

2 Zielstellung

Leishmania tarentolae weist gegenüber anderen Expressionssystemen eine Reihe von Vorteilen auf. Besonders herausragend ist die Fähigkeit zur säugetierähnlichen N-Glykosylierung. 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 Zelldichten (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.