

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 Proteinerückfaltung 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	Entwicklungs-status
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-Glykosylierung 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-Glykosylierungstyp nicht nachgewiesen werden. Gegenüber Säugerzellen fehlen bei der N-Glykosylierung 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 Glykosylierungsstrukturen.

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

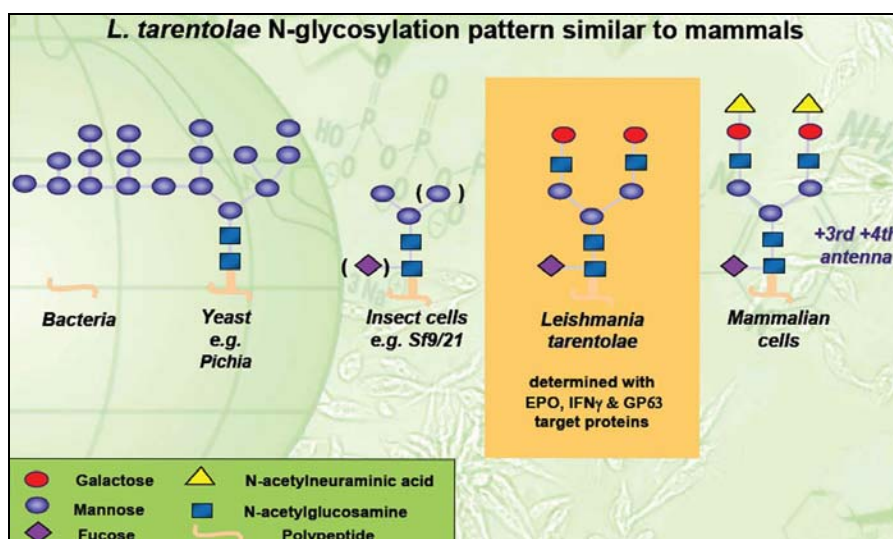


Abb. 1-1: Vergleich der N-Glykosylierung verschiedener Expressionssysteme, [Quelle: Jena Bioscience]

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, Fructose 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 Glykosoms 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</i> , <i>L. mexicana</i>	[18]
Green Fluorescent Protein (GFP)	<i>L. major</i> , <i>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 Kontrollsignale 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 galactosilierter, core- α -fucosilierter 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 Ornithindecaboxylase-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 (*aprt*). 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.

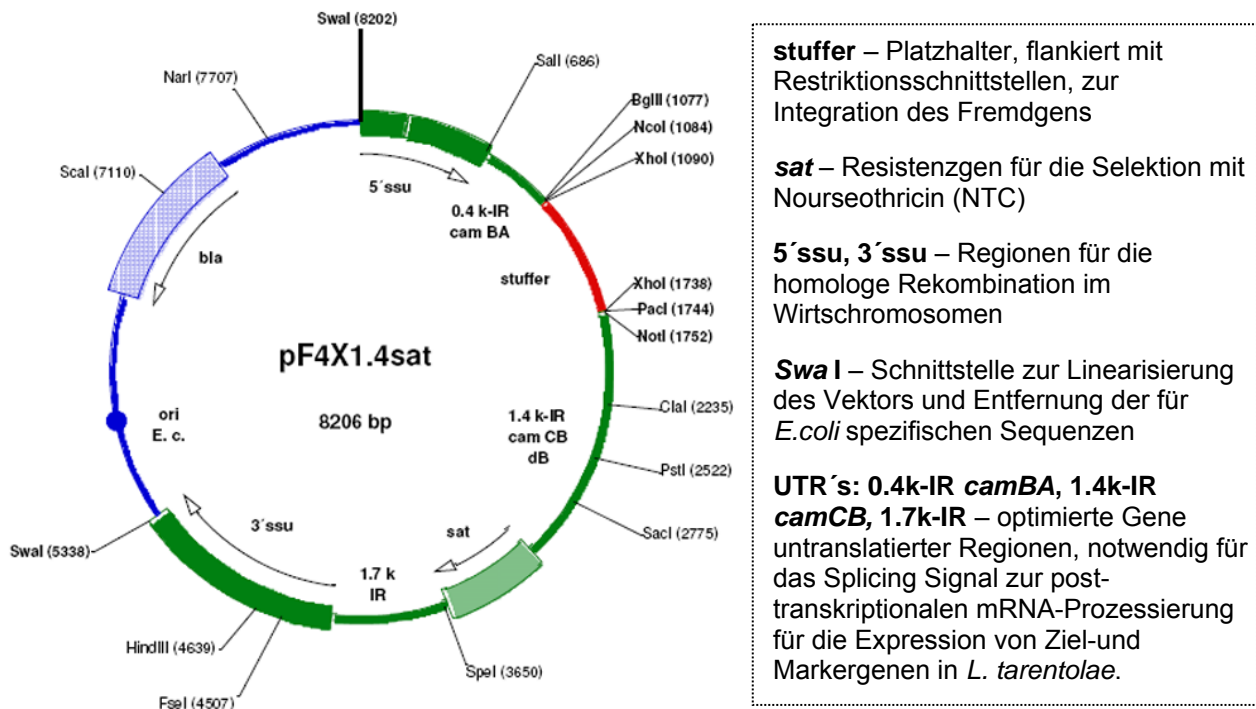


Abb. 1-2: Konstitutiver Expressionsvektor für *L. tarentolae* [Quelle: Jena Bioscience]

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-Glykosylierung 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 (ν), 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.

