

HODNOCENÍ FYZIOLOGICKÉHO STAVU *PICHIA PASTORIS* S VYUŽITÍM FLUORESCENČNÍCH TECHNIK

Barbora Branská

Paulová Leona, Patáková Petra, Linhová Michaela a Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Pichia pastoris – slibný expresní systém pro produkci rekombinantních proteinů

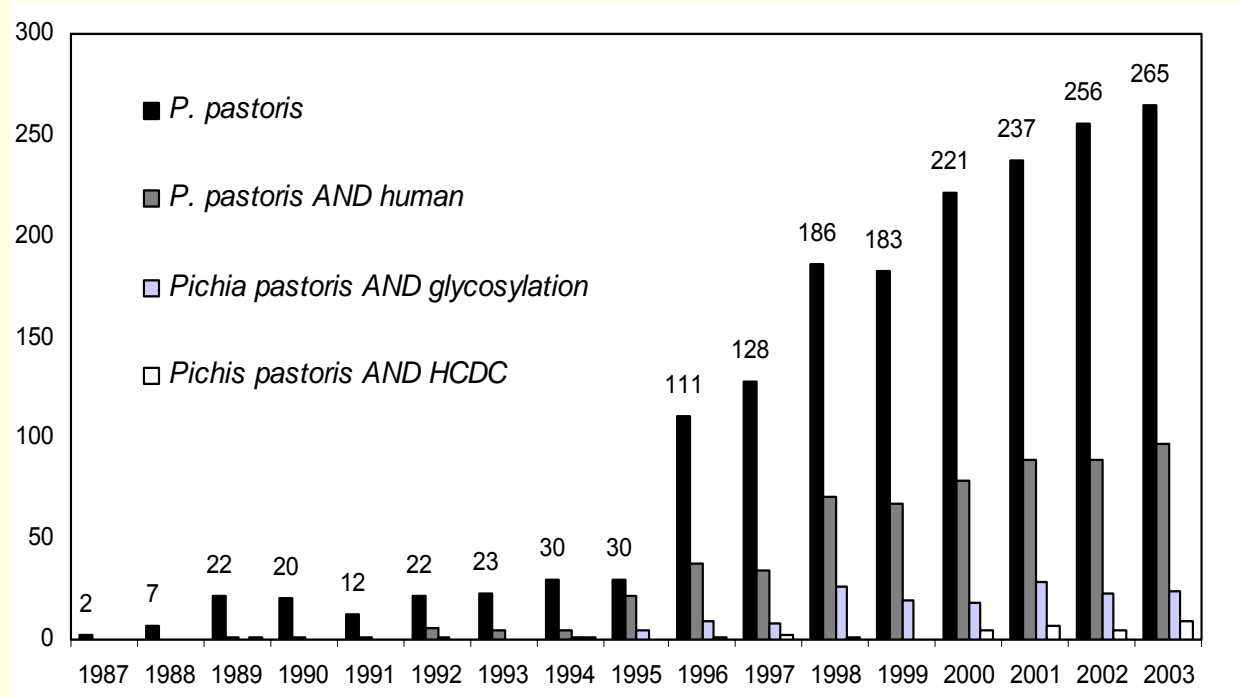
- ❑ Na rozdíl od prokaryotních systémů jsou kvasinky schopné posttranslačních modifikací
- ❑ Kvasinky jsou alternativou, která oproti živočišným producentům umožňuje redukci času a nákladů spojených s kultivacemi

r. 2006 publikace produkce rekomb. proteinů	Count	Percentage
<i>E. coli</i>	196	70
<i>P. pastoris</i>	29	11
<i>S. cerevisiae</i>	5	2
Mammalian tissue culture	18	6
Insect cell system	17	6
Other	15	5

Pichia pastoris – výjimečný host pro produkci jak sekretovaných tak intracelulárních proteinů

- ❑ Silný, indukovatelný AOX promotor
- ❑ Snadná indukce a regulace exprese
- ❑ Sekrece nízké hladiny vlastních proteinů
- ❑ Vysoká výtěžnost proteinů (až 5000 mg/l)
- ❑ Účinný sekreční systém
- ❑ HCD - hustá kultura (>100 g/l CDW)
- ❑ Post-translační modifikace

Budoucnost expresního systému *P. pastoris*



- 2007 – více než 500 produktů
- Human-like products
(leukocyty, beta iterferon, lactoferrin, insulin, serum albumin, antigeny)
- Proteiny (histamin, trypsin)
- Ostatní produkty (etanol, kyselina mléčná, ceramidy)

Stresové faktory ovlivňující buněčnou fyziologii

- ❑ Utilizace methanolu
 - ❑ Vysoké požadavky na kyslík – produkce toxického peroxidu – oxidativní stres

