

Optimierung der Translationseffizienz

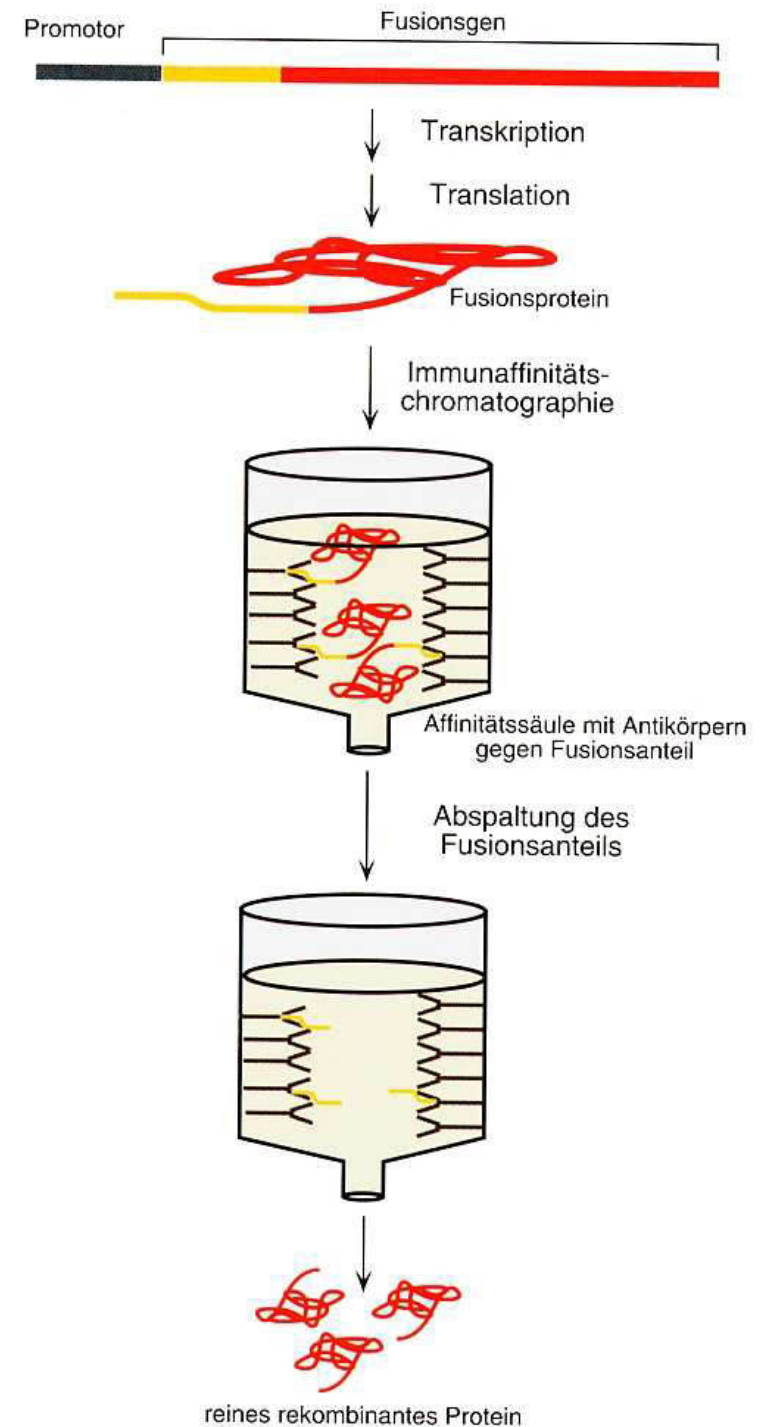
- Die Shine/Dalgarno Sequenz optimiert die Translationseffizienz:
- mind. 4 nts der S/D Konsensus Sequenz (5'-AGGAGG-3') müssen vorhanden sein
- Die S/D Sequenz sollte möglichst 8 nts vor dem AUG-Start sein
- zwischen S/D und AUG sollten möglichst nur A und T sein
- in diesem Bereich sollten sich keine Sekundärstrukturen ausbilden können
- auch andere codons können die Translation initiieren (GUG, UUG, codons, die für Valin codieren) - diese sollten nicht zwischen S/D und AUG vorhanden sein
- vor der S/D Sequenz sollten einige Terminations-Signale (Stopp-codons) geschaltet sein

Proteinexpression (inclusion bodies vs secretion)

- E.coli verpackt normalerweise Fremdproteine in inclusion-bodies
- Gründe warum das Produkt sezerniert werden sollte:
 - bessere Aufarbeitung der Proteine
 - Bakterienzellen müssen nicht aufgeschlossen werden - HCP-Problematik, DNA
 - Prozessierung des N-Terminus - Proteine in IBs haben immer ein Methionin am N-Terminus
- Signalsequenzen schleusen das Protein ins Periplasma (phA-Signal-Peptid) oder in das Medium (Hämolysin-Signal-Peptid)

Fusionsproteine zur Affinitätsreinigung

- Nicht alle heterolog gewonnenen Proteine können aus den Zellen sezerniert werden. Um die, in den Zellen akkumulierenden Proteine von den Zellproteinen abtrennen zu können, verwendet man oft Fusionsproteine.
- Durch den Fusionsanteil erhalten die gewonnenen Proteine Eigenschaften, die die Aufreinigung des Proteins erleichtern.



Fusionspartner

- Zur Affinitätsreinigung
 - beta-Galaktosidase
 - Glutathion-S-Transferase
 - Chloramphenicol-Acetyltransferase
- Reinigung über Metallchelatkomplexe
 - His-tags binden an Metallionen, die auf der Säulenmatrix binden

Der Fusionstag muss so an in das Zielprotein fusioniert sein, dass die Sequenz eine spezifische Abspaltung erlaubt.

Freisetzung des Zielproteins

- Chemische Abspaltung:

- CNBr, CNCl (spaltet im sauren nach Met)
- Ameisensäure (spaltet zwischen Asn und Pro)
- Hydroxylamin (spaltet bei pH 9 zw. Asn und Gly)
- 2-Nitro-5-thiocyanobenzoäure (spaltet vor Cystein)

- Enzymatische Spaltung:

- Exopeptidasen

- Carboxypeptidase A (spaltet alle AS vom C-Terminus ausser Arg, Lys)
- Carboxypeptidase B (entfernt C-terminales Arg oder Lys)

- Endopeptidasen

- Kollagenase
- Endonuklease
- Faktor Xa
- Thrombin

Plasmidstabilisierung

- Zufällige Verteilung der Plasmide auf den Tochterzellen
- Plasmid-tragende Zellen verbrauchen mehr Energie
- Plasmide mit hoher Genexpressionsrate bilden öfter Segreganden (Zellen die ihr Plasmid verloren haben)
- Plasmide sind instabil wenn die exprimierten Gene auf die Wirtszelle inhibierend wirken
- Strukturelle Instabilitäten entstehen durch Punktmutationen oder Rekombinationen auf dem Plasmid
- Transposons oder Insertionssequenzen fördern die Deletion - vermeiden
- Plasmid-freie Zellen überwuchern oft die Plasmid-tragenden Zellen.

Stabilisierung rekombinanter Stämme

- Resistenzgene oder Auxotrophiemarker
- Expression in der Wachstumsphase reprimieren
- Transposons oder Insertionselemente vermeiden
- kleinere Plasmide sind stabiler
- keine redundanten Sequenzen auf den Plasmiden - Rekombinationen
- keine Homologien zu chromosomalen Sequenzen
- Wirtstämme mit inaktiviertem oder geschwächtem enzymatischem Rekombinationssystem
- par (partetition) Regionen verteilen die Plasmide gleichmäßig auf die Tochterzellen

Therapeutische Proteine werden aus verschiedenen Ausgangsmaterialien gewonnen

- Biologika reinigt man großtechnisch aus tierischen oder menschlichen Geweben oder Blutkonserven
- rekombinante Proteine aus Expressionszelllinien im Containment
 - Bakterien
 - Hefen
 - Tierische Zellen
- rekombinante Proteine aus transgene Pflanzen oder Tiere
- Impfstoffe
 - bakterielle Impfstoffe - Toxine, Toxoide, oder abgeschwächte Bakterien
 - Virale Impfstoffe - virale Proteine, Viren auf verschiedenen Zellen gezüchtet

Insulin

- Insulin ist ein Polypeptid-Hormon, das in Wirbeltieren den Glucose-Gehalt regelt.
- Insulin senkt den Blutzuckerspiegel drastisch,
- erhöht die Permeabilität der Zellmembranen für Glucose und einige andere Zucker und fördert gleichzeitig den Abbau der KH in der Zelle,
- in der Leber in erster Linie durch Induktion des Enzyms Glukokinase
- Im Fettgewebe hemmt Insulin die Lipolyse dh die Freisetzung der Fettsren.
- Gleichzeitig wird die Umwandlung von KH in Fett gefördert hptsl. durch Bereitstellung von NADP.H über den vermehrt ablaufenden Pentosephosphat-Zyklus.
- Insulin wirkt antagonistisch zu Glucagon und Insulin wird von Glucagon gehemmt, ebenso von Somatotropin und Cortisol.

