

8 Ausblick

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist eine grundlegende Charakterisierung des *L. tarentolae* Expressionssystems in Bezug auf statische und dynamische Prozessparameter erfolgt. Weiterhin sind verschiedene Strategien zur Kultivierung des Organismus im Bioreaktor aufgezeigt und das biotechnologische Potential des Systems an der Expression verschiedener Modellproteine demonstriert wurden. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann eine optimale Kultivierung von *L. tarentolae* erfolgen.

Weiterführende Untersuchungen sind im Bereich der Vorkulturstrategie bei Fermentationen notwendig. Es ist zu prüfen, ob die Prozessführung von der Standkultur über zwei Schüttelkolben-Stufen bis zum Bioreaktor verkürzt werden könnte, um Vorbereitungszeit einzusparen.

Die Suche nach einer Heminalternative oder einem synthetisch hergestellten Heminpräparat sollte fortgesetzt werden, da Hemin die einzige verbleibende „animal-derived“ Substanz sowohl im Komplex- als auch im definierten Medium ist.

Das SFP(III)-Medium muss noch bezüglich der Inhaltsstoffe ausbalanciert werden, um hier die minimal notwendigen Substanzen in einer optimalen Konzentration einzusetzen. Anwendung könnten die Methoden der statistischen Versuchsplanung finden. Auch sollte ein anderes Präparat der Hefe-RNA verwendet werden, da dieses sehr preisintensiv ist. Zu überprüfen ist, ob eine Kultivierung mit Ribonukleinsäuren anderer Organismen möglich ist.

Weiterhin zeigten sich interessante Schaltbereiche, die für eine Produktbildung ausgenutzt werden könnten, beispielsweise das Umschalten zwischen Glukose- und Aminosäuremetabolismus oder die Transformation von Promastigoten zu Amastigoten. Die Transformation ist besonders interessant, denn die Zellstadien zeigen eine unterschiedliche Genexpression. Bei Integration des Fremdgens in stark transkribierte Bereiche der Amastigoten könnten die Zellen als Promastigoten zu hohen Zelldichten kultiviert werden und anschließend die Produktbildung durch Transformation ausgelöst werden. Weiterführenden Untersuchungen sind notwendig, um die Anwendbarkeit dieser Produktbildungsstrategie zu überprüfen und geeignete Transformationsbedingungen herauszufinden. Bei der pH-Erniedrigung zeigte sich ansatzweise eine Umwandlung, jedoch keine bei Temperaturerhöhung. Eine Kombination beider Parameter wird als am effektivsten für langzeitstabile Amastigoten angesehen [106].

Die Ergebnisse zeigen, dass *L. tarentolae* sowohl glukose- als auch heminlimitiert kultiviert werden kann. Gezielte FedBatch-Strategien mit μ -Steuerung können nun geplant werden. Dabei kann die Gültigkeit des Monod-Modells unter Beachtung der Einschränkungen angewandt werden. Die ermittelten Halbsättigungskonstanten für Glukose und Hemin, den

Ausblick

maximalen spezifischen Wachstums- und Zellteilungsraten sowie den Ertragskoeffizienten für Glukose und Hemin können als Basis für weitere Fermentationsprozessentwürfe und –optimierungen dienen.

Weiterführende Untersuchungen sind im Bereich der Expression von Fremdproteinen erforderlich. Zwar zeigten die verwendeten Wirts-Vektor-Systeme eine Produktbildung, jedoch konnte die Konzentration nicht bestimmt werden (SAG2) oder die Konzentration war so gering, dass das Fremdprotein nur über die spezifische Enzymaktivität nachweisbar war (Hyal-1). Mit den optimierten Wachstumsbedingungen sollte die Produktbildung mit *L. tarentolae* weiter charakterisiert werden. Beispielsweise bietet sich die Strategie zur Erzielung hoher Zelldichten im Komplexmedium an, um nach Produktion von Zellmasse die Produktbildung zu induzieren. Bei der Verwendung von konstitutiv exprimierenden Stämmen ist das Phänomen eines physiologisch bedingten Absinkens von μ weiter zu beobachten. Untersuchungen mit weiteren konstitutiven Stämmen müssen zeigen, ob dieses Verhalten im Allgemeinen durch den konstitutiven Wirtsstamm oder durch das spezielle Wirt-Vektor-System (SAG2-Stamm) ausgelöst wurde.

Ein interessanter Ansatzpunkt ist eine Biofilmbildung von *L. tarentolae*, die sich gezielt durch Ausfällung von Hemin, z. B. mit Natriumphosphat, auslösen lassen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dadurch könnte *L. tarentolae* auch in Immobilisierungs- oder Festbettreaktoren eingesetzt werden.

Für den Einsatz des *L. tarentolae* Expressionssystems für die Produktion von rekombinanten Proteinen zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung am Menschen sind fortführende Untersuchungen notwendig. Beispielsweise sollte nach alternativen Promotoren gesucht werden. Gegenwärtig werden zu viele Antibiotika für die Stabilität des Genkonstruktes eingesetzt. In einem Produktionsprozess sollen zukünftig keine Antibiotika-basierten Selektionssysteme mehr verwendet werden [1]. Weiterhin ist interessant, in wie weit *Leishmania* Zellen von Viren befallen werden können. Dazu findet sich gegenwärtig keine Literatur. Eine Virussicherheit ist wichtig für einen Produktionsprozess.