme von *L. tarentolae*

Tab. 3-1: Zusammenstellung der verwendeten *L. tarentolae* Stämme

Stamm	Kurzbezeichnung	Expressionstyp	Resistenzen für Antibiotika	Quelle
<i>L. tarentolae</i> p10	Wildtyp-Stamm	Konstitutiv, ohne Fremd-Gen	keine	Jena Bioscience GmbH
<i>L. tarentolae</i> p10::F9Begfp1.4 dBSat#12	EGFP-Stamm	Konstitutiv und intrazellulär exprimiert	Nourseothricin	Jena Bioscience GmbH
<i>L. tarentolae</i> p10 pF4SPSAG2sat #05	SAG2-Stamm	Konstitutiv und sekretorisch, His ₆ -Tag	Nourseothricin	fzmb GmbH
<i>L. tarentolae</i> T7TR::6071#8-3	Hyal-1-Stamm	Induzierbar und sekretorisch, His ₆ -Tag, <i>Leishmania</i> Signalsequenz	Bleomycin, Nourseothricin, Hygromycin; Induktion mit Tetracyclin	Eigene Konstruktion bei Jena Bioscience GmbH

Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -80°C in 20%igem Glyzerin. Zur Herstellung von Kryokonserven wurden 1,2 ml exponentiell wachsende Kulturen (1 – 2 g/l TBM, BHI-Medium, ggf. Antibiotika, siehe 3.2) verwendet und mit 0,4 ml 80%igem Glyzerin versetzt. Nach dem Mischen verblieben die Konserven 10 min bei Raumtemperatur, 1 h auf Eis, in -30°C über Nacht und wurden dann in -80°C gelagert.

3.2 Kultivierung von *L. tarentolae*

Komplexe Nährmedien

Die Kultivierung von *L. tarentolae* Stämmen erfolgte in verschiedenen komplexen Nährmedien, siehe Tab. 3-2. Die komplexen Inhaltsstoffe wurden von Becton Dickinson und die Salze von Merck (analytische Reinheit) bezogen. Die Zugabe an PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Invitrogen) vor der Kultivierung diente zur Unterdrückung bakterieller Kontaminationen. Glukose wurde aus einer sterilen, autoklavierten Stammlösung (500 g/l) zugegeben und Hemin (bovine, Sigma-Aldrich) aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (2,5 g/l Hemin in 50 % Triethanolamin (Sigma)).

Material und Methoden

Tab. 3-2: Herstellungsvorschrift für verschiedene komplexe Nährmedien für *L. tarentolae*. Komponenten werden in Aqua dest. gelöst und bei 121°C für 20 min autoklaviert.

Medium	Lösung	Komponente	Konz. [g/l]	Herstellung	Vor der Kultivierung zugeben:
BHI		Difco Brain Hearth Infusion	37,0	lösen und autoklavieren	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Unit's/ml PenStrep • 5 mg/l Hemin • 2 g/l Glukose
TSB		BBL™ Trypticase™ Soy Broth Bacto™ Yeast Extract	15,0 20,0	lösen und autoklavieren	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Unit's/ml • PenStrep • 5 mg/l Hemin • 2 g/l Glukose
TB	Lösung A	Bacto™ Tryptone Bacto™ Yeast Extract	12,0 24,0	lösen in 900 ml, autoklavieren	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Unit's/ml PenStrep • 5 mg/l Hemin • 2 g/l Glukose
	Lösung B	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	12,5 2,3	lösen in 100 ml, autoklavieren	
YE	Lösung C	Bacto™ Yeast Extract	24,0	lösen in 900 ml, autoklavieren	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Unit's/ml PenStrep • 5 mg/l Hemin • 2-3 g/l Glukose
	Lösung D	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	12,5 2,3	lösen in 100 ml, autoklavieren	

Definierte Nährmedien SFP(I)-(III)

Die Nährmedien nach Sitz-Fritsche-Pohl (SFP) basieren auf dem Nährmedium nach Trager [57] und wurden entsprechend Anhang 1 aus verschiedenen Stammlösungen hergestellt. Vor dem Sterilfiltrieren wurde der pH-Wert auf 6,7 mit 2 M KOH eingestellt. Die Zusammensetzung der einzelnen SFP-Medien ist in Tab. 3-3 gezeigt. Im SFP(III)-Medium wurde ein RNA-Konzentrationsbereich von 77 - 230 mg/l RNA untersucht.

Tab. 3-3: Zusammensetzung der SFP-Nährmedien (I)-(III) mit Rinderserumalbumin (BSA, SERVA), Ribonukleinsäure (RNA, Fluka) (~18 A₂₆₀Units/mg, *Saccharomyces cerevisiae*) und Polyethylenglykol (PEG, SIGMA). Hemin (2,5 g/l) wurde in 50% Triethanolamin gelöst und sterilfiltriert. Die PEG-Hemin-Lösung beinhaltete 2 g/l Hemin und 10% (W/W) PEG1000 (Carl Roth). Zur Herstellung wurden 5 ml einer 20% (W/W) PEG1000 Lösung mit 5 ml 50%igem Triethanolamin (Sigma) gemischt, 20 mg Hemin (bovine, Sigma-Aldrich) darin gelöst und autoklaviert [79].

Komponente	SFP(I)-Medium	SFP(II)-Medium	SFP(III)-Medium
Stammlösungen laut Anhang 1	ja	ja	ja
Penicillin-Streptomycin	50 Units/ml	50 Units/ml	50 Units/ml
Glukose	3 g/l	3 g/l	3 g/l
BSA	0,528 g/l	—	—
Hemin in 50% Triethanolamin	5 mg/l Hemin	—	—
PEG-Hemin-Lösung	—	5 mg/l Hemin	5 mg/l Hemin
RNA	—	—	77 mg/l

Schematische Darstellung der Kultivierung

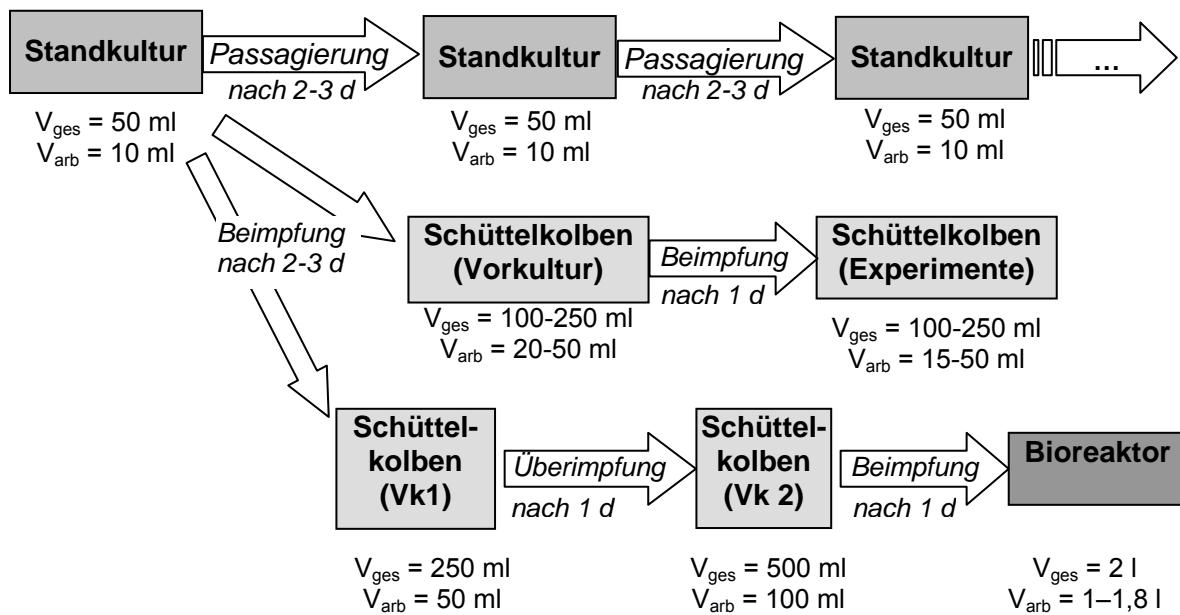


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Kultivierung von *L. tarentolae* mit der Stammhaltung durch Kultivierung in der Standkultur, die Strategie für Schüttelkolbenexperimente und die Vorkulturstrategie für Fermentationen. Abkürzungen: V_{ges} – Gesamtvolumen, V_{arb} – Arbeitsvolumen, d – Tage, V_k – Vorkultur.

Standkultur

Die Stammhaltung erfolgte als unbewegte Suspensionskultur (Standkultur) in sterilen, liegenden Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm²) oder in autoklavierten 100 ml Kolben mit Silikonschwamm-Stopfen. Die Kultivierung erfolgte mit 10 ml eines komplexen Nährmediums. Die Standkulturen wurden bei einer Endbiomassekonzentration von ~1,5 g/l (nach 2-3 oder 4-5 Tagen) in neues Nährmedium passagiert und bei 26°C im Brutschrank kultiviert.

Bei den rekombinanten *L. tarentolae* Stämmen wurden entsprechend den Resistenzen zusätzlich die Antibiotika Nourseothricin, Bleomycin, Nourseothricin oder Hygromycin (Jena Bioscience) mit einer Endkonzentration von 100 mg/l eingesetzt. Zur Induktion der Produktbildung des Hyal-1-Stammes wurde Tetracyclin (10 mg/l, Jena Bioscience) zugesetzt.

Schüttelkolben

Verschiedene Größen von autoklavierten Erlenmeyerkolben mit Silikonschwamm-Stopfen wurden bei der Kultivierung verwendet.

- Schüttelkolbenmaßstab:
- (A) 100 ml Kolben mit Schikane, Füllvolumen 15 – 20 ml
 - (B) 250 ml Kolben mit Schikane, Füllvolumen 25 – 50 ml
 - (C) 500 ml Kolben ohne Schikane, Füllvolumen 100 ml

Material und Methoden

Die Beimpfung von Schüttelkolben für Versuchsreihen erfolgte aus einem Vorkultur-Schüttelkolben, siehe Abb. 3-1, S. 21. Zur Reduktion des Inokulumvolumens wurde bei Bedarf das alte Nährmedium abzentrifugiert (2000*g, 20°C, 5-10 min) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Startzelldichten waren im Bereich von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

Rekombinante Stämme wurden ohne die Selektionsantibiotika kultiviert, da laut Firmenaussage (Jena Bioscience) eine Expressionsstabilität bis zu 10 Passagen gegeben ist. Zur Induktion der Produktbildung wurde bei dem Hyal-1-Stamm Tetracyclin (10 mg/l) zugegeben.

Zur Beimpfung von definierten Nährmedien dienten Zellen von exponentiell wachsenden Vorkultur-Schüttelkolben mit YE-Medium, die mit 0,9%igem NaCl gewaschen wurden (Zentrifugationsbedingungen: 2000*g, 20°C, 5-10 min). Die Kultivierung erfolgte im Schüttler (3031, GFL) oder Wasserbad-Schüttler (SW20, Julabo Labortechnik oder SWB20, Prüfgerätewerk Medingen) bei 100-140 rpm und 26 oder 30°C. Zur Variation der Kultivierungstemperatur (12 - 40°C) wurde Schüttelwasserbad mit gekoppelten Kryothermostaten verwendet.

Batch- und FedBatch-Kultivierungen im Laborfermenter

Die Kultivierungen von *L. tarentolae* erfolgten im 2 l Doppelmantelbioreaktor (Biostat MD mit DCU, B. Braun International) im Airlift- oder Rührgefäß, das mit zwei parallel, übereinander angeordneten Schrägblattrührern versehen war. Zur Dokumentation diente die Software MFCS (B. Braun International). Der pO₂-Wert wurde mit dem Sensor InPro6800/12/220 (Mettler-Toledo) gemessen, der CO₂- und O₂-Gehalt der Abluft mit dem Abgasanalysator EGAS-1 (B. Braun International). Zur Erzielung einer Startbiomassekonzentrationen von ~0,2 g/l TBM wurden gestufte Vorkulturen eingesetzt, siehe Abb. 3-1, S. 21. Der Reaktor wurde durch Alufolie vor Licht geschützt. Zur Schaumbekämpfung wurde autoklaviertes Silikonöl M30 (verdünnt 1:5 mit A. dest) oder Sojaöl (Carl Roth) eingesetzt. Zudosagen erfolgten entweder über ein Septum und sterile Spritzen oder über die Schlauchpumpe 101U/R (Watson Marlow). Entnahmen von Zellsuspensionen erfolgen über ein Ernterohr mit angeschlossener Schlauchpumpe. Verschiedene, autoklavierte Nährmedienkonzentrate mit 12,5 g/l K₂HPO₄ und 2,3 g/l KH₂PO₄ wurden für die Fermentationen eingesetzt: 4xTB-Konzentrat (48 g/l BactoTM Tryptone, 96 g/l BactoTM Yeast Extract), 4xYE-Konzentrat (96 g/l BactoTM Yeast Extract) und 6,25xYE-Konzentrat (150 g/l BactoTM Yeast Extract).

Material und Methoden

Tab. 3-4 Übersicht über die Prozessparameter bei den Bioreaktorkultivierungen mit Komplex- oder definierten Medium

Prozess- parameter	Zielstellung der Kultivierung							
	Batch- Kultivierung bei 26°C	Batch- Kultivierung bei 30°C	Bioreaktorauswahl		Effekte der Zudosage von Glukose	Effekte einer einmaligen Zudosage von Nährmedien- konzentrat	Mehrfache Zudosagen von Nährmedien- konzentrat	Mehrfache Zudosage von SFP(III)-Medium
Reaktor	Rührreaktor	Rührreaktor	Airliftreaktor	Rührreaktor	Rührreaktor	Rührreaktor	Rührreaktor	Rührreaktor
Nährmedium	YE-Medium	YE-Medium	BHI-Medium	BHI-Medium	TSB-Medium	TB-Medium	YE-Medium	SFP(III)-Medium
Nährmedien- zugaben	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (1 mg/l) Glukose (3 g/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l) Glukose (3 g/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l) Glukose (3 g/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l) Glukose (3 g/l)	PenStrep (50 Units/ml) Hemin (5 mg/l) Glukose (3 g/l)	PenStrep (50 Units/ml) PEG-Hemin (5 mg/l) Glukose (5 g/l)
Temperatur	26°C	30°C	26°C	26°C	26°C	26°C	26°C	26°C
Begasungs- rate (Airflow)	1 VVM	1 VVM	1 VVM	1 VVM	1 VVM	1 VVM	1 VVM	1 VVM
pO₂- Regelung	über Drehzahl zu pO _{2 min} =20%	über Drehzahl zu pO _{2 min} =20%	—	über Drehzahl zu pO _{2 min} =20%	über Drehzahl zu pO _{2 min} =30%	über Drehzahl zu pO _{2 min} =20%	über Drehzahl zu pO _{2 min} =20%	—
Rührerdreh- zahl	100 - 300 rpm	100 - 330 rpm	—	100 - 300 rpm	100 - 300 rpm	100 - 380 rpm	100 - 500 rpm	100 rpm
pH-Kontrolle	—	—	—	—	mit Ammoniak (0,5%) zu pH 7,35	mit Ammoniak (5%) zu pH 7,4	mit 0,5 M KOH zu pH 7,3	mit 5%iger Phosphorsäure zu pH 7,3
Antischaum- mittel	1ml/l Silikonöl	1ml/l Silikonöl	1ml/l Silikonöl	1ml/l Silikonöl	1ml/l Silikonöl	1ml/l Sojaöl	1ml/l Silikonöl	—
Zudosagen	—	—	—	—	Glukose (zyklisch) Hemin	4x TB- Konzentrat (500ml) Glukose (zyklisch)	YE-Konzentrat (4x; 6,25x) Glukose (zyklisch) Hemin (zyklisch)	SFP(III)-Medium (3x je 0,5 l) 5 ml RNA-Lösung (8 g/l)

Material und Methoden

Tab. 3-5: Zugaben und Entnahmen während der FedBatch-Kultivierung mit mehrfacher Zudosage von Nährmedienkonzentrat.

Zeit	Zugaben					Entnahme von Zellsuspension
	Nährmedien- konzentrat	Glukose- lösung (500 g/l)	Hemin- lösung (2,5 g/l)	Antischaum- mittel	PenStrep	
15,5 h	500 ml 4x Konzentrat					
16,7 h		6,7 ml				
21,8 h			3,2 ml	0,8 ml	5 ml	
23,5 h	500 ml 4x Konzentrat					500 ml
25,9 h		6,1 ml				
31,9 h		6,2 ml				
33,3 h	200 ml 6,25x Konzentrat		2 ml	0,5 ml	5 ml	800 ml
38,9 h		4,1 ml				
41,8 h	250 ml 6,25x Konzentrat					
43,8 h		5 ml				
48,5 h			2,5 ml		5 ml	
50,8 h	312 ml 6,25x Konzentrat			0,6 ml		
51,2 h		6,2 ml				
55,7 h			2,8 ml	0,5 ml		
58,3 h		6,2 ml				
63,7 h		6,5 ml				
63,8 h			2,7 ml			
68,1 h		7 ml				
71,3 h			2,8 ml			

Während der Kultivierung wurde der Begasungsstrom dem aktuellen Fermentervolumen angepasst, um eine Begasungsrate von 1 VVM konstant zu halten.

Kontinuierliche Kultivierung

Die kontinuierliche Kultivierung von *L. tarentolae* wurde in einem 100 ml Glasgefäß mit Doppelmantel durchgeführt, siehe Abb. 3-2. Das Arbeitsvolumen des Reaktors verringerte sich durch die Einbauten auf 93 ml. Die Temperierung erfolgte zu $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ oder 30°C ($29,9$ - $30,4^\circ\text{C}$) durch einen separaten Wasserkreislauf. Das Nährmedium wurde durch die Schlauchpumpe 101U/R (Watson Marlow) oder IPCN-4 (Ismatec) dosiert und Verdünnungsraten von $0,03$ - $0,064 \text{ h}^{-1}$ realisiert. Zur Kontrolle der Flussrate wurde die Gewichtsabnahme der Vorlageflasche ermittelt (Waage LC4201, Sartorius). Der Reaktor wurde mit einer Rate von $0,7$ - 1 VVM mit Luft begast. Die Probennahme erfolgte im Überlauf durch ein Septum und sterile Spritzen. Über einen Magnettisch wurde der Reaktor bei 200 - 250 rpm durchmischt. Der Reaktor wurde durch Alufolie vor Licht geschützt.

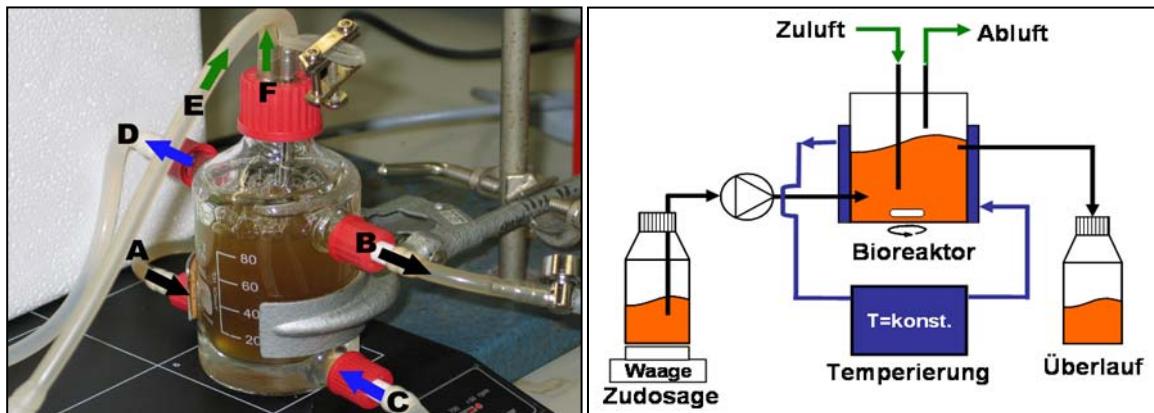


Abb. 3-2: Linkes Bild: Bioreaktor für die kontinuierliche Kultivierung mit A) Nährmedienzufluss, B) Überlauf, C) Zufluss und D) Abfluss des Kühlwassers, E) Zuluftstrom und F) Abluftstrom. Rechtes Bild: Fließbild zur kontinuierlichen Kultivierung.

Die glukoselimitierte Kultivierung wurde mit YE-Medium bei annähernd konstanten Glukosekonzentrationen (1,5 - 1,8 g/l) und 5 mg/l Hemin durchgeführt. Beim heminlimitierten Chemostaten wurden 3 bzw. 3,7 mg/l Hemin in das YE-Medium gegeben und 1,3 bzw. 1,5 mg/l Hemin über die Heminanalytik gemessen. Die Glukosekonzentration war unlimitiert und betrug 2,57 g/l (1. Vorlage) bzw. 2,27 g/l (2. Vorlage). Die Beimpfung des Reaktors zu 0,2 - 0,3 g/l TBM erfolgte unter der Laminarflowbox aus einem Vorkultur-Schüttelkolben mit 2 g/l TBM in YE-Medium, nachdem die Zellen durch Zentrifugation von dem alten Nährmedium abgetrennt wurden. Nach Anschluss des Reaktors wurde die kontinuierliche Fahrweise sofort gestartet. Der Wechsel von Vorlage- und Überlaufflaschen erfolgte durch Sterilkupplungen und unter der Flamme.

Zur Kontrolle des Versuchsaufbaus wurde im Vorfeld ein Steriltest des Reaktors mit unbewegter und unbegaster Lösung (verdünntes YE-Medium) über 3 Tage durchgeführt.

3.3 Methoden zur Wachstumskontrolle

Das Wachstum des Organismus wurde durch verschiedene Messmethoden (Optische Dichte, Zellzählung, Glukoseverbrauch, pH-Veränderung) verfolgt. Die Morphologie der Zellen wurde durch Aufnahmen mit der Digitalkamera Canon Power Shot G5 im Phasenkontrast 2 am Lichtmikroskop (Axiostar, Carl Zeiss Jena) dokumentiert.

Optische Dichte

Die Absorption der Zellsuspension (Optische Dichte, OD) wurde bei 600 nm Wellenlänge mit dem Spektrometer Spectronic 20 Genesys (Spectronic Instruments) gemessen und der Blindwert des Nährmediums subtrahiert. Ein Umrechnungsfaktor von 0,969 g/l TMB /OD wurde für den Wildtyp-Stamm im YE-Medium bestimmt, für den EGFP-Stamm

Material und Methoden

0,912 g/l TBM/OD [80]. Für den Hyal-1-Stamm und den SAG2-Stamm wurde der Umrechnungsfaktor des Wildtyp-Stammes verwendet.

Glukose

Die Glukosekonzentration wurde mit Hilfe des Glukometers ECA PD10 (Prüfgerätewerk Medingen) über das enzymatisch-amperometrischen Messprinzip bestimmt. In einer Durchflussmesszelle wird Glukose durch immobilisierte Glukoseoxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt, anschließend diffundiert das Wasserstoffperoxid durch eine zweite Membranschicht und wird an einer Platinelktrode mit 600 mV oxidiert. Das erhaltene Messsignal ist der Glukosekonzentration in der Probe proportional.

Die Proben wurden 1:51 mit Glukosepuffer (Prüfgerätewerk Medingen) verdünnt und gegen einen Glukosestandard (Prüfgerätewerk Medingen) von 2,162 g/l, ebenfalls 1:51 verdünnt, gemessen.

pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit einer Einstabelektrode (SenTix Mic, WTW) und dem pH-Meter 526 (WTW) bestimmt. Bei Fermentationen kam die Elektrode (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler-Toledo) gekoppelt mit der DCU des Biostat MD zum Einsatz.

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstumsverhalten von *L. tarentolae* wurde mit verschiedenen Puffersystemen im Bereich von pH 4,45 – pH 8,4 untersucht, siehe Tab. 3-6. Die Puffersalze des YE-Mediums wurden ersetzt und 24 g/l Yeast Extract verwendet. Weitere Zugaben erfolgten wie unter 3.2 beschrieben für 15 ml Nährmedium und die Verwendung von 100 ml Kolben mit Schikane.

Tab. 3-6 Molarität der Puffersubstanzen zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes

pH	KH_2PO_4 [mmol/l]	Na_2HPO_4 [mmol/l]	pH	Zitronensäure [mmol/l]	Na_2HPO_4 [mmol/l]	pH	TRIS [mmol/l]	HCl [mmol/l]
7,7	2,5	64,2	4,45	62,0	76,0	6,7	50	42,0
7,4	13,1	53,5	4,9	53,7	92,6	7,0	50	39,3
7,0	27,5	39,1	5,3	49,0	102,0	7,6	50	27,9
6,8	35,6	31,1	5,8	42,2	115,6	8,0	50	17,3
6,3	59,3	7,4	6,1	37,4	125,2	8,2	50	13,0
6,0	66,1	0,5	6,9	19,0	162,0	8,4	50	5,3

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit dem Gerät Coulter Z2 (Coulter Electronics), der auf dem Widerstandsmessprinzip basiert. Die Zellsuspension wurde in isotoner Elektrolytlösung (Isoton 2 oder 0,9%ige NaCl) im Bereich von 1:200 – 1:10000 verdünnt und durch eine 70 µm Messkapillare gesaugt. Beim Durchtritt erzeugten die Zellen bei konstanter

Material und Methoden

Stromstärke eine Änderung des elektrischen Widerstandes. Gemäß dem Ohmschen Gesetz resultierten aus den Widerstandsänderungen Spannungsimpulse, deren Anzahl der Zellzahl in der Probe entsprach. Die Kalibrierung erfolgte mit Latexkügelchen mit einem Durchmesser von $10\text{ }\mu\text{m}$. Die diskrete Größenverteilung wird im Folgenden als kontinuierliche Kurve dargestellt, um Zusammenhänge besser zu verdeutlichen. Durch den verwendeten Dispenser ergab sich ein negativer Verdünnungsfehler von ca. 2,4%, welcher durch die Eingrenzung der Zellverteilung, siehe Abb. 3-3, nahezu korrigiert wurde (ca. +3%). In der Abb. 3-3 wird weiterhin durch den Vergleich mit einem mikroskopischen Bild deutlich, dass die Zelle mit dem Zellzählgerät in ihrer Breite erfasst wird.

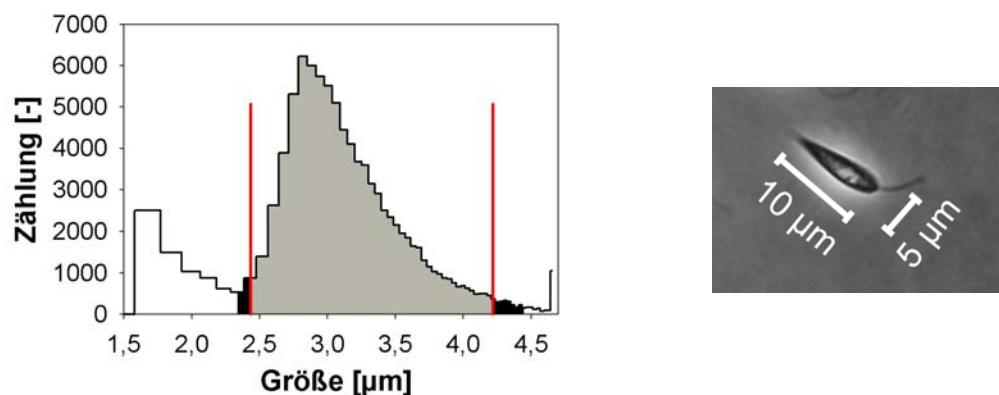


Abb. 3-3: Linkes Bild: Prinzipielle Darstellung der Ermittlung der Zelldichte. Das Zellzählgerät gab eine Verteilung der Zellgröße aus. Die graue Fläche entsprach dem ausgewählten Verteilungsbereich, welcher mit den roten, senkrechten Strichen eingegrenzt wurde. Die schwarzen Flächen entsprachen der restlichen am Zellzählgerät angezeigten Peakfläche. **Rechts:** Mikroskopisches Bild einer *L. tarentolae* Zelle mit Kennzeichnung der Größe.

Lichtmikroskopie

Die Zellmorphologie wurde im Durchlichtmikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss Jena) im Phasenkontrast 2 begutachtet und über den binokularen Phototubus mit der Digitalkamera Canon Power Shot G5 dokumentiert. Neben der Vergrößerung des Objektives und der Digitalkamera wurde im Vorfeld ein Vergrößerungsfaktor von 6,6 für die restlichen Einbauten des Mikroskopes mit Hilfe eines Kreuzstrichmikrometers (Carl Zeiss Jena) bestimmt. Zur Verbesserung der Bildschärfe wurde eine Tonwertkorrektur über das gesamte Bild vorgenommen. Der Maßstabsbalken wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS unter Berücksichtigung aller Vergrößerungen eingefügt.

3.4 Bestimmung der Heminkonzentration

Die Heminkonzentration wurde durch eine wässrige 2-Phase-Extraktion in saures Chloroform nach der Methode von Lombardo *et al.* [81] bestimmt. Die Chemikalien stammten von Carl

Material und Methoden

Roth oder Merck. Die Analyse wurde in 15 ml Röhrchen (Falcon, Greiner Labortechnik) durchgeführt, indem 4 ml Probe mit 2 ml 50 mM Glycin-HCl Puffer (3,75 g/l Glycin, 2,922 g/l NaCl, mit HCl auf pH 2) vermischt wurden. Bei der Bestimmung von Hemin aus YE-Medium wurden zusätzlich 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Die Proben wurden auf pH 2 mit 25%iger oder 10%iger HCl eingestellt und 200 µl 5 M NaCl zugegeben. Nach dem Vortexen wurden 2 ml Chloroform zugegeben und 3x5 Sekunden stark gemischt (für einen optimalen Phasenübergang von Hemin). Die Ausbildung des 2-Phasengemisches wurde durch Zentrifugieren bei 2000xg, 20 °C und 5 min erreicht. Die Unterphase (Chloroformphase) wurde in eine 1ml Quarzküvette überführt und die Absorption im Mikroplattenreader (Lambda Scan 200, BIO-TEC INSTRUMENTS) gemessen. Die Auswertung erfolgte abweichend von Lombardo *et al.* [81], da die Absorption der Probe im Bereich von 340-450 nm gemessen wurde und eine Kompensation der Basislinie erfolgte, siehe Abb. 3-4.

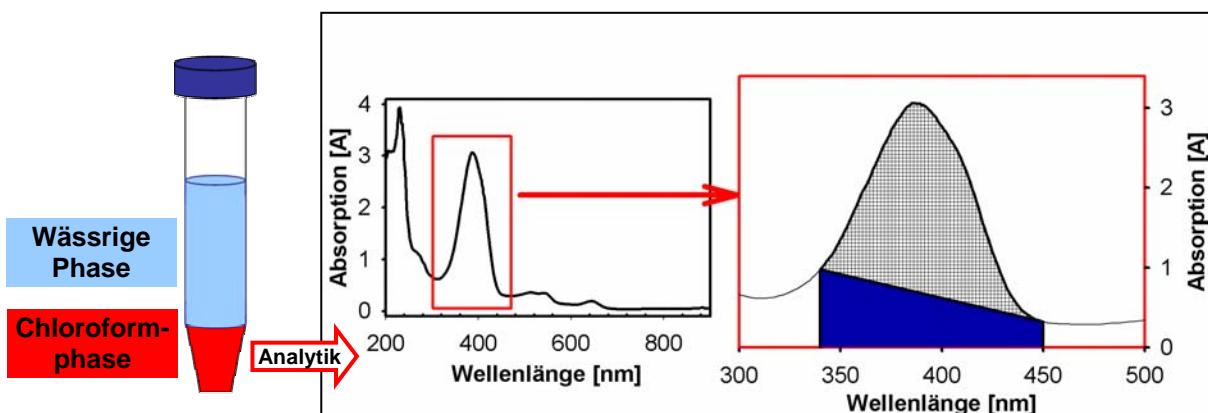


Abb. 3-4: Das Prinzip der Heminkonzentrationsbestimmung. Nach Ausbildung der zwei Phasen wird die Chloroformphase gewonnen und das Absorptionsspektrum aufgenommen. Hemin in Chloroform zeigte eine starke Absorption im Bereich um 390 nm. Die korrigierte Peakfläche von 340-450 nm Wellenlänge (grau schraffiert) wurde mit nachfolgender Gleichung berechnet. Dadurch wird vom Gesamtpeak die blau markierte Fläche abgezogen. Dies entspricht der Kompensation der Basislinie.

Die korrigierte Peakfläche (PA_{korr} , in $[A \cdot nm]$) wurde mit der Glg. 3-1 berechnet. Darin geht die Absorption (A_n) bei der Wellenlänge n und die Schrittweite der Wellenlänge bei der Messung ($\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$) ein. Mit λ_{gesamt} wird die Peakbreite festgelegt ($\lambda_{gesamt} = 110 \text{ nm}$).

Glg. 3-1:

$$PA_{korr} = \sum_{n=340 \text{ nm}}^{450 \text{ nm}} A_n * \Delta\lambda - \left(A_{450 \text{ nm}} * \lambda_{gesamt} - (A_{340 \text{ nm}} - A_{450 \text{ nm}}) * \frac{\lambda_{gesamt}}{2} \right)$$

Als Standardlösung diente eine 5 mg/l Heminlösung, hergestellt in 0,5 % (V/V) Triethanolamin. Die vollständige Auflösung von Hemin wurde erzielt, indem die Lösung eine Minute in ein Ultraschallbad bei 50 % Leistung gehalten wurde. Zur Herstellung der Standardkurve wurde

Material und Methoden

die Heminlösung stufenweise mit Aqua dest im Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 mg/l verdünnt und gegen die korrigierte Peakfläche aufgetragen. Die Untersuchung von Einflussgrößen erfolgte laut Tab. 3-7.

Tab. 3-7: Untersuchung von Einflussgrößen bei der Heminextraktion. Die Extraktion wurde nach der oben beschriebenen Standardprozedur durchgeführt und jeweils die Einflussgröße verändert. DMSO wurde bei der Extraktion nicht zugesetzt. Zur Veränderung des Volumens der wässrigen Phase wurde Wasser zugegeben, die Anteile der anderen Lösungen blieben konstant. Die Lösungen A und B waren jeweils Standardlösungen mit 5 mg/l Hemin in 0,5% (V/V) Triethanolamin.

Einflussgröße	Verwendete Reaktionsgefäß	Hemin-stamm-lösung	Hemin-konz.	Verhältnis Wässrige : Chloroform-Phase
Material des Reaktionsgefäßes	- Polypropylen (PP) (50ml Röhrchen, Falcon, Carl Roth) - Glas (Dupont)	Lösung A	3 mg/l 5 mg/l	6,2 ml : 2 ml
Volumen des Reaktionsgefäßes	- 15 ml PP-Röhrchen (Falcon) - 50 ml PP-Röhrchen (Falcon)	Lösung B	5 mg/l	6,2 ml : 2 ml
Volumen der Chloroformphase	15 ml PP-Röhrchen (Falcon)	Lösung B	5 mg/l	6,2 ml : 2 ml 6,2 ml : 2,5 ml 6,2 ml : 3 ml 6,2 ml : 4 ml
Volumen der wässrigen Phase	15 ml PP-Röhrchen (Falcon)	Lösung B	5 mg/l	6,2 ml : 2 ml 8,2 ml : 2 ml 9,3 ml : 2 ml
Lagerung der Stammlösung	50 ml PP-Röhrchen (Falcon)	Lösung A	5 mg/l	6,2 ml : 2 ml
– bei 4°C im Kühlschrank				
– bei Raumtemperatur und Licht				

3.5 Gewinnung rekombinanter Proteine für die Analytik

Zellaufschluss

Während der Kultivierung des EGFP-Stammes in verschiedenen komplexen Nährmedien wurde 1 ml Probe entnommen, zentrifugiert (2000xg, 20 °C, 10 min) und die Zellen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert (20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) und im Ultraschalldesintegrator aufgeschlossen (Energieeintrag ~ 400 Ws) (UP400S, Dr. Hielscher, Germany). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (6000xg, 4 °C, 5 min) entfernt.

TCA-Fällung

In ein Eppendorftube wurde 1 ml Zellüberstand mit 111 µl Trichloressigsäure (TCA) (100% w/v; 1000g/l) versetzt, um eine 10%ige Endkonzentration an TCA herzustellen. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat abzentrifugiert (20000xg, 4°C, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in kaltem 80%igen Aceton (300 µl) resuspendiert, anschließend vortexiert und zentrifugiert (20000xg, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde bei Raumtemperatur oder im Trockenschrank bei max. 30°C getrocknet. Zur Analyse im SDS-PAGE wurde das Pellet in 10 µl Probenpuffer aufgenommen (Aufkonzentrationsfaktor = 100), bei 99°C für 5 min denaturiert und vollständig auf das Gel geladen.

3.6 Proteinanalytik

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration des Nährmedienüberstandes oder des Zellaufschlusses wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt [82]. Der Test beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau zu höheren Wellenlängen durch Komplexbildung mit Proteinen in saurem Milieu. Als Referenz diente eine Standardkurve mit BSA (Albuminstandard, PIERCE) im Bereich von 4 - 24 µg/ml. Die Proben wurden mit Fertigreagenz (Coomassie Protein Assay Reagent, PIERCE) auf Mikrotiterplatten vermischt und bei 595 nm gegen Aqua dest. gemessen (Kinetikreader Lambda Scan 200, MWG-Biotech).

SDS-PAGE

Mit der SDS-Polyacryl-Gelektrophorese wurden Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgrund ihrer Größe in einem 12,5%igen Gel aufgetrennt. Die Proben wurden 5 min bei 90 °C denaturiert und zu 10 µg pro Tasche aufgegeben. Es wurde das diskontinuierliche Puffersystem nach Laemmli [83] verwendet. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie-Brillantblau (MERCK) sichtbar gemacht.

Zur Charakterisierung der Produktbildung (SAG2) wurde die Intensität der einzelnen Spuren (Lanes) des Gels mit dem Programm TotalLab (BioSystemica) bestimmt. Dies entspricht der Gesamtintensität der Lane. Die Intensität der SAG2-Banden (Haupt- und Schattenbande) wurden ins Verhältnis zu der jeweiligen Gesamtintensität gesetzt und somit eine relative Intensität der SAG2-Bande (in Lane%) ermittelt.

Immunologischer Proteinnachweis (Western Blotting)

Der Nachweis basierte auf der Detektion des His₆-Tags des rekombinanten Proteins durch einen Anti-His₆-Antikörper, nachdem die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet wurden. Nach der spezifischen Bindung des zweiten Antikörpers an den Anti-His₆-Antikörper erfolgte eine Farbreaktion über die konjugierte alkalische Phosphatase, die das Substrat BCIP/NBT umwandelte. Die vollständige Methode ist in Anhang 2, S. 146 beschrieben.

Hyaluronidase-Aktivitätstest

Die Aktivität der rekombinanten Hyaluronidase wurde durch die Methode von Muckenschnabel *et al.* [84] nachgewiesen. Die Methode basierte auf der Morgan-Elson-Reaktion, welche N-Acetyl-Aminozucker durch eine Farbentwicklung nach Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) nachweist. Hyaluronidase spaltet von der Hyaluronsäure Oligosaccharide ab, die am reduzierenden Ende N-Acetyl-D-Glucosamin-Reste aufweisen und eine Anwendung der Morgan-Elson-Reaktion ermöglichen.

Eine Standardkurve mit N-Acetyl-D-Glucosamin (NAG) wurde bei pH 3 (0,2 M Natriumformiat, 0,1 M NaCl, 0,2 g/l BSA) erstellt im Konzentrationsbereich von 0,01-0,2 mM. Ein Umrechnungsfaktor von 0,074 mM NAG/AU wurde für die Detektion bei 586 nm und nach Abzug des Blindwertes (reines Wasser + DMAB) ermittelt. Die Expression von Hyal-1 im Nährmedienüberstand und im Zellaufschluss wurde bei pH 3 untersucht, da bei einem pH von 6 keine Enzymaktivität messbar war. Die Inkubationszeit variierte zwischen 21 und 25 h. Die Umsatzrate wurde durch Multiplikation mit dem Umrechnungsfaktor und durch Division mit der Inkubationszeit berechnet. Die Rate wurde bezüglich des Probenvolumens (50µl) korrigiert, um die Einheit „nM NAG/ min /ml Überstand bzw. Zellaufschluss“ zu erhalten.

3.7 Methoden der faktoriellen Versuchsplanung

Die faktorielle Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) fand Anwendung zur Reduzierung der „animal-derived“ Komponenten des Komplexmediums (Versuchsplan 1) und zur Bestimmung der Einflüsse der Chemikalien der Heminanalytik (Versuchsplan 2 und 3). Im Versuchsplan 1 wurden die Einflussgrößen entsprechend der Tab. 3-8 gewählt und die Versuche nach einem Zentralkompositionenplan (3²-Plan) durchgeführt. Bei der Durchführung wurden teilweise die Versuchspunkte zweimal experimentiert und für die Auswertung der Mittelwert der Antwortgröße (spezifische Wachstumsrate μ) verwendet. Im Versuchsplan 2 wurde die Konzentrationen an Natriumchlorid und DMSO variiert (Tab. 3-9), und als 2²-Versuchsplan mit Zentralpunkt experimentiert. Als Antwortgröße diente die PA_{korr}. Die Heminstammlösung enthielt 500mg/l Hemin in 50%igem (V/V) Triethanolamin.

Material und Methoden

Tab. 3-8: Einflussgrößen des Versuchsplanes 1 zur Reduzierung der „animal-derived“ Substanzen im Komplexmedium (TB-Medium).

Typ	Einflussgröße	Bezeichnung	Dimension	Normierung e		
				+1	0	-1
variabel	x_1	Bacto TM Yeast Extract Konzentration	g/l	24	12	0
	x_2	Bacto TM Trypton Konzentration	g/l	12	6	0
konstant	Heminkonzentration	5,0 mg/l				
	Glucosekonzentration	3,0 g/l				
	Puffersalzkonzentration					
	K ₂ HPO ₄	12,5 g/l				
	KH ₂ PO ₄	2,3 g/l				
	Temperatur	26 °C				
	Penicillin-Streptomycin Konzentration	50 Unit's/ml				
	Volumen des Nährmediums	50 ml				
	Einstellungen des Schüttelwasserbades	140 rpm				

Tab. 3-9: Versuchsplan 2: NaCl und DMSO-Zugaben als Einflussfaktoren der Heminanalytik.

Typ	Einflussgröße	Bezeichnung	Dimension	Normierung e		
				+1	0	-1
variabel	x_1	NaCl	µl	200	100	0
	x_2	DMSO	ml	2	1	0
konstant	YE-Medium	4 ml				
	Heminlösung (500mg/l)	40 µl				
	Glycinpuffer	2 ml				
	Chloroform	3 ml				
	Variable Zugabe von A. dest, um ein konstantes Endvolumen der wässrigen Phase von 9,3 ml zu erhalten					
	50 ml Röhrchen					

Mit dem Versuchsplan 3 wurden die Konzentrationsverhältnisse des YE-Mediums, des DMSOs und des Hems zueinander untersucht. Experimentiert wurde ein 3x2² Faktorenplan mit Sternpunkten und Zentralpunkt. Als Antwortgröße diente die PA_{corr}. Die Heminstammlösung enthielt 500mg/l Hemin in 50%igem (V/V) Triethanolamin.

Tab. 3-10: Versuchsplan 3: Untersuchung der Einflussfaktoren Hemin, DMSO und YE-Medium.

Typ	Einflussgröße	Bezeichnung	Dimension	Normierung e		
				+1	0	-1
variabel	x_1	Heminkonzentration in 4ml Probe	mg/l	5	2,5	0
	x_2	DMSO	ml	2,5	2	1,5
	x_3	YE-Medium-Konzentration	-	1x	0,5x	0x
konstant	NaCl	200 µl				
	Glycinpuffer	2 ml				
	Variable Zugabe von A. dest, um ein konstantes Endvolumen der wässrigen Phase von 9,3 ml zu erhalten					
	Chloroform	3 ml				
	50 ml Glasröhrchen					

Material und Methoden

Die Anpassung von linearen oder quadratischen Modellen (\tilde{Y}) erfolgte mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit Hilfe des Programmes MATLAB[®] (Math Works, USA). Zur Schätzung der Modellparameter (a_n) wurde die Glg. 3-2 angewendet [85], worin \hat{a} der Vektor der Modellparameter a_n ist, \tilde{Y} der Ergebnisvektor, in dem die Versuchsergebnisse zusammengefasst sind und F die Matrix der unabhängigen Variablen.

$$\text{Glg. 3-2: } \hat{a} = (F'F)^{-1}F'\tilde{Y}$$

Ein Modell bezogen auf die experimentierten Werte ergibt sich mit $\tilde{Y} = \hat{a} f(x_n)$. Wird die Regression auf die normierten Werte e ($-1 \leq 0 \leq +1$) bezogen, ergibt sich das Modell $\tilde{Y} = b f(e_n)$. Als Transformationsvorschrift gilt Glg. 3-3, worin $X_{i\max}$ und $X_{i\min}$ die jeweils maximalen und minimalen Ausprägungen der Einflussgröße X_i sind.

$$\text{Glg. 3-3: } e_i = \alpha_i + \beta_i * x_i \quad \text{mit} \quad \alpha = \frac{-X_{i\max} + X_{i\min}}{X_{i\max} - X_{i\min}} \quad \text{und} \quad \beta = \frac{2}{X_{i\max} - X_{i\min}}$$

Die Präzisionsmatrix C (Glg. 3-4) ermöglicht eine Bewertung der Streuungen der Modellparameter, denn wenn C als Diagonalmatrix vorkommt, ist eine unabhängige Schätzung der Modellparameter möglich. Treten Nebendiagonale auf, ist die Koeffizientenschätzung nicht mehr unabhängig und nur im Verbund möglich.

$$\text{Glg. 3-4: } C = (F'F)^{-1}$$

Zur Schätzung der Versuchsstreuung wurden die Restsumme der Fehlerquadrate (S_e) und der Freiheitsgrad φ_e mit den nachfolgenden Formeln berechnet. Darin ist n die Anzahl der Versuche, \tilde{y}^i der Einzelmesswert und \bar{y} der Mittelwert der Messungen. Es wird angenommen, dass in jedem Versuchspunkt die Häufigkeitsdichteverteilung der Messwerte gleich ist. Deshalb wird die Streuung in einem Versuchspunkt geschätzt und auf die anderen Punkte übertragen.

$$\text{Glg. 3-5: } S_e = \sum_{i=1}^n (\tilde{y}^i - \bar{y})^2 \quad \text{Glg. 3-6: } \varphi_e = n - 1$$

Die Defektquadratsumme (S_D) und der Freiheitsgrad (φ_D) wurden nach den folgenden Formeln ermittelt, um die Modellstreuung bestimmen zu können. Darin ist N die Anzahl der Versuche des Versuchsplanes, k die Anzahl der geschätzten Parameter des Modells, \tilde{y}^i der Messwert und \hat{y}^i der Modellwert an der Stelle i .

$$\text{Glg. 3-7: } S_D = \sum_{i=1}^N (\tilde{y}^i - \hat{y}^i)^2 \quad \text{Glg. 3-8: } \varphi_D = N - k - 1$$

Material und Methoden

Zur Überprüfung der Adäquatheit des Modells wurde die Testgröße für den F-Test als Quotient zwischen Modellfehler und Versuchsfehler berechnet (Glg. 3-9). Diese ist im Falle der Adäquatheit eine F-verteilte zufällige Veränderliche mit φ_D und φ_e Freiheitsgraden.

Glg. 3-9:

$$F = \frac{S_D / \varphi_D}{S_e / \varphi_e}$$

Für ein vorgegebenes Signifikanzniveau $P = P(F < F_{\text{krit}})$, z. B. 0,95, wird die Schranke F_{krit} aus Tabellenwerten abgelesen [85]. Das Modell kann als adäquat angenommen werden, wenn die Hypothese $F < F_{\text{krit}}$ gilt.

3.8 Bewertung von Modellanpassungen

Die Anpassung von mathematischen, mikrobiologischen Modellen erfolgte mit den Programmen MATLAB[®] und Berkeley Madonna 7.0.2 (Macey & Oster, University of California, USA). Die verwendeten mikrobiologischen Modelle waren teilweise linear als auch nicht-linear. Um eine Aussage über die Güte der Modellanpassung treffen zu können, wurde der Korrelationskoeffizient (R) nach Pearson bestimmt (Glg. 3-10). Prinzipiell wurde so vorgegangen, dass zu dem diskreten Messwert (h_{Mess}^i) der Modellwert (h_{Modell}^i) an der entsprechenden Stelle i geordnet wurde. Weiterhin ist in der Glg. 3-10 der Mittelwert der Messwerte (\bar{h}_{Mess}) und der Modellwerte (\bar{h}_{Modell}) sowie die Anzahl der Messwerte (n) enthalten.

Glg. 3-10:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (h_{\text{Mess}}^i - \bar{h}_{\text{Mess}})(h_{\text{Modell}}^i - \bar{h}_{\text{Modell}})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (h_{\text{Mess}}^i - \bar{h}_{\text{Mess}})^2 \sum_{i=1}^n (h_{\text{Modell}}^i - \bar{h}_{\text{Modell}})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zweier Größen. Repräsentieren die Modellwerte die Messwerte so gut, dass beide Zahlenreihen identisch sind, dann liegen alle Zahlenwerte in einem 2-dimensionalen Koordinatensystem auf einer Geraden. Das wiederum zeigt die vollständige Korrelation dieser Größen ($|R| = 1$). Das verwendete mikrobiologische Modell ist schlussfolgernd repräsentativ für die Messreihe. Mit sinkendem $|R|$ nimmt der lineare Zusammenhang zwischen Modell- und Messwerten ab. Das Modell wird weniger repräsentativ. Bei $R = 0$ kann der Zusammenhang beider Größen nicht mehr durch eine Gerade dargestellt werden und das Modell ist nicht repräsentativ für die Messreihe.

Weiterhin erfolgte der Nachweis der Adäquatheit des Modells, wie unter Abschnitt 3.7, S. 31 beschrieben.

4 Ergebnisse

TEIL A: ERMITTLEMENT STATISCHER PROZESSPARAMETER

4.1 Nährmedienentwicklung – von komplex zu definiert

Die Medienentwicklung zielte darauf ab, geeignete Nährmedien für die Kultivierung der promastigoten Form von *L. tarentolae* (Wildtyp-Stamm) zu ermitteln. Die Substanzen tierischen Ursprungs sollten im Medium reduziert werden und die Entwicklung vom Komplexmedium bis zum definierten Medium erfolgen. Die Nährmedien sollten die Bildung von Biomasse ermöglichen und in verschiedenen Kultivierungsmaßstäben einsetzbar sein. Eine Umwandlung in die amastigote Form sollte unterbunden werden, da Amastigoten einen veränderten Stoffwechsel zu Promastigoten aufweisen. Morphologischen Änderungen können im Mikroskop verfolgt werden, da Amastigoten rund und unbegeißelt erscheinen.

Ausgangspunkt bei der Komplexmedienentwicklung war das häufig zur Kultivierung von *L. tarentolae* eingesetzte BHI-Medium, siehe Tab. 1-3, S. 12. Weiterhin wurden typische Nährmedien der Mikrobiologie überprüft (siehe Abb. 4-1). Untersuchungen im Bereich der Komplexmedien waren notwendig, da diese den Vorteil einer sehr einfach Handhabung besaßen und nur diese Medien hohe Zelldichten in der Größenordnung von 10^8 Zellen/ml unterstützten (Tab. 1-3, S. 12). Problematisch war der hohe Anteil an „animal-derived“ Substanzen.

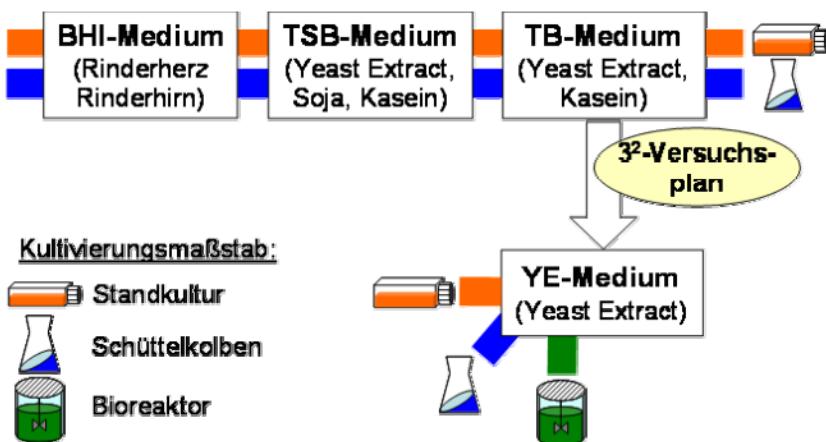


Abb. 4-1: Vorgehensweise bei der Entwicklung des Komplexmediums ohne tierische Bestandteile mit Kennzeichnung des Kultivierungsmaßstabs (Schema).

Bei den definierten Medien wurden mit in der Literatur beschriebenen Nährmedien begonnen (Abb. 4-2). Definierte Medien haben den Vorteil, dass alle Inhaltsstoffe bekannt sind und gezielt verändert werden können. Die Herstellung ist jedoch aufwendiger als bei Komplexmedien und hohe Zelldichten konnten bis jetzt nicht erzielt werden (Tab. 1-3, S. 12).

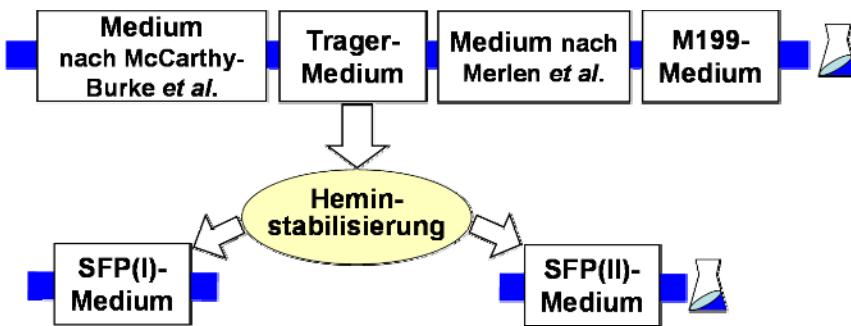


Abb. 4-2: Schema zur Entwicklung der Medien nach Sitz-Fritsche-Pohl (SFP-Medien).

4.1.1 Komplexe Nährmedien mit „animal-derived“ Komponenten

Das Wachstum von *L. tarentolae* wurde in verschiedenen Komplexmedien untersucht [86]. Die Medienherstellung und die Versuchsdurchführung sind in Abschnitt 3.2, Seite 19 und Fortfolgende, beschrieben. Das Wachstum wurde auf Basis von Wachstumsmodellen (Glg. 4-1 und Glg. 4-2) beurteilt, die spezifische Raten aus der Veränderung der Zelldichte (N in Zellen/ml) bzw. der Biomasse (X in g/l TBM; TBM - Trockenbiomasse) pro Zeiteinheit berechnen. Unterschieden wurde zwischen der spezifischen Zellteilungsrate ν (in h^{-1}) und der spezifischen Wachstumsrate μ (in h^{-1}).

$$\text{Glg. 4-1: } \nu = \frac{1}{N} * \frac{dN}{dt} \quad \text{approximiert zu} \Rightarrow \nu = \frac{1}{N} * \frac{\Delta N}{\Delta t}$$

$$\text{Glg. 4-2: } \mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad \text{approximiert zu} \Rightarrow \mu = \frac{1}{X} * \frac{\Delta X}{\Delta t}$$

Eine stabile Kultivierung in der Standkultur war essentiell, da diese die Zellen für Wachstumsexperimente, besonders für den Schüttelkolbenmaßstab, lieferten. Kinetiken der Standkultur wurden frühestens nach vier Sub-Passagen in dem untersuchten Nährmedium aufgenommen, um den Zellen genügend Adoptionszeit einzuräumen und eine repräsentative Wachstumskurve zu erhalten.

Aus der Abb. 4-3 wird deutlich, dass alle drei Nährmedien das Wachstum von *L. tarentolae* unterstützen. Besonders vorteilhaft war die Verwendung von TSB- und TB-Medium, da hier der Anteil „animal-derived“ Inhaltsstoffe stark reduziert war. Die mittlere spezifische Zellteilungsrate betrug $0,063 - 0,054 h^{-1}$ in der Standkultur (siehe Tab. 4-1). Deutlich wird, dass ν in geschüttelten Kulturen ungefähr 1,5fach höher war als in der Standkultur. Ursache war vermutlich die bessere Sauerstoffversorgung bei bewegten Flüssigkeiten. Um den Zellen genügend Adoptionszeit an geschüttelte Bedingungen zu ermöglichen, wurde generell ein Vorkultur-Schüttelkolben bei Schüttelkolbenexperimenten vorgeschaltet (Abb. 4-1, S. 21).

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Bezogen auf die gesamte Kultivierungszeit wurden 3,9 - 4,4 Generationen (g_{ges}) erzielt. Zur Berechnung der Anzahl der Generationen während des exponentiellen Wachstums (g_{exp}) wurde die Gleichung Glg. 4-3 verwendet, für g_{ges} die Glg. 4-4.

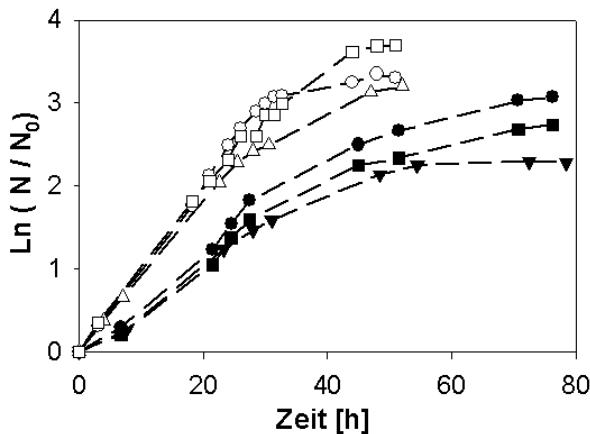


Abb. 4-3: Wachstumskinetik von *L. tarentolae* im BHI- (●), TSB- (▼) und TB-Medium (■) in der Standkultur (gefüllte Symbole) und im Schüttelkolben (ungeföllte Symbole). Logarithmische Auftragung von N bezogen auf die Anfangszelldichte $N_0 = 2,5 - 3 \times 10^7$ Zellen/ml. Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21), 26 °C.

Glg. 4-3:

$$g_{exp} = \frac{t_{ges}}{t_D}$$

Glg. 4-4:

$$g_{ges} = \ln \left(\frac{N_{max}}{N_0} \right)$$

Tab. 4-1: Vergleich der Wachstumsparameter der exponentiellen Phase von *L. tarentolae*, kultiviert in Komplexmedien als Stand- und Schüttelkultur bei 26°C.

Medium	Standkultur (10 ml)			Schüttelkultur (50 ml)		
	v [h ⁻¹]	t_D [h]	g_{exp} [-]	v [h ⁻¹]	t_D [h]	g_{exp} [-]
BHI	0,063	11,0	2,6	0,103	6,7	3,9
TSB	0,054	12,8	2,4	0,090	7,7	3,3
TB	0,056	12,4	2,4	0,097	7,1	3,6

Die Verdopplungszeiten t_D , berechnet nach Glg. 4-5, betrugen 6,7 - 7,7 h (Tab. 4-1) und waren bedeutend geringer als bisher beschriebene Literaturwerte, siehe Tab. 1-3, S.12. Das exponentielle Wachstum endete bei $2,6 - 3,7 \times 10^8$ Zellen/ml. Am Ende der Kultivierung konnte sogar eine maximale Zelldichte von 9×10^8 Zellen/ml im TB-Medium erreicht werden. Im Vergleich zu Literaturangaben sind diese Zelldichten extrem hoch, denn die höchsten Zelldichten wurden mit 4×10^8 Zellen/ml für BHI-Medium berichtet [31].

Glg. 4-5:

$$t_D = \frac{\ln 2}{v}$$

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Im exponentiellen Wachstum verbrauchten die Zellen in allen untersuchten Nährmedien Glukose als primäre Kohlenstoffquelle. Der Verbrauch von Glukose wurde begleitet durch eine Abnahme des pH-Wertes, was eine Änderung der physiologischen Bedingungen bedeutete. In Abb. 4-4 ist eine repräsentative Kinetik gezeigt. Nach vollständiger Metabolisierung der Glukose schalteten die Zellen auf alternative Energiequellen um, wahrscheinlich auf den Verbrauch von Aminosäuren. Dies führte zu einem Anstieg des pH-Wertes und zu einer drastischen Reduktion von v.

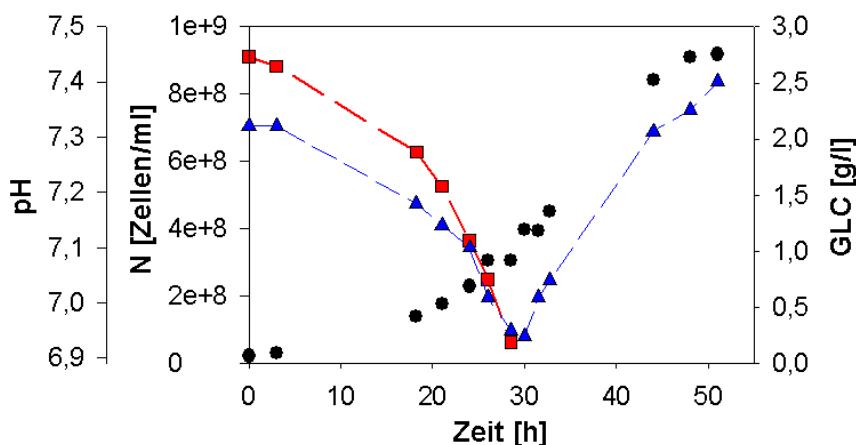


Abb. 4-4: Veränderung des pH-Wertes (Δ) bei Verbrauch von Glukose (■) durch *L. tarentolae*, N (●), TB-Medium, Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21), 26°C.

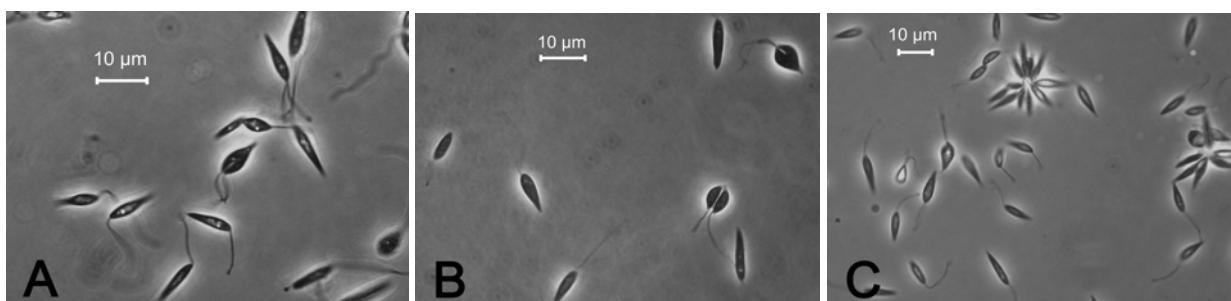


Abb. 4-5: Mikroskopische Aufnahmen von *L. tarentolae* während des exponentiellen Wachstums in BHI- (A), TSB- (B) und TB-Medium (C).

Die morphologische und physiologische Erscheinung der Zellen während des exponentiellen Wachstums war in allen Medien gleich, wie die Bilder in Abb. 4-5 belegen. Die Zellen wiesen die gewünschte promastigote Form auf.

Abschließend kann festgehalten werden, dass *L. tarentolae* in allen drei untersuchten Komplexmedien mit einer hohen und stabilen spezifischen Zellteilungsrate kultiviert wurde. Das TB-Medium wies gegenüber dem TSB-Medium verbesserte Wachstumsparameter auf. Der Anteil „animal-derived“ Substanzen im Nährmedium konnte beim TSB-Medium um 25 % ($^W/_W$) und beim TB-Medium sogar um 50 % ($^W/_W$) im Vergleich zum BHI-Medium reduziert werden. Das TB- und TSB-Medium enthält neben Hemin nur noch Kasein (Haupt-

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

eiweiß der Milch) als Substanz aus tierischer Quelle. Da Milch ein Produkt des Rindes ist, stellte sich nach wie vor die Problematik einer möglichen Kontamination mit Prionen. In der öffentlichen Meinung wird Milch als frei von Prionen betrachtet und als ungefährlich für den Menschen eingestuft. Jedoch konnten Prionenproteine durch einen Enzymatischen Immunoassay in der Milch nachgewiesen werden [87]. Weiterhin sind in der Literatur Probleme bei der Verwendung von Kasein in Nährmedien beschrieben, z. B. führten Batch-zu-Batch-Variationen des Kaseins zu schwankenden Ausbeuten in der Tetanustoxin-Produktion [88]. Aus diesen Gründen sollte der Kaseinanteil aus dem Nährmedium entfernt werden.

4.1.2 Faktorielle Versuchsplanung zur Reduzierung von „animal-derived“ Komponenten

Der Einfluss der Einzelkomponenten des TB-Mediums wurde mit den Methoden der faktoriellen Versuchsplanung im Schüttelkolbenmaßstab untersucht [86]. Im TB-Medium war BactoTM Yeast Extract (konzentrierte, wasserlösliche Fraktion autolysierter *S. cerevisiae* Zellen) und BactoTM Tryptone (enzymatisch abgebautes Kasein) enthalten. Ziel war sowohl die Reduzierung der „animal-derived“ Substanzen im Medium als auch herauszufinden, welche Komponenten für den positiven Effekt auf das Wachstum verantwortlich waren. Yeast Extract (x_1) und Tryptone (x_2) wurden entsprechend eines 3²-Plans auf drei Konzentrationsstufen verwendet (Tab. 3-8, S.32) und deren Einfluss auf μ bestimmt, siehe Tab. 4-2.