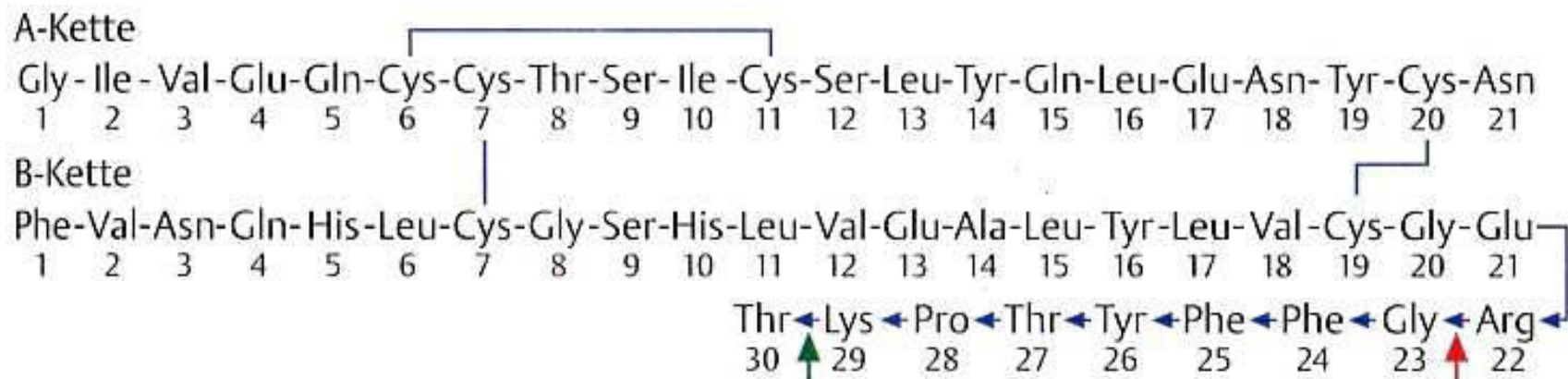
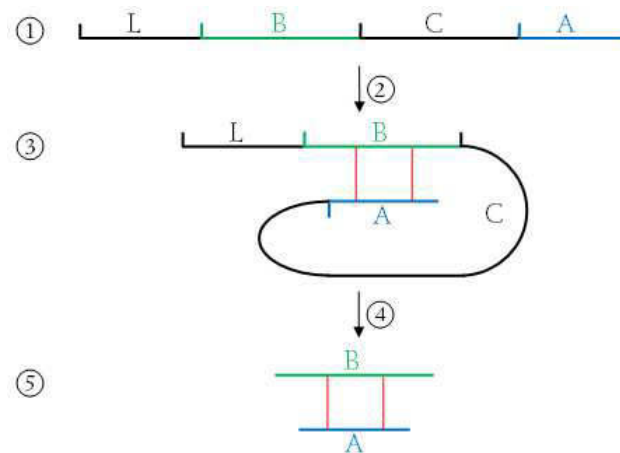
Insulin

- Bis 1985 wurde es durch Extraktion von Schlachttierabfällen gewonnen.
- Danach setzten sich die genetischen Herstellverfahren mit rekombinanten Stämmen von *E.coli* und *Saccharomyces cerevisiae* durch.
- Der Weltmarkt liegt bei ca. 8t/a.
- Die Biosynthese von Insulin erfolgt in den beta-Zellen des Pankreas, wobei zunächst Präproinsulin, dann durch intrazelluläre Prozessierung Proinsulin gebildet wird, das zunächst im Golgi gespeichert wird.
- Bei Glucose-Mangel wird Proinsulin durch membranständige Proteasen zu drei Peptidketten A, B und C hydrolysiert; dabei vereinen sich die A und B-Kette (21 und 30 AS) mittels 3 Cystein-Brücken zum aktiven Insulin während die C-Kette (31 AS) freigesetzt wird.

Insulin wird seit 1928 therapeutisch verwendet

- Zu seiner Gewinnung extrahiert man die Bauchspeicheldrüse von Rindern oder Schweinen mit n-Butanol, fällt daraus das leicht kristallisierende Zink-Insulin und reinigt es mittels Gelchromatographie weiter auf. Der Insulingehalt der Bauchspeicheldrüse eines Schweins deckt den Insulinbedarf eines Diabetikers für 3d, aus einem Rinderpankreas reinigt man Material für 10d. Schweine- und Rinderinsulin unterscheiden sich vom humanen in ein bis 2 AS, was zu immunologischen Reaktionen führen kann.
- Seit 1965 konnte man Insulin sehr unwirtschaftlich durch Totalsynthese herstellen. Ab 1975 tauschte man das C-terminale Ende (Ala30) mittels Carboxypeptidase Y gegen Thr aus.
- Seit 1985 hat sich die gentechnische Herstellung von Insulin durchgesetzt. Die mRNA von hu Insulin wurde aus Pankreaszellen isoliert (75% der mRNA codiert für Insulin), und verwendet aber dann zur Expression eine codon optimierte Sequenz (für E.coli K12). Früher wurden A und B-Kette getrennt exprimiert, gereinigt und dann erst durch chemische Methoden oxidativ zum aktiven Insulin verbrückt. Heute stellt man rekombinantes Proinsulin als Fusionsprotein mit Tryptophan-Synthase her und arbeitet in mehreren chem und enzym Schritten zum Insulin auf.

Insulin als wichtiges Protein-Hormon



C-terminales Thr kann mit **Carboxypeptidase Y**, das Octapeptid mit **Trypsin**, abgespalten werden

Biosynthese von Insulin

- heterodimeres Peptidhormon, das von einem einzigen Gen codiert wird
- Die Biosynthese ist streng zelltypspezifisch (Langerhans'sche Inseln des Pankreas)
- Prä-Proinsulin trägt leader, A-Kette, B-Kette und C-Peptid
 - leader - 24 AS für Sekretion in das ER, wird dabei abgespalten
 - C-Peptid wird durch membranständige Proteasen abgespalten
- reifes Insulin /A- und B-Kette wird aus den Vesikeln durch Exozytose freigesetzt
- Bakterien besitzen diese posttranslationalen Mechanismen nicht

Varianten des Insulins

Insulin verschiedener Herkunft (C-terminales Ende der B-Kette)

Glu	Glu	Glu		Glu	Glu
Arg	Arg	Arg ²²		Arg ²²	Arg
Gly	Gly	Gly	← Trypsin →	Gly	Gly
Phe	Phe	Phe	Austausch des C-terminalen	Phe	Phe
Phe	Phe	Phe	Octapeptid	Phe	Phe
Tyr	Tyr	Tyr		Tyr	Tyr
Thr	Thr	Thr		Thr	Thr
Lys ²⁸	Pro ²⁸	Pro ²⁸	← Carboxypeptidase Y →	Pro	Pro
Pro ²⁹	Lys ²⁹	Lys	Austausch des C-terminalen	Lys	Lys
Thr ³⁰	Thr ³⁰	Thr ³⁰	Alanin gegen Threonin	Ala³⁰	Ala³⁰

