

**„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

<b>Publikationen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
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
<b>2 Zielstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
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
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>TEIL A: ERMITTLUNG STATISCHER PROZESSPARAMETER</b> .....	<b>35</b>
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
<b>4.2</b>	<b>Primäre Energiequelle – Glukose .....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Ertragskoeffizienten $Y_{X/GLC}$ , $Y_{N/GLC}$ .....	50
4.2.2	Alternative C-Quellen .....	51
<b>4.3</b>	<b>Essentielle Eisenquelle – Hemin .....</b>	<b>51</b>
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
<b><u>TEIL B: ERMITTLUNG DYNAMISCHER PROZESSPARAMETER.....</u></b>		<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b><math>\mu = f(\text{Temperatur})</math>.....</b>	<b>61</b>
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
<b>4.5</b>	<b><math>\mu, \nu = f(\text{pH})</math>.....</b>	<b>65</b>
<b>4.6</b>	<b><math>\mu = f(\text{Glukose})</math> .....</b>	<b>69</b>
4.6.1	Limitationsbereich durch Kultivierung im Chemostaten .....	69
4.6.2	Inhibitionskonzentration der Glukose .....	74
<b>4.7</b>	<b><math>\mu = f(\text{Hemin})</math> .....</b>	<b>76</b>
<b><u>TEIL C: STRATEGIEN ZUR PROZESSFÜHRUNG .....</u></b>		<b>79</b>
<b>4.8</b>	<b>Bioreaktorauswahl .....</b>	<b>79</b>
<b>4.9</b>	<b>pH-Regelung.....</b>	<b>80</b>
<b>4.10</b>	<b>Batch-Kultivierung mit YE-Medium .....</b>	<b>80</b>
<b>4.11</b>	<b>Zudosagestrategien für hohe Zelldichten im Komplexmedium.....</b>	<b>80</b>
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
<b>4.12</b>	<b>Strategien für das definierte Nährmedium.....</b>	<b>92</b>
4.12.1	Ausbeutesteigerung durch Fraktion „Pool 5“ .....	92
4.12.2	Ausbeutesteigerung durch Hefe-RNA .....	93

<b>TEIL D: EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN</b> .....	<b>101</b>
4.13 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).....	101
4.14 Oberflächenantigen (SAG2) von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	101
4.15 Hyaluronidase (Hyal-1) .....	108
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>113</b>
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
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>134</b>
<b>7 Summary</b> .....	<b>139</b>
<b>8 Ausblick</b> .....	<b>143</b>
<b>9 Anhang</b> .....	<b>145</b>
<b>10 Literatur</b> .....	<b>166</b>

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]
$\Delta t$	Zeitintervall [h]
$t_{\text{exp}}$	Zeitspanne des exponentiellen Wachstums [h]
V	Volumen [ml; l]
T	Temperatur [°C]
OD <sub>600nm</sub>	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]
$X_{\text{max}}$	maximale Biomassekonzentration [g/l TBM]
$\Delta X$	Biomassekonzentrationsänderung [g/l TBM]
N	Zelldichte [Zellen/ml]
$N_0$	Zelldichte zum Startzeitpunkt [Zellen/ml]
$N_{\text{exp}}$	maximale Zelldichte während des exponentiellen Wachstums [Zellen/ml]
$N_{\text{max}}$	maximale Zelldichte [Zellen/ml]
$\Delta N$	Zellzahländerung [Zellen/ml]
$\mu$	spezifische Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]
$\mu_{\text{max}}$	maximale spezifische Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]
$\nu$	spezifische Zellteilungsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]
$\nu_{\text{max}}$	maximale spezifische Zellteilungsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]
$g_{\text{exp}}$	Anzahl der Generationen während des exponentiellen Wachstums [-]
$g_{\text{ges}}$	Gesamtanzahl der Generationen [-]
$t_D$	Verdopplungszeit [h]
GLC	Glukosekonzentration [g/l]
GLC <sub>zu</sub>	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 [ $\text{h}^{-1}$ ]
$F_{\text{zu}}$	Zuflussvolumenstrom des Nährmediums aus der Vorlage [ml/h]
$V_R$	Reaktorvolumen [ml]
$k_L \cdot a$	maximalen spezifischen Sauerstofftransportkoeffizienten [ $\text{h}^{-1}$ ]

## Heminanalytik

$PA_{\text{korr}}$	korrigierte Peakfläche nach Kompensation der Basislinie [ $\text{A} \cdot \text{nm}$ ]
$\lambda$	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
$\varphi_e$	Freiheitsgrad zur Schätzung der Versuchsstreuung
n	Anzahl der Versuche an der Stelle i
$\tilde{y}^i$	Einzelmesswert an der Stelle i
$\bar{y}$	Mittelwert der Messungen
$\hat{y}^i$	der Modellwert an der Stelle i
$S_D$	Defektquadratsumme
$\varphi_D$	Freiheitsgrad zur Bestimmung der Modell
N	Anzahl der Versuche des Versuchsplanes
k	Anzahl der geschätzten Parameter des Modells
P	Signifikanzniveau
$F_{\text{krit}}$	kritischer Wert der F-verteiltern zufälligen Veränderlichen zur Überprüfung der Adäquatheitshypothese des Modells
R	Korrelationskoeffizient [-]