Tab. 4-2: Experimentelle Ergebnisse des Versuchsplanes 1. Versuchsnummer 4 wurde nicht experimentiert und $\tilde{Y} = 0$ angenommen, n.d. = nicht durchgeführt.

Versuchsnummer	Versuchsmatrix			Antwortvektor		Auswertung
	e_0	e_1	e_2	\tilde{Y}_1	\tilde{Y}_2	
1	1	1	1	n.d.	0,096	0,096
2	1	1	-1	0,095	0,088	0,092
3	1	-1	1	0,025	n.d.	0,025
4	1	-1	-1	n.d.	n.d.	0
5	1	0	1	0,074	0,077	0,076
6	1	0	-1	0,060	0,065	0,062
7	1	1	0	0,094	0,095	0,094
8	1	-1	0	0,015	n.d.	0,015
9	1	0	0	0,085	0,074	0,079

Die Auswertung erfolgte mit einem quadratischen Modell \tilde{Y} (Glg. 4-6), wo $\mu \div \tilde{Y}$. Betrachtet wurde der Einfluss der Einzelkomponenten als auch die Wechselwirkung beider Substanzen in Bezug auf μ .

Glg. 4-6:
$$\tilde{Y} = a_0 + a_1 * x_1 + a_2 * x_2 + a_3 * x_1 x_2 + a_4 * x_1^2 + a_5 * x_2^2$$

Glg. 4-7:
$$e_i = \alpha_i + \beta_i * x_i \quad i = 1, 2; \quad |e_i| = 1;$$

$$0 \text{ g l}^{-1} \leq x_1 \leq 24 \text{ g l}^{-1}$$

$$0 \text{ g l}^{-1} \leq x_2 \leq 12 \text{ g l}^{-1}$$

Glg. 4-8: $\hat{Y} = b_0 + b_1 * e_1 + b_2 * e_2 + b_3 * e_1 e_2 + b_4 * e_1^2 + b_5 * e_2^2$

Die Normierung der Variablen x_1 und x_2 zu den Einflussfaktoren e_1 und e_2 erfolgte entsprechend der Normierungsvorschrift (Glg. 4-7) und resultierte in dem normierten Modell \hat{Y} (Glg. 4-8). Die Parameter b_n ($n = 0, 1, 2, 3, 4, 5$) des normierten Modells (\hat{Y}) wurden mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate im Programm MATLAB[®] berechnet. Die Konstruktion des Zentralkompositionsplanes ermöglichte die unabhängige Schätzung der Haupteinflussgrößen mit bewertbaren Regressionskoeffizienten.

Glg. 4-9: $\hat{Y} = 0,075 + 0,040 * e_1 + 0,007 * e_2 - 0,005 * e_1 e_2 - 0,019 * e_1^2 - 0,004 * e_2^2$

Die resultierende Gleichung (Glg. 4-9) für das Modell \hat{Y} zeigt deutlich, dass BactoTM Yeast Extract einen 6-fach höheren Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate hatte als BactoTM Tryptone. Die Dimension des Wechselwirkungsterms ist klein im Vergleich zum b_1 -Faktor, aber der quadratische Term e_1^2 hat einen nicht zu vernachlässigenden Wert. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde der Gradient im Zentralpunkt des Versuchsplanes bestimmt.

Glg. 4-10:
$$\text{grad } \hat{Y} = \begin{bmatrix} \frac{d \hat{Y}}{d x_1} \\ \frac{d \hat{Y}}{d x_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,0069 + 0,000073 * x_2 - 0,00026 * x_1 \\ 0,0035 - 0,000073 * x_1 - 0,00024 * x_2 \end{bmatrix}$$

Glg. 4-11: $x_{(1)}^{OP} = x_{(2)}^{OP} + \lambda * \text{grad } \hat{Y}$

Glg. 4-12: $x_{(1)}^{OP} = \begin{bmatrix} 12 \\ 6 \end{bmatrix} + \lambda * \begin{bmatrix} 0,0034 \\ 0,0011 \end{bmatrix}$

Der Gradient bestätigte, dass der Haupteinfluss auf den Parameter \hat{Y} durch x_1 ausgeübt wurde, da der Anstieg in die x_1 -Richtung am größten war. Die Adäquatheit des quadratischen Modells wurde durch den F -Test mit $F < F_{krit} = 0,155 < 5,42$ nachgewiesen (Modellstreuung = $1,2 \times 10^{-5}$, Versuchsstreuung = $7,8 \times 10^{-5}$, $P = 0,99$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Hefeextrakt im TB-Medium die entscheidende Komponente für eine hohe spezifische Wachstumsrate ist. Der Einfluss von Tryptone ist vernachlässigbar, da die Eliminierung dieser Substanz zu keiner drastischen Reduktion der Wachstumsparameter führte.

Mit diesen Untersuchungen konnte das neue YE-Medium entwickelt werden, welches nur aus BactoTM Yeast Extract und Puffersalzen besteht und erstmals keine Bestandteile aus tierischen Quellen mehr enthält. Im Weiteren sollte nun das Wachstumsverhalten von *L. tarentolae* in diesem Komplexmedium untersucht werden, besonders bezüglich der Reproduzierbarkeit und Stabilität.

4.1.3 Das komplexe YE-Medium

Das YE-Medium bietet die Möglichkeit, *L. tarentolae* in einem Komplexmedium frei von tierischen Substanzen zu kultivieren [86]. Lediglich Hemin ist noch eine Substanz tierischen Ursprungs, welche separat in Abschnitt 4.3. (ab S. 51) betrachtet wird. In der Standkultur wurde ein v von $0,06 \text{ h}^{-1}$ erzielt, siehe Abb. 4-6. Im Schüttelkolben wurde ein μ_{\max} von $0,103 \text{ h}^{-1} \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ gemessen (Anzahl Einzelmessungen: 25). Die Zellen zeigten eine normale promastigote Form, wie sie auch in den anderen Komplexmedien beobachtet wurde, zum Vergleich siehe Abb. 4-5.

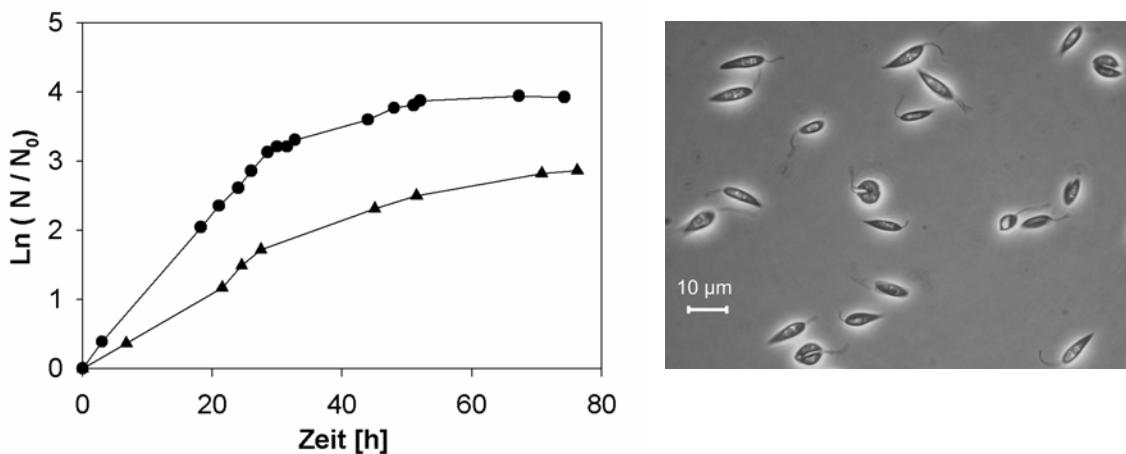


Abb. 4-6: Linkes Bild: Wachstumskinetik von *L. tarentolae* im YE-Medium, Standkultur (▲) und Schüttelkolben (●), $N_0 = 2,42 \times 10^7$ Zellen/ml (Standkultur) und $1,97 \times 10^7$ Zellen/ml (Schüttelkolben). Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21). Rechtes Bild: Mikroskopische Aufnahme von *L. tarentolae* während des exponentiellen Wachstums in YE-Medium.

Die Zellpopulation wies immer Schwankungen in der Zellgröße auf. Diese Inhomogenitäten zeigten sich in allen Wachstumstadien. Zellen vor der Teilung wurden dicker und runder, bis sie sich durch Längsteilung in zwei Tochterzellen aufteilten. Die normale Zellgröße betrug 3 - 5 μm in der Breite und 10 - 15 μm in der Länge.

Glukose wurde als primäre Kohlenstoffquelle im YE-Medium während des exponentiellen Wachstums verbraucht, wie es bereits für andere Komplexmedien festgestellt wurde (siehe 4.1.1, S. 37). Auch der Einfluss auf die pH-Kinetik war identisch (Abb. 4-4, S. 38). Weitere Ausführungen folgen im Abschnitt 4.2. Im exponentiellen Wachstum wurden $3,4 \times 10^8$ Zellen/ml (ca. 4,1 Generationen) erzielt, am Ende der Kultivierung sogar 1×10^9 Zellen/ml und 5,7 Generationen.

Wenn die Glukosekonzentration (GLC) durch Zufütterung in einem unlimitierten Bereich gehalten wurde, traten erste Limitationen im YE-Medium nach einer gebildeten Biomasse (ΔX) von ca. 2 - 2,5 g/l auf, siehe Abb. 4-7. Danach verringerte sich das μ , da die Zellen ihren

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Stoffwechsel anpassen mussten. Diese Zellen benötigten außerdem eine Adoptionszeit, wenn sie in frisches Nährmedium überführt wurden. Für Wachstumsversuche als auch Fermentationen war es erstrebenswert, Zellen aus der ersten exponentiellen Phase zu verwenden, da diese die besten Wachstumsparameter aufwiesen. Bei einer Fermentation, die mit Zellen aus der späten Wachstumsphase beimpft wurden, zeigten sich stark verringerte Wachstumsparameter.

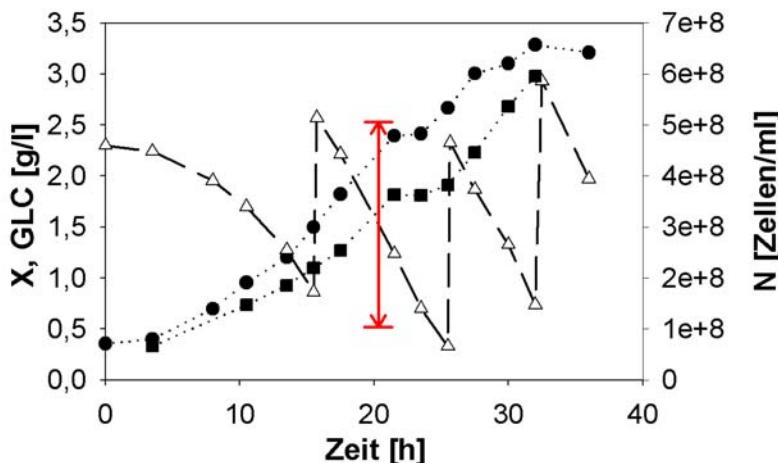


Abb. 4-7: Limitation des YE-Mediums bei unlimitierter Glukosekonzentration (Δ) durch Zufütterung. Darstellung von X (●) und N (■). Schüttelkolbenmaßstab C (siehe 3.2, S. 21).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Anteil an Yeast Extract im Medium um 20% reduziert werden konnte (19,2 g/l Endkonzentration), ohne dass das μ drastisch abfiel [80]. Der dabei auftretende Ausbeuteverlust an Biomasse von 5% wäre vertretbar.

Das entwickelte YE-Medium musste eine stabile, reproduzierbare Kultivierung von *L. tarentolae* über viele Passagen der Standkultur gewährleisten. Das Wachstum musste über viele Tochtergenerationen aufrechterhalten werden, ohne dass die Lebensfähigkeit der Zellen abnahm. Dies war essentiell, da die Standkultur die Zellen für Schüttelkolbenexperimente und Bioreaktorkultivierungen lieferte. Die Zellen mussten an das verwendete Nährmedium angepasst werden, was nach 4 Passagierungen in dem neuen Medium gewährleistet war. Gleichzeitig war das alte Nährmedium genügend ausverdünnt. Ein Maß für die Langzeitstabilität war die erreichte Biomassekonzentration zum Zeitpunkt der Passagierung. Die Beimpfung erfolgte zu 1,3 g/l TBM. Starke Abweichungen in der Endbiomassekonzentration (< 1 g/l TBM) deuteten auf eine Degeneration der Zellen hin und ein Absterben der Kultur war die Folge, trotz Passagierung in frisches Nährmedium.

Zum Monitoring des Wildtyp-Stammes in der Standkultur wurde zum Beginn und am Ende der jeweiligen Passage die Biomassekonzentration bestimmt, ein μ' berechnet und über die Passagenzahl aufgetragen [79], siehe Abb. 4-8. Zu beachten ist, dass μ' nur eine grobe

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Schätzung war, da μ' um einen Mittelwert von $0,039 \text{ h}^{-1}$ schwankte und ein μ_{\max} von $0,06 \text{ h}^{-1}$ für das YE-Medium bestimmt wurde. Die Passagierung erfolgte somit zu Beginn der stationären Phase. Die Kultur konnte als relativ stabil angesehen werden bis zur Passage 79, dort brach das Wachstum schlagartig ein. Bis dahin wurden mehr als 200 Generationen gebildet. Es zeigten sich keine morphologischen Änderungen trotz der limitierenden Wachstumsbedingungen.

Im TB-Medium stoppte das Wachstum in Passage 70 der Standkultur nach einem μ' von $0,043 \text{ h}^{-1}$. Diese Wachstumseinbrüche traten unabhängig vom Laborpersonal und der Jahreszeit (eventuelle Temperaturschwankungen) auf.

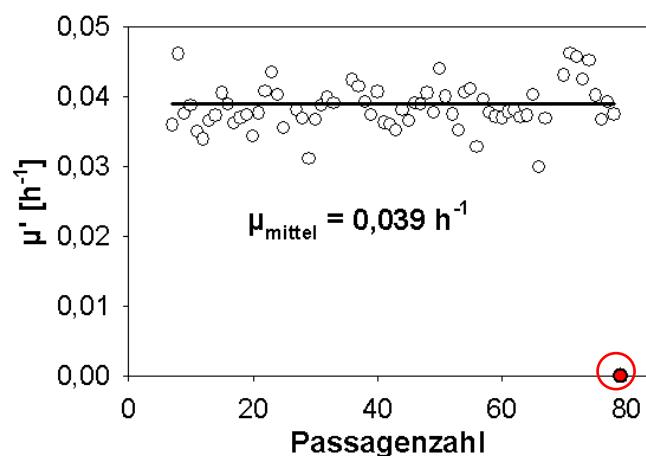


Abb. 4-8: Langzeitstabilität des Wachstums von *L. tarentolae* in der Standkultur, YE-Medium, μ' berechnet zwischen X_0 und X (bei Passagierung). Der Mittelwert aller μ' ergab $0,039 \text{ h}^{-1}$.

Aus Sicherheitsgründen wird eine Passagierung in der Standkultur über 50 Passagen vorgeschlagen (ca. 150 Generationen). Das YE-Medium eignet sich, um *L. tarentolae* über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten stabil zu kultivieren. Somit sind konstante Anfangsbedingungen für größere Kultivierungsmaßstäbe gegeben.

Das YE-Medium unterstützt auch die Kultivierung von *L. tarentolae* im Bioreaktor [86] - eine wichtige Voraussetzung in Hinblick auf eine Prozessentwicklung. Detaillierte Untersuchungen sind im „Teil C“ ab Seite 79 zu finden.

Das Resultat dieser Untersuchungen ist, dass mit dem YE-Medium ein Nährmedium für die Kultivierung von *L. tarentolae* zur Verfügung steht, welches nur Hemin als Substanz tierischen Ursprungs enthält. The Hauptkomponente BactoTM Yeast Extract wird als “animal-free” (englisch: tierfrei) durch die regulatorischen Behörden betrachtet [89].

4.1.4 Entwicklung der definierten Nährmedien SFP(I) und (II)

Test von publizierten Nährmedien

Ausgangspunkt der Entwicklung eines definierten Nährmediums war die Überprüfung von in der Literatur beschriebenen Medien, siehe Tab. 1-3. Das Medium nach Merlen *et al.* [51] unterstützte das Wachstum von *L. tarentolae* nicht. Durch den osmotischen Druck in dem Nährmedium lysierten die Zellen [79, 90]. Im Nährmedium nach McCarthy-Burke *et al.* [52] konnte die beschriebene Verdopplungszeit von 8,9 h nicht nachvollzogen werden. Ein deutlich höheres t_D von 18,5 h wurde gemessen. Im Gegensatz dazu wurde ein viel geringeres t_D (9,4 h) im Medium nach Trager [57] erzielt, dies sogar in Verbindung mit höheren Biomassedichten als in der Literaturstelle beschrieben. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die Untersuchungen in dieser Arbeit im Schüttelkolben erfolgten im Gegensatz zu den Literaturangaben (Standkulturen). Verzichtet wurde auf eine langwierige stufenweise Passagierung d. h., über veränderte Verdünnungsverhältnisse von altem und neuem Medium, um die Zellen an das neue Nährmedium zu gewöhnen, wie es teilweise auch beschrieben wurde. Im Vorfeld der Untersuchungen zeigte sich ein sehr schnelles Adoptionsvermögen der Zellen an neues Nährmedium. Ein Wachstum im ungenügenden, „schlechten“ Medium konnte auch über eine stufenweise Gewöhnung nicht erreicht werden. Dies wurde mit dem Medium 199 (mit Hank's Salzen, Invitrogen, Deutschland) versucht [91].

In der Kultivierung war auffällig, dass dunkle Präzipitationen des Hemins aufgetreten sind. Diese Aggregate traten in allen Wachstumsphasen auf und äußerten sich als fester Belag am Flaschenboden der Standkultur oder als Flocken im Schüttelkolben. Ausfällungen von Hemin in Nährmedium und wässrigen Lösungen wurden in der Literatur beschrieben [92, 93], jedoch nicht in Bezug auf eine Kultivierung von *Leishmania* als störend eingeordnet. Den Fällungen wurde wahrscheinlich keine Beachtung geschenkt, da in der Literatur Standkulturen verwendet wurden und die Heminpräzipitationen dort einen Film am Flaschenboden bilden. Als Flocken äußern sich die Heminpräzipitationen im geschüttelten Kolben und stören zum einen die Messung der Optischen Dichte, da zusätzliches Streulicht erzeugt wird, zum anderen besteht die Gefahr der Verstopfung der Messkapillare des Zellzählgerätes. Im Hinblick auf einen Fermentationsprozess könnten diese Ausfällungen auch den Begasungsring zusetzen und im Downstream Processing stören. Unklar ist weiterhin, in wieweit das ausgefällte Hemin für die Zellen verfügbar ist, da Hemin ein essentieller Nährstoff ist. Eine Sub-Kultivierung der Zellen über mehr als 2 Passagen war nicht möglich.

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Auffällig ist, dass in komplexen Nährmedien wie BHI oder YE keine Präzipitationen beobachtet wurden. Das Hemin bindet wahrscheinlich an Medienkomponenten beispielsweise Proteine, wird stabilisiert und eine Ausfällung verhindert. Vorrangiges Ziel weiterer Untersuchungen war die Stabilisierung von Hemin, um eine Kultivierung in einem definierten Medium zu ermöglichen.

Stabilisierung von Hemin

Das Medium nach Trager zeigte, wie bereits beschrieben, die besten Ergebnisse und wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet [79, 90]. Da Hemin sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Zellen präzipitiert, wird vermutet, dass die Salze im Medium die Löslichkeit des Hemins verringern könnten. Eine gezielte Reduktion ist aber nicht möglich, da viele Aminosäuren als auch Vitamine als Salze vorliegen. Die Fachliteratur wurde nach möglichen Stabilisierungsmethoden für Hemin durchsucht. Dabei wurde die Möglichkeit untersucht, Hemin durch ein neues Lösungsmittel der Stammlösung zu stabilisieren. Der Austausch von Triethanolamin gegen Natronlauge brachte keinen positiven Effekt.

Die Ergebnisse beim Zusatz von verschiedenen, potentiell stabilisierenden Substanzen sind in Tab. 4-3 gezeigt. Bei der Herstellung der Lösungen wurde nach drei Methoden vorgegangen. Mit „A“ wird die Herstellung von neuen Heminstammlösungen bezeichnet, mit „B“ die Zugabe der Substanz zum Nährmedium nach Lösen in Wasser und mit „C“ die Mischung der Substanzstammlösung mit der Heminstammlösung (2,5 g/l Hemin in 50%igem Triethanolamin) bevor die Zugabe zum Medium erfolgte. Die Heminpräzipitation wurde entweder visuell bewertet oder über die Heminanalytik, siehe 3.4, berechnet. Deutlich wird, dass BSA als einzige Substanz das Hemin stabilisieren kann, wenn es in einem molaren Verhältnis von 1:1 zugegeben wird. Der Heminverlust kann durch diesen Zusatz auf 8% reduziert werden. BSA als auch humanes Serumalbumin besitzen eine hydrophobe Tasche, in der eine Bindungsstelle für ein Heminmolekül nachgewiesen wurde [100]. Jedoch ist Rinderserumalbumin (BSA) eine Substanz tierischen Ursprungs, was die Problematik der Kontamination des rekombinanten Produktes mit Viren oder Prionen wieder aufwirft. Vorübergehend wurde BSA trotzdem im Nährmedium verwendet (SFP(I)-Medium), um weiterführende Versuche anderer Themengebiete zu ermöglichen. Gleichzeitig wurde nach einem Ersatz für BSA gesucht.

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Tab. 4-3: Hemininstabilisierung durch verschiedene Substanzen [79, 90]. Visuelle Präzipitationsbeurteilung durch Einteilung in die Ordinalskala „starke“, „schwache“ und „keine“ Präzipitation. Alternativ: Berechnung des prozentualen Heminverlustes durch die Heminanalytik (quantifiziert). Abkürzungen: DMSO - Dimethylsulfoxid, PVA - Polyvinylalkohol, CD - Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, BSA - Rinderserumalbumin, PEG - Polyethylenglycol. Chemikalien wurden von Carl Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Substanz	Art der Herstellung	Endkonzentration der Substanz im Nährmedium	Präzipitations- auswertung	
			visuell	quantifiziert
Hemin-Arginin [94]	A*	9 mg/l Arginin	stark	
DMSO [95]	A**	-	stark	
PVA+ CD [96]	A***	PVA: 90 mg/l CD: 98 mg/l	stark	
CD [97]	A****	98 mg/l	stark	
PVA [98]	B	1 g/l; 100 mg/l	stark	
DMSO [95]	B	1%; 10% (v/v)	stark	
Imidazol [99]	B	$3,4 \times 10^3$ mg/l	stark	
Niacinamid [99]	B	$6,1 \times 10^3$ mg/l	stark	
HEPES [99]	B	$23,8 \times 10^3$ mg/l	stark	
BSA [100]	B	15 mg/l 528 mg/l	stark	
PEG 400	B	0,1%; 1% (v/v)	keine	
Silicon	B	0,05%; 0,5% (v/v)	stark	
BSA [100]	B	528 mg/l		8,5%
CD [97]	B	0,1% (w/w)		67%
PEG 20000	C	4% (w/w) 8% (w/w)		70% 54%
PEG 1000	B	0,1% (w/w) 1% (w/v)	stark	
				schwach

A* – Hemin und Arginin werden in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt, über Nacht getrocknet und in 50% Triethanolamin gelöst; Endkonzentration Hemin; 2,5 g/l

A** – 2,5 g/l Hemin werden in DMSO gelöst.

A*** Lösung 1: 2,8 mg Hemin in 14 ml 96% Ethanol (pH 9) gelöst, Lösung 2: 50 mg PVA and 55,2 mg CD in 6 ml A. dest gelöst; Lösungen 1 und 2 vereinigt; über Nacht gerührt, Entfernung von Ethanol und Wasser durch Vakuumdestillation und Lyophilisierung; der feste Rückstand wurde in A. dest aufgenommen. Endkonzentration Hemin: 1g/l

A**** 2,8 mg Hemin in 14 ml 96% Ethanol (pH 9) gelöst, 55,2 mg CD in 6 ml A. dest gelöst; Lösungen vereinigt; über Nacht gerührt, Entfernung von Ethanol und Wasser durch Vakuumdestillation und Lyophilisierung; der feste Rückstand wurde in A. dest aufgenommen. Endkonzentration Hemin: 1g/l

Polyvinylalkohol wird von Biggers et al. [101] als angemessener Ersatz für BSA beschrieben. Eine Stabilisierung des Hemins im Nährmedium bewirkte es jedoch nicht. Bei der visuellen Beurteilung zeigte Polyethylenglykol (PEG 1000) gute Tendenzen und wurde deshalb genauer untersucht. Wie in Tab. 4-4 deutlich wird, kann eine 70%ige Stabilisierung des Hemins durch eine PEG1000-Hemin-Stammlösung erzielt werden. Der Verlust von 27% resultiert wahrscheinlich aus der Adsorption von Hemin zur Glasoberfläche, siehe 4.3.1. Die

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Stammlösung ist ein guter Kompromiss zwischen der Hemininstabilisierung als auch der möglichst geringen Viskositätserhöhung durch die PEG-Zugabe. Die Peakflächen waren zum Zeitpunkt 0 h zwischen autoklavierten und sterilfiltrierten, identischen Ansätzen nur minimal unterschiedlich.

Tab. 4-4: Weiterführende Experimente mit PEG1000 zur Hemininstabilisierung [79, 90]. Als Heminstammlösung diente die bei der Kultivierung verwendete Lösung, siehe 3.2. Zum Sterilfiltrieren wurden 0,2 µm Filter verwendet. Hemin wurde in einer Endkonzentration von 5 mg/l verwendet. Der Heminverlust wurde nach 18 bzw. 20 h durch die Heminanalytik (Abschnitt 3.4) bestimmt.

Typ	Herstellung	Sterilisierung	Auswertung	
			PEG1000 Endkonzentration (% (w/w))	Heminverlust (%)
A	PEG mit A. dest verdünnt und in das Nährmedium gegeben	autoklaviert	1	45
			4	66,5
			8	36
			10	36
			20	31
B	PEG-Stammlösung mit der Hemin-Stammlösung gemischt und in das Nährmedium gegeben	autoklaviert	4	43
			8	46
			10	30
C	PEG-Hemin-Stammlösung: 2 g/l Hemin in 50% Triethanolamin lösen und mit 10% oder 30% (w/w) PEG1000 mischen	autoklaviert	0,025	27
		filtriert	0,075	35
		autoklaviert	0,075	34
D	PEG-Hemin-Stammlösung: 1,25 g/l Hemin in 50% Triethanolamin lösen und mit 10% oder 30% (w/w) PEG1000 mischen	filtriert	0,04	75
			0,12	86

Kultivierungen in den Nährmedien SFP(I) und SFP(II)

Die Stabilisierung von Hemin mit BSA (SFP(I) Medium) oder mit PEG 1000 (SFP(II) Medium) ermöglichte das Wachstum von *L. tarentolae* in den definierten Nährmedien, ohne das Fällungen von Hemin auftraten [90]. Wie die Kinetiken in Abb. 4-9 verdeutlichen, wuchs *L. tarentolae* zu Beginn der Kultivierung mit einem ν von $0,094 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,096 \text{ h}^{-1}$, was der spezifischen Zellteilungsrate von komplexem Nährmedium entsprach. Die Zellen nutzten in dieser ersten Phase Glukose als C- und Energiequelle, wie es bereits in Komplexmedium beobachtet wurde. Im Unterschied dazu kam es jedoch nicht zu einem Ansäuern des Mediums, sondern zu einer Alkalisierung.

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

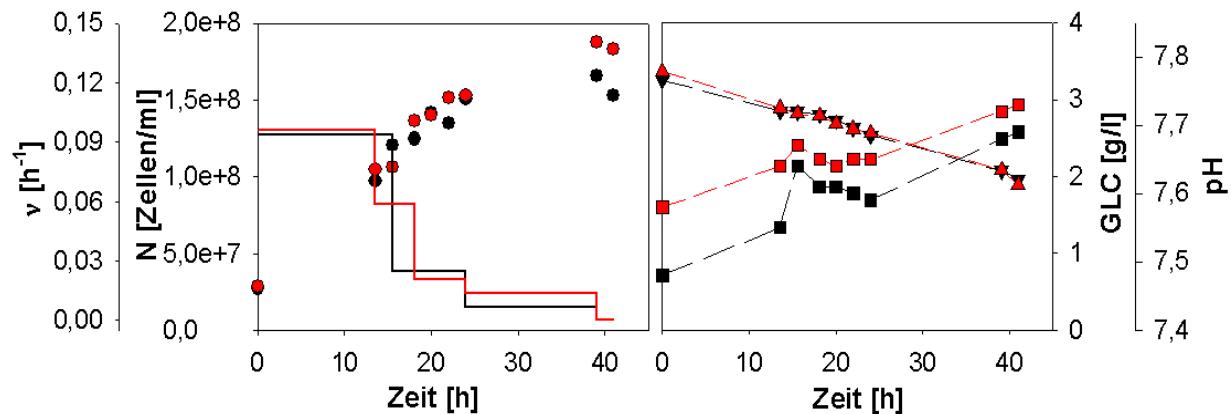


Abb. 4-9: Wachstumskinetik von *L. tarentolae* in den Medien SFP(I) (schwarz) und SFP(II) (rot) mit N (○), v (—), pH (□) und GLC (△), Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21), 26°C.

In der 1. Phase wurden Zelldichten von $1 - 1,2 \times 10^8$ Zellen/ml erzielt, bis Limitationen in den Nährmedien auftraten. Als Folge verringerte sich v , der pH-Wert blieb nahezu konstant. Nach einem Übergangsbereich folgte eine zweite Wachstumsphase, in der das Wachstum mit einem stark verringerten v ($0,01 \text{ h}^{-1}$) stattfand. Da die Zellen einen höheren Energiebedarf zur Überbrückung der Limitation hatten, verringerte sich in dieser Phase der Ertragskoeffizient $Y_{N/GLC}$ drastisch (Berechnungen $Y_{N/GLC}$ in Abschnitt 4.2.1, S. 50). Am Ende der Kultivierung wurden maximale Zelldichten von $1,8 \times 10^8$ Zellen/ml erzielt, was deutlich höher ist als bisherige Literaturwerte, siehe Tab. 1-3, S. 12. Die Nährmedien ermöglichen die Bildung von 2,6 (SFP(I)) bzw. 2,7 (SFP(II)) Generationen.

Das SFP(II) Medium wurde für weitere Untersuchungen favorisiert, da es nur noch Hemin als „animal-derived“ Substanz enthielt.

An dieser Stelle ist die Darstellung der spezifischen Raten μ und v genauer zu erklären, denn die Raten werden mit approximierten Übergangsbereichen dargestellt. Die Raten μ oder v sind stetige Funktionen und weisen im Realen keine Sprünge auf, sondern zeitlich schnelle Übergänge. Diese Übergangsbereiche waren nicht Gegenstand dieser Forschungen und wurden deshalb nicht im Detail untersucht. Im Folgenden werden deshalb überwiegend die berechneten Mittelwerte der Raten gezeigt mit vermuteten Übergangsbereichen, die auch teilweise eine Sprungänderung darstellen können. Diese Festlegung ist zulässig, da die Raten über längere Zeiträume betrachtet werden und die Übergangsbereiche im Detail gegenwärtig nicht von Interesse sind.

4.2 Primäre Energiequelle – Glukose

Glukose wurde in allen untersuchten Komplexmedien als primäre Energie- und Kohlenstoffquelle metabolisiert. Die Verstoffwechselung von GLC wurde begleitet durch ein Sinken des pH-Wertes, siehe Abb. 4-4, S. 38 und Abb. 4-10. Der pH-Wert wird im Detail in Abschnitt

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

4.5 betrachtet. Nach Verbrauch der Glukose schalteten die Zellen auf alternative Energiequellen um, wahrscheinlich auf Aminosäuren, und der pH stieg. Die Raten μ und v waren stark verringert im Vergleich zum Wachstum auf Glukose. Am Ende einer Kultivierung befand sich der pH im Bereich von 7,4 – 7,7 und die Zellen waren sehr dünn und teilweise degeneriert. Zellen dieses Stadiums konnten für ein erneutes Wachstum durch Passagierung in frisches Nährmedium nicht reaktiviert werden.

Bei Wachstum von *L. tarentolae* auf GLC korrelierte die Zelldichte mit der optischen Dichte bei 600 nm, also der Trockenbiomassekonzentration. Diese Korrelation war auch am Anfang der stationären Phase gegeben, siehe Abb. 4-10. Da $N \sim OD$, ist weiterhin $x \sim N$ zulässig und daraus folgt, dass $v = \mu$ ist. Deshalb kann im Weiteren entweder μ oder v zur Beschreibung des exponentiellen Wachstums angegeben werden.

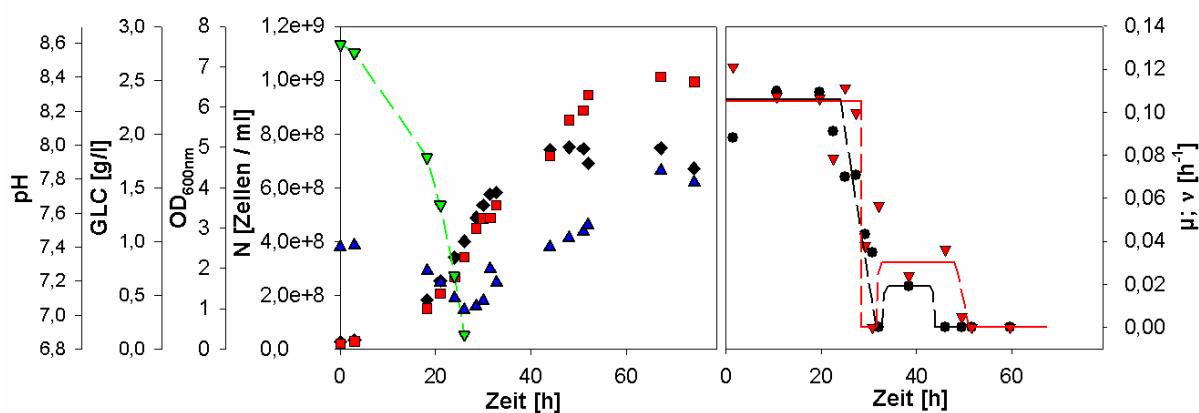


Abb. 4-10: Wachstumskinetik von *L. tarentolae* in YE-Medium bei 26°C. Links: OD bei 600 nm (◆), N (■), GLC (▽), pH (△). Rechts: μ (●) und v (▽), ermittelt zwischen 2 Messpunkten, aufgetragen zur mittleren Intervallzeit. μ (—) und v (—) nach logarithmischer Glättung sind mit vermuteten Übergangsbereichen (• ·) dargestellt. Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21).

Am Ende der stationären Phase und beim Wachstum auf Aminosäuren kam es zu morphologischen Änderungen der Zellen und $v \neq \mu$, siehe Abb. 4-10. Die Zellen wurden in diesem Stadium deutlich dünner und die Verteilung der Zellzahl verschob sich zu kleineren Messbereichen, wie in der Abb. 4-11 verdeutlicht wird. Auch bildeten die Zellen längere Geißeln aus. Durch die morphologischen Veränderungen wurde die OD-Messung beeinflusst, da zwar die Anzahl der Zellen weiter zunahm, jedoch die kleineren Zellen kaum eine Erhöhung des gestreuten Lichtes verursachten. Die spezifische Wachstumsrate μ war an dieser Stelle kein aussagekräftiger Parameter mehr. Nur die spezifische Zellteilungsrate v , bestimmt aus der Zelldichte, kann verlässliche Aussagen liefern. Hiermit werden zumindest die Veränderungen der Zellbreite erfasst.

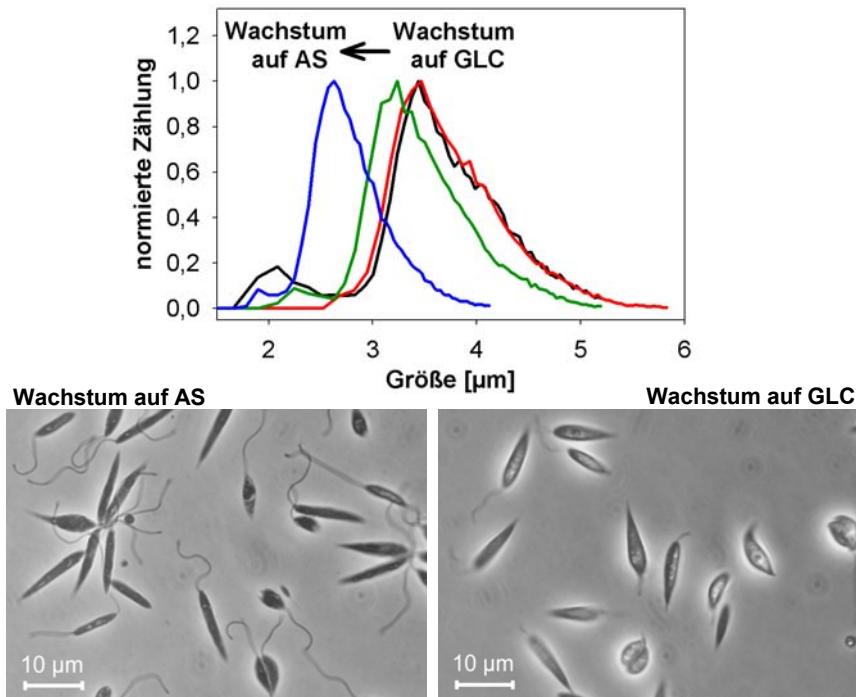


Abb. 4-11: Oben: Verschiebung der Zellverteilung bei Wachstum auf verschiedenen Energie-Quellen im YE-Medium. Zellverteilung bei GLC-Verbrauch (—), GLC-Limitation (—), Umschalten des Stoffwechsels (—) und Aminosäure(AS)-Stoffwechsel (—). Fotos unten: physiologisches Aussehen der Zellen bei Wachstum auf Glucose (rechtes Bild) und Aminosäuren (linkes Bild).

4.2.1 Ertragskoeffizienten $Y_{X/GLC}$, $Y_{N/GLC}$

Die Ertragskoeffizienten $Y_{X/GLC}$ und $Y_{N/GLC}$ wurden unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels entsprechend der Glg. 4-13 und Glg. 4-14 für das Substrat Glukose berechnet, worin ΔN die gebildete Zelldichte, ΔX die gebildete Biomasse und ΔGLC die verbrauchte Glukose für ein konstantes Volumen ist. Die Berechnung erfolgte für ein definiertes Zeitintervall, indem die Raten μ bzw. v als konstant angesehen werden konnten.

$$\text{Glg. 4-13: } Y_{N/GLC} = \frac{\Delta N}{\Delta GLC} \quad [\text{Zellen/g Glukose}]$$

$$\text{Glg. 4-14: } Y_{X/GLC} = \frac{\Delta X}{\Delta GLC} \quad [\text{g TBM / g Glukose}]$$

Während des exponentiellen Wachstums in den verschiedenen Komplexmedien variierte der Ertragskoeffizient $Y_{N/GLC}$ (Tab. 4-5) und war in der Submerskultur (Schüttelkolben) höher als in der Emerskultur (Standkultur). Der Ertragskoeffizient verringerte sich bei Limitationen im Nährmedium, da die Zellen wahrscheinlich mehr Energie aufwenden mussten, um sich an den Nährstoffmangel anzupassen.

Tab. 4-5: Vergleich der Ertragskoeffizienten $Y_{N/S}$ in verschiedenen Komplexmedien bei Kultivierung als Standkultur oder Schüttelkolben.

Medium	Standkultur		Schüttelkultur	
	ν [h ⁻¹]	$Y_{N/S}$ [Zellen/ g Glukose]	ν [h ⁻¹]	$Y_{N/S}$ [Zellen/ g Glukose]
BHI	0,063	$8,9 \times 10^7$	0,103	$1,4 \times 10^8$
TSB	0,054	$9,1 \times 10^7$	0,090	$1,1 \times 10^8$
TB	0,056	$1,2 \times 10^8$	0,097	$1,3 \times 10^8$
YE	0,060	$1,2 \times 10^8$	0,103	$1,2 \times 10^8$

Der Ertragskoeffizient $Y_{X/GLC}$ für Wachstum in YE-Medium ist für weitere Modellierungen, z. B. der kontinuierlichen Kultivierung in Abschnitt 4.6.1, besonders wichtig und wurde zu $0,93 \pm 0,09$ g TBM/ g Glukose ermittelt (Anzahl Einzelmessungen: 24).

Der $Y_{X/GLC}$ im definierten Medium (SPF(I) und SFP(II)) war in der Größenordnung von 1 g TBM/ g Glukose in der ersten Wachstumsphase (siehe Abb. 4-9, S. 48).

4.2.2 Alternative C-Quellen

Der Zusatz von alternativen C-Quellen ergab [80], dass *L. tarentolae* mit Glycerin (0,95%) im YE-Medium kultivierbar war ($\mu = 0,097$ h⁻¹). Bei Zugabe von Ethanol trat bei 1,1% (v/v) eine Wachstumsinhibition auf, denn das μ sankt auf 0,071 h⁻¹ und die Zellen begannen, zunehmend zu deformieren. Ohne Zugabe einer externen C-Quelle trat zwar ein Wachstum auf ($\mu = 0,082$ h⁻¹), jedoch konnten nur 1,4 g/l TBM während des exponentiellen Wachstums gebildet werden. Mit Glukose wurden 2,5 g/l TBM erzielt (zum Vergleich 4.1.3).

4.3 Essentielle Eisenquelle – Hemin

Hemin ist der essentielle Wachstumsfaktor für die Kultivierung von *L. tarentolae* und stellt damit eine interessante Steuergröße für einen Bioprozess dar. Ein heminlimitierter FedBatch-Prozess ist denkbar, jedoch sind einige grundlegende Untersuchungen notwendig, bevor solche Prozessstrategien entworfen werden können.

Eine analytische Nachweismethode für Hemin war bisher nicht etabliert und es gab keine Aussagen zum Heminverbrauch beim Wachstum von *L. tarentolae*. In der Literatur findet sich eine Untersuchung von Pal & Joshi-Purandare [42], in der eine optimale Hemin-Konzentration von 10 µmol/l für *L. donovani* zu Unterstützung der Proteinsynthese und der Zellteilung festgestellt wurde. Bei einer Konzentration von 50 µmol/l trat eine Inhibition der Proteinsynthese und Änderungen in der Morphologie der Zellen (verkürzte Geißel, gedrungene Form) auf. Da Hemin bei den Kultivierungen von *L. tarentolae* in einer Konzentration von 5 mg/l (8 µmol/l) eingesetzt wird, liegt wahrscheinlich eine nahezu

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

optimale Konzentration vor. Eine erneute Heminzugabe bei der Fermentation zeigte einen reaktivierenden Effekt auf das Wachstum, da Zellen in der stationären Phase zu einem exponentiellen Wachstum mit μ_{\max} zurückkehrten, siehe Abschnitt 4.11.1, Seite 83 [102]. Weitere Heminzugaben wiederholten diesen Effekt nicht.

Weiterhin zeigte sich in Schüttelkolbenversuchen, dass der Organismus ein „Gedächtnis“ für Hemin besitzt und eine begrenzte Zeit ohne Hemin wachsen kann. Dieser Effekt wird in Abschnitt 4.3.3 genauer betrachtet.

4.3.1 Heminanalytik

Die analytische Bestimmung der Heminkonzentration im Nährmedium stellte sich als schwierig heraus. Eine einfache Bestimmung des Absorptionsspektrums von Hemin [103] in wässriger Lösung ist zwar prinzipiell möglich, jedoch wurden charakteristische Absorptionspeaks (490 und 615 nm) durch die Grundabsorption des YE-Mediums überlagert.

Der Nachweis von Hemin gelang durch eine wässrige 2-Phasen-Extraktion in saures Chloroform [79, 81, 86]. Hemin erzeugte in Chloroform einen Absorptionspeak in der Soret-Region [81], der charakteristisch für Porphyrine ist. Der Absorptionspeak trat nur bei Anwesenheit von Hemin auf, wie die Abb. 4-12 belegt.

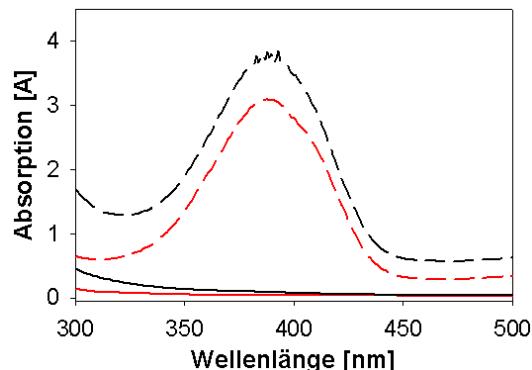


Abb. 4-12: Absorptionsspektren von Wasser (rot) und YE-Medium (schwarz) nach Extraktion in Chloroform (2 ml). Bei der Extraktion aus YE-Medium wurden 2 ml DMSO zugesetzt. Vergleich der Spektren ohne Hemin (—) und mit 5 mg/l Hemin (- -), 50 ml Falcons.

Mit einer 3-stufigen Extraktion wurde das Lösungsbestreben des Hemins in die Chloroformphase untersucht, siehe Tab. 4-6. Dabei wurde deutlich, dass sich ca. 98% des insgesamt detektierbaren Hemins bereits in der 1. Stufe in der Chloroformphase löste und in den nachfolgenden Stufen nur noch geringe Mengen an Hemin extrahiert werden konnten. Unter der Annahme, dass 1,4% des Hemins in der wässrigen Phase verblieben sind (Summe der Heminanteile Stufe 2 und 3), ergibt sich für die erste Extraktionsstufe ein Verteilungskoeffizient von 22 unter Berücksichtigung der Volumenverhältnisse. Der Verteilungs-

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

koeffizient gibt an, das Hemin ein 22mal höheres Lösungsbestreben für die Chloroformphase als für die wässrige Phase hat.

Tab. 4-6: Mehrstufige Extraktion von Hemin (5 mg/l) in 2 ml Chloroform. Die Spektren der Chloroformphase wurden pro Stufe aufgenommen und die korrigierte Peakfläche (PA_{korr}) berechnet. Zur Auswertung wurde die Summe der korrigierten Peakflächen zu 100% gesetzt. (50 ml Falcon-Röhrchen).

Stufen	PA_{korr} (Chloroformphase) [A*nm]	Auswertung
1. Extraktion	74,5	98,6%
2. Extraktion	0,6	0,8%
3. Extraktion	0,4	0,6%
Summe	75,5	100%

Zur Charakterisierung der Analytikmethode war es entscheidend, die Haupteinflussfaktoren auf die Messmethode herauszufinden und geeignete Festlegungen zu treffen. Nur so sind reproduzierbare Ergebnisse möglich.

Einfluss von Material und Größe des Reaktionsgefäßes

Als Erstes galt das Interesse dem zu verwendenden Reaktionsgefäß, unter Berücksichtigung des nachfolgenden Zentrifugationsschrittes. Beim Vergleich von Polypropylen (PP) und Glasröhrchen zeigte sich, dass bei gleichem Probenansatz im Glasröhrchen ca. 35% weniger korrigierte Peakfläche wiedergefunden wurde [79]. PP-Röhrchen sind für die Extraktion zu bevorzugen. Der große Verlust an Glasoberflächen ist damit zu erklären, dass Hemin Eisen enthält und Eisenionen sehr stark an Glas adsorbieren. Die Erkenntnis macht die Etablierung der Heminanalytik schwierig, da im Laboralltag viele Glasgeräte verwendet werden und die Heminstammlösung in einem Glasgefäß gelagert wird. Weiterhin werden die Kultivierungen von *L. tarentolae* in Glasschüttelkolben und im Glasbioreaktor durchgeführt. Bei der Interpretation der Analytikergebnisse ist dies immer zu beachten.

Weiterhin hatte sich gezeigt, dass auch das Verhältnis der Füllhöhe zur Gefäßoberfläche einen Einfluss hat, denn beim Vergleich von 15 ml und 50 ml PP-Röhrchen (Falcon) wurden ca. 12% weniger PA_{korr} bei dem 15 ml Röhrchen gemessen [79]. Im 15 ml Röhrchen hatten die 4 ml Probe mit Hemin eine größere Benetzungsfläche zum Kunststoff als im 50 ml Röhrchen. Da diese Einflüsse bestehen, ist für jede Art und Größe von Probenröhrchen eine Standardkurve anzufertigen, um die Heminkonzentration verlässlich bestimmen zu können.

Für eine Standardprozedur sind trotz der Abweichung die 15 ml PP-Röhrchen zu bevorzugen, da diese besser in der Handhabung sind, z. B. bei Abtrennung der wässrigen Phase. Außerdem sind sie preiswerter als die 50 ml PP-Röhrchen. Da die Absorption von

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Hemin zu den Oberflächen besteht, sind die Röhrchen nach der Extraktion zu verwerfen. Eine mehrfache Verwendung führte zu verfälschten Messergebnissen.

Einfluss des Volumens der Phasen auf die Extraktion

Interessant war weiterhin, in wieweit die Volumenverhältnisse der Phasen die Verteilung des Hemin beeinflussten. Zuerst wurde das Volumen der wässrigen Phase von 6,2 ml bis 9,3 ml variiert, die eingesetzte Heminmasse aber konstant gehalten und in 2 ml Chloroform extrahiert. Es bestätigte sich, dass Hemin ein sehr starkes Lösungsbestreben in die Chloroformphase hatte, da unabhängig von dem verwendeten Volumen der wässrigen Phase annähernd konstante PA_{korr} gemessen wurden (Abweichungen < 2,5%).

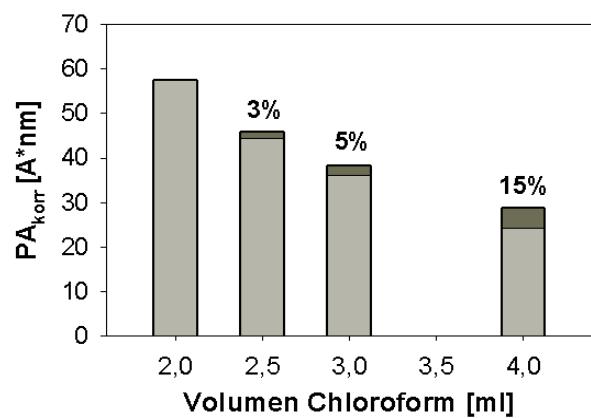


Abb. 4-13: Einfluss des Chloroformvolumens auf die Extraktion einer konstanten Heminmasse. Die gemessenen PA_{korr} (■) wurden den theoretischen PA_{korr} (■) gegenübergestellt, welche sich unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnungen aus der Referenzfläche (PA_{korr_2ml} Chloroform) theoretisch ergaben. Im Diagramm sind die relativen Fehler zwischen theoretischem und gemessenem PA_{korr} angegeben.

Trotz des sehr guten Lösungsbestrebens von Hemin in Chloroform hatte das verwendete Volumen der Chloroformphase einen Einfluss auf das Messergebnis. Wie in Abb. 4-13 zu sehen ist, nahm der relative Fehler mit steigendem Chloroformvolumen zu. Je stärker das Hemin in Chloroform verdünnt wurde, umso mehr wirkten sich beispielsweise Messfehler des Spektrometers, Pipettierfehler oder die Adsorption von Hemin an die Gefäßoberflächen aus. Festzuhalten ist, dass bei der Extraktion in 3 ml Chloroform ein vertretbarer Fehler von ca. 5% auftrat. Dies ist wichtig für die Aussagefähigkeit des nachfolgenden Versuchsplanes.

Einfluss der Heminstammlösung auf die Extraktion

Die Heminstammlösung wurde mit 0,5% Triethanolamin hergestellt. Dieses organische Lösungsmittel hatte einen geringfügigen Einfluss auf die Extraktion, denn 8% weniger PA_{korr} wurden bei Anwesenheit von Triethanolamin erzielt. Stabilitätsuntersuchungen der Heminstammlösung zeigten, dass bei einer Lagerung im Kühlschrank (4°C) die Hemin-

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

konzentration >100 Tagen relativ konstant blieb. Bei einer Lagerung bei Licht und Raumtemperatur begann ein exponentieller Zerfall nach 20 Tagen [79]. Dies ist damit zu erklären, dass Hemin im Allgemeinen als lichtempfindlich eingestuft wird.

Standardkurve

Als Standardprozedur wurde die Verwendung von 15 ml Röhrchen und die Extraktion in 2 ml Chloroform festgelegt, wie in Abschnitt 3.4, S. 27, beschrieben. Unter diesen Bedingungen konnte über die korrigierte Peakfläche eine gute Korrelation zur Heminkonzentration der Standardlösung hergestellt werden, wie die Abb. 4-14 zeigt.

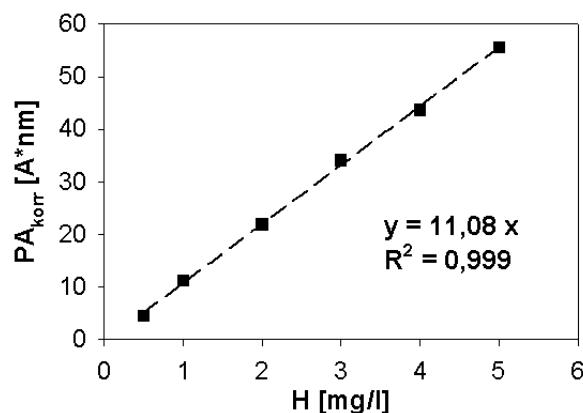


Abb. 4-14: Standardkurve für die Hemin-Detektion mit einem Korrelationskoeffizienten von $11,08 A\text{ nm l/mg}$ (Peakfläche pro Heminkonzentration) [79, 86], bestimmt mit einer 5 mg/l Hemin-Stammlösung (in $0,5\%$ Triethanolamin), 15 ml Röhrchen und Extraktion in 2 ml Chloroform. Für die 50 ml Röhrchen wurde ein Korrelationskoeffizient von $13,84 A\text{ nm l/mg}$ ermittelt (Definitionsbereich: $2 - 5\text{ mg/l}$ Hemin).

In proteinreichen Lösungen adsorbierte Hemin an Proteine, welche sich in denaturierter Form bei der 2-Phasen-Extraktion in der Interphase anreicherten. Deshalb wurde vor der Extraktionsprozedur Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt, um das Hemin abzulösen [81]. Wie oben gezeigt, beeinflusst dieses zusätzliche Volumen der wässrigen Phase (2 ml) das Verteilungsverhältnis an sich nicht. DMSO hatte jedoch Einfluss auf die Peakform und erhöhte die Basislinie, siehe Abb. 4-12. Deshalb war die Kompensation der Basislinie zur Berechnung der PA_{korr} notwendig.

Der systematische Einfluss von Proteinen des YE-Mediums auf die Hemin-Extraktion wurde genauer untersucht und ein Offset von $\approx 0,6\text{ mg/l}$ Hemin (unter Annahme von konstanten Proteinkonzentrationen) ermittelt. Ursache der Verschiebung des Detektionslimits war, dass das gebundene Hemin nicht vollständig von den Proteinen durch DMSO abgelöst werden konnte. Der Korrelationsfaktor zwischen Peakfläche und Heminkonzentration blieb konstant.

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Zur Validierung der Messmethode wurden die verschiedenen Substanzen, die bei der Extraktion zugesetzt werden, genauer untersucht. Bei der Entwicklung der Versuchspläne wurden die bisherigen Ergebnisse berücksichtigt, z. B. wurde pro Plan eine Heminstammlösung, eine Art von Extraktionsgefäß und ein festgelegtes Chloroformvolumen verwendet, und damit systematische Fehler ausgeschlossen.

Einfluss von NaCl, DMSO und YE auf die Extraktion (Versuchspläne)

In einem ersten Versuchsplan (Nr.2, siehe Tab. 3-9, S. 32) wurde der Einfluss von NaCl ($\div e_1$) und DMSO ($\div e_2$) auf die korrigierte Peakfläche untersucht und die Ergebnisse in Tab. 4-7 zusammengefasst.

Tab. 4-7: Experimentelle Ergebnisse des Versuchsplanes 2 mit der $\bar{Y} \div PA_{korr}$ als Antwortvektor.

Versuchs- nummer	Versuchsmatrix			\bar{Y}
	e_0	e_1	e_2	
1	1	1	1	30,08
2	1	-1	1	27,71
3	1	1	-1	14,76
4	1	-1	-1	16,16

Die Anpassung eines linearen Modells (Glg. 4-15, $\hat{Y} \div PA_{korr}$) ergab, dass DMSO einen 28mal höheren Einfluss auf die Extraktion von Hemin hatte als NaCl. In Kombination mit DMSO hatte NaCl eine stärkere Wirkung als allein (Wechselwirkungsterm). Ohne DMSO konnten nur ca. 50% des Hemins extrahiert werden, ein Fehlen von NaCl führte zu 8% weniger extrahiertem Hemin.

$$\text{Glg. 4-15: } \hat{Y} = 22,18 + 0,24 * e_1 + 6,72 * e_2 + 0,94 * e_1 e_2$$

Festzuhalten ist, dass mit diesem ersten Stützmodell NaCl als Haupteinflussgröße ausgeschlossen werden konnte. Für maximale Extraktionsausbeuten sollte jedoch NaCl zugesetzt werden. Um zukünftig eine Vereinfachung der Extraktionsmethode zu erreichen, könnte NaCl aus der Prozedur zu entfernen.

DMSO wurde als ein Haupteinflussfaktor identifiziert und dessen Wirkung in einem weiteren Versuchsplan genauer untersucht, siehe Anhang 3, S. 149. Ein reduzierter 3³-Zentralkompositionenplan mit Sternpunkten und Zentralpunkt wurde experimentiert, da 3fach Wechselwirkungen nicht geschätzt werden sollten. Weiterhin wurden bisherige Erfahrungen zur Reduzierung der Versuchszahl berücksichtigt, z. B. wurden die Versuche ohne Heminzusatz nicht experimentiert, da in Vorversuchen kein Absorptionspeak in der Chloroformphase detektiert werden konnte (zum Vergleich siehe Abb. 4-12, S. 52).

Hemin war erwartungsgemäß der Haupteinflussfaktor, wie das lineare Modell (Glg. 4-16) belegt, in der $\hat{Y} \div PA_{korr}$. Das YE-Medium hatte einen stark negativen Effekt auf das

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Extraktionsergebnis (-4,52* e_3), da die Proteine des Komplexmediums das Hemin bei der Extraktion zurückhielten.

Glg. 4-16:

$$\hat{Y} = 19,10 + 20,10 * e_1 - 0,24 * e_2 - 0,88 * e_1 e_2 - 4,52 * e_3 - 4,66 * e_1 e_3 + 0,39 * e_2 e_3$$

Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich, dass mit steigenden DMSO-Zugaben die Probe immer wärmer wurde. Besonders bei 2,5 ml DMSO-Zugabe war der Reaktionsansatz sehr warm und die Proteine im Komplexmedium denaturierten im starken Maße. Das protein gebundene Hemin wurde mitgerissen und ging für die Analytik verloren. Dieser Effekt äußerte sich in einem negativen Haupteinfluss des DMSO (-0,24* e_2) und einem negativen 2fach Wechselwirkungsterm von Hemin und DMSO ($e_1 e_2$). Wie bereits festgestellt wurde, sind die Extraktionsausbeuten ohne DMSO deutlich geringer. Deshalb muss dieser Effekt in Kauf genommen werden und der Arbeitspunkt in 2 ml DMSO ist als ideal anzusehen.

Ein Zusammenwirken von DMSO und YE-Medium hat einen positiven Effekt auf das Extraktionsergebnis (+0,39 $e_2 e_3$). Für eine optimale Extraktion sollte das DMSO immer bei der Extraktion aus Komplexmedium zugesetzt werden.

Die Adäquatheit des linearen Modells konnte mit $F < F_{\text{krit}} = 3,39 < 244$ nachgewiesen werden ($S_D = 118$; $\varphi_D = 12$; $S_e = 2,89$; $\varphi_e = 1$; $P = 0,95$). Die Koeffizienten wurden unabhängig voneinander geschätzt, da die Präzisionsmatrix C eine Diagonalmatrix war.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der Extraktion aus Komplexmedium unbedingt DMSO zugesetzt werden muss und trotzdem keine vollständige Extraktion des Hemins erreicht wird. Die Probenmenge (4 ml YE-Medium) sollte nicht reduziert werden, da sonst am unteren Detektionsbereich der Heminanalytik gearbeitet würde.

4.3.2 Ertragskoeffizienten $Y_{X/H}$ und $Y_{N/H}$

Die etablierte und optimierte Heminanalytik ermöglichte die Bestimmung der Ertragskoeffizienten $Y_{X/H}$ bzw. $Y_{N/H}$ für das Substrat Hemin und YE-Medium. Die Berechnung erfolgte nach Glg. 4-17 und Glg. 4-18, worin ΔN die gebildete Zelldichte, ΔX die gebildete Biomasse und ΔH das verbrauchte Hemin war, unter der Annahme eines konstanten Volumens und eines definierten Zeitintervalls, indem μ bzw. ν als konstant angesehen werden konnten.

$$\text{Glg. 4-17: } Y_{X/H} = \frac{\Delta X}{\Delta H} \quad [\text{g TBM/g Hemin}]$$

$$\text{Glg. 4-18: } Y_{N/H} = \frac{\Delta N}{\Delta H} \quad [\text{Zellen/g Hemin}]$$

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Für das YE-Medium wurde ein $Y_{X/H}$ von 834 g TBM /g Hemin für exponentielles Wachstum ($\mu=0,121 \text{ h}^{-1}$) experimentell ermittelt [79, 86], siehe Abb. 4-15, und umgerechnet zu einem $Y_{N/H}$ von $1,1 \times 10^{14}$ Zellen/ g Hemin.

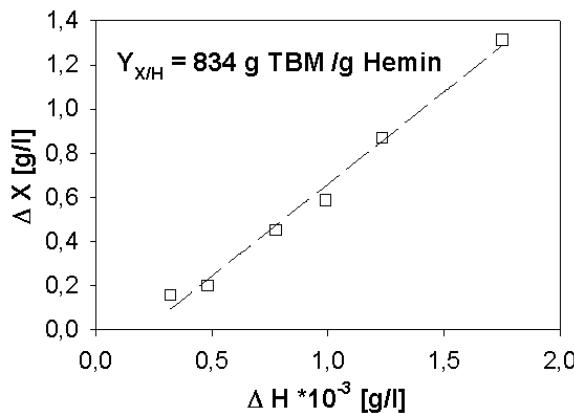


Abb. 4-15: Ertragskoeffizient $Y_{X/H}$ für YE-Medium während exponentiellen Wachstums. Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21).

Der Ertragskoeffizient verdeutlicht, dass geringe Heminkonzentrationen für ein Wachstum von *L. tarentolae* notwendig sind. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass Hemin stark an Glasoberflächen adsorbiert, wie in 4.3.1, S. 53 festgestellt. Die Kultivierung erfolgte im Glashüttelkolben und es zeigte sich auch bei einem unbeimpften Kolben eine starke Abnahme des detektierbaren Hemins. Wenn der Heminverbrauch gegen die Glasabsorption korrigiert wurde, konnte ein wahrer Ertragskoeffizient zum Verbrauch der Zellen nicht eindeutig bestimmt werden. Vielmehr müssen weitere Einflussgrößen vorliegen. Beispielsweise wurde bisher eine eventuelle Adsorption des Hemins an die Zellen nicht berücksichtigt, obwohl die Zelloberfläche im Vergleich zur Glaswand deutlich größer war. Auch zeigte sich, dass die Schüttelgeschwindigkeit des Kolbens die Heminabnahme beeinflusste. Unklar ist weiterhin, ob eine Desorption des Hemin stattfindet und welche Bedingungen dafür notwendig sind.

Der ermittelte Ertragskoeffizient ist trotzdem für die Berechnung von Prozessen anwendbar, da dieser Wert alle „heminverbrauchenden“ Vorgänge bei der Kultivierung erfasst. Das bedeutet, auch wenn nur ein Teil des zugegebenen Hemin tatsächlich von den Zellen verbraucht wird, ist die komplette Zugabe erforderlich, da sonst den Zellen zu wenig Hemin zur Verfügung stehen würde. Die erfolgreiche Anwendung von $Y_{X/H}$ ist bei der Modellierung des heminlimitierten Chemostaten in Abschnitt 4.7, Seite 76, gezeigt.

4.3.3 Heminspeicher

Bei Kultivierungen von *L. tarentolae* im YE-Medium war aufgefallen, dass die Zellen ca. 3 Generationen ohne Hemin wachsen konnten ($\mu = 0,090 \text{ h}^{-1} \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$; 4 Messreihen), bevor μ und ν drastisch einbrachen, siehe Abb. 4-16. Die Zellen speicherten wahrscheinlich bei

Ergebnisse – Teil A: Ermittlung statischer Prozessparameter

Überschuss einen Teil des Hemins und nutzten diesen Speicher bei Heminmangel. Eine Adsorption des Hemins an die Zelloberfläche wäre auch möglich, wie es für das definierte Medium vermutet wird. Diese Adsorption würde wie ein intrazellulärer Speicher wirken.