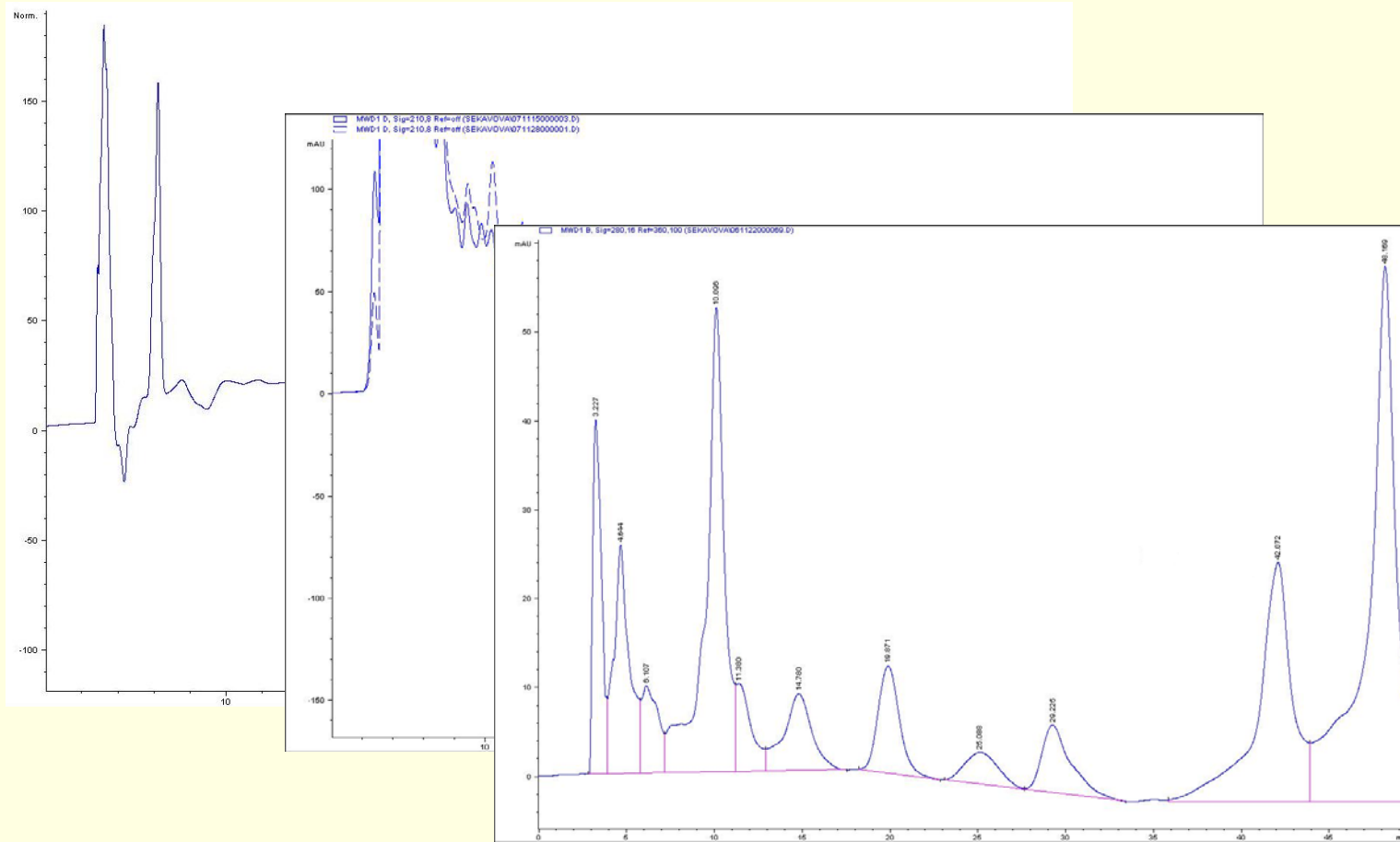
- ❑ Nadprodukce proteinu
 - ❑ Nadprodukce proteinů může vést k akumulaci „nesbalených“ proteinů v ER
 - ❑ aktivován regulační mechanismus UPR (unfolded protein response)

- ❑ Vysoká koncentrace buněk

- ❑ Kultivační podmínky (pH, teplota, složení média...)

- ❑ **Ztráta viability → buněčná lyze → uvolnění nespecifických proteináz → degradace produktu → nižší výtěžnosti, kvalita, náročnější separace**

HPLC data



Tradiční postupy stanovení viability

- ❑ CFU
- ❑ Vitalní barvení (methylenová modř, tetrazoliové soli..)
- ❑ Detekce buněčných komponentů
- ❑ Metabolická aktivita
 - ❑ Fermentační kapacita
 - ❑ Acidifikační potenciál
 - ❑ Spotřeba kyslíku
- ❑ Etc...

Fluorescenční sondy

❑ Membránová integrita

- ❑ propidium jodid, ethidium bromid, sytox green
- ❑ vysoce afinitní k nukleovým kyselinám, díky náboji neproniká do buněk s funkční nepoškozenou membránou, (příp. pumpován ven), naopak je-li integrita membrány narušena, prochází do buňky, kde po vazbě na NK dochází k zesílení fluorescence