Lys → Pro-
Insulin
mit erhöh-
ter Biover-
fügbarkeit

rekombi-
nantes
Human-
insulin aus
E. coli K12

Human-
insulin

Thr³⁰ → Ala³⁰

Schweine-
insulin

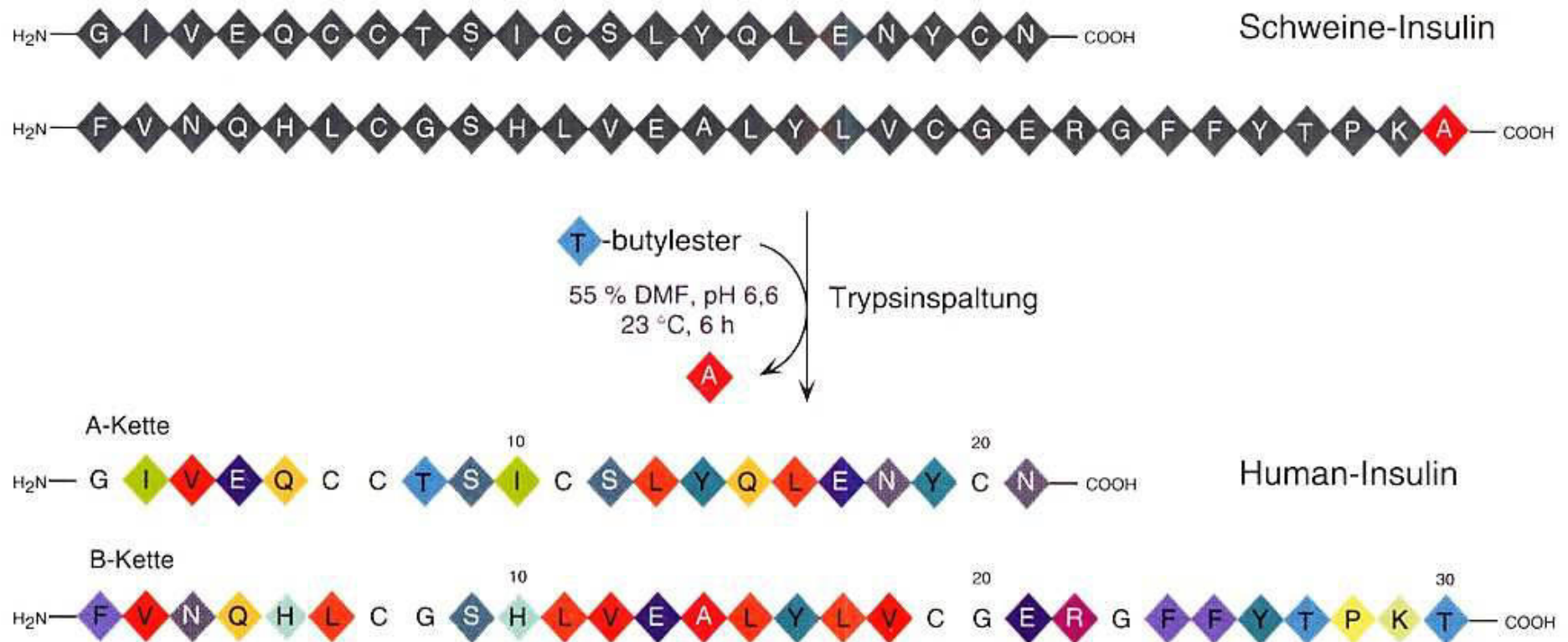
Rinder-
insulin*

*zusätzlicher Austausch von
2 Aminosäuren in der A-Kette

Tierisches Insulin wirkt als Immunogen

- Human und Schweineinsulin unterscheiden sich nur in 1 AS, der letzten der B-Kette Schwein A, human T.
- Bei der Humanisierung wird zunächst das A durch die Endoprotease Trypsin abgespalten (Trypsin hydrolysiert die Peptidbindung immer nach einer basischen AS, Lys, Arg). Damit die Bindung nach dem Arg22 nicht gespalten wird hat Hoechst eine Verfahren entwickelt bei dem die Reaktionsbedingungen so eingestellt sind, dass nur die gewünschte Bdg hydrolysiert wird. Gleichzeitig wird dem Ansatz Threonin-Tertiärbutylester zugesetzt, sodass unter den H₂O armen Bedingungen die Rückreaktion der Trypsin-Hydrolyse mit Threonin-Tertiärbutylester als Substrat in Form einer Transpeptidierung abläuft. Anschließend wird der Ester zu biologisch voll aktivem Human-Insulin hydrolysiert.
- Hoechst arbeitete täglich ca 11 t Schweine Bauchspeicheldrüsen auf (100.000 Schlachttiere).
- Der weltweite Bedarf ist mit modifiziertem Schweineinsulin daher nicht mehr zu decken, daher gehört die Zukunft der gentechnischen Herstellung.

Umwandlung Schweine-Humaninsulin



Gentechnisch hergestelltes Insulin

- Proteolytische Spaltung des Prä-Proinsulins in Bakterien nicht möglich
- bei Verwendung des natürlichen Gens für rekombinante E.coli muss man aufwendige Verfahren zur Konvertierung vornehmen (unökonomisch)
- alternative Strategien:
 - Verwendung von 2 Teilgenen und einer biochemischen/biotechnischen Aufarbeitung (DSP-Verfahren)
 - Expression von Proinsulin in E.coli
 - Expression von Mini-Proinsulin in *S. cerevisiae*

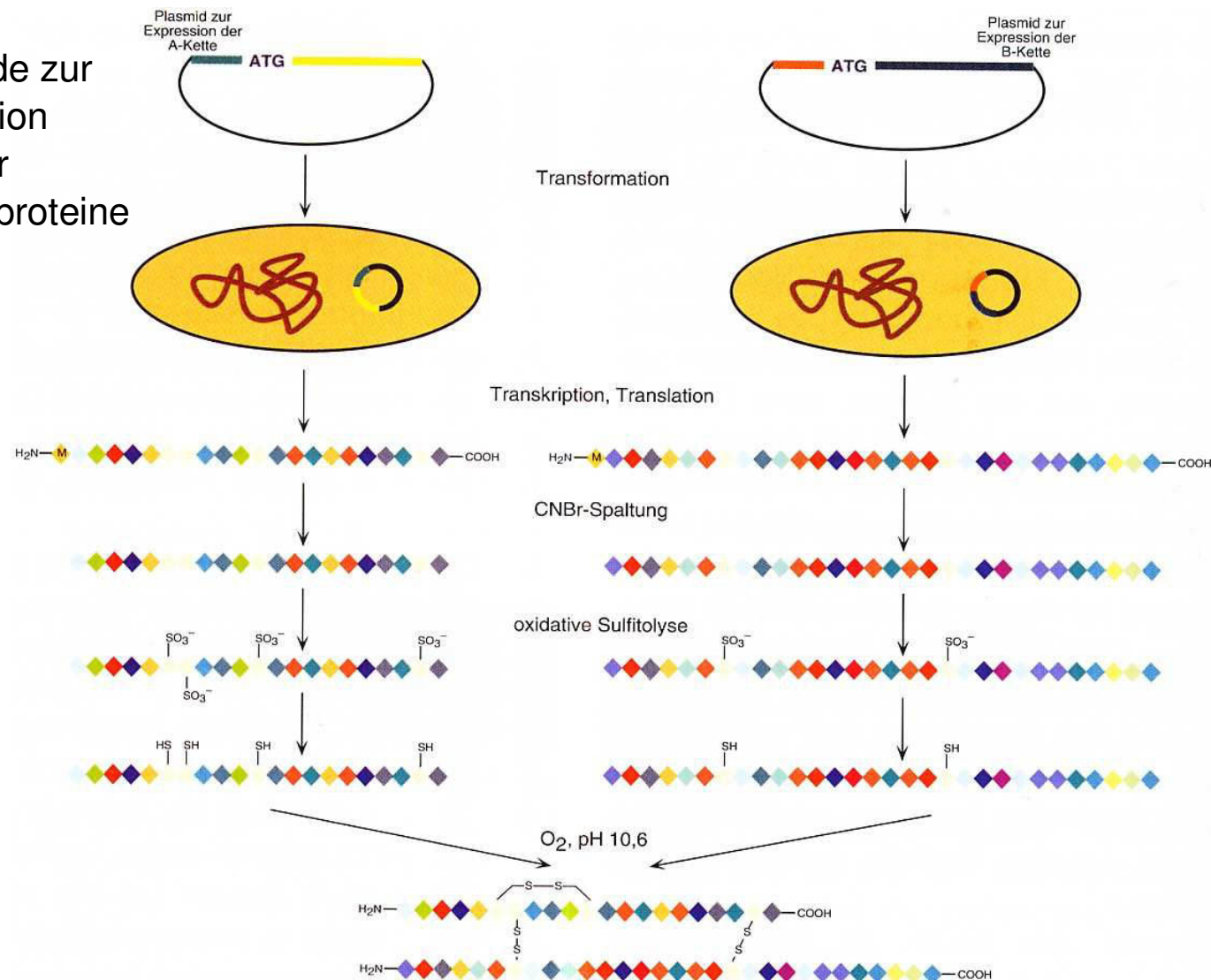
Expression der beiden Insulinketten in unterschiedlichen E.coli-Stämmen