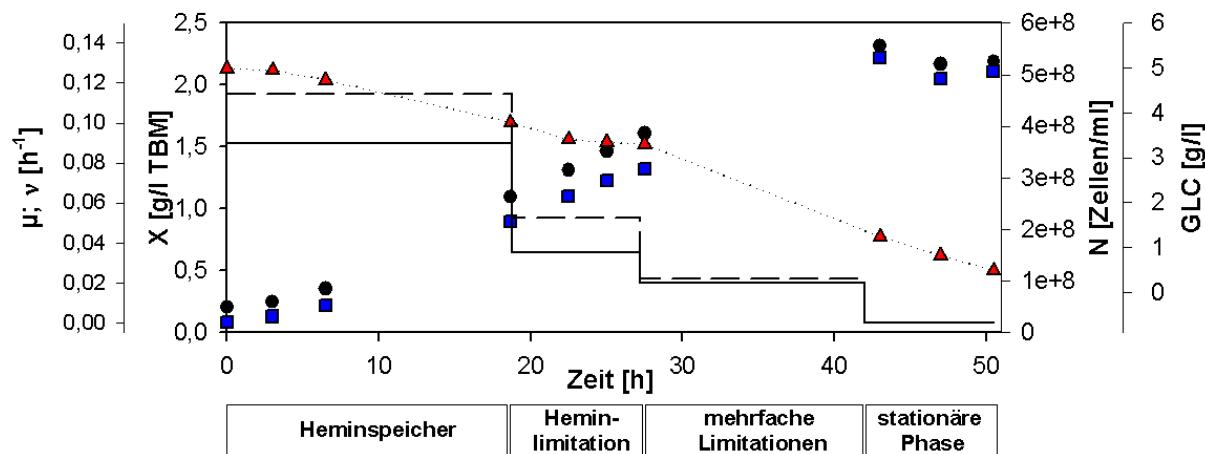


Abb. 4-16: Wachstumskinetik von *L. tarentolae* in YE-Medium ohne Hemin mit Darstellung von μ (—), ν (---), X (●), N (□) und GLC (△) und Markierung der einzelnen Wachstumsphasen, Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21), 26°C.

Bei der Kultivierung war weiterhin auffällig, dass Glukose in allen Wachstumsphasen verstoffwechselt wurde. $Y_{X/GLC}$ war zu Beginn $\approx 0,8$ g TBM/ g GLC (bzw. $Y_{N/GLC}$ mit $1,6 \times 10^8$ Zellen/ g GLC, Wachstum mit Heminspeicher) und reduzierte sich auf 0,3 g TBM/ g GLC. Die Zellen benötigten mehr Energie, um der Heminlimitation entgegen zu wirken. Nach $8,4 \pm 1,3$ h traten wahrscheinlich mehrfache Limitationen auf und μ bzw. ν fielen weiter ab. In dieser Phase konnte keine Verdopplung der Zelldichte erreicht werden (0,8 Generationen). Diese beiden Limitationsphasen traten auch auf, wenn die Zellen bei aufgebrauchten Heminspeicher in neues Medium passagiert wurden. Zellen mit leerem Heminspeicher hatten ca. einen Tag gebraucht, um nach einer Heminzugabe wieder die maximale Wachstumsrate zu erreichen.

Die Betrachtung der Zellverteilung über die Kultivierungszeit zeigte, dass die Zellen von Beginn an sehr schlank waren, wie es für das Wachstum auf Aminosäuren bereits beobachtet wurde (Abb. 4-11, S. 50). Somit ist sowohl X als auch N aussagekräftig.

Bei Wachstum unter Nutzung des Heminspeichers konnten die Zellen ein ΔX von $0,84$ g/l $\pm 0,08$ g/l TBM bilden (Mittelwert aus 4 Messungen). Unter Verwendung des Ertragskoeffizienten $Y_{X/H}$, siehe 4.3.2, kann eine gespeicherte Heminmenge von 1 mg/l Hemin berechnet werden. Dies war bei der Beimpfung in den Zellen gespeichert bzw. an ihnen absorbiert. Somit ergibt sich, dass 4,76 mg Hemin pro g TBM gespeichert waren, bzw. 5,4 mg in 10^8 Zellen.

4.3.4 Alternative Eisenquellen

Im YE-Medium als auch in den SFP-Nährmedien ist Hemin die einzige verbleibende Substanz tierischen Ursprungs. Es wurde versucht, Hemin durch alternative anorganische oder organische Eisenquelle zu ersetzen, siehe Tab. 4-8. Die gelösten, anorganischen Salze konnten Hemin nicht ersetzen, da keine höheren Wachstumsraten als im Schüttelkolben ohne Hemin nachgewiesen wurden [79]. Die vielversprechendsten Ersatzsubstanzen von Chang & Chang [104] und von Gaughan & Krassner [92] konnten auch keinen wachstumsfördernden Effekt bewirken. Die Untersuchungen zeigen, dass gegenwärtig nicht auf Hemin in der Kultivierung verzichtet werden kann.

Tab. 4-8 : Untersuchte eisenhaltige Substanzen, die als Alternative zu Hemin dienen sollten.

Alternative Eisenquelle	Substanz	Untersuchter Konzentrationsbereich	Literaturquelle
anorganisch	Ammonium-Eisen (II)-Sulfat	2 – 21 mg/l	
	Eisen (III)-Citrat	2 – 20 mg/l	
	Eisen (III)-Chlorid	2 – 20 mg/l	
organisch	Protoporphyrin IX	1 µg/ml	[104]
	Katalase	250; 2500 U/ml	[92]
	Peroxidase	100 – 700 mg/l	[92]

TEIL B: ERMITTLUNG DYNAMISCHER PROZESSPARAMETER

Die spezifischen Raten μ und ν sind keine Konstanten, sondern hängen von einer Vielzahl von Zustandsparametern ab. Wolf [108] erfasst diese Abhängigkeit mit folgender Gleichung:

Glg. 4-19: nach Wolf [108], modifiziert

$$\mu = f_1(T) * f_2(pH) \prod_{j=0}^m \Phi_j(c_{s_j}) \prod_{k=0}^n \Psi_k(c_{p_k})$$

c = Konzentration

j = Substrat, Stickstoff, Sauerstoff

k = Produkt 1, Produkt 2

Zur Charakterisierung des Wirtsorganismus *L. tarentolae* wurden die wichtigsten Zustandsparameter untersucht, siehe Abb. 4-17.

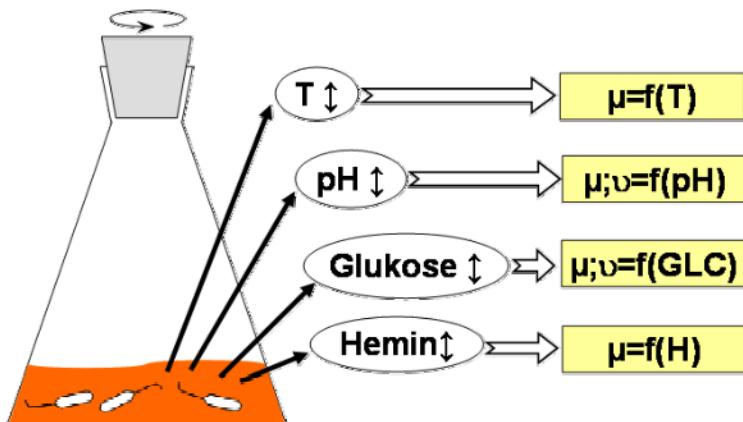


Abb. 4-17: Vorgehensweise zur Ermittlung der dynamischen Wachstumsparameter (Schema).

4.4 $\mu = f(\text{Temperatur})$

Die Temperatur ist ein Hauptfaktor bei der Kultivierung von Mikroorganismen und entscheidend für eine gezielte Prozessführung.

4.4.1 $\mu(T)$ für Komplexmedium

Die Untersuchungen zur optimalen Wachstumstemperatur erfolgten mit YE-Medium im Temperaturbereich von 12 bis 40°C [80]. Die spezifische Wachstumsrate zeigte eine Temperaturabhängigkeit, wie es einen mesophilen Organismus entspricht, siehe Abb. 4-18. Im Allgemeinen wird die *Leishmania* Spezies bei 22 – 28°C, aber hauptsächlich bei 26°C kultiviert (zum Vergleich Tab. 1-3). Überraschenderweise wurde gefunden, dass das Temperaturmaximum von *L. tarentolae* nicht bei 26°C sondern 30°C liegt und μ ca. 30 % höher ist. Die Verdopplungszeit reduziert sich von 6,9 h auf 5,4 h, was einen deutlichen Zeitgewinn bedeutet.

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

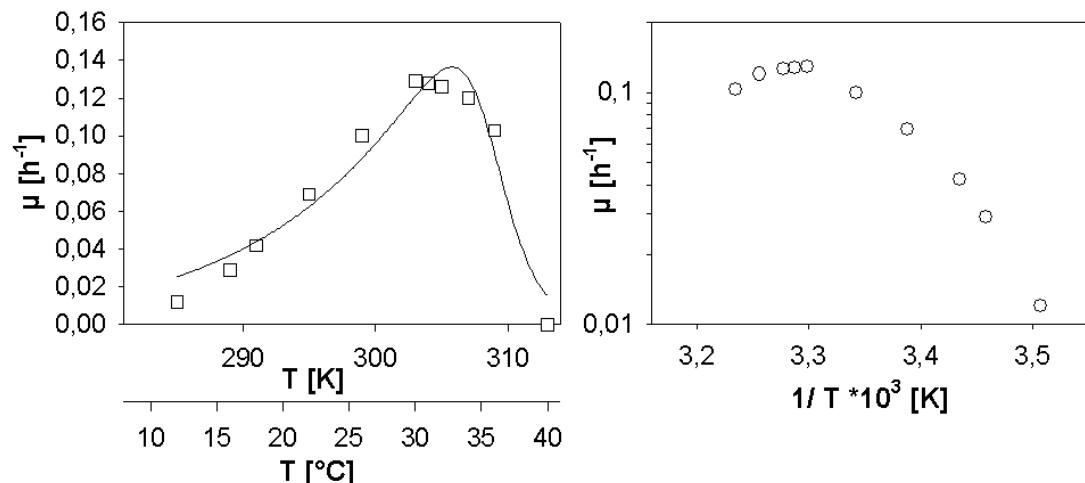


Abb. 4-18: $\mu = f(T)$ für YE-Medium. Auftragung von T im linearen Maßstab (linkes Bild) und reziprok (rechtes Bild) mit Modellanpassung, Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21).

Zur Beschreibung des Einflusses von T auf μ wird ein Modellansatz gewählt (Glg. 4-20), der auf der Arrhenius-Gleichung basiert [105]. Als Minimaltemperatur kann 12°C angenommen werden, da bei dieser Temperatur das Wachstum nahezu zum Erliegen kommt. Die Reaktionsgeschwindigkeit metabolischer Prozesse steigt mit zunehmender Temperatur, was im Modell durch die Aktivierungsenergie (E_A) und den Arrheniusfaktor „A“ erfasst wird. Im Temperaturoptimum von 30°C liegen maximale Geschwindigkeiten vor. Danach beginnt die Denaturierung wichtiger Enzyme, berücksichtigt im Modell durch die Denaturierungsenergie (E_B) und den Arrheniusfaktor „B“, und das Wachstum kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Maximaltemperatur für *L. tarentolae* kann bei $\approx 40^\circ\text{C}$ festgelegt werden ($\mu = 0$). Das Modell ist repräsentativ für die Messwerte (Korrelationskoeffizient $R = 0,98$, berechnet nach Glg. 3-10, S. 34) und adäquat (nachgewiesen durch $F < F_{\text{krit}} = 2,24 < 4,32$, siehe Glg. 3-9, S. 34, Modellstreuung = $1,7 \times 10^{-4}$, Versuchsstreuung = $7,8 \times 10^{-5}$, $P = 0,99$).

Glg. 4-20:

$$\mu(T) = \frac{A * e^{-\frac{E_A}{R*T}}}{1 + B * e^{-\frac{E_B}{R*T}}} \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} A &= 9 \times 10^9 \text{ h}^{-1} & B &= 2,6 \times 10^{90} \text{ h}^{-1} \\ E_A &= 63 \text{ kJ/mol} & E_B &= 534 \text{ kJ/mol} \\ R &= 8,3145 \times 10^{-3} \text{ kJ/mol/K} \end{aligned}$$

Definitionsbereich: $12 - 40^\circ\text{C}$

Die Modellparameter für *L. tarentolae* können mit Richtwerten für bakterielle Kultivierungen verglichen werden ($A = 10^{10} \text{ h}^{-1}$, $E_A = 58 \text{ kJ/mol}$, $E_B = 550 \text{ kJ/mol}$, $B = 3 \times 10^{90} \text{ h}^{-1}$, nach [105]). Erstaunlicherweise weichen die Parameter nur geringfügig voneinander ab.

Im gesamten Bereich von 26°C bis 36°C war $\mu \geq 0,1 \text{ h}^{-1}$, jedoch zeigten sich Unterschiede bei den Wachstumsparametern, siehe Tab. 4-9. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von $26 \rightarrow 30^\circ\text{C}$ verkürzte die Zeitspanne der exponentiellen Wachstumsphase (t_{exp}). Die erzielte Biomasse (X_{exp}) am Ende der exponentiellen Phase war geringer als bei 26°C . Die

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Signifikanz müsste genauer untersucht werden. Eine deutliche Abnahme der TBM war bei 34°C und 36°C festzustellen, obwohl $\mu \geq \mu$ (26°C) war. Durch die Temperaturerhöhung war tendenziell eine Verringerung von $Y_{X/GLC}$ zu registrieren. Die Zellen hatten einen höheren Energiebedarf zur Aufrechterhaltung von μ , was sich in einer geringeren Ausbeute an TBM und einer verkürzten t_{exp} äußerte. Eine Kultivierung bei $T > 30^\circ\text{C}$ ist nicht empfehlenswert.

Tab. 4-9: Wachstumsparameter von *L. tarentolae* bei Kultivierungstemperaturen von 26 - 36°C in YE-Medium, Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21).

Temperatur [°C]	μ [h ⁻¹]	t_{exp} [h]	X_{exp} [g/l]	$Y_{X/GLC}$	R zum $Y_{X/GLC}$ -Modell
26	0,100	22	2,52	0,86	1,00
30	0,129	18	2,19	0,81	0,99
34	0,120	12,5	0,95	0,82	0,99
36	0,103	8,5	0,50	0,77	0,96

Die Temperatur spielt eine entscheidende Rolle bei der Transformation der Zellstadien, denn ein Hitzeschock kann die Umwandlung von Promastigoten zu Amastigoten auslösen [106]. Wie die Fotos in Abb. 4-19 belegen, konnten bei keiner der untersuchten Kultivierungs-temperaturen diese Transformationen nachgewiesen werden.

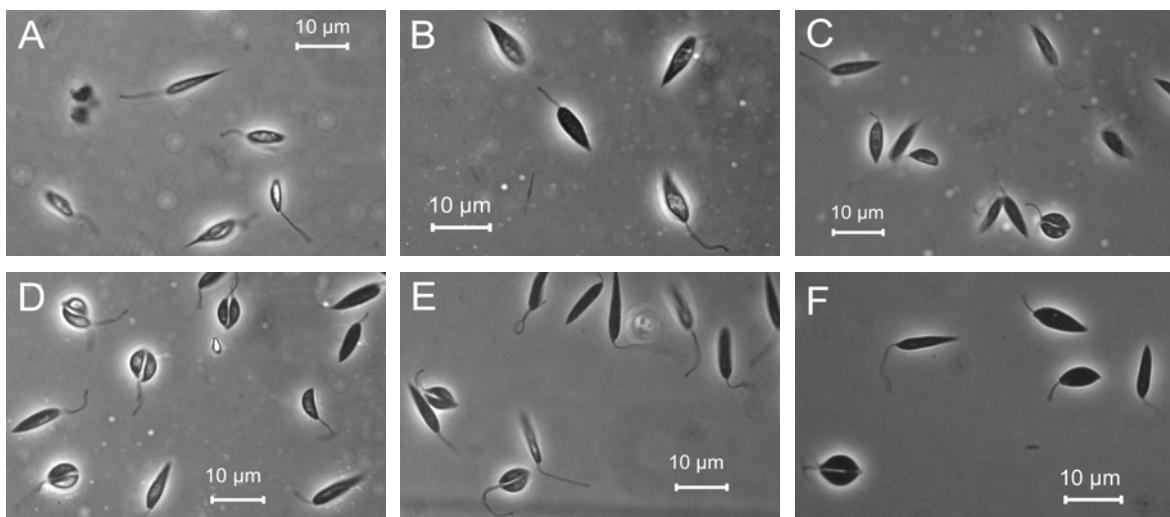


Abb. 4-19: Mikroskopische Aufnahmen von *L. tarentolae* bei verschiedenen Kultivierungs-temperaturen: A) 12 °C; B) 26 °C; C) 30 °C; D) 32 °C; E) 34 °C und F) 36 °C.

4.4.2 Bioreaktorkultivierungen bei 26 und 30°C

Die optimale Kultivierungstemperatur aus den Schüttelkolbenversuchen wurde im Bioreaktor bestätigt [79], siehe Abb. 4-20. Im Vergleich zu einer Referenzkultivierung bei 26°C war die Fermentationszeit bei annähernd gleicher X_{max} und N_{max} deutlich verkürzt. Die GLC-Verbrauchskinetik war vergleichbar. Bei 30°C betrug der $Y_{X/GLC}$ nur 0,63 g TBM/ g GLC ($R = 0,99$), was deutlich geringer war als der Messwert des Schüttelkolbenversuches (siehe

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Tab. 4-9, S. 63). Eine Untermauerung dieses Wertes durch weitere Kultivierungen ist notwendig, um Messfehler auszuschließen.

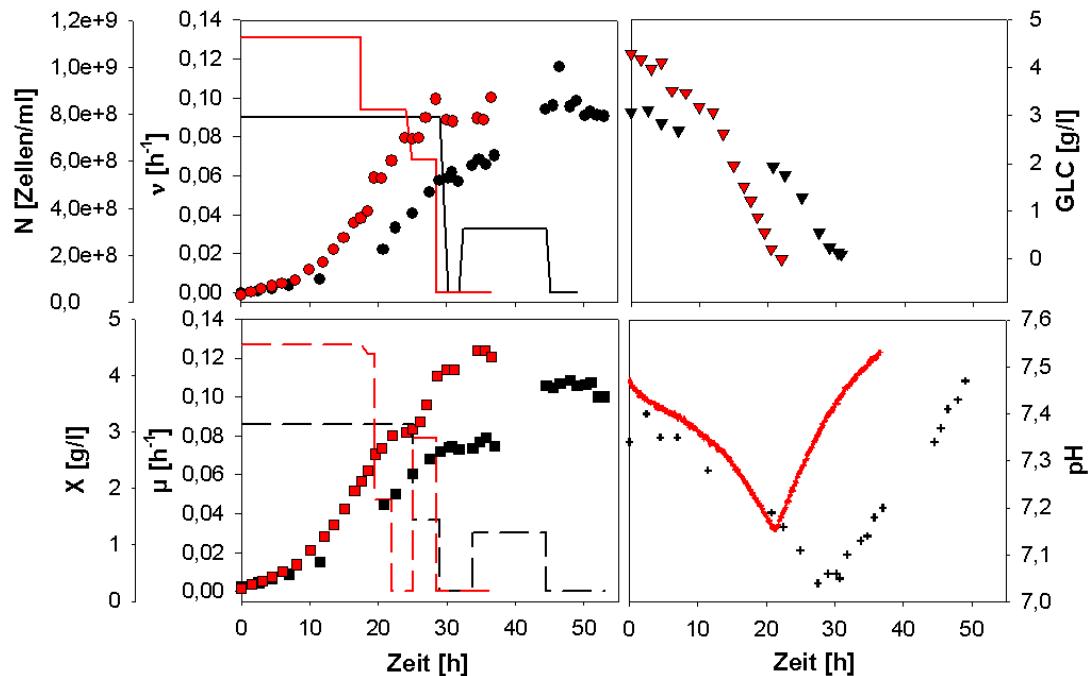


Abb. 4-20: Vergleich der Bioreaktorkultivierungen bei 26°C (schwarz) und 30°C (rot) in Bezug auf v (–), N (O), μ (---), X (□), GLC(▽) und pH (+, —), YE-Medium.

Die pH-Kinetik bestätigte bisherige Beobachtungen einer pH-Abnahme während des Glukosekatabolismus und eines pH-Anstiegs bei Wachstum auf Aminosäuren. Beide Phasen sind in Abb. 4-20 zu erkennen, bei 30°C trat die 2. Phase deutlich früher auf.

4.4.3 Temperatureinfluss in den definierten Medien SFP(II) und SFP(III)

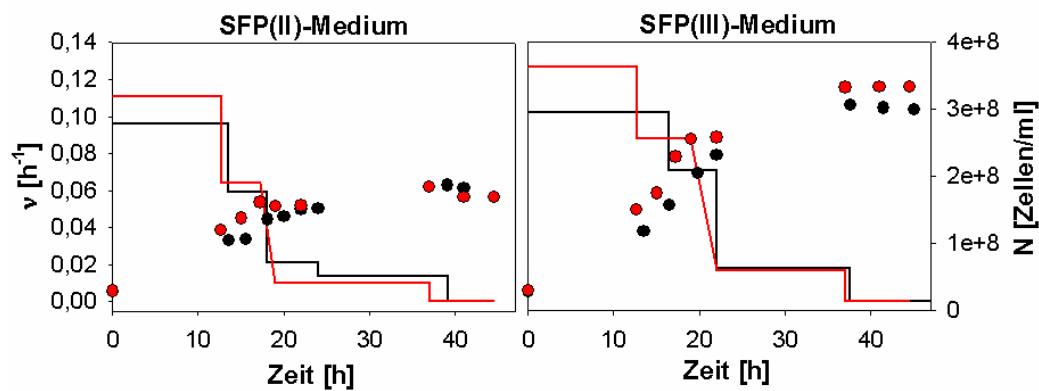


Abb. 4-21: Einfluss der Kultivierungstemperatur von 26°C (schwarz) und 30°C (rot) auf das Wachstum von *L. tarentolae* in den Medien SFP(II) und SFP(III) mit v (–) und N (O). Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21). Die Ordinatenachsen gelten für beide Diagramme.

Die Abhängigkeit $\mu = f(T)$ wurde im Abschnitt 4.4.1 für Komplexmedium bestimmt. In der Literatur wird beschrieben, dass sich die Temperaturmaxima und -minima geringfügig ändern

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

können, wenn Mikroorganismen in synthetischen Medien kultiviert werden [107]. Die Abb. 4-21 verdeutlicht, dass im SFP(II)-Medium bei 30°C ein höheres v vorlag als bei 26°C. Durch den Zusatz an Hefe-RNA im SFP(III)-Medium (Details siehe 4.12.2) konnte die maximale Rate des YE-Mediums ($\mu_{max} = 0,129 \text{ h}^{-1}$) erreicht werden. Da diese maximale Rate nur ca. 12 h anhielt, ist für einen Produktionsprozess gegebenenfalls zu prüfen, ob eine Temperaturerhöhung sinnvoll ist.

Die Erzielung gleicher Raten bei 26 und 30°C im definierten als auch im Komplexmedium beweist, dass im SFP(III)-Medium alle essentiellen Nährstoffe für das Wachstum vorhanden sind. Weiterhin kann die Kinetik $\mu = f(T)$ des Komplexmediums auch auf das definierte Medium übertragen werden.

4.5 $\mu, v = f(\text{pH})$

Der pH-Wert ist ein weiterer wichtiger physiologischer Parameter bei der Kultivierung von Mikroorganismen. Die Kultivierung im physiologisch pH-Bereich ist entscheidend für hohe Wachstums- und Zellteilungsraten und für eine optimale Prozessführung.

Der Einfluss des pH-Wertes auf μ und v wurde im Bereich von pH 4,5 – pH 8,4 mit verschiedenen Puffersystemen im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Ein wachstumsinhibierender Einfluss der verwendeten Puffersubstanzen kann ausgeschlossen werden, da im neutralen pH-Bereich vergleichbar hohe Raten erzielt wurden. Diese entsprechen bisherigen Beobachtungen. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen ist gewährleistet. In Abb. 4-22 wird deutlich, dass im pH-Bereich von 6 - 7,7 Raten $\geq 0,1 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurden und der pH somit einen vernachlässigbaren Einfluss auf μ und v hatte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bisherige Schüttelkolbenversuche repräsentativ waren, trotz pH-Änderungen.

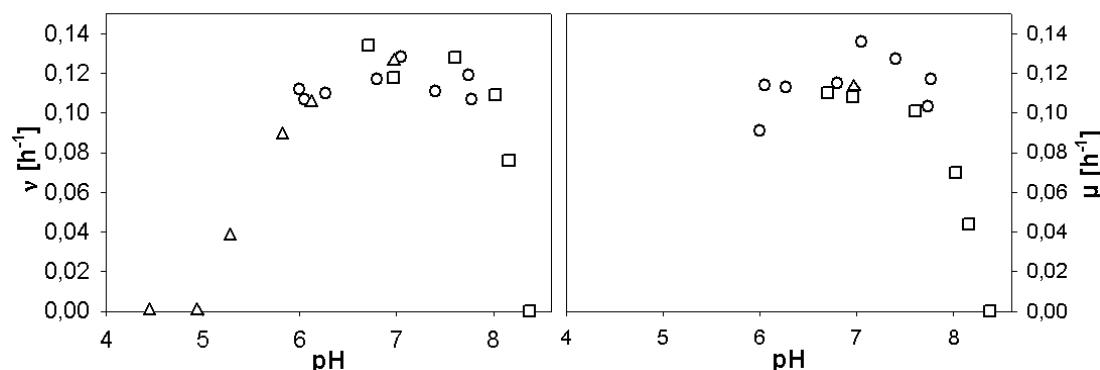


Abb. 4-22: Abhängigkeit μ und v vom pH-Wert. Puffersysteme: (O) $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, (\triangle) Zitronensäure/ Na_2HPO_4 und (\square) TRIS/HCl. Bestimmung der Raten im Zeitraum 0 - 7 h nach Inkulation wo gilt: pH \approx konstant. Schüttelkolbenmaßstab A (siehe 3.2, S. 21). Beimpfung aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur (YE-Medium, pH \approx 7).

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Bei einem $\text{pH} > 8$ und < 6 war eine Wachstumsinhibition des pH-Wertes zu erkennen. Ein Erliegen des Wachstums trat bei $\text{pH} \leq 5$ und $\text{pH} \geq 8,4$ auf. Genauer Aufschluss boten die Verteilung der Zellgröße und die Zellmorphologie (Abb. 4-23). Eine normale promastigote Form war bei $\text{pH} 6 - 7,6$ zu erkennen. Im Bereich von $\text{pH} 5$ fand eine unvollständige Umwandlung in die amastigote Form statt, da die Zellen rund und insgesamt kleiner waren, aber noch die Geißel der Promastigoten besaßen. Die Verteilung der Zellgröße war deutlich breiter als bei den Promastigoten, da diese in ihrer Breite und nicht in ihrer Länge erfasst wurden. Es kann keine Aussage getroffen werden, ob eine endgültige Umwandlung in die amastigote Form unter diesen Bedingungen möglich ist, da die Kultivierung nach 7 h beendet wurde.

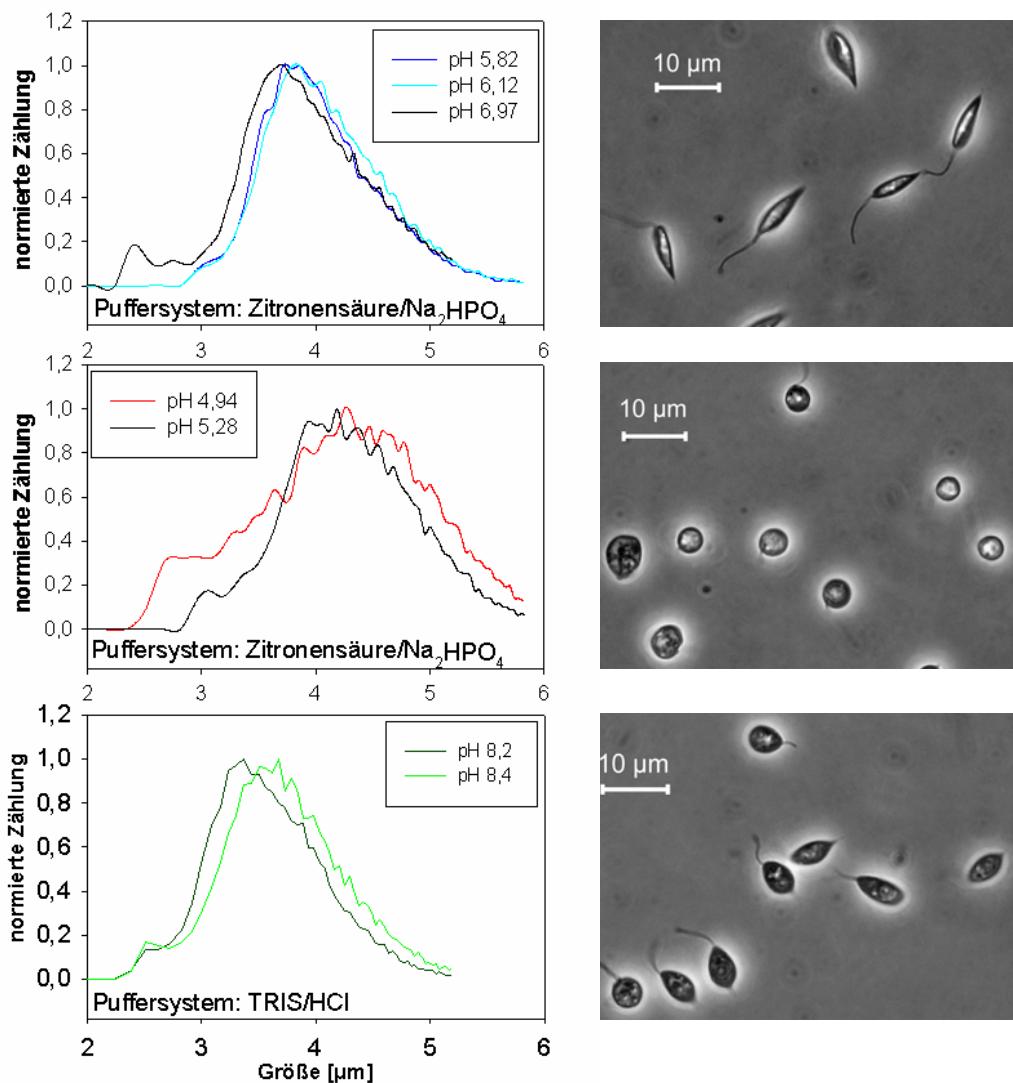


Abb. 4-23: Verteilung der Zellgröße (links) im Vergleich zu den mikroskopischen Bildern der Zellen (rechts) bei verschiedenen pH-Werten.

Die Umwandlung in die amastigote Form fand bei $\text{pH} 4,5$ nicht so deutlich statt wie bei $\text{pH} \approx 5$. Die Größenverteilung entsprach wieder annähernd der von Promastigoten und die

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Mischpopulation von sehr kleinen Promastigoten und Amastigoten mit Geißel. Die Ursache könnte sein, dass der Schock über den großen pH-Shift ($\Delta\text{pH} = 2,5$) die Auslösung der Transformation verhinderte oder bei diesem pH die Umwandlung deutlich langsamer stattfand.

Die Zellen zeigten bei pH 7,7 im $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffersystem noch eine deutliche promastigote Form, dagegen begannen sie im Puffersystem TRIS/HCl bei pH 7,6 langsam zu degenerieren. Bei Erhöhung des pH in den alkalischen Bereich verloren die Zellen ihre typische tropfenförmige Gestalt, der Zellkörper schwoll an, die Geißel und die Zellspitze waren noch erhalten und teilweise bildeten sich abgerundete Zellformen aus.

$$\text{Gl. 4-21: } v(\text{pH}) = v' * \frac{1}{1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}} \quad \text{mit} \quad v' = 0,147 \text{ h}^{-1} \quad H^+ = 10^{-\text{pH}} \\ K_1 = 2 \times 10^{-6} \quad K_2 = 7,4 \times 10^{-9} \\ \text{Definitionsbereich: pH 4,0 – 9,0} \\ R = 0,93$$

Modell adäquat, da $F < F_{\text{krit}} = 11,09 < 26,83$
(Modellstreuung = $3,4 \times 10^{-4}$, Versuchsstreuung = $3,1 \times 10^{-5}$, P = 0,99)

$$\text{Gl. 4-22: } v(\text{pH}) = a_0 + a_1 * \text{pH} + a_2 * (\text{pH})^2 \quad \text{mit} \quad a_0 = -1,72 \quad a_1 = 0,539 \\ a_2 = -0,039 \\ \text{Definitionsbereich: pH 5,0 – 8,4} \\ R = 0,88$$

Modell adäquat, da $F < F_{\text{krit}} = 10,37 < 26,92$
(Modellstreuung = $3,2 \times 10^{-4}$, Versuchsstreuung = $3,1 \times 10^{-5}$, P = 0,99)

Zur mathematischen Beschreibung des Zusammenhangs zwischen pH-Wert und v werden zwei verschiedene Modellansätze überprüft, zum einen ein quadratischer Ansatz (Gl. 4-21) [108] und zum anderen ein reziproker Verhältnis (Gl. 4-22) [105]. Es ist zu beachten, dass sich die veränderte Zellmorphologie in den verschiedenen pH-Bereichen negativ auf die μ -Bestimmung auswirkte. Deshalb erfolgt die Modellierung nur für die spezifische Zellteilungsrate v . Die Modelle (Abb. 4-24) können bis auf die Randbereiche eine gute Abbildung des Zusammenhangs $v = f(\text{pH})$ liefern.

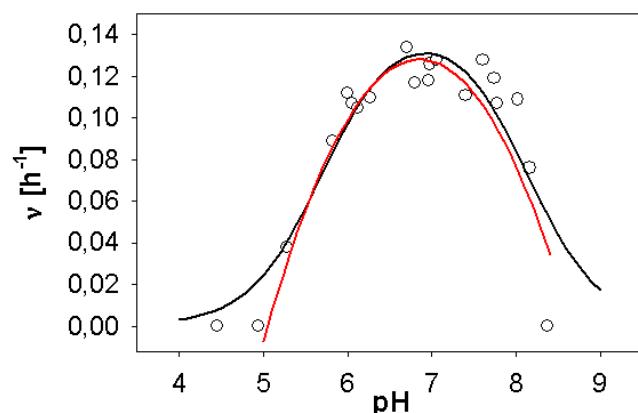


Abb. 4-24: Modellierung der Funktion $v = f(\text{pH})$ mit einem quadratischen (—) und einem reziproken Ansatz (—).

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Die Parameter des reziproken Ansatzes (Glg. 4-21) können mit Werten für *Aspergillus oryzae* verglichen werden ($K_1=4\times 10^{-3}$; $K_2=2\times 10^{-8}$), einem zur Enzymproduktion eingesetzten Schimmelpilz [105]. Besonders im K_1 -Wert zeigen sich deutliche Abweichungen zu *L. tarentolae*, denn dieser ist um den Faktor 1000 kleiner.

Die vorherigen Experimente untersuchten das Verhalten von *L. tarentolae* bei einem plötzlichen pH-Sprung, denn die Beimpfung erfolgte aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur mit YE-Medium ($\text{pH} \approx 7$). Der anschließende pH-Wert war nahezu konstant. Interessant war weiterhin, wie die Zellen auf die dynamische Änderung des pH-Wertes reagieren. Aussagen dazu lieferten die Schüttelkolbenexperimente mit den verschiedenen komplexen Nährmedien (siehe 4.1.1, S. 36). Betrachtet wurde das Verhalten bei Metabolisierung von Glukose, siehe Tab. 4-10. Deutlich wurde, dass der pH-Wert im TSB-Medium zu Beginn der Kultivierung am geringsten war und im Weiteren am stärksten abnahm. Das Medium besaß keine pH-Pufferwirkung. Sowohl in der Stand- als auch in der Schüttelkultur war v in diesem Nährmedium am geringsten. Bei einer Stabilisierung des pH im neutralen Bereich ($\text{pH } 6,9 – 7,6$) wurden die besten Wachstumsparameter erzielt.

Tab. 4-10: Veränderung des pH-Wertes bei der Kultivierung von *L. tarentolae* in verschiedenen komplexen Nährmedien und Metabolisierung von Glukose.

Kultivierungstyp	Medium	$\frac{v}{[\text{h}^{-1}]}$	pH-Änderung
Standkultur	BHI	0,063	$7,6 \rightarrow 7,0$
	TSB	0,054	$7,1 \rightarrow 6,0$
	TB	0,056	$7,3 \rightarrow 7,2$
	YE	0,060	$7,4 \rightarrow 7,3$
Schüttelkultur	BHI	0,103	$7,6 \rightarrow 6,9$
	TSB	0,090	$7,1 \rightarrow 6,1$
	TB	0,097	$7,3 \rightarrow 7,0$
	YE	0,103	$7,4 \rightarrow 7,0$

Wenn jedoch Glukose $> 10 \text{ g/l}$ im Kolben vorgelegt wurde, dann säuereten die Zellen das Nährmedium so stark an, dass eine Wachstumsinhibition auch im BHI- und YE-Medium zu registrieren war. Einem dynamischen Absinken des pH unterhalb von $\text{pH} \approx 6,9$ sollte durch rechtzeitige Passagierung in neues Nährmedium oder durch eine pH-Regelung entgegengewirkt werden.

Wird die Alkalisierung des Mediums durch den Aminosäuremetabolismus betrachtet, so fällt die beginnende Degeneration der Zellen bei einem $\text{pH} > 7,6$ auf. Ursachen könnten neben dem pH auch in der Alterung der Kultur oder in der Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten gesehen werden.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine Kultivierung im neutralen pH-Bereich (pH 6,9 - 7,6) optimal ist und bei der Prozessführung eingehalten werden sollte.

4.6 $\mu = f(\text{Glukose})$

4.6.1 Limitationsbereich durch Kultivierung im Chemostaten

Die Glukoseverbrauchskinetik in Abb. 4-10, S. 49, lässt vermuten, dass eine Wachstumslimitation durch Substratverbrauch vorliegt. Wie bereits festgestellt wurde, wird Glukose als primäre C-Quelle genutzt. Wird die Wachstumskinetik im Bereich des Glukosemetabolismus und der anschließenden stationären Phase betrachtet, so kann eine Gültigkeit des Monod-Modells angenommen werden. Weiterhin ist die Einschränkung zulässig, dass nur Glukose das limitierende Substrat ist, da im Komplexmedium alle weiteren Substanzen im Überschuss vorliegen, solange nicht mehr als $X = 2 - 2,5 \text{ g/l TBM}$ gebildet wird (siehe 4.1.3, S. 41). Da erst nach Verbrauch der Glukose die Zellen auf eine alternative Energiequelle umschalten, kann Glukose als einzige relevante C-Quelle angenommen werden.

Das Monod-Modell beschreibt die Abhängigkeit des μ von einem limitierenden Substrat durch eine hyperbolische Funktion (Glg. 4-23). Der Einfluss auf μ wird durch die Wechselwirkung des limitierenden Substrates mit einem für den Stoffwechsel schrittmachenden Enzym erklärt. In die Gleichung geht μ_{\max} und die Halbsättigungskonzentration (K_S) ein.

$$\text{Glg. 4-23: } \mu(\text{GLC}) = \mu_{\max} * \frac{\text{GLC}}{K_S + \text{GLC}}$$

Der K_S -Wert muss relativ klein ($< 0,1 \text{ g/l}$) sein, da bis zum Detektionslimit des Glukometers keine Verringerung von μ messbar war (Wachstumskinetik in Abb. 4-10, S. 49). Zur Ermittlung der Beziehung $\mu = f(\text{GLC})$ muss der Übergangsbereich zur stationären Phase genauer untersucht werden, wozu sich die Kultivierung im Chemostaten durch die Einstellung verschiedener Fließgleichgewichte (Steady State) anbietet.

In einer kontinuierlichen Kultivierung gelten die Differentialgleichungen (Glg. 4-24 bis Glg. 4-26) für die Biomassebildung und den Glukoseverbrauch. Darin finden die Parameter Verdünnungsrate (D), Zuflussstrom des Nährmediums aus der Vorlage (F_{zu}), das Reaktorvolumen (V_R) und die Glukosekonzentration in der Vorlage (GLC_{zu}) Eingang. Im Steady State gilt $\mu = D$, da $d/dt(X) = 0$ und $d/dt(\text{GLC}) = 0$.

$$\text{Glg. 4-24: } \frac{d}{dt}(X) = -D * X + \mu(\text{GLC}) * X$$

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Glg. 4-25:

$$\frac{d}{dt}(GLC) = D * (GLC_{zu} - GLC) - \frac{\mu(GLC) * X}{Y_{X/GLC}}$$

Glg. 4-26:

$$D = \frac{F_{zu}}{V_R}$$

Vorüberlegungen zu D ergaben, dass eine Messung der GLC im Steady State mit den vorhandenen Messgeräten nicht möglich sein wird, da bei $\mu_{max} = 0,103 \text{ h}^{-1} \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ das D_{krit} (kritische Verdünnungsrate, die zum Auswaschen des Reaktors führt) im Bereich von 0,09 – 0,103 h⁻¹ liegen wird (GLC_{zu} = 1,5 g/l; Annahme von K_S = 0,1 g/l). Andere Messmethoden für GLC konnten nicht angewandt werden. Für einen stabilen Prozess muss gelten: D < D_{krit}.

Als Resultat dieser Vorüberlegungen wurden zwei Chemostaten mit limitierender Glukose geführt. Alle weiteren Elemente wurden im Überschuss belassen [109], d. h. Zufuhr des YE-Mediums mit Zusätzen und Begasung mit Luft (0,7 - 1 VVM), siehe 3.2, S. 24. Prozessbestimmend sind die Startbedingungen und die verwendeten Verdünnungsraten.

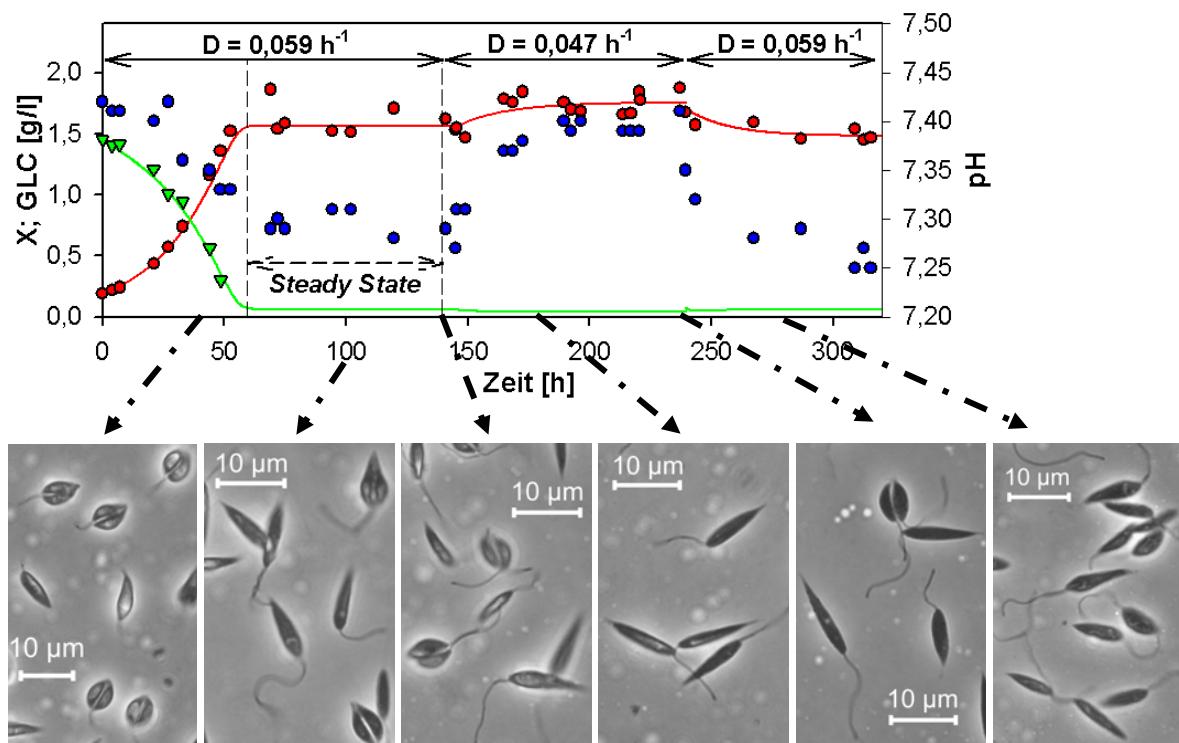


Abb. 4-25: Chemostatenkultivierung (I) mit limitierender GLC bei T=26°C, Messwerte für X (●), GLC (▼), pH (●), Modellwerte für X (—) und GLC (—), Kennzeichnung des 1. Steady State. Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte (Pfeile) sind unterhalb gezeigt.

Die Abb. 4-25 zeigt einen typischen Einschwingvorgang des Chemostaten bis zum Steady State. Durch Parameteranpassungen im Programm Berkeley Madonna wurde ein K_S-Wert von 0,046 g/l für Glukose ermittelt unter Annahme eines μ_{max} von 0,103 h⁻¹ und der Variation von Y_{X/GLC} im Bereich von 0,98 - 1,18 g TBM/ g Glukose, siehe Tab. 4-11. Das Y_{X/GLC} lag

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

damit teilweise außerhalb des Bereiches, der im Abschnitt 4.2.1 bestimmt wurde. Auffällig war die starke Streuung der Messwerte bei $D = 0,047 \text{ h}^{-1}$. Hier wirkte sich die Pulsation der Schlauchpumpe 101U/R verstärkt aus. Der Modellverlauf im Chemostaten (II) (Abb. 4-27) bestätigte die ermittelten Parameter. Der K_s -Wert wurde aus vier unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Empfindlichkeit des Parameters verdeutlicht Abb. 4-26.

Tab. 4-11: Vergleich der Modellanpassung zur kontinuierlichen Kultivierung. Korrelationskoeffizient R berechnet nach Glg. 3-10, S. 34.

D [h ⁻¹]	R bzgl. X [-]	R bzgl. GLC [-]	Y _{X/GLC} [g TBM/ g GLC]	K _s [g/l]	T [°C]
0,059	0,99	0,99	1,06		
0,047	0,65	-	1,18	0,046	26
0,059	0,79	-	0,98		
0,030	0,98	0,99	0,98		
0,064	0,93	0,27	0,76	0,22	30

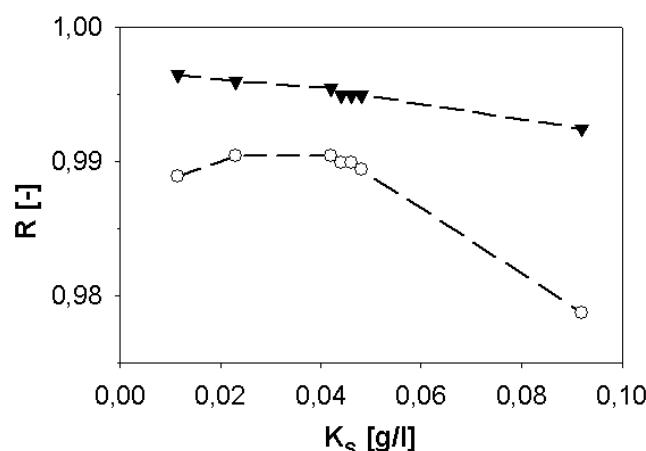


Abb. 4-26: Empfindlichkeit des K_s-Wertes, gezeigt an dessen Einfluss auf den Korrelationskoeffizienten R bei Modellanpassung bezüglich X (O) oder GLC (▼).

Bei Betrachtung des pH-Wertes fällt auf, dass im Chemostaten (I) der pH-Wert anscheinend dem Glukoseverbrauch folgt. Dies bestätigt die Metabolisierung der Glukose, obwohl sie im Steady State nicht gemessen werden konnte. Im Chemostaten (II) sind diese Tendenzen zu Beginn auch zu sehen, jedoch steigt der pH-Wert im Steady State wieder an. Diese Effekte sollten weiter untersucht werden, wenn Messfehler ausgeschlossen werden können.

Der zweite Chemostat wurde zur Gewinnung weiterer Aussagen zur Kultivierung bei 30°C verwendet. Für $D = \frac{1}{2} * \mu_{max}$ konnte die Dynamik des Prozesses verfolgt und über Modellanpassung ein K_s von 0,22 g/l für Glukose errechnet werden. Dieser Wert muss durch weitere Versuche bestätigt werden.

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

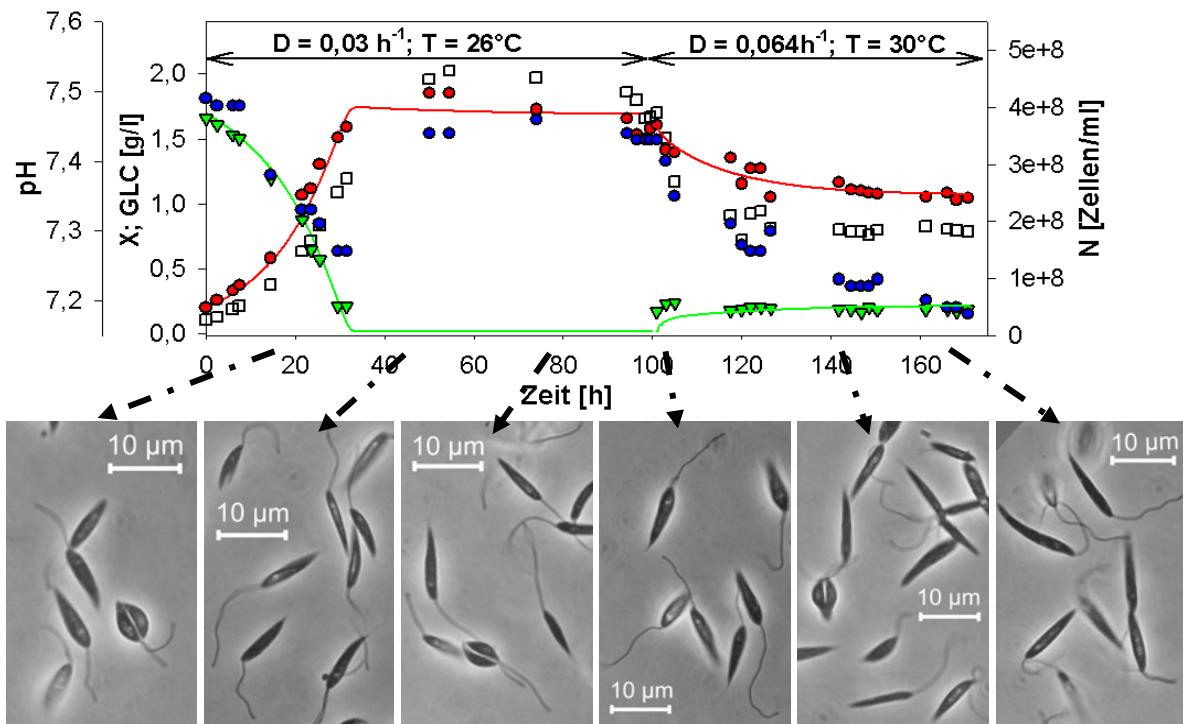


Abb. 4-27: Chemostatenkultivierung (II) mit limitierender GLC bei variierendem D und T. Messwerte für X (●), GLC (▼), pH (●), N (□) und Modellwerte für X (—) und GLC (—). Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte (Pfeile) sind unterhalb gezeigt.

Die kontinuierliche Kultivierung liefert Aussagen zur Langzeitstabilität des Wachstumsprozesses, denn die Fermentationen wurden über 8 bzw. 16 Tage geführt. Im Chemostaten (I) konnten über 27 Generationen erzielt werden, jedoch zeigten sich gegen Ende der Fermentation vermehrt degenerierte Zellen. Die morphologischen Veränderungen der Zellen über den gesamten Prozess sind sehr interessant. Im dynamischen Einschwingprozess war ein tropfenförmiger Zellkörper vorherrschend und die Geißellänge gleich der Zellkörperlänge, teilweise auch kürzer (Abb. 4-25, Abb. 4-27). Sehr viele Zellen waren in Teilung. Im Gleichgewichtszustand wurden die Zellen dünner, am dünnsten bei dem geringen D von 0.03 h^{-1} . Auffällig war, dass die Zellen unter der Limitation von GLC längere Geißeln ausbildeten, die zum Teil die doppelte Länge des Zellkörpers hatten. Bei Erniedrigung von D in Abb. 4-25 bildeten die Zellen wieder die kürzeren Geißeln aus und teilten sich stärker (3. Bild).

Die morphologischen Veränderungen erklären auch, warum eine gute Korrelation zwischen X und N im Einschwingprozess der Chemostatenkultivierung (II) vorliegt, jedoch deutliche Unterschiede im Steady State. Der gleiche Einfluss wurde auch im Schüttelkolben beobachtet, siehe Abschnitt 4.2.

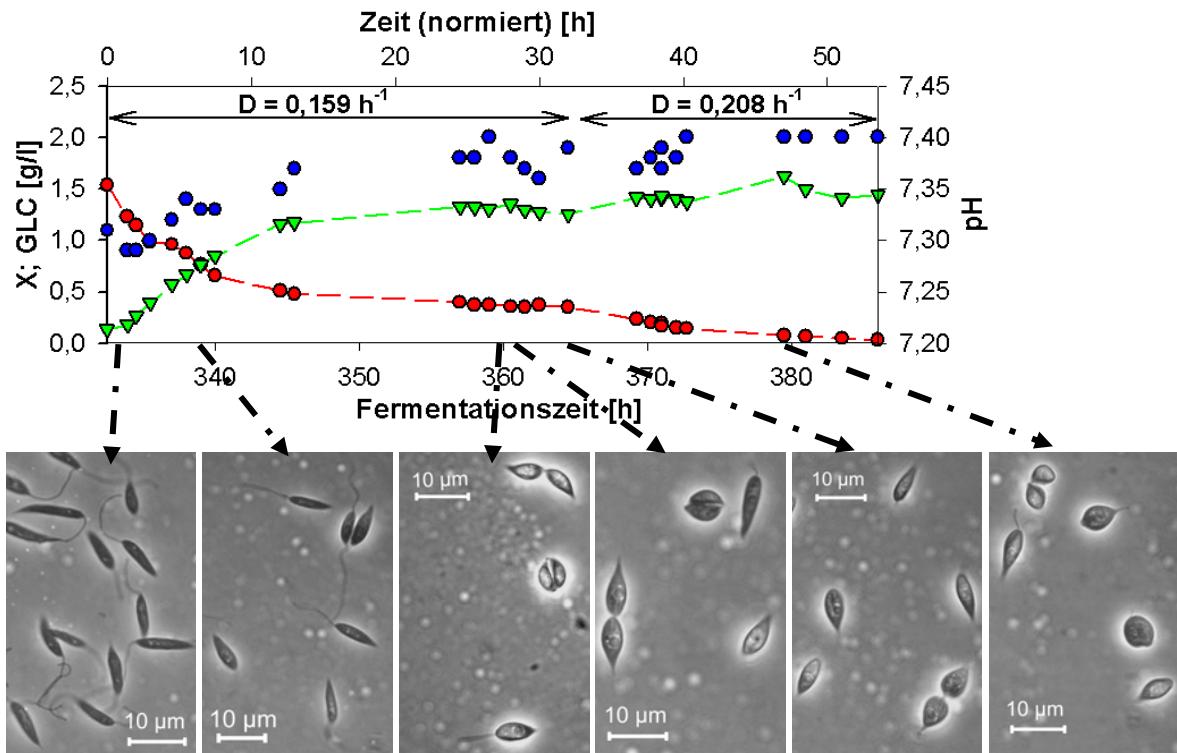


Abb. 4-28: Auswaschen des Chemostaten (I) zur Überprüfung von μ_{\max} mit X (●), GLC (▼) und pH (●). Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte (Pfeile) sind unterhalb gezeigt.

Von Interesse war weiterhin, ob die Zellen nach 14 Tagen Kultivierung ihre maximale Rate wieder aufnehmen und somit dass μ_{\max} im Chemostaten bestätigt werden kann. Deshalb wurde der Chemostat (I) gezielt zum Auswaschen gebracht ($D > D_{\text{krit}}$). Das ausgelöste Auswaschen des Reaktors führte jedoch nicht zur optimalen Bestimmung von μ_{\max} , wie Abb. 4-28 verdeutlicht. Vielmehr zeigten sich deutliche Konformationsänderungen der Zellen. Die Zellen reagierten auf den hohen Selektionsdruck, indem sie verkürzte Geißeln ausbildeten. Überwiegend waren sogar keine Geißeln mehr zu erkennen. Der Zellkörper war kleiner als zu Beginn des Auswaschens und die Tropfenform war noch erhalten, somit lag keine Umwandlung in die amastigote Form vor. Es bildete sich sogar ein erneutes Steady State aus ($t \approx 360$ h, $X = 0,4$ g/l TBM, Abb. 4-28). Durch die morphologischen Änderungen konnten die Zellen wahrscheinlich die hohe spezifische Wachstumsrate von $0,159$ h $^{-1}$ halten. Ungeklärt ist, wie lange die Zellen diese hohe Rate hätten aufrecht erhalten können.

Das endgültige Auswaschen des Reaktors wurde durch eine Erhöhung von D ausgelöst, welches infolge des Wechsels der Vorlageflasche auftrat. Die morphologische Adaption der Zellen reichte nicht zur Erzielung eines μ von $0,208$ h $^{-1}$.

Abschließend ist festzuhalten, dass das Monod-Modell nur für $D < \mu_{\max}$ gilt, da das μ_{\max} durch Zellkonformationsänderungen im Auswaschen des Reaktors nicht gehalten werden konnte.

4.6.2 Inhibitionskonzentration der Glukose

Die Glukose kann bei hohen Konzentrationen wachstumsinhibierend wirken. Zur Ermittlung dieses Bereiches wurden Schüttelkolbenversuche mit YE-Medium bei 26°C und 30°C durchgeführt (Erklärung der erhöhten Kultivierungstemperatur in Abschnitt 4.4.1, S. 61).

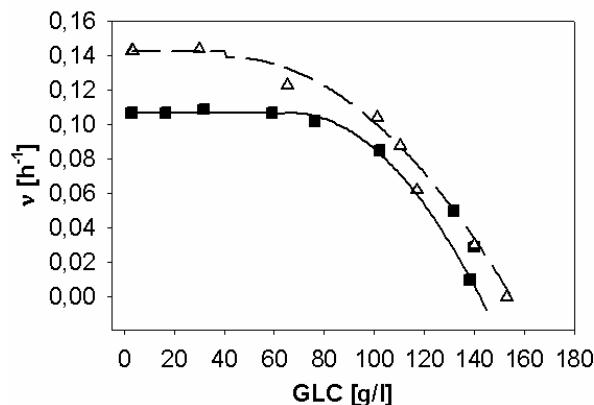


Abb. 4-29: Glukoseinhibition bezüglich v bei 26°C (■) und 30°C (△) mit den Modellwerten für 26°C (—) und 30°C (---). Bestimmung von v 0 - 8 h nach Inokulation, wo $GLC \approx$ konstant gilt. YE-Medium, Schüttelkolbenmaßstab A (siehe 3.2, S. 21), $X_0 = 0,25 - 0,4$ g/l TBM.

Wie in der Abb. 4-29 deutlich wird, inhibiert Glukose bei Konzentrationen > 60 g/l das Wachstum von *L. tarentolae*. Unterschiede in der Inhibition bestehen zwischen den verschiedenen Temperaturen. Mit steigender Glukosekonzentration zeigten sich morphologische Veränderungen der Zellen, weshalb eine Ermittlung von $\mu = f(GLC)$ nicht möglich war. Mit Wirkung der Inhibition verschob sich die Verteilung der Zellgröße zu höheren Größen, d. h., die Zellen wurden breiter, siehe Abb. 4-30 und Abb. 4-31.

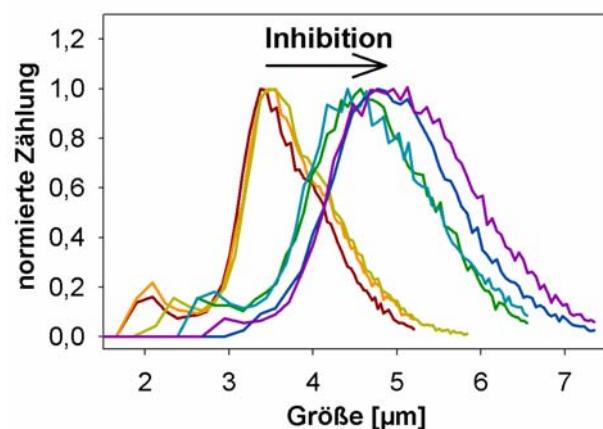


Abb. 4-30: Beeinflussung der Zellgrößenverteilung durch GLC bei 26°C. GLC von 3 g/l (—), 30 g/l (—), 60 g/l (—), 76 g/l (—), 132 g/l (—), 138 g/l (—), 140 g/l (—). Die Verteilungsverschiebung infolge Inhibition ist durch Pfeil gekennzeichnet.

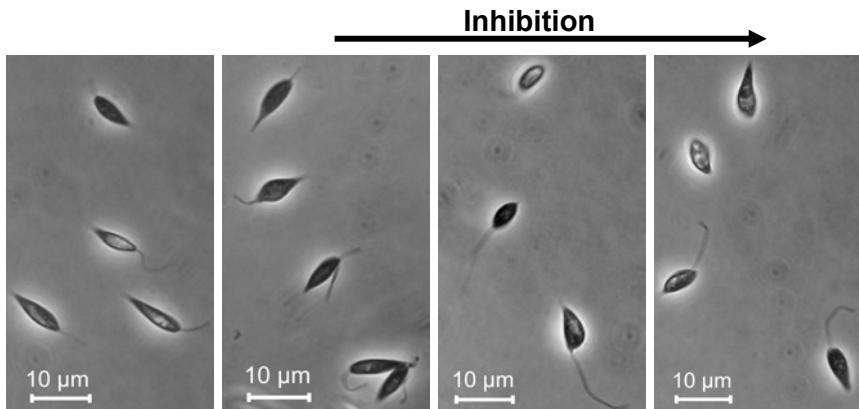


Abb. 4-31: Mikroskopische Aufnahmen von *L. tarentolae*, kultiviert bei verschiedenen GLC. Bilder von links nach rechts: GLC von 3 g/l, 76 g/l, 100 g/l und 140 g/l.

Die Inhibition der Glukose kann durch ein quadratisches Modell (Gl. 4-27) approximiert werden, siehe Abb. 4-29. Das Modell ist gültig für $GLC \geq 60 \text{ g/l}$ bei 26°C ($GLC \geq 40 \text{ g/l}$ bei 30°C). Zwischen $3 \text{ g/l} \leq GLC \leq 60 \text{ g/l}$ gilt $v = v_{\max}$. Deutlich wird, dass die Zellen bei höheren Temperaturen wahrscheinlich sensibler gegenüber Glukose sind als bei niedrigeren Temperaturen, da die GLC-Inhibition bei 30°C früher eintritt als bei 26°C .

$$\text{Gl. 4-27: } v(GLC) = v_{\max} * (a_0 + a_1 * GLC + a_2 * (GLC)^2)$$

$$\begin{aligned} \text{für } 26^\circ\text{C: } v_{\max} &= 0,107 \text{ } h^{-1} & a_0 &= 0,2246 \\ a_1 &= 0,0232 \text{ } l/l \text{ g} & a_2 &= -1,74 * 10^{-4} \text{ } l^2 / \text{g}^2 \\ \text{Definitionsbereich: } &60 - 145 \text{ g/l GLC} & R &= 0,98 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{für } 30^\circ\text{C: } v_{\max} &= 0,143 \text{ } h^{-1} & a_0 &= 1,14 \\ a_1 &= 0,008 \text{ } l/l \text{ g} & a_2 &= -9,9 * 10^{-5} \text{ } l^2 / \text{g}^2 \\ \text{Definitionsbereich: } &40 - 155 \text{ g/l GLC} & R &= 0,99 \end{aligned}$$

Andere Modelle mit Glukoseinhibitionsterm z. B. nach Andrews oder Teissier können nicht verwendet werden, da mit diesen ein exponentiell abnehmender Verlauf approximiert wird. Dies steht den Messwerten entgegen. Mit dem quadratischen Modell können die morphologischen Änderungen berücksichtigt werden. Der Korrelationskoeffizient von ≈ 1 bestätigt die Modellwahl.

Zu überprüfen war die Hypothese einer partiellen Glukoseinhibition, d. h., die pro Zelle wirksame Glukosekonzentration war inhibierend. Dazu wurden bei einer konstanten Glukosekonzentration von 11 g/l die Startkonzentrationen X_0 und N_0 variiert. Wie die Abbildung in Anhang 4 verdeutlicht, lag keine partielle Glukoseinhibition bezüglich μ und v vor. Vielmehr wirkten sich bei kleinen X_0 die Messfehler in der OD-Bestimmung stärker aus und μ stieg. In der Zellgrößenverteilung zeigten sich keine Verschiebungen.

