

Nichtinvasive Messung fluoreszenter Reporter-moleküle



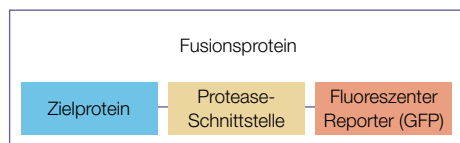
Tobias Broger, wissenschaftlicher Assistent, tobias.broger@zhaw.ch
Res Odermatt, wissenschaftlicher Assistent, res.odermatt@zhaw.ch
Prof. Dr. Bernhard Sonleitner, Dozent für Biochemical Engineering, bernhard.sonleitner@zhaw.ch
v.l.n.r.

Die Bioingenieurtechnik ist heutzutage in der Lage, eine breite Palette von Molekülen – oft Proteine – herzustellen. Über geeignete Klonierungsstrategien wird ein fluoreszenter Reporter an das Zielprodukt gekoppelt und im Verhältnis 1:1 exprimiert. Mit Hilfe eines KTI-Projektes sollen messtechnisch neue Massstäbe gesetzt werden, damit in naher Zukunft die Zielproteinexpression *in-situ* (im Reaktorraum), online (vollautomatisch), nichtinvasiv und in real-time (in Echtzeit) verfolgt werden kann.

Bis anhin war es während einer Kultivierung nicht möglich, die Expression des Zielproteins *in-situ* zu erfassen. Das exprimierte Zielprotein wird meistens nach einer aufwändigen Aufarbeitung zum Beispiel mit ELISA, SDS-Page oder einem Western-Blot (halb)quantitativ bestimmt. Mit Hilfe fluoreszenter Reporter kann das Expressionsverhalten im Bioreaktor an lebenden Zellen ermittelt werden, was eine erhebliche Verbesserung der Kultivationsanalytik darstellt.

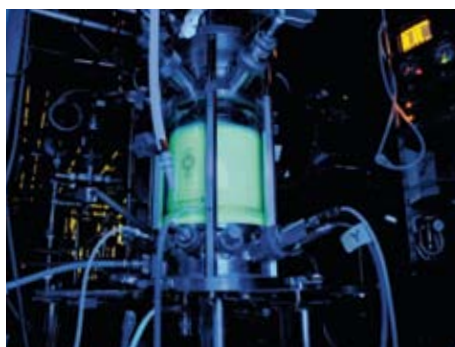
Messprinzip

Erfolgreich eingesetzte und etablierte optische Messsonden, die zur Bestimmung der Trübung einer Zellsuspension entwickelt wurden, konnten in Zusammenarbeit mit dem Industriepartner in gut funktionierende Fluoreszenzsonden umgebaut werden. Die Messsonden ermöglichen eine in Echtzeit erfasste, vollautomatische und im Reaktorraum gemessene Fluoreszenzerfassung. Als fluoreszenter Reporter diente das Green Fluorescent Protein (GFP). Dieses Protein stammt aus der Qualle *A. victoria* und wurde zusammen mit einem Zielprotein als Fusionsprotein in *P. pastoris* Zellen exprimiert.



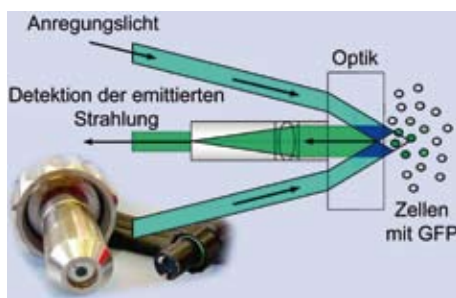
Stabil integriertes Konstrukt in *P. pastoris* DNA unter Kontrolle des AOX-Promotors; die Schnittstelle dient zum Abtrennen des Reporters am Ende des Produktionsverfahrens.

Mit Methanol kann die Expression des Fusionsproteins in Gang gebracht werden. Unter Anregung von UV-Licht wird das Fusionsprotein, bzw. der GFP-Teil, zum Leuchten gebracht.



Modifizierte *P. pastoris* Zellen im Bioreaktor, mit UV-Lampe zum Leuchten gebracht.

Die optische Messsonde kann die Fluoreszenz quantifizieren und somit Zielproteinkonzentrationen erfassen.



GFP exprimierende Zellen werden mit Blaulicht angeregt und geben längerwelliges, grünes Licht ab. Die Fluoreszenz wird über die Empfangsoptik zum Detektor rückgeführt. Unten links: Aquasant Sonde

In weiteren Versuchsreihen soll untersucht werden in wie weit andere fluoreszente Proteine wie YFP (Yellow Fluorescent Protein), BFP (Blue Fluorescent Protein) und RFP (Red Fluorescent Protein) ebenfalls mit dieser Messtechnik erfasst werden können. Ausserdem wird nicht mehr nur mit *P. pastoris* kultiviert sondern auch mit modifizierten *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämmen. In Zukunft sollen quantitative Aussagen über die jeweilige Proteinexpression während eines Prozesses möglich sein!

Viel versprechende Aussichten

Der Messaufbau ist PAT (Process Analytical Technology) konform und somit ein relevantes Tool für die Qualitäts- und Prozesssicherung. Gleichzeitig können die generierten Messdaten aber auch zum besseren Prozessverständnis beitragen.

Zusätzlich kann die Messtechnik in Aufbereitungsprozessen gewinnbringend verwendet werden. Durch die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten könnte diese Messtechnik zu einer anerkannten Plattform-Technologie in der Biotech-Branche werden und ihren Beitrag zu besser kontrollierten Up- und Downstreamprozessen liefern.

Forschungsprojekt

In-situ Sensor für Fluoreszenz-Proteine

Leitung:	Prof. Dr. Bernhard Sonleitner
Projektdauer:	12 Monate
Partner:	Aquasant AG
Förderung:	Förderagentur für Innovation KTI, Bern
Projektvolumen:	CHF 400'000.-