

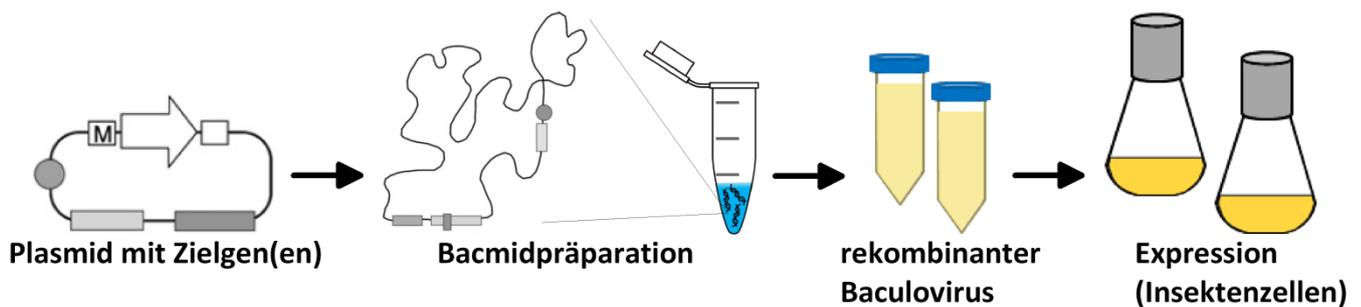
Expression in Insektenzellen (Sf21, Hi5)

Insektenzellen bieten diverse Vorteile für die rekombinante Proteinproduktion. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzen sie ein Säugetier-ähnliches Sekretions- und Prozessierungssystem, einschließlich Golgi-Apparat und ER. Weiterhin führen Insektenzellen einen Großteil der auch in Säugetieren vorkommenden posttranslationalen Modifikationen durch, wie z.B. Phosphorylierungen oder Palmitoylierung. Daher können die meisten aus Säugetieren stammenden Zielproteine korrekt gefaltet und aktiv in Insektenzellen produziert werden. Einzig die N-Glykosylierung ist unterschiedlich im Vergleich zu Säugetieren: Sie ist deutlich homogener und simpler, was auf die Aktivität meist nur geringen Einfluss hat, gleichzeitig aber für die Strukturbiologie von Vorteil ist, da sich so leichter Proteinkristalle bilden.

Folgende Methoden werden als Expressionssysteme in Insektenzellen angeboten:

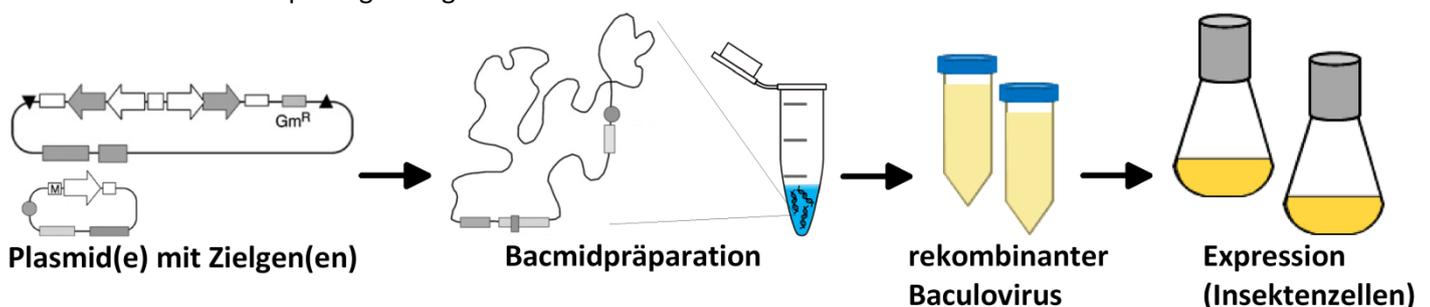
1. Baculovirale Expression (BEVS)

Hierbei wird ausgenutzt, dass Lepidoptera Insekten (aus denen Zelllinien wie Sf21 und Hi5 stammen) natürlicherweise von Baculoviren infiziert werden. Rekombinante Baculoviren werden somit verwendet um rekombinante DNA in die Wirtszellen zu schleusen und eine Überexpression der Zielproteine zu erreichen. Dieses System ist besonders gut geeignet für die Expression von intrazellulären Proteinen, welche in großem Maßstab produziert werden sollen.



1b. Expression im MultiBac-System

Das MultiBac-System ist ein Vektorsystem welches speziell für die baculovirale Expression von Multiproteinkomplexen entwickelt wurde. Durch (mitunter komplexe) Klonierungsarbeiten lassen sich offene Leserahmen von vielen Zielproteinen in einen rekombinanten Baculovirus integrieren. Die Proteine werden dann in Insektenzellen koexprimiert, können sich noch in den Zellen zu nativen Proteinkomplexen zusammenlagern und schließlich auch als Komplexe gereinigt werden.