4.7 $\mu = f(\text{Hemin})$

Hemin als essentielle Eisenquelle stellt eine interessante Steuergröße beispielsweise für einen Chemostaten oder einen μ -geführten FedBatch-Prozess dar. Hemin ist auch im Komplexmedium die einzige Eisenquelle, die *L. tarentolae* metabolisiert. Einer Steuerung würde aber der zelluläre Heminspeicher entgegen wirken (zum Vergleich Abschnitt 4.3.3, S. 58). Zur Klärung dieser Überlegungen wurde ein Chemostat mit limitierender Hemin-Konzentration geführt. Dabei wurde in Kauf genommen werden, dass eine analytische Bestimmung des Hemins aufgrund des notwendigen Probenvolumens nicht möglich war. Trotzdem konnte Hemin nur die einzige limitierende Substanz in der Kultivierung gewesen sein, da das vollständige YE-Medium nachgeführt wurde, siehe 3.2, S. 19. Für eine Modellierung wurden die Differentialgleichungen für eine kontinuierliche Kultivierung (Glg. 4-24 bis Glg. 4-26) zugrunde gelegt. Ergänzt wurden die Gleichungen um eine Heminverbrauchskinetik (Glg. 4-28) und eine Erweiterung des Monod-Modells (Glg. 4-29), um die Abhängigkeit von zwei Substraten zu beschreiben.

$$\text{Glg. 4-28: } \frac{d}{dt}(H) = D * (H_{zu} - H) - \frac{\mu(GLC; H) * X}{Y_{X/H}} - a$$

$$\text{Glg. 4-29: } \mu(GLC; H) = \mu_{\max} * \frac{GLC}{K_S + GLC} * \frac{H}{K_H + H}$$

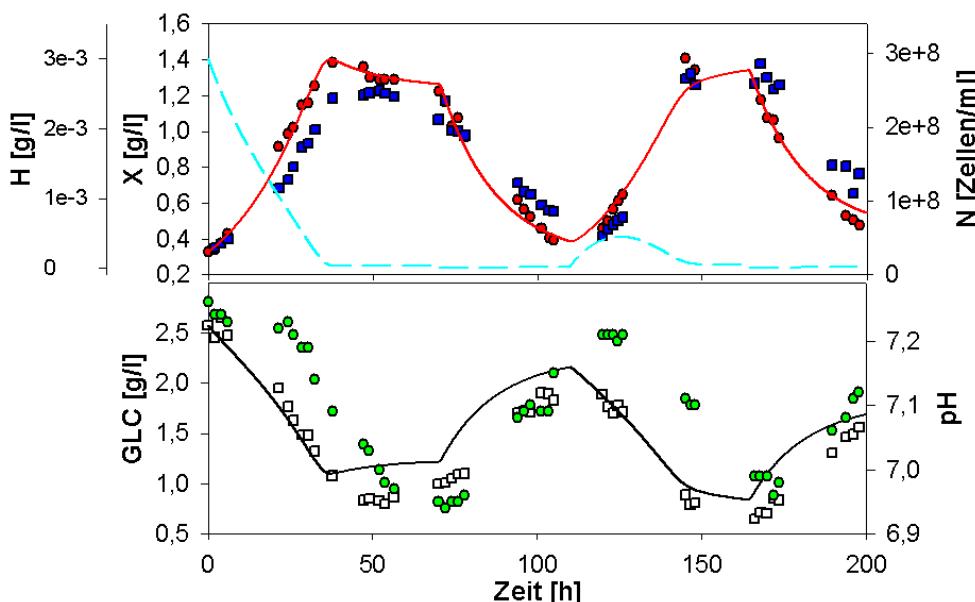


Abb. 4-32: Chemostatenkultivierung mit Heminlimitation und YE-Medium bei $D = 0,061 \text{ h}^{-1}$ und 26°C . Dargestellt sind die Messwerte von X (●), N (■), GLC (□) und pH (●), sowie die Modellierungen für X (—), H (—) und GLC (—).

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Wie die Abb. 4-32 zeigt, hatte sich der Reaktor überraschenderweise auf einem Steady State eingeschwungen. Dort lag eine GLC von ca. 0,8 g/l vor. Es wurde „nur“ ≈ 1 g/l TBM gebildet, obwohl das YE-Nährmedium eine Biomassebildung von 2,5 g/l ermöglicht, bevor es limitiert (siehe 4.1.3, S. 41). In der Kinetik wird deutlich, dass X und N relativ gut miteinander korrelierten. Weiterhin ist zu beachten, dass der pH-Wert der Glukosekinetik zeitversetzt folgte und auch weiterhin abnahm, obwohl der Reaktor laut X und N im Steady State eingeschwungen war. Mit Erreichen des ersten Gleichgewichtszustandes wurden ca. 5,5 Generationen gebildet, am Ende der Kultivierung 18 Generationen.

Der Einschwingprozess des Chemostaten ist sehr gut modellierbar, wie die Modellanpassung in Abb. 4-32 zeigt. Eine Halbsättigungskonzentration des Substrates Hemin (K_H) von 31 µg/l konnte berechnet werden ($R = 0,99$ bezüglich X). Eine Modellanpassung mit Heminspeicherterm war nicht möglich und fand deshalb keine Berücksichtigung. Das verwendete Berkeley-Madonna-Programm befindet sich in Anhang 5.

Bei der Betrachtung der Kinetik (Abb. 4-32) fällt auf, dass ab 70 h Kultivierungszeit ein Auswaschen des Chemostaten begann, obwohl weder die Verdünnungsrate verändert noch die Zudosage ausgetauscht wurde. Nach ca. 100 h wurde die Vorlageflasche gewechselt und der Prozess fing an, sich auf ein neues Steady State einzuschwingen. Anzumerken ist, dass beide Vorlageflaschen nahezu identisch waren bezüglich des Mediums und der GLC, nur das Hemin in der 2. Flasche war geringfügig höher (von 1,5 auf 1,7 mg/l; Messwerte der Heminanalytik). Das Verhalten des Reaktors lässt nur eine Schlussfolgerung zu: Das Hemin baut sich im Nährmedium ab, wenn es längere Zeit bei Raumtemperatur verwendet wird. Ein Abbau aufgrund von Lichteinwirkung wurde durch Einpacken des Reaktors und der Vorlageflaschen in Alufolie minimiert. Die Berücksichtigung dieses Abbaus erfolgte im Modell durch den Term a, der eine exponentielle Abbaukinetik beschreibt (Gl. 4-30).

$$\text{Gl. 4-30: } a = 70 \times 10^{-6} \times e^{-24 \times 10^{-6} \cdot t} \quad \begin{array}{l} \text{für } 70 \text{ h} \leq t \leq 110 \text{ h} \\ \text{oder } 164 \text{ h} \leq t \leq 200 \text{ h} \end{array}$$

Nachdem die zweite Vorlageflasche wiederum für 3 Tage der Raumtemperatur ausgesetzt war, begann sich das Hemin erneut abzubauen. Als Reaktion wusch der Reaktor wieder aus. Dies bestätigt die Annahme der Heminabbaukinetik.

Die Anpassung der GLC-Kinetik konnte nur sehr grob erfolgen ($R = 0,94$) mit den bisher ermittelten Werten für K_s und $Y_{X/GLC}$ (Abschnitte 4.2 und 4.6). Eine Variation in diesen Parametern ermöglicht eine bessere Übereinstimmung zwischen Modell und Messwerten. An dieser Stelle ist die Genauigkeit dieser Messreihe anzuzweifeln. Über einen Vergleich mehrerer Messreihen kann nur eine vertrauenswürdige Aussage getroffen werden. Die Parameter der Abschnitte 4.2 und 4.6 sind als gesicherter zu betrachten.

Ergebnisse – Teil B: Ermittlung dynamischer Prozessparameter

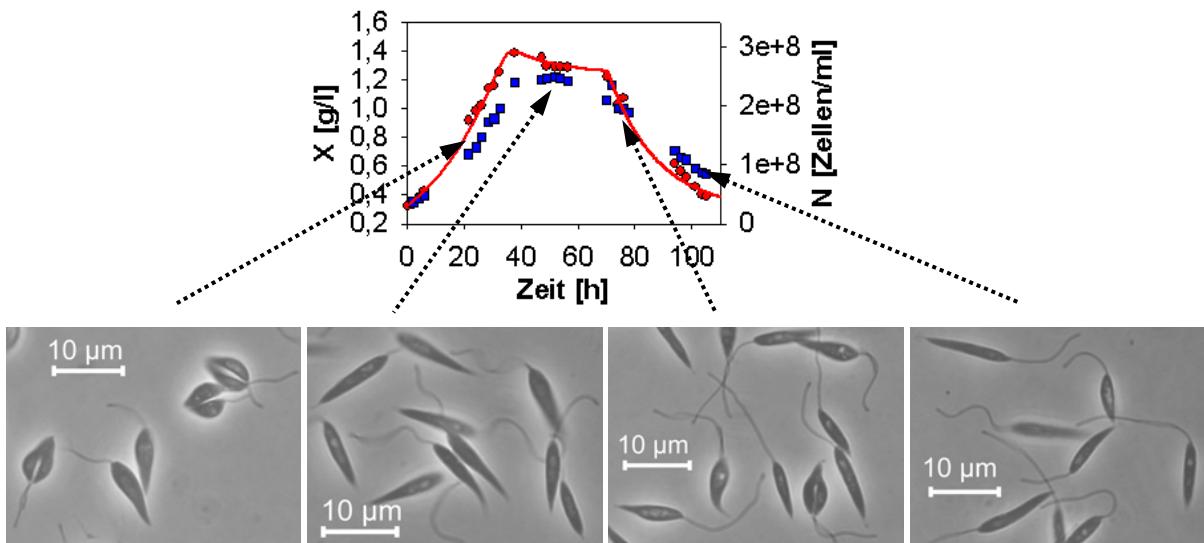


Abb. 4-33: Morphologische Veränderungen von *L. tarentolae* im Chemostaten mit Heminlimitation, demonstriert an der ersten Schwingung des Prozesses; X (●) und N (■). Die Bilder sind repräsentativ für die zweite Schwingung.

In dem heminlimitierten Chemostaten zeigten sich interessante morphologische Veränderungen der Zellen, die mit dem Status des Prozesses korreliert werden können (Abb. 4-33). Im dynamischen Einschwingprozess waren die Zellen tropfenförmig und viele in Teilung. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurden die Zellen etwas dünner, jedoch nicht so extrem schlank wie bei dem Wachstum auf Aminosäuren (zum Vergleich Abb. 4-11, S. 50). Die Zellen bildeten unter den Limitationsbedingungen längere Geißeln aus, der Effekt verstärkte sich beim „Auswaschen“ des Reaktors durch die abnehmende Hemin-Konzentration. Mit zunehmender Zeit unter Limitationsbedingungen bildeten mehr Zellen die verlängerten Geißeln aus, die teilweise zweimal so lang waren wie der Zellkörper.

Nachdem die neue Vorlageflasche angeschlossen war, begannen ein erneuter Einschwingprozess und morphologische Zellveränderungen. Die Zellen zeigten einen dicken, tropfenförmigen Zellkörper und eine normal lange Geißel. Häufig wurden sogar Zellen mit einer verkürzten Geißel beobachtet (wie bei der Zellteilung im ersten Bild von Abb. 4-33). Oft zu sehen war bei sich teilenden Zellen, dass die eine Tochterzelle eine verkürzte Geißel hatte und die andere eine „normal“ lange. Jedoch waren die morphologischen Veränderungen unter Limitationsbedingungen nicht so dramatisch, wie sie bei dem Auswaschen des GLC-limitierten Chemostaten beobachtet wurden (Abb. 4-28, S. 73).

Die relativ gute Korrelation zwischen X und N lässt sich damit erklären, dass die Zellen unter Limitationsbedingungen nicht so extrem dünn werden wie beim Wachstum auf Aminosäuren. Deshalb gibt es kaum Abweichungen zwischen der Zelldichte und dem OD (bzw. der errechneten Trockenbiomasse).

TEIL C: STRATEGIEN ZUR PROZESSFÜHRUNG

In der Literatur gibt es kaum Untersuchungen zu Bioreaktorkultivierungen mit *Leishmania*. Die Fragestellung, unter welchen Bedingungen eine Kultivierung von *L. tarentolae* im Rührkesselreaktor möglich ist, hat deshalb besondere Relevanz. Die Auswahl eines geeigneten Reaktors ist besonders wichtig für die Planung weiterer Kultivierungen. Weiterhin steht im Fokus der Untersuchungen der Entwurf von unterschiedlichen FedBatch-Strategien für das Komplexmedium und das definierte Medium, um möglichst hohe Biomassedichten zu erzielen. Begleitend dazu ist interessant, welche Prozessparameter und Prozessbedingungen beim Bioreaktor verwendet werden können. Die Untersuchungen wurden mit dem Wildtypstamm durchgeführt, um grundsätzlich die Parameter und Strategien abzustecken. Diese können dann bei konkreten Wirt-Vektor-Systemen als Orientierungspunkte dienen.

4.8 Bioreaktorauswahl

Die Auswahl des Bioreaktors ist bei Eukaryoten besonders wichtig, da diese Zellen aufgrund einer fehlenden Zellwand scherstressempfindlich sein können. Deshalb wurden identische Kultivierungen von *L. tarentolae* im Airlift und im Rührreaktor durchgeführt (2 l Maßstab) [110, 111, 112]. Zur Reduzierung des Scherstresses wurden Schrägblattrührer verwendet (Drehzahl von 100 – 300 rpm). Bei einer Belüftungsrate von 1 VVM und einem maximalen spezifischen Sauerstofftransportkoeffizienten ($k_L \cdot a$) von 50 h^{-1} (ermittelt nach der dynamischen Methode [113]) wurden vergleichbare Wachstums- und Substratverbrauchs-kinetiken erzielt, siehe Abb. 4-34. In den Fermentationen wurde eine maximale Optische Dichte von 2,5 erreicht und ein μ von $0,1 \text{ h}^{-1}$.

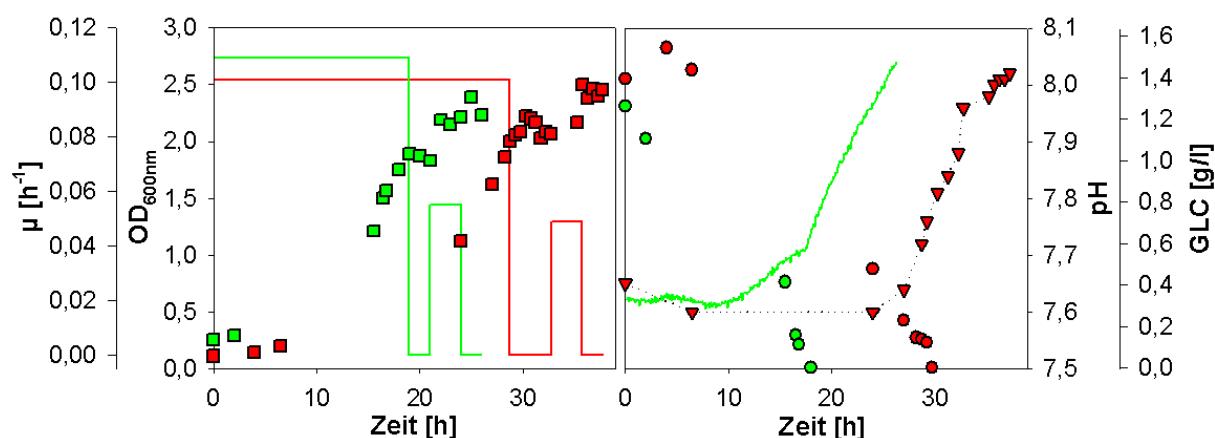


Abb. 4-34: Gegenüberstellung der Kultivierung im Airlift- (rot) und Rührreaktor (grün) mit Darstellung der OD_{600nm} (□), μ (–), GLC (○) und pH (▽), BHI-Medium.

Die Untersuchungen zeigen, dass eine Kultivierung von *L. tarentolae* im Rührreaktor möglich ist. Durch den vergleichbaren Wachstumsverlauf in beiden Reaktoren kann geschlussfolgert

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

werden, dass die verwendeten Reaktorparameter Drehzahl, Belüftungsrate und Temperatur und der damit auftretende Scherstress keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hatten. Die Chemostatenkultivierungen aus Abschnitt B bestätigten diese Schlussfolgerung, da die Prozesse unter gerührten Bedingungen (Magnetrührer) durchgeführt wurden.

4.9 pH-Regelung

Zu Beginn der Untersuchungen wurde Ammoniak zur Gegentitrierung der Nährmedienansäuerung eingesetzt. Jedoch wurde eine Wachstumsinhibition bei einer steigenden Ammoniakkonzentration vermutet. Alternativ kann Natronlauge oder Kaliumhydroxid als Base zur Gegentitrierung eingesetzt werden [80].

4.10 Batch-Kultivierung mit YE-Medium

Das YE-Medium unterstützt die Kultivierung von *L. tarentolae* im Bioreaktor [86] - eine wichtige Voraussetzung in Hinblick auf eine Prozessentwicklung. Wie die Abb. 4-35 zeigt, wurde ein ν von $0,092 \text{ h}^{-1}$ im exponentiellen Wachstum auf Glukose erzielt. Der Ertragskoeffizient $Y_{N/GLC}$ betrug $1,6 \times 10^8$ Zellen/g Glukose. Nachdem die GLC-Limitation einsetzte, stieg der pH-Wert an, was bereits in der Standkultur als auch im Schüttelkolben beobachtet wurde. Am Ende des Prozesses wurde ein N_{\max} von $8,5 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht.

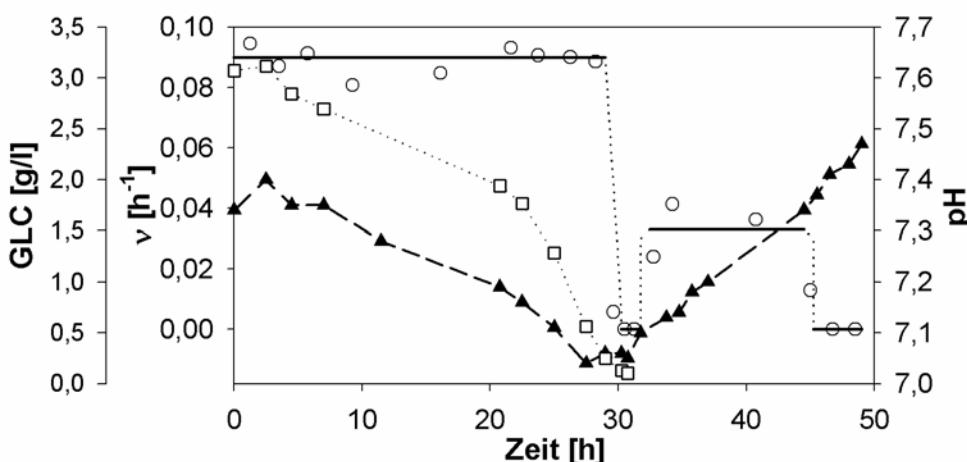


Abb. 4-35: Batch-Fermentation von *L. tarentolae* im 2 l Bioreaktor mit pH (▲) und GLC (□), YE-Medium, 26°C. Weiterhin ist ν (○) gezeigt, bestimmt zwischen 2 Messpunkten und aufgetragen zur mittleren Intervallzeit. Die Werte von ν nach logarithmischer Glättung (—) sind mit approximierten Übergangsbereichen (··) dargestellt.

4.11 Zudosagestrategien für hohe Zelldichten im Komplexmedium

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass im Komplexmedium eine oder mehrere Komponenten vorliegen müssen, die das exponentielle Wachstum nach einer gewissen

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Kultivierungszeit limitieren. Dies verhindert hohe Zelldichten am Ende des exponentiellen Wachstums. Naheliegend ist die Annahme, dass die C-Quelle diese Komponente ist. Deshalb wurde versucht, Glukose im nicht-limitierenden Konzentrationsbereich durch Zudosagen zu halten. Da diese Strategie einen begrenzten Erfolg zeigte, siehe nachfolgenden Abschnitt, wurde die Zudosage von Nährmedienkonzentrat untersucht, da die limitierende(n) Komponente(n) nicht identifiziert werden konnten.

Ziel dieser Untersuchungen war es, möglichst hohe Biomassedichten zu erzielen, während die Zellen Glukose metabolisieren (exponentielles Wachstum). Ein Umschalten auf den Aminosäurenstoffwechsel sollte verhindert werden, da dies metabolische Veränderung zur Folge hat und damit Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Kultivierungen und die Produktbildung haben kann.

Während der Kultivierungen mit Komplexmedium war ein Zusatz an Antischaummittel erforderlich. Silikonöl wurde überwiegend eingesetzt, jedoch neigte es zu Aggregatbildungen im TSB-Medium. Als Ersatz diente Sojaöl, welches zu Beginn gute Ergebnisse mit TB-Medium zeigt, später jedoch zu einer starken Flockenbildung neigte. Für das YE-Medium hat sich das Silikonöl bewährt.

4.11.1 Effekte der Zudosage der primären C-Quelle Glukose

Die Strategie einer unlimitierten C-Quelle wurde durch zyklische Glukoseimpulse realisiert, siehe Abb. 4-36 und Abschnitt 3.2 Seite 22. Ein Umschalten auf ein alternatives Substrat sollte damit unterbunden und der Prozess möglichst mit μ_{\max} geführt werden [91, 102, 112]. Trotz der unlimitierenden Glukose sank das μ bei einem erzielten ΔX von 1,3 g/l TBM auf 0,064 h⁻¹ ab (Punkt 1 in Abb. 4-36), was zuvor auch im Schüttelkolben mit TSB-Medium beobachtet wurde. Somit lagen im Bioreaktor die gleichen physiologischen Randbedingungen wie im Schüttelkolben vor. Ein wichtiger Bestandteil des Nährmediums war wahrscheinlich aufgebraucht und die Zellen mussten zur Erschließung von neuen Nährstoffquellen zusätzliche Substanzen produzieren und ausscheiden. Dies beanspruchte den Metabolismus und resultierte in einer verringerten spezifischen Wachstumsrate. Das weitere Absinken des μ von 0,064 h⁻¹ auf 0 zeigte bei unlimitierter C-Quelle, dass ein essentielles Substrat fehlte (Punkt 2 in Abb. 4-36). Am Ende des exponentiellen Wachstums wurde eine Zelldichte von 4,5x10⁸ Zellen/ml erzielt.

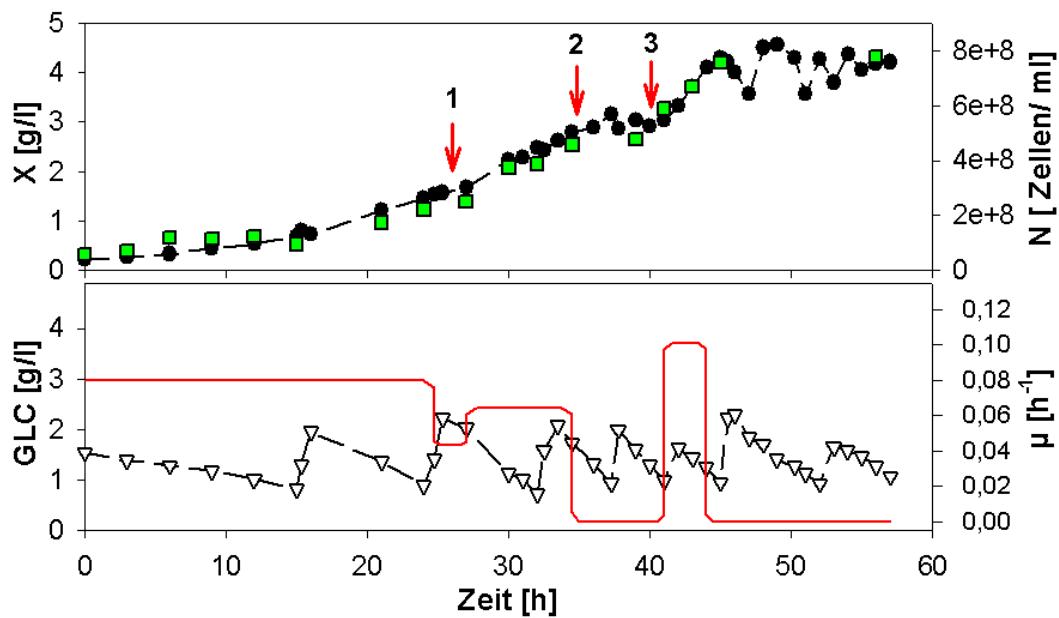


Abb. 4-36: Bioreaktorkultivierung mit TSB-Medium und Zudosage von Glukose. Darstellung von X (●), N (■), GLC (▽) und μ (—). Erklärung der Punkte 1-3 im Text.

Nachdem die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, wurde versucht, das Wachstum durch eine Zugabe von Hemin zu reaktivieren. Wie die Abb. 4-36 in Punkt 3 zeigt, kehrten die Zellen für ca. 5 Stunden zu einem weiteren exponentiellen Wachstum zurück. Danach endete das Wachstum in einer stationären Phase bei ca. 4,5 g/l TBM. Erneute Zugaben von Hemin konnten diesen Effekt nicht wiederholen. Die erneute stationäre Phase weist darauf hin, dass das Wachstum aufgrund von mehrfachen Limitationen zum Erliegen kam, obwohl die detektierbaren Substrate im Überschuss vorlagen. Das verbrauchte Nährmedium unterstützte in dieser Phase der Kultivierung nur noch den Erhaltungsstoffwechsel. Auffällig war, dass OD und N über die gesamte Fermentationszeit korrelierten. Somit traten wahrscheinlich keine metabolischen Veränderungen der Zellen auf.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann festgehalten werden, dass mit unlimitierter GLC höhere Zelldichten erzielt werden konnten, denn im Schüttelkolben wurden nur $2,6 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht (TSB-Medium). Für weitere Prozessstrategien sollte dieser Parameter weiter unlimitiert gehalten werden.

4.11.2 Effekte einer einmaligen Zudosage von Nährmedienkonzentrat

Da die limitierenden Faktoren im Komplexmedium nicht bekannt waren, wurden alle Substanzen durch eine einmalige Zugabe an Nährmedienkonzentrat nachgeführt [91]. Das verwendete 4xTB-Konzentrat enthielt nur 1fach konzentrierte Puffersalze, da die Zellen in Vorversuchen nur sehr wenig freies Phosphat verbrauchten und Kalium durch die pH-

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Regelung mit KOH zugeführt wurde. Zur Verhinderung einer Wachstumsinhibition oder Störung der osmotischen Verhältnisse wurde die Salzkonzentrationen nicht erhöht.

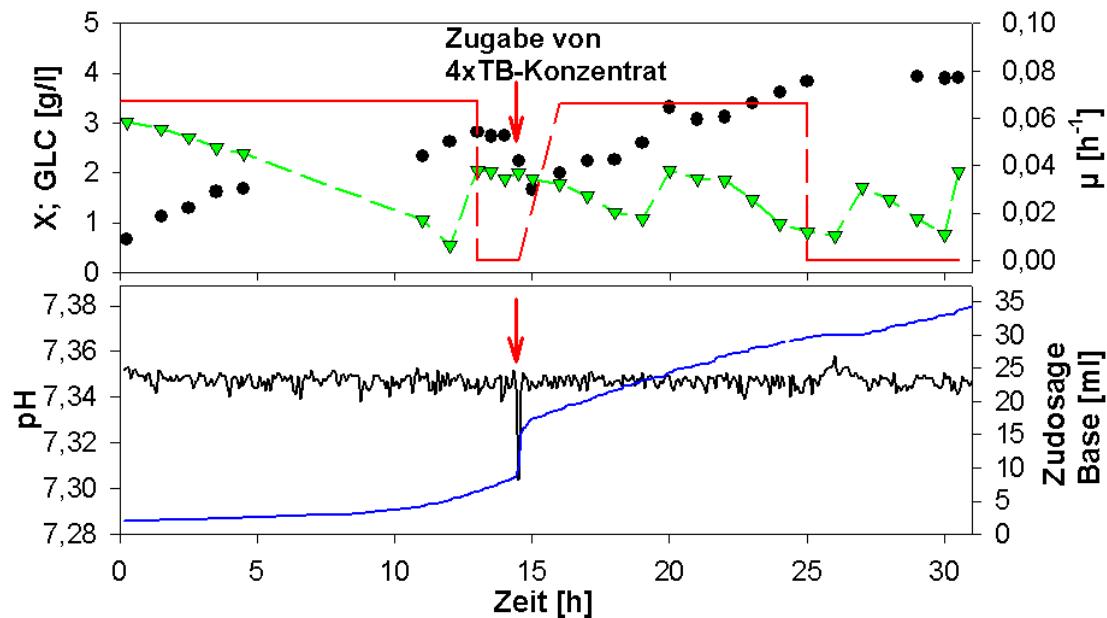


Abb. 4-37: Fermentation mit einer einmaligen Zugabe von 4xTB-Nährmedienkonzentrat. Darstellung von X (●), GLC (▽), μ (—), pH (—) und des zudosierten Basenvolumens (—) zur pH-Regelung, Verwendung von TB-Medium.

Wie die Abb. 4-37 verdeutlicht, konnte das Wachstum durch Zugabe von Nährmedienkonzentrat reaktiviert werden und μ kehrte zu dem Wert der ersten Wachstumsphase zurück. Die erneute Zugabe von Base zur Regelung des pH-Wertes weist auf eine Ansäuerung des Nährmediums hin und bestätigt den Katabolismus von Glukose. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/GLC}$ betrug ca. 0,6 g TBM/ g Glukose in beiden Phasen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit der Zugabe von Nährmedienkonzentrat höhere Biomassedichten unter exponentiellem Wachstum erzielt werden konnten.

4.11.3 Mehrfache Zudosagen von Nährmedienkonzentrat

Die entwickelte Strategie wurde erweitert durch wiederholte Zudosagen an Nährmedienkonzentrat [114]. Die Zugaben erfolgten, wenn 2,5 g/l TBM im Reaktor gebildet wurde. Wie in Abschnitt 4.1.3 (S. 41) festgestellt wurde, limitierten erste Substanzen des YE-Mediums ab diesem Wert. Um μ und ν zu halten und ein Umschalten auf den Aminosäurestoffwechsel zu verhindern, erfolgten die Zugaben entsprechend, wie in Abb. 4-38 durch Pfeile gekennzeichnet ist. Die Zugaben wurden so durchgeführt, dass im Bioreaktor wieder ca. 1x konzentriertes Medium vorlag (Annahme: bei 2,5 g/l TBM gebildeter Biomasse ist das Nährmedium aufgebraucht).

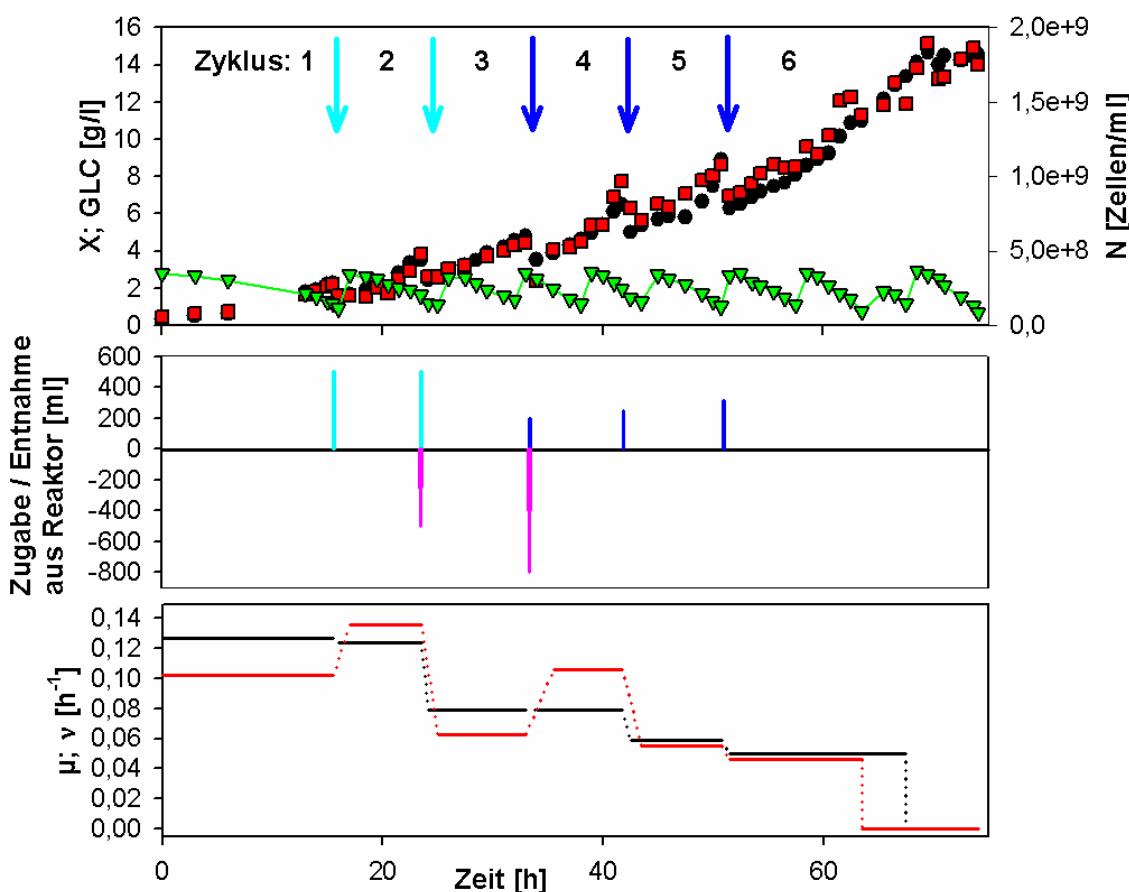


Abb. 4-38: FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen an Nährmedienkonzentrat. Darstellung von X (●), N (■), GLC (▽), μ (—), ν (—) und Kennzeichnung der Zugabe von 4xYE-Konzentrat (↓, —) und 6,25xYE-Konzentrat (↓, —) und der Entnahme von Zellsuspension (—).

Eine zweimalige Entnahme von Zellsuspension wurde aufgrund des begrenzten Reaktorvolumens erforderlich. Bei allen Zugaben und Entnahmen wurde darauf geachtet, das gilt: X_0 (neuer Zyklus) $> X_0$ (vorheriger Zyklus). Nur so konnte das Ziel einer hohen Biomassedichte erzielt werden. Weiterhin wurden Glukose und Hemin durch zyklische Zugaben unlimitiert gehalten. Die Heminzudosagen wurden aus dem aktuellen X und einem $Y_{X/H}$ von

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

800 g TBM/ g Hemin errechnet, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Heminanalytik etabliert war. Eine detaillierte Auflistung der Zugabezeitpunkte ist im Abschnitt 3.2, „Batch- und FedBatch-Kultivierungen im Laborfermenter“ auf Seite 22 zu finden.

PenStrep wurde mehrfach während der Fermentation zur Verhinderung einer Kontamination zugegeben. Eine inhibierende Konzentration auf *L. tarentolae* ist nicht bekannt, jedoch wurde darauf geachtet, dass die verwendete Konzentration nur maximal die 2fache der sonst verwendeten Konzentration betrug.

Mit dieser Strategie konnte *L. tarentolae* bis zu einer maximalen Zelldichte von $1,8 \times 10^9$ Zellen/ml ($X_{\max} = 14,5$ g/l TBM) unter Verbrauch von Glukose kultiviert werden, siehe Abb. 4-38. Dies ist eine deutlich höhere Zelldichte, als mit bisherigen Verfahren und Nährmedien bei Wachstum auf Glukose erzielt wurde (Schüttelkolben mit YE-Medium: $X_{\exp} = 3,4 \times 10^8$ Zellen/ml, siehe 4.1.3, S. 41). Über einen weiten Bereich des Prozesses korrelierten die Optische Dichte mit der Zellzahl (0 - 63,5 h, bis OD = 11,4). Ein Glukoseverbrauch war detektierbar. Deshalb fand wahrscheinlich kein Umschalten auf den Aminosäuremetabolismus statt. Das Ziel dieser Strategie, mit Glukosemetabolismus möglichst hohe Zelldichten zu erzielen, war somit erfüllt.

Die Zellen wuchsen mit definierten spezifischen Raten, jedoch verringerten sich μ und ν ab Zyklus 3 stetig. Die Ursachen werden im nachfolgenden Abschnitt (Seite 88) diskutiert.

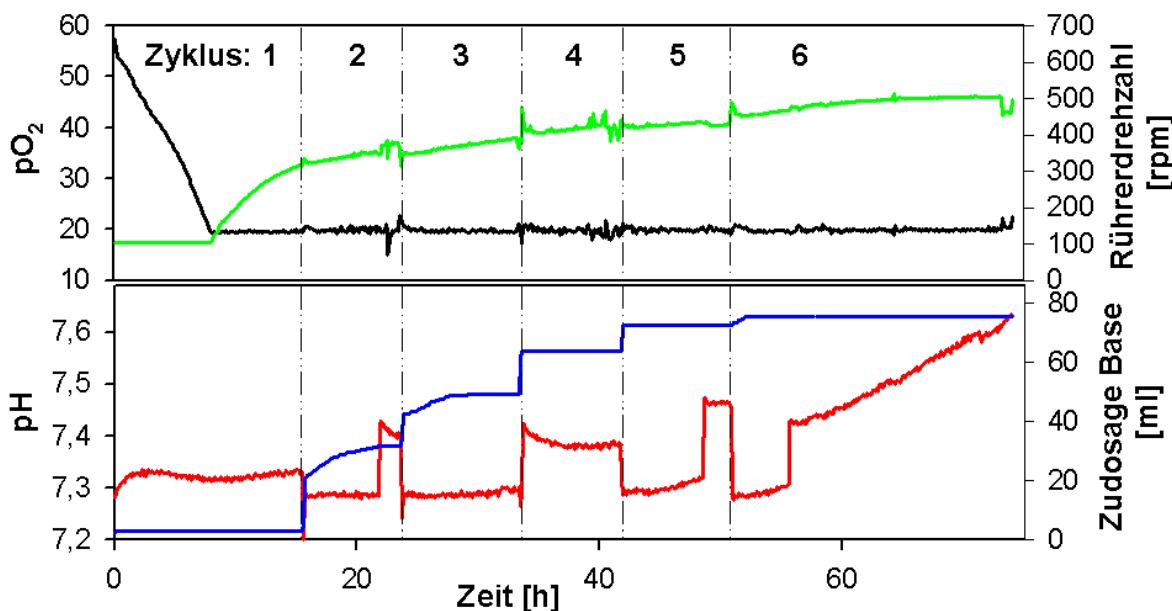


Abb. 4-39: Prozessparameter zur FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen an Nährmedienkonzentrat. Darstellung des pO₂ (—), Rührerdrehzahl (—), pH (—) und des Zudosagevolumens an Base zur pH-Regelung (—).

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Die pH-Kinetik in Abb. 4-39 zeigt Störungen in den Zyklen 2, 5 und 6, hervorgerufen durch Heminzugaben, da Hemin in dem alkalischen Lösungsmittel Triethanolamin gelöst war. Bei Zugaben ab $t > 60$ h wurde der pH der Lösung auf 7,4 mit Phosphorsäure eingestellt.

Unterstützende Aussagen zum Metabolismus der Zellen lieferte die pH-Kinetik. Im 5. Zyklus war eine leichte Alkalisierung des Nährmediums zu erkennen, im Zyklus 6. war sie deutlich ausgeprägt. Trotzdem unterschieden sich die Ertragskoeffizienten $Y_{X/GLC}$ nicht deutlich von den vorherigen Zyklen, siehe Tab. 4-12. Auch morphologisch zeigten sich keine drastischen Unterschiede, wie sie zuvor beim Wachstum auf Aminosäuren beobachtet wurden (siehe Abb. 4-11, S. 50). Mit zunehmender Zykluszahl wurden die Zellen etwas kleiner und dicker. Diese Zellen könnten sich gerade in Teilung befinden haben oder repräsentieren die Alterung der Kultur (Zyklus 5 und 6). Auch die Geißellängen waren wie bei Zellen mit exponentiellem Glukosewachstum.

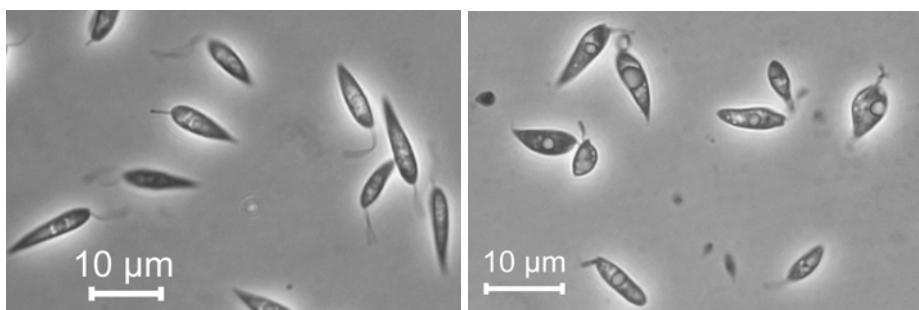


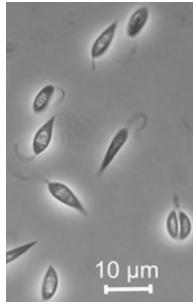
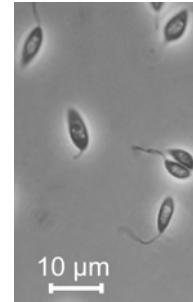
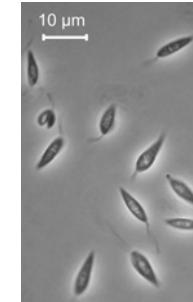
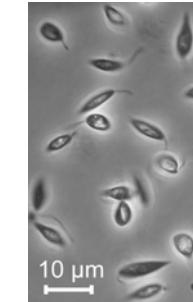
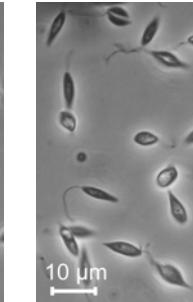
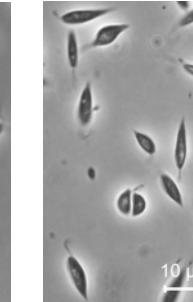
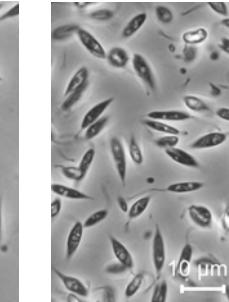
Abb. 4-40: Vergleich der Zellen zu Beginn (links) und am Ende (rechts) des Prozesses.

Wurden die Zellen zu Beginn und am Ende der Fermentation betrachtet, zeigten sich Veränderungen, die auf einen natürlichen Alterungsprozess hinweisen, siehe Abb. 4-40. Der Anteil an degenerierten Zellen nahm in der Kultur zu. Die Zellkompartimente traten viel deutlicher im Zellkörper hervor. Detaillierte, mikrobiologische Untersuchungen sind notwendig, um die Zellorganellen zu charakterisieren. Deutlich wird aber, dass grundsätzlich der Zellkörper eines Promastigoten mit Geißel erhalten blieb.

Durch Anwendung dieser Prozessstrategie konnten insgesamt 8 Generationen an Zellen gebildet werden, siehe Tab. 4-12. Weiterhin kann festgehalten werden, dass die Zellen im Metabolismus nicht umschalteten, da Nährmedienkonzentrat zudosiert und GLC unlimiert gehalten wurde. Für diesen Prozess kann die Produktivität als Verhältnis der kumulierten Biomasse bezogen auf das Bruttovolumen des Reaktors (2 l) und die Gesamtzeit des Prozesses berechnet werden. Für die kumulierte Biomasse wird eine Ernte des Fermenters in der stationären Phase angenommen. Unter Berücksichtigung der zweimaligen Entnahme von Zellsuspension ergibt sich eine Biomasse von 26,3 g TBM. Die Gesamtzeit des Prozesses setzt sich aus der Fermentationszeit (71 h) und der Rüstzeit (52 h) zusammen. Damit ergibt sich eine Produktivität von 0,107 g TBM/ l/ h.

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Tab. 4-12: Gegenüberstellung von Parametern der Zyklen 1 - 6 der FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen an Nährmedienkonzentrat.

Parameter	Zyklus						Stationäre Phase ab t = 68,5 h
	1	2	3	4	5	6	
μ [h ⁻¹]	0,127	0,124	0,079	0,079	0,059	0,050	0
v [h ⁻¹]	0,102	0,136	0,063	0,106	0,055	0,046	0
$Y_{X/GLC}$ [g TBM/ g GLC]	0,84	0,60	0,82	0,99	0,57	0,96	-
Generationen pro Zyklus [-]	2,8 (nach X) 2,3 (nach N)	1,3 (nach X) 1,5 (nach N)	1,0 (nach X) 0,8 (nach N)	0,9 (nach X) 1,2 (nach N)	0,7 (nach X) 0,7 (nach N)	1,2 (nach X) 1,1 (nach N)	-
Generationen (kumuliert) [-]	2,8 (nach X) 2,3 (nach N)	4,2 (nach X) 3,8 (nach N)	5,2 (nach X) 4,6 (nach N)	6,1 (nach X) 5,7 (nach N)	6,8 (nach X) 6,4 (nach N)	7,9 (nach X) 7,5 (nach N)	7,9 (nach X) 7,5 (nach N)
YE-Konzentration (unter Annahme des vollständigen Verbrauchs)	1x	1,25x	1,25x	1,25x	1,28x	1,3x	0
YE-Konzentration (kumuliert)	1x	1,97x	2,6x	3,33x	4,01x	4,56x	4,56x
Mikroskopische Aufnahmen der Zellen							

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Für den Drehzahlbereich von 100 - 300 rpm ($k_L \cdot a = 14 - 30 \text{ h}^{-1}$, [110]) wurde keine Scherstressemfindlichkeit von *L. tarentolae* festgestellt (siehe 4.8, S. 79). Bei dieser Fermentation war eine Drehzahlerhöhung auf 500 rpm ($k_L \cdot a = 71 \text{ h}^{-1}$, [110]) erforderlich, um den pO_2 konstant zu halten. Ab Zyklus 4 waren vereinzelt kleine, runde Kompartimente unter dem Mikroskop sichtbar, wahrscheinlich Zellorganellen. Im Zyklus 6 waren auch Zelltrümmer zu sehen, jedoch war der überwiegende Teil der Zellen intakt und sehr beweglich. Ab Zyklus 4 war die Rührerdrehzahl > 400 rpm. Am Ende der Fermentation wurde die Drehzahl sprunghaft auf 700 rpm ($k_L \cdot a > 110 \text{ h}^{-1}$, [110]) erhöht, was eine starke Schaumbildung auslöste. Dies deutet auf eine Freisetzung von Zellproteinen hin und damit auf eine Zerscherung der Zellen. Die mikroskopische Aufnahme in Abb. 4-41 bestätigt dies.

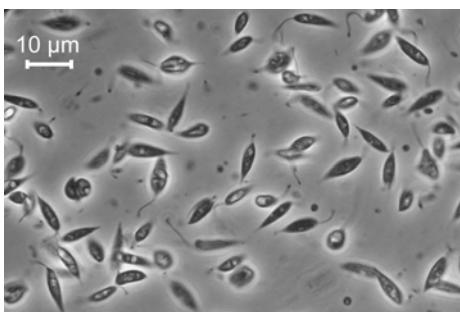


Abb. 4-41: Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach Drehzahlerhöhung (500 → 700 rpm).

Ursachen für die Verringerung der Raten

Die Substrate Glukose, Hemin, Sauerstoff und Nährmedienbestandteile wurden durch entsprechende Zugaben und Begasungsraten unlimitiert gehalten und können somit nicht die Verringerung der Raten μ und ν ausgelöst haben. Die Ursache ist vielmehr in einer Wachstumsinhibition zu sehen. Zum einen könnten Stoffwechselprodukte der Zellen inhibieren. Eine Überprüfung der Stoffwechselprodukte erfordert jedoch umfangreiche analytische Untersuchungen und die Identifikation der entsprechenden Substanzen - ein zeitaufwendiges Unterfangen mit ungewissem Ausgang.

Zum anderen könnten Substanzen des Nährmediums inhibieren. Die Zellen nutzen wahrscheinlich nicht alle Inhaltsstoffe des Komplexmediums, diese reichern sich im Bioreaktor an (kumulieren) und wirken mit zunehmender Konzentration inhibierend. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden aus einer Vorkultur ($\mu = 0,102 \text{ h}^{-1}$) Schüttelkolben mit Nährmedienkonzentrat beimpft. Eine Verringerung von μ auf $0,069 \text{ h}^{-1}$ wurde bei 2,5xYE-Konzentrat gemessen ($\mu = 0,053 \text{ h}^{-1}$ bei 4,56xYE-Konzentrat). Dies erklärt die Abnahme von μ und ν im Fermentationsprozess, denn bei Annahme einer Kumulierung von Nährmedienbestandteilen lag im 3. Zyklus 2,5x konzentriertes und im 6. Zyklus 4,56x konzentriertes Medium vor (siehe Tab. 4-12). Die im Schüttelkolben und im Fermenter gemessenen Raten waren bei diesen

Konzentrationen gleich. Somit wurde die Verringerung der Raten im Fermentationsprozess durch eine Inhibierung von Nährmedienbestandteilen ausgelöst.

Modellanpassung

Die mathematische Beschreibung der FedBatch-Fermentation [115] soll eine leichte Anwendung und eine Optimierung der Prozessstrategie ermöglichen. Die mathematischen, mikrobiologischen Modelle basieren auf kausalen Zusammenhängen, die die makroskopischen Stoffwandlungsprozesse repräsentieren. Für die Modellierung wurde ein idealer Reaktor angenommen, d. h., keine Konzentrationsgradienten. Dies ist für die zwei Schrägbatatrührer und die minimal verwendete Rührerdrehzahl von 100 rpm bei einem 2 l-Bioreaktor zulässig. Grundlage für die Modellierung sind die allgemeinen Differentialgleichungen für X und GLC eines FedBatch-Prozesses (Glg. 4-31; Glg. 4-32). Darin ist ein Korrekturterm ($K_{X,D} = 0,0025 \text{ h}^{-1}$) enthalten, der den Biomassezerfall bzw. die Biomassealterung im Modell erfasst. Dieser Term wirkt vor allem bei hohen Biomassekonzentrationen, d. h., zum Ende der Kultivierung, wo sich die Alterung der Kultur am stärksten auswirkt. Zur Vereinfachung wurde für den Glukoseverbrauch nur Wachstum und kein Erhaltungsstoffwechsel angenommen. Der Parameter $F_{ZU,GLC}$ erfasst den Zulaufstrom der Glukosestammlösung, $F_{ZU,Y}$ den des Nährmedienkonzentrates. Das Reaktorvolumen wurde durch Zugaben ($F_{IN,GLC}$; $F_{IN,Y}$) als auch Entnahmen von Zellsuspension ($F_{OUT,R}$) und Probennahmen ($F_{OUT,RP}$) während des Prozesses beeinflusst (Glg. 4-33). Zugaben von Hemin, PenStrep und Antischaummittel wurden bei der Modellierung vernachlässigt, da sie über den gesamten Prozess nur 33,4 ml betragen. Weiterhin wurde das Kondenswasser in der Abluftkühlfalle nicht berücksichtigt (50 ml nach 70 h Kultivierung).

$$\text{Glg. 4-31: } \frac{d}{dt}(X) = \left(\mu(GLC; Y) - K_{X,D} - \frac{F_{IN,GLC} + F_{IN,Y}}{V_R} \right) * X$$

$$\text{Glg. 4-32: } \frac{d}{dt}(GLC) = \left(-\frac{\mu(GLC; Y)}{Y_{X/GLC}^*(t)} \right) * X - \left(\frac{F_{IN,GLC} + F_{IN,Y}}{V_R} \right) * GLC + \frac{F_{IN,GLC}}{V_R} (GLC_{ZU})$$

$$\text{Glg. 4-33: } \frac{d}{dt}(V_R) = F_{IN,GLC} + F_{IN,Y} - F_{OUT,R} - F_{OUT,RP}$$

Das Nährmedium stellt ein separates Substrat (Y) dar, welches äquivalent zur GLC bilanziert wird (Glg. 4-34). Jedoch muss in der Bilanz die Zugabe von unterschiedlichem Nährmedienkonzentrat berücksichtigt werden (Faktor $CF_Y = 4$ für $t < 33,5 \text{ h}$; $CF_Y = 6,25$ für $t \geq 33,5 \text{ h}$).

$$\text{Glg. 4-34: } \frac{d}{dt}(Y) = \left(-\frac{\mu(GLC; Y)}{Y_{X/Y}^*(t)} \right) * X - \left(\frac{F_{IN,GLC} + F_{IN,Y}}{V_R} \right) * Y + \frac{F_{IN,Y}}{V_R} (Y_{ZU} * CF_Y)$$

Wie oben bereits festgestellt, wurde die Verringerung der Raten μ und ν durch eine Inhibition des Nährmedienkonzentrates hervorgerufen. Berücksichtigung findet dies in einer erweiterten Monod-Kinetik mit Inhibitionsterm (Glg. 4-35). Der Parameter K_{Y_i} repräsentiert die Stärke der Inhibition. Für die Modellierung wurde ein willkürlicher Wert von 90 g/l angenommen. Die Modellanpassung erfolgte über die Variation von Y .

Glg. 4-35:
$$\mu(GLC; Y) = \mu_{\max} * \frac{GLC}{K_{S,GLC}^*(t) + GLC} * \frac{K_{Y_i}}{K_{Y_i} + Y}$$

Die nichtlinearen Differentialgleichungen des Prozessmodells wurden durch numerische Integration nach EULER gelöst, wodurch die Differentialquotienten durch Differenzenquotienten approximiert wurden. Die Schrittweite betrug 3,6 s (0,001 h). Das vollständige Programm für MATLAB[®] befindet sich in Anhang 6 [116]. Die Anfangswerte von μ , $Y_{X/GLC}$ und Y wurden durch lineare Regression geschätzt.

Für die Anpassung des Modells waren Korrekturen in $Y_{X/GLC}$ und K_S notwendig. Der K_S -Wert ist definitionsgemäß die Konzentration an Substrat, bei der μ auf $\frac{1}{2} \mu_{\max}$ abgefallen ist und beschreibt die Affinität des Mikroorganismus zum limitierenden Substrat. Wenn die Zellen morphologische Veränderungen durchlaufen, z.B. in Folge der Alterung der Kultur, kann die Affinität zum limitierenden Substrat beeinflussen werden. Im Modell wurde ein exponentieller Ansatz zur Veränderung von K_S angenommen, siehe Glg. 4-37.

Glg. 4-36:
$$K_{S,GLC}^*(t) = K_S(0h) * e^{b*t} \quad \text{mit } b = 0,055 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S(0h) = 0,046 \text{ g/l GLC}$$

$$0,046 \leq K_{S,GLC}^* \leq 2,16 \text{ g/l GLC}$$

Glg. 4-37:
$$Y_{X/GLC}^*(t) = Y_{X/GLC}(0h) * e^{a*t} \quad \text{mit } a = 0,002 \text{ h}^{-1}$$

$$Y_{X/GLC}(0h) = 1,14 \text{ g TBM/g GLC}$$

$$1,14 \leq Y_{X/GLC}^* \leq 1,31 \text{ g TBM/g GLC}$$

Der Ertragskoeffizient ist ein weiterer physiologischer Parameter, der bei $\mu = \mu_{\max}$ bestimmt wird. Es kann aber nicht vorausgesetzt werden, dass bei einer Abnahme von μ die Zellen die gleiche Menge an GLC verbrauchen. Bei der Modelanpassung zeigte sich, dass $Y_{X/GLC}$ durch eine exponentielle Funktion modifiziert werden musste (Glg. 4-37). Mit dem positiven Faktor „a“ würde dies bedeuten, dass die Zellen mit zunehmender Zeit mehr Biomasse pro eingesetzte Glukose bildeten. Dies ist kausal mit dem Zellmetabolismus nicht zu begründen. Die exponentielle Korrektur erfasst vielmehr eine Summe von möglichen Einflussgrößen. Beispielsweise könnte das konzentrierte Nährmedium die Messung der Glukose stärker beeinflussen als das „normal“ konzentrierte. Schwankungen zeigten sich auch bei der rechnerischen Ermittlung von $Y_{X/GLC}$ der einzelnen Phasen (siehe Tab. 4-12, S. 87). Trotz der Korrektur verändert sich $Y_{X/GLC}$ nur innerhalb eines sehr kleinen Definitionsbereiches.

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Die Variablen a und b wurden optimal geschätzt, wobei der Korrekturterm für K_S deutlich größer ist als für $Y_{X/GLC}$. Das Modell lieferte eine sehr gute Korrelation zu den Messwerten ($R = 0,995$ bezüglich X und $R = 0,95$ bezüglich GLC), siehe Abb. 4-42 und Abb. 4-43. Mit dem Modell wurde eine Produktivität von $0,108 \text{ g TBM/ (l}^*\text{h)}$ berechnet, was dem zuvor ermittelten Wert entspricht (S.86).

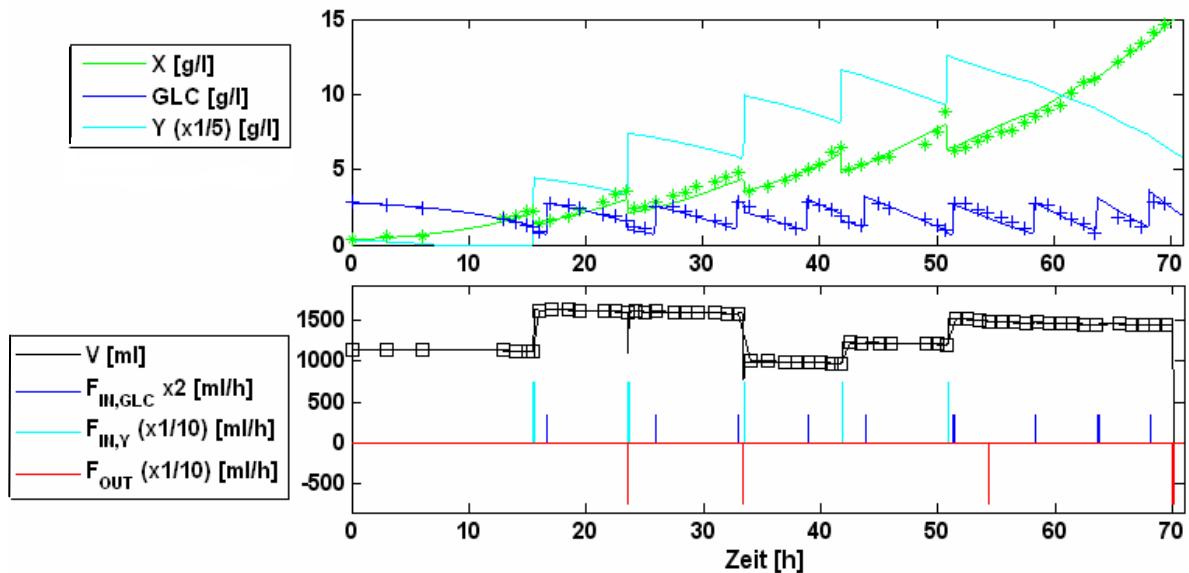


Abb. 4-42: Modellanpassung (1), FedBatch, wiederholte YE-Konzentrat-Zudosagen.

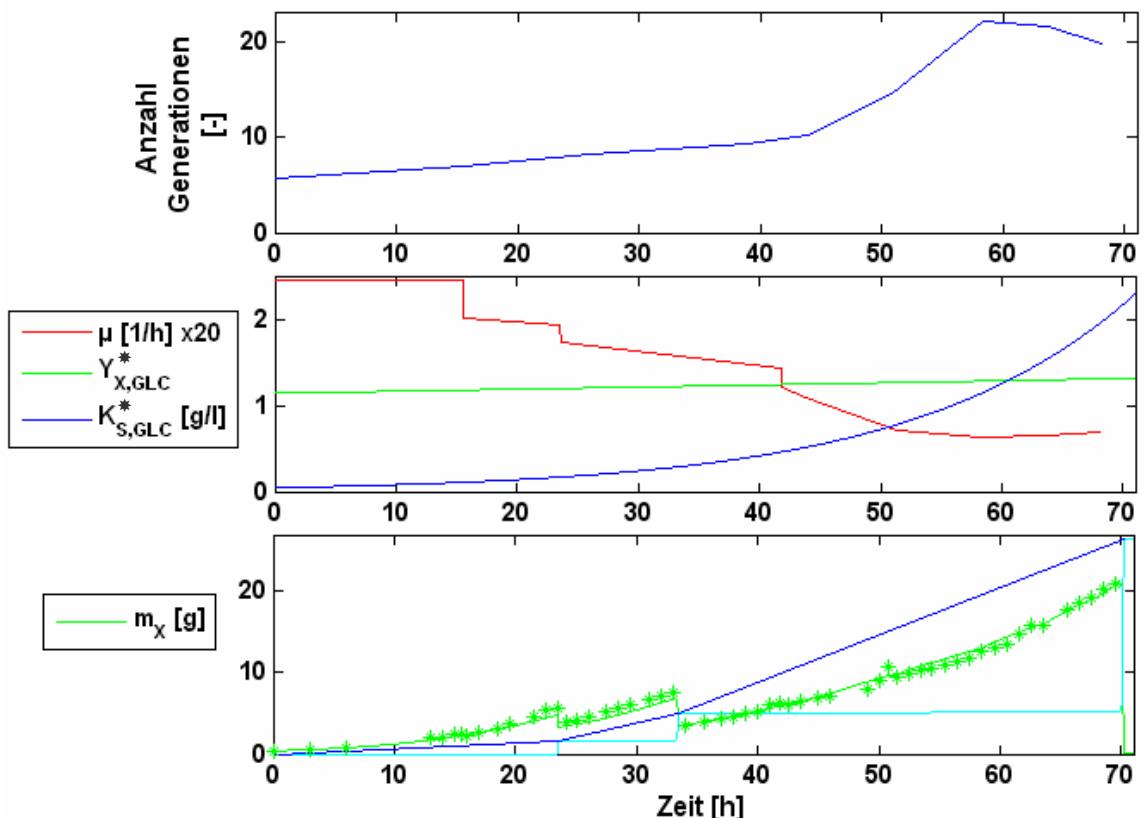


Abb. 4-43: Modellanpassung (2), FedBatch, wiederholte YE-Konzentrat-Zudosagen.

4.12 Strategien für das definierte Nährmedium

Für die definierten SFP-Medien wurde nach geeigneten Additiven und Maßnahmen zur Steigerung der bisherigen maximalen Zelldichte von $1,8 \times 10^8$ Zellen/ml gesucht. Aufgrund des guten Wachstums von *L. tarentolae* im YE-Medium wurde versucht, die wachstumsfördernden Substanzen daraus zu isolieren. Schließlich konnte eine Fraktion „Pool 5“ separiert werden. Da die Hauptinhaltsstoffe RNA oder DNA in dieser Fraktion waren, siehe 4.12.1, wurde nach einem handelsüblichen Produkt gesucht und der Effekt von Hefe-RNA (aus *S. cerevisiae*) auf das Wachstum von *L. tarentolae* untersucht [90].

4.12.1 Ausbeutesteigerung durch Fraktion „Pool 5“

Der wachstumsfördernde Effekt des YE-Mediums, besonders des darin enthaltenen Hefeextraktes wurde im Rahmen der Diplomarbeit von M. Sitz [79] genauer untersucht. Durch verschiedene Aufreinigungsschritte, wie Ultrafiltration (100 kDa und 10 kDa Membranen) und Anionenaustauschchromatographie (20 mM TRIS-Puffer, Elution mit 0,5 M NaCl, pH 7,2) wurde aus konzentriertem Hefeextrakt (96 g/l) eine Fraktion "Pool 5" eluiert. Ein Zusatz dieser Fraktion zum SFP(I)-Medium zeigte eine deutliche Verbesserung der Wachstumsparameter gegenüber dem reinen Medium.

Die biochemische Analyse dieser Fraktion, z. B. mit Proteinnachweis nach Bradford, Reverse Phase Chromatographie, Aminosäureanalyse, MALDI-TOF, Dünnschichtchromatographie und Agarosegelektrophorese, ergab, dass hauptsächlich Nukleinsäuren und sehr geringe Spuren (2-10 nmol/ml) an Aminosäuren (nach saurer Hydrolyse und Aminosäureanalyse) enthalten waren. Bei den Nukleinsäuren handelte es sich entweder um RNA oder DNA.

Diese Inhaltsstoffe und der wachstumsfördernde Effekt waren sehr überraschend, zumal die einzelnen Basen der Nukleinsäuren im SFP(I)-Medium enthalten waren. Problematisch an der Verwendung der Fraktion "Pool 5" war neben der zeitaufwendigen Herstellungsweise die Elution mit Hochsalzpuffer (20 mM TRIS; 0,5 M NaCl). Durch den hohen Salzgehalt konnte die Fraktion nicht unbegrenzt zugegeben werden, da die osmotischen Verhältnisse verändert und das Wachstum negativ beeinflusst wurden. Eine Umpufferung war zudem zeitaufwendig. Auch könnten Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen entstehen. Deshalb wurde nach einem kommerziell erhältlichen Produkt gesucht, woraufhin RNA von *S. cerevisiae* verwendet wurde. Der wachstumsfördernde Effekt konnte auch mit diesem Präparat beobachtet werden, siehe nachfolgenden Abschnitt.

4.12.2 Ausbeutesteigerung durch Hefe-RNA

Schüttelkolbenversuche

Der wachstumsfördernde Effekt von Hefe-RNA zeigte sich sowohl bei BSA-stabilisiertem als auch PEG-stabilisiertem Hemin Medium (SFP(I) und SFP(II)). Wie Abb. 4-44 verdeutlicht, bewirkte die Hefe-RNA eine verlängerte erste Wachstumsphase, verbunden mit einer höheren spezifischen Zellteilungsrate. Glukose wurde als primäre C- und Energiequelle genutzt und $Y_{X/GLC}$ betrug ca. 1 g TBM/ g Glukose. Der pH-Wert sank zu Beginn der ersten Phase um 0,15 pH-Einheiten im SFP(III)-Medium (PEG-Hemin+RNA), danach trat eine stetige Erhöhung auf. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen, die durchgängig eine Alkalisierung des Mediums zeigten (Abb. 4-9, S. 48). In Phase 2 wurde teilweise ein höheres ν erzielt.

Deutlich wird, dass mit Hefe-RNA signifikant höhere Zelldichten erzielt wurden. Im Schüttelkolben betrug $N_{max} = 2,8 - 3,3 \times 10^8$ Zellen/ml. Im Vergleich zu den Nährmedien ohne diesen Zusatz, siehe 4.1.4, bedeutet dies eine Verdopplung der Zelldichte (Faktor 1,8).

