

Schlussbericht

ZE. GenExpress GmbH

Förderkennzeichen: 13N9592

Vorhabensbezeichnung:

Rekombinante Synthese von bakteriellen, viralen und toxischen Proteinen für die Diagnostik

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2008 bis 31.12.2011

I Kurzdarstellung

1) Aufgabenstellung

Aufgabe der Firma GenExpress war es, die zur Etablierung der angestrebten Detektionssysteme notwendigen rekombinanten Proteine in Absprache mit den Projektpartnern herzustellen. Mit Hilfe dieser Proteine sollten Antikörper oder Aptamere gegen virale oder bakterielle Antigene, bzw. bakterielle Toxine hergestellt oder selektiert werden. In der letzten Phase des Projekts war es Aufgabe von GenExpress, Einzelstrang-Antikörper in E.coli direkt zu exprimieren.

2) Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.

Ein von GenExpress schon vorher konzipiertes Expressionssystem diente als Plattform für die herzustellenden rekombinanten Antigene.

Das Spektrum der Proteine, welche hergestellt werden sollten, war sehr breit und anspruchsvoll. Die Voraussetzungen für einen erfolgreichen Abschluss waren durch die langjährig praktizierte Zusammenarbeit mit den Kollegen am Robert Koch Institut jedoch als „gut“ einzustufen.

3) Planung und Ablauf des Vorhabens

Über die gesamte Förderperiode hinweg war der Ablauf der Experimente durch einen direkten und regelmäßigen Kontakt mit den Partnern, die das jeweils zu exprimierende Protein weiter verwendet haben, gekennzeichnet. Die Proteine oder Proteinsegmente, welche als Antigen geeignet erschienen, wurden in Absprache ausgewählt, wobei Literaturdaten und Daten aus den Proteinstruktur-Datenbanken verwendet wurden. Ziel war es in jedem Falle, eine genügende Menge an stabilem Protein für die weiteren Experimente zu produzieren. Dadurch, dass eine Reihe unterschiedlicher Proteine von unterschiedlichen Partnern gleichzeitig angefordert waren, mussten die Experimente ineinander verschachtelt durchgeführt werden.

4) Wissenschaftlicher, technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Alle Sequenzen der für das Projekt relevanten Gene konnten aus den öffentlich zugänglichen Datenbanken entnommen werden.

Die Herstellung der rekombinanten Proteine basiert auf bekannten Verfahren, welche für die spezifischen Anforderungen des Projektes modifiziert und optimiert wurden.

5) Zusammenarbeit

Das gesamte Projekt war nur in enger Abstimmung mit den Projektpartnern durchführbar.

II Eingehende Darstellung

1) Verwendung der Zuwendung, erzielte Ergebnisse, Gegenüberstellung zu den Zielen

Insgesamt wurde über eine Vielzahl an Optimierungsschritten 16 sehr unterschiedliche Proteine hergestellt und in der gewünschten Menge an die Projektpartner ausgeliefert. Konkret waren dies:

