

6 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung des biotechnologischen Potentials des *Leishmania tarentolae* Expressionssystems. Der Fokus lag auf der Bestimmung von statischen und dynamischen Prozessparametern, um eine optimale Kultivierung der promastigoten Form von *L. tarentolae* zu ermöglichen, da diese rekombinante Proteine außergewöhnlich homogen N-terminal glykosilieren und Strukturen vom Säugertyp erzeugen kann [Breitling *et al.* (2002)].

Das Nährmedium ist der wichtigste statische Prozessparameter. Für die Kultivierung von *L. tarentolae* stehen nun verschiedenen Komplexmedien zur Verfügung, die hohe Wachstumsraten ($\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$) und hohe Zelldichten ($6,5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ Zellen/ml) unterstützen. Mit dem YE-Medium konnte ein Nährmedium etabliert und evaluiert werden, welches nur noch Hemin als Substanz tierischen Ursprungs („animal-derived“) enthält. Die maximale spezifische Wachstumsrate beträgt $0,103 \text{ h}^{-1} \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ im YE-Medium. Es ist relativ einfach und preiswert herzustellen.

Das 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 Kultivierung von *L. tarentolae* ist als Standkultur, im Schüttelkolben oder im Bioreaktor möglich. Die geringsten Verdopplungszeiten (6,7 h im YE-Medium) weisen die Zellen unter geschüttelten oder gerührten Bedingungen auf. Die entwickelten Nährmedien sind für eine Kultivierung im Bioreaktor geeignet. Die Langzeitstabilität des Wachstums in der Standkultur konnte durch über 50 Passagen im YE-Medium nachgewiesen werden. Somit sind konstante Anfangsbedingungen für größere Kultivierungsmaßstäbe für jeweils ein halbes Jahr problemlos gewährleistet.

Glukose erwies sich als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle, deren Metabolismus im Komplexmedium mit einem Ansäuern des pH-Wertes verbunden war. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/GLC}$ wurde mit $0,93 \pm 0,09$ g Trockenbiomasse/ g Glukose ermittelt. Eine glukoselimitierte Kultivierung (Chemostat) war auch mit Komplexmedium möglich, wobei eine Halbsättigungskonzentration K_S des Monod-Modells zu 0,046 g/l Glukose bestimmt wurde. *L. tarentolae* zeigte eine große Toleranz gegenüber Glukose, denn eine wachstumshemmende Wirkung setzte ab einer Konzentration von 60 g/l (26°C) bzw. 40 g/l (30°C) ein.

Zusammenfassung

Hemin ist der essentielle Wachstumsfaktor für die Kultivierung von *L. tarentolae* und stellt eine interessante Steuergröße für einen Bioprozess dar. Grundlegende Voraussetzung war die Etablierung einer Heminanalytik, was mit einer wässrigen 2-Phasen-Extraktion in saures Chloroform gelang. Die Identifizierung der Haupteinflussgrößen auf diese Analytik führte zur Festlegung einer Standardprozedur. So konnte ein Ertragskoeffizient $Y_{X/H}$ von 834 g TBM pro g Hemin für exponentielles Wachstum über eine Standardkurve ermittelt werden. Dieser Ertragskoeffizient repräsentiert alle „heminverbrauchenden“ Vorgänge bei der Kultivierung, denn die Adsorption an die Glasoberfläche des Kultivierungsgefäßes beeinflusst in großem Maße die freie Heminkonzentration. Auch wenn nur ein Teil des zugegebenen Hemin tatsächlich von den Zellen verbraucht wird, ist die komplette Zugabe erforderlich, damit den Zellen genügend Hemin zur Verfügung steht. Der ermittelte Ertragskoeffizient ist für eine Prozessmodellierung anwendbar, was beispielhaft an einem heminlimitierten Chemostaten gezeigt wurde. Überraschend war, dass die Zellen der Kultivierung in einem heminlimitierten Prozess folgten, da Hinweise auf einen Heminspeicher vorhanden waren. Die Zellen konnten bei Heminmangel das Wachstum für ca. 3 Generationen fortsetzen. Eine Halbsättigungskonzentration des Substrates Hemin (K_H) von 31 µg/l wurde berechnet und kann als Orientierungsgröße für zukünftige Untersuchungen dienen. Hemin ist die einzige verbleibende Substanz tierischen Ursprungs (Rind oder Schwein) und kann gegenwärtig nicht durch eine Alternativsubstanz oder ein handelsübliches, synthetisch hergestelltes Heminpräparat ersetzt werden.