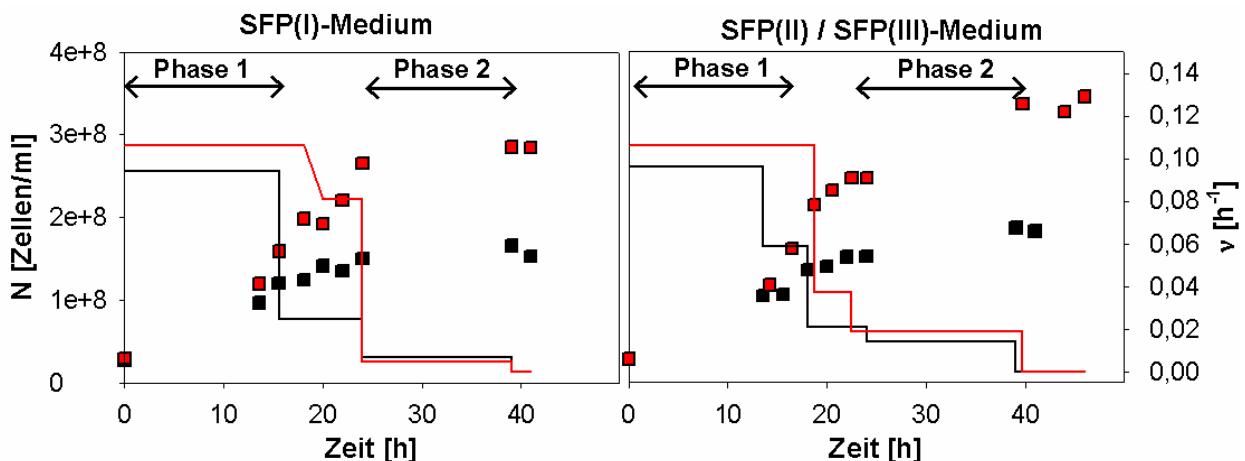


Abb. 4-44: Ausbeutesteigerung durch Zusatz von Hefe-RNA (77 mg/l) in den SFP-Medien. Darstellung von N (□) und ν (—) im Medium ohne RNA (schwarz) und mit RNA (rot). Schüttelkolbenmaßstab B (siehe 3.2, S. 21), 26°C. Die Ordinatenachsen gelten für beide Diagramme.

Darüber hinaus war interessant, ob höhere RNA-Konzentrationen in höheren Zelldichten resultierten. In der Abb. 4-45 wird deutlich, dass bei einer dreifachen RNA-Konzentration eine maximale Zelldichte von 5×10^8 Zellen/ml erzielt wurde. Dies entsprach einem Faktor von 2,7 gegenüber Medium ohne RNA. Jedoch wird auch deutlich, dass andere Komponenten des Mediums limitierten und somit keine höhere Ausbeute möglich war. Die optimale RNA-Konzentration kann mit 150 mg/l im SFP(III)-Medium angegeben werden. Höhere Konzentrationen erzielten nur geringfügig höhere Zelldichten. Ein Ertragskoeffizient (Zelldichte zu RNA) zu konnte nicht bestimmt werden, da die RNA beide Wachstumsphasen

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

beeinflusste und keine aussagekräftige RNA-Analytik verfügbar war. Allgemein verwendete Analysemethoden, wie beispielsweise die Optische Dichte bei 260 nm, konnte keine Anwendung finden, da das Nährmedium eine zu hohe Eigenabsorption besaß.

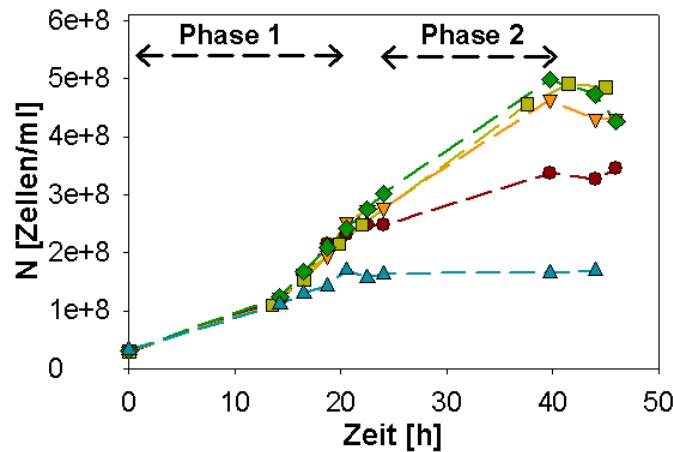


Abb. 4-45: Einfluss der RNA-Konzentration auf N, Einteilung in zwei Wachstumsphasen. RNA-Konz.: 0 mg/l (▲), 77,6 mg/l (●), 155,2 mg/l (▽), 181,1 mg/l (■) und 232,8 mg/l (◆).

Das generell beobachtete Absinken der spezifischen Zellteilungsrate von $0,1 \rightarrow 0,04 \text{ h}^{-1}$ (Phase 1 zu Phase 2) wurde durch die Anwesenheit von RNA nur verzögert, aber nicht unterbunden. Andere Substanzen im SFP(III) Medium limitierten. Der Versuch, die Rate durch ein Zuspiken von a) allen Vitaminen oder b) Folsäure/Riboflavin/Biotin (zur Ausgangskonzentration des definierten Mediums) zu halten, scheiterte. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig.

In dem SFP(II)-Medium sind die einzelnen Nukleinbasen Adenin, Guanin, Cytidin und Uracil enthalten. Thymin fehlt im Medium, jedoch ist im Allgemeinen eine Herstellung durch Methylierung des Uracils möglich. Zum Aufbau von Nukleinsäuren sind somit die notwendigen Quellen vorhanden, trotzdem wachsen die Zellen bei Anwesenheit der Hefe-RNA deutlich besser. Wahrscheinlich bevorzugen die Zellen Nukleoside oder Nukleotide vor den einzelnen Nukleinbasen. Weitere Versuche zeigten, dass die Zellen das Ribose-Rückgrad der RNA auch als C-Quelle nutzen können. Zellen, kultiviert in SFP(III)-Medium ohne Glukose, wachsen bei Anwesenheit von Hefe-RNA relativ identisch wie bei Anwesenheit von Hefe-RNA und Ribose ($\nu \approx 0,08 \text{ h}^{-1}$). Glukose ist weiterhin als primäre C-Quelle zu empfehlen, da die Zellen im Medium mit Glukose höhere Wachstumsraten aufweisen.

Bioreaktorkultivierung

In einer FedBatch-Fermentation wurde das definierte SFP(III)-Medium eingesetzt, um die Eignung des Mediums für die Bioreaktorkultivierung zu zeigen, den wachstumsfördernden Effekt der RNA zu untermauern, das μ möglichst lange zu halten und hohe Biomassedichten

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

mit einem rekombinanten Stamm zu erzielen. Zur Kultivierung wurde der SAG2-Stamm eingesetzt, welcher in Abschnitt 4.14, Seite 101 fortfolgende, genauer betrachtet wird. Der Stamm exprimierte konstitutiv das Zielprotein und eine Produktinhibition wurde vermutet.

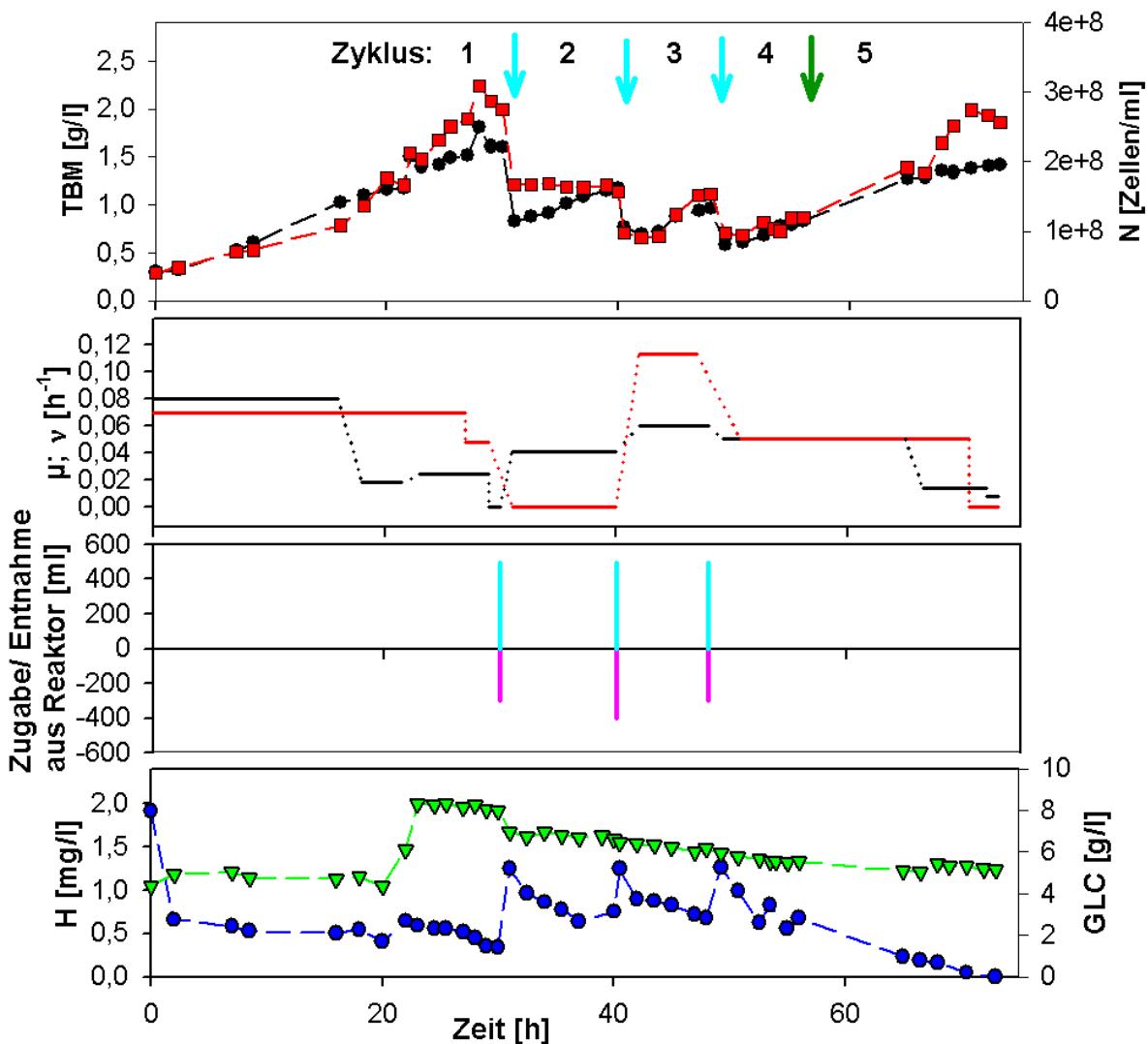


Abb. 4-46: FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen von SFP(III)-Medium, *L. tarentolae* SAG2-Stamm, X (●), N (■), μ (—), v (—), GLC (▽), Hemin (●) und Kennzeichnung der Zugabe von SFP(III)-Medium (↓, —), RNA-Stammlösung (↓) und der Entnahme von Zellsuspension (—).

Die limitierende Komponente im SFP(II)-Medium konnte nicht ermittelt werden. Die Zudosage eines Cocktails aus stark verbrauchten Aminosäuren, von Hemin, Insulin, α -Liponsäure, 3-Aminoquinolin, Phosphatsalzen des YE-Mediums oder Vitaminen des SFP(II)-Mediums brachten keinen Effekt [79]. Deshalb fand die Strategie einer Substitution von Zellsuspension durch das gesamte SFP(III)-Medium Anwendung. Es erfolgten dreimal Zugaben und Entnahmen von Medium, siehe Abschnitt 3.2, S. 22 und Tab. 3-4, S. 23. Somit gliederte sich die Fermentation in 4 Zyklen, wie sie in Abb. 4-46 gekennzeichnet sind. Die Zugaben erfolgten, wenn der Prozess begann, sich auf eine stationäre Phase einzulegen.

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

schwingen. Zu Beginn des 5. Zyklus wurde nur Hefe-RNA zu einer 0,5fachen Endkonzentration der sonst im SFP(III)-Medium üblichen Konzentration zugegeben. Die Produktbildung wird in Abschnitt 4.14, S. 107 betrachtet.

Glukose und Hemin wurden bei der Kultivierung unlimitiert gehalten (Abb. 4-46). Sehr vorteilhaft war die Verwendung der PEG-Hemin-Lösung, da durch die Antischaumwirkung des PEG1000 kein weiteres Mittel, z. B. Silikonöl, zugesetzt werden musste. Nach Zudosage des Mediums zeigte sich immer eine verstärkte Schaumbildung. Der Schaum war gefärbt durch das Hemin und löste sich allmählich im Nährmedium. Am Zyklusende war deutlich weniger und ungefärbter Schaum vorhanden.

Zum Ende des 1. Zyklus wurde eine Zelldichte von 3×10^8 Zellen/ml erzielt, siehe Abb. 4-46. Durch den Austausch des halben Arbeitsvolumens gegen neues Medium wurde N im Folgenden so stark verdünnt, dass diese hohen Zelldichten erst wieder am Ende der Fermentation erzielt wurden. Im gesamten Prozess wurden 5,6 Generationen gebildet.

Durch die Zugabe von neuem Nährmedium konnte das Wachstum reaktiviert werden (Zyklus 3 und 4). In Zyklus 2 zeigte sich überraschenderweise, dass die Optische Dichte zunahm und N konstant blieb. Bisher wurde eine solche Entwicklung nicht beobachtet, denn beim Umschalten auf Aminosäuren nahm N weiter zu und die OD blieb konstant. Die Ursache war eine morphologische Veränderung der Zellen, da diese viel dünner als beim Wachstum auf Glukose wurden (zum Vergleich siehe Abschnitt 4.2, S. 48, mit Abb. 4-10, S. 49). Somit müssten theoretisch die Zellen zwar dicker werden, was sich in der OD äußert, jedoch nicht zahlenmäßig zunehmen. In der Verteilung der Zellgröße zeigten sich jedoch keine eindeutigen Effekte. Da in diesem Zeitraum auch mehrere Proben bezüglich N und X vermessen wurden, kann ein Messfehler ausgeschlossen werden. An dieser Stelle wurde vermutet, dass die Zellbreite konstant blieb, aber die Zellen sich in ihrer Länge änderten, weshalb nur die OD und nicht die Zelldichte beeinflusst wurde.

Da einzelne limitierende Substanzen des Mediums nicht bekannt waren, wurde das vollständige SFP(III)-Medium ersetzt. Um zu überprüfen, ob die Hefe-RNA die limitierende Komponente war, erfolgte eine einmalige Zugabe von Hefe-RNA (Konzentration von 0,5x gegenüber SFP(III)-Medium). Wie der 5. Zyklus zeigte, konnte das Wachstum durch diese Zugabe reaktiviert werden. Damit wird untermauert, dass die Hefe-RNA das erneute Wachstum auslöste. Bei mehrfachen Zugaben würden aber natürlich andere Komponenten des Mediums limitierend wirken.

Die mikroskopischen Bilder in Abb. 4-47 zeigen, dass die Zellen im gesamten Prozess die promastigote Form behielten. Zu Beginn des ersten Zyklus entsprach die Geißellänge der

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Länge des Zellkörpers. In den nachfolgenden Zyklen wurden die Geißeln doppelt bis dreifach so lang. Zum Ende der Fermentation waren die Zellen sehr dünn.

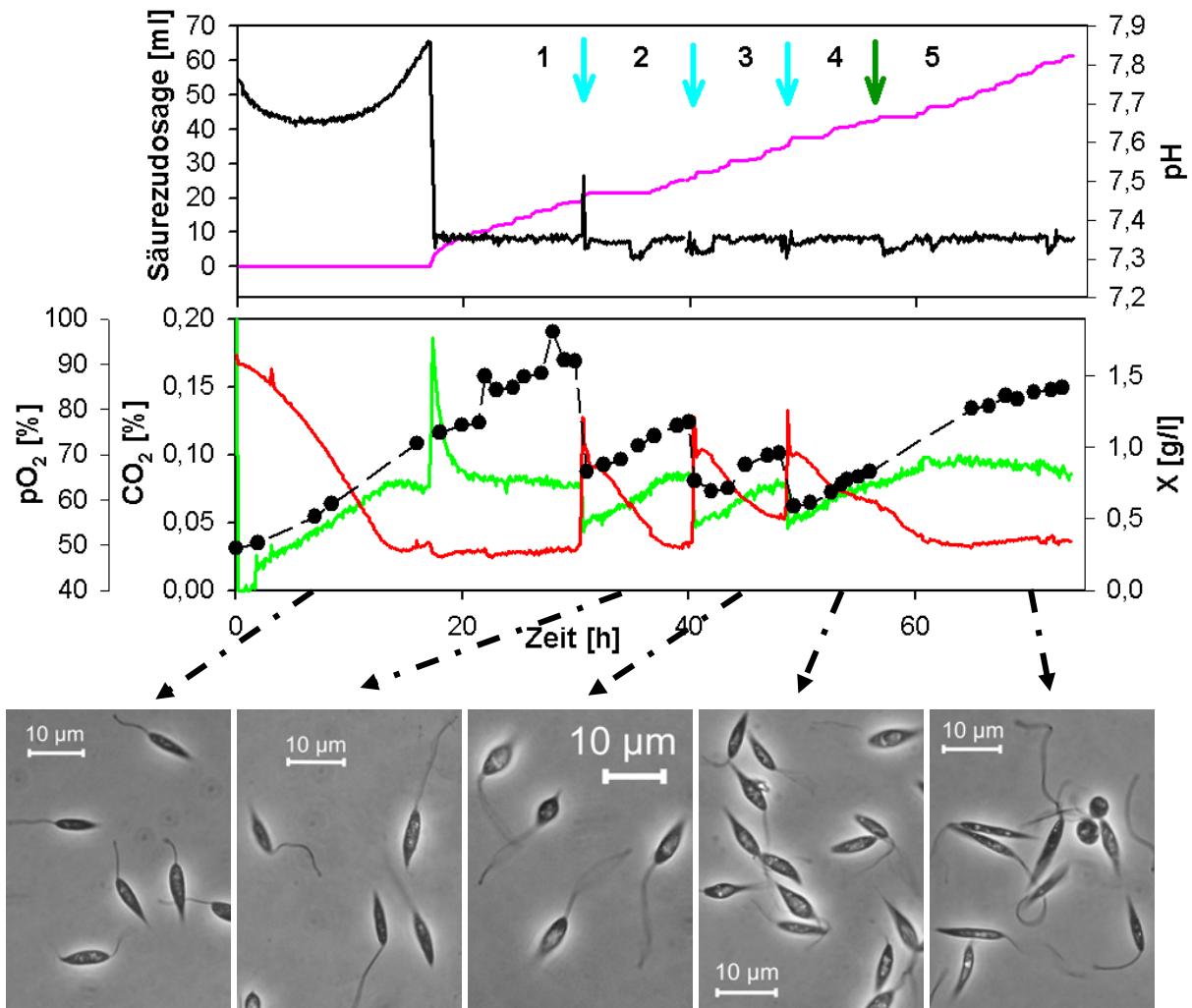


Abb. 4-47: Prozessparameter zur FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen an SFP(III)-Medium, mit pH (—), Zudosagevolumen von Säure zur pH-Regelung (—), pO₂ (—), X (●), CO₂-Anteil (—) und Markierung der Zyklen. Mikroskopische Aufnahmen zu entsprechenden Zeitpunkten (Pfeile) sind unterhalb gezeigt.

Die Prozessparameter dieser Fermentation sind im weiteren sehr interessant. Wie die Abb. 4-47 zeigt, war zur Regelung des pH-Wertes die Zugabe einer Säure erforderlich. Das Anschalten der Regelung (nach 17 h) führte zu einer Störung des CO₂-Wertes der Abluft. Das Wachstum der Zellen bewirkte eine Alkalisierung des Mediums, im Komplexmedium dagegen säuerten die Zellen das Medium an und eine Base musste zudosiert werden. Trotzdem verbrauchten die Zellen weiterhin Glukose.

Ein weiterer interessanter Aspekt zeigte sich bei Betrachtung des pO₂-Wertes des Mediums und des CO₂-Gehaltes der Abluft (Abb. 4-47). Wenn die Zellen auf die Medienzugabe durch Wachstum reagierten (repräsentiert durch X), dann sank der pO₂ und der CO₂ stieg. Das

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Einschwingen des Wachstums auf eine erneute stationäre Phase wurde auch in der pO_2 -und CO_2 -Kinetik abgebildet. Diese Effekte wiederholten sich in allen Zugabephasen, auch bei der Zudosage von reiner Hefe-RNA (Zyklus 5). In weiterführenden Untersuchungen wird zu überprüfen sein, ob dieser Effekt durch den Organismus *L. tarentolae* oder das spezifische Wirt-Vektor-System ausgelöst wurde.

Modellanpassung zur Bioreaktorkultivierung

Die vorherigen Untersuchungen belegen deutlich den wachstumsfördernden Effekt der Hefe-RNA. Die durchgeführte Fermentation wurde nun mit einem Wachstumsmodell unterlegt [115], indem neben GLC auch die RNA als limitierende Substanz erfasst wurde (Glg. 4-38). Die Modellierung erfolgt prinzipiell wie in Abschnitt 4.11.3, S. 89 beschrieben auf Grundlage der allgemeinen Differentialgleichungen eines FedBatch-Prozesses (Glg. 4-39 bis Glg. 4-42) ohne Berücksichtigung eines Biomassezerfalls bzw. -alterung. Zur Vereinfachung wurde wiederum der Erhaltungsstoffwechsel für den Glukoseverbrauch vernachlässigt. Der Parameter $F_{IN, GLC}$ erfasst den Zulaufstrom der Glukosestammlösung (GLC_{ZU_SL}), $F_{IN, RNA}$ den der RNA-Lösung (RNA_{SL}) und $F_{IN, SFP}$ den des SFP(III)-Mediums mit 77 mg/l RNA (RNA_{SFP}) und 5 - 6 g/l Glukose (GLC_{ZU_SFP}). Zugaben von Hemin, PenStrep und Antischaummittel wurden vernachlässigt. Das Reaktorvolumen wurde durch die Zudosagen und die Entnahmen von Zellsuspension ($F_{OUT, R}$) und Probennahmen ($F_{OUT, PR}$) beeinflusst. Das vollständige Programm für MATLAB[®] befindet sich in Anhang 7 [117].

$$\text{Glg. 4-38: } \mu(GLC; RNA) = \mu_{\max} * \frac{GLC}{K_S + GLC} * \frac{RNA}{K_{RNA}^*(t) + RNA}$$

$$\text{Glg. 4-39: } \frac{d}{dt}(X) = \left(\mu(GLC; RNA) - \frac{F_{IN, SFP} + F_{IN, GLC} + F_{IN, RNA}}{V_R} \right) * X$$

$$\text{Glg. 4-40: } \frac{d}{dt}(GLC) = \left(-\frac{\mu(GLC; RNA)}{Y_{X/GLC}} \right) * X - \left(\frac{F_{IN, SFP} + F_{IN, GLC} + F_{IN, RNA}}{V_R} \right) * GLC + \frac{F_{IN, GLC}}{V_R} (GLC_{ZU_SL}) + \frac{F_{IN, SFP}}{V_R} (GLC_{ZU_SFP})$$

$$\text{Glg. 4-41: } \frac{d}{dt}(RNA) = \left(-\frac{\mu(GLC; RNA)}{Y_{X/RNA}^*(t)} \right) * X - \left(\frac{F_{IN, SFP} + F_{IN, GLC} + F_{IN, RNA}}{V_R} \right) * RNA + \frac{F_{IN, SFP}}{V_R} (RNA_{SFP}) + \frac{F_{IN, RNA}}{V_R} (RNA_{SL})$$

$$\text{Glg. 4-42: } \frac{d}{dt}(V_R) = F_{IN, SFP} + F_{IN, GLC} + F_{IN, RNA} - F_{OUT, R} - F_{OUT, PR}$$

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

Zur Modellanpassung mussten $Y_{X/RNA}$ und K_{RNA} variiert werden (Glg. 4-43 und Glg. 4-44). Dabei zeigte sich, dass alternierende Werte zwischen einen relativ hohen und einen relativ niedrigen Wert eine gute Anpassung ermöglichen, siehe Tab. 4-13. Wiederum wurde ein exponentieller Ansatz gewählt.

Glg. 4-43: $Y_{X/RNA}^*(t) = Y_{X/RNA}(0) * e^{a*t}$ mit $a = 0,015 \text{ h}^{-1}$

$$9,8 \leq Y_{X/RNA}^* \leq 183 \text{ g TBM/g RNA}$$

Glg. 4-44: $K_{RNA}^*(t) = K_{RNA}(0) * e^{b*t}$ mit $b = 0,00001 \text{ h}^{-1}$

$$0,005 \leq K_{RNA}^* \leq 0,065 \text{ g/l RNA}$$

Tab. 4-13: Variation von $Y_{X/RNA}(0)$ und $K_{RNA}(0)$ über die Prozesszeit.

Prozesszeit [h]	$Y_{X/RNA}(0)$ [g TBM/ g RNA]	Prozesszeit [h]	$K_{RNA}(0)$ [g/l]
0 – 20	15	0 – 22	0,005
20 – 30,5	40	22 – 30,5	0,045
30,5 – 34	15	30,5 – 35,5	0,005
34 – 40,3	100	35,5 – 40,3	0,045
40,3 – 45	15	40,3 – 45	0,005
45 – 48,5	5	45 – 48,5	0,045
48,5 – 52,5	15	48,5 – 52,5	0,005
52,5 – 61,6	5	52,5 – 66,5	0,045
ab 61,6	25	ab 66,5	0,065

Das Modell liefert eine sehr gute Korrelation zu den Messwerten, ausgewiesen durch $R = 0,97$ bezüglich X und $R = 0,94$ bezüglich GLC, siehe Abb. 4-48 und Abb. 4-49. Mit dem Modell wurde eine Produktivität von $0,011 \text{ g TBM/ (l*h)}$ errechnet, welche 10mal kleiner ist als die Produktivität des zyklischen FedBatch-Prozesses mit YE-Medium (Abschnitt 4.11.3, S. 89).

Das Modell zum RNA-Verbrauch konnte durch Messwerte untermauert werden. Die RNA-Konzentration wurde über die Intensität der RNA-Bande im Vergleich mit einem Referenzwert in einem 1%igen Agarosegel qualitativ erfasst [115]. Natürlich sind diese Werte fehlerbehaftet. Trotzdem korrelieren sie relativ gut mit den Modellwerten. Beispielhaft ist ein Agarosegel in Anhang 8 gezeigt.

Ergebnisse – Teil C: Strategien zur Prozessführung

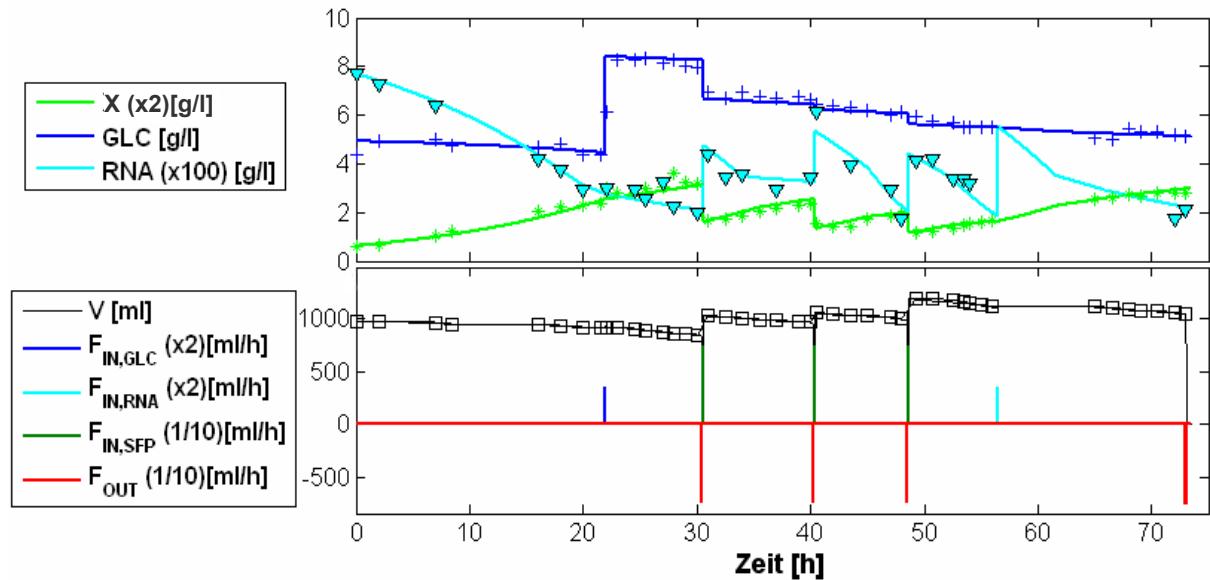


Abb. 4-48: Modellanpassung (1), FedBatch, wiederholte SPF(III)-Nährmedium-Zudosagen.

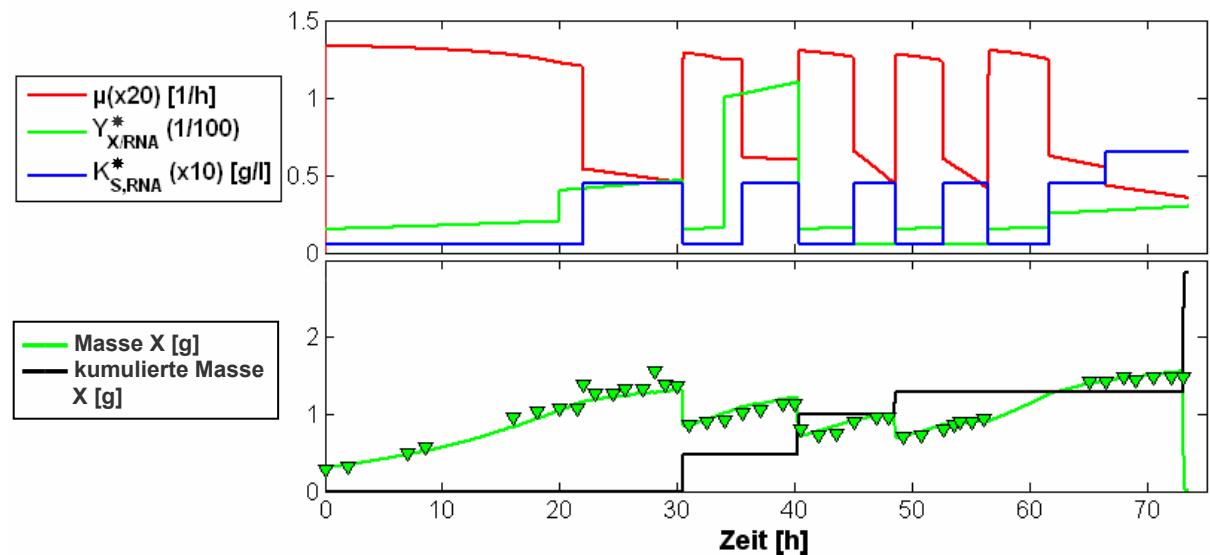


Abb. 4-49: Modellanpassung (2), FedBatch, wiederholte SPF(III)-Nährmedium-Zudosagen.

TEIL D: EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN

Die ermittelten Wachstumsparameter des Wildtyp-Stammes von *L. tarentolae* und die physiologischen Rahmenbedingungen sollen mit rekombinanten Stämmen verglichen werden. Insbesondere die Eignung der entwickelten Nährmedien für die Expression von rekombinanten Proteinen soll gezeigt werden.

4.13 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)

Das konstitutive System von *L. tarentolae*, siehe 1.3 S. 5, wurde zur heterologen Expression eingesetzt. Die Ziele waren der Vergleich der intrazellulären EGFP-Expression in den verschiedenen Komplexmedien und die Evaluation des YE-Mediums [86].

Tab. 4-14: Vergleich von μ und der EGFP-Bildung in komplexen Nährmedien. Bestimmung der EGFP-Konzentration und des spezifischen Gehaltes am Ende der exponentiellen Wachstumsphase durch SDS-PAGE und Proteinbestimmung nach Bradford, siehe 3.6, S. 30.

Medium	Standkultur		Schüttelkolben	
	μ [h ⁻¹] (über 43 h)	μ [h ⁻¹] (über ~20h)	EGFP-Konzentration [mg EGFP / 1 Kulturlösung]	Spezifischer EGFP-Gehalt [g GFP / g TBM]
BHI-Medium	0,051	0,076	119	0,10
TSB-Medium	0,032	0,068	17	0,04
TB-Medium	0,052	0,114	205	0,10
YE-Medium	0,052	0,115	195	0,10

Die Tab. 4-14 zeigt, dass der spezifische EGFP-Gehalt der Zellen im BHI-, TB- und YE-Medium identisch war und die Stabilität des Genkonstruktes bestätigt wurde. Eine deutlich geringere Produktbildung in Kombination mit einem verringerten μ wurde für TSB-Medium registriert, was die Ergebnisse für den Wildtyp-Organismus untermauern (zum Vergleich siehe 4.1.1, S.36). Die Eignung des YE-Mediums für die Produktexpression wurde bewiesen.

4.14 Oberflächenantigen (SAG2) von *Toxoplasma gondii*

Der rekombinante *L. tarentolae* exprimierte das Antigen SAG2 konstitutiv und sekretierte es in seine Umgebung. Da die Proteinkonzentration gering war, wurde SAG2 aus dem Nährmedienüberstand durch TCA-Fällung gewonnen (100fache Aufkonzentrierung). Wie die Abb. 4-50 zeigt, fand sich im Überstand des SAG2-Stammes eine deutliche Bande bei 19,7 kDa (Markierung durch Pfeil), welche durch den His₆-Tag mit Anti-His₆-Antikörpern im Western Blot erkannt wurde. Im Zellaufschluss war bei dieser Molekulargröße keine Bande zu erkennen. Wahrscheinlich war die Konzentration des SAG2 in der Zelle zu gering und unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Coomassie-Färbung (200 – 400 mg Protein pro

Ergebnisse – Teil D: Expression von rekombinanten Proteinen

0,5 cm Bande, [118]). Damit ist die erfolgreiche heterologe Expression des SAG2 im YE-Medium nachgewiesen.

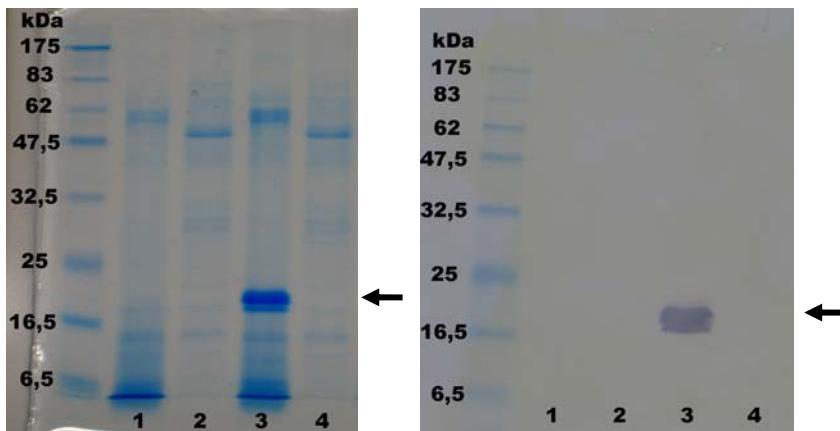


Abb. 4-50: Expressionsvergleich zwischen SAG2- und Wildtyp-Stamm mit SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts), Nährmedienüberstand (100x konzentriert) von 1) WT- und 3) SAG2-Stamm und der Zellaufschluss von 2) WT- und 4) SAG2-Stamm. Markierung der SAG2-Bande durch Pfeile, Standkultur, YE-Medium.

Expression von SAG2 im BHI- und YE-Medium

Im Weiteren wurde die Produktbildung genauer untersucht, indem der rekombinante Stamm im BHI- und YE-Medium kultiviert wurde. Die Gele des SDS-PAGE beider Nährmedienüberstände sind in Anhang 9 gezeigt. Da die Proben für den SDS-PAGE aufkonzentriert werden mussten, erfolgte die Auswertung über der Produktbildung über die relative Intensität (Erläuterungen siehe Abschnitt 3.6, S. 30). Für eine Proteinbestimmung nach Bradford waren die Konzentrationen des SAG2 zu gering und der Test wurde maßgeblich durch die Braunfärbung des Mediums gestört.

Wie der Vergleich in Abb. 4-51 zeigt, lagen zu Beginn der Kultivierung Raten von $\approx 0,1 \text{ h}^{-1}$ vor. Dies entspricht den Raten des Wildtyp-Stammes in Komplexmedien. Bei $X = 1,5 - 1,9 \text{ g/l TBM}$ (bzw. $N = 2,3 - 2,6 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$; 20,5 - 22,5 h Kultivierungszeit) sanken μ und ν auf $0,07 \text{ h}^{-1}$ ab, obwohl genügend Glukose vorhanden war ($>1,8 \text{ g/l}$) und andere Nährmedienkomponenten noch nicht limitieren konnten (entsprechend der Erkenntnisse mit dem WT-Stamm, siehe 4.1.3, S. 41). Der Übergang von Phase (1) zu (2) war durch einen stationären pH bzw. durch einen Sprung in dem pH gekennzeichnet. Wie die Produktkinetik in Abb. 4-51 belegt, nahm der SAG2-Anteil in dieser 2. Wachstumsphase drastisch zu und erreichte eine maximale relative Intensität zum Ende dieser Phase. In Phase (1) und (2) war die Zellgrößenverteilung im YE-Medium gleich, im BHI-Medium verringert sie sich.

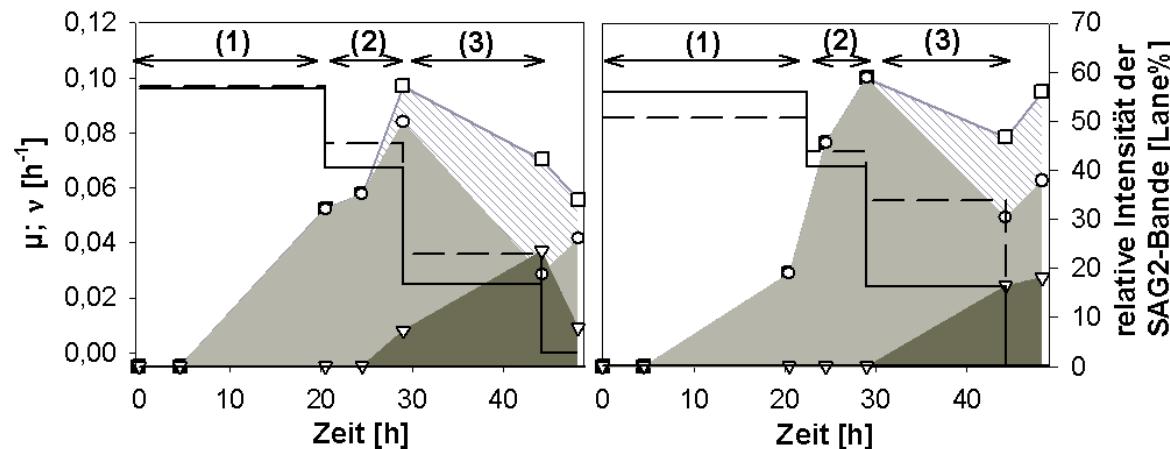


Abb. 4-51: Vergleich der Raten μ (—) und ν (---) mit der Expression des SAG2 im Nährmedienüberstand von BHI- (linkes Bild) und YE-Medium (rechtes Bild). Darstellung der relativen Intensität der SAG2-Hauptbande (\circ , ■), -Schattenbande (∇ , ■) und beider SAG2-Banden (\square , ■■). SDS-Gele siehe Anhang 9. Schüttelkolbenmaßstab C (siehe 3.2, S. 21). Die Ordinatenachsen gelten für beide Diagramme.

Bei der Betrachtung der SDS-Gele in Anhang 9 fällt auf, dass sich ab 24 h eine zweite Bande unterhalb der SAG2-Bande bildete. Diese war auch in Abb. 4-50 zu erkennen. Beide Banden wurden im Western Blot erkannt, was die Vermutung nahe legt, dass es sich um ein verkürztes SAG2 mit 6xHis-Tag handeln muss. Vielleicht stieg die Exoproteaseaktivität mit zunehmender Kultivierungszeit an. Deshalb ist in Abb. 4-51 eine Hauptbande und eine Schattenbande gezeigt, die in der Summe die Gesamtbande ergeben. Bei Betrachtung dieser relativen Gesamtintensität kann geschlussfolgert werden, dass die SAG2-Konzentration am Ende der Phase (2) in beiden Nährmedien gleich war.

Anschließend folgte die Wachstumsphase (3), die durch eine Glukose-Limitation gekennzeichnet war (zuerst im YE-Medium, dann im BHI-Medium). Der pH stieg infolge des Umschaltens im Metabolismus, siehe Tab. 4-15. Die Phase (3) endete mit $\mu = \nu = 0 \text{ h}^{-1}$ und die Zellen führten nur noch Erhaltungsstoffwechsel durch, wobei der pH-Wert weiter stieg. Die Produktkonzentration blieb in diesen Phasen im YE-Medium nahezu konstant, im BHI-Medium deutete sich ein Abbau an. Grundsätzlich nahm der Anteil der Schattenbande zu, was die Theorie des Abbaus durch Proteasen unterstützt. Da das SAG2 in das Nährmedium sekretiert wurde, kann während der Kultivierung einer Proteaseaktivität nicht entgegengewirkt werden. Eine frühzeitige Termination der Kultivierung (Ende der Phase (2)) und eine anschließende Zugabe von Proteasehemmern könnten den Produktverlust minimieren.

Tab. 4-15: Vergleich von $Y_{X/GLC}$, $Y_{N/GLC}$ und der pH-Änderung bei SAG2-Expression mit Gliederung in Wachstumsphasen, siehe Abb. 4-51. Negatives Vorzeichen bei ΔpH bedeutet eine Abnahme des pH, ein positives Vorzeichen eine Zunahme.

Wachstums- phase	BHI-Medium			YE-Medium		
	$Y_{X/GLC}$	$Y_{N/GLC}$	ΔpH	$Y_{X/GLC}$	$Y_{N/GLC}$	ΔpH
(1)	0,8	1,1 E+08	-0,60	0,9	1,2 E+08	-0,27
(2)	0,8	1,6 E+08	-0,23	0,7	5,9 E+07	-0,13
(3)	(—)	(—)	+0,21	—	—	+0,35

Expression von SAG2 in dem definierten Medium SFP(III)

Wesentlich bei der Nährmedienentwicklung war, ob das definierte Medium SFP(III) die Bildung des rekombinanten Proteins unterstützte. Dazu wurden zwei Schüttelkolben (A und B) zeitversetzt kultiviert und die Expression von SAG2 ermittelt [90]. Wie die Abbildung in Anhang 10 zeigt, war das Wachstumsverhalten in beiden Kolben identisch und die Auswertung konnte als Gesamtkinetik über beide Kolben erfolgen. Zu bemerken war, dass die Zellverteilung bei Kultivierungszeiten >60 h so stark in den Rauschbereich der Elektrode verschoben war, dass die Messwerte fehlerhaft waren und für die Auswertung nicht verwendet wurden. Außerdem zeigten die SDS-PAGE-Gele in diesem Bereich vermehrt Zellyse, siehe Abb. 4-52, Lane 8.

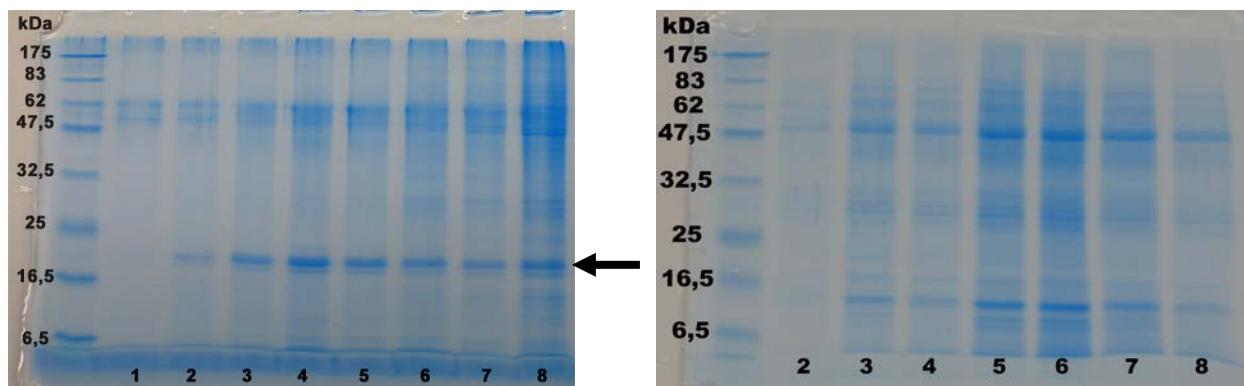


Abb. 4-52: SAG2-Expression in SFP(III)-Medium (Kolben A gezeigt). SDS-PAGE mit Nährmedienüberständen (100x) (links) und Zellaufschluss (rechts), (←) Markierung der SAG2-Bande. Lanes: Start der Kultivierung (1), nach 6 h (2), 22,75 h (3), 27 h (4), 30 h (5), 46,5 h (6), 52,5 h (7) und 70 h (8). Schüttelkolbenmaßstab C (siehe 3.2, S. 21).

Die SDS-PAGE-Gele belegen, dass eine Expression und Sekretion von SAG2 in dem definierten Medium SFP(III) möglich ist. Im Zellaufschluss waren Banden im Größenbereich von SAG2 vorhanden, die aber eine Intensität <1,7 Lane% hatten. Die Konzentration in der Zelle war zu gering für eine Detektion mit Coomassie Brillantblau. Eine Aussage bezüglich

der Effektivität der Sekretion kann wegen der unterschiedlichen Konzentrierung von Zellaufschluss und Nährmedienüberstand nicht getroffen werden.

Die Kinetiken von μ und ν in Abb. 4-53 zeigen, dass das Wachstumsverhalten des SAG2-Stammes in definierten Medium identisch zu den Komplexmedien (BHI und YE) war. Die drei Phasen waren zu erkennen und die Phase im Erhaltungsstoffwechsel (4) war ausgeprägter. Die 1. Phase war um 3 Stunden kürzer als im Komplexmedium. Beim Übergang zu Phase (2) lag eine Zelldichte von $1,2 \times 10^8$ Zellen/ml vor (0,8 g/l TBM), was deutlich geringer war als im Komplexmedium. Übereinstimmend war, dass in der 2. Phase die höchste SAG2-Konzentration vorlag und mit zunehmender Kultivierungszeit das Produkt langsam abgebaut wurde. Eine Konzentration von ≈ 20 Lane% wurde dabei nicht unterschritten.

Im Schüttelkolben wurden maximale Zelldichten von 3×10^8 Zellen/ml erzielt (2 g/l TBM). Die Veränderung des pH-Wertes war identisch zum Komplexmedium, siehe Tab. 4-15.

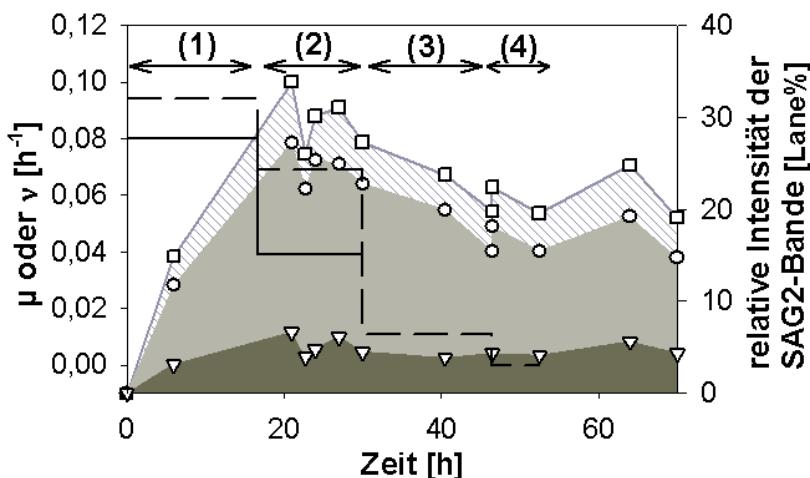


Abb. 4-53: Vergleich der SAG2-Expression in SFP(III)-Medium mit den Raten μ (—) und ν (---). Darstellung der relativen Intensität der SAG2-Hauptbande (O, ■), -Schattenbande (▽, □) und beider SAG2-Banden (□, ▨), Nährmedienüberstand, Schüttelkolbenmaßstab C (siehe 3.2, S. 21).

Ein quantitativer Vergleich der Expressionshöhen in den verschiedenen Medien stellte sich schwierig dar, da die Auswertung auf der relativen Intensität beruhte. Unterschiedliche Inhaltsstoffe beeinflussten diesen prozentualen Anteil. Deutlich wurde trotzdem, dass die Expression im Komplexmedium höher war als im definierten Medium, was der Sichtvergleich der SDS-PAGE-Gele belegte, siehe Abb. 4-52 und Anhang 9.

Auffällig war, dass die bereits im Komplexmedium beobachtete Schattenbande hier über die gesamte Kultivierungszeit mit einer annähernd konstanten Intensität auftrat. Hier lag wahrscheinlich eine basale Proteaseaktivität vor, die unabhängig von dem morphologischen Zellzustand war. Wenn eine Instabilität des SAG2 vorgelegen hätte, dann wäre das relative Verhältnis der Banden zueinander konstant und nicht die absolute Konzentration.

Expression und Downstream Processing von SAG2 im SFP(III)-Medium

Ziel weiterer Untersuchungen war es, das rekombinante SAG2 Protein aus dem Nährmedienüberstand zu gewinnen [90] und dessen Antigenität bezüglich IgG und IgM Antikörpern im ELISA zu testen. Der ELISA-Test wurde von dem Forschungszentrum fzmb GmbH durchgeführt, wo auch die Entwicklung des Tests erfolgte.

Der SAG2-Stamm wurde im SFP(III)-Medium für 29 h kultiviert und der Nährmedienüberstand durch Zentrifugation gewonnen, siehe Anhang 11. Die Aufreinigung erfolgte durch Metall-Affinitätschromatographie (IMAC), indem das His₆-getaggte, rekombinante Protein am Säulenmaterial immobilisiert und präparativ gereinigt wurde. Das Chromatogramm ist in Abb. 4-54 gezeigt. Das SAG2 eluierte als sehr kleiner Peak, was auf eine sehr geringe Proteinconzentration hindeutete.

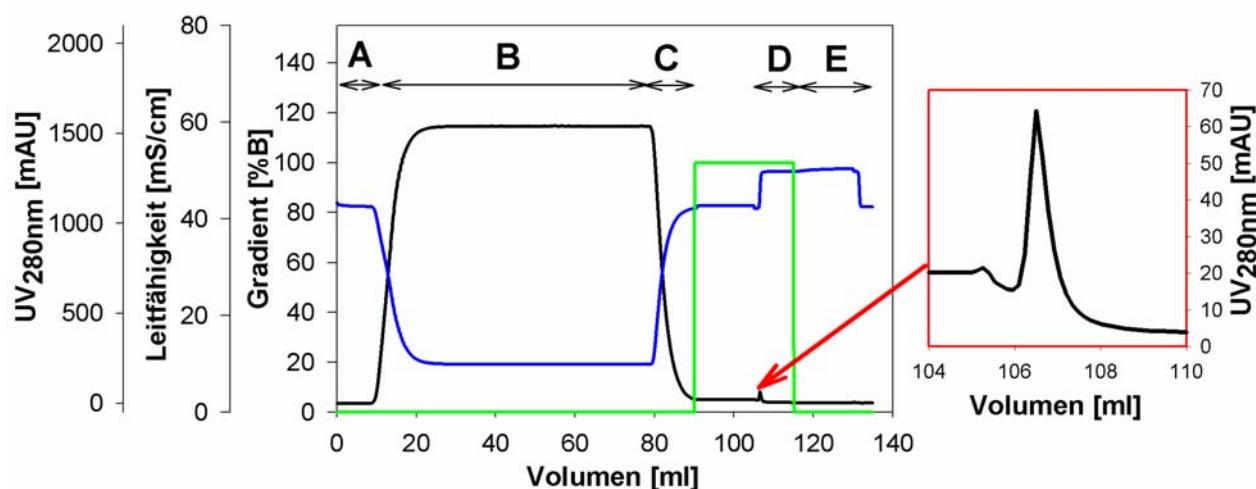


Abb. 4-54: Affinitätschromatographie zur Reinigung von SAG2, UV-Signal (—), Leitfähigkeit (—) und Pumpengradient mit Elutionspuffer (—). Prozessablauf mit A) Equilibrierung, B) Beladung, C) Waschen, D) Elution und E) Equilibrierung. Der Elutionspeak des SAG2 ist im rechten Bild vergrößert dargestellt. Ablauf der Methode und Pufferzusammensetzung, siehe Anhang 11.

Die verschiedenen Prozessstufen wurden im SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Abb. 4-55 zeigt, dass die Reinigung mit der HisTrap-Säule sehr effektiv war und alles SAG2 gebunden wurde. Die Reinheit des SAG2 betrug am Ende der Chromatographie ~80 Lane%. Wiederum waren eine Haupt- und eine Schattenbande des SAG2 zu detektieren.

Im Western Blot zeigte sich eine sehr dünne Bande bei ungefähr dem doppelten Molekulargewicht des SAG2. Diese Bande wurde zuvor nicht detektiert. Vielleicht handelt es sich um ein Dimer von SAG2 oder um unspezifisch gebundene Proteine, die durch den Chromatographieschritt aufkonzentriert wurden. Jedoch sind die Konzentrationen zu gering, um gefärbte Banden im SDS-PAGE zu erzeugen. Weitere Untersuchungen müssen folgen.

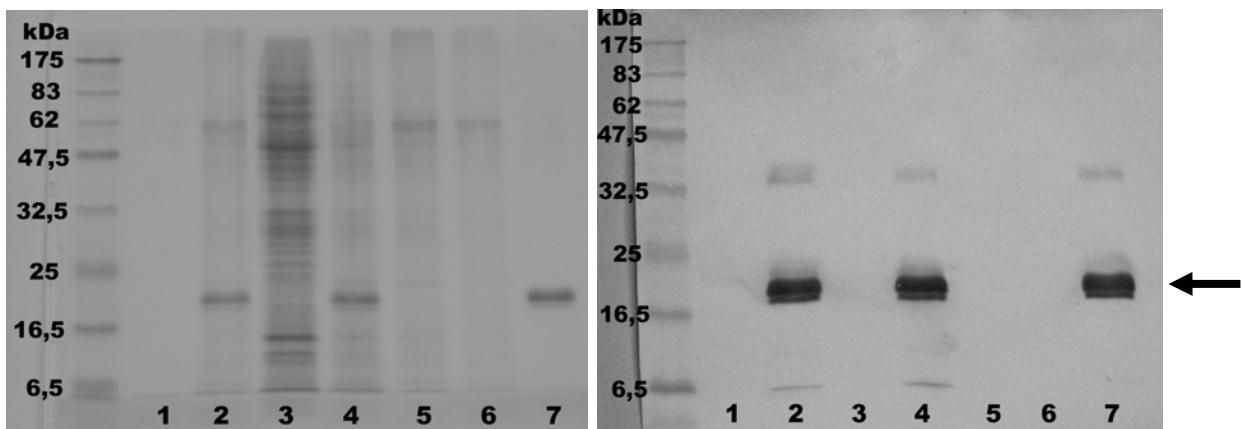


Abb. 4-55: SAG2-Expression im SFP(III)-Medium und Downstream Processing, nachgewiesen im SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts). Alle Proben außer der Zellaufschluss wurden 100x konzentriert, (←) Markierung der SAG2-Bande, Lanes mit Nährmedienüberstand zu Beginn (1) und am Ende (2) der Kultivierung, 3) Zellaufschluss und Proben der HisTrap-Säule mit 4) Beladung, 5) Durchlauf, 6) Waschen und 7) Elution.

Leider war keine Aussage zur Konzentration des SAG2 möglich, da die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.6, S. 30) durch das Imidazol im Elutionspuffer gestört wurde. Die Proteinkonzentration war zu gering, um eine signifikante Aussage über die Absorption bei 280 nm zu erhalten.

FedBatch-Fermentation mit SFP(III)-Medium

Im Abschnitt 4.12.2, S. 94 wurde eine FedBatch-Fermentation mit mehrfacher Zugabe von SFP(III)-Medium und Hefe-RNA beschrieben. In dieser Kultivierung wurde der SAG2-Stamm eingesetzt. Die Produktbildung wird in diesem Kapitel genauer betrachtet. Bisher wurde festgestellt, dass sowohl im Komplexmedium als auch im definierten Medium das v von $0,09 \rightarrow 0,07 \text{ h}^{-1}$ abfiel, obwohl die Medien genügend Nährstoffe für eine längere erste Wachstumsphase beinhalteten. Deshalb wurde eine Produktinhibition des konstitutiv exprimierten und sekretierten SAG2 vermutet. Dagegen lagen zum Ende der 2. Wachstumsphase Limitationen im Nährmedium vor. Um einer Toxizität entgegen zu wirken, wurde die Hälfte des Fermentervolumens gegen neues SFP(III)-Medium ausgetauscht. Ziel war es, die 2. Phase möglichst lange zu halten und dabei wichtige Prozessparameter zu verfolgen. Die Auswertung des Prozesses erfolgte in 4.12.2, S. 94.

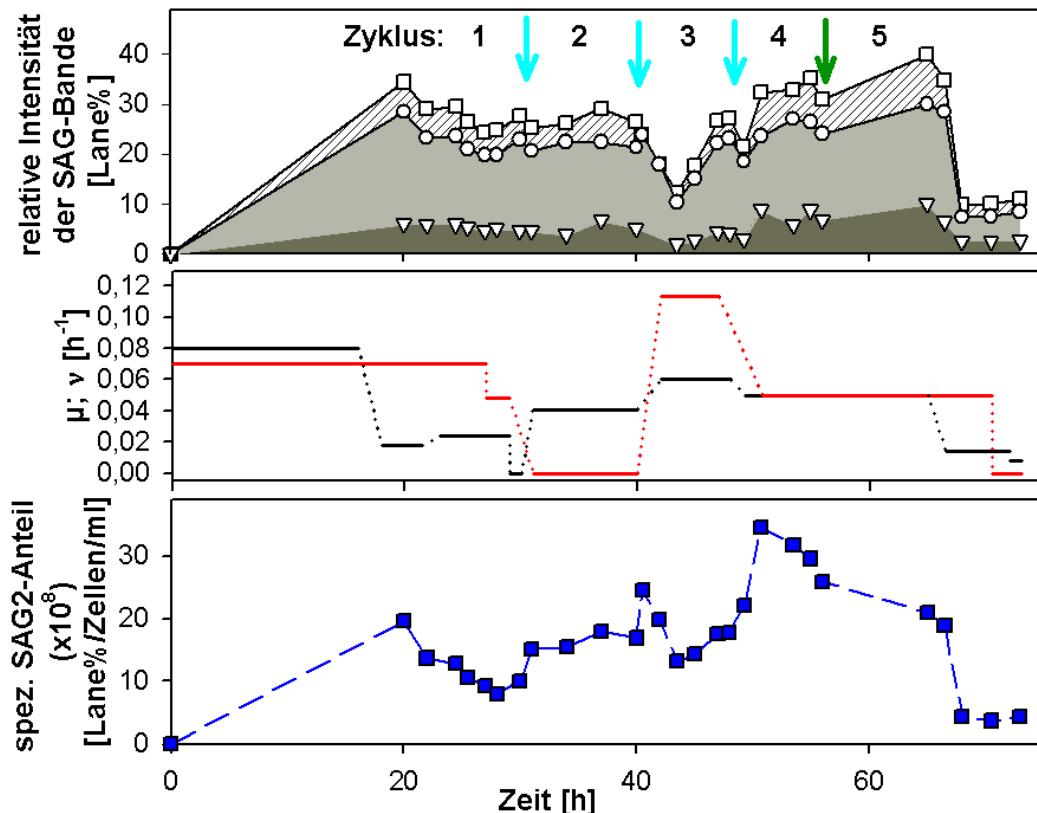


Abb. 4-56: Produktbildung bei der FedBatch-Fermentation mit wiederholten Zudosagen von SFP(III)-Medium, *L. tarentolae* SAG2-Stamm, siehe 4.12.2, S. 94, mit Kennzeichnung der Zugabe von SFP(III)-Medium (↓, —) und RNA-Stammlösung (↓, —). Darstellung der relativen Intensität der SAG2-Haupt- (O, ■), -Schatten- (▽, □) und beider SAG2-Banden (□, ▨), von μ (—), v (—) und des spezifischen SAG2-Gesamtanteils (■). Bestimmung der relativen Intensität siehe 3.6, S.30.

Die Produktbildung folgte nicht dem exponentiellen Wachstum, sondern die Produktkonzentration war nahezu konstant über weite Bereiche der Fermentation (Abb. 4-56). Dementsprechend nahm der spezifische SAG2-Anteil pro Zelle tendenziell ab, außer im Zyklus 2, wo N annähernd konstant blieb. Eigentlich sollte das Produkt zu den Zeitpunkten der Entnahme und Zugabe von Nährmedium verdünnt werden. Der starke Konzentrations-einbruch in Zyklus 3 wurde wahrscheinlich durch einen fehlerhaften Wert verursacht. Weiterhin trat wieder die Schattenbande mit einem konstanten Anteil auf.

4.15 Hyaluronidase (Hyal-1)

Das Gen für humane Hyaluronidase-1 (*hyal-1*) wurde zuerst in einen konstitutiv sekretierenden Stamm von *L. tarentolae* kloniert (*L. tarentolae* p10:6058#1). Die Arbeiten wurden von Regina Pietrucha (Jena Bioscience GmbH) durchgeführt. Nachdem der Stamm von der Agarplatte in die Standkultur überführt wurde, konnte eine Proteinbande im Western Blot durch Anti-His₆-Antikörper im Bereich der erwarteten Molekulargröße nachgewiesen werden. Jedoch verschwand die Produktbildung mit der Kultivierung und Überimpfung des

Ergebnisse – Teil D: Expression von rekombinanten Proteinen

Stammes. Die Sequenzierung der Insertregion des Vektors brachte eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenz. Das in das Genom integrierte *hyal-1* Gen konnte durch PCR nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass eine Produktinhibition vorlag und dies zu einer Herunterregulierung der konstitutiven Genexpression führte.

Abhilfe sollte die Verwendung eines neuen, induzierbaren Systems schaffen, welches das Fremdgen in die hochexprimierte *odc*-Region des *Leishmania* Genoms integrierte. Der induzierbare, sekretorische Hyal-1-Stamm wurde durch Elektroporation und anschließender Selektion mit Antibiotika auf Agarplatten hergestellt, wie im Anhang 12 beschrieben. Die integrierte Genkassette des Hyal-1-Stammes ist in Abb. 4-57 gezeigt. Bei einer erfolgreichen Integration wurde neben dem Zielprodukt auch das Blecherry-Protein gebildet - ein Fusionsprotein aus dem Bleomycin-Resistenzprotein und einem Fluoreszenzfarbstoff. Diese Co-Expression färbte die *Leishmania* Kolonien rot, ermöglichte eine leichte Selektion der Klone und eine sofortige Detektion der Expression über die Fluoreszenz.

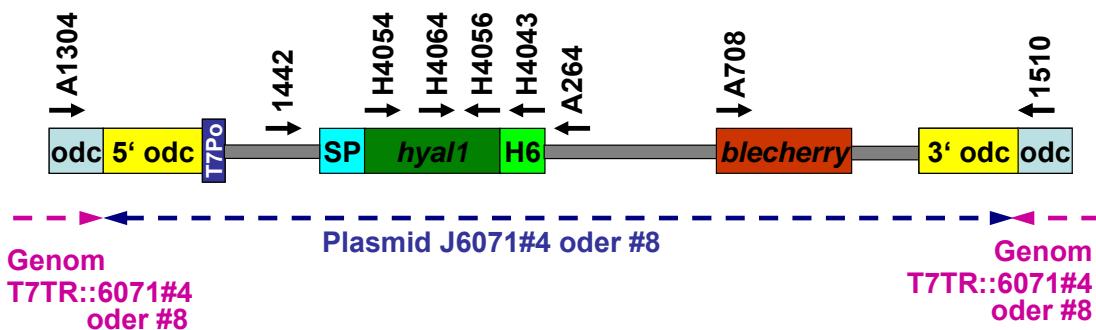


Abb. 4-57: Schematische Darstellung der Expressionskassette 6071 mit dem Gen für Hyaluronidase-1 (*hyal-1*). Die Primerbezeichnung mit Leserichtung ist oberhalb dargestellt, unterhalb die Zugehörigkeit der Genabschnitte zum Plasmid oder Genom. Abkürzungen: *odc* – stark exprimierte Genregion, T7Po – T7-Polymerase, SP – *Leishmania* spezifisches Signalpeptid, H6 – His₆-Tag, blecherry – Gen für roten Fluoreszenzfarbstoff und Resistenz.

Nachdem einzelne Kolonien von der Agarplatte in Standkulturen überführt wurden, siehe Anhang 12, S. 161, wurde die Fluoreszenz der Kulturen kontrolliert, siehe Abb. 4-58. Die Induktion war erfolgreich, da stark erhöhte Fluoreszenzen (Faktor 12-19) gegenüber dem nicht induzierten Hyal-1-Stamm gemessen wurden. Vier Klone mit der höchsten Fluoreszenz wurden anschließend auf ihre Hyal-1-Expression im SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abb. 4-59). Der Western Blot verdeutlicht, dass wahrscheinlich Hyal-1 von *L. tarentolae* gebildet und in das Nährmedium sekretiert wurde. Da keine Anti-Hyal-1-Antikörper vorhanden/erhältlich waren, konnte nur die Anwesenheit des His₆-Tags nachgewiesen werden. Leider war die Expression der Hyal-1 sehr gering. Im SDS-PAGE konnte keine Bande eindeutig zugeordnet werden. Wegen der Konzentrationen an der Nachweigrenze zeigten sich wahrscheinlich keine Banden für die Klone #8-2 und #4-5 im Western Blot.