NTNH Neurotoxin von *Clostridium botulinum*

L1R, F13L, A33R, B5R, D8L, H3L von Vaccinia Virus

A5L, ATI nt, ATI ct von Cowpox virus

pdpD, ftt 1651 von *Francisella tularensis*

VP40, NP von Marburg Virus

VP40, NP von Ebola Virus

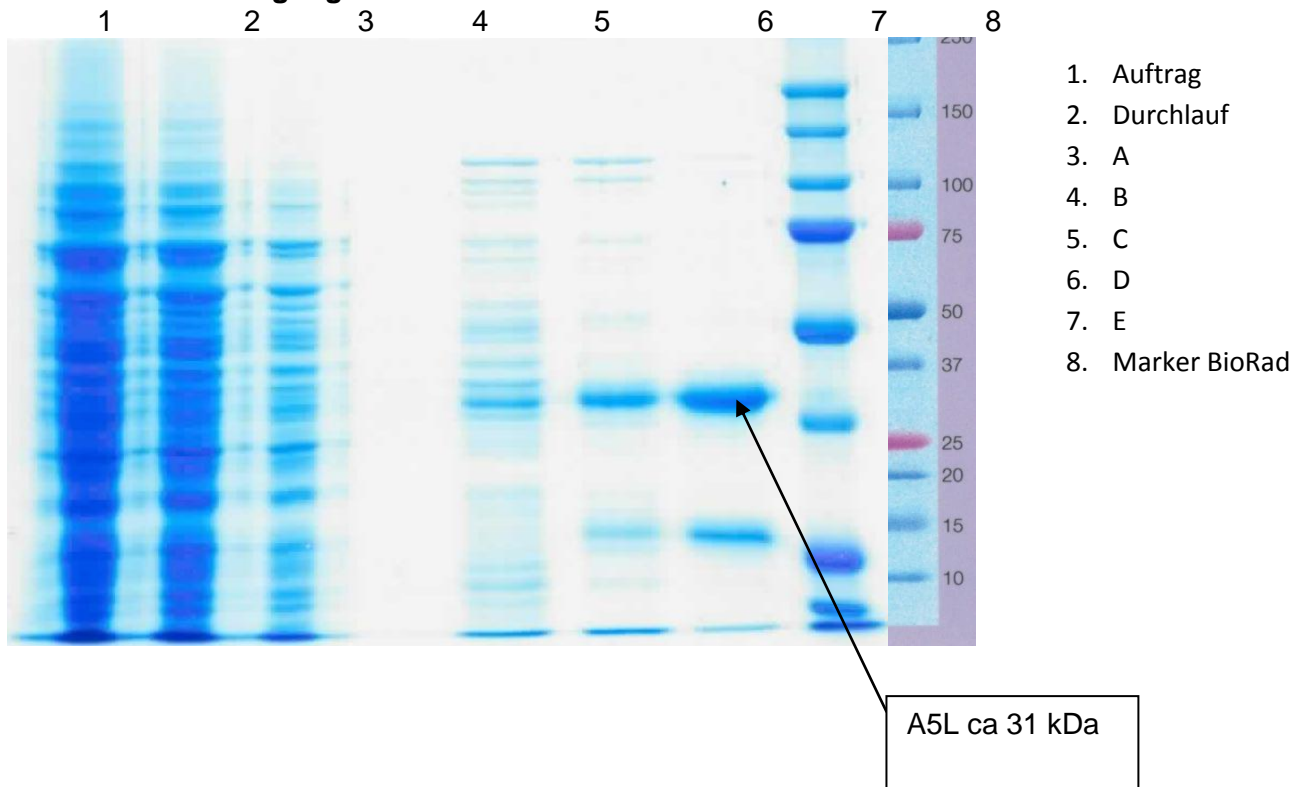
Die Zuwendungen durch den Projektträger wurden exakt im Sinne des beantragten Projekts verwendet, die angestrebten Ziele wurden erreicht. Hierbei kam es, wie zu erwarten, bei einzelnen Proteinen zu einem erheblichen Mehraufwand, andere Proteine konnten schnell und unproblematisch hergestellt werden.

Alle Daten zu den Klonierungen, Expressionen und Aufreinigungen dieser Proteine sind in den Zwischenberichten im Detail aufgeführt. Exemplarisch sei hier die Aufreinigung des Proteins A5L vom cowpox virus noch einmal dargestellt:

A5L Protein von **Cowpoxvirus** (NC_003663, P33832), Molekulargewicht 31kDa (282AS)

Das A5L Protein kann nativ aufgereinigt werden, allerdings ist das Eluat in diesem Falle relativ stark verunreinigt. Nach Absprache mit dem Kooperationspartner wurde auf die denaturierende Aufreinigung ausgewichen.

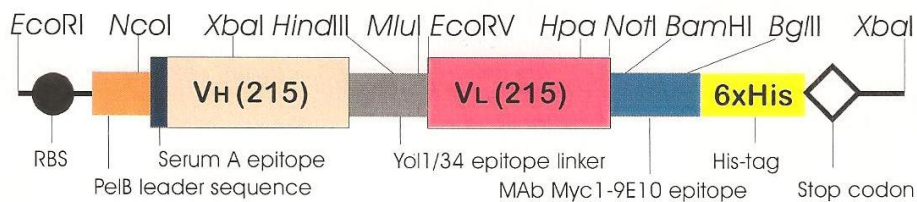
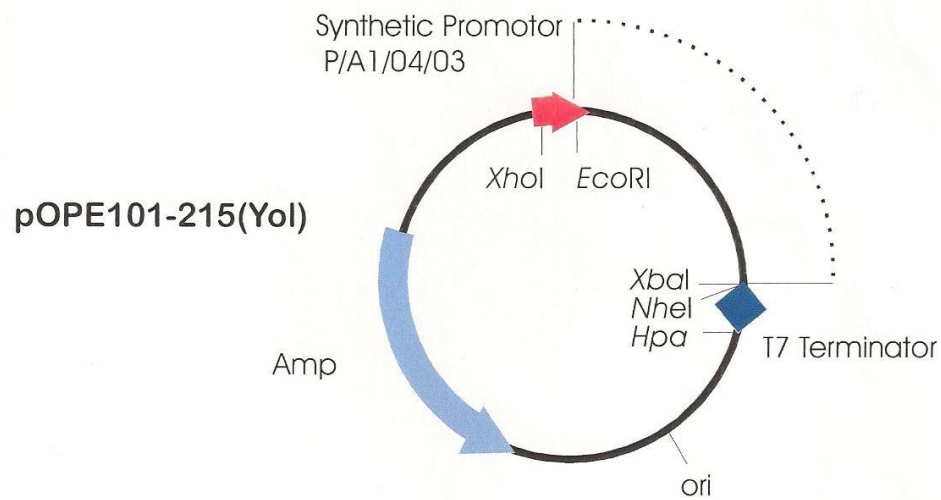
Gel 4: A5L Aufreinigung



Das A5L Protein konnte ab Januar 2011 an die Kooperationspartner ausgeliefert werden.