Die Untersuchungen ergaben ein optimales Wachstum von *L. tarentolae* bei einer Temperatur von 30°C. Dies wurde sowohl im Schüttelkolben als auch im Bioreaktor bestätigt. Sehr überraschend war dieser Befund, da die Promastigoten der *Leishmania* Spezies gewöhnlich bei 22 – 28°C, aber hauptsächlich bei 26°C kultiviert werden. Höhere Temperaturen lösen im Allgemeinen eine Transformation in die amastigote Form aus. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 26°C 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.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine Kultivierung im neutralen pH-Bereich (pH 6,9 – 7,6) optimal ist. 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 und bei Verringerung des pH-Wertes zu pH 5 zeigte sich eine unvollständige Umwandlung in die amastigote Form.

Zusammenfassung

Drastische Veränderungen der extrazellulären Umgebung oder des Metabolismus werden in morphologischen Änderungen der Zellen abgebildet. Dies ist ein wichtiges Erkenntnis zur Charakterisierung des Wachstums. Zelldegenerationen traten bei pH-Werten $> 7,6$ und bei alten Kulturen auf. Sind die Zellen mit einer hohen Wachstumsrate gewachsen, z. B. beim Einschwingen/ Auswaschen des Chemostaten oder einem exponentiellen Wachstum im Schüttelkolben, dann war die Länge der Geißel kleiner als die des Zellkörpers, teilweise auch extrem verkürzt oder nicht mehr vorhanden. Der Zellkörper war immer dick und tropfenförmig. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen bei Wachstum unter limitierten Bedingungen (Steady State des Chemostaten) deutlich verlängerte Geißeln, die die doppelte Länge des Zellkörpers annehmen konnten. Auch war der Zellkörper viel dünner, aber immer noch tropfenförmig. Bei der GLC-geführten Kultivierung zeigte sich sogar eine Abhängigkeit von der Verdünnungsrate (D), denn die Zellen waren viel schlanker bei einem kleinen als bei einem großen D . Nach dem Umschalten auf den Aminosäure-Metabolismus erschienen die Zellen sehr dünn und bildeten längere Geißeln aus. Keine Veränderungen wurden bei Variation der Kultivierungstemperatur registriert.

Weiterhin wurden verschiedene FedBatch-Strategien zur Erzielung hoher Zelldichten beim Wachstum auf Glukose entworfen. Es empfiehlt sich, die Glukose und das Hemin unlimitiert zu halten und Nährmedienkonzentrat zuzudosieren. Mit dieser Strategie konnte im YE-Medium 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 Angaben von Simpson *et al.* (1996) bedeutet dies eine 4,5mal höhere Zelldichte.

Für einen Bioprozess empfiehlt sich die Einhaltung eines Drehzahlbereiches von 100 bis 400 rpm bei Verwendung von Schrägblattrührern. Im Bereich von 400 – 500 rpm begann die Lyse einzelner Zellen. Vorteilhaft ist die Regelung des pH-Wertes mit Kali- oder Natronlauge, der Einsatz von Silikonöl zur Schaumbekämpfung oder die Verwendung von PEG-Hemin, welches durch den PEG1000-Anteil eine Antischaumwirkung besitzt.