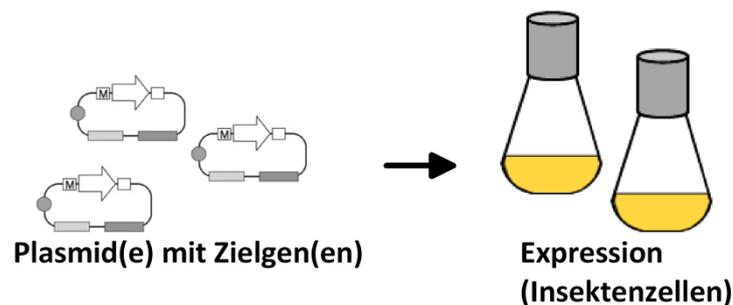


Vorteile: - hohe Ausbeuten für intrazelluläre Proteine

Nachteile: - relativ hoher Zeitaufwand durch viel-schrittige Virusherstellung (3-4 Wochen)
- Lyse der Wirtszellen nach Infektion mit Baculoviren (evtl. negativer Einfluss auf die Proteinqualität)

2. Plasmid-basierte Expression (PEI-basierte Transfektion)

Bei der Plasmid-basierten Expression wird das Plasmid, welches für das Zielprotein kodiert, durch Komplexierung mit dem basischen Polykation Polyethylenimin (PEI) direkt in die Insektenzellen eingebracht. Das Plasmid wird bei jeder Zellteilung verdünnt, weshalb die Expression auch hier nur zeitlich begrenzt möglich ist. Angeboten werden Testexpressionen (30 mL), Expressionen im Liter Maßstab, aber auch kleine Spilt-GFP-Screenings [Bleckmann *et al.* 2016], mit welchen gleichzeitig bis zu 45 Konstrukte auf lösliche Expression getestet werden können. Hierfür steht der Serviceeinheit das Mikrokultivierungssystem BioLector von M2P Labs zur Verfügung.



Vorteile:

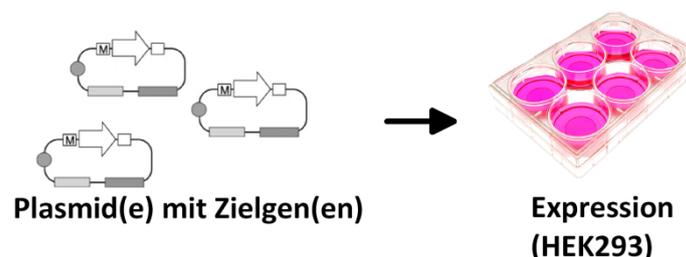
- Schnelle Expression (etwa eine Woche)
- Hohe Viabilität der Wirtszellen
- Hohe Ausbeuten für intrazelluläre und sekretierte Proteine

Nachteile:

- Für die Transfektion werden große DNA-Mengen benötigt
- Ausbeuten oft geringer als bei Baculovirus-vermittelter Expression

Expression in adhärenenten HEK293 Zellen

Zur authentischen Herstellung von humanen Zielproteinen bieten sich menschliche Zelllinien – wie z.B. HEK293 - an. Die HEK293-Zelllinie wächst adhärenent und zeichnet sich durch gutes Wachstum und leichte Transfizierbarkeit mit entsprechenden Expressionsvektoren aus. Die Serviceeinheit bietet sowohl die transiente Expression von Zielproteinen in HEK293 Zellen, als auch die Etablierung stabiler Zelllinien an.



Vorteile:

- Relativ schnelle Expression (transiente Transfektion)
- Selektion einzelner Klone möglich (stabile Zelllinien)
- Native Expressionsumgebung für humane Proteine

Nachteile:

- Für die Transfektion werden große DNA-Mengen benötigt
- Ausbeuten oft recht begrenzt
- hohe Kosten für Zellkultivierung (Medium, Handling, usw.)

Expression in *E.coli*

Die Expression in *E.coli* stellt den Standard für die Produktion von rekombinanten Proteinen dar. Dieses System ist mit Abstand die kosteneffektivste Möglichkeit um große Mengen an Zielprotein zu produzieren. Der Serviceeinheit **Rekombinante Proteinexpression** stehen die Mehrheit aller gängigen *E.coli*-Expressionsstämme zur Verfügung und wir bieten sowohl Testexpressionen im kleinen Maßstab, als auch große Expressionen im Produktionsmaßstab an.