Rekombinante Antikörper

Im letzten Abschnitt des Projektes hat GenExpress in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut damit begonnen, Antikörper, die zur Detektion verwendet werden können, aber von den Hybridomazellen nur in geringer Menge produziert werden, rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Hierbei wurde der unten dargestellte Vektor verwendet, der die Leichte Kette und die Schwere Kette des IG Moleküls parallel als Operon exprimiert. Drei dieser rekombinanten Antikörper wurden aufgereinigt und an das RKI ausgeliefert (40Light/40Heavy, 116 Light/40 Heavy, 719Light/710Heavy).



2) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die für das Projekt beantragten Personalkosten lagen insgesamt bei 370.480 Euro, die tatsächlichen Personalkosten lagen jedoch bei 382.000 Euro

Die Differenz ergibt sich aus zwischenzeitlichen Gehaltserhöhungen, welche die Firma GenExpress trägt.

Die für das Projekt veranschlagten Verbrauchsmittel betragen 30.000 Euro, die tatsächlich verwendeten Verbrauchsmittel waren ca. 35.000 Euro.

Diese Differenz ergibt sich aus speziellen Kultivierungsmedien, welche für einzelne, schlecht exprimierbare Proteine notwendig waren.

Die beantragten Reisekosten lagen bei 3000 Euro, tatsächlich nur bei 600 Euro. Die Verbundtreffen fanden in aller Regel in Berlin statt. Die Partner kamen zu uns.

3) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Antikörper- bzw. Aptamer-basierte Detektionssysteme sind davon abhängig, dass die zu bindenden Strukturen der pathogenen Organismen mit hoher Spezifität erkannt werden. Zurzeit gibt es keine Alternative, als die Generierung von Antikörpern *in vivo* (Selektionsprozess in primären und sekundären lymphatischen Organen der immunisierten Tiere) oder durch die Generierung von Aptameren *in vitro* (Selektionsverfahren Selex). In beiden Fällen ist die Qualität des Assays von der Qualität der Antigene, welche für die Selektionsverfahren notwendig sind, abhängig. Aus diesem Grunde hatten sich die Antragsteller dazu entschieden, diesen zentralen Bereich an einem Ort bei der Firma GenExpress durchzuführen. Die Arbeiten waren für das Gesamtprojekt absolut essentiell und der Aufwand angemessen.

4) Nutzen und Projektverwertung

GenExpress hat im Rahmen des Projekts sein KnowHow in der rekombinanten Proteinexpression verwendet und damit einen wichtigen Beitrag zur Funktionalität der Detektionssysteme geleistet. Die Firma hat sich hierbei primär als Partner in der Entwicklung, nicht als Dienstleister gesehen. Die Verwertung ist über die Kooperationsvereinbarung aller Partner eindeutig geregelt, der nationale Nutzen einer schnellen, universellen Detektionsplattform bei bioterroristischen Anschlägen ist unumstritten. Die Firma GenExpress konnte im Rahmen des Projekts wertvolle Erfahrungen bei der Herstellung schwer zu exprimierender Proteine sammeln und wird diese Erfahrungen in zukünftigen Auftragsarbeiten einsetzen können.

5) Wissenschaftlich-technischer Fortschritt an anderer Stelle

Auf dem Gebiet der rekombinanten Proteinexpression werden in regelmäßigen Abständen neue Systeme am Markt angeboten, wobei wenige, sehr große Firmen diesen Markt beherrschen. Die neuen Systeme beziehen sich in aller Regel auf vereinfachte Klonierungsstrategien über Rekombinations-Verfahren und gelegentlich auf neue Expressionsorganismen.

Die Etablierung eines neuen Gesamtsystems mit allen Vektoren und Kultivierungsanlagen ist dabei immer sehr teuer. Während des Förderzeitraums ist uns kein Expressionssystem bekannt geworden, welches sich als neue Alternative zu dem verwendeten System angeboten hätte. Im Gegenteil erlebt die Expression in *E.coli* in den vergangenen Jahren durch neue Stämme und Kultivierungsmethoden eine steigende Attraktivität. Einige Proteine konnten von uns durch eine Zusammenarbeit mit der Firma Biosilta aus Berlin, welche sich auf eine Optimierung der Kultivierungsverfahren von *E.coli* spezialisiert hat, besser und in deutlich höheren Ausbeuten produziert werden.