Ergebnisse – Teil D: Expression von rekombinanten Proteinen

Auffällig war, dass im Zelllysat zusätzliche Banden auftraten, was die Anwesenheit von verschiedenen Proteinen mit Histidin-Sequenzen vermuten lässt.

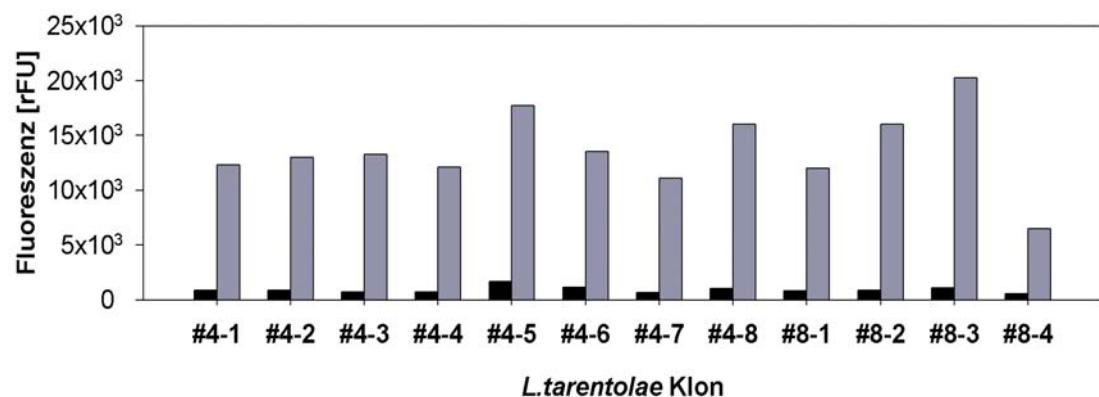


Abb. 4-58: Relative Fluoreszenz der *L. tarentolae* Klone nach Überführung in die Standkultur und Induktion über 3 Tage. Anregungswellenlänge: 590 nm, Emissionswellenlänge: 620 nm, FLUOstar Galaxy (BMG Laboratories). Als Blindwert diente der WT-Stamm.

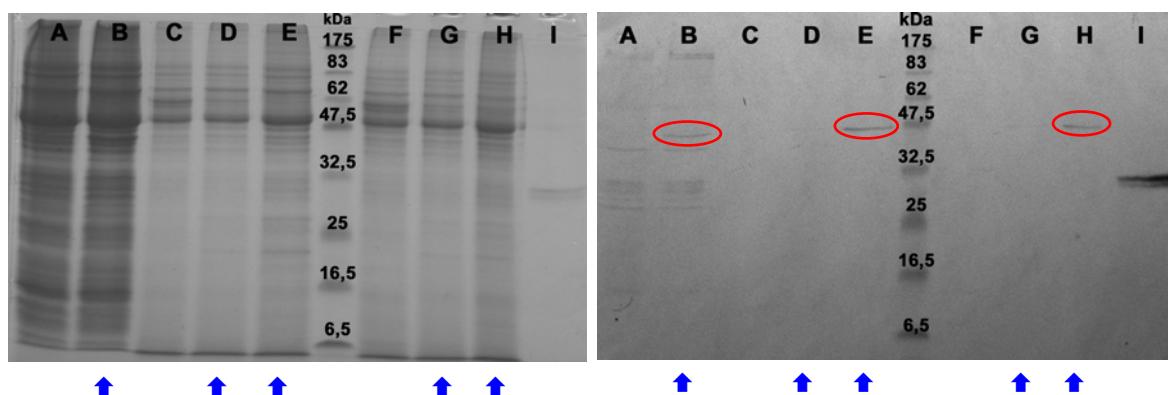


Abb. 4-59: SDS-PAGE (linkes Bild) und Western Blot (rechtes Bild) zur Kontrolle der Hyal-1-Expression verschiedener *L. tarentolae* Stämme. Induktion der Produktbildung durch Tetracyclinzugabe bei den mit blauen Pfeilen markierten Kulturen. Aufgetragen wurden zum einen die Zelllysate des Stammes #8-2 in den Lanes A) und B), zum anderen 100fach konzentrierte BHI-Nährmedienüberstände: C) und D) Stamm #8-2, E) Stamm #8-3, F) und G) Stamm #4-5 und H) Stamm #4-8. In die Lane I) wurde ein Protein mit His₆-Tag als Positivkontrolle für den Western Blot geladen. Nachweis der Hyal-1 über den His₆-Tag mit Anti-His₆-Antikörpern. Markierung der Banden mit roten Kreisen, die wahrscheinlich der Hyal-1 entsprechen.

Die 4 ausgewählten Klone wurden als Standkulturen geführt und passagiert. Nach 10 Tagen wurde die Induktion der Produktbildung in der Standkultur mit anschließendem Western Blot wiederholt. Die Bildung des Blecherry-Farbstoffes resultierte wieder in einer gestiegenen Fluoreszenz (Faktor 20-25). Im Western Blot konnte jedoch keine Banden im Größenbereich der Hyal-1 detektiert werden. Weiterführende Untersuchungen mit Aufkonzentrierungsschritten durch Affinitätschromatographie und TCA-Fällung zeigten eine dünne Hyal-1-Bande im Zellaufschluss, jedoch nicht im Nährmedienüberstand.

Ergebnisse – Teil D: Expression von rekombinanten Proteinen

Grundsätzlich musste nun geklärt werden, ob das *hyal-1*-Gen richtig in das Genom integriert wurde und ob wirklich eine Hyal-1-Expression vorlag, was nur durch einen spezifischen Test bewiesen werden konnte. Als Erstes konnte die korrekte und vollständige Integration der Expressionskassette mit dem *hyal-1*-Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gezeigt werden, siehe Abb. 4-60. Zum einen wurde durch die Verwendung des genspezifischen Primers H4056 die Anwesenheit des *hyal-1*-Gens nachgewiesen, zum anderen die korrekte Orientierung der Expressionskassette innerhalb des *odc*-Locus (genomische Primer: A1304 und 1510).

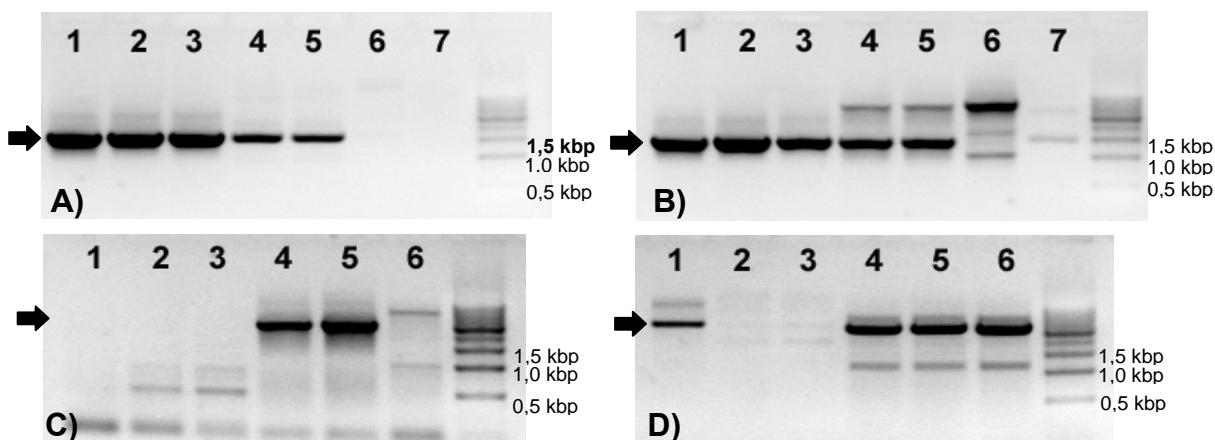


Abb. 4-60: Kontrolle der genomischen Integration des *hyal-1* Gens durch PCR und Auftrennung im 1%igen Agarosegel. A) Primer P1442 / A264, B) Primer P1442 / H4056, jeweils korrektes Fragment in 1-5 (Pfeile). C) Fragment in 4 und 5, da Verwendung des genspezifischen Primers H4056 (+A1304). D) korrektes Fragment in 1, 4-6, Primer A708 / 1510. Proben: 1) Plasmid J6058; 2) Plasmid J6071#4; 3) Plasmid J6071#8; 4) Genom T7TR::6071#4-5; 5) Genom T7TR::6071#8-3; als Negativkontrollen: 6) Genom J6042 und 7) Plasmid J6042. PCR-Führung mit 30 s Annealing bei 55°C und 2-3 min Elongation (68°C), Eppendorf Mastercycler.

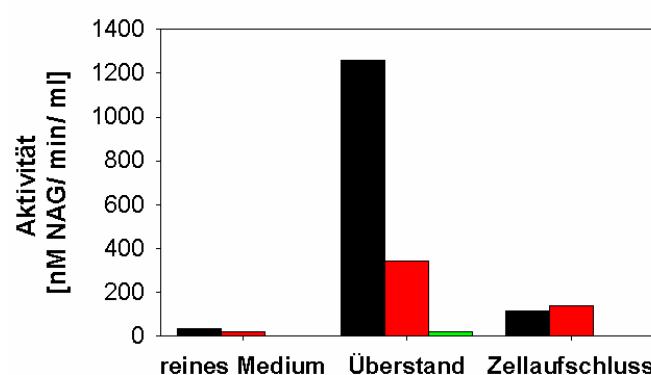


Abb. 4-61: Vergleich der Hyaluronidase-Aktivität zwischen Hyal-1-Stamm, kultiviert in BHI- (■) oder YE-Medium (■), und WT-Stamm (■). Kultivierung als Standkultur über 3 Tage, Induktion der Produktbildung bei Beimpfung, $N_{max} = 3,4 \times 10^8$ Zellen/ml (BHI), $N_{max} = 2,9 \times 10^8$ Zellen/ml (YE). Die Aktivität bezieht sich auf „ml Nährmedienüberstand“ oder „ml Zellaufschluss“.

Ergebnisse – Teil D: Expression von rekombinanten Proteinen

Aufklärung über die Hyal-1-Expression konnte nur ein spezifischer Nachweis der Enzymaktivität bringen. Hyaluronidase spaltet Hyaluronsäure durch Hydrolyse und erzeugt Oligosaccharide mit N-Acetyl-D-Glucosamin-Resten, welche colorimetrisch durch Anwendung der Morgan-Elson-Reaktion nachgewiesen werden können. Dieser Enzymtest ist etabliert für den Nachweis von Hyaluronidase [84].

Die Abb. 4-61 zeigt deutlich die Hyaluronidaseaktivität im Nährmedienüberstand des Hyal-1-Stammes. Der Wildtyp-Organismus zeigte keine Aktivität. Im BHI-Überstand war eine 10mal höhere Aktivität als im Zellaufschluss zu messen, beim YE-Überstand jedoch nur doppelt so viel. Im BHI-Medium wurde mehr Hyal-1 produziert, sekretiert und höhere Zelldichten erzielt.

Weiterhin wurde deutlich, dass die Nährmedien eine Basalaktivität erzeugten. Dies war nicht auf eine Hyal-1-Aktivität zurückzuführen, sondern auf eine Störung der Farbreaktion durch Bestandteile der Nährmedien. Diese Einflüsse waren gering im Vergleich zur Aktivität der Hyal-1-Stämme. Die Enzymaktivität wurde bei pH 3 gemessen. Die gleichen Probenansätze erzeugten bei pH 6 keine Farbreaktion. Dies stimmt mit bisherigen Untersuchungen überein, die das pH-Optimum der Hyaluronidase mit pH 3 - 4 angeben [61].

5 Diskussion

Die Untersuchung des biotechnologischen Potentials des *L. tarentolae* Expressionssystems ist das Hauptziel dieser Arbeit. Für eine optimale Kultivierung von *L. tarentolae* ist es entscheidend, die wichtigsten statischen und dynamischen Prozessparameter des Wirts-Vektor-Systems zu identifizieren. Um *L. tarentolae* auch als Produktionssystem zum Einsatz zu bringen, ist die Erzielung von hohen Zelldichten unerlässlich. Voraussetzung dafür ist die Bioreaktorkultivierung und optimierte Prozessparameter und –bedingungen.

Wirts-Vektor-Systeme zeigen meist veränderte Wachstumsparameter im Gegensatz zum Wildtyp-Organismus, weshalb die Übertragung und Überprüfung gewonnener Ergebnisse auf spezielle Systeme ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit ist.

5.1 Ermittlung statischer Prozessparameter

Nährmedienentwicklung

Der wichtigste statische Prozessparameter ist das Nährmedium, welches zur Kultivierung eingesetzt wird. Nur mit einem geeigneten Nährmedium können hohe Wachstums- bzw. Zellteilungsraten und hohe Zelldichten erzielt werden. Bisher wurden nur mit Komplexmedium hohe Zelldichten (im Bereich von 10^8 Zellen/ml) der *Leishmania* Spezies erreicht (Tab. 1-3, S. 12). Nachteilig war jedoch, dass die verwendeten Medien hohe Anteile von Substanzen tierischen Ursprungs enthielten, wie beispielsweise das BHI-Medium. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *L. tarentolae* in verschiedenen Komplexmedien kultivierbar ist und die Medien in ihren Anteil an „animal-derived“ Substanzen reduziert werden konnten. Zusätze aus tierischen Quellen bergen immer die Gefahr einer Kontamination mit Viren und Prionen. Ein Nährmedium, das nur noch Hemin als Substanz tierischen Ursprungs enthält, wurde mit dem YE-Medium entwickelt. Die Hauptkomponente BactoTM Yeast Extract wird als „animal-free“ betrachtet [89]. Mit diesem Nährmedium können erstmals wichtige regulatorische Anforderungen für einen Produktionsprozess berücksichtigt werden, denn Nährmedien frei von „animal-derived“ Substanzen sind vorgeschrieben [1]. Damit wurde eine Grundvoraussetzung für die Nutzung von *L. tarentolae* als Expressionssystem für rekombinante Proteine zur therapeutischen oder diagnostischen Anwendung geschaffen.

BactoTM Yeast Extract ist ein Konzentrat der gesamten wasserlöslichen Fraktion von autolysierten Hefezellen (*S. cerevisiae*) [89]. Der Gehalt an Vitaminen der B-Gruppe, an Stickstoff, Kohlenstoff und Aminosäuren ist sehr hoch. Normalerweise wird Yeast Extract in der mikrobiologischen Kultivierung von Bakterien, Hefen, Zell- und Insektenkulturen

Diskussion

eingesetzt. In diesem Nährmedium kann *L. tarentolae* stabil und reproduzierbar mit Verdopplungszeiten von 6,7 h kultiviert werden ($\mu_{\max} = 0,103 \text{ h}^{-1} \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$). Das YE-Medium ist relativ einfach und preiswert herzustellen.

Kushnir *et al.* [26] berichteten von Verdopplungszeiten von ca. 5 h, ohne diese mit Daten zu belegen. Unter der Berücksichtigung, dass *L. tarentolae* wahrscheinlich bei 26°C kultiviert wurde, kann es sich nur um einen Ausreißerwert handeln. In den vorliegenden Untersuchungen wurden auch unter optimalen Bedingungen im Mittel höhere Verdopplungszeiten gemessen, ausgenommen bei der erhöhten Kultivierungstemperatur.

Die *Leishmania* Spezies wird laut Literatur vorwiegend als stehende Suspensionskultur kultiviert (Tab. 1-3, S. 12). Die Untersuchungen zeigten, dass sich eine Kultivierung als Submerskultur im Schüttelkolben progressiv auf die Wachstumsparameter auswirkte. Auch ist eine Kultivierung in einer gerührten Umgebung mit aktiver Begasung im Bioreaktor möglich.

Von außerordentlicher Wichtigkeit ist Stabilität der Kultivierung. Die Verifizierung des stabilen Wachstums über 50 Passagen in der Standkultur war essentiell und gab den Daten aus Schüttelkolbenversuchen und Fermentationen ein wissenschaftlich tragfähiges Fundament, da die Zellen der Standkultur zur Beimpfung verwendet wurden. Die Glaubwürdigkeit der daraus ermittelten Wachstumsparameter wird untermauert. Ein stabiles Wachstum in der Standkultur konnte für über 50 Passagen im YE-Medium nachgewiesen werden. Damit sind konstante Anfangsbedingungen für größere Kultivierungsmaßstäbe gewährleistet. *L. tarentolae* kann somit für ca. ein halbes Jahr problemlos kultiviert werden.

Der spontane Einbruch des Wachstums bei Passagenzahlen >50 wurde mehrfach beobachtet für das YE- und TB-Medium. Laut Aussage von Dr. Breitling (Jena Bioscience GmbH) ist dies bei seiner Kultivierung in BHI-Medium nicht aufgetreten (>300 Passagen). Dies wurde jedoch nicht im Detail untersucht und mit Daten untermauert. Da sich auch in der Literatur der Hinweis findet, dass „eine neue Kultur immer nach einigen Wochen aus einem gefrorenen Stock gestartet werden sollte, um kultivierungsinduzierte Veränderungen zu vermeiden [31]“ (“To avoid cultivation-induced changes, new cultures should be started from a frozen stock every few weeks.”), wird an der Faustregel mit 50 Passagen festgehalten. So konnten auch rekombinante Stämme mit konstitutiver Expression stabil kultiviert werden.

In Hinblick auf einen Produktionsprozess ist zu prüfen, ob die Form der Prozessführung über Standkultur, Schüttelkolben bis zum Bioreaktor Anwendung finden kann. Vielleicht ist eine direkte Beimpfung mit hochkonzentrierten Konserven praktikabler. Untersuchungen dazu müssen folgen.

Diskussion

Das Wachstumsverhalten von *L. tarentolae* in Verbindung mit morphologischen Änderungen der Zellen konnte umfassend für das YE-Medium beschrieben werden. Bisher finden solche Beobachtungen kaum Berücksichtigung in der Literatur. Gaughan & Krassner [92] stellten beispielsweise fest, dass Zellen im exponentiellen Wachstum kleiner sind, als „alte“ Zellen (Zellen der stationären Phase oder der Absterbephase) und das dieses Phänomen den Kultivierungsstatus widerspiegelt.

Die Wachstumsparameter in Tab. 1-3, S. 12, wurden unter der Annahme berechnet, dass keine morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit von der spezifischen Zellteilungsrate ν stattfanden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten jedoch, dass morphologische Veränderungen auftraten, wenn Zellen z. B. ihren Stoffwechsel von Glukose auf Aminosäuren umstellten, unter starken Limitationsbedingungen oder unter hohen Selektionsdruck wuchsen. Auffällig wurden diese Veränderungen, als $\nu \neq \mu$ galt.

Mit der Kultivierung im Schüttelkolben konnten sehr hohe Zelldichten erzielt werden. Während des exponentiellen Wachstums wurden $N > 2,6 \times 10^8$ Zellen/ml und N_{\max} von $6,5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ Zellen/ml erreicht. Im Vergleich zu dem höchsten Wert aus Literaturangaben [31] entsprach dies einem Faktor von 1,6 für BHI-Medium. Mit TB- und YE-Medium konnten sogar 2,3 bis 2,5mal höhere Zelldichten erreicht werden.

Die gemessenen Verdopplungszeiten, beispielsweise 6,7 h im YE-Medium, sind außergewöhnlich klein im Vergleich zu Verdopplungszeiten von tierischen Zellkulturen, welche sich ungefähr einmal am Tag teilen [119]. Mit Verwendung von *L. tarentolae* als Expressionssystem sind deutliche Zeiteinsparungen im Prozess möglich.

Das entwickelte YE-Medium ist ein komplexes Nährmedium mit einer Vielzahl von Substanzen in unbekannter Konzentration. Trotzdem konnte es erfolgreich für Wachstumsexperimente, auch unter limitierenden Glukose- oder Heminbedingungen (Chemostaten), für Untersuchungen zur primären Kohlenstoffquelle, zur Eisenquelle und zu physiologischen Parametern wie der Temperatur und dem pH-Wert eingesetzt werden. Eine starke Chargenabhängigkeit konnte nicht bemerkt werden, da die Bäckerhefe in einer relativ gleichbleibenden Qualität kultiviert werden kann.

Entwicklung der definierten Medien SFP(I) und SFP(II)

Die Entwicklung eines definierten Nährmediums war trotz des breiten Anwendungsgebietes des YE-Mediums sinnvoll, da alle Inhaltsstoffe und Konzentrationen in einem definierten Medium bekannt sind. So sind gezielte Untersuchungen von Nährmedienbedürfnissen möglich. Beispielsweise wurden die freien Aminosäuren im Komplexmedium analysiert (Daten nicht gezeigt), jedoch ist diese Aussage bezüglich des Aminosäureverbrauchs

Diskussion

begrenzt, da im Komplexmedium auch viele Peptide und Proteine enthalten sind und diese auch den Zellen als Lieferanten für Aminosäuren dienen können. Eine Analyse des definierten Mediums ist dagegen eindeutig.

Das definierte Medium bietet weiterhin den Vorteil einer vereinfachten Aufarbeitung von sekretierten Produkten im Vergleich zum Komplexmedium, da weniger störende Komponenten abgetrennt werden müssen.

Bei der Entwicklung der definierten SFP-Medien trat das Problem der Fällung von Hemin auf. Hemin ist nicht löslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln [81]. Deshalb musste eine Stabilisierungsmöglichkeit beziehungsweise ein Lösungsvermittler gefunden werden. Mit BSA und PEG1000 standen dabei zwei Substanzen zur Auswahl. Das PEG1000 ist zu bevorzugen, da es synthetisch hergestellt ist und schaumunterdrückend in der Kultivierung wirkt.

Das entwickelte definierte SFP(III)-Nährmedium ist noch nicht ausbalanziert bezüglich der optimalen Konzentration der Einzelsubstanzen. Diesbezüglich müssen weitere Studien folgen. Zu beachten ist dabei, dass eine direkte Übertragbarkeit von Ergebnissen anderer Stämme auf *L. tarentolae* schwierig ist, da die Nährmedienbedürfnisse stark zwischen den Spezies und den einzelnen Stämmen variieren [51, 53, 54]. Essentielle Substanzen und optimale Konzentrationen könnten z. B. mit den Methoden der faktoriellen Versuchsplanung herausgefunden werden. Bisher sind solche Untersuchungen an Nährmedien für *Leishmania* nur mit einer schrittweisen Veränderung einzelner Substanzen durchgeführt worden [53]. Die faktorielle Versuchsplanung bietet die Möglichkeit, auch die Wechselwirkung mehrerer Komponenten zu erfassen.

Primäre Energiequelle – Glukose

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Bestimmung bevorzugter Nährstoffquellen. In allen untersuchten Komplexmedien nutzten die Zellen Glukose als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Fähigkeit zur aerobischen „Fermentation“ von Glukose, im Sinne eines enzymatischen Abbaus, berichtete Parodi zuvor [11]. Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen den Beschreibungen von Blum [120] und Louassini *et al.* [121], die eine Bevorzugung von Aminosäuren gegenüber Glukose im exponentiellen Wachstum der *Leishmania* Spezies berichteten. Auch andere Literaturquellen weisen auf einen Glukoseverbrauch im Komplexmedium hin [122, 123].

In allen Komplexmedien veränderten sich die physiologischen Bedingungen während des Wachstums, da der Katabolismus der Glukose mit einer Abnahme des pH-Wertes verbunden war. Van Hellemond *et al.* [124] fanden heraus, dass die Trypanosomatidae hauptsächlich

Diskussion

teiloxidierte Produkte wie Pyruvat, Succinat und Acetat während ihres Energiemetabolismus sekretierten. Besonders ein Nährstoffüberfluss führte zur Bildung von organischen Säuren. Der Überflussmetabolismus (Overflow Metabolismus) der Acetatproduktion war vergleichbar mit der Lactat- oder Ethanolproduktion anderer Organismen.

Nachdem die Glukose im Nährmedium aufgebraucht war, schalteten die Zellen auf alternative Nährstoffquellen um. Diese waren höchstwahrscheinlich die Aminosäuren, da eine Alkalisierung des Nährmediums eintrat. Beim Aminosäurekatabolismus kann durch Desaminierung Ammonium freigesetzt und die Ketosäuren unter Energiegewinn zu CO_2 und H_2O abgebaut werden [125]. Eine andere Theorie ist der Abbau der zuvor im Glukosemetabolismus produzierten organischen Säuren [78]. Das Umschalten im Stoffwechsel führte zu starken morphologischen Veränderungen der Zellen, denn diese wurden viel dünner und bildeten längere Geißeln aus. Das Umschalten im Stoffwechsel könnte ein interessanter physiologischer Schalter sein, der beispielsweise für die Induktion der Produktbildung ausgenutzt werden könnte. Dieser Schaltbereich sollte weiter untersucht werden.

Bei der Bestimmung des Ertragskoeffizienten $Y_{X/\text{GLC}}$ zeigten sich schwankende Werte. Da das Komplexmedium sehr proteinreich ist, können die Proteine die Membran des Glykometers zugesetzt und so die Messwerte beeinflusst haben. Deshalb wurde $Y_{X/\text{GLC}}$ als Mittelwert über 24 Messreihen für das YE-Medium bestimmt ($Y_{X/\text{GLC}} = 0,93 \pm 0,09 \text{ g TBM/ g Glukose}$). So erklären sich auch die notwendigen Variationen in $Y_{X/\text{GLC}}$ bei der Modellanpassung zur kontinuierlichen Kultivierung (Abschnitt 4.6.1, S. 69) und bei Modellanpassung der Strategie mit mehrfachen Zudosagen an Nährmedienkonzentrat (Abschnitt 4.11.3, S. 84).

In den definierten Medien SFP(I) und (II) wurde auch Glukose als primäre Kohlenstoff- und Energie-Quelle verbraucht, jedoch kam es zu keinem Ansäuern sondern zu einer Alkalisierung des Mediums. Dies legt die Vermutung nahe, dass das definierte Medium keinen Overflow Metabolismus mit Produktion von organischen Säuren unterstützt. Mit Zugabe von Hefe-RNA (weitere Ausführungen siehe 5.3, S. 127) waren wahrscheinlich diese Bedingungen gegeben, denn es kam zu Beginn der Kultivierung zu einem Absinken des pH, worauf eine Alkalisierung folgte.

Essentielle Eisenquelle - Hemin

Hemin ist als Wachstumsfaktor essentiell für die Kultivierung von *L. tarentolae* und stellt eine interessante Steuergröße für einen Bioprozess dar. Voraussetzung für ein Prozessdesign ist, das Hemin analytisch detektiert und die Konzentration bestimmt werden kann. Mit Etablierung und Evaluierung der Heminanalytik auf Basis der wässrigen 2-Phasen-Extraktion

Diskussion

in saures Chloroform ist ein Meilenstein auf diesem Weg gelungen. Es konnte erstmals ein Ertragskoeffizient für den Verbrauch von Hemin für *L. tarentolae* bestimmt werden.

Die Methode basiert auf der Beschreibung von Lombardo *et al.* [81], jedoch wurde die Peakauswertung abweichend durchgeführt. In der Literatur wird eine korrigierte Absorption über die Einzelabsorptionen bei 330, 388 und 540 nm Wellenlänge ermittelt. Praktikabler erschien die Ermittlung der korrigierten Peakfläche durch Kompensation der Basislinie, da so der Einfluss des DMSOs auf die Peakform korrigiert werden konnte. Abweichend wurde auch die Heminstandardlösung hergestellt, da sich das Hemin in dem beschriebenen Phosphatpuffer nicht löste.

Die Methode ist bis zu 30fach sensitiver als andere spektroskopische Methoden, z. B. der Pyridin-Hemochromogen-Methode. Der Detektionsbereich liegt zwischen 1,15 – 9,2 μM Hemin (entspricht 0,75 – 6 mg/l) [81]. Das untere Detektionslimit wurde in der Standardkurve in Abb. 4-14, S. 55, auf 0,5 mg/l Hemin erniedrigt. Lombardo *et al.* [81] haben weiterhin den Einsatz von DMSO an der Albuminkonzentration in der Lösung evaluiert und fanden 80% des Hemin bei 0,19 – 5 mg/l Albumin wieder. Proteinreiche Komplexmedien wie in dieser Arbeit wurden nicht betrachtet, weiterhin auch keine methodischen Einflussgrößen.

Mit der evaluierten Heminanalytik steht eine robuste Methode zur Verfügung, deren Haupteinflussgrößen bekannt sind. Trotzdem sollten weitere Optimierungen vorgenommen werden, z. B. sollte das Probenvolumen verringert werden. Gegenwärtig werden pro Extraktion 4 ml Probe benötigt, was bei Schüttelkolbenversuchen auf Dauer starke Volumenreduktionen bedeuten. Geringere Probenvolumina wären möglich, wenn das Hemin in ein kleineres Chloroformvolumen aufkonzentriert werden könnte. Kleinere Quarzküvetten sind dazu erforderlich. Weiterhin sollte über Extraktionsgefäße nachgedacht werden, die weniger Hemin auf der Oberfläche adsorbieren.

Abschließend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der Heminanalytik der wichtige Parameter „Ertragskoeffizient“ ermittelt werden konnte. Zwar handelt es sich um einen Gesamtkoeffizienten, der alle „heminverbrauchenden“ Vorgänge bei der Kultivierung mit erfasst, trotzdem bietet sich damit eine Orientierung zur Beschreibung des Heminbedarfs der Zellen. Dieser Wert konnte auch erfolgreich bei der Modellierung verwendet werden, was wiederum zur Entwicklung von gezielten FedBatch-Strategien dienen kann.

Der Ertragskoeffizient $Y_{X/H}$ ist relativ hoch im Vergleich zum $Y_{X/GLC}$, was auf einen geringen Heminbedarf hinweist. Hemin ist somit in Spuren im Medium enthalten und trotzdem essentiell für das Wachstum, wobei die detaillierte Funktion des Hemins in der Zelle gegenwärtig noch unbekannt ist. Wahrscheinlich dient es als Eisenquelle, prosthetische

Diskussion

Gruppe vieler Proteine und ist als intrazellulärer Regulator an einer Vielzahl von Stoffwechselwegen der Atmung und der Proteinsynthese beteiligt [42, 41].

Bei den Experimenten wurde ein Hinweis auf einen Heminspeicher gefunden, denn die Zellen konnten in Abwesenheit des essentiellen Hemins noch ca. 3 Generationen bilden, bevor die spezifische Zellteilungsrate drastisch einbrach. Dies steht im Widerspruch zur Literatur, denn beispielsweise registrierten Pal & Joshi-Purandare [42] kein Wachstum ohne Heminzugabe und die Zellen begannen, nach einem Tag bereits abzusterben. In den vorliegenden Untersuchungen blieben die Zellen im YE-Medium ohne Hemin über 2 Tage lebensfähig. Der Hinweis auf einen Heminspeicher war sehr überraschend, denn die Heminsynthese wird in den meisten biologischen Systemen als fein reguliert angesehen und eine Akkumulation dieses Metaboliten ausgeschlossen [81]. Jedoch besitzen die *Trypanosomatidae* einen defekten Biosyntheseweg für Hemin [41], was die Notwendigkeit einer Vorratsspeicherung erklärt.

Eine inhibierende Heminkonzentration geben Pal & Joshi-Purandare [42] mit 50 µM an, wobei sie morphologische Veränderungen der Zellen in Form von verkürzten Geißeln und einem stumpfartigen Zellkörper beobachteten. Sie vermuteten eine Zellzwischenform bei der Transformation von Promastigoten zu Amastigoten und schlussfolgerten, dass eine erhöhte Heminkonzentration ein Schaltfaktor bei der Transformation sein könnte. Dieser Hinweis ist für die Planung von Fermentationsstrategien wichtig, da zur Vermeidung der Zelltransformation keine zu hohe Heminkonzentration verwendet werden darf.

Auch an alternativen Eisenquellen wurde geforscht, um Hemin als letzte verbleibende Substanz tierischen Ursprungs sowohl im Komplexmedium als auch im definierten Medium zu ersetzen. Jedoch zeigte sich, dass gegenwärtig keine Ersatzsubstanz verfügbar ist. Beschriebene Effekte von Protoporphyrin [104], Katalase und Peroxidase [92] konnten nicht beobachtet werden. Laut Aussage von Gaughan & Krassner benötigt *L. tarentolae* nur den eisenhaltigen Porphyrinring und den Zellen fehlt wahrscheinlich die Hemesynthetase [92].

Hemin wird aus Rinder- oder Schweineblut gewonnen. Bei aus Schweinen gewonnenem Hemin stellt sich zwar nicht die Problematik der Prionenkontamination, jedoch können Schweine beispielsweise an der Schweinepest erkranken. Günstiger wäre synthetisch hergestelltes Hemin, jedoch sind handelsübliche Produkte gegenwärtig nicht verfügbar.

Festzuhalten ist, dass die Reduktion auf eine einzige „animal-derived“ Substanz im Medium trotzdem einen enormen Fortschritt bedeutet, da analytisch gezielt diese Komponente detektiert werden kann. Bei einem Komponentencocktail, wie er beispielsweise im BHI-Medium enthalten ist, stellt sich dies als sehr schwierig dar. In einem zukünftigen

Diskussion

Produktionsprozess kann so gezielt auf Hemin detektiert und die Abreicherung im Downstream Processing verfolgt werden.

5.2 Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Die spezifischen Raten μ und ν sind keine Konstanten, sondern hängen von einer Vielzahl von Zustandsparametern ab, die sowohl limitierend als auch inhibierend wirken können. Die wichtigsten Einflussgrößen eines biotechnologischen Prozesses sind die primäre C-Quelle, die optimale Wachstumstemperatur und der physiologische pH-Bereich. Für die *Leishmania* Spezies ist darüber hinaus das Hemin als essentielle Substanz interessant.

Glukose ist beispielsweise die primäre Energiequelle und deren Einfluss auf die spezifische Wachstums- und Zellteilungsrate von besonderem Interesse. Wichtig ist die Abgrenzung der physiologischen Bereiche von Temperatur und pH-Wert, um optimale Kultivierungsbedingungen zu ermöglichen. Das allgemeine Ziel der Untersuchungen war es, die optimalen physiologischen Bedingungen für die Kultivierung von *L. tarentolae* herauszufinden.

$\mu=f(Temp)$

Die Untersuchungen ergaben eine optimale Wachstumstemperatur von 30°C, die sowohl im Schüttelkolben als auch im Bioreaktor bestätigt werden konnte. Sehr überraschend war dieser Befund, da die Promastigoten der *Leishmania* Spezies gewöhnlich bei 22 – 28°C, aber hauptsächlich bei 26°C kultiviert werden (zum Vergleich Tab. 1-3). In der Literatur wird eine hohe Temperaturtoleranz für die *Leishmania* Spezies beschrieben, denn sie können Temperaturen bis 37°C tolerieren [106]. Jedoch lösen hohe Temperaturen bzw. ein Hitzeschock die morphologische Umwandlung der Promastigoten zu Amastigoten aus. Die Transformation beginnt je nach Spezies ab 30°C [53, 106]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen im Temperaturbereich von 12 - 36°C zeigten sich keine morphologischen Änderungen der promastigoten Zellen. Dies könnte am Organismus selbst liegen, da *L. tarentolae* ein Eidechsenparasit ist. Beispielsweise wurden bei den humanpathogenen Stämmen Unterschiede in der Sensitivität in Abhängigkeit von der Temperatur des infizierten Zielorgans gefunden [106]. Auch variiert die Temperatursensitivität der einzelnen Stämme [53, 126]. O'Daly & Rodriguez [53] kultivierten zwei spezielle Stämme (*L. mexicana pifanoi*, *L. garnhami*), die bei 30 - 34°C die promastigote Zellform behielten. Eine Adaption von Promastigoten an 37°C kann auch mit 5-10% (V/V) mit Hühnerembryo-extrakt erfolgen [127]. Eine Ursache kann auch in dem verwendeten Komplexmedium gesehen werden. O'Daly & Rodriguez [53] haben bei humanpathogenen Spezies herausgefunden, dass diese in Nährmedium mit Serumzusatz bei 30°C wachsen können, ohne Proteinzufluss jedoch nur bei Temperaturen bis 26°C. Auch Krassner [128] stellte fest,

Diskussion

dass *L. tarentolae* im definierten Medium besser bei 28°C als bei 33°C wächst. Bei der Kultivierung von *L. tarentolae* in den SFP(II)-Medien zeigte eine Temperaturerhöhung auf 30°C keinen negativen Wachstumseffekt, vielmehr wurden höhere Wachstums- und Zellteilungsraten gemessen. Durch den Zusatz an RNA im SFP(III)-Medium konnten sogar die Raten des Komplexmediums erreicht werden. Hervorzuheben ist, dass dieser Effekt nicht durch ein Proteingemisch ausgelöst wurde, wie von O'Daly & Rodriguez [53] beschrieben, sondern durch Hefe-RNA.

Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 26 auf 30°C resultierte in einem Anstieg der spezifischen Wachstumsrate um ungefähr 30 %. Die Verdopplungszeit reduzierte sich von 6,9 h auf 5,4 h. Für einen Produktionsprozess bedeutet dies einen deutlichen Zeitgewinn.

$\mu, v=f(pH)$

In der Literatur wird die *Leishmania* Spezies als sehr anpassungsfähig gegenüber verschiedenen externen pH-Werten beschrieben [106]. Begründet wird dies mit den extremen Umweltveränderungen in Bezug auf pH und Temperatur, denen die Parasiten während ihres Lebenszyklus ausgesetzt sind. Für *L. donovani* wurde die Fähigkeit beschrieben, den intrazellulären pH neutral zu halten über eine weite Spanne des Umgebungs-pH-Wertes (pH 5,0 – 7,4) [106, 129]. Durch die Änderung ihrer Zellform können die Parasiten sowohl im sauren (Makrophagen) als auch im neutralen pH-Bereich (Darmepithel der Sandmücke) überleben, wobei die Umwandlung von Promastigoten zu Amastigoten durch einen pH-Shift zu 4,5 – 5,0 in Verbindung mit einer Temperaturerhöhung ausgelöst wird [106].

Als physiologisch erwies sich der neutrale pH-Bereich (pH 6 – 7,6), worin die Promastigoten eine große Toleranz zeigten. Bestimmt wurde dies statisch im Schüttelkolben, nach einem plötzlichen pH-Sprung. Deshalb ist die Kinetik $v = f(pH)$ nur als Schätzung anzusehen, da die Zellen dies auch als physiologischen Stress empfunden haben könnten. Bei einer dynamischen pH-Änderung während des Kultivierungsprozesses zeigte sich, dass eine Kultivierung bei pH < 6,9 nicht empfehlenswert ist, da die Zellen im TSB-Medium die geringste spezifische Wachstumsrate aufwiesen. Die Ergebnisse sollten weiter untermauert werden durch Fermentationen bei gezielt eingestellten pH-Werten. Weiterhin könnte die kontinuierliche Kultivierung dazu dienen, eventuelle bistabile Zustände bezüglich $v = f(pH)$ herauszufinden. Dies wären interessante Ansatzpunkte für eine Produktinduktion.

Bestätigung findet dieser physiologische pH-Bereich in Beschreibungen von Zilberstein und Shapira [106], die einen optimalen pH von 7,0 – 7,5 für einen membranassoziierten Transport und Metabolismus der Promastigoten beschreiben. Auch wird eine optimale Glukoseaufnahmerate von *L. tropica* Promastigoten bei pH 7,0 erzielt [130].

Diskussion

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine Kultivierung im neutralen pH-Bereich (pH 6,9 – 7,6) optimal ist. Durch den gewählten pH-Bereich werden Infektionen mit Pilzen entgegengewirkt und gleichzeitig saure Phosphatasen gehemmt. Für eine Schüttelkolbenkultivierung sind ein pH-Puffersystem und eine rechtzeitige Passagierung zu empfehlen, wobei die Zellen verschiedene Puffersysteme, beispielsweise mit Zitronensäure, Kalium- oder Natriumphosphat oder Tris/HCl tolerieren. Für die Kultivierung im Bioreaktor ist eine pH-Regelung sinnvoll.

Außerhalb dieses optimalen pH-Bereiches zeigten sich Wachstumsinhibitionen. Bei pH-Werten > 7,6 begannen erste Zelldegenerationen. Die Zellen verloren ihre typische tropfenförmige Gestalt, teilweise bildeten sich abgerundete Zellformen aus. Der Zellkörper schwoll an und die Geißel und die Zellspitze war aber noch vorhanden. Somit fand keine Umwandlung in die amastigote Form statt. Auch nach dem Umschalten auf den Aminosäure-Metabolismus zeigten sich morphologische Änderungen, da die Zellen sehr dünn und teilweise degeneriert erschienen. Diese Beobachtungen stimmen teilweise mit Glaser *et al.* [129] überein, die geschwollene Zellen bei pH > 7,5 bemerkten und schlussfolgerten, dass Promastigoten die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung des zytosolischen pH-Wertes im physiologischen Bereich verloren.

Bei der Verringerung des pH-Wertes zu pH 5 zeigte sich eine unvollständige Umwandlung in die amastigote Form. Dieses Zellstadium unterscheidet sich von Promastigoten durch einen veränderten Stoffwechsel und unterschiedliche Genexpressionen [106], beispielsweise werden verstärkt Hitzeschockproteine (Heat-Shock Proteins) exprimiert [106]. Auch sind aktive Transportvorgänge der Zellstadien unterschiedlich pH-abhängig [106]. Die Transformation bedeutet zum jetzigen Zeitpunkt für einen Produktionsprozess undefinierte und unkontrollierbare Bedingungen, weshalb die Transformation zu Amastigoten im Allgemeinen während der Kultivierung unterbunden werden soll. Allerdings stellt sie auch einen interessanten Schalter für eine Produktinduktion dar. Wenn das Fremdgen in eine Genregion integriert werden würde, die nur stark in Amastigoten transkribiert wird, dann tritt keine Produktbildung bei den Promastigoten auf. Dieses Zellstadium könnte zur Bildung von Zellmasse verwendet werden. Anschließend könnte mit der Umwandlung zu Amastigoten auch die Produktbildung induziert werden. Die Umsetzung dieser Idee bedarf aber weiterer intensiver Forschungen, da bisher keine Charakterisierung der amastigoten Form des hier verwendeten *L. tarentolae* vorliegt. Weiterhin müssen die Transformationsbedingungen genauer untersucht werden. Bei der pH-Erniedrigung zeigte sich schon eine Umwandlung, jedoch keine bei Temperaturerhöhung. Eine Kombination beider Parameter wird als am effektivsten für langzeitstabile Amastigoten angesehen [106].

Diskussion

Mit dem großen Toleranzbereich gegenüber pH und Temperatur weiß *L. tarentolae* wieder einen Vorteil gegenüber anderen eukaryotischen Expressionssystemen auf, denn höhere eukaryotische Zellen tolerieren diese drastischen Änderungen nicht [106].

$\mu=f(GLC)$

Verschiedene Prozessführungen, wie beispielsweise der glukoselimitierte FedBatch, erfordern eine gezielte Zugabe der Kohlenstoffquelle unter der Voraussetzung, dass keine weiteren C-Quellen im Nährmedium vorhanden sind. Dies ist zwar nur im definierten Nährmedium gewährleistet, jedoch konnte die Glukose als einzige relevante C-Quelle angenommen werden, da die Zellen erst nach Verbrauch der Glukose auf alternative Energiequellen umschalteten. Diese Annahme wurde durch die zwei glukosegeführten Chemostatenkultivierungen bestätigt, denn die Prozesse hatten sich entsprechend der Glukosezudosage auf Gleichgewichtszustände eingeschwungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals der K_S -Wert des Monod-Modells für *L. tarentolae* bestimmt werden. Der K_S -Wert ist relativ klein mit 0,046 g/l Glukose und unterstreicht die starke Affinität des Organismus für diese C-Quelle. In der Literatur sind bisher nur zwei Chemostatenkultivierungen mit der *Leishmania* Spezies beschrieben. Erste Versuche wurden von Schaefer *et al.* [76] mit Komplexmedium und Serum durchgeführt. Ziel dieses Versuches war nicht die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von *L. tropica*, sondern die Produktion von großen Zellmengen im Steady State für weitere physiologische und biochemische Experimente. Untersuchungen mit einem glukoselimitierten Chemostaten führten TerKuile und Opperdoes [77] durch und ermittelten ein μ_{max} (eigentlich v_{max} , da aus der Zelldichte berechnet) von 0,082 h^{-1} und einen K_S -Wert von 0,1 mM (0,018 g/l) für *L. donovani* in einem halbsynthetischen Nährmedium mit Hemin und 10% Serum. Der ermittelte K_S -Wert für *L. tarentolae* ist zwar in diesem Dimensionsbereich, jedoch um den Faktor 2,5 größer. Hier bestätigt sich wieder die Variation der Nährmedienbedürfnisse der einzelnen *Leishmania* Spezies [51, 53, 54].

Die pH-Kinetik folgte im 1. Chemostaten bei $D = 0,059 h^{-1}$ sehr gut dem Glukoseverbrauch. Dagegen stieg der pH im Steady State des 2. Chemostaten wieder an. Die Ansäuerung des Mediums wurde wahrscheinlich durch die Produktion von organischen Säuren im Overflow-Metabolismus ausgelöst, wie oben bereits ausgeführt. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der untersuchten Verdünnungsrate von $0,059 h^{-1}$ dieser Metabolismus noch aktiv war und als Folge dessen der pH sank. Dagegen wurde ab $D \leq 0,047 h^{-1}$ die gesamte Glukose für den Energiestoffwechsel benötigt und es war kein Überschuss für den Overflow-Metabolismus vorhanden. Deshalb korrelierten nur die Kinetiken von GLC und pH in der

Diskussion

Einschwingphase des zweiten Chemostaten, da hier die Zellen noch mit der Differenz von $\mu_{max} - D$ wachsen konnten und GLC noch im Überschuss vorlag.

Die Glukose zeigte eine inhibierende Wirkung ab einer Konzentration von 60 g/l (26°C) bzw. 40 g/l (30°C). *L. tarentolae* zeigte eine große Toleranz gegenüber diesem Parameter. Bei *E. coli* ML30 setzte beispielsweise die Inhibition ab ca. 20 g/l Glukose ein [131]. Für Fermentation könnte dieser Bereich ausgeschöpft werden und dieser Parameter unlimitiert gehalten werden. Damit kann auf eine zyklische Zudosage der Glukose verzichtet werden.

$\mu=f(Hemin)$

In dieser Arbeit wurde erstmalig, laut dem gegenwärtigen Kenntnisstand der Literatur, eine Chemostatenkultivierung mit Heminlimitation und *L. tarentolae* durchgeführt. Das dynamische Einschwingen des Prozesses auf einen Steady State war sehr überraschend. Es wurde vermutet, dass die Zellen auf eine Heminlimitation nicht reagieren und ihren intrazellulären Heminreserven aufbrauchen. Aufgrund der erhaltenen Kinetik eröffnen sich verschiedene Hypothesen für diese kontinuierliche Kultivierung:

Hypothese 1: Der Heminreservoir wird nur bei Heminüberschuss angelegt. Die Zellen des Inokulums haben Hemin gespeichert. Durch die Verdünnung bei der kontinuierlichen Kultivierung werden diese Zellen ausverdünnt (90% dieser Zellen nach ca. 38 h). Dagegen können die Tochterzellen keinen Speicher anlegen, da kein Heminüberschuss vorliegt und alles Hemin für das Wachstum aufgewendet wird. Deshalb wirkt kein Heminreservoir bei der Kultivierung.

Bestätigt wird diese Hypothese durch den typischen Einschwingvorgang eines Chemostaten bis zum Steady State. Mit Speicherterm ergibt sich dieser Verlauf nicht.

Hypothese 2: Die heminlimitierte Fahrweise ist nicht möglich. Der Stress, der durch die Heminlimitation erzeugt wird, ist zu groß für die Zellen. Im erreichten Steady State können die Zellen die spezifische Wachstumsrate nicht mehr aufrechterhalten ($\mu \neq D$) und der Reaktor wäscht aus.

Widersprüchlich zu dieser Hypothese ist, dass sich der Reaktor nach Anschluss der neuen Vorlageflasche wieder auf einen neuen Steady State einschwingt. In Schüttelkolbenversuchen hatte sich gezeigt, dass Zellen unter Heminmangel ungefähr einen Tag für die Wiederaufnahme der maximalen Wachstumsrate benötigten. Gestresste oder geschädigte Zellen reagierten nicht sofort auf geänderte Nährmedienbedingungen, sondern brauchten eine gewisse Adoptionszeit. Die sofortige Reaktion auf das frische Nährmedium kann so nicht erklärt werden.

Diskussion

Hypothese 3: Der Hemin speicher ist nicht wirksam. Die Zellen sind auf die Hemin zufuhr über das Nährmedium angewiesen und folgen in ihrem Wachstum der heminlimitierten Prozessführung. Deshalb schwingt sich der Prozess auf den Steady State ein. Nach 70 h wird das Fließgleichgewicht gestört, denn das Hemin baut sich im Nährmedium ab. Als Folge kann die spezifische Wachstumsrate nicht gehalten werden und der Reaktor wäscht aus. Das Wachstum erfolgt weiter unter Heminlimitation und reagiert damit auf die sich veränderten Konzentrationen.

Diese Hypothese gilt als am wahrscheinlichsten, denn unter diesen Annahmen war eine Modellanpassung sehr gut möglich, wie in Abschnitt 4.7 zeigt. Weiterhin erklärt sich die Reaktion der Zellen auf die höheren Heminkonzentrationen der neuen Vorlageflasche. Das sofortige „Abspringen“ des Wachstums beweist, dass die Zellen bis dahin unter Heminlimitation gewachsen sind und auf die veränderte Konzentration reagierten. Der Abbau von Hemin im Nährmedium bestätigt sich dadurch, dass auch mit der zweiten Vorlageflasche nach drei Tagen bei Raumtemperatur ein Auswaschen des Reaktors begann. Untersuchungen zur Stabilität der Standkulturen hatten auf diesen Effekt schon hingewiesen. Dort zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten der Zellen in der Standkultur immer schlechter wurde, wenn das fertige Medium mit Hemin im Kühlschrank gelagert wurde und für die Passagierung verwendet wurde [110]. Als Folge dessen wurde bei der Passagierung der Heminzusatz immer frisch in das Nährmedium gegeben.

Eine Schlussfolgerung für zukünftige heminlimitierte FedBatch-Prozesse folgt aus der letzten Hypothese, denn ein häufigerer Flaschenwechsel muss eingeplant werden. In Glukose-limitierten Chemostaten oder anderen Fermentationen hatte sich dieser Heminabbau bisher nicht ausgewirkt, da das Hemin im Überschuss zugegeben wurde (5 mg/l) und genügend Hemin im Prozess verfügbar war.

Mit Hilfe der Monod-Modellanpassung konnte zum ersten Mal eine Halbsättigungskonzentration (K_H) für Hemin geschätzt werden. Der Wert von 0,031 µg/ml ist zwar nur als grobe Näherung zu betrachten, da eine experimentelle Heminbestimmung der Reaktorproben aufgrund des zu hohen Probenvolumens nicht möglich war, trotzdem bietet er eine gute Orientierungsmöglichkeit für zukünftige Untersuchungen. Unterstützt wird die Größenordnung des Parameters durch Feststellungen bezüglich der minimal notwendigen Hemin-Konzentration, die von 0,1 - 0,2 µg/ml für eine stetige Kultur variieren [93, 133].

Der Steady State bietet die Möglichkeit, weiterführende Aussagen zur Morphologie zu treffen und morphologische Änderungen zu verfolgen. Bei der Chemostatenkultivierung mit Glukose- oder Heminlimitation sind morphologische Veränderungen, insbesondere bei der Länge der Zellgeißeln, aufgetreten. Sind die Zellen mit einer hohen Wachstumsrate gewachsen, z. B. beim Einschwingen zum Steady State oder dem Auswaschen des

Diskussion

Reaktors, dann war die Länge der Geißel kleiner als die des Zellkörpers. Häufig traten auch Zellen mit einer extrem verkürzten Geißel auf. Teilweise war die Geißel nur noch als „Stummel“ erkennbar oder gar nicht mehr vorhanden. Die verkürzten Geißeln traten auch unter exponentiellem Wachstum im Schüttelkolben auf, beispielsweise mit YE-Medium. Der Zellkörper war immer dick und tropfenförmig. Festzuhalten ist, dass bei einem guten Nährstoffangebot und der daraufhin hohen spezifischen Wachstumsrate eine Rückbildung der Geißel eintrat. Im Gegensatz dazu beobachtete Trager [127] eine verkürzte Geißel bei *L. tarentolae*, wenn die Zellen mit minimalen Konzentrationen von benötigten Wachstumsfaktoren kultiviert wurden.

Zellen unter limitierten Wachstumsbedingungen (Steady State) bildeten in der vorliegenden Untersuchung deutlich verlängerte Geißeln aus, die sogar die doppelte Länge des Zellkörpers annehmen konnten. Auch war der Zellkörper viel dünner, aber immer noch tropfenförmig. Bei der GLC-geführten Kultivierung zeigte sich eine Abhängigkeit von der Verdünnungsrate, denn die Zellen waren viel schlanker bei einem kleinen als bei einem großen D. Auch TerKuile & Opperdoes [132] stellten bei ihrer Chemostatenkultivierung mit und ohne Glukoselimitation fest ($0,024 \leq D \leq 0,073 \text{ h}^{-1}$), dass sich die Zellgestalt beträchtlich änderte, obwohl das innere Zellvolumen konstant blieb. Leider wurde dies im Detail nicht näher ausgeführt und ein Vergleich zu den vorliegenden Befunden ist nicht möglich.

Ein direkter Einfluss auf die Morphologie ist für Zellen beschrieben, die ohne Hemin kultiviert wurden. Sie wurden als länger und dünner ($\sim 15 \times 1,6 \text{ } \mu\text{m}$) als normale Zellen ($10 \times 2,2 \text{ } \mu\text{m}$) [92] beschrieben und bildeten längere Geißeln aus [133]. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann dieser Befund stark erweitert werden.

Die morphologischen Veränderungen der Geißel können mit der Verfügbarkeit von Nährstoffen erklärt werden. Bei unlimitiertem Wachstum sind genügend Nährstoffe vorhanden und die Zellen speichern diese intrazellulär. Gleichzeitig wachsen sie sehr schnell und teilen sich oft. Entweder fehlt die Zeit für die vollständige Ausbildung der Geißel oder sie wird zurückgebildet, da die Zellen diese Beweglichkeit nicht benötigen, um an Nährstoffe zu gelangen. Unter Limitationsbedingungen ist das Wachstum deutlich langsamer und genügend Zeit für die Ausbildung der Geißel. Allerdings sind die Geißeln deutlich länger als unter normalen Bedingungen. Vielleicht „wollen“ die Zellen ihre Beweglichkeit erhöhen, um zu Orten mit höherem Nährstoffangebot zu gelangen.

Die Erkenntnis dieser Untersuchungen ist, dass die Zellmorphologie in Kultivierungen immer verfolgt werden sollte. Sie kann wertvolle Hinweise auf Limitationsbedingungen geben und in Kombination mit dem pH-Wert auf den Metabolismus hinweisen.

Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass weitestgehend das Monod-Modell für das Wachstum von *L. tarentolae* angewandt werden kann. Abweichungen zu diesem Modell traten bei der Glukoseinhibition als auch bei der Temperaturerhöhung in der kontinuierlichen Kultivierung auf. Grundsätzlich kann somit das Monod-Modell angewendet werden, jedoch müssen die Einschränkungen beachtet werden. Mit den ermittelten Halbsättigungs-konstanten für Glukose und Hemin, den maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsraten sowie den Ertragskoeffizienten für Glukose und Hemin ist die Basis für alle weitere Fermentationsprozessentwürfe und –optimierungen gelegt. Weiterhin wurde deutlich, dass der Einfluss von Substrat größer ist als von Temperatur oder pH-Wert. Dieses eröffnet gute Steuermöglichkeiten für μ beziehungsweise v .

5.3 Strategien zur Prozessführung

Um hohe Zelldichten im Produktionsprozess von rekombinanten Proteinen zu erzielen, kann auf lange Sicht nur eine Kultivierung im Bioreaktor Anwendung finden. Laut Kenntnisstand gibt es nur wenige Literaturstellen, die gezielt Bioreaktorkultivierungen von parasitischen Protozoen beschreiben. Neben zwei Chemostatenkultivierungen mit Magnetrührern (60 - 100 rpm) [76, 77] finden sich die Beschreibungen von Enders *et al.* [78], worin *L. donovani*, *L. brasiliensis* und *L. enrietti* unter Verwendung eines Rührreaktors mit Scheibenrührern kultiviert wurden (2 - 20 l-Maßstab, 100 - 140 h Kultivierungszeit). Bei einer Fermentation von *L. enrietti* zeigte sich eine Verringerung des Wachstums bei einer Rührerdrehzahl von 500 rpm, wobei die Autoren die Scherstressproblematik nicht betrachteten. Die Fragestellung, unter welchen Prozessbedingungen eine Kultivierung von *L. tarentolae* im Rührkesselreaktor möglich ist, hat deshalb besondere Relevanz. Für einen Drehzahlbereich von 100 – 400 rpm unter Verwendung von Schrägbatatrührern ($k_L \cdot a = 14 - 47 \text{ h}^{-1}$, [110]) wurde in der vorliegenden Arbeit keine Scherstressempfindlichkeit von *L. tarentolae* festgestellt, da vergleichbar hohe Raten im Rührreaktor als auch im Airlift-Reaktor gemessen wurden. Im Bereich von 400 – 500 rpm ($k_L \cdot a = 47 - 71 \text{ h}^{-1}$, [110]) begann die Lyse einzelner Zellen, wodurch der Prozess jedoch nicht gestört und auch kein massiver Einsatz von Antischaummittel erforderlich wurde. Der überwiegende Teil der Zellen war intakt und sehr beweglich. Bei einer Drehzahl von 700 rpm ($k_L \cdot a > 110 \text{ h}^{-1}$, [110]) wurde eine starke Schaumbildung auslöste, welche auf die Freisetzung von Zellproteinen hinweist. In einem Produktionsprozess kann bei Verwendung von Schrägbatatrührern der Drehzahlbereich bis 500 rpm voll ausgeschöpft werden. Höhere Drehzahlen sind nicht zu empfehlen. Zur Gewährleistung des Sauerstoffeintrags ($pO_2 \text{ min} = 20\%$) ist gegebenenfalls die Begasungsrate zu erhöhen.

Diskussion

Die entwickelten Nährmedien (YE-Medium, SFP(III)-Medium) sind für die Bioreaktorkultivierung geeignet und ermöglichen auch unter gerührten und begasten Bedingungen ein Wachstum von *L. tarentolae*. Weiterhin wird die gute Anpassungsfähigkeit der Zellen durch ein Wachstum bei unterschiedlichen Bedingungen (stehendes, durchmischt oder gerührtes Medium mit/ohne aktiver Begasung) unterstrichen.

Im Fokus der Untersuchungen stand der Entwurf von unterschiedlichen FedBatch-Strategien für das Komplexmedium und das definierte Medium. Ziel war die Erzielung möglichst hoher Zelldichten beim Wachstum auf Glukose, da ein Umschalten im Metabolismus undefinierte Bedingungen und morphologische Änderungen bedeuten. Dazu empfiehlt es sich, die Glukose und das Hemin unlimitiert zu halten und Nährmedienkonzentrat zuzudosieren. Mit dieser Strategie konnte im Komplexmedium eine maximale Zelldichte von $1,8 \times 10^9$ Zellen/ml ($X_{\max} = 14,5$ g/l TBM) unter Verbrauch von Glukose erzielt werden. Dies ist eine deutlich höhere Zelldichte, als mit bisherigen Verfahren und Nährmedien bei Wachstum auf Glukose erzielt wurde (Schüttelkolben mit YE-Medium: $X_{\exp} = 3,4 \times 10^8$ Zellen/ml). Im Vergleich zu Literaturangaben [31] bedeutet dies eine 4,5mal höhere Zelldichte. Außerdem wurde *L. tarentolae* nicht in BHI-Medium sondern im YE-Medium kultiviert, welches nur noch Hemin als Substanz tierischen Ursprungs enthält. In diesem Prozess wuchsen die Zellen mit definierten spezifischen Raten, jedoch verringerten sich μ und ν mit zunehmender Inhibition des Nährmedienkonzentrates stetig. Dies ist gegenwärtig nicht zu verhindern, da die limitierenden Komponenten des YE-Mediums nicht bekannt sind und gezielt zugegeben werden können.

Begleitend dazu war interessant, welche Prozessparameter und Prozessbedingungen beim Bioreaktor verwendet werden können. Neben den bereits diskutierten Drehzahlbereich empfiehlt sich die Regelung des pH-Wertes mit Kali- oder Natronlauge. Eine pH-Regelung wird auch von Enders *et al.* [78] befürwortet. Weiterhin vorteilhaft ist der Einsatz von Silikonöl zur Schaumbekämpfung oder die Verwendung von PEG-Hemin, welches durch den PEG1000-Anteil eine Antischaumwirkung besitzt.

Im definierten SFP-Medium wurde eine Steigerung der Zelldichte durch die Zugabe von Hefe-RNA erzielt. Dieser Effekt war sehr überraschend, da einzelne Nukleinbasen im Medium vorhanden waren. Zwar werden Nukleinsäuren von vielen Organismen für das Wachstum benötigt, die Zudosage von Nukleinsäuren als gezieltes, direktes Nährmedienadditiv ist bisher nur wenig in der Literatur beschrieben. Siegel *et al.* [134] berichteten von einem an Salzlösungen gewöhnnten *Penicillium notatum* Stamm, der erst durch Zusatz von Hefeextrakt, RNA oder RNA-Hydrolysat wieder in salzfreiem Glukose-Pepton-Medium wuchs.

Diskussion

Der wachstumsfördernde Effekt von Nukleinsäure wird durch die Tatsache unterstützt, dass die *Leishmania* Spezies auxotroph für Purinbasen sind, d. h., sie besitzen einen defekten Biosyntheseweg für die *de novo* Synthese [135]. Dagegen können Pyrimidin-Nukleotide *de novo* hergestellt als auch über verschiedene Versorgungswege zugeführt werden. Der parasitische Organismus ist auf die Zufuhr von Purinen (Adenin und Guanin) durch den Wirtsorganismus angewiesen. Die Promastigoten haben verschiedene Versorgungswege etabliert [135], wie eine konstitutiv sekretierte, 35 kDa große Nuklease [136], eine ≥ 40 kDa membranständige 3'-Nukleotidase/Nuklease, die einzelsträngige Nukleinsäuren und 3'-Nukleotide hydrolysiert [137, 138, 139, 140], Membrantransporter für Nukleoside [141] und Adenosin/Pyrimidin-Nukleoside [142] und vier verschiedene Purin-Transporter für die Aufnahme von Adenosin, Pyrimidin-Nukleosiden, Inosin, Guanosin, Hypoxanthin, Xanthin, Adenin und Guanin in die Zellen [143].

Die *Leishmania* Spezies ist auf die Versorgung mit „vorgeformten“ Purinen, also Nukleosiden oder Nukleobasen, angewiesen [143]. Dies erklärt den wachstumsfördernden Effekt von Hefe-RNA, da wahrscheinlich die Zellen von *L. tarentolae* die Hefe-RNA hydrolyseren und anschließend über die Membrantransporter aufnehmen. Bestätigt wird die katabolische Verwendung von Nukleinsäure durch die Tatsache, dass *L. tarentolae* auf diesem Weg nicht transfizierbar ist, d. h., die vorgelegten Nukleinsäuren werden nicht in das Genom eingebaut (Hinweis Dr. Breitling, Jena Bioscience GmbH).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Wachstum und Hefe-RNA-Konzentration konnte gezeigt werden, denn mit dem Zusatz konnte nahezu eine Verdopplung der Zelldichte im definierten Nährmedium erzielt werden ($N_{max} = 2,8 - 3,3 \times 10^8$ Zellen/ml). Der Abbau der Hefe-RNA als auch die signifikante Reaktion der Zellen auf die Zugabe dieses Substrates konnte nachgewiesen werden. Mit der FedBatch-Strategie konnte der Prozess über 5 Generationen gehalten werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Prozessparameter pH, pO_2 und CO_2 wichtige Orientierungsmöglichkeiten bieten.

Der RNA-Verbrauch erfolgte nur bis zu einer Konzentration von ca. 20 mg/l. Danach schienen die Zellen die RNA nicht mehr abzubauen. Um dies im Modell zu berücksichtigen, musste der Ertragskoeffizient $Y_{X/RNA}^*$ alternierend angenommen werden. Es ist im Weiteren zu untersuchen, ob diese Schalteffekte durch den Wirtsorganismus oder das Wirts-Vektor-System ausgelöst werden. Verursacht wird dies nicht durch das Nährmedium. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um den Schalteffekt genauer zu untersuchen und dessen Einfluss auf die Produktbildung zu klären.

Auffällig war bei der RNA-Analytik, dass nur eine Bande im Agarosegel zu detektieren war, deren Intensität abnahm. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zellen die RNA entweder unzerlegt aufnehmen oder als Nukleoside oder Nukleotide, die mit Ethidiumbromid nicht

Diskussion

mehr anfärbbar sind. Letzteres ist wegen der Vielzahl an Nukleosid/Nukleotid-Transportern wahrscheinlicher.

Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Hefe-RNA ist nicht bekannt. Der Hersteller macht keine detaillierten Angaben. Wenn es sich um eine Mischung verschiedener RNA wie beispielsweise tRNA und mRNA handeln würde, könnten die Zellen vielleicht nur eine Art für den Metabolismus verwenden und die andere bleibt als Basalkonzentration „liegen“. Weitere Untersuchungen müssen außerdem klären, ob andere Nukleinsäuren eingesetzt werden können, da die verwendete Hefe-RNA sehr preisintensiv ist (500 mg für ca. 300 €, das entspricht bei 77 mg/l ca. 46 € pro Liter Medium).