❑ Substráty esteráz

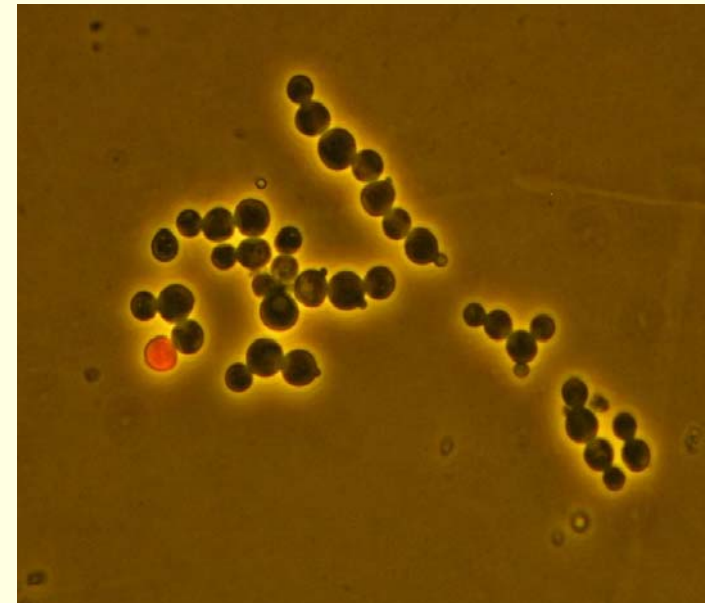
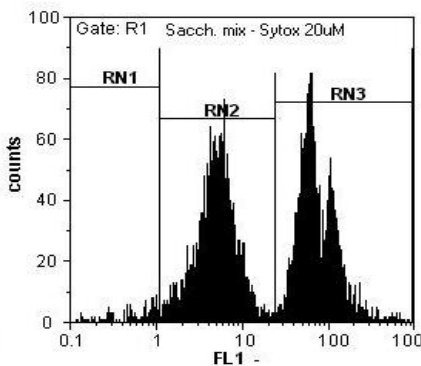
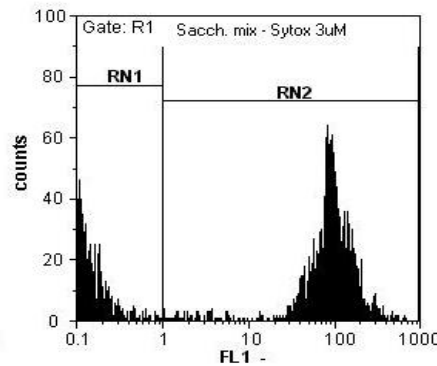
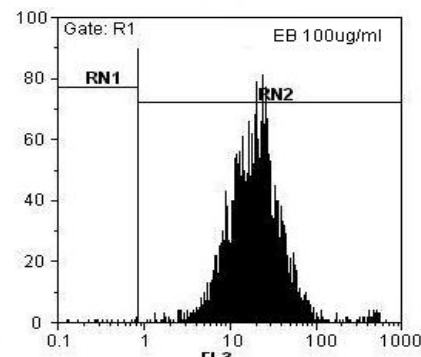
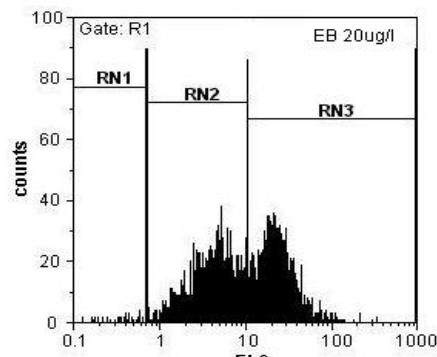
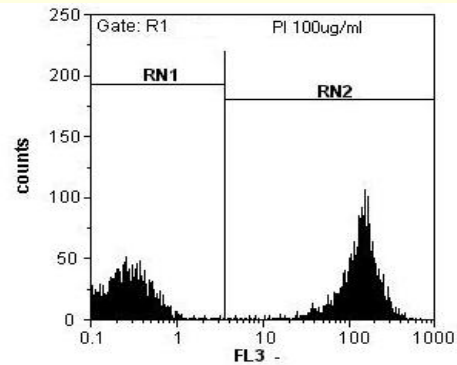
- ❑ fluorescein diacetát, karboxyfluorescein diacetát
- ❑ elektricky neutrální, nefluorescentní substráty, schopné procházet do buněk volnou difuzí
- ❑ v buňkách hydrolyzovány nespecifickými esterázami na fluorescentní produkt, který je v intaktních buňkách zadržován, zatímco rychle uniká z buněk s narušenou cytoplazmatickou membránou

❑ Potenciometrické sondy

- ❑ Rhodamin 123, DiOC2(3), bis-oxonol
- ❑ Kationické sondy - akumulace v buňce v závislosti na transmembránovém potenciálu
- ❑ Anionické sondy - akumulace v depolarizovaných buňkách, vazba na nepolární kompartmenty