- Getrennte Expression der beiden Insulinketten; codon optimierte Teilgene synthetisieren und hinter das M-Codon des beta-Galaktosidase- oder des Thryptophansynthase-gens insertieren. Die beiden Plasmide werden in 2 getrennte Bakterienstämme transformiert (A- und B-Kette)
- Dadurch entstehen Fusionsproteine mit beta-Galaktosidase oder der bakteriellen Tryptophan-Synthase mit hoher Effizienz. Nach der Isolierung der chimären Proteine müssen dann in einer komplexen Nachbehandlung die Teilproteine zu aktivem Insulin umgesetzt werden. Dafür werden die Fusionsproteine zunächst mit CNBr fragmentiert, CNBr spaltet ausschließlich nach Methioninresten. Da weder A noch B-Kette Methionin enthält, die Gene aber unmittelbar hinter dem Methionin insertiert wurden, erhält man durch CNBr Behandlung intakte Insulinketten ohne fremde AS.
- Durch oxidative Sulfitolyse werden A- und B-Ketten in die S-Sulfonatderivate überführt. Diese werden dann miteinander kombiniert und dann in Thiolderivate umgewandelt. Schließlich bilden sich durch Luftoxidation die 3 Disulfidbrücken des aktiven Insulins. Der NT ist die relativ geringe Ausbeute an aktivem Insulin, denn durch die Ausbildung falscher intra- und intermolekularer Disulfidbdgen werden viele inaktive Nebenprodukte gebildet.

Expression zweier Insulinketten

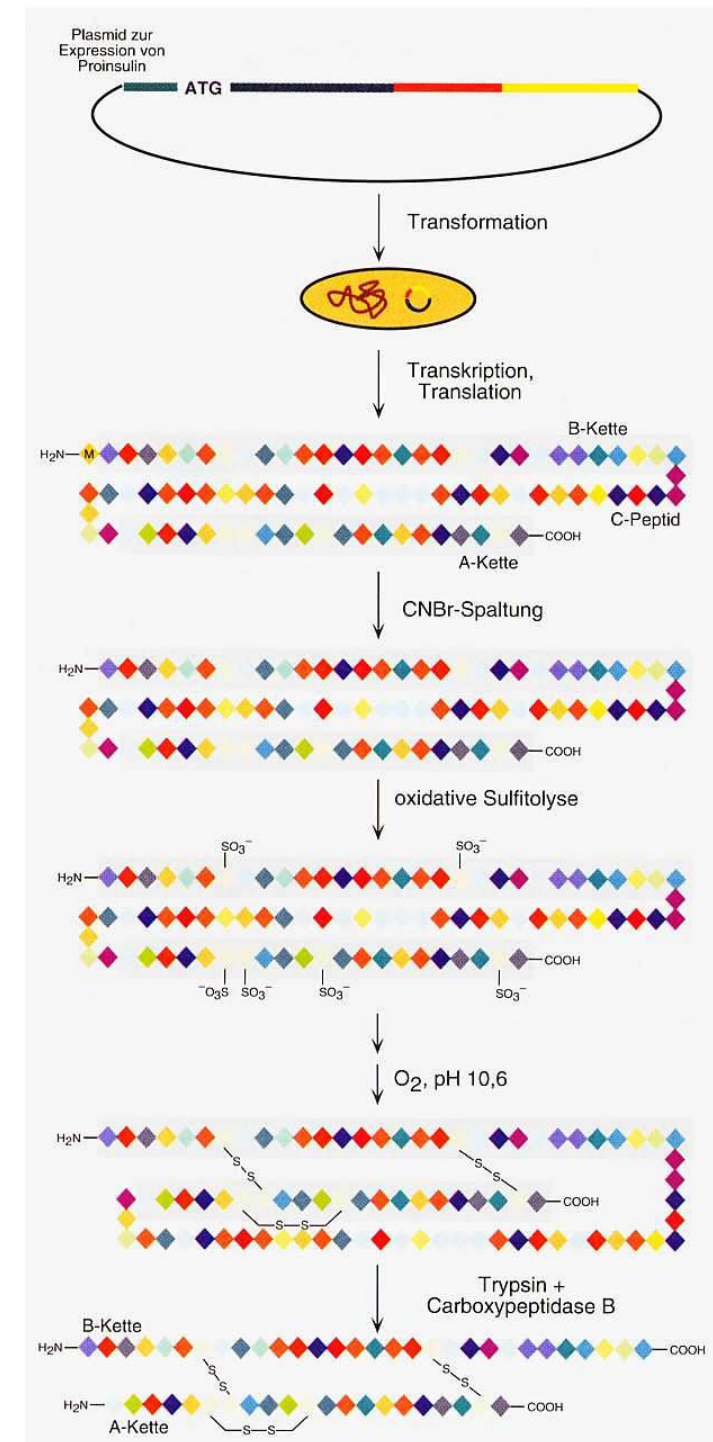
- Plasmide zur Expression chimärer Fusionsproteine



Expression von Proinsulin in E.coli

- Dieses Verfahren unterscheidet vom ersten darin, dass nur ein einziges Plasmid und nur ein transgener E.coli Stamm für die Produktion verwendet wird. Das Plasmid trägt das komplette Insulin-Gen also die genetische Information für die Insulin-A-B- und C-Kette. Ähnlich wie beim ersten Verfahren wurde auch in diesem Fall das Gen exakt hinter einem Met-Codon des Tryptophan-Synthase Gens insertiert, sodass wiederum ein Fusionsprotein synthetisiert wird.
- Das Proinsulin wird aus dem Fusionsprotein durch CNBr-Behandlung freigesetzt und durch oxidative Sulfitolyse in das Sulfonatderivat überführt. Die Ausbildung der korrekten Disulfidbdgen erfolgt in diesem Fall wesentlich effektiver als im Fall einzelner Teilketten. Das verdeutlicht, dass im Proinsulin die aktive Struktur bereits vorgeformt zu sein scheint. Durch Behandlung von Proinsulin mit Carboxypeptidase B und Trypsin wird das Trypsin in das C-Peptid entfernt, und man erhält aktives Insulin in guter Ausbeute.