Für beide Prozessstrategien konnten sehr gute Modellanpassungen gefunden werden, wobei das Monod-Modell modifiziert werden musste. Zur Modellierung der Fermentation mit Komplexmedium war die Einführung eines Korrekturterms für die Biomassealterung notwendig, sowie exponentielle Änderungen von $Y_{X,GLC}$ und $K_{S,GLC}$. Damit wurden der Biomassezerfall bzw. die Biomassealterung und weitere Einflussgrößen, wie die veränderte Affinität zum Substrat Glukose oder Einflüsse auf die Glukosemessung, im Modell erfasst. Bei der Modellierung der Fermentation mit definiertem Medium konnte mit alternierenden Werten von $Y_{X/RNA}$ und K_{RNA} zwischen einem relativ hohen und einem relativ niedrigen Wert eine gute Anpassung des Modells erfolgen. Dabei zeigte sich, dass bei Beginn einer RNA-Limitation auch der K_{RNA} stieg, teilweise um den Faktor 10. Mit Ansteigen des K_{RNA} musste eine relativ hohe Substratkonzentration zur Aufrechterhaltung des Metabolismus vorliegen. Der $Y_{X/RNA}$ sank im Gegensatz dazu. Eine Hypothese ist, dass dünne Zellen mit einer großen Geißel eine eher ungünstige Oberfläche im Vergleich zu „normalen“ Zellen darstellen, da weniger Substratübergang gewährleistet werden kann und die Diffusion negativ beeinflusst wird. Deshalb sind höhere Konzentrationen im Nährmedium nötig, um den Metabolismus aufrecht zu erhalten, $Y_{X/RNA}$ und K_{RNA} ändern sich ständig und 20 mg/l RNA wirken limitierend. Eine andere Hypothese ist, dass mit zunehmendem RNA-Verbrauch die Bildung des Ammoniaks zu einer Vergiftung der Zellen führt. Durch den Austausch von Zellsuspension gegen frisches Nährmedium wurde dieser dann verdünnt.

Die Zellen reagierten auf die RNA-Zugabe durch ein erneutes Wachstum. Das war sehr überraschend, da sich der Organismus vorher in Limitation befunden hatte. Somit müssen die Zellen physiologisch sehr robust sein. Bestätigung findet dies auch in der hohen Generationszahl, die bei den FedBatch-Prozessen, aber vor allem in der kontinuierlichen Kultivierung mit über 27 Generationen erzielt wurden.

5.4 Expression von rekombinanten Proteinen

Die erfolgreiche Expression von Modellproteinen mit *L. tarentolae* in verschiedenen Nährmedien konnte gezeigt werden. Mit dem EGFP wurde das YE-Medium für die Expression von rekombinanten Proteinen evaluiert, denn am Ende des exponentiellen Wachstums lag eine Konzentration von 195 mg EGFP pro Liter Kulturlösung vor ($X_{exp} = 2 \text{ g/l}$). Der verwendete Stamm enthielt eine in das Genom integriert Einzelkopie des *egfp*. Eine deutlich niedrigere Konzentration erreichten Breitling *et al.* [12] mit 10 mg EGFP/l Kulturvolumen. Dort beschrieben ist eine Steigerung der Expressionshöhe auf 30mg/l durch mehrfache Integrationen des Fremdgens. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die EGFP-Konzentration über die Fluoreszenz und nicht über SDS-PAGE bestimmt wurde. Weiterhin sind in dieser Publikation keine Aussagen bezüglich der Zelldichte oder der Trockenbiomassekonzentration enthalten. Wahrscheinlich wurde hier die Standkultur mit einer sehr geringen Zelldichte verwendet. Diese würde die Unterschiede in der Konzentration um den Wert 20 erklären.

Als zweites rekombinantes Protein wurde das Oberflächenantigen SAG2 von *T. gondii* exprimiert. Nach einer erfolgreichen Expression und Aufreinigung soll das Protein in einem ELISA-Test zum Nachweis von *T. gondii* in Tier- und Menschenseren Verwendung finden. Der Aufbau und die Evaluierung des ELISA erfolgt am Forschungszentrum fzmb GmbH. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Wachstumsverhalten und die Produktbildung des rekombinanten Stammes und eine erste Reinigung des SAG2 untersucht.

Das SAG2 konnte erfolgreich mit *L. tarentolae* exprimiert werden, was durch den His₆-Tag im Western Blot nachgewiesen wurde. Das SAG2 war zu gering konzentriert für eine Proteinbestimmung nach Bradford (Nachweisgrenze: 0,05 – 0,5 µg Protein/ml, [144]), weshalb eine 100fache Aufkonzentrierung durch TCA-Fällung erforderlich wurde.

Ein Vergleich mit der SAG2-Expressionshöhe von *L. tarentolae* mit der Expression in Bakterien, Hefe- oder Insektenzellen [67 - 71] ist nicht möglich, da die Literaturstellen diesbezüglich keine Aussagen enthalten. Im Fokus stehen dort vielmehr die Reaktion von IgG- und IgM-Antikörpern auf das rekombinante Protein und dessen Verwendbarkeit für die Entwicklung spezifischer Nachweistests. Die Reaktion von Seren immunisierter Kaninchen auf das SAG2-Protein ist Gegenstand der Forschung der fzmb GmbH und wird in dieser Arbeit nicht betrachtet.

Im SDS-PAGE zeigte sich neben einer SAG2-Hauptbande eine geringer konzentrierte Schattenbande. Beide wurden im Western Blot detektiert und haben auf dem Säulenmaterial der Metall-Affinitätschromatographie gebunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich

Diskussion

um ein verkürztes SAG2 mit His₆-Tag handeln könnte. Im Komplexmedium trat die Schattenbande erst nach 24 h Kultivierungszeit auf, was auf eine über die Kultivierungszeit ansteigende Exoproteaseaktivität hinweist. Dagegen zeigte sich diese Bande im definierten Medium mit einer nahezu konstanten relativen Intensität über die gesamte Kultivierung. Wahrscheinlich trat eine basale Proteaseaktivität auf, die unabhängig von dem morphologischen Zellzustand war. Bei einer Instabilität des SAG2 wäre das Verhältnis der Banden zueinander konstant und nicht die relative Intensität über die gesamte Lane. Auch im Downstream Processing konnten die beiden Banden nicht voreinander getrennt werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob beide SAG2-Formen im ELISA die gleiche Antigenität aufweisen und ob eine gezielte Trennung notwendig ist.

Bei der Kultivierung im Bioreaktor konnte eine SAG2-Bildung nachgewiesen werden. Jedoch folgte die Produktbildung nicht dem exponentiellen Wachstum und der spezifische SAG2-Anteil nahm tendenziell ab. Dieser Befund könnte auf eine überwiegend wachstumsentkoppelte Produktbildung und proteolytischen Abbau hinweisen. Eine Erklärung wäre auch eine Inhibition des konstitutiv exprimierten und sekretierten Produktes. Diese würde aber schon bei sehr geringen SAG2-Konzentrationen wirken.

Bei dem Wachstumsverhalten zeigte sich, dass das μ unabhängig von dem verwendeten Nährmedium sinkt. Dieses Absinken ist wahrscheinlich physiologisch bedingt. Dieser Stamm ist als System betrachtet nicht steuerbar und somit für eine gezielte Prozessführung z. B. μ -geführter FedBatch nicht verwendbar. Untersuchungen mit weiteren konstitutiven Stämmen müssen zeigen, ob dieses Verhalten im Allgemeinen durch den konstitutiven Wirtsstamm oder durch das spezielle Wirt-Vektor-System ausgelöst wurde. Eine Alternative würde ein induzierbarer Expressionsvektor bieten.

Mit der Hyaluronidase-1 konnte die heterologe Expression eines Glykoproteins mit *L. tarentolae* nachgewiesen werden. Die korrekte Integration der Expressionskassette mit dem Gen für *hyal-1* in das Genom wurde bewiesen, weiterhin die spezifische Hyal-1-Aktivität im Nährmedienüberstand und im Zellpellet. Jedoch war die Proteinkonzentration auch nach TCA-Fällung zu gering, um im SDS-PAGE eine konkrete Bande zu identifizieren. Im sensitiveren Western Blot wurde nur eine sehr schwache Bande detektiert. Grundlegende Experimente zur Aufkonzentrierung der Hyal-1 durch Affinitäts- und Kationenaustausch-chromatographie waren leider nicht erfolgreich. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um eine gezielte Reinigungsstrategie zu entwickeln. In der Literatur wird darauf hingewiesen, dass die Hyal-1 sehr adsorptiv an Oberflächen ist und ein Zusatz an Detergenz im gesamten Downstream notwendig ist [61].

Die gemessenen Enzymaktivitäten sind allerdings deutlich höher als bisherige Literaturangaben. Hofinger *et al.* [61] erzielten mit Insektenzellen eine maximale Aktivität von

Diskussion

150 nmol NAG/ min/ ml Zellsuspension nach 10 Tagen Produktinduktion. Mit dem *L. tarentolae* Expressionssystem konnten unter nicht optimierten Bedingungen 8mal höhere Enzymaktivitäten gemessen werden, nach nur 3 Tagen Induktion und Kultivierung in der Standkultur. Auch unter Berücksichtigung der Zelldichte weist *L. tarentolae* eine höhere Produktivität auf. Damit zeigt sich das große Potential dieses neuen Systems. Unter Verwendung von Schüttelkolben bzw. Bioreaktoren können noch viel höhere Zelldichten und damit höhere Proteinausbeuten erzielt werden.

Die hohen Aktivitätswerte lassen vermuten, dass die Hyaluronidase-1 nativ gefaltet ist, Disulfidbrücken besitzt und sehr wahrscheinlich eine Glykosilierung vorliegt, denn bei fehlender Glykosilierung sinkt die Aktivität dramatisch [61]. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Glykosilierung der Hyaluronidase sowie die Glykosilierungsstruktur nachzuweisen. Die Analyse der Oligosaccharidseitenketten von Glykoproteinen ist eine komplexe und stereochemisch anspruchsvolle Aufgabe [145]. Da die Verknüpfungsmöglichkeiten von Zuckereinheiten sehr vielfältig sind, bedarf es zum einen der Analyse der Monosaccharidbausteine, zum anderen auch der anomeren Konfiguration (α oder β -glycosidische Bindung zwischen den Zuckern) und der Verknüpfungsrichtung. Die Analyse ist neben der Komplexität auch technisch, zeitlich und personell aufwendig. Es gibt die verschiedensten Techniken, beispielsweise die HPLC kombiniert mit der Massenspektrometrie, die LC-MS und die 2D-Elektrophorese [145]. Die Informationen über die räumliche Anordnung der Monomere und die Konformation der glykosidischen Bindung werden mit Hilfe biophysikalischer Methoden wie NMR-Spektroskopie, Computerberechnungen und Röntgenwinkelsowie Neutronenstreuungen gewonnen [146]. Die strategische Kombination der NMR-Spektroskopie mit Molecular Modelling Methoden ist besonders aussagekräftig [146].

Festzuhalten ist, dass sich *L. tarentolae* grundsätzlich zur Expression von rekombinanten Proteinen, besonders Glykoproteinen, eignet, jedoch ist die Expressionshöhe weiter zu optimieren. Nachgewiesen wurde, dass die entwickelten Nährmedien auch die Expression von Fremdproteinen unterstützen. Auch die FedBatch-Strategie mit definiertem Medium konnte zur Herstellung von rekombinantem Protein angewendet werden.

6 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung des biotechnologischen Potentials des *Leishmania tarentolae* Expressionssystems. Der Fokus lag auf der Bestimmung von statischen und dynamischen Prozessparametern, um eine optimale Kultivierung der promastigoten Form von *L. tarentolae* zu ermöglichen, da diese rekombinante Proteine außergewöhnlich homogen N-terminal glykosilieren und Strukturen vom Säugertyp erzeugen kann [Breitling *et al.* (2002)].

Das Nährmedium ist der wichtigste statische Prozessparameter. Für die Kultivierung von *L. tarentolae* stehen nun verschiedenen Komplexmedien zur Verfügung, die hohe Wachstumsraten ($\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$) und hohe Zeldichten ($6,5 \times 10^8 - 1 \times 10^9 \text{ Zellen/ml}$) unterstützen. Mit dem YE-Medium konnte ein Nährmedium etabliert und evaluiert werden, welches nur noch Hemin als Substanz tierischen Ursprungs („animal-derived“) enthält. Die maximale spezifische Wachstumsrate beträgt $0,103 \text{ h}^{-1} \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ im YE-Medium. Es ist relativ einfach und preiswert herzustellen.

Das YE-Medium ist ein komplexes Nährmedium mit einer Vielzahl von Substanzen in unbekannter Konzentration. Trotzdem konnte es erfolgreich für Wachstumsexperimente, auch unter limitierenden Glukose- oder Heminbedingungen (Chemostaten), für Untersuchungen zur primären Kohlenstoffquelle, zur Eisenquelle und zu physiologischen Parametern wie der Temperatur und dem pH-Wert eingesetzt werden.

Eine Kultivierung von *L. tarentolae* ist als Standkultur, im Schüttelkolben oder im Bioreaktor möglich. Die geringsten Verdopplungszeiten (6,7 h im YE-Medium) weisen die Zellen unter geschüttelten oder gerührten Bedingungen auf. Die entwickelten Nährmedien sind für eine Kultivierung im Bioreaktor geeignet. Die Langzeitstabilität des Wachstums in der Standkultur konnte durch über 50 Passagen im YE-Medium nachgewiesen werden. Somit sind konstante Anfangsbedingungen für größere Kultivierungsmaßstäbe für jeweils ein halbes Jahr problemlos gewährleistet.

Glukose erwies sich als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle, deren Metabolismus im Komplexmedium mit einem Ansäuern des pH-Wertes verbunden war. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/GLC}$ wurde mit $0,93 \pm 0,09 \text{ g Trockenbiomasse/ g Glukose}$ ermittelt. Eine glukoselimitierte Kultivierung (Chemostat) war auch mit Komplexmedium möglich, wobei eine Halbsättigungskonzentration K_s des Monod-Modells zu $0,046 \text{ g/l}$ Glukose bestimmt wurde. *L. tarentolae* zeigte eine große Toleranz gegenüber Glukose, denn eine wachstumsinhibierende Wirkung setzte ab einer Konzentration von 60 g/l (26°C) bzw. 40 g/l (30°C) ein.

Zusammenfassung

Hemin ist der essentielle Wachstumsfaktor für die Kultivierung von *L. tarentolae* und stellt eine interessante Steuergröße für einen Bioprozess dar. Grundlegende Voraussetzung war die Etablierung einer Heminanalytik, was mit einer wässrigen 2-Phasen-Extraktion in saures Chloroform gelang. Die Identifizierung der Haupteinflussgrößen auf diese Analytik führte zur Festlegung einer Standardprozedur. So konnte ein Ertragskoeffizient $Y_{X/H}$ von 834 g TBM pro g Hemin für exponentielles Wachstum über eine Standardkurve ermittelt werden. Dieser Ertragskoeffizient repräsentiert alle „heminverbrauchenden“ Vorgänge bei der Kultivierung, denn die Adsorption an die Glasoberfläche des Kultivierungsgefäßes beeinflusst in großem Maße die freie Heminkonzentration. Auch wenn nur ein Teil des zugegebenen Hemin tatsächlich von den Zellen verbraucht wird, ist die komplette Zugabe erforderlich, damit den Zellen genügend Hemin zur Verfügung steht. Der ermittelte Ertragskoeffizient ist für eine Prozessmodellierung anwendbar, was beispielhaft an einem heminlimitierten Chemostaten gezeigt wurde. Überraschend war, dass die Zellen der Kultivierung in einem heminlimitierten Prozess folgten, da Hinweise auf einen Heminspeicher vorhanden waren. Die Zellen konnten bei Heminmangel das Wachstum für ca. 3 Generationen fortsetzen. Eine Halbsättigungs-konzentration des Substrates Hemin (K_H) von 31 µg/l wurde berechnet und kann als Orientierungsgröße für zukünftige Untersuchungen dienen. Hemin ist die einzige verbleibende Substanz tierischen Ursprungs (Rind oder Schwein) und kann gegenwärtig nicht durch eine Alternativsubstanz oder ein handelsübliches, synthetisch hergestelltes Heminpräparat ersetzt werden.

Die Untersuchungen ergaben ein optimales Wachstum von *L. tarentolae* bei einer Temperatur von 30°C. Dies wurde sowohl im Schüttelkolben als auch im Bioreaktor bestätigt. Sehr überraschend war dieser Befund, da die Promastigoten der *Leishmania* Spezies gewöhnlich bei 22 – 28°C, aber hauptsächlich bei 26°C kultiviert werden. Höhere Temperaturen lösen im Allgemeinen eine Transformation in die amastigote Form aus. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 26°C auf 30°C resultierte in einem Anstieg der spezifischen Wachstumsrate um ungefähr 30 %. Die Verdopplungszeit reduzierte sich von 6,9 h auf 5,4 h. Für einen Produktionsprozess bedeutet dies einen deutlichen Zeitgewinn.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine Kultivierung im neutralen pH-Bereich (pH 6,9 – 7,6) optimal ist. Für eine Schüttelkolbenkultivierung sind ein pH-Puffersystem und eine rechtzeitige Passagierung zu empfehlen, wobei die Zellen verschiedene Puffersysteme, beispielsweise mit Zitronensäure, Kalium- oder Natriumphosphat oder Tris/HCl tolerieren. Für die Kultivierung im Bioreaktor ist eine pH-Regelung sinnvoll. Außerhalb dieses optimalen pH-Bereiches zeigten sich Wachstumsinhibitionen. Bei pH-Werten > 7,6 begannen erste Zelldegenerationen und bei Verringerung des pH-Wertes zu pH 5 zeigte sich eine unvollständige Umwandlung in die amastigote Form.

Zusammenfassung

Drastische Veränderungen der extrazellulären Umgebung oder des Metabolismus werden in morphologischen Änderungen der Zellen abgebildet. Dies ist eine wichtige Erkenntnis zur Charakterisierung des Wachstums. Zelldegenerationen traten bei pH-Werten $> 7,6$ und bei alten Kulturen auf. Sind die Zellen mit einer hohen Wachstumsrate gewachsen, z. B. beim Einschwingen/ Auswaschen des Chemostaten oder einem exponentiellen Wachstum im Schüttelkolben, dann war die Länge der Geißel kleiner als die des Zellkörpers, teilweise auch extrem verkürzt oder nicht mehr vorhanden. Der Zellkörper war immer dick und tropfenförmig. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen bei Wachstum unter limitierten Bedingungen (Steady State des Chemostaten) deutlich verlängerte Geißeln, die die doppelte Länge des Zellkörpers annehmen konnten. Auch war der Zellkörper viel dünner, aber immer noch tropfenförmig. Bei der GLC-geführten Kultivierung zeigte sich sogar eine Abhängigkeit von der Verdünnungsrate (D), denn die Zellen waren viel schlanker bei einem kleinen als bei einem großen D. Nach dem Umschalten auf den Aminosäure-Metabolismus erschienen die Zellen sehr dünn und bildeten längere Geißeln aus. Keine Veränderungen wurden bei Variation der Kultivierungstemperatur registriert.

Weiterhin wurden verschiedene FedBatch-Strategien zur Erzielung hoher Zelldichten beim Wachstum auf Glukose entworfen. Es empfiehlt sich, die Glukose und das Hemin unlimitiert zu halten und Nährmedienkonzentrat zuzudosieren. Mit dieser Strategie konnte im YE-Medium eine maximale Zelldichte von $1,8 \times 10^9$ Zellen/ml ($X_{max} = 14,5$ g/l TBM) unter Verbrauch von Glukose erzielt werden. Dies ist eine deutlich höhere Zelldichte als mit bisherigen Verfahren und Nährmedien bei Wachstum auf Glukose erzielt wurde (Schüttelkolben mit YE-Medium: $X_{exp} = 3,4 \times 10^8$ Zellen/ml). Im Vergleich zu Angaben von Simpson *et al.* (1996) bedeutet dies eine 4,5mal höhere Zelldichte.

Für einen Bioprozess empfiehlt sich die Einhaltung eines Drehzahlbereiches von 100 bis 400 rpm bei Verwendung von Schrägblattrührern. Im Bereich von 400 – 500 rpm begann die Lyse einzelner Zellen. Vorteilhaft ist die Regelung des pH-Wertes mit Kali- oder Natronlauge, der Einsatz von Silikonöl zur Schaumbekämpfung oder die Verwendung von PEG-Hemin, welches durch den PEG1000-Anteil eine Antischaumwirkung besitzt.

Bei der Entwicklung der definierten SFP-Medien trat das Problem der Heminfällung auf. Mit BSA und PEG1000 konnten zwei Lösungsvermittler gefunden werden. Aufgrund der synthetischen Herstellung und der geringeren Neigung zur Schaumbildung ist das PEG1000 zu bevorzugen. Im definierten SFP-Medium konnte nahezu eine Verdopplung der Zelldichte durch Zugabe von Hefe-RNA erzielt werden ($N_{max} = 2,8 - 3,3 \times 10^8$ Zellen/ml). Der Abbau der Hefe-RNA als auch die signifikante Reaktion der Zellen auf die Zugabe dieses Substrates konnte gezeigt werden. Mit einer FedBatch-Strategie, bei der Nährmedium ausgetauscht

Zusammenfassung

wurde, konnte der Prozess über 5 Generationen gehalten werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Prozessparameter pH, pO₂ und CO₂ wichtige Orientierungsmöglichkeiten bieten.

Die Untersuchungen belegen, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen das Monod-Modell für das Wachstum von *L. tarentolae* grundsätzlich eine Gültigkeit besitzt, ausgenommen bei einer Glukoseinhibition. Weiterhin wurde deutlich, dass der Substrateinfluss größer als der Temperatur- oder pH-Einfluss ist. Dieses eröffnet gute Steuermöglichkeiten für μ beziehungsweise ν .

Mit den Untersuchungen am Wildtyp-Stamm konnten grundlegende Parameter und Strategien für eine optimale Kultivierung herausgearbeitet werden und als Orientierungspunkte bei konkreten Wirt-Vektor-Systemen dienen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die Expression der Modellproteine Hyaluronidase-1, Oberflächenantigen SAG2 von *Toxoplasma gondii* und EGFP übertragen. Die entwickelten Nährmedien unterstützen die Expression der Fremdproteine. Das Wirts-Vektor-System mit intrazellulärer Expression von EGFP zeigte nahezu identische Wachstumsraten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Dagegen war ein Absinken von μ und ν bei dem konstitutiv, sekretorischen SAG2-Stamm zu registrieren, unabhängig von dem verwendeten Nährmedium. Die Expression des SAG2 wurde im Western Blot durch den His₆-Tag nachgewiesen, jedoch erst nach 100facher Aufkonzentrierung des Nährmedienüberstandes. Eine Proteinkonzentrationsbestimmung war nicht möglich. Die Antigenität des rekombinanten SAG2 müssen weitere Untersuchungen zeigen. Bei der Bioreaktorkultivierung folgte die SAG2-Bildung nicht dem exponentiellen Wachstum. Der spezifische SAG2-Anteil nahm tendenziell ab. Eine Produktinhhibition wurde vermutet.

Mit der Hyaluronidase-1 erfolgte die heterologe Expression eines Glykoproteins. Die korrekte genomische Integration des *hyal-1*-Gens wurde bewiesen. Die spezifische Hyal-1-Aktivität im Nährmedienüberstand war 8mal höher als die von Hofinger *et al.* (2007) für Insektenzellen beschriebene. Jedoch war die Proteinkonzentration auch nach TCA-Fällung zu gering, um im SDS-PAGE eine konkrete Bande zu identifizieren. Im sensitiveren Western Blot wurde nur eine sehr schwache Bande detektiert. Unter Berücksichtigung der Zelldichte und der kürzeren Induktionszeit weist *L. tarentolae* eine höhere Produktivität auf. Damit zeigt sich das große Potential dieses neuen Systems. Die hohen Aktivitätswerte weisen auf eine nativ gefaltete und glykosilierte Hyaluronidase-1 hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern deutlich die Kenntnisse über das *L. tarentolae* Expressionssystem, vor allem in Vorbereitung einer biotechnologischen Nutzung. Mit den ermittelten Halbsättigungskonstanten für Glukose und Hemin, den maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsraten sowie den Ertragskoeffizienten für Glukose und Hemin ist

Zusammenfassung

die Basis für alle weitere Fermentationsprozessentwürfe und –optimierungen gelegt. Mit den Nährmedien und Prozessstrategien können hohe Zeldichten in Verbindung mit Verdopplungszeiten von 5 - 7 h erzielt werden. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, Promastigoten von *L. tarentolae* für die Produktion von rekombinanten Proteinen zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung am Menschen einzusetzen. Durch die Möglichkeit der N-Glykosilierung von humanen Proteinen kann *L. tarentolae* als alternatives Expressionssystem zu Zellkultursystemen wie BHK oder CHO-Zellen eingesetzt werden.

7 Summary

The main objective for this work was the examination of the biotechnological power of the *L. tarentolae* expression system. Static and dynamic process parameters had to be determined for an optimal cultivation of the promastigote cell type of *L. tarentolae*, because promastigotes can produce recombinant proteins with an animal-like N-glycosylation pattern [Breitling *et al.* (2002)].

The nutrient media is the important static process parameter. Different nutrient media are now available for the cultivation of *L. tarentolae*, which support high growth rates ($\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$) and cell densities ($6.5 \times 10^8 - 1 \times 10^9 \text{ cells/ml}$). A nutrient media, containing only hemin as animal-derived substance, could be established and evaluated with the YE-medium. The maximal specific growth rate is $0.103 \text{ h}^{-1} \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ in the YE-medium. It could be prepared relatively easy and cheap.

The YE-medium is a complex nutrient media, containing a mass of substances with unknown concentrations. Nevertheless, the media was successfully used for growth experiments, also under limiting glucose or hemin concentrations (chemostate), for investigations to the primary carbon source, to the iron source and to physiological parameters like temperature or pH.

L. tarentolae could be cultivated as static culture, in shaker flasks or bioreactors. The least doubling times (6.7 h in the YE-medium) offered the cells under shaked or agitated conditions. The developed media are appropriate for bioreactor cultivations. The long-term stability of growth was demonstrated for more than 50 passages as static suspension culture in the YE-medium. Thus, constant initial conditions for larger scales are provided for about half a year.

Glucose was proved as primary carbon and energy source, whose metabolism in complex media was accompanied with an acidification of the pH. The yield coefficient $Y_{X/GLC}$ was determined to 0.93 ± 0.09 gram cell dry weight per gram glucose. A glucose-limited cultivation (chemostate) was possible with complex medium, resulted in determination of the Monod-constant (K_S) to 0.046 g/l glucose. *L. tarentolae* showed a huge tolerance to glucose, because a growth inhibition occurred first at 60 g/l glucose (at 26°C cultivation temperature) and 40 g/l (at 30°C) respectively.

Hemin is the essential growth factor for the cultivation of *L. tarentolae* and an interesting control factor for a bioprocess. Therefore, the fundamental prerequisite was the establishment of an analytical method, which succeeded with an aqueous two-phase extraction in acidic chloroform. The identification of the main influencing variables to this analytical method resulted in a final standard procedure. For an exponential growth, a yield

Summary

coefficient ($Y_{X/H}$) of 834 gram cell dry weight per gram hemin could be determined by comparison to a standard plot. This yield coefficient represents all "hemin-consuming" procedures during the cultivation, because the free hemin concentration was influenced largely by the adsorption of hemin to the glass surface of the cultivation vessel. Even if only a portion of the declared hemin is used by the cells, addition of the whole hemin is necessary in order that sufficient hemin is available for the cells. The determined yield coefficient is applicable for bioprocess modelling, which was exemplified with a hemin-limiting chemostate. The cells of the cultivation followed the hemin-limitation of the process. This was surprising, because details to a hemin accumulation of the cells existed. The cells could continue growth for approximately 3 generations under hemin deprivation. A Monod-constant for the substance hemin (K_H) could be calculated to 31 µg/l. This is an important factor for future investigations. Hemin is the only substance of animal origin (bovine or pork), but currently it could not be replaced by an alternative substance or a commercially available, synthetic hemin preparation.

During these studies, an optimal growth of *L. tarentolae* could be determined at a cultivation temperature of 30°C. This was approved in the shaker flask and in the bioreactor. This result was very astonishing, because promastigotes of the *Leishmania* species were normally cultivated at 22 – 28°C, but mainly at 26°C. In general, higher temperatures induce the transformation to the amastigote cell type. The increase of the cultivation temperature from 26°C to 30°C resulted in a rising of the specific growth rate at about 30%. The doubling time was reduced from 6.9 h to 5.4 h. This could be a considerable saving in time for a production process.

As a basic principle, the optimal pH-range for the cultivation is the neutral one (pH 6.9 – 7.6). For cultivations in shaker flasks, the use of a pH-buffer system and well-timed passages into new media are recommended. The cells tolerate different buffer systems like citric acid, potassium- or sodium phosphate or Tris/HCl. For bioreactor cultivations, the regulation of the pH is advisable. Growth inhibitions occurred out of the optimal pH-range. At pH > 7.6 cell degenerations started and by reduction to pH 5, an incomplete transformation to the amastigote cell type appeared.

Drastic variations of the extra cellular environment or the metabolism are represented in morphological changes of the cells. This is an important conclusion for characterization of the growth. Degeneration of the cells occurred at pH > 7.6 and in old cultures. If cells grew at high growth rates, e.g. engage / wash out of the chemostate or exponential growth in a shaker flask, then the length of the flagellum was less the length of the cell body. Partially, the flagellum was extremely shortened or degenerated. The cell body was always thick and drop-like. In contrast, clearly extended flagellates, about twice the length of the cell body,

Summary

were shown by cells growing under limited conditions (steady state of the chemostate). The cell body was much thinner, but also drop-like. The glucose-limited cultivation showed a dependency between morphological changes and dilution rate, because the cells were much thinner at a small dilution rate than at a larger one. After the switch in metabolism, the cell appeared very thin with longer flagellates. No morphological changes were recognized during the variation of the cultivation temperature.

Furthermore, different fedbatch-strategies for high cell densities during growth on glucose were designed. It is recommended to hold glucose and hemin unlimited and to feed a concentrate of the nutrient media. With this strategy a maximal cell density of 1.8×10^9 cells/ml ($X_{\max} = 14.5$ g/l CDW) could be achieved in the YE-medium and under metabolism of glucose. This is a clearly higher cell density compared to cell densities of previous methods and media (shaker flask with YE-medium: $X_{\exp} = 3.4 \times 10^8$ cells/ml). In contrast to literature values [Simpson *et al.* (1996)] meaning these 4.5 higher cell densities.

A stirrer range of 100 rpm to 400 rpm is advisable for a bioprocess (by use of 2-blade turbines). Lyses of some cells started at 400 – 500 rpm. Advantageously is the regulation of the pH by using caustic potash or caustic soda, the use of silicone oil to reduce foam and the utilization of PEG-hemin, which has an anti-foam effect through the PEG1000-portion.

During the development of the defined SFP-media problematic hemin precipitations occurred, which could be prevented by the use of BSA and PEG1000. PEG1000 is advantageous to BSA because of the synthetic production and the reduced formation of foam. The cell density in the defined SFP-media could be nearly doubled by addition of yeast-RNA ($N_{\max} = 2.8 - 3.3 \times 10^8$ cells/ml). The metabolism of the yeast-RNA and also the significant reaction of the cells to the addition of this substrate could be demonstrated. By using a fedbatch strategy, which includes the exchange of nutrient media, the process could be held for five cell generations. Furthermore, important orientations are offered by the process parameters pH, pO_2 and CO_2 .

The investigations of this work occupy that under the used experimental conditions the Monod-model is in power for the growth of *L. tarentolae*, excluding glucose inhibition. Moreover, it was clearly pointed out, that the effects of substrates are greater than the influence of temperature or pH. This inaugurates good control possibilities for μ or ν , respectively.

Basic parameters and strategies for an optimal cultivation were detected and designed by using the wild type strain. These could be utilized as orientation for the use of concrete host-vector-systems. The earned knowledge's were transferred to the expression of the model proteins hyaluronidase-1, surface antigen SAG2 of *Toxoplasma gondii* and EGFP. The

Summary

developed nutrient media supported the expression of the recombinant proteins. The host-vector-system with intracellular expression of EGFP showed nearly identical growth rates in comparison to the wild type-organism. In contrast, a decrease of μ and ν was registered for the constitutive, secretory SAG2-strain, which was independent to the used nutrient medium. The expression of the SAG2-protein was proved by detection of the fused His₆-tag in the western blotting after a one hundred-times concentration of the media supernatant. Determination of the protein concentration was not possible. Further investigations have to show the antigenicity of the recombinant SAG2. During the bioreactor cultivation, the formation of the SAG2 did not follow exponential growth. The specific SAG2-ratio decreased tendentially. A product inhibition is assumed.

With the hyaluronidase-1, a recombinant glycoprotein has been expressed. The correct genomic integration of the *hyal-1* gene was verified. The specific Hyal-1 activity in the media supernatant was eight times higher than the reported one for insect cells [Hofinger *et al.* (2007)]. But a concrete protein band in the SDS-PAGE could not be identified, because the protein concentration was too small, also after TCA-precipitation. In the western blotting a very thin band was detected. Under consideration of the cell density and the shortened induction time, *L. tarentolae* has a higher productivity compared to insect cells. In that, the great potential of this new system is shown. The high activity values indicate a natively folded and glycosylated hyaluronidase-1.

The results of this work enlarge clearly the knowledge about the *L. tarentolae* expression system, mainly in preparation of a biotechnological utilization. The basis for future bioprocess strategies and optimizations is set with the determination of the Monod-constants for glucose and hemin, the maximal specific growth and doubling rates and also the yield coefficients for glucose and hemin. High cell densities in combination with doubling times of 5-7 h are possible with the developed nutrient media and strategies. Therewith, prerequisites for the use of the promastigotes of *L. tarentolae* for production of recombinant proteins for diagnostic or therapeutic purposes at humans are made. Because of the possibility for N-glycosylation of human proteins, *L. tarentolae* is an alternative system to mammalian cells like BHK or CHO-cells.

8 Ausblick

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist eine grundlegende Charakterisierung des *L. tarentolae* Expressionssystems in Bezug auf statische und dynamische Prozessparameter erfolgt. Weiterhin sind verschiedene Strategien zur Kultivierung des Organismus im Bioreaktor aufgezeigt und das biotechnologische Potential des Systems an der Expression verschiedener Modellproteine demonstriert wurden. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann eine optimale Kultivierung von *L. tarentolae* erfolgen.

Weiterführende Untersuchungen sind im Bereich der Vorkulturstrategie bei Fermentationen notwendig. Es ist zu prüfen, ob die Prozessführung von der Standkultur über zwei Schüttelkolben-Stufen bis zum Bioreaktor verkürzt werden könnte, um Vorbereitungszeit einzusparen.

Die Suche nach einer Hemanalternative oder einem synthetisch hergestellten Heminpräparat sollte fortgesetzt werden, da Hemin die einzige verbleibende „animal-derived“ Substanz sowohl im Komplex- als auch im definierten Medium ist.

Das SFP(III)-Medium muss noch bezüglich der Inhaltsstoffe ausbalanciert werden, um hier die minimal notwendigen Substanzen in einer optimalen Konzentration einzusetzen. Anwendung könnten die Methoden der statistischen Versuchsplanung finden. Auch sollte ein anderes Präparat der Hefe-RNA verwendet werden, da dieses sehr preisintensiv ist. Zu überprüfen ist, ob eine Kultivierung mit Ribonukleinsäuren anderer Organismen möglich ist.

Weiterhin zeigten sich interessante Schaltbereiche, die für eine Produktbildung ausgenutzt werden könnten, beispielsweise das Umschalten zwischen Glukose- und Aminosäuremetabolismus oder die Transformation von Promastigoten zu Amastigoten. Die Transformation ist besonders interessant, denn die Zellstadien zeigen eine unterschiedliche Genexpression. Bei Integration des Fremdgens in stark transkribierte Bereiche der Amastigoten könnten die Zellen als Promastigoten zu hohen Zelldichten kultiviert werden und anschließend die Produktbildung durch Transformation ausgelöst werden. Weiterführenden Untersuchungen sind notwendig, um die Anwendbarkeit dieser Produktbildungsstrategie zu überprüfen und geeignete Transformationsbedingungen herauszufinden. Bei der pH-Erniedrigung zeigte sich ansatzweise eine Umwandlung, jedoch keine bei Temperaturerhöhung. Eine Kombination beider Parameter wird als am effektivsten für langzeitstabile Amastigoten angesehen [106].

Die Ergebnisse zeigen, dass *L. tarentolae* sowohl glukose- als auch heminlimitiert kultiviert werden kann. Gezielte FedBatch-Strategien mit μ -Steuerung können nun geplant werden. Dabei kann die Gültigkeit des Monod-Modells unter Beachtung der Einschränkungen angewandt werden. Die ermittelten Halbsättigungskonstanten für Glukose und Hemin, den

Ausblick

maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsraten sowie den Ertragskoeffizienten für Glukose und Hemin können als Basis für weitere Fermentationsprozessentwürfe und – optimierungen dienen.

Weiterführende Untersuchungen sind im Bereich der Expression von Fremdproteinen erforderlich. Zwar zeigten die verwendeten Wirts-Vektor-Systeme eine Produktbildung, jedoch konnte die Konzentration nicht bestimmt werden (SAG2) oder die Konzentration war so gering, dass das Fremdprotein nur über die spezifische Enzymaktivität nachweisbar war (Hyal-1). Mit den optimierten Wachstumsbedingungen sollte die Produktbildung mit *L. tarentolae* weiter charakterisiert werden. Beispielsweise bietet sich die Strategie zur Erzielung hoher Zelldichten im Komplexmedium an, um nach Produktion von Zellmasse die Produktbildung zu induzieren. Bei der Verwendung von konstitutiv exprimierenden Stämmen ist das Phänomen eines physiologisch bedingten Absinkens von μ weiter zu beobachten. Untersuchungen mit weiteren konstitutiven Stämmen müssen zeigen, ob dieses Verhalten im Allgemeinen durch den konstitutiven Wirtsstamm oder durch das spezielle Wirt-Vektor-System (SAG2-Stamm) ausgelöst wurde.

Ein interessanter Ansatzpunkt ist eine Biofilmbildung von *L. tarentolae*, die sich gezielt durch Ausfällung von Hemin, z. B. mit Natriumphosphat, auslösen lassen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dadurch könnte *L. tarentolae* auch in Immobilisierungs- oder Festbettreaktoren eingesetzt werden.

Für den Einsatz des *L. tarentolae* Expressionssystems für die Produktion von rekombinanten Proteinen zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung am Menschen sind fortführende Untersuchungen notwendig. Beispielsweise sollte nach alternativen Promotoren gesucht werden. Gegenwärtig werden zu viele Antibiotika für die Stabilität des Genkonstruktes eingesetzt. In einem Produktionsprozess sollen zukünftig keine Antibiotika-basierten Selektionssysteme mehr verwendet werden [1]. Weiterhin ist interessant, in wieweit *Leishmania* Zellen von Viren befallen werden können. Dazu findet sich gegenwärtig keine Literatur. Eine Virussicherheit ist wichtig für einen Produktionsprozess.

9 Anhang

Anhang 1: Herstellungsvorschrift für das synthetische Nährmedium nach Träger. Chemikalien wurden von Carl Roth, SIGMA oder Fluka in analytischer Reinheit verwendet.

Komponenten	Konzentration [mg/l]	Konz.- Faktor	Einwaage [mg]	Endvolumen [l] {Stammlösung}	Lösungsmittel/ Sterilisierungsart
Aminosäuren					
Glycin	100		100		
L-Alanin	700		700		
L-Arginin-Hydrochlorid	300		300		
L-Histidin-Hydrochlorid- H ₂ O	162		162		
L-Isoleucin	600		600		
L-Leucin	1500		1500		
L-Lysin-Hydrochlorid	1250		1250		
L-Methionin	300	2	300	0,5	
L-Phenylalanin	400		400		
L-Prolin	500		500		
L-Serin	400		400		
L-Threonin	500		500		
L-Tryptophan	200		200		
L-Valin	500		500		
L-Asparaginsäure	1200		1200		
L-Glutaminsäure	1900		1900		
L-Tyrosin	400		100	1000	1M NaOH/ sterilfiltrieren
Vitamine					
	[mg/l]				
Folsäure	1,6		16		
Biotin	0,2		1000	2	
Riboflavin	2			20	1M NaOH/ sterilfiltrieren
Cholinchlorid	3		30		
i-Inositol	3		30		
Niacinamid/ Nicotinamid	5		50		
Pyridoxa-Hydrochlorid	2		20		
Pyridoxin-Hydrochlorid	2		20		
Thiamin-Hydrochlorid	2		20		
Pyridoxamin-2 HCL	2		20		
Para-Aminobenzoësäure	3		2000	60	96% Ethanol / -
D-Calciumpantothenat	8		2000	160	Wasser/ sterilfiltrieren
Nukleotide					
Adeninsulfat	2,317		500	11,585	
Guanin-Hydrochlorid	1,7			8,5	0,01
Uracil	1,7		1000	17	
Xanthin-Na	1,96			19,6	0,01
Cytidin-3'(+2')- Monophosphat (Cytidylic Acid)	0,5		1000	5	1M NaOH/ sterilfiltrieren
					Wasser/ sterilfiltrieren

Anhang

Komponenten	Konzentration [mg/l]	Konz.-Faktor	Einwaage [mg]	Endvolumen [l] {Stammlösung}	Lösungsmittel/Sterilisierungsart
Anorganische Salze					
Calciumchlorid (CaCl ₂) (anhyd.)	26	269	700	0,1	Wasser/autoklavieren
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1000	20	2000	0,1	Wasser/autoklavieren
Kaliumphosphat monobasic (KH ₂ PO ₄)	500		500		
Natriumchlorid (NaCl)	2000	10	2000	0,1	Wasser/autoklavieren
Natriumphosphat dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1250 (ohne H ₂ O)		1562,5		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10		100		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22		220		
H ₃ BO ₃	0,11	100	1,1	0,1	
MnSO ₄ ·H ₂ O	3		30		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,57 µM		3,74		
CuSO ₄	3,125 µM		7,8125		
					Lösung 1: FeSO ₄ + 800mg EDTA + 6g Zitronensäure in 40ml H ₂ O lösen. Mit KOH pH auf 5,5 stellen. Lösung 2: Restlichen Salze in 40ml H ₂ O in Reihenfolge lösen. Lösung 1 und 2 vereinen und pH mit KOH auf 6,5 stellen / sterilfiltrieren

Anhang 2: Anleitung für den Western Blot zur Detektion von His₆-getaggten Proteinen

Puffer und Lösungen

- Transferpuffer: 39 mM Glycin (Carl Roth), 48 mM TRIS (Merck), 0,037% (w/v) SDS (Merck), 20% (v/v) Methanol (Merck)
- TBST-Puffer: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl (Carl Roth),
⇒ pH auf 7,5 mit 10%iger HCl (Carl Roth) einstellen,
0,1% (v/v) Tween^R 20) (Carl Roth) zugeben
- TBS-Puffer: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, ⇒ pH auf 7,5 mit 10%iger HCl einstellen
- Blockpuffer: 50 ml TBST-Puffer mit 1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich)
1. Antikörper: 0,2 µg/ml Anti-His₆-Antikörper, (Mouse IgG1) (Roche Diagnostics GmbH), 1% BSA in TBS-Puffer
2. Antikörper: Fertiglösung Anti-Mouse IgG – konjugiert mit alkalischer Phosphatase (in der Ziege hergestellt) (Sigma-Aldrich) 1:30000 verdünnt, 1% BSA in TBS-Puffer gelöst
- Substrat: BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich)

Durchführung

- 12,5 %iges SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen prozessieren
- Gel, Membran (0,2 µm Nitrozellulosemembran, Kisker Biotech), 2xFilterpapier und Fiber pads 15 min in Transferpuffer äquilibrieren und anschließend die Blotapparatur zusammenbauen
- Prozessierung des Transfers bei 280 mA für 1 h
- Markierung der Membran nach Entnahme

Anhang

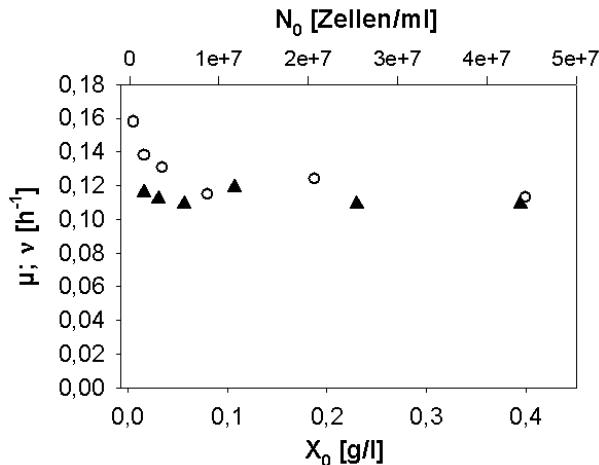
- Membran für 1 h in Blockpuffer
- Membran 3x5min mit TBST-Puffer waschen
- 1 h mit 1. Antikörper inkubieren
- 3x10min in TBST-Puffer waschen
- 1 h mit 2. Antikörper inkubieren
- 3x10 min in TBST-Puffer waschen
- 1x10min in TBS-Puffer waschen
- Membran trocknen lassen
- In Schale legen und Substrat mit Pasteurpipette tropfenweise auftragen
- 10 min bei Dunkelheit entwickeln

Anhang 3: Experimentelle Ergebnisse des Versuchsplanes 3 (Tab. 3-10, S. 32) mit der PA_{korr} als Antwortvektor. Die Versuche Nr. 2, 13, 14, 17 und 18 wurden nicht experimentiert, da ohne Hemin kein Absorptionspeak in der Chloroformphase messbar war.

Versuchs- nummer		Versuchsmatrix			\hat{Y}
		e_1	e_2	e_3	
1	Sternpunkte	1	0	0	36,26
2		-1	0	0	0
3		0	1	0	14,91
4		0	-1	0	15,56
5		0	0	1	14,79
6		0	0	-1	24,17
7	Eckpunkte 1	0	1	1	15,70
8		0	1	-1	23,50
9		0	-1	1	14,06
10		0	-1	-1	23,40
11	Eckpunkte 2	1	1	0	36,13
12		1	-1	0	39,65
13		-1	1	0	0
14		-1	-1	0	0
15	Eckpunkte 3	1	0	1	35,18
16		1	0	-1	53,81
17		-1	0	1	0
18		-1	0	-1	0
19	Zentralpunkt	0	0	0	15,86

Anhang

Anhang 4: Ablehnung der Hypothese einer partiellen GLC-Inhibition, d.h. die Glukose (11 g/l = konst.) wirkt nicht inhibierend auf die Anfangskonzentration der Zellen. (O) $\mu = f(X_0)$ und (\blacktriangle) $v = f(N_0)$, Raten im Bereich von 0 - 8 h ermittelt. Schüttelkolbenmaßstab A (siehe 3.2, S. 21), YE-Medium, 26°C.



Anhang 5: Programm für Berkeley Madonna zur Modellierung des Chemostaten mit Heminlimitation.

METHOD EULER

{Modellierung der Konti mit Heminlimitation ohne Speicherterm für Hemin}
 {Berücksichtigung, dass sich Hemin in der Vorlageflasche abbaut}
 STARTTIME = 0
 STOPTIME=200
 DT = 0.01
 INIT X=0.326
 INIT H=0.003 ;laut Referenzanalytik in Nährmedien/Zudosage getan
 INIT S=2.57
 Vr=93
 D=0.061
 muemax=0.109 ; gemittelte spezifische Wachstumsrate für YE-Medium
 Yhs=834 ; Ertragskoeffizient für Hemin, siehe Dissertation
 Hzu;if (TIME<=110) then 0.00153 else 0.0017 ; laut Analytik in der Zudosage bestimmt
 Kh=3.1e-5 ; mit Parameteranpassung des Modells bestimmt
 Yxs=0.93 ;gemittelter Ertragskoeffizient, siehe Dissertation
 szu;if(TIME>110) then 2.27 else 2.57 ; erfasst dass GLC unterschiedlich zwischen den zwei Vorratsflaschen
 Ks=0.046 ;Ks-Wert für Glukose, siehe Dissertation
 d/dt(x)=-D*X+mu*X
 mue=muemax*H/(Kh+H)*S/(Ks+S)
 d/dt(H)=D*(Hzu-H)-(1/Yhs)*mu*X-a
 a =if(TIME>=70 and Time<=110) or (TIME>=164 and TIME<=200) then 0.00007*EXP(-0.000024*(TIME-70)) else 0 ; Modell erweitert um einen Abbau von Hemin im YE-Medium
 d/dt(s)=D*(szu-s)-(1/Yxs)*mu*X

Anhang 6: Programm für MATLAB[®] zur Modellierung des FedBatch-Prozesses mit mehrfacher Zugabe von Nährmedienkonzentrat [116].

```
clear all, tim=cpu time;
fprintf(' \n\nZyklischer FedBatch %s %s\n', date, datestr(rem(now,1)));
% Messwerte
```

Anhang

```

t_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(C19:C74)');
cX_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(I19:I74)');
cS_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(K19:K74)');
V_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(R19:R74)');
m_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(S19:S74)');
% Parameterwerte (Konstanten)
% Kinetik
muem = 0.1268; % maximale Wachstumsrate [1/h]
K_I = 90; % Inhibitionskonstante [g/l] des unbekannten
           Substrates
% Biomasse
K_XD = 0.0025; % Biomassezerfallskoeffizient [1/h]
% Substrat
Y_XS2 = 0.3; % Biomasseertragskoeffizient [g_Biomasse/g_Substrat]
               des unbekannten Substrates
m = 0; % Maintenancekoeffizient [1/h]
Y_PS = 0.5; % Produktertragskoeffizient [g_Produkt/g_Substrat]
cS_EIN1= 500; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
cS_EIN2= 20; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Y
% Produkt
alpha = 0.00; % Koeffizient der wachstumsgekoppelten Produktbildung
beta = 0.00; % Koeffizient der teilweise wachstumsgekoppelten
               % Produktbildung [1/h]
K_PD = 0; % Produktzerfallskoeffizient [1/h]
% Volumen
V_EIN1 = 172.31; % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Glucose
V_EIN2 = 7463; % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Yeast
V_AUS1 = 7463; % Ablaufrate der Pumpe [ml/h] --> Zellsuspension
V_AUS2 = 5000; % Probenahme
T_EIN1 = 138; % Zulaufzeit [s]
T_EIN2 = 240; % Zulaufzeit [s]
T_AUS = 240; % Ablaufzeit [s]
% Fermentationszeit
t_max = 71; % [h]
% Intergrationsschritte des Eulerverfahrens
dt = 0.001; % [h]
% Produktivität
t_R = 52; % Rüstzeit Fermenter [h]
t_F = t_max; % Fermentationszeit [h]
V_R = 2; % Bruttovolumen Fermenter [l]
% Vorabberechnungen
% Umrechnung der Zu- und Ablaufzeit in Intergrationsschritte
t_EIN1 = T_EIN1/3600/dt;
t_EIN2 = T_EIN2/3600/dt;
t_AUS = T_AUS/3600/dt;
% Anzahl der Intergrationsschritte
i_max = t_max/dt+1;
% Initialisierung der Feldvariablen
t = zeros(i_max,1);
cX = zeros(i_max,1);
cS = zeros(i_max,1);
cP = zeros(i_max,1);
V = zeros(i_max,1);
F_IN1 = zeros(i_max,1);
F_IN2 = zeros(i_max,1);
F_OUT1 = zeros(i_max,1);
F_OUT2 = zeros(i_max,1);
mue = zeros(i_max,1);
K_S = zeros(i_max,1);
cSY = zeros(i_max,1);
cS_EIN2_Faktor = zeros(i_max,1);
Y_XS1 = zeros(i_max,1);

```

Anhang

```

t_d          = zeros(i_max,1);
mX          = zeros(i_max,1);
mX_OUT      = zeros(i_max,1);
% Zuweisen der Anfangswerte
t(1)        = 0;          % Startzeitpunkt der Fermentation [h]
cX(1)        = 0.3217;    % Startbiomassekonzentration [g/l]
cS(1)        = 2.798;     % Startsubstratkonzentration [g/l]
cP(1)        = 0;          % Startproduktkonzentration [g/l]
V(1)         = 1145;      % Startvolumen [ml]
F_IN1(1)     = 0;          % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                           [ml/h]
F_IN2(1)     = 0;          % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                           [ml/h]
F_OUT1(1)    = 0;          % Ablauf zum Fermentationsbeginn [1/h]
F_OUT2(1)    = 0;          % Probenahme
cSY(1)        = 1.50;      % Startsubstratkonzentration des
                           unbekannten Substrates [g/l]
cS_EIN2_Faktor(1) = 4;    % Konzentrationsfaktor des Yeast-
                           Konzentrates
Y_XS1(1)     = 1.1405;    % Biomasseertragskoeffizient
                           [g_Biomasse/g_Substrat]
K_S(1)        = 0.046;     % MONOD-Konstante [g/l]
% Berechnung des Startwertes von  $\mu$ 
mue(1)        = muem*(cS(1)/(K_S(1) + cS(1)))*(K_I/(cSY(1)+K_I));
% Berechnung der Generationen zum Zeitpunkt t=0
t_d(1)        = log(2)/mue(1);
% Berechnung der Masse (Biomasse) zum Zeitpunkt t=0
mX(1)         = cX(1)*V(1)/1000;
mX_OUT(1)= (F_OUT1(1)/1000)*cX(1);
% Berechnung
for i=1:i_max-1;
  for n=0:t_AUS
    F_OUT1(23501+n)=V_AUS1; % 23.50h Entnahme von 500ml Zellsuspension
  end
  for n=0:107
    F_OUT1(33334+n)=V_AUS1; % 33.33h Entnahme von 800ml Zellsuspension
  end
  for n=0:2.8
    F_OUT1(54301+n)=V_AUS1; % 54.30h Probenahme von 20.00ml Zellsuspension
  end
  for n=0:191
    F_OUT1(70001+n)=V_AUS1; % 70.00h Entnahme von Gesamtvolumen
  Zellsuspension
  end
  for n=0:68
    F_IN2(15501+n)=V_EIN2; % 15.50h Zugabe von 500ml Yeast Konzentrat
    F_IN2(23584+n)=V_EIN2; % 23.50h Zugabe von 500ml Yeast Konzentrat
  end
  for n=0:28
    F_IN2(33501+n)=V_EIN2; % 33.50h Zugabe von 200ml Yeast Konzentrat
    cS_EIN2_Faktor(33501)=6.25;
  end
  for n=0:33.33
    F_IN2(41834+n)=V_EIN2; % 41.83h Zugabe von 250ml Yeast Konzentrat
  end
  for n=0:41.60
    F_IN2(50834+n)=V_EIN2; % 50.83h Zugabe von 312ml Yeast Konzentrat
  end
  for n=0:t_EIN1
    F_IN1(16667+n)=V_EIN1; % 16.6h Zugabe von 6.72ml Glucose
  end
  for n=0:34.72

```

Anhang

```
F_IN1(25918+n)=V_EIN1; % 25.92h Zugabe von 6.08ml Glucose
end
for n=0:35.55
F_IN1(32918+n)=V_EIN1; % 31.92h Zugabe von 6.20ml Glucose
F_IN1(51334+n)=V_EIN1; % 51.33h Zugabe von 6.16ml Glucose
F_IN1(58334+n)=V_EIN1; % 58.33h Zugabe von 6.20ml Glucose
end
for n=0:23.61
F_IN1(38918+n)=V_EIN1; % 38.92h Zugabe von 4.10ml Glucose
end
for n=0:28.74
F_IN1(43834+n)=V_EIN1; % 43.83h Zugabe von 5.00ml Glucose
end
for n=0:37.24
F_IN1(63667+n)=V_EIN1; % 63.66h Zugabe von 6.48ml Glucose
end
for n=0:40.23
F_IN1(68084+n)=V_EIN1; % 68.08h Zugabe von 7.00ml Glucose
end
for n=0:0.001
F_OUT2(1+n) =V_AUS2; % 0.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(3001+n) =V_AUS2; % 3.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(6001+n) =V_AUS2; % 6.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(13001+n)=V_AUS2; % 13.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(14001+n)=V_AUS2; % 14.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(15001+n)=V_AUS2; % 15.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(15501+n)=V_AUS2; % 15.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(16001+n)=V_AUS2; % 16.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(17001+n)=2000; % 17.00h Probenahme 2.00ml Zellsuspension
F_OUT2(18501+n)=V_AUS2; % 18.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(19501+n)=V_AUS2; % 19.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(21501+n)=10000; % 21.50h Probenahme 10.00ml Zellsuspension
F_OUT2(22501+n)=V_AUS2; % 22.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(23501+n)=V_AUS2; % 23.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(24171+n)=V_AUS2; % 24.17h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(25001+n)=V_AUS2; % 25.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(26001+n)=3000; % 26.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(27501+n)=3000; % 27.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(28501+n)=3000; % 28.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(29501+n)=3000; % 29.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(31001+n)=V_AUS2; % 31.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(32001+n)=V_AUS2; % 32.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(33001+n)=V_AUS2; % 33.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(34001+n)=3000; % 34.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(35501+n)=3000; % 35.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(37001+n)=3000; % 37.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(38001+n)=3000; % 38.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(39001+n)=3000; % 39.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40001+n)=3000; % 40.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(41001+n)=V_AUS2; % 41.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(41751+n)=V_AUS2; % 41.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(42501+n)=3000; % 42.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(43501+n)=3000; % 43.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(45001+n)=V_AUS2; % 45.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(46001+n)=V_AUS2; % 46.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(49001+n)=V_AUS2; % 49.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50001+n)=V_AUS2; % 50.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50751+n)=V_AUS2; % 50.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(51501+n)=V_AUS2; % 51.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(52501+n)=V_AUS2; % 52.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(53501+n)=V_AUS2; % 53.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(54301+n)=V_AUS2; % 54.30h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
```

Anhang

```

F_OUT2(55501+n)=3000; % 55.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(56501+n)=3000; % 56.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(57501+n)=3000; % 57.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(58501+n)=3000; % 58.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(59501+n)=V_AUS2; % 59.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(60501+n)=V_AUS2; % 60.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(61501+n)=V_AUS2; % 61.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(62501+n)=V_AUS2; % 62.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(63501+n)=V_AUS2; % 63.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(65501+n)=V_AUS2; % 65.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(66501+n)=V_AUS2; % 66.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(67501+n)=V_AUS2; % 67.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(68501+n)=V_AUS2; % 68.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(69501+n)=V_AUS2; % 69.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
end
Y_XS1(i+1) = 0.002*Y_XS1(i)*dt + Y_XS1(i);
K_S(i+1) = 0.055*K_S(i)*dt + K_S(i);
mue(i+1) = muem*(cS(i)/(K_S(i) + cS(i)))*(K_I/(cSY(i)+K_I));
t_d(i+1) = log(2)/mue(i);
t(i+1) = t(i) + dt;
cX(i+1) = (mue(i) - K_XD - (F_IN1(i) + F_IN2(i))/V(i))*cX(i)*dt +
cX(i);
mX(i+1) = (cX(i)*V(i)/1000);
mX_OUT(i+1)= (F_OUT1(i)/1000)*cX(i)*dt + mX_OUT(i);
pi = alpha*mue(i) + beta;
cS(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS1(i) - m - pi/Y_PS)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i))/V(i))*cS(i) + (F_IN1(i)/V(i))*cS_EIN1)*dt +
cS(i);
cSY(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS2)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i))/V(i))*cSY(i) + (F_IN2(i)/V(i))*...
cS_EIN2_Faktor(i)*cS_EIN2)*dt + cSY(i);
if cSY(i)<=0
cSY(i)=0;
end
cS_EIN2_Faktor(i+1) = cS_EIN2_Faktor(i);
cP(i+1) = (pi*cX(i) - K_PD - ((F_IN1(i) +F_IN2(i))/V(i))*cP(i))*dt +
cP(i);
V(i+1) = (F_IN1(i) + F_IN2(i) - F_OUT1(i) - F_OUT2(i))*dt + V(i);
end
% Bewertung des Modells
cX_Modell = [cX(1) cX(3001) cX(6001) cX(13001) cX(14001)...
cX(15001) cX(15501) cX(16001) cX(17001) cX(18501)...
cX(19501) cX(21501) cX(22501) cX(23501) cX(24171)...
cX(25001) cX(26001) cX(27501) cX(28501) cX(29501)...
cX(31001) cX(32001) cX(33001) cX(34001) cX(35501)...
cX(37001) cX(38001) cX(39001) cX(40001) cX(41001)...
cX(41751) cX(42501) cX(43501) cX(45001) cX(46001)...
cX(49001) cX(50001) cX(50751) cX(51501) cX(52501)...
cX(53501) cX(54301) cX(55501) cX(56501) cX(57501)...
cX(58501) cX(59501) cX(60501) cX(61501) cX(62501)...
cX(63501) cX(65501) cX(66501) cX(67501) cX(68501)...
cX(69501)];
cS_Modell = [cS(1) cS(3001) cS(6001) cS(13001) cS(14001)...
cS(15001) cS(15501) cS(16001) cS(17001) cS(18501)...
cS(19501) cS(21501) cS(22501) cS(23501) cS(24171)...
cS(25001) cS(26001) cS(27501) cS(28501) cS(29501)...
cS(31001) cS(32001) cS(33001) cS(34001) cS(35501)...
cS(37001) cS(38001) cS(39001) cS(40001) cS(41000)...
cS(41751) cS(42501) cS(43501) cS(45001) cS(46001)...
cS(49001) cS(50001) cS(50751) cS(51501) cS(52501)...
cS(53501) cS(54301) cS(55501) cS(56501) cS(57501)...
cS(58501) cS(59501) cS(60501) cS(61501) cS(62501)...
cS(63501) cS(65501) cS(66501) cS(67501) cS(68501)...
cS(69501)];

```

Anhang

```

cS(63501) cS(65501) cS(66501) cS(67501) cS(68501)...
cS(69501) ];
resid_X = cX_MW - cX_Modell';
resid_S = cS_MW - cS_Modell';
SSE_X = sum(resid_X.^2);
SSE_S = sum(resid_S.^2);
SSyy_X = sum((cX_MW - mean(cX_MW)).^2);
SSyy_S = sum((cS_MW - mean(cS_MW)).^2);
R_X = sqrt(1 - SSE_X/SSyy_X);
R_S = sqrt(1 - SSE_S/SSyy_S);
STD_X = sqrt((resid_X.^2)/(length(cX_MW)-1));
STD_S = sqrt((resid_S.^2)/(length(cS_MW)-1));
Pr = mX_OUT(i_max)/(V_R*(t_R+t_F));
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für die Biomasse mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_X)
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für das Substrat mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_S)
fprintf('\n Die Produktivität beträgt: %6.4f [g Biomasse/(1
Fermentervolumen * h)] \n',Pr);
% grafische Ausgabe
figure;
subplot(2,1,1)
plot(t,cX,'g',...
      t,cS,'b',...
      t,cP,'r',...
      t,cSY/5,'c',...
      t_MW,cX_MW,'*g',...
      t_MW,cS_MW,'+b',...
      'LineWidth',1);
title ('Zyklische Zufütterung am Fed-Batch-Reaktor');
xlabel('t [h]');
ylabel(' ');
legend('c_X [g/l]', 'c_S_,-G_L_C [g/l]', 'c_P [g/l]', 'c_S_,-Y:5
[g/l]',2)
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[0 15]);
subplot(2,1,2)
plot(t,V,'k',...
      t,F_IN1*2,'b',...
      t,F_IN2/10,'c',...
      t,-F_OUT1/10,'r',...
      t_MW,V_MW,'-sk',...
      'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
ylabel(' ');
legend('V [ml]', 'F_I_N_,-G_L_C*2 [ml/h]', 'F_I_N_,-Y:10
[ml/h]', 'F_O_U_T:10 [ml/h]',3);
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[-(V_EIN2/10)-100 max(V)+300]);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
figure;
subplot(3,1,1)
t_d_Modell = [t_d(1)      t_d(15540) t_d(25955) t_d(38943)
t_d(43864)...
              t_d(50835) t_d(58330) t_d(63668) t_d(68080)];
t_Modell1 = [t(1)        t(15540)   t(25995)   t(38943)   t(43864)...
              t(50835)   t(58330)   t(63668)   t(68080)];
plot(t_Modell1,t_d_Modell, ...
      'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
ylabel('Anzahl der Generationen');
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[0 23]);
subplot(3,1,2)

```

Anhang

```

mue_Modell = [mue(1)      mue(15490) mue(15540) mue(23570)
mue(23610)...
               mue(41800) mue(41868) mue(43820) mue(51330)
mue(58330)...
               mue(63668) mue(68080)];
t_Modell2 = [t(1)      t(15490) t(15540) t(23570) t(23610)...
t(41800) t(41868) t(43820) t(51330) t(58330)...
t(63668) t(68080)];
plot(t_Modell2,mue_Modell*20,'r',...
     t,Y_XS1,'g',...
     t,K_S,'b',...
     'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('μ [1/h]*20','Y_X,_G_L_C','K_S,_G_L_C [g/l]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max],'YLim',[0 2.5]);
subplot(3,1,3)
mX_OUT_Modell = [mX_OUT(1) mX_OUT(23570) mX_OUT(33441) mX_OUT(70192)];
t_Modell3 = [t(1)      t(23570)      t(33441)      t(70192)];
plot(t,mX,'g',...
     t,mX_OUT,'c',...
     t_Modell3,mX_OUT_Modell,'b',...
     t_MW,m_MW,'*g',...
     'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('m_X [g]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max],'YLim',[0 27]);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
fprintf('\nCPU-time needed %6.2f [s]\n',cputime-tim)