Membránová integrita

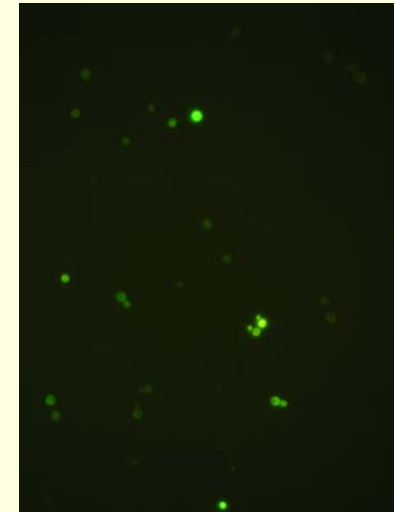
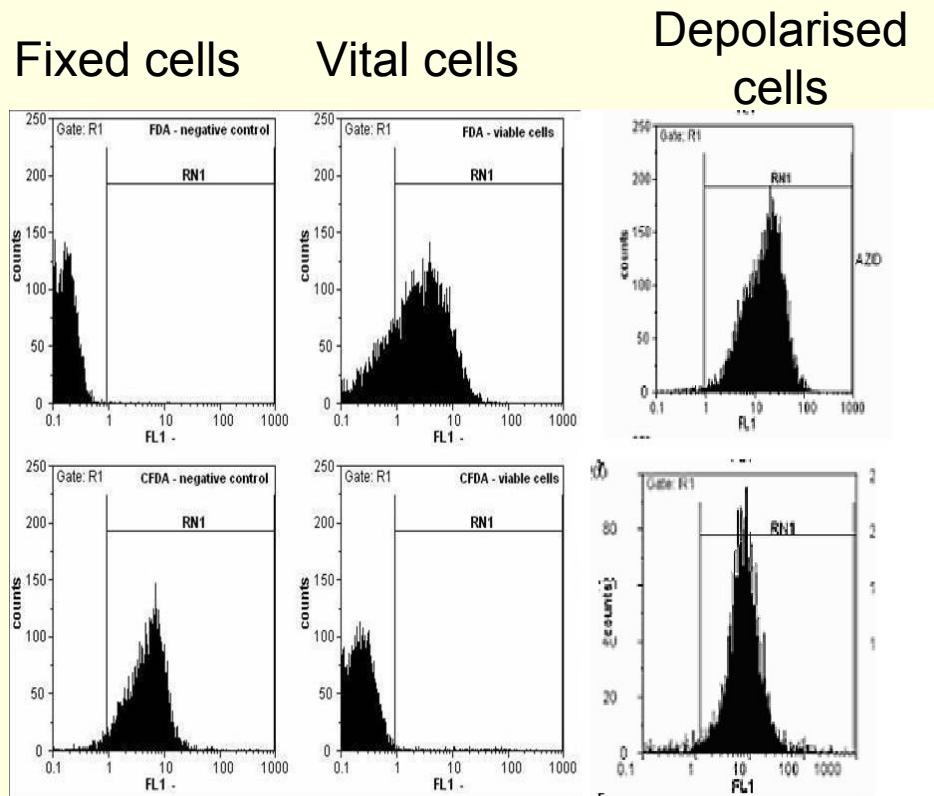
- PI
- EB
- Sytox