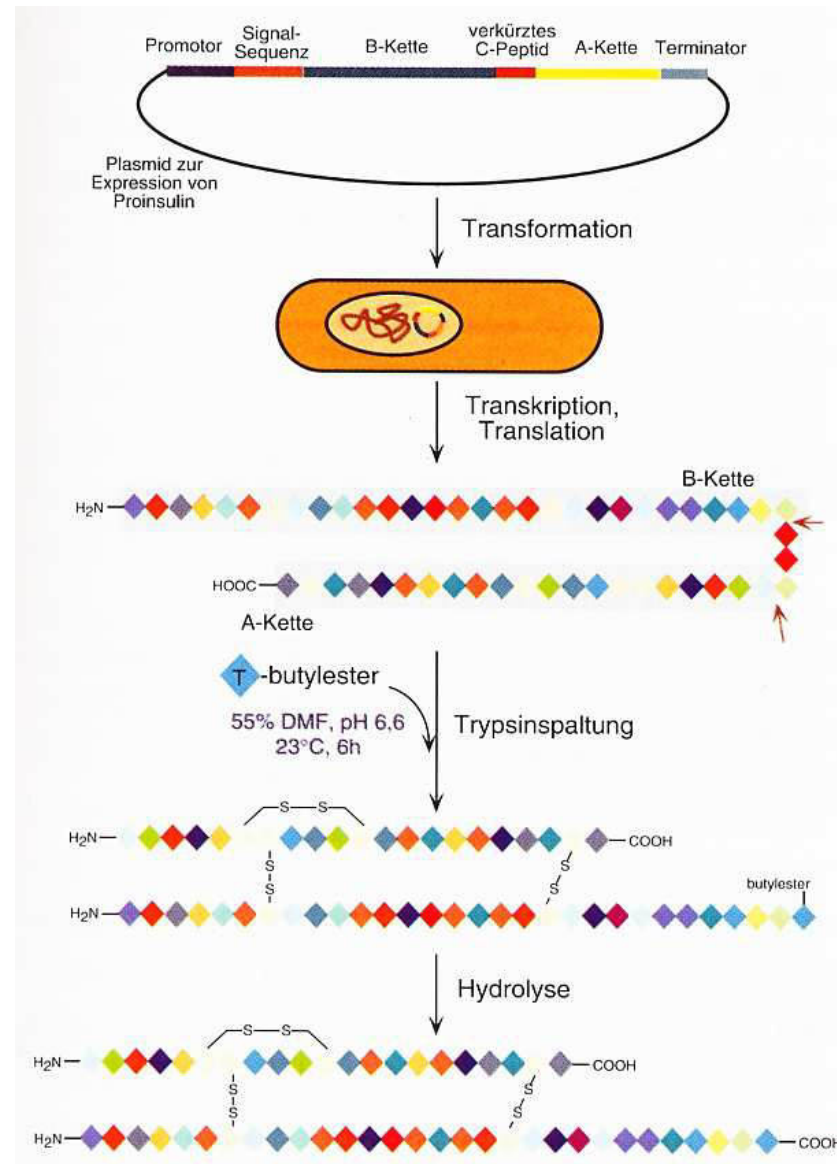
Expression von Proinsulin in E.coli



Insulinherstellung in *S.cerevisiae*

- Sekretion in den Überstand, damit nicht soviel HCP isoliert wird.
- Promotor ist der Triosephosphat-Isomerase-Promotor aus *S.cerevisiae*, Signalpeptid aus einem *S.cerevisiae* Protein,
- Der größte Teil des sezernierten Proteins war das C-Peptid, und die Disulfidbrücken des geringen Insulinanteils waren falsch geknüpft. Das Primärprodukt wird so schnell von den Hefeproteasen hydrolysiert, dass keine Zeit für die Knüpfung der richtige S-S Brücken bestand. Deshalb machte man verschieden Konstrukte für die Expression: Das Mini-Proinsulin-Gen hat nur ein sehr verkürztes C-Peptid mit 9 bp und 3AS: AAK. Hefeproteasen können dieses kurze C-Peptid nicht hydrolysieren, es ist aber noch flexibel genug, um eine Faltung des Proteins zu ermöglichen, die eine korrekte Ausbildung der S-S Bdgen garantiert. Diese Proinsulinvariante wird in das Medium sezerniert, wobei der N-Terminus bereits richtig ist und ebenso alle S-S. Dadurch braucht man die CNBr Behandlung nicht mehr und auch nicht die oxidative Sulfitolyse. Die Entfernung des Mini-C-Peptides erfolgt mit der gleichen Methode wie die Umwandlung des Schweine Insulins. In H₂O armen Milieu wird in Ggw von Threonin-Ester mit Trypsin behandelt. Dieses spaltet zunächst hinter den beiden Ks und verlängert dann in der Rückreaktion durch Transpeptidierung die B-Kette um ein Thr. Dann wird der Ester durch Hydrolyse entfernt.

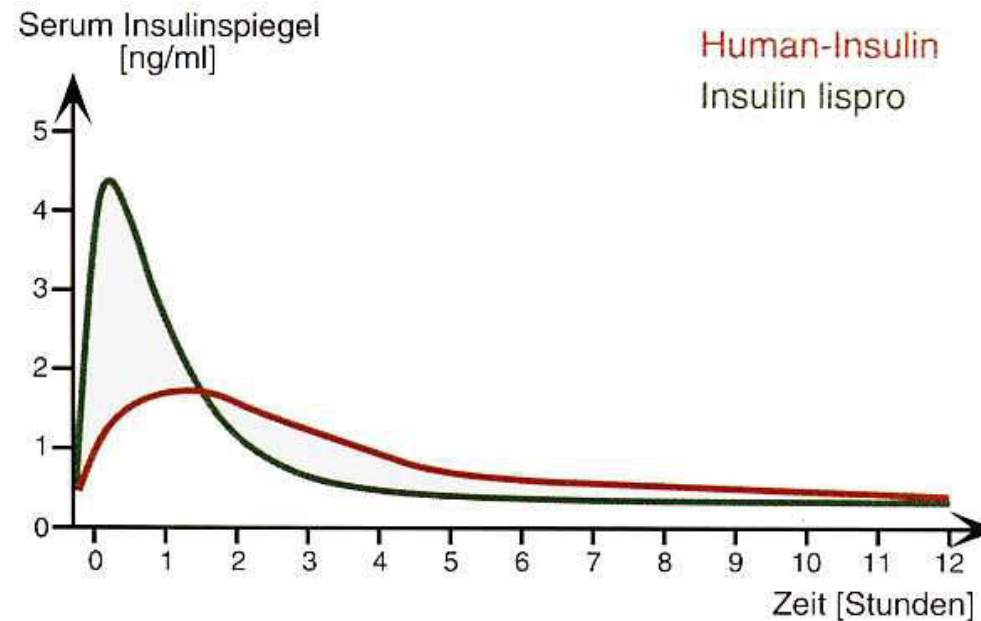
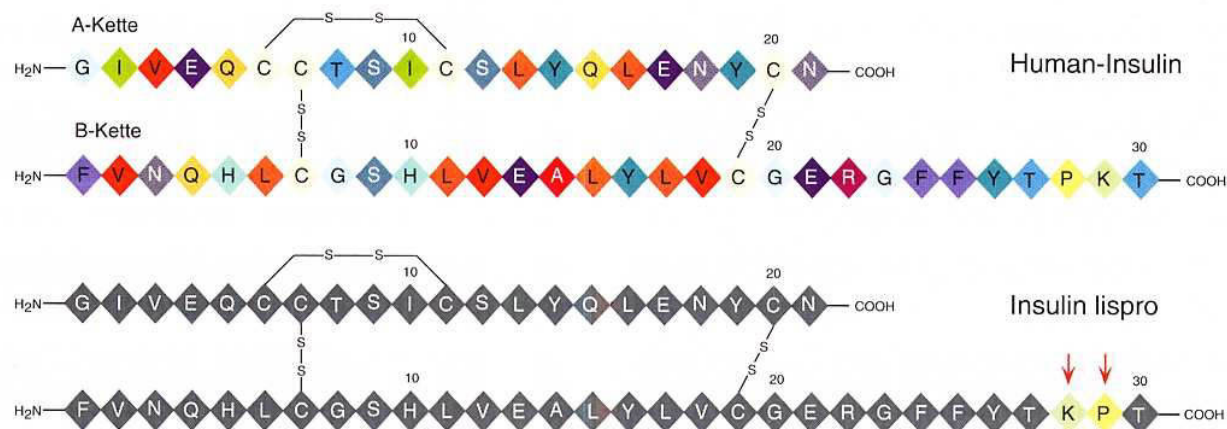
Expression von Mini-Proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*



Weitere Insulin Varianten

- Ausfällung durch Zn-Salze oder Protamine - Depotwirkung durch langsames Lösen
- pI von Insulin liegt bei 5.5 und ist bei physiologischem pH löslich
 - Änderung der Primärstruktur so, dass pI in Richtung sauer verschoben wird; dadurch wird die Auflösung verzögert und eine Depot-Wirkung des Insulin-Analogen erzielt
 - basische AS werden an die A- oder B-Kette angeheftet (Arg(B31) und Arg(B32) und Asn(A21) wird durch Gly ersetzt (Hoe901)
 - saure Gruppen werden im Protein blockiert
 - saure AS werden durch basische AS ersetzt