6) Veröffentlichungen

Die wissenschaftlichen Ergebnisse des Verbundes werden sich in einer Reihe von Veröffentlichungen in internationalen Zeitschriften wiederfinden. Soweit die Arbeiten unserer Mitarbeiter für die Ergebnisse essentiell sind, werden diese Mitarbeiter entsprechend beteiligt sein.

Berlin, den 22.06.2012

Ute Böttcher (Geschäftsführerin)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart Schlussbericht
3a. Titel des Berichts Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien (BGRUDI)- Teilvorhaben: Rekombinante Synthese von bakteriellen, viralen und toxischen Proteinen für die Diagnostik	
3b. Die Publikation der Teilergebnisse wird in Absprache mit den Koautoren getroffen.	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Schwarz, Vivien, Böttcher, Ute, Lauster, Roland	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2011
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Schwarz, Vivien	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) GenExpress GmbH Eresburgstr.22-23, 12103 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen ^{*)} 13N9592
	11a. Seitenzahl Bericht Sechs
	11b. Seitenzahl Publikation geplant
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	12. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen Zwei
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Das Ziel des BGRUDI-Projektes war der Aufbau einer leicht zu verwendenden Technologie-Plattform zur parallelen Detektion bioterroristisch relevanter Organismen und Toxine im nationalen Interesse der Bundesrepublik Deutschland. Der Beitrag der Firma GenExpress war die Herstellung rekombinanter Proteine, welche dann zur Herstellung von Antikörpern oder Aptameren dienen sollten. Konkret hat die Firma dabei NTNH Neurotoxin von Clostridium botulinum, L1R, F13L, A33R, B5R, D8L, H3L von Vaccinia Virus, A5L, ATI nt, ATI ct von Cowpox virus, pdpD, ftt 1651 von Francisella tularensis, VP40, NP von Marburg Virus und VP40, NP von Ebola Virus und drei rekombinante Antikörper kloniert, exprimiert und als rekombinante Proteine an die Projektpartner ausgeliefert. In der direkten Kooperation mit den Projektpartnern konnte GenExpress diese Ziele erreichen. Für das Unternehmen waren diese Arbeiten sehr hilfreich, da neue Erfahrungen in der Herstellung der Proteine durch die Verwendung neuer Verfahren gewonnen werden konnten.	
19. Schlagwörter Bioterrorismus, Diagnostik, Rekombinante Proteine	
20. Verlag unbekannt	21. Preis unbekannt

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. Type of Report Final report
3a. Report Title Bioterrorism: Risk calculation, ultrafast detection and identification of bioterrorism-relevant substances (BIGRUDI)- Subproject: Recombinant synthesis of bacterial, viral und toxic proteins for diagnostic purposes	
3b. Title of Publication planned	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s)) Schwarz, Vivien, Böttcher, Ute, Lauster, Roland	5. End of Project December 2011
4b. Author(s) of the Publication (Family Name, First Name(s)) Schwarz, Vivien	6. Publication Date planned
8. Performing Organization(s) (Name, Address) GenExpress GmbH Eresburgstr. 22-23, 12103 Berlin	7. Form of Publication international scientific journal
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	9. Originator's Report No.
	10. Reference No. 13N9592
	11a. No. of Pages Report six
	11b. No. of Pages Publication planned
	12. No. of References
	14. No. of Tables
	15. No. of Figures two
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	
18. Abstract Main goal of the BIGRUDI project was the establishment of a detection platform for substances and organisms with a high relevance for a possible bioterroristic scenario. The role of GenExpress GmbH. was the recombinant expression and purification of proteins or toxins, which are then used by the co-operation partners for the generation of antibodies or aptamers. In particular NTNH Neurotoxin of Clostridium botulinum, L1R, F13L, A33R, B5R, D8L, H3L of Vaccinia Virus, A5L, ATI nt, ATI ct of Cowpox virus, pdpD, ftt 1651 of Francisella tularensis, VP40, NP of Marburg Virus und VP40, NP of Ebola Virus and three recombinant antibodies were successfully expressed in E.coli and provided to our partners. In direct cooperation with our partners GenExpress could reach all aims, defined in the project proposal. The company has collected additional experience in the expression of "difficult proteins". This will help us to offer our services in that field in a broader range.	
19. Keywords Bioterrorism, recombinant proteins, diagnostics	
20. Publisher unknown	21. Price unknown

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.