Intracelulární enzymová aktivita

□ FDA

□ CFDA

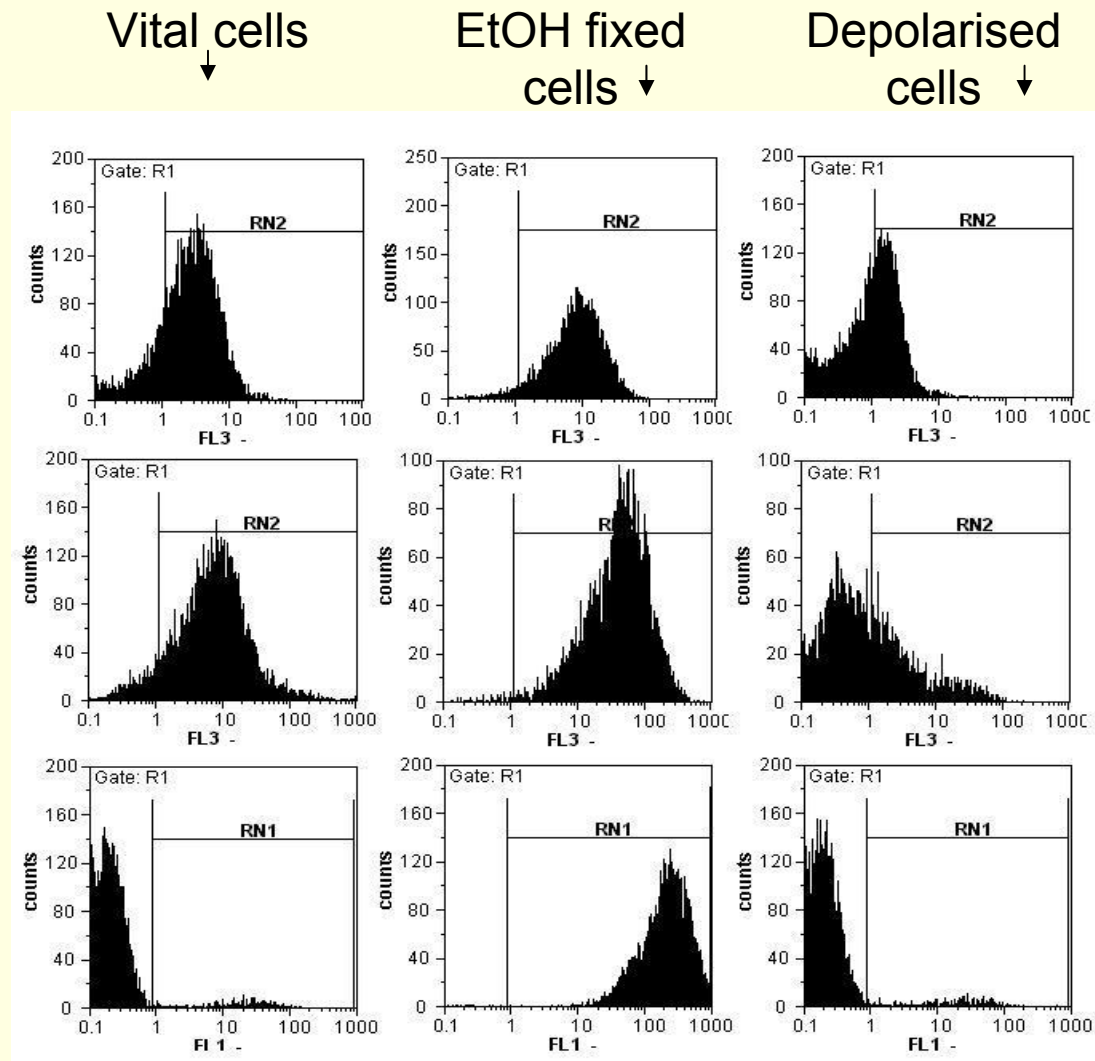


Potenciometrické sondy

□ Rh 123

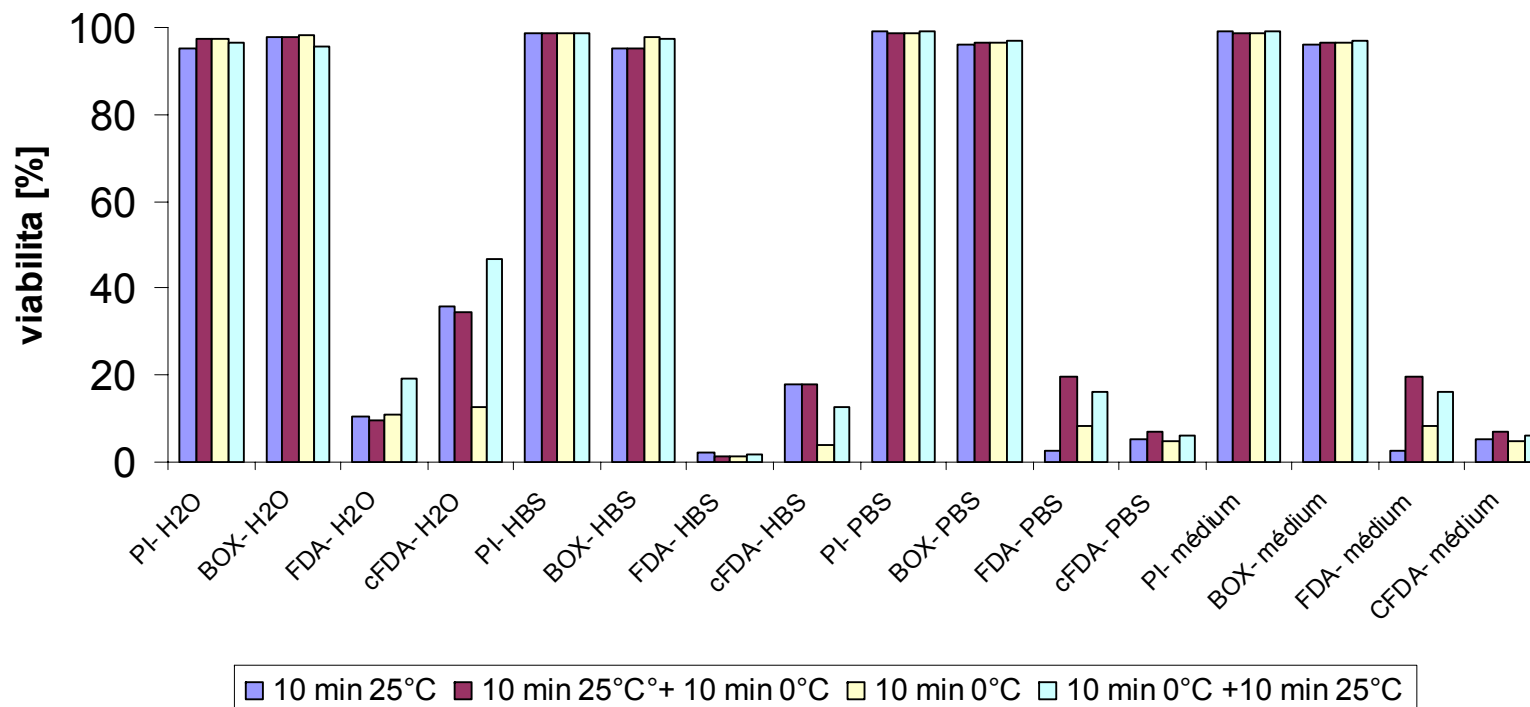
□ DiOC₂(3)