Lispro, das erste zugelassene Insulin-Mutein



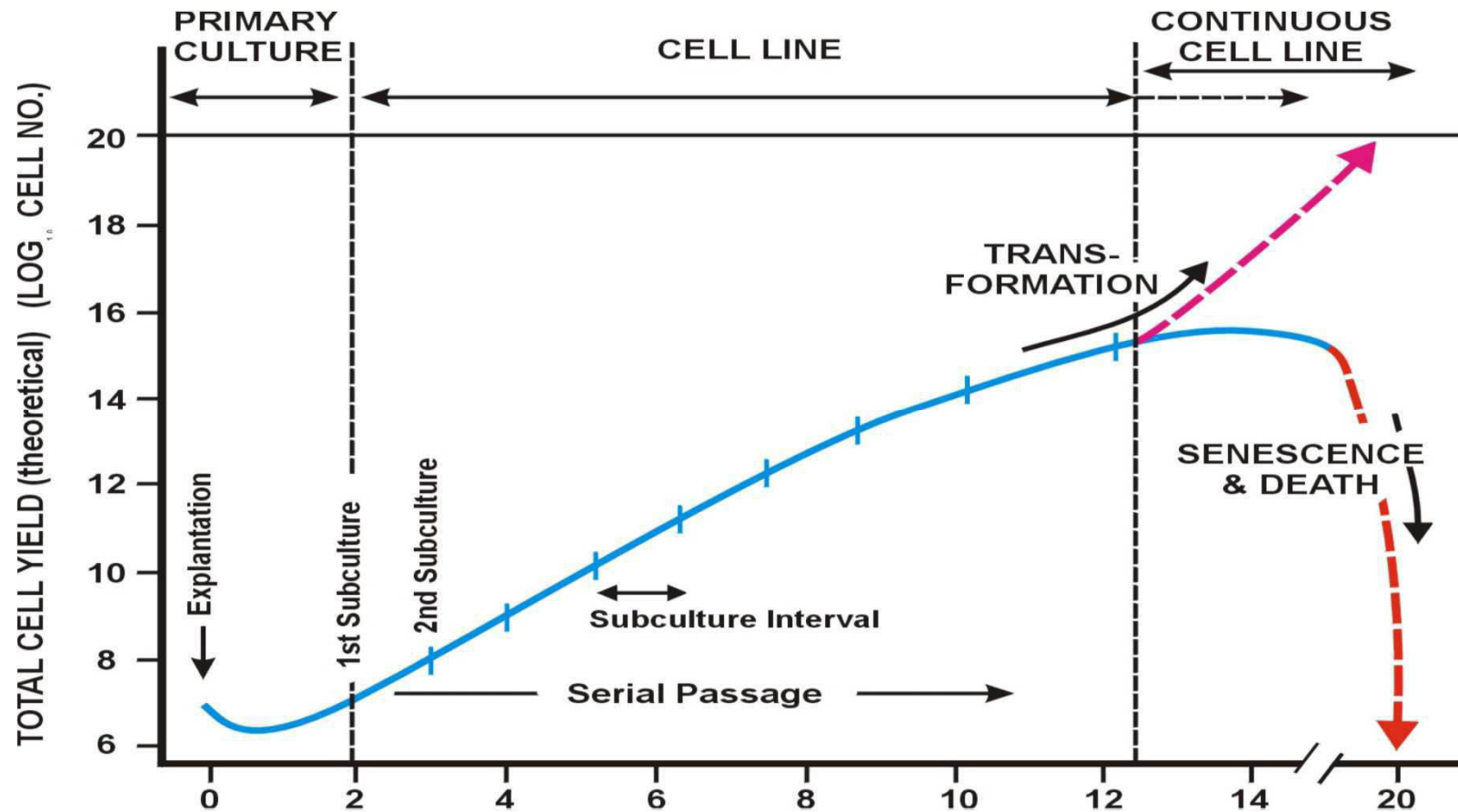
Milestones in cell culture

- 1880 Roux maintained embryonic chicken cells in culture
- 1900 Harrison grew frog nerve cells by hanging drop technique
- 1910 Carrel used aseptic techniques for long term cell cultures
- 1910 Rous and Jones used trypsin for sub-culture of adherent cells
- 1940 Penicillin and streptomycin were added to culture medium
- 1940 Earle isolated mouse L-Fibroblasts
- 1940 Enders grew poliovirus on cultured human cells
- 1950 Gey cultures HeLa Cells
- 1950 Eagle developed a chemical defined culture medium
- 1960 Hayflick and Moorhead showed that human cells have a finite life span
- 1970 Köhler and Milstein produced an antibody-secreting hybridoma
- 1970 Sato developed serum free medium from hormones and growth factors
- 1980 Human insulin was produced from bacteria
- 1980 Recombinant tissue plasminogen activator was produced from animal cells

Produkte aus tierischen Zellen

- Virale Impfstoffe: Viruszüchtung auf Wirtszellen (Polio, Influenza, Keuchhusten)
- Herstellung von Proteinen
 - ◆ Aus immortalisierten Zellen (Interferon, monoklonale Antikörper)
 - ◆ Aus rekombinanten Zellen (Enzyme, Hormone, Zytokine, Impfstoffantigene, monoklonale Antikörper)
- Zellen als Produkte (Hauttransplantate, drug screening, Toxikologietests, Organoide)

In-vitro Kultivierung primärer Zellen



Zellkulturen entstehen aus tierischem Gewebe oder Blut

- Primäre Zellen
- diploide Zelllinien
- kontinuierliche, immortalisierte Zelllinien

Ursache für die Immortalisierung

- Spontanmutation
- Virusinfektionen
- virale Onkogene

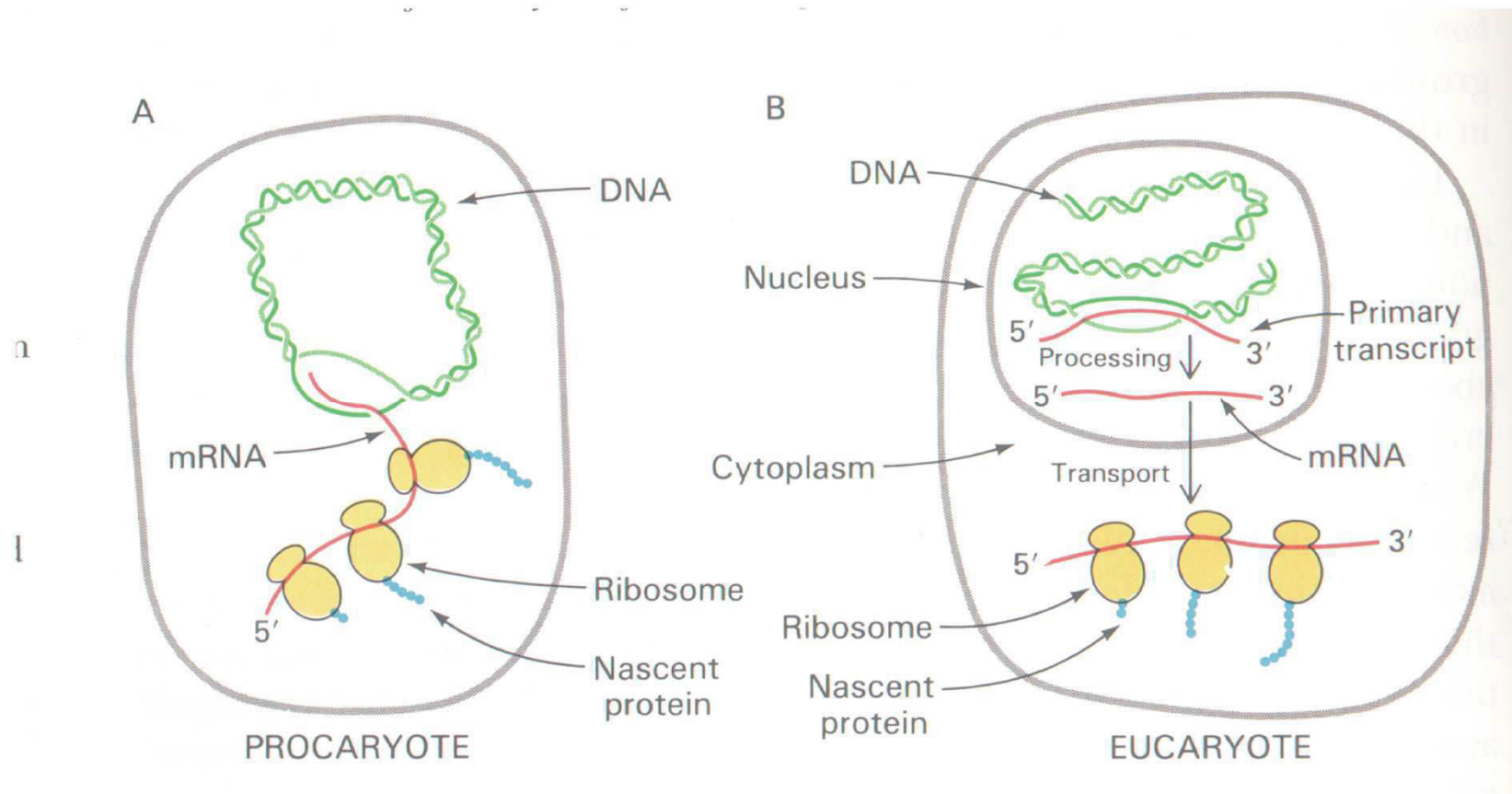
Expression von Zielgenen in tierischen Zellen

