

**„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

| | |
|---|-----------|
| Publikationen | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 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 $Y_{X/GLC}$, $Y_{N/GLC}$ | 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 |
| <u>TEIL B: ERMITTLUNG DYNAMISCHER PROZESSPARAMETER</u> | | 61 |
| 4.4 | $\mu = f(\text{Temperatur})$ | 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 | $\mu, \nu = f(\text{pH})$ | 65 |
| 4.6 | $\mu = f(\text{Glukose})$ | 69 |
| 4.6.1 | Limitationsbereich durch Kultivierung im Chemostaten | 69 |
| 4.6.2 | Inhibitionskonzentration der Glukose | 74 |
| 4.7 | $\mu = f(\text{Hemin})$ | 76 |
| <u>TEIL C: STRATEGIEN ZUR PROZESSFÜHRUNG</u> | | 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 |

| | |
|---|------------|
| 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] |
| OD _{600nm} | 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] |
| $k_L \cdot a$ | maximalen spezifischen Sauerstofftransportkoeffizienten [h^{-1}] |

Heminanalytik

| | |
|--------------------|--|
| PA_{korr} | korrigierte Peakfläche nach Kompensation der Basislinie [$\text{A} \cdot \text{nm}$] |
| 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 |
| \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 |
| 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-verteiltern zufälligen Veränderlichen zur Überprüfung der Adäquatheitshypothese des Modells |
| R | Korrelationskoeffizient [-] |