□ BOXP



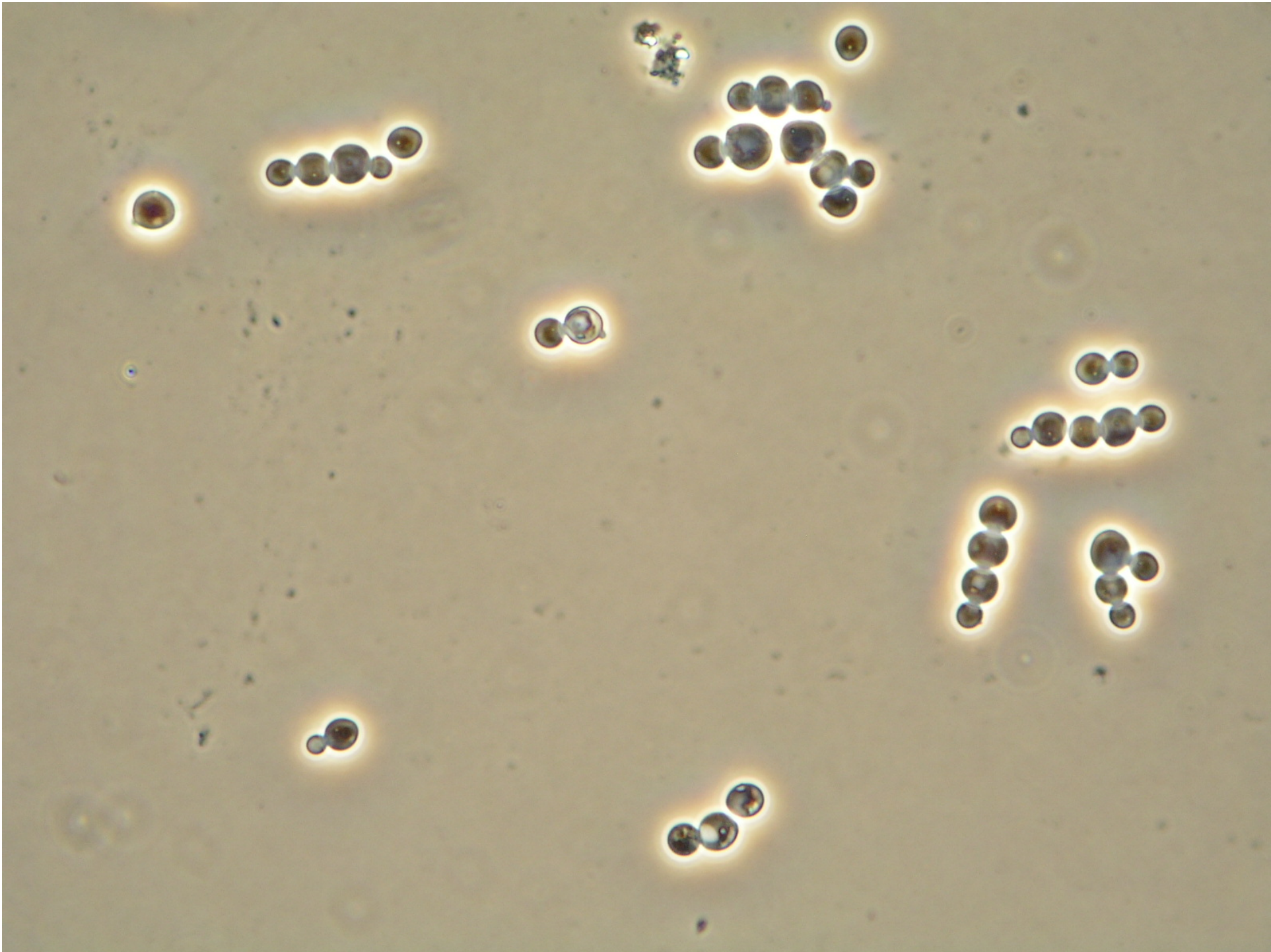
Robustnost stanovení

Vliv různých reakčních podmínek na značení *P. pastoris*
cFDA, FDA, PI a BOX



Srovnání vybraných fluorescenčních sond s klasickými metodami určování viability

	<i>P.pastoris</i> - wild			<i>P.pastoris</i> - trypsinogen		
	glukosa	glycerol	methanol	glukosa	glycerol	methanol
FDA	70,1%	28,7%	60,1%	6,0%	7,3%	36,9%
PI	98,9%	99,3%	99,2%	97,6%	97,7%	97,9%
EB	85,8%	71,5%	92,2%	83,4%	43,2%	77,4%
BOX	98,8%	99,3%	99,3%	98,0%	98,0%	98,3%
methylenová modř	100%	100%	100%	100%	100%	100%
kultivační stanovení	19,9%	40,6%	14,6%	25,4%	27,9%	21,3%