- Einführung von Fremdgenen in die Zellen
- Immortalisierung unter Beibehaltung der Differenzierungseigenschaften

Organisation eukaryontischer Zellen

- Zellen sind kompartimentiert
(Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen)
- Zellkern teilt sich mitotisch, in der Metaphase sind Chromosomen leicht sichtbar
- während des Zellzyklus erfolgt die Teilung (M-G1-S-G2)
- Chromatin ist die aufgelockerte Chromosomenstruktur im Kern
- DNA ist überwiegend als Komplex mit Histonen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) zu Nucleosomen organisiert
- Repetitive Sequenzen wiederholen sich bis zu 100.000fach im Chromosom (Histone, tRNA, rRNA, nicht codierende Sequenzen).
- Genamplifikation (extrachromosomale, intrachromosomale Replikation)
- Replikation der DNA Okazaki Fragmente mit ori, RNA Primer
- oris sind in einem Abstand von ca. 100.000bp und die Replikation erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 50bp/sec

Genexpression in Prokaryonten und Eukaryonten



Organisation eines eukaryontischen Gens

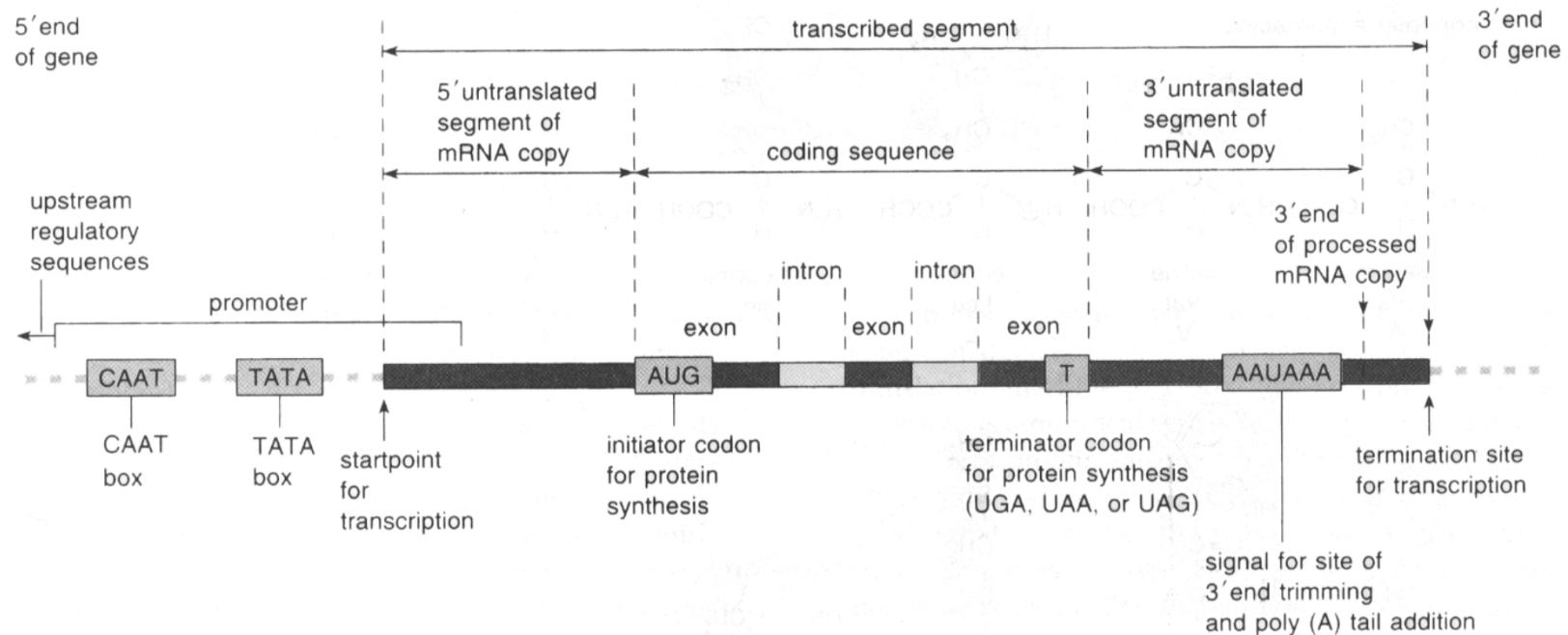
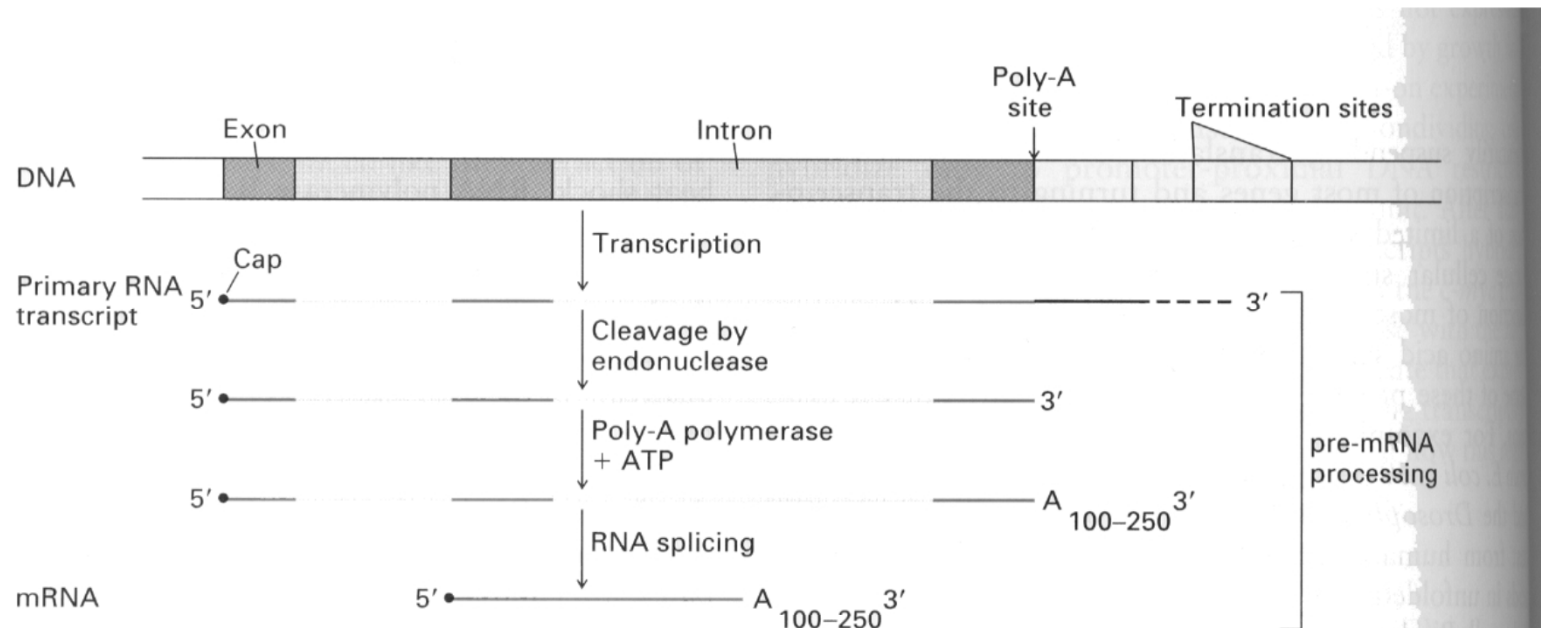


Figure 3.12 Eukaryotic promoter elements and other sequences important for transcription and translation. Introns also may be present within the gene coding sequence. The transcribed segment is presented as RNA (with uracil in the sequence). The CAAT and TATA boxes are shown as the DNA missense sequence (the sequence complementary to the DNA templates).