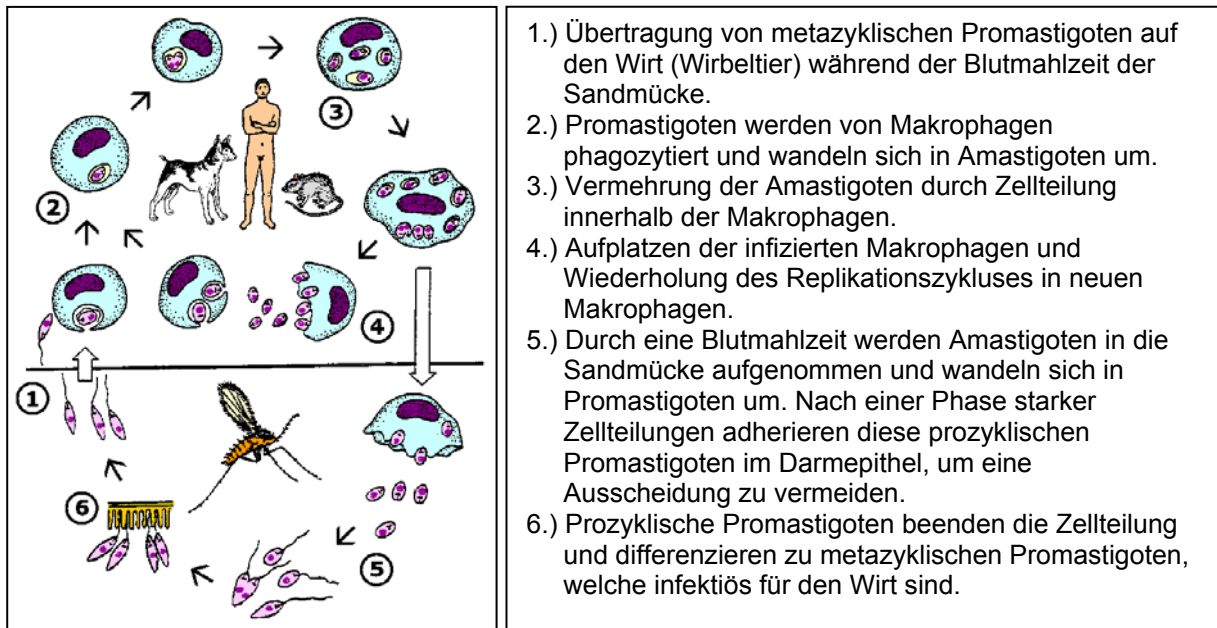


Abb. 1-3: Lebenszyklus der *Leishmania* Spezies mit Erklärungen.

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

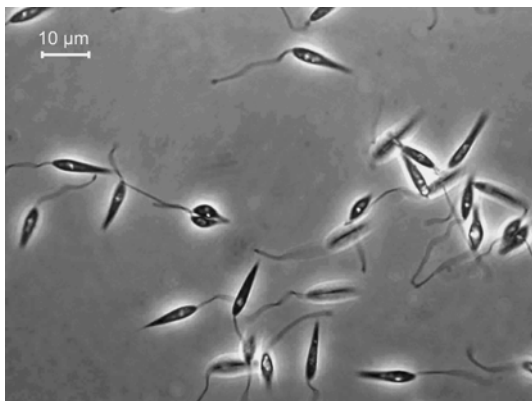


Abb. 1-4: Promastigoten von *L. tarentolae* im Lichtmikroskop, Phasenkontrast 2.

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 chargenabhängig 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 [°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	~ 2×10^6	~ 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
	Semi-definierte, flüssige Medien	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*
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> <i>L. brasiliensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i> <i>L. major</i>	Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin, Nukleotide	Standkultur	~ 7,9x10 ⁷	0,023*	~ 30*	7,3*	25
	McCarthy-Burke et al. [52]	1991	<i>L. donovani</i>	M199+HEPES, Folsäure, Hemin, Basal Medium mit Eagle's Vitaminen	Standkultur	4x10 ⁷	0,077	8,9 ± 0,1	~6,3*	26
				RPMI 1640+HEPES, Glutamin, Folsäure, Hemin, Basal Medium mit Eagle's Vitaminen, Adenosin	Standkultur	4x10 ⁷	0,043	15,9±0,05	~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	~ 7x10 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*10 ⁷	~0,008*	86,6*	2,5*	25
	Steiger & Black [55]	1980	<i>L. donovani</i>	RE IX: Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin	Standkultur	3,5*10 ⁷	~ 0,036*	19,2±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	2x10 ⁷	~ 0,04*	17,3±2,4	4,3*	27±1
	Trager [57]	1957	<i>L. tarentolae</i>	Aminosäuren, Salze, Vitamine, Hemin, Purine, Pyrimidine	Standkultur	5x10 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 Fremdstoffe 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 Glykosylierung des Proteins beeinflusst wurde.

Einleitung

Hyal-1 ist ein lösliches, säurereaktives, 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].