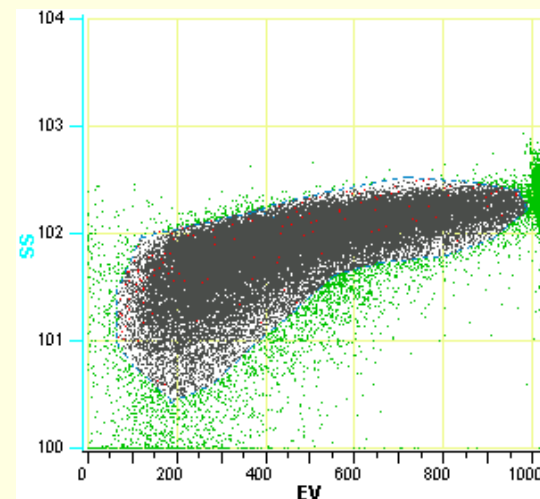
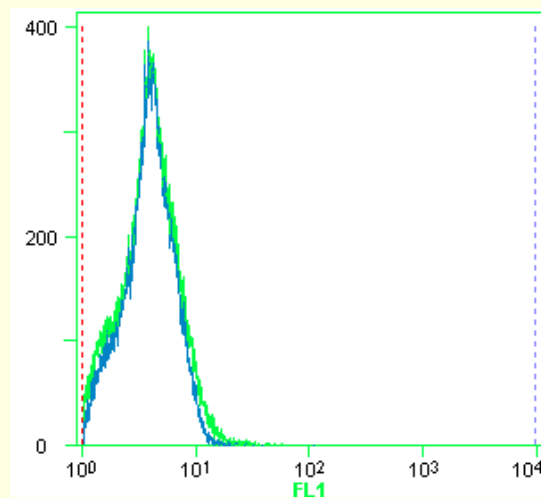
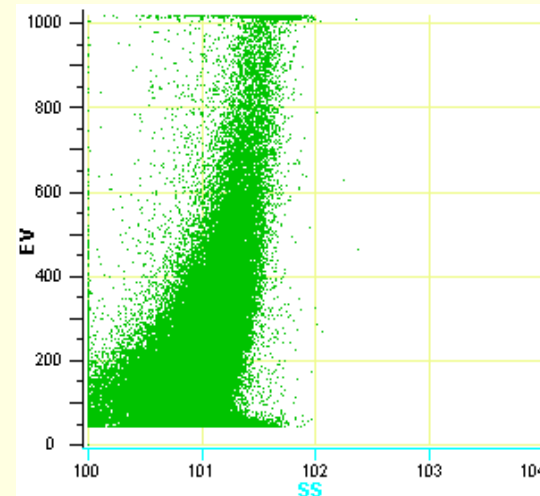
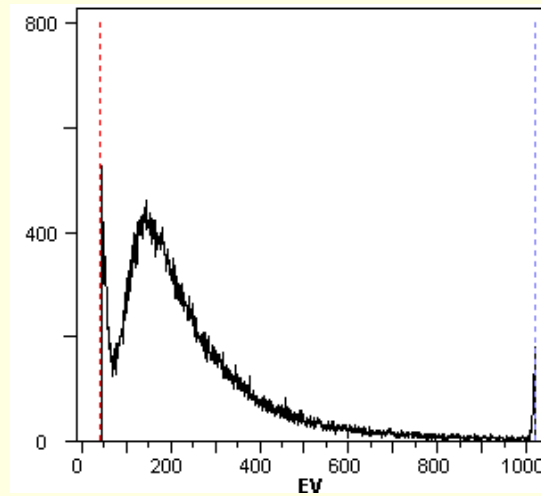


Quanta a *Pichia pastoris*

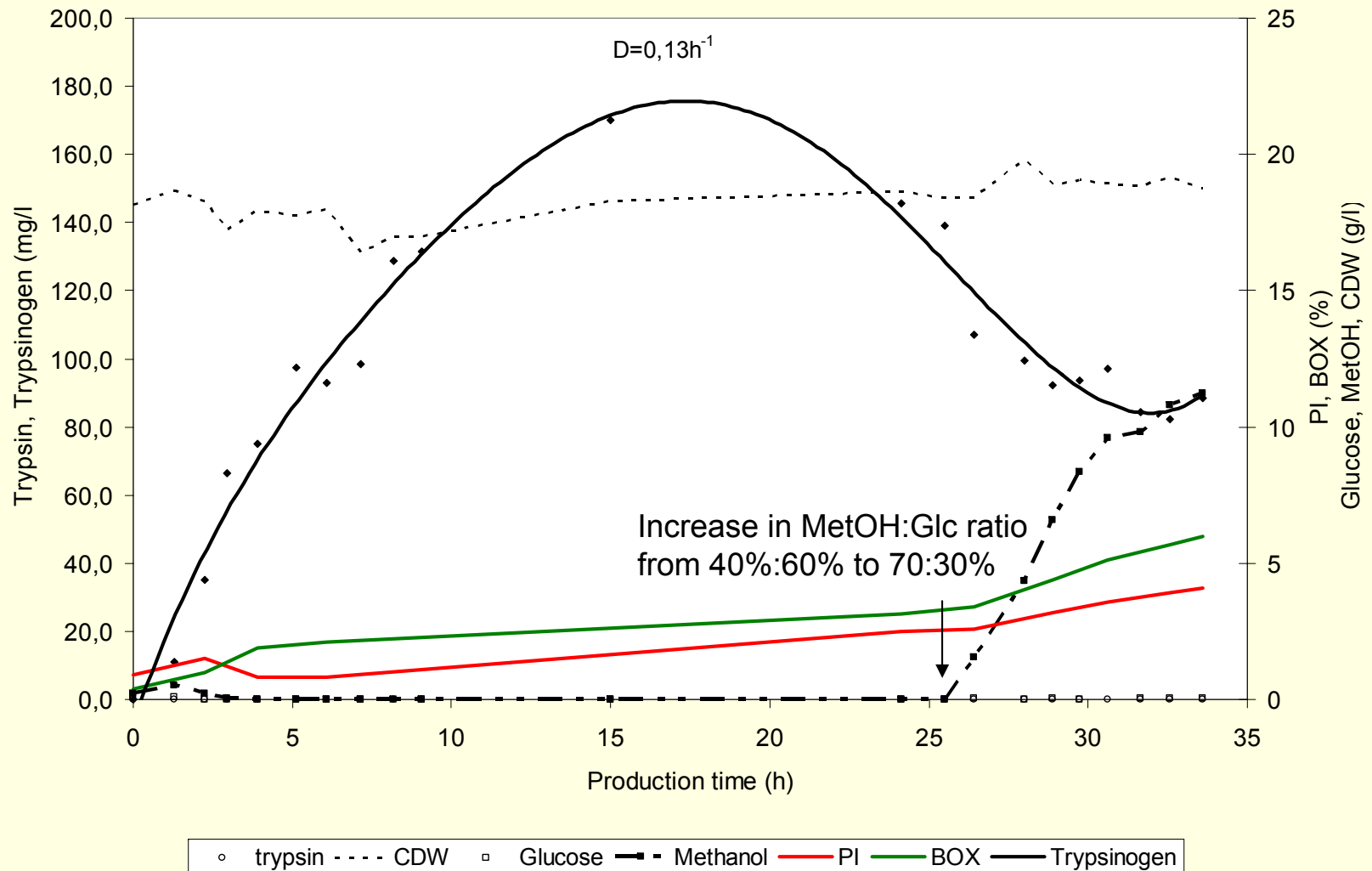
- ❑ Velikost buněk 2-4 μm
- ❑ Detekce částic – EV, SS, FL ?