Transkription und RNA-processing



▲ **FIGURE 12-9** Steps in pre-mRNA processing in eukaryotes. This processing occurs in the nucleus, yielding a functional, mature mRNA, which is transported to the cytoplasm. Transcription by RNA polymerase II produces a primary RNA transcript extending from the 5' capped nucleotide, which is retained in the mature RNA, to one of several

alternative 3' nucleotides located $\approx 0.5\text{--}2$ kb downstream from the poly-A site. The primary transcript is cleaved at the poly-A site, a string of A residues is added, and the introns are spliced out. The poly-A tail contains ≈ 250 A residues in mammals, ≈ 150 in insects, and ≈ 100 in yeasts.

Expression in Eukaryonten vs. Prokaryonten

- Die Genexpression wird durch den Promotor gesteuert.
- Ein Gen, das in Prokaryonten transkribiert wird, kann in Eukaryonten nur transkribiert werden, wenn ein geeigneter EUKARYONTISCHER Promotor vorgeschaltet ist!!!!
- Der genetische code ist universell!!!
- Die post translationalen Modifikationen unterscheiden sich signifikant!!! – Glykosilierung, Sulfatierung, Phosphorylierung
- Das exprimierte Protein wird je nach Signalsequenzen (leader-Sequenz) an seinen Bestimmungsort geleitet (targeting)

Transkriptionskontrolle

..in Prokaryonten von außen und reversibel

Nährstoffangebot, Temperatur, chemische Substanzen

DNA bindende Proteine (repressors or activators of RNA polymerase)

Katabolit Repression (glucose effect – use of best available glucose source)

CRP (cAMP receptor protein) binds as a dimer to DNA and enables transcription

stringent response (ppGpp, pppGpp) generated during amino acid starvation

heat shock response is regulated by alternative sigma factors

..in Eukaryonten zur Genkontrolle und Differenzierung

geringe Bedeutung äußerer Einflüsse für überlebensnotwendigen Proteine

Genkontrolle erfolgt über die Chromatinstruktur und regulatorische Proteine

körpereigene Signale oder durch Zell-Zell Kontakt

Übertragung von Signalen auf Protein Untereinheiten der RNA Polymerase

Unmittelbare Promotorelemente (CCAAT-Motiv, GC-reiche Box)

Enhancer werden über ihre Wirkungsweise definiert, enthalten repetitive Sequenzen, wirken in fast allen Geweben

Induzierbare Transkriptionselemente werden durch Hormone, Temperatur, Wachstumsfaktoren und Viren stimuliert

Negative cis-acting elements sind negative enhancer und wirken direkt auf die TATA oder indirekte auf proximale Promotorelemente

Translation der Proteine

- Der universelle genetische Code wird von Prokaryonten und Eukaryonten verwendet (degenerierte Codons in allen Organismen unterschiedlich bevorzugt)
- Translation erfolgt in allen Organismen an den Ribosomen mit Proteinfaktoren, die für Initiation, Elongation und Termination verantwortlich sind
- Es werden auch mehrere Proteine von einer mRNA abgelesen
- Die Translation erfolgt an Ribosomen
 - Proteine, die im Zytosol bleiben oder in den Kern oder Peroxisomen wandern, haben dafür nur eine Signalsequenz
 - andere Proteine werden noch während der Synthese in das Lumen des ER geschleust (leader).

Post translationale Modifikationen (PTMs)

- Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten
- Anheftung komplexer Zuckerstrukturen an Asparagin-, Serin- oder Tyrosin
- Blockierung des N-Terminus durch N-Formyl-, N-Acetyl oder N-Acylreste
- Anheftung eines Glycolipid-Ankers zur Fixierung der Proteine in der Zellmembran
- Modifikation durch Farnesylierung, Myristinylierung zur Membranassoziation
- Acylierung durch FS an Cysteinen führen zur Verankerung der Proteine in der Membran
- Sulfatierung oder gamma-Carboxylierung ermöglicht die Ca^{2+} Bindung und beeinflussen die biologische Aktivität.
- Besonders bei Blut-Gerinnungsfaktoren sind bestimmte Modifikationen essentiell:
 - gamma-Carboxylierung von Glutamat-Resten
 - beta-Hydroxylierung von Aspartat- bzw. Asparagin-Resten
 - proteolytische Modifikationen

Änderung der Proteineigenschaften durch PTMs

- Einfluss auf die Eigenschaften eines Proteins oft sehr wenig verstanden
- Änderung der
 - ◆ Tertiärstruktur
 - ◆ Ladung
 - ◆ Hydrophobizität
- keine allgemein gültigen Regeln wie sich die Modifikationen auswirken

Zell-Linien aus Säugetierzellen

Einteilung nach der Spezies:

- Humane Zelllinien (HepG2, HeLa, PER-C6)
- Maus-Zelllinien (NS0, Sp2/0)
- Affen-zelllinien (Vero)
- Hamster Zelllinien (CHO, BHK)

Einteilung nach dem Gewebe, aus dem sie isoliert wurden:

- Nieren, Lugen, Gebärmutter, Amnion, Leber, Blutzellen

Einteilung nach dem Zelltyp:

Lymphoblasten, Fibroblasten, Endothelien, Epithelien

Einteilung nach Wachstumseigenschaften:

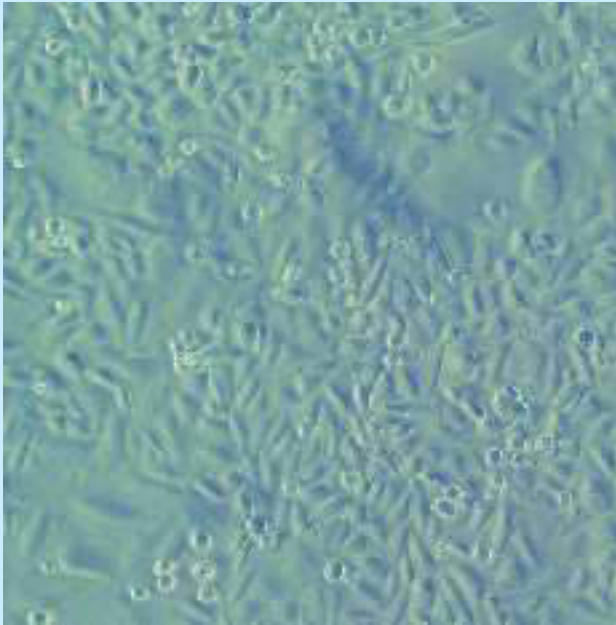
Adhärente Zellen, Suspensionszellen

Beispiele für Produkte aus tierischen Zellen

Cell line	Description	Product
BHK-21 (C13)	Syrian golden hamster kidney cells ATCC CCL-10 (MacPherson, J.A.) (MacPherson 1963) Polyoma virus transformed/tumorigenic	Vaccine production ⇒ Polyomavirus ⇒ Foot- and mouth disease ⇒ Rabies (veterinary vaccines)
C127	Mouse mammary gland cells ATCC CRL-1616 (Howley, P.M.)	Recombinat protein production ⇒ Human growth hormone
CHO	Chinese hamster ovary cells (Puck 1958) <i>CHO-K1</i> ATCC CCL-61 Subclone of the original CHO cell line <i>CHO-DHFR-</i> ATCC CRL-9096 Dihydrofolate reductase negative	Recombinant protein production ⇒ β -interferone ⇒ Erythropoietin ⇒ Tissue plaminogen activator TPA ⇒ Factor VIII ⇒ Granulocyte colony stimulating factor
MDCK	Adult female cocker spaniel ATCC CCL-34 (Madin, S., Darby, N.B., 1958)	Veterinary vaccine production
MRC-5	Normal human embryonic lung fibroblast cells ATCC CCL-171 (Jacobs, J.P.) (Jacobs, Jones et al. