

## 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 Bacto™ 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.

Bacto™ Yeast Extract ist ein Konzentrat der gesamten wasserlöslichen Fraktion von autolytierten 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 dass 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  $\nu$  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 ausbalanciert 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

teilloxidierte 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<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O 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  $Y_{X/GLC}$  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  $Y_{X/GLC}$  als Mittelwert über 24 Messreihen für das YE-Medium bestimmt ( $Y_{X/GLC} = 0,93 \pm 0,09$  g TBM/ g Glukose). So erklären sich auch die notwendigen Variationen in  $Y_{X/GLC}$  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  $\mu\text{M}$  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 Hauptinflussgrößen 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  $Y_{\text{XH}}$  ist relativ hoch im Vergleich zum  $Y_{\text{X/GLC}}$ , 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, prothetische

## 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 Schalfaktor 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

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

## 5.2 Ermittlung dynamischer Prozessparameter

Die spezifischen Raten  $\mu$  und  $\nu$  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.

### $\mu=f(\text{Temp})$

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 Hühnerembryoextrakt 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 Proteinzusatz 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.

### $\mu, \nu = f(\text{pH})$

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  $\nu = f(\text{pH})$  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  $\nu = f(\text{pH})$  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 Glukoseaufnahme 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 schwoh 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  $\text{pH} > 7,5$  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 weist *L. tarentolae* wieder einen Vorteil gegenüber anderen eukaryotischen Expressionssystemen auf, denn höhere eukaryotische Zellen tolerieren diese drastischen Änderungen nicht [106].

### $\mu=f(\text{GLC})$

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  $\mu_{\max}$  (eigentlich  $v_{\max}$ , da aus der Zelldichte berechnet) von  $0,082 \text{ h}^{-1}$  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  $D = 0,059 \text{ h}^{-1}$  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  $0,059 \text{ h}^{-1}$  dieser Metabolismus noch aktiv war und als Folge dessen der pH sank. Dagegen wurde ab  $D \leq 0,047 \text{ h}^{-1}$  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.

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

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 Heminspeicher aufbrauchen. Aufgrund der erhaltenen Kinetik eröffnen sich verschiedene Hypothesen für diese kontinuierliche Kultivierung:

Hypothese 1: Der Heminspeicher 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 Heminspeicher 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 Adaptionszeit. Die sofortige Reaktion auf das frische Nährmedium kann so nicht erklärt werden.

## *Diskussion*

Hypothese 3: Der Heminspeicher ist nicht wirksam. Die Zellen sind auf die Heminzufuhr 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 glukoselimitierten 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  $\mu\text{g/ml}$  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 Heminkonzentration, die von 0,1 - 0,2  $\mu\text{g/ml}$  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 ( $\sim 15 \times 1,6 \mu\text{m}$ ) als normale Zellen ( $10 \times 2,2 \mu\text{m}$ ) [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 Halbsättigungskonstanten für Glukose und Hemin, den maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsrate 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  $\mu$  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. enriettii* unter Verwendung eines Rührreaktors mit Scheibenrührern kultiviert wurden (2 - 20 l-Maßstab, 100 - 140 h Kultivierungszeit). Bei einer Fermentation von *L. enriettii* 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 Schrägblattrührern ( $k_L \cdot a = 14 - 47 \text{ h}^{-1}$ , [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 auslöst, welche auf die Freisetzung von Zellproteinen hinweist. In einem Produktionsprozess kann bei Verwendung von Schrägblattrührern 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, durchgemischtes 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:  $X_{\text{exp}} = 3,4 \times 10^8$  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  $\mu$  und  $v$  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 gewöhnten *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 Nucleinsäure 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-Nucleotide *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 Nuclelease [136], eine  $\geq 40$  kDa membranständige 3'-Nucleotidase/Nuclease, die einzelsträngige Nucleinsäuren und 3'-Nucleotide hydrolysiert [137, 138, 139, 140], Membrantransporter für Nucleoside [141] und Adenosin/Pyrimidin-Nucleoside [142] und vier verschiedene Purin-Transporter für die Aufnahme von Adenosin, Pyrimidin-Nucleosiden, Inosin, Guanosin, Hypoxanthin, Xanthin, Adenin und Guanin in die Zellen [143].

Die *Leishmania* Spezies ist auf die Versorgung mit „vorgeformten“ Purinen, also Nucleosiden oder Nucleobasen, angewiesen [143]. Dies erklärt den wachstumsfördernden Effekt von Hefe-RNA, da wahrscheinlich die Zellen von *L. tarentolae* die Hefe-RNA hydrolysieren und anschließend über die Membrantransporter aufnehmen. Bestätigt wird die katabolische Verwendung von Nucleinsäure durch die Tatsache, dass *L. tarentolae* auf diesem Weg nicht transfizierbar ist, d. h., die vorgelegten Nucleinsäuren 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 Nucleoside oder Nucleotide, die mit Ethidiumbromid nicht

## Diskussion

mehr anfärbbar sind. Letzteres ist wegen der Vielzahl an Nucleosid/Nucleotid-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 Nucleinsäuren 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 ( $X_{\text{exp}} = 2 \text{ g/l}$ ). 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 His<sub>6</sub>-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 His<sub>6</sub>-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 voneinander 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  $\mu$  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.  $\mu$ -geführter FedBatch nicht verwendbar. Untersuchungen mit weiteren konstitutiven Stämmen müssen zeigen, ob dieses Verhalten im Allgemeinen durch den konstitutiven Wirtstamm 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 Kationenaustauschchromatographie 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 ( $\alpha$  oder  $\beta$ -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 glycosidischen Bindung werden mit Hilfe biophysikalischer Methoden wie NMR-Spektroskopie, Computerberechnungen und Röntgenwinkel- sowie 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.