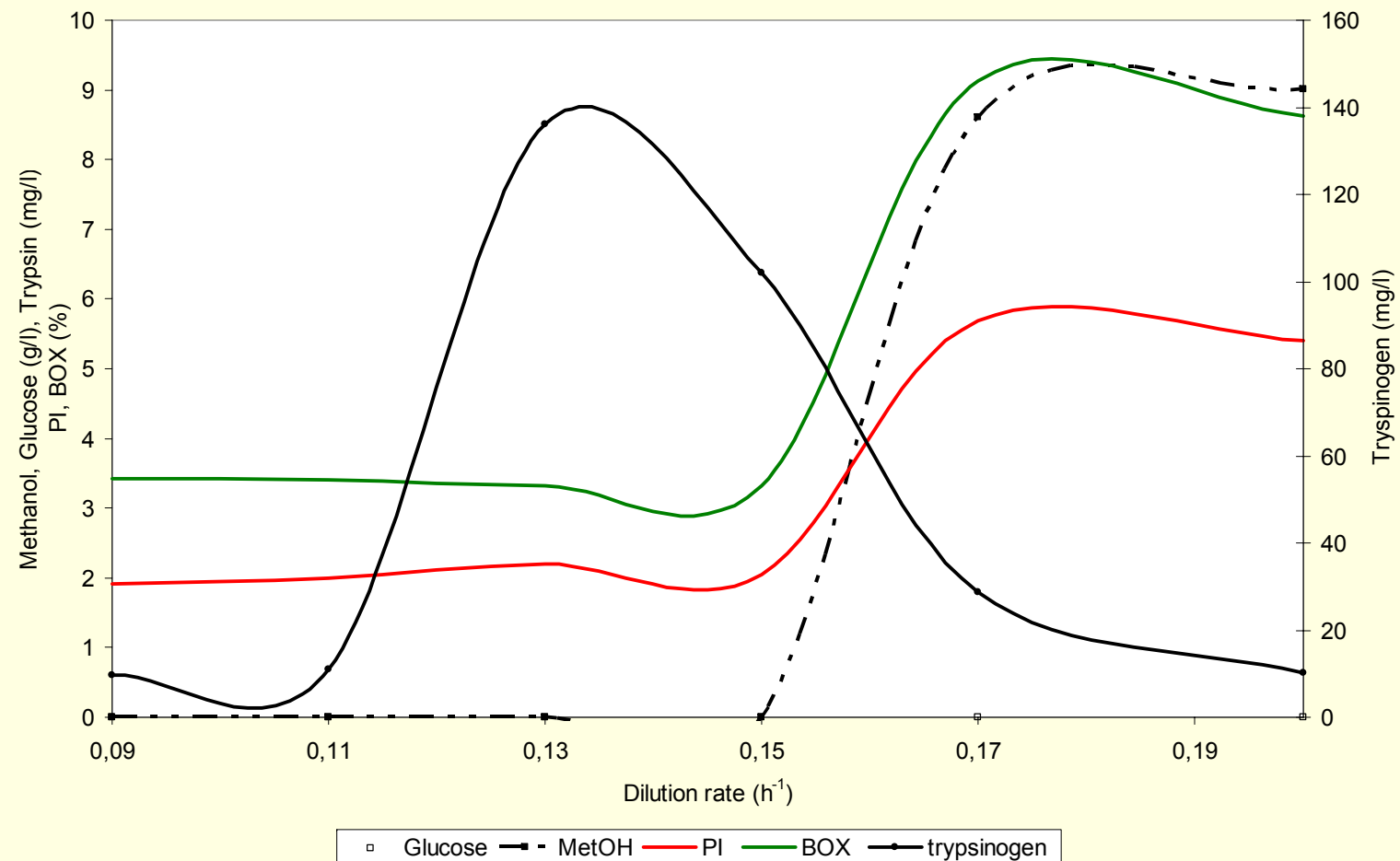
Quanta a *Pichia pastoris*



Chemostat – limitace substrátem



Shrnutí pro různé zřed'ovací rychlosti



Závěr

- ❑ Fluorescenční analýza ve spojení s průtokovou cytometrií umožňuje rychlou a přesnou determinaci buněčné viability, nicméně k získání relevantních výsledků je nutná citlivá optimalizace a vhodný výběr fluorescenčních sond
- ❑ *Pichia pastoris* – unikátní vlastnosti spojené s nestandardním chováním s ohledem na interakce s jednotlivými sondami
- ❑ Testováno celkem 7 sond, jen 2 poskytovaly jednoznačné výsledky