Bei der Entwicklung der definierten SFP-Medien trat das Problem der Heminfällung auf. Mit BSA und PEG1000 konnten zwei Lösungsvermittler gefunden werden. Aufgrund der synthetischen Herstellung und der geringeren Neigung zur Schaumbildung ist das PEG1000 zu bevorzugen. Im definierten SFP-Medium konnte nahezu eine Verdopplung der Zelldichte durch Zugabe von Hefe-RNA 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 gezeigt werden. Mit einer FedBatch-Strategie, bei der Nährmedium ausgetauscht

Zusammenfassung

wurde, konnte der Prozess über 5 Generationen gehalten werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Prozessparameter pH, pO₂ und CO₂ wichtige Orientierungsmöglichkeiten bieten.

Die Untersuchungen belegen, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen das Monod-Modell für das Wachstum von *L. tarentolae* grundsätzlich eine Gültigkeit besitzt, ausgenommen bei einer Glukoseinhibition. Weiterhin wurde deutlich, dass der Substrateinfluss größer als der Temperatur- oder pH-Einfluss ist. Dieses eröffnet gute Steuermöglichkeiten für μ beziehungsweise v .

Mit den Untersuchungen am Wildtyp-Stamm konnten grundlegende Parameter und Strategien für eine optimale Kultivierung herausgearbeitet werden und als Orientierungspunkte bei konkreten Wirt-Vektor-Systemen dienen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf die Expression der Modellproteine Hyaluronidase-1, Oberflächenantigen SAG2 von *Toxoplasma gondii* und EGFP übertragen. Die entwickelten Nährmedien unterstützen die Expression der Fremdproteine. Das Wirts-Vektor-System mit intrazellulärer Expression von EGFP zeigte nahezu identische Wachstumsraten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Dagegen war ein Absinken von μ und v bei dem konstitutiv, sekretorischen SAG2-Stamm zu registrieren, unabhängig von dem verwendeten Nährmedium. Die Expression des SAG2 wurde im Western Blot durch den His₆-Tag nachgewiesen, jedoch erst nach 100facher Aufkonzentrierung des Nährmedienüberstandes. Eine Proteinkonzentrationsbestimmung war nicht möglich. Die Antigenität des rekombinanten SAG2 müssen weitere Untersuchungen zeigen. Bei der Bioreaktorkultivierung folgte die SAG2-Bildung nicht dem exponentiellen Wachstum. Der spezifische SAG2-Anteil nahm tendenziell ab. Eine Produktinhibition wurde vermutet.

Mit der Hyaluronidase-1 erfolgte die heterologe Expression eines Glykoproteins. Die korrekte genomische Integration des *hyal-1*-Gens wurde bewiesen. Die spezifische Hyal-1-Aktivität im Nährmedienüberstand war 8mal höherer als die von Hofinger *et al.* (2007) für Insektenzellen beschriebene. 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. Unter Berücksichtigung der Zelldichte und der kürzeren Induktionszeit weist *L. tarentolae* eine höhere Produktivität auf. Damit zeigt sich das große Potential dieses neuen Systems. Die hohen Aktivitätswerte weisen auf eine nativ gefaltete und glykosilierte Hyaluronidase-1 hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern deutlich die Kenntnisse über das *L. tarentolae* Expressionssystem, vor allem in Vorbereitung einer biotechnologischen Nutzung. Mit den ermittelten Halbsättigungskonstanten für Glukose und Hemin, den maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsrate sowie den Ertragskoeffizienten für Glukose und Hemin ist

Zusammenfassung

die Basis für alle weitere Fermentationsprozessentwürfe und –optimierungen gelegt. Mit den Nährmedien und Prozessstrategien können hohe Zelldichten in Verbindung mit Verdopplungszeiten von 5 - 7 h erzielt werden. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, Promastigoten von *L. tarentolae* für die Produktion von rekombinanten Proteinen zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung am Menschen einzusetzen. Durch die Möglichkeit der N-Glykosylierung von humanen Proteinen kann *L. tarentolae* als alternatives Expressionssystem zu Zellkultursystemen wie BHK oder CHO-Zellen eingesetzt werden.