```

Anhang 7: Programm für MATLAB® zur Modellierung des FedBatch-Prozesses mit mehrfacher Zugabe von SFP(III)-Medium [117].

```

clear all, tim=cputime;
fprintf('\n\nZyklischer FedBatch %s %s\n',date,datestr(rem(now,1)));
% Messwerte
t_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(C19:C61)');
cX_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(I19:I61)');
cS_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(K19:K61)');
cRNA_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(S19:S61)');
V_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(R19:R61)');
m_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(P19:P61)');
% Parameterwerte (Konstanten)
% Kinetik
muem = 0.0717; % maximale Wachstumsrate [1/h]
% Biomasse
K_XD = 0.0000; % Biomassezerfallskoeffizient [1/h]
% Substrat
m = 0; % Maintenancekoeffizient [1/h]
Y_PS = 0.5; % Produktertragskoeffizient [g_Produkt/g_Substrat]
cS_EIN1= 5; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
cS_EIN2= 0.077; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> RNA
cS_EIN3= 8; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> RNA (für
letzte Zugabe)
cS_EIN4= 500; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
(für 1.Zugabe)

```

Anhang

```

% Produkt
alpha  = 0.00;    % Koeffizient der wachstumsgekoppelten Produktbildung
beta   = 0.00;    % Koeffizient der teilweise wachstumsgekoppelten
                  % Produktbildung [1/h]
K_PD   = 0;       % Produktzerfallskoeffizient [1/h]
% Volumen
V_EIN1 = 172.31; % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Glucose/RNA
V_EIN2 = 7463;    % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Nährmedium
V_AUS1 = 7463;    % Ablaufrate der Pumpe [ml/h] --> Zellsuspension
V_AUS2 = 10000;   % Probenahme
T_EIN1 = 138;     % Zulaufzeit [s]
T_EIN2 = 240;     % Zulaufzeit [s]
T_AUS  = 240;     % Ablaufzeit [s]
% Fermentationszeit
t_max = 73.5;    % [h]
% Intergrationsschritte des Eulerverfahrens
dt = 0.001;      % [h]
% Produktivität
t_R    = 52;      % Rüstzeit Fermenter [h]
t_F    = t_max;   % Fermentationszeit [h]
V_R    = 2;        % Bruttovolumen Fermenter [l]
% Vorabberechnungen
% Umrechnung der Zu- und Ablaufzeit in Intergrationschritte
t_EIN1 = T_EIN1/3600/dt;
t_EIN2 = T_EIN2/3600/dt;
t_AUS  = T_AUS/3600/dt;
% Anzahl der Intergrationsschritte
i_max = t_max/dt+1;
% Initialisierung der Feldvariablen
t          = zeros(i_max,1);
cX         = zeros(i_max,1);
cS         = zeros(i_max,1);
cP         = zeros(i_max,1);
V          = zeros(i_max,1);
F_IN1     = zeros(i_max,1);
F_IN2     = zeros(i_max,1);
F_IN3     = zeros(i_max,1);
F_OUT1    = zeros(i_max,1);
F_OUT2    = zeros(i_max,1);
mue        = zeros(i_max,1);
K_S1      = zeros(i_max,1);
K_S2      = zeros(i_max,1);
cS_EIN1_Faktor = zeros(i_max,1);
cS_RNA    = zeros(i_max,1);
Y_XS1     = zeros(i_max,1);
Y_XS2     = zeros(i_max,1);
t_d        = zeros(i_max,1);
mX        = zeros(i_max,1);
mX_OUT    = zeros(i_max,1);
% Zuweisen der Anfangswerte
t(1)      = 0;      % Startzeitpunkt der Fermentation [h]
cX(1)     = 0.3072; % Startbiomassekonzentration [g/l]
cS(1)     = 4.920;  % Startsubstratkonzentration [g/l]
cP(1)     = 0;      % Startproduktkonzentration [g/l]
V(1)      = 1000;   % Startvolumen [ml]
F_IN1(1)  = 0;      % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                  % [ml/h]
F_IN2(1)  = 0;      % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                  % [ml/h]
F_IN3(1)  = 0;      % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                  % [ml/h]
F_OUT1(1) = 0;      % Ablauf zum Fermentationsbeginn [l/h]

```

Anhang

```

F_OUT2(1) = 0; % Probenahme
cS_RNA(1) = 0.077; % Startsubstratkonzentration des
                     unbekannten Substrates [g/l]
cS_EIN1_Faktor(1) = 1;
Y_XS1(1) = 1.998; % Biomasseertragskoeffizient
                     [g_Biomasse/g_Substrat]
Y_XS2(1) = 15; % Biomasseertragskoeffizient
                     [g_Biomasse/g_Substrat] der RNA
K_S1(1) = 0.046; % MONOD-Konstante [g/l]
K_S2(1) = 0.005; % Limitationskonstante [g/l] der RNA
% Berechnung der Masse (Biomasse) zum Zeitpunkt t=0
mX(1) = cX(1)*V(1)/1000;
mX_OUT(1)= (F_OUT1(1)/1000)*cX(1);
% Berechnung
for i=1:i_max-1;
  % Zugaben/Entnahmen aus dem Fermenter
  for n=0:40.2
    F_OUT1(30417+n)=V_AUS1; % 30.42h Entnahme von 300ml Zellsuspension
    F_OUT1(48501+n)=V_AUS1; % 48.50h Entnahme von 300ml Zellsuspension
  end
  for n=0:53.6
    F_OUT1(40251+n)=V_AUS1; % 40.25h Entnahme von 400ml Zellsuspension
  end
  for n=0:138
    F_OUT1(73001+n)=V_AUS1; % 73.00h Entnahme von Gesamtvolumen
                             Zellsuspension
  end
  for n=0:66
    F_IN2(30501+n)=V_EIN2; % 30.50h Zugabe von 500ml Nährmedium
    F_IN2(40334+n)=V_EIN2; % 40.33h Zugabe von 500ml Nährmedium
    cS_EIN1_Faktor(40334)=1.2;
    F_IN2(48584+n)=V_EIN2; % 48.58h Zugabe von 500ml Nährmedium
    cS_EIN1_Faktor(48584)=1.0;
  end
  for n=0:29
    F_IN3(56501+n)=V_EIN1; % 56.50h Zugabe von 5.000ml RNA
    Y_XS2(56501) =Y_XS2(1);
    K_S2(56501) =K_S2(1);
  end
  for n=0:42
    F_IN1(21917+n)=V_EIN1; % 21.90h Zugabe von 7ml Glucose
  end
  for n=0:0.001
    F_OUT2(1+n) =20000; % 0.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(2001+n) =7000; % 3.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(7001+n) =12000; % 6.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(8501+n) =V_AUS2; % 13.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(16001+n)=V_AUS2; % 14.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(18001+n)=9000; % 15.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(20001+n)=V_AUS2; % 15.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(21501+n)=2000; % 16.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(22001+n)=V_AUS2; % 17.00h Probenahme 2.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(23001+n)=7000; % 18.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(24501+n)=12000; % 19.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(25501+n)=11000; % 21.50h Probenahme 10.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(27001+n)=13000; % 22.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(28001+n)=11000; % 23.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(29001+n)=8000; % 24.17h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(30001+n)=11000; % 25.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(31001+n)=16000; % 26.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(32501+n)=V_AUS2; % 27.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
    F_OUT2(34001+n)=13000; % 28.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
  end

```

Anhang

```

F_OUT2(35501+n)=9000;      % 29.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(37001+n)=13000;     % 31.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(39001+n)=5000;      % 32.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40001+n)=V_AUS2;    % 33.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40501+n)=V_AUS2;    % 34.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(42001+n)=11000;     % 35.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(43501+n)=V_AUS2;    % 37.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(45001+n)=V_AUS2;    % 38.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(47001+n)=11000;     % 39.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(48001+n)=11000;     % 40.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(49251+n)=V_AUS2;    % 41.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50751+n)=V_AUS2;    % 41.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(52601+n)=14000;     % 42.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(53501+n)=12000;     % 43.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(54001+n)=V_AUS2;    % 45.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(55001+n)=12000;     % 46.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(56001+n)=12000;     % 49.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(65001+n)=11000;     % 50.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(66501+n)=11000;     % 50.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(68001+n)=11000;     % 51.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(69001+n)=12000;     % 52.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(70501+n)=V_AUS2;    % 53.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(72001+n)=V_AUS2;    % 54.30h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(73001+n)=V_AUS2;    % 55.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
end

% Änderungen von Yxs und Ks
Y_XS1(i+1) = Y_XS1(1);
Y_XS2(i+1) = 0.015*Y_XS2(i)*dt + Y_XS2(i);
K_S1(i+1) = K_S1(1);
K_S2(i+1) = 0.00001*K_S2(i)*dt + K_S2(i);
Y_XS2(20001) = 40;
K_S2(22001) = 0.045;
Y_XS2(30501) = Y_XS2(1);
K_S2(30501) = K_S2(1);
K_S2(35501) = 0.045;
Y_XS2(34001) = 100;
Y_XS2(40334) = Y_XS2(1);
K_S2(40334) = K_S2(1);
Y_XS2(45001) = 5;
K_S2(45001) = 0.045;
Y_XS2(48584) = Y_XS2(1);
K_S2(48584) = K_S2(1);
Y_XS2(52581) = 5;
K_S2(52581) = 0.045;
Y_XS2(61681) = 25;
K_S2(61681) = 0.045;
K_S2(66501) = 0.065;

% Differentialgleichungen für die Kinetik, Biomasse, Substrate und
Reaktorvolumen
mue(i+1) = muem*(cS(i)/(K_S1(i) + cS(i)))*(cS_RNA(i)/(K_S2(i) +
cS_RNA(i)));
t_d(i+1) = log(2)/mue(i+1);
t(i+1) = t(i) + dt;
cX(i+1) = (mue(i) - K_XD - (F_IN1(i) + F_IN2(i) +
F_IN3(i))/V(i))*cX(i)*dt + cX(i);
mX(i+1) = (cX(i)*V(i)/1000);
mX_OUT(i+1) = (F_OUT1(i)/1000)*cX(i)*dt + mX_OUT(i);
pi = alpha*mue(i) + beta;
cS(i+1) = ((-mue(i)/Y_XS1(i) - m - pi/Y_PS)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i) + F_IN3(i))/V(i))*cS(i) +
(F_IN2(i)/V(i))*cS_EIN1_Faktor(i)*cS_EIN1...
+ (F_IN1(i)/V(i))*cS_EIN4)*dt + cS(i);

```

Anhang

```

cS_EIN1_Faktor(i+1) = cS_EIN1_Faktor(i);
cS_RNA(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS2(i))*cX(i) - ((F_IN1(i)
    + F_IN2(i) + F_IN3(i))/V(i))*cS_RNA(i) +
    + (F_IN2(i)/V(i))*cS_EIN2
    + (F_IN3(i)/V(i))*cS_EIN3)*dt + cS_RNA(i);
cP(i+1) = (pi*cX(i) - K_PD - ((F_IN1(i) + F_IN2(i)
    + F_IN3(i))/V(i))*cP(i))*dt + cP(i);
V(i+1) = (F_IN1(i) + F_IN2(i) + F_IN3(i) - F_OUT1(i) - F_OUT2(i))*dt
    + V(i);
end
% Bewertung des Modells
cX_Modell = [cX(1) cX(2001) cX(7001) cX(8501) cX(16001)...
    cX(18001) cX(20001) cX(21501) cX(22001) cX(23001)...
    cX(24501) cX(25501) cX(27001) cX(28001) cX(29001)...
    cX(30001) cX(31001) cX(32501) cX(34001) cX(35501)...
    cX(37001) cX(39001) cX(40001) cX(40501) cX(42001)...
    cX(43501) cX(45001) cX(47001) cX(48001) cX(49251)...
    cX(50751) cX(52601) cX(53501) cX(54001) cX(55001)...
    cX(56001) cX(65001) cX(66501) cX(68001) cX(69001)...
    cX(70501) cX(72001) cX(73001)];
cS_Modell = [cS(1) cS(2001) cS(7001) cS(8501) cS(16001)...
    cS(18001) cS(20001) cS(21501) cS(22001) cS(23001)...
    cS(24501) cS(25501) cS(27001) cS(28001) cS(29001)...
    cS(30001) cS(31001) cS(32501) cS(34001) cS(35501)...
    cS(37001) cS(39001) cS(40001) cS(40501) cS(42001)...
    cS(43501) cS(45001) cS(47001) cS(48001) cS(49251)...
    cS(50751) cS(52601) cS(53501) cS(54001) cS(55001)...
    cS(56001) cS(65601) cS(66501) cS(68001) cS(69001)...
    cS(70501) cS(72001) cS(73001)];
resid_X = cX_MW - cX_Modell';
resid_S = cS_MW - cS_Modell';
SSE_X = sum(resid_X.^2);
SSE_S = sum(resid_S.^2);
SSyy_X = sum((cX_MW - mean(cX_MW)).^2);
SSyy_S = sum((cS_MW - mean(cS_MW)).^2);
R_X = sqrt(1 - SSE_X/SSyy_X);
R_S = sqrt(1 - SSE_S/SSyy_S);
STD_X = sqrt((resid_X.^2)/(length(cX_MW)-1));
STD_S = sqrt((resid_S.^2)/(length(cS_MW)-1));
Pr = mX_OUT(i_max)/(V_R*(t_R+t_F));
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für die Biomasse mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_X)
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für das Substrat mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_S)
fprintf('\n Die Produktivität beträgt: %6.4f [g Biomasse/(1
Fermentervolumen * h)] \n',Pr);
% grafische Ausgabe
figure;
subplot(2,1,1)
plot(t,cX*2,'g',...
    t,cS,'b',...
    t,cS_RNA*100,'c',...
    t_MW,cX_MW*2,'*g',...
    t_MW,cS_MW,'+b',...
    t_MW,cRNA_MW*100,'.c',...
    'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
ylabel(' ');
legend('X [g/l]', 'GLC [g/l]', 'RNA (x100) [g/l]', 2)
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[0 10]);
subplot(2,1,2)
plot(t,V,'k',...
    t,cS_RNA*100,'c',...
    t_MW,cX_MW*2,'*g',...
    t_MW,cS_MW,'+b',...
    t_MW,cRNA_MW*100,'.c',...
    'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
ylabel(' ');
legend('X [g/l]', 'GLC [g/l]', 'RNA (x100) [g/l]', 2)
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[0 10]);

```

Anhang

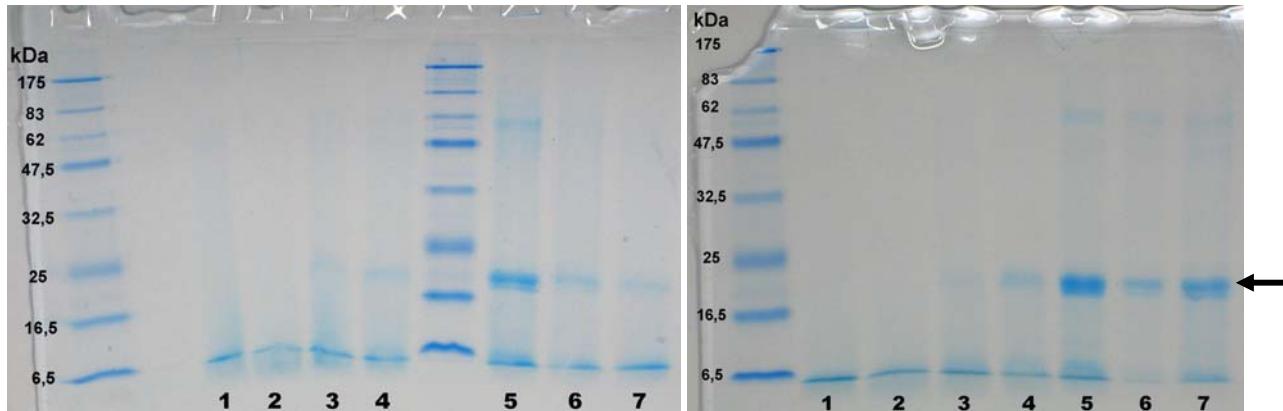
```
t,F_IN1*2,'b',...
t,F_IN3*2,'c',...
t,F_IN2/10,'k',...
t,-F_OUT1/10,'r',...
t_MW,V_MW,'-sk',...
'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
ylabel(' ');
legend('V [ml]', 'F_I_N_-_G_L_C (x2)[ml/h]', 'F_I_N_-_R_N_A
(x2)[ml/h]',...
'F_I_N_-_S_F_P (1/10)[ml/h]', 'F_O_U_T (1/10)[ml/h]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[-(V_EIN2/10)-100 max(V)+300]);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
figure;
subplot(2,1,1)
plot(t,mue*20,'r',...
t,Y_XS2/100,'g',...
t,K_S2*10,'b',...
'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('μ(x20) [1/h]', 'Y_X_-_R_N_A (1/100)', 'K_S_-_R_N_A (x10)
[g/l]',2);
subplot(2,1,2)
mX_OUT_Modell = [mX_OUT(1) mX_OUT(23570) mX_OUT(33441) mX_OUT(70192)];
t_Modell3 = [t(1) t(23570) t(33441) t(70192)];
plot(t,mX,'g',...
t,mX_OUT,'c',...
t_MW,m_MW,'*g',...
'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
legend('m_X [g]',2);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
fprintf('\nCPU-time needed %6.2f [s]\n',cputime-tim)
```

Anhang 8: Demonstration der RNA-Konzentrationsbestimmung an einem Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid. Der Grauwert der Bande „Max.“ entspricht 77 mg/l (Start der Fermentation) und der Bande „Min.“ 0 mg/l (Nährmedium ohne RNA). Die Grauwerte der Fermentationsproben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Bestimmung der Grauwerte mit Adobe Photoshop CS3 Extended v10.0 Deutsch. Markierung der RNA-Bande mit Pfeil.

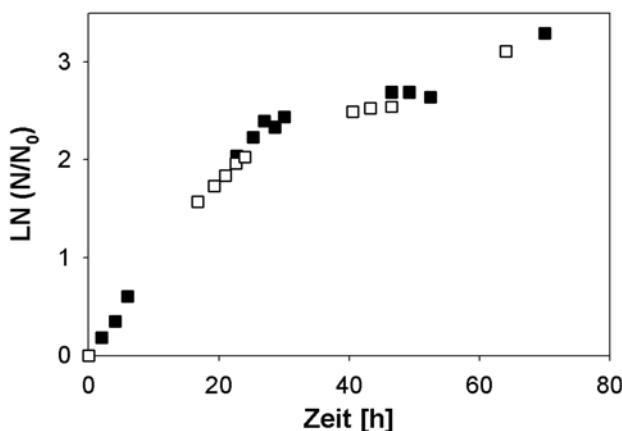


Anhang

Anhang 9: SDS-PAGE mit Expression von SAG2 im Nährmedienüberstand von BHI-Medium (linkes Bild) und YE-Medium (rechtes Bild). Überstand wurde 100x aufkonzentriert durch TCA-Fällung. Lane 1) Nährmedium vor der Beimpfung; 2) nach 4,5 h Kultivierungszeit; 3) nach 20,5 h; 4) nach 24,5 h; 5) nach 29 h; 6) nach 44 h und 7) nach 48h Kultivierung. Die Kultivierung von *L. tarentolae* erfolgte in 100 ml Nährmedium in 500 ml Schüttelkolben ohne Schikane. SAG2 Bande ist durch einen Pfeil markiert.



Anhang 10: Logarithmische Auswertung der Zellzahl bei der Kultivierung des SAG2-Stammes im SFP(III)-Medium in den Kolben A (■) und B (□). Der Anstieg der Kurven entspricht der spezifischen Zellteilungsrate v . Messpunkte >60 h sind stark fehlerbehaftet.



Anhang 11: Protokoll zum Downstream Processing des SAG2

- 100 ml SFP(III)-Medium vorbereitet, Proben für Analytik entnommen
- Beimpfung mit gewaschenen Zellen einer exponentiell wachsenden Vorkultur
- Startkonzentration: 0,25 g/l TBM bzw. $2,84 \times 10^7$ Zellen/ml
- Teilung des Volumen zu 2x50 ml in 250 ml Kolben mit Schikane
- Ernte nach 29 h, Vereinigung beider Kolben (1,1 g/l TBM bzw. $1,58 \times 10^8$ Zellen/ml)
- Zellpellet von 1 ml Suspension gewonnen, gewaschen und durch Desintegration aufgeschlossen nach Resuspension in Aufschlusspuffer
- Abzentrifugation der Zellen und Gewinnung von 92 ml Überstand
- Proben der Überstandes für die Analytik entnommen

- Zugabe von 0,0297 g Imidazol (5 mM, Merck) zu 85 ml Überstand, Proben für Analytik entnommen
 - Affinitätschromatographie:
 - Säule: HisTrap-Säule FF crude (GE Healthcare), gepackt mit Ni Sepharose™ Fast Flow, Säulenvolumen (CV) = 1 ml
 - Flussrate: 1 ml/min
 - Equilibrierung mit 5 CV mit Equilibrierungspuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol)
 - Beladung von 70 ml Überstand mit 5 mM Imidazol, Proben des Durchlaufes zurückgestellt
 - Waschen der Säule mit 15 CV Equilibrierungspuffer, Proben für Analytik gewonnen
 - Einspülen von Elutionspuffer in das Äkta-System (15 ml)
 - Stufenelution für 10 CV mit Elutionspuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol), Proben für Analytik gewonnen
 - Equilibrierung der Säule mit 5 CV Equilibrierungspuffer
 - Lagerung der Säule in 20 % Ethanol
 - Die Analytik erfolgte wie im Kapitel 3.6 beschrieben, nach Anwendung der TCA-Fällung, siehe 3.5.

Anhang 12: Gentechnische Konstruktion des Hyal-1-Stammes: *L. tarentolae* T7TR::6071#8-3

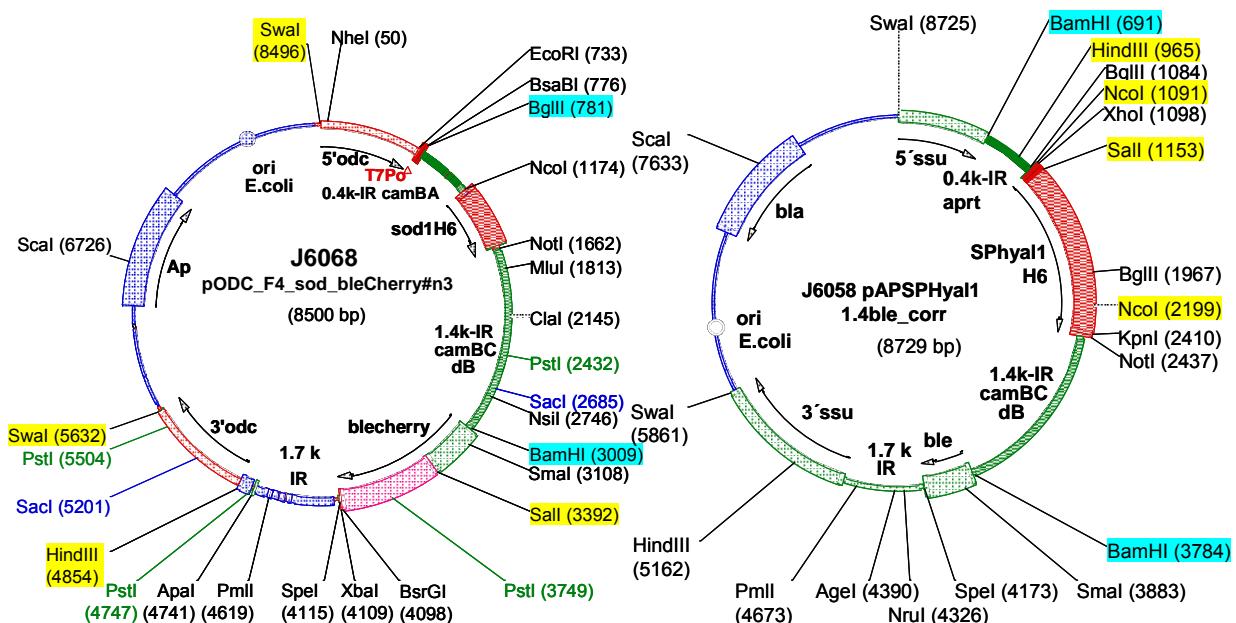


Abb. 9-1: Genkarte der Vektoren J6068 (links) und J6058 (rechts) mit Markierung der verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Anhang

Die Konstruktion des Vektors J6071 erfolgte aus Teilstücken der Vektoren J6068 und J6058 nach gezieltem Verdau mit Restriktionsenzymen. Die verwendeten Vektoren, Enzyme, Kits und Puffer stammten von Jena Bioscience, Abweichungen werden entsprechend genannt. Der Vektor J6058 enthielt das Insert mit dem Gen für *hyal1* (J6058 pAPSPHyal1 1.4ble_corr; insgesamt 8729 bp groß) und der Vektor J6068 stellte den Zielvektor dar, aus dem das Insert mit dem Gen für *sod1* (pODC_F4_sod_bleCherry#n3; 8500bp groß) entfernt werden musste, siehe Abb. 9-1.

Der Vektor J6058 wurde mit *BamHI* verdaut, indem 10 µl gelöster J6058-Vektor, 10 µl Puffer B3 (10x konzentriert), 10 µl BSA (10x konzentriert), 65 µl A. dest und 5 µl *BamHI* gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Der Ansatz war identisch bei dem Vektor J6068, außer das dieser mit *BamHI* und *BgII* geschnitten wurde, nach 1 h 0,5 µl SAP (Shrimps Alkaline Phosphatase, Fermentas) zugeben und für weitere 30 min inkubiert wurde.

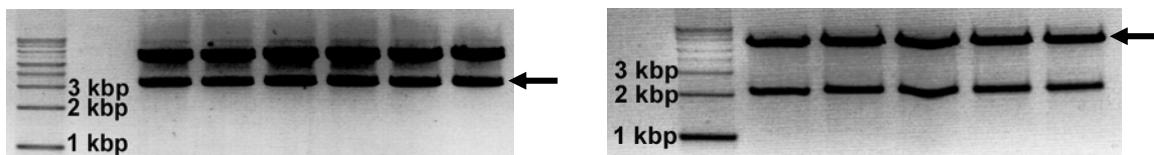


Abb. 9-2: Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung der Fragmente von J6058 (linkes Bild), geschnitten mit *BamHI*, und der Fragmente von J6068 (rechtes Bild), geschnitten mit *BamHI* und *BgII*. Das extrahierte Insert und der Vektor sind mit Pfeilen markiert.

Die Ansätze wurden nach Konditionierung mit dem Gelladepuffer bei 180 V in einem 1%igen Agarosegel nach Molekulargewicht aufgetrennt (1 g Agarose pro 100 ml TAE-Puffer (4,84 g/l TRIS, 1,142 ml/l Essigsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,5) durch Erhitzen gelöst, Zugabe von 10 mg/ml Ethidiumbromid). Aus den Gelen, siehe Abb. 9-2, wurden die Fragmente des Inserts (mit *hyal1*) und des Vektorfragmentes mit Hilfe des „Agarose Gel Extraction Kit“ gewonnen und die Reinheit der isolierten DNA im Agarosegel überprüft.

Tab. 9-1: Ligationsansätze des Vektorfragmentes von J6068 und des Inserts von J6058 mit Auswertung der Transformation von *E. coli*.

Komponenten	Ligationsansatz-Nr. ($\Sigma=20 \mu\text{l}$)				
	1	2	3	4	5
Insert (J6058)	1 µl	3 µl	5 µl	-	-
Vektor (J6068)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Puffer T4 Ligase (10x)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
T4 DNA Ligase (Fermentas)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-
A. dest	15 µl	13 µl	11 µl	16 µl	17 µl

Auswertung der Transformation von <i>E. coli</i>					
Anzahl der Kolonien	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 10	keine

Anhang

Der nächste Schritt beinhaltete die Ligation von Vektor und Insert, wofür verschiedene Ansätze hergestellt (siehe Tab. 9-1) und über Nacht bei 16°C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (10Z) durch Zugabe von je 10 µl Ligationsansatz zu 120 µl Zellen, der Inkubation auf Eis für 40 min, Zugabe von 1 ml SOD-Medium (Komplexmedium mit Trypton, Yeast Extract, NaCl, Glukose, KCl) und der geschüttelten Inkubation für 45 min bei 30°C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und das resuspendierte Pellet auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion diente Ampicillin. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur kultiviert und die Anzahl der gebildeten Kolonien bewertet, siehe Tab. 9-1 und Abb. 9-3.

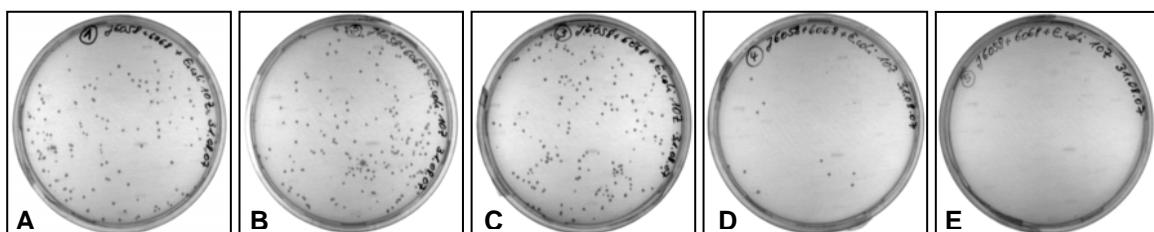


Abb. 9-3: Transformation von *E. coli* nach Ausplattieren auf BHI-Platten mit Ampicillin. A - C) Ligationsansätze 1 - 3, D) Kontrolle der SAP-Behandlung (Ansatz 4), E) Negativkontrolle.

Die Ligationsansätze 1-3 erzeugten die meisten transformierten Klone. Der Ansatz D diente zur Überprüfung der Effektivität der SAP-Behandlung, denn die SAP entfernte die Phosphatreste der endständigen Nukleotide des linearisierten Vektors. Durch die Behandlung wird der Einbau des *hyal1*-Inserts gefördert, da die Ligase Phosphatgruppen als Startpunkt benötigt. Der reine Vektor kann nur dann ligiert werden, wenn Phosphatreste nicht vollständig abgespalten wurden. Im Vergleich zu den Ansätzen 1-3 war die Phosphatase-Behandlung zu 90% erfolgreich. Erwartungsgemäß entstanden keine Klone in der Negativkontrolle.

Von der Platte mit dem Ansatz 3 wurden 12 einzelne Klone entnommen und 2 ml LB-Medium (mit Ampicillin) beimpft. Nach Kultivierung über Nacht wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des „Plasmid Mini-Prep Kit“ gewonnen und die Reinheit und Größe im Agarosegel überprüft. Die Plasmidgröße der Klone #1-#11 entsprach der erwarteten Größe von ca. 9 kbp (Abb. 9-4). Das Plasmid von Klon #12 war eindeutig zu klein, somit ohne Insert und wurde verworfen.

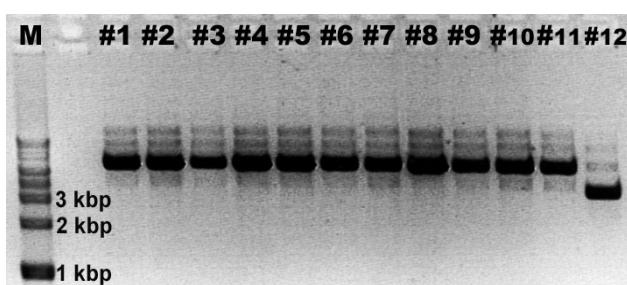


Abb. 9-4: Plasmid-Präparation (Mini-Prep) aus transfizierten und selektierten *E. coli* Zellen. M) Marker, 1kbp-Leiter; #1 bis #12) die selektierten Klone.

Anhang

Im Weiteren war die Orientierung des eingebauten Inserts zu prüfen, was durch den Verdau mit *Sa*I erfolgte. Jeweils 4 µl Plasmid-DNA der Klone #1-#11 wurden mit 2 µl Puffer B4 (10x), 2 µl BSA (10x), 0,5 µl Enzym und 12 µl A. dest gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Als Negativkontrollen dienten die Ausgangsvektoren J6068 und J6058.

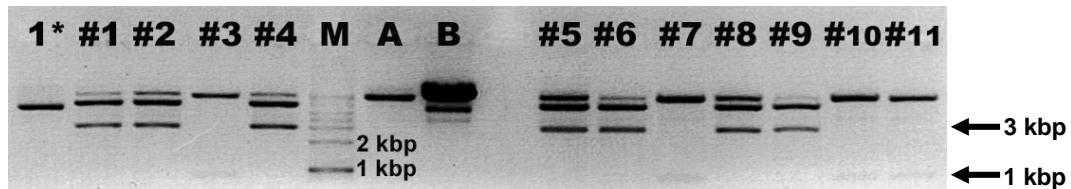


Abb. 9-5: Fragmentmuster des Verdau der Plasmid-DNA der Klone #1 - #11 mit *Sa*I. 1*) unverdauter Klon #1, M) Marker, 1kbp-Leiter; A) J6068; B) J6058.

Bei dem Verdau mit *Sa*I entsteht bei korrekter Insertorientierung ein 3kbp-Fragment, bei falscher nur ein 1 kbp Fragment, siehe Abb. 9-1. Wie in der Abb. 9-5 zu erkennen ist, war das Insert bei den Klonen #3, #7, #10 und #11 in der falschen Orientierungsrichtung. Weitere Testverdaue, siehe Abb. 9-6, unterstützen diese Ergebnisse.

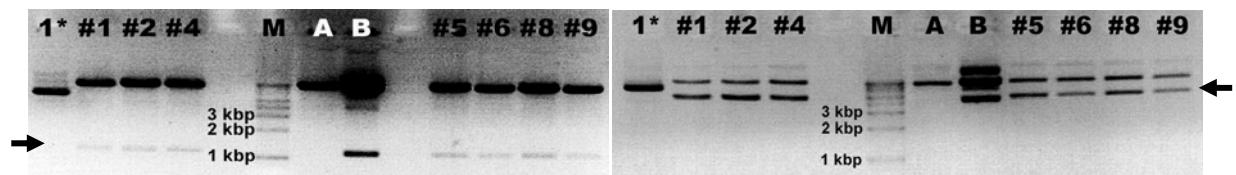


Abb. 9-6: Weitere Kontrollen der Insertintegration. Durch *Nco*I-Verdau (linkes Bild) wurde ein 1 kbp-Fragment bei korrektem Insert erzeugt, bei *Hind*III (rechtes Bild) ein 4,6 kbp Fragment. #1 - #11 bezeichnen die getesteten Klone, M) Marker, 1kbp-Leiter; A) J6068; B) J6058.

Die Klone #4 und #8 wurden im Schüttelkolben mit LB-Medium kultiviert und die Plasmid-DNA mittels des „Pure YieldTM Plasmid Midiprep System“ (Promega, USA) gereinigt. Die Überprüfung im Agarosegel ergab ca. 100 ng/µl DNA-Konzentration. Vor der Transfektion von *L. tarentolae* wurde der Vektor linearisiert durch *Sw*I-Verdau (New England Biolabs, UK) bei 26°C für 2,5 h. Nach Trennung im Agarosegel wurde die obere Bande (linearisierter Vektor) extrahiert, siehe Abb. 9-7, und die *E.coli*-spezifischen Sequenzen entfernt.

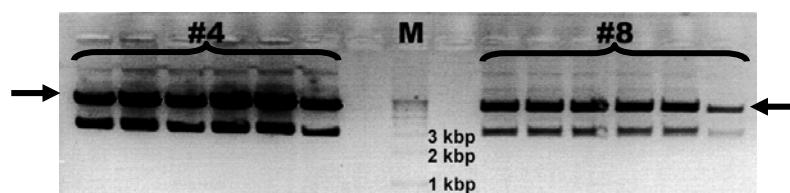


Abb. 9-7. Linearisierung Vektors J6071 Klone #4 und #8 durch Verdau mit *Sw*I. M) Marker, 1kbp-Leiter. (←) Markierung der herausgeschnittenen Bande (linearisierter Vektor).

Anhang

Zur Transfektion wurden *L. tarentolae* Zellen einer exponentiell wachsenden Standkultur (BHI-Medium) mit einer OD von 1,0 (Messwert bei Jena Bioscience, entspricht ca. $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml) verwendet. 1,5 ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert, in 0,5 ml Überstand resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit der gereinigten Vektor-DNA J6071 #4 (Ansatz 1) und #8 (Ansatz 2) vermischt. Als Negativkontrolle diente *A. dest* (Ansatz 3). Anschließend wurden die Ansätze in gekühlte Spezialküvetten (Biorad) überführt und die Elektroporation bei 450 V und 450 μ F mit dem Gene Pulser® II (Biorad) durchgeführt (Zeitkonstante τ (bei $\frac{1}{2} V_{max}$) = 5,2 - 5,5 ms). Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Zellen in eine BHI-Standkultur mit den Antibiotika Hygromycin (0,1 g/l) und Nourseothricin (0,1 g/l) überführt und über Nacht kultiviert. Das Ausplattieren der transformierten *L. tarentolae* erfolgte auf Nitrozellulosemembranen (Whatman), die auf 1%igen Nähragarplatten (12,95 g/l BHI, 10% fötalem Kälberserum, 40 mM HEPES, 10 ml/l PenStrep, 5 mg/l Hemin) mit den Antibiotika Nourseothricin (0,1 g/l), Hygromycin (0,1 g/l) und Bleomycin (0,1 g/l) gelegt wurden. 2 ml der jeweiligen Standkultur wurden abzentrifugiert und die Zellpellets in 100 μ l Überstand resuspendiert. Ausplattiert wurden 4mal #8, 3mal #4 und eine Platte für die Negativreferenz. Die Platten wurden 7 Tage bei 26°C inkubiert, bis sich farblose Kolonien bildeten. Die Nitrozellulosemembranen mit den Kolonien wurden anschließend auf neue Agarplatten umgesetzt, die neben den obengenannten Bestandteilen zusätzlich Tetracyclin (10 mg/l) zur Induktion der Produktbildung enthielten. Bei einer erfolgreichen Integration des Vektors in das Genom von *L. tarentolae* wurde neben der Hyaluronidase auch das Blecherry-Protein gebildet, welches die Kolonien rot färbte und eine sehr leichte Selektion der Klone ermöglichte, siehe Abb. 9-8.



Abb. 9-8: Kolonien von *L. tarentolae* J6071pODC_APHyA.4blecherry#4, drei Tage nach Induktion mit Tetracyclin. Die Rotfärbung resultiert aus dem exprimierten Fluoreszenzfarbstoff.

Einzelne *L. tarentolae* Kolonien wurden zur Beimpfung von je 1 ml BHI-Medium (mit den Antibiotika Nourseothricin, Hygromycin und Bleomycin) verwendet. Am nächsten Tag dienten diese Zellen zur Inokulation von 2x10 ml BHI-Medium (mit obengenannten Antibiotika). Eine der Standkulturen wurde mit Tetracyclin induziert. Insgesamt wurden 4 Klone der #8 und 8 Klone der #4 selektiert. Nach 3 Tagen wurden die vier Klone mit der höchsten, absoluten Fluoreszenz bezüglich ihrer Hyal-1-Expression im Western Blot kontrolliert.

10 Literatur

- 1 Sodoyer, R. (2004) Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *Biodrugs*, 18, 51-62.
- 2 Morrow, K.J. (2003) Glycosylation: Art and Science. American Biotechnology Laboratory, 33-34.
- 3 Harrison, R.L. & Jarvis, D.L. (2006) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Advances in Virus Research*, 68, 159-191.
- 4 Hellwig, S., Sack, M., Spiegel, H., Drossard, J., Fischer, R. (2003) Using plants as a production system for N-glycosylated proteins of therapeutic relevance. American Biotechnology Laboratory, 50-53.
- 5 Whitford, D. (2005) Proteins - structure and function. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England, S. 291.
- 6 Lottspeich, F. & Engels, J.W. (2006) Bioanalytik, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 541.
- 7 Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R., Verbert, A. (2001) Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biological Chemistry*, 382(2), 151-159.
- 8 Hartmann, M. (2006) Ciliates as a new expression system for the production of biopharmaceutical relevant proteins. *Achema Book of Abstracts – Expression and Production Systems for Recombinant Therapeutics*, Frankfurt am Main, S. 142.
- 9 Stephan, M. (1997) Untersuchungen zur Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Universität Bielefeld, S. 3.
- 10 Ferguson, M.A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 352(1359), 1295-1302.
- 11 Parodi, A.J. (1993) N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, 3(3), 193-199.
- 12 Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., et al. (2002) Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expression and Purification*, 25, 209-218.
- 13 Teixeira, S.M. (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian journal of medical and biological research*, 31(12), 1503-1516.
- 14 Teixeira, S.M.R. & daRocha, W.D. (2003) Review: Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 148-158.
- 15 Zhang, W.W., Charest, H., Matlashewski, G. (1995) The expression of biologically active human p53 in *Leishmania* cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins. *Nucleic Acids Research*, 23(20), 4073-4080.
- 16 Tobin, J.F., Reiner, S.L., Hatam, F., Zheng, S., Leptak, C.L., Wirth, D.F., Locksley, R.M. (1993) Transfected *Leishmania* Expressing Biologically Active IFN- γ . *The Journal of Immunology*, 150(11), 5059-5069.
- 17 La Flamme, A.C., Buckner, F.S., Swindle, J., Ajioka, J., Van Voorhis, W.C. (1995) Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal

- sequence requirements and processing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75, 25–31.
- 18 Mißlitz, A., Mottram, J.C., Overath, P., Aebsicher, T. (2000) Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 107(2), 251-261.
- 19 Furger, A., Jungi T.W., Salomone, J.Y., Weynans, V., Roditi, I. (2001) Stable expression of biologically active recombinant bovine interleukin-4 in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Letters*, 508(1), 90-94.
- 20 Dumas, C., Muyombwe, A., Roy, G., Matte, C., Ouellette, M., Olivier, M., Papadopoulou, B. (2003) Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages *in vitro* and delays disease development in mice. *Infection and Immunity*, 71(11), 6499-6509.
- 21 Clayton, C.E. (1999) Genetic Manipulation of Kinetoplastida. *Parasitology Today*, 15(9), 372-378.
- 22 Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G.A. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99(1), 89-101.
- 23 LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & Development*, 7(6), 996-1007.
- 24 WO 01/32896 A1, Protein Expression System for non-pathogentic Kinetoplastidae. 05.11.1999.
- 25 Wiese, M., Ilg, T., Lottspeich, F., Overath, P. (1995) Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *EMBO Journal*, 14(69), 1067-1074.
- 26 Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R., Alexandrov, K. (2005) Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expression and Purification*, 42, 37-46.
- 27 Lukeš, J., Paris, Z., Regmi, S., Breitling, R., Mureev, S., Kushnir, S., Pyatkov, K., Jirků, M., Alexandrov, K.A. (2006) Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 148(2), 125-132.
- 28 Breton, M., Zhao, C., Ouellette, M., Tremblay, M.J., Papadopoulou, B. (2007) A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *Journal of General Virology*, 88(1), 217-225.
- 29 Soleimani, M., Mahboudi, F., Davoudi, N., Amanzadeh, A., Azizi, M., Adeli, A., Rastegar, H., Barkhordari, F., Mohajer-Maghari, B. (2007) Expression of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) in *Leishmania tarentolae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48, 55-61.
- 30 Niculae, A., Bayer, P., Cirstea, I., Bergbrede, T., Pietrucha, R., Gruen, M., Breitling, R., Alexandrov, K. (2006) Isotop labeling of recombinant proteins expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expression and Purification*, 48, 167-172.
- 31 Simpson, L., Frech, G.C., Maslov, D.A. (1996) RNA editing in Trypanosomatid

- mitochondria. Methods in Enzymology, 264, 99-121.
- 32 Lucius, R. & Loos-Franke, B. (1997) Parasitologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN 3-86025-275-5, S. 39 und 56.
- 33 Elwasila, M. (1988) *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentolae annularis* in the Sudan. Parasitology Research, 74, 591-592.
- 34 Wiser, M.F. (2004) KINETOPLASTIDS. Internetseite, Tulane University, <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>, 19. Oktober.
- 35 Wallbanks, K.R., Maazoun, R., Canning, E.U., Rioux, J.A. (1985) The identity of *Leishmania tarentolae* Wenyon 1921. Parasitology, 90, 67-78.
- 36 Gomez-Eichelmann, M.C., Holz, G., Beach, D., Simpson, A.M., Simpson, L. (1988) Comparison of several lizard *Leishmania* species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. Molecular and Biochemical Parasitology, 27, 143-158.
- 37 Simpson, L. & Holz, G. (1988) The Status of *Leishmania tarentolae/Trypanosoma platydactyli*. Parasitology Today, 4(4), 115-118.
- 38 Briones, M.R.S., Nelson, K., Beverley, S.M., Affonso, H.T., Camargo, E.P., Floeter-Winter, L.M. (1992) *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Molecular and Biochemical Parasitology, 53, 121-128.
- 39 Robb, L.A. (1975) The preparation of an improved tetanus toxoid by removal of a sensitizing fraction. In: Proc. 4th Internat. Conf. Tetanus, Dakar, Senegal, Foundation Mérieux, Lyon, S. 735-743.
- 40 Yamamoto, A. & Akama, K. (1969) Studies on the side effects of tetanus toxoid. 1. Sensitizing ability of substances present in the medium. Japanese Journal of Bacteriology, 24, 359-364.
- 41 Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K., Pandey, V.C. (1997) Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. Molecular and Cellular Biochemistry, 171, 65-68.
- 42 Pal, J. & Joshi-Purandare, M. (2001) Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured *in vitro*. Journal of Biosciences, 26, 225-231.
- 43 Chang, K.P. & Fish, W.R. (1983) *Leishmania*. In: In vitro cultivation of protozoan parasites. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, S. 111-153.
- 44 Schuster, F.L. & Sullivan, J.J. (2002) Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clinical Microbiology Reviews, 15(3), 374-389.
- 45 Gupta, A.K. & Saran, R. (1991) *In-vitro* maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes in cheap, serum-free, hemin-base, autoclaveable culture medium. Journal of Communicable Diseases, 23(4), 276-277.
- 46 Limoncu, M.E., Özbilgin, A., Balcioğlu, I.C., Özböl, Y. (2004) Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of *Leishmania* parasites. Journal of Basic Microbiology, 44(3), 197-202.
- 47 Meehan, H.A., Lundberg, R.A., Connell, G.J. (2000) A trypanosomatid protein specifically interacts with a mammalian iron-responsive element. Parasitology Research, 86, 109-114.
- 48 Ali, S.A., Iqbal, J., Ahmad, B., Masoom, M. (1998) A semisynthetic fetal calf serum-

- free liquid medium for *in vitro* cultivation of *Leishmania* promastigotes. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 59, 163-165.
- 49 Limoncu, M.E., Balcioğlu, I.C., Yereli, K., Özböl, Y., Özbilgin, A. (1997) A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. Journal of Clinical Microbiology, 35, 2430-2431.
- 50 Palomino, J.C. (1982) Peptone-yeast autolysate-fetal bovine serum 10, a simple, inexpensive liquid medium for the cultivation of *Leishmania* spp. Journal of Clinical Microbiology, 15, 949-950.
- 51 Merlen, T., Sereno, D., Brajon, N., Rostand, F., Lemesre, J.-L. (1999) *Leishmania* spp.: Completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous *in vitro* cultivation of infective promastigote forms. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60, 41-50.
- 52 McCarthy-Burke, C., Bates, P.A., Dwyer, D.M. (1991) *Leishmania donovani*: Use of two different, commercially available chemically defined media for the continuous *in vitro* cultivation of promastigotes. Experimental Parasitology, 73, 385-387.
- 53 O'Daly, J.A. & Rodriguez, M.B. (1988) Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. in chemically defined media. Acta Tropica, 45, 109-126.
- 54 Melo, N.M., Peixoto de Azevedo, H., Roitman, I., Mayrink, W. (1985) A new defined medium for cultivating *Leishmania* promastigotes. Acta Tropica, 42, 137-141.
- 55 Steiger, R.F. & Black, C.D.V. (1980) Simplified defined media for cultivating *Leishmania donovani* promastigotes. Acta Tropica, 37, 195-198.
- 56 Steiger, R.F. & Steiger, E. (1977) Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: Nutritional requirements. Journal of Protozoology, 24(3), 437-441.
- 57 Trager, W. (1957) Nutrition of a hemoflagellate (*Leishmania tarentolae*) having an interchangeable requirement for cholin or pyridoxal. Journal of Protozoology, 4, 269-276.
- 58 Toole, B.P. (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. Nature Reviews Cancer, 4, 528-539.
- 59 Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, ISBN 3-13-357814-6, S. 265-266.
- 60 Stern, R. & Jedrzejas, M.J. (2006) Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. Chemical Reviews, 106(3), 818-839.
- 61 Hofinger, E.S.A., Spickenreither, M., Oschmann, J., Bernhardt, G., Rudolph, R., Buschauer, A. (2007) Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *E. coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. Glycobiology, 17(4), 444-453.
- 62 Gold, E.W. (1982) Purification and properties of hyaluronidase from human liver. Biochemical Journal, 205, 69-74.
- 63 Datenbank NetNGlyc, www.cbs.dtu.dk, 2007.
- 64 Hill, D. & Dubey, J.P. (2002) *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clinical Microbiology and Infection, 8(10), 634-640.
- 65 Grimwood, J. & Smith, J.E. (1996) *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. International Journal of Parasitology, 26,

- 169-173.
- 66 Piergili, F.D. (2004) Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. *Parassitologia*, 46(1-2), 177-181.
- 67 Huang, X., Xuan, X., Hirata, H., Yokoyama, N., Xu, L., Suzuki, N., Igarashi, I. (2004) Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG2 for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 351-353.
- 68 Huang, X., Xuan, X., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T., Igarashi, I. (2002) Characterization of *Toxoplasma gondii* SAG2 expressed in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1343-1347.
- 69 Protein-Datenbank ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics, www.expasy.org, 2007.
- 70 Aubert, D., Maine, G.T., Villena, I., Hunt, J.C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, L.E., Nowlan, S.F., Pinon, J.M. (2000) Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1144-1150.
- 71 Lau, Y.L., Hisam, S., Fong, M.Y. (2006) Characterisation of a truncated *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Tropical Biomedicine*, 23(2), 186-193.
- 72 Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239.
- 73 Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 60(1), 85-103.
- 74 Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544.
- 75 Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R. (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227, 707-711.
- 76 Schaefer, F.W., Bell, E.J., Etges, F.J. (1970) *Leishmania tropica*: Chemostatic cultivation. *Experimental Parasitology*, 28, 465-472.
- 77 TerKuile, B.H. & Opperdoes, F.R. (1992) Comparative physiology of two protozoan parasites, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*, grown in chemostats. *Journal of Bacteriology*, 174, 2929-2934.
- 78 Enders, B., Brauns, F., Zwisler, O. (1977) Biochemical and technical considerations regarding the mass production of certain parasitic protozoa. *Bulletin of the World Health Organization*, 55(2-3), 393-402.
- 79 Sitz, M. (2007) Untersuchungen der Eigenschaften eines halbsynthetischen Nährmediums zur Kultivierung von *Leishmania tarentolae*. Diplomarbeit, FH Jena.
- 80 Weiland, N. (2006) Untersuchungen zur Kultivierbarkeit und Wachstumsparametern des eukaryontischen Parasiten *Leishmania tarentolae* in einem serumfreien Nährmedium. Diplomarbeit, FH Jena.
- 81 Lombardo, M.E., Araujo, L.S., Ciccarelli, A.B., Batlle, A. (2005) A spectrophotometric

- method for estimating hemin in biological systems. *Analytical Biochemistry*, 341, 199-203.
- 82 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- 83 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 84 Muckenschabel, I., Bernhardt, G., Spruss, T., Dietl, B., Buschauer, A. (1998) Quantification of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Letters*, 131, 13-20.
- 85 Hartmann, K., Lezki, E., Schäfer, W. (1974) Statistische Versuchsplanung und – auswertung in der Stoffwirtschaft. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, S. 47 ff.
- 86 **Fritzsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R., Pohl, H.-D. (2007) Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* – a new expression system for recombinant proteins. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 384-393.**
- 87 Boesen, M. (2005) Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens zum Nachweis von zellulärem Prion Protein bei Wiederkäuern. Ph. D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 88 Mueller, J.H. & Miller, P.A. (1954) Variable factors influencing the production of tetanus toxin. *Journal of Bacteriology*, 67, 271-274.
- 89 BactoTM manuals, www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/difcoBblManual.asp, Becton Dickinson, USA, 10.04.2006.
- 90 **Fritzsche, C., Sitz, M., Wolf, M., Pohl, H.-D. (200X) Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *Journal of Basic Microbiology*, (in press).**
- 91 Rupprecht, S. (2006) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* zur Entwicklung eines synthetischen Mediums. Diplomarbeit, FH Jena.
- 92 Gaughan, P.L.Z. & Krassner, S.M. (1971) Hemin deprivation in culture stages of the hemoflagellate, *Leishmania tarentolae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 39(B), 5-18.
- 93 Chang, K.P., Chang, C.S., Sassa, S. (1975) Heme biosynthesis in bacterium-protозoon symbioses: Enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbionts. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Biochemistry*, 72(8), 2979-2983.
- 94 Paneque, A., Fernández-Bertrán, J., Reguera, E., Yee-Madeira, H. (2003) Mechano-chemical synthesis and spectroscopic characterisation of hemin complexes with some amino acids. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal Organic Chemistry*, 33(8), 1405-1416.
- 95 Tomlinson, E.J. & Ferguson, S.J. (2000) Conversion of a c type cytochrome to a b type that spontaneously forms *in vitro* from apo protein and heme: Implications for c type cytochrome biogenesis and folding. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97(10), 5156-5160.
- 96 Loftsson, T. & O'Fee, R. (2003) Cyclodextrins in Solid Dosage Forms.

- BUSINESSBRIEFING: PHARMATECH, 76-81.
- 97 Greenberg-Ofrath, N., Terespolosky, Y., Kahane, I., Bar, R. (1993) Cyclodextrins as carriers of Cholesterol and Fatty Acids in Cultivation of Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 547-551.
- 98 Liu, Z., Cai, R., Mao, L., Huang, H., Ma, W. (1999) Highly sensitive spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide with β -cyclodextrin-hemin as catalyst. *Analyst*, 124, 173-176.
- 99 Cannon, J.B., Yunker, M.H., Luoma, N. (1995) The Effect of Aggregation Inhibitors and Antioxidants on the Stability of Hemin Solutions. *Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 49(2), 77-82.
- 100 Zunszain, P.A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., Curry, S. (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structural biology*, 3(6), doi: 10.1186/1472-6807-3-6.
- 101 Biggers, J.D., Summers, M.C., McGinnis, L.K. (1997) Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Human Reproduction Update*, 3(2), 125-135.
- 102 **Fritzsche, C. & Pohl, H.-D. (2007) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* in LEXSY-Broth YS-Medium. In: Tagungsband zur 8. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, Fachhochschule Jena, ISBN 3-932886-15-1, S. 92-96.**
- 103 Larson, R.A. & Cervini-Silva, J. (2000) Dechlorination of substituted trichloromethanes by an iron (II) porphyrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(3), 543-548.
- 104 Chang, C.S. & Chang, K.-P. (1985) Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 267-276.
- 105 Lübbert, A. (2006) Bioprocess Engineering: Microbial Cultures - Fermentation Recipies. Vorlesungsskript, Universität Halle-Wittenberg, S. 29ff.
- 106 Zilberstein, D. & Shapira, M. (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 48, 449-470.
- 107 Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0566-1, S. 165.
- 108 Wolf, K.-H. (1994) Aufgaben zur Bioreaktionstechnik. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 34ff.
- 109 **Pohl, H.-D., Fritzsche, C., Weiland, N., Sitz, M. (2006/2007) Kultivierung von *Leishmania tarentolae* in einer kontinuierlichen Prozessführung. Forschungsbericht, Fachhochschule Jena, ISBN 978-3-932886-17-1, S. 55-56.**
- 110 Wolf, M. (2004) Fermentation von *Leishmania tarentolae* im Labormaßstab und Herstellung eines GFP-Standards aus rekombinanten *Escherichia coli* und *Leishmania tarentolae*. Diplomarbeit, FH Jena.
- 111 **Fritzsche, C. & Pohl, H.-D. (2006) Kultivierung des Parasiten *Leishmania tarentolae* im Laborfermenter. In: Tagungsband zur 7. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz Mitteldeutscher Fachhochschulen, Fachhochschule Harz, Wernigerode, ISBN 3-00-018148-2, S. 231-232.**
- 112 **Fritzsche, C., Wolf, M., Rupprecht, S., Pohl, H.-D. (2007) Cultivation of *Leishmania tarentolae* in complex nutrient media in bioreactors (lab scale). In: Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2007 in Osnabrück, Biospektrum**

Sonderausgabe, S. 51.

- 113 Moser, A. (1981) Bioprozeßtechnik: Berechnungsgrundlagen der Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse. Springer Verlag Wien - New York, S. 73.
- 114 **Fritsche, C., Pohl, H.-D., Weiland, N. (2006) Nährmedium und Verfahren zur Kultivierung eines Protozoan zu hohen Zelldichten mit hohen spezifischen Wachstumsraten. Deutsche Patentanmeldung 10 2006 041 388.1-41, Anmelder: Fachhochschule Jena.**
- 115 Bretschneider, T. (2007) Modellierung zyklischer FedBatch-Prozesse von *L. tarentolae* zur Herstellung eines rekombinanten, sekretorischen Produktes. Studentisches Forschungsprojekt, Fachhochschule Jena.
- 116 Bretschneider, T. (2007) ZfedBatch_1D. Programm für MATLAB[®], entstanden im Rahmen des Studentisches Forschungsprojektes, Fachhochschule Jena.
- 117 Bretschneider, T. (2007) ZFedBatch_SAG2_6. Programm für MATLAB[®], entstanden im Rahmen des Studentisches Forschungsprojektes, Fachhochschule Jena.
- 118 Rehm, H. (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-1195-5, S. 13.
- 119 Chmiel, H. (2006) Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, München, S. 111.
- 120 Blum, J.J. (1994) Energy metabolism of *Leishmania*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 26, 147-155.
- 121 Louassini, M., Foulquié, M.R., Benítez, R., Adroher, F.J. (1999) Activity of key enzymes in glucose catabolism during the growth and metacyclogenesis of *Leishmania infantum*. Parasitology Research, 85, 300-306.
- 122 Crowther, S., Fulton, J.D., Joyner, L.P. (1954) The metabolism of *Leishmania donovani* in culture. Biochemical Journal, 56(2), 182-185.
- 123 Steiger, R.F. & Meshnik, S.R. (1977) Amino-acid and glucose utilization of *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71, 441-443.
- 124 Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., Tielens, A.G.M. (1998) Trypanosomatidae produce acetat via a mitochondrial acetat:succinate CoA transferase. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 95, 3036-3041.
- 125 Löffler, G. (2004) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 227.
- 126 Callahan, H.L., Portal, I.F., Bensinger, S.J., Grogl, M. (1996) *Leishmania* spp: Temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. Experimental Parasitology, 84, 400-409.
- 127 Trager, W. (1974) Nutrition and biosynthetic capabilities of flagellates: problems of *in vitro* cultivation and differentiation. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, Ciba Foundation Symposium 20, Elsevier, Amsterdam, S. 225-254.
- 128 Krassner, S.M. (1965) Effect of temperature on growth and nutritional requirements of *Leishmania tarentolae* in a defined medium. Journal of Protozoology, 12(1), 73-78.
- 129 Glaser, T.A., Baatz, J.E., Kreishman, G.P., Mukkada, A.J. (1988) pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85, 7602-7606.

- 130 Schaefer, F.W. & Mukkasa, A.J. (1976) Specificity of the glucose transport system in *Leishmania tropica* promastigotes. *Journal of Protozoology*, 23(3), 446-449.
- 131 Bergter, F. (1983) Wachstum von Mikroorganismen, Experimente und Modelle. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, S. 58.
- 132 TerKuile, B.H. & Opperdoes, F.R., (1993) Uptake and turnover of glucose in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60, 313-322.
- 133 Simpson, L. (1968) Effect of acriflavine on the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. Mode of action and physiological correlates of the loss of kinetoplast DNA. *Journal of Cell Biology*, 37, 660-682.
- 134 Siegel, S. M., Roberts, K., Lederman, M., Daly, O. (1967) Microbiology of saturated salt solutions and other harsh environments. II. Ribonucleotide dependency in the growth of a salt-habituuated *Penicillium notatum* in salt-free nutrient media. *Plant Physiology*, 42, 201-204.
- 135 Hammond, D.J. & Gutteridge, W.E. (1984) Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 13(3), 243-261.
- 136 Joshi, M.B. & Dwyer, D.M. (2007) Molecular and functional analyses of a novel class I secretory nuclease from the human pathogen, *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 10079-10095.
- 137 Debrabant, A., Ghedin, E., Dwyer, D.M. (2000) Dissection of the functional domains of the *Leishmania* surface membrane 3'-nucleotidase/nuclease, a unique member of the class I nuclease family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16366-16372.
- 138 Yamage, M., Debrabant, A., Dwyer D.M. (2000) Molecular characterization of a hyperinducible, surface membrane-anchored, class I nuclease of a trypanosomatid parasite. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 36369-36379.
- 139 Debrabant, A., Bastien, P., Dwyer, D.M. (2001) A unique surface membrane anchored purine-salvage enzyme is conserved among a group of primitive eukaryotic human pathogens. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 220(1-2), 109-116.
- 140 Sopwith, W.F., Debrabant, A., Yamage, M., Dwyer, D.M., Bates, P.A. (2002) Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*. *International Journal for Parasitology*, 32(4), 449-459.
- 141 Carter, N.S., Landfear, S.M., Ullman, B. (2001) Nucleoside transporters of parasitic protozoa. *Trends Parasitology*, 17(3), 142-145.
- 142 Vasudevan, G., Carter, N.S., Drew, M.E., Beverley, S.M., Sanchez, M.A., Seyfang, A., Ullman, B., Landfear, S.M. (1998) Cloning of *Leishmania* nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(17), 9873-9878.
- 143 Landfear, S.M., Ullman, B., Carter, N.S., Sanchez, M.A. (2004) Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell*. 3(2), 245-254.
- 144 Lottspeich, F. & Engels, J.W. (2006) Bioanalytik. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 38.
- 145 Lottspeich, F. & Engels, J.W. (2006) Bioanalytik. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 579.
- 146 André, S., Kaltner, H., Kopitz, J., Siebert, H.-C. (2006) Wie der Zuckerkode entschlüsselt wird. Biospektrum, 7, 706-709.

LEBENSLAUF

Persönliche Informationen

Name: Fritsche, geb. Fritsche
Vorname: Claudia Lieselotte Ella
Geburtsdatum: 01.02.1981
Geburtsort: Bad Frankenhausen
Familienstand: verheiratet

Schulische und akademische Bildung

1987 - 1991 Grundschule Ringleben
1991 - 1999 Kyffhäuser-Gymnasium Bad Frankenhausen
1999 - 2003 Biotechnologie-Studium an der Fachhochschule Jena,
Abschluss als Diplom-Ingenieurin(FH)
Seit 2004 Doktorarbeit an der Fachhochschule Jena im Fachbereich
Medizintechnik und Biotechnologie unter der Betreuung von
Prof. Dr. M. Pietzsch von der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg und von Prof. Dr.-Ing. H.-D. Pohl von der
Fachhochschule Jena

Berufliche und praktische Erfahrungen

09/2004 - 08/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) an der
Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik und
Biotechnologie
09/2007 – 12/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) bei der Jena
Bioscience GmbH
03/2008 – 08/2008 Dozentin (Lehrerin für besondere Aufgaben) für das Fachgebiet
Gentechnik, Fachhochschule Jena

Danksagung

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all denjenigen Personen, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Arbeit wurde im Rahmen einer kooperativen Promotion zwischen der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Fachhochschule Jena erstellt. An dieser Stelle bedanke ich mich bei meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Pietzsch und Prof. Dr.-Ing. Pohl für dieses spannende Forschungsthema, die hilfreiche Unterstützung bei großen und kleinen Problemen, die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Der Fachhochschule Jena gebührt mein besonderer Dank. Durch das spezielle Doktoranden-Förderprogramm bekam ich die strukturelle Unterstützung, als FH-Absolvent das Unternehmen Promotion anzugehen.

Weiterhin danke ich Dr. Grün, Dr. Breitling und den Mitarbeitern der Firma Jena Bioscience GmbH für die finanzielle und fachliche Unterstützung bei der *Leishmania* Kultivierung. Außerdem danke ich dem Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH für den rekombinanten *Leishmania* Stamm.

Den Mitarbeitern der Fachhochschule Jena, insbesondere des Fachbereiches Medizintechnik und Biotechnologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Einen herzlichen Dank an Marco Schmidt für die vielen anregenden Diskussionen und die Unterstützung im Labor. Weiterhin danke ich Mandy Sitz, Norman Weiland, Marco Wolf, Stefan Rupprecht und Tom Bretschneider sowie den verschiedenen studentischen Hilfskräften für ihre Mitarbeit in der *Leishmania* Forschung. Vielen Dank für den unermüdlichen Einsatz, besonders bei den nächtlichen Fermentationen. Diese Untersuchungen haben wesentlich zu meiner Dissertation beigetragen.

Meinen Eltern und meiner Schwester Carolin danke ich für den seelischen und moralischen Beistand sowie die Unterstützung bei Studium und Promotion.

Ich danke meinem Mann Roberto, der mir in den letzten vier Jahren täglich sein Vertrauen und seine Unterstützung gegeben hat, die Herausforderungen der Doktorarbeit zu meistern.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und dass diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht sind.

Halle (Saale), den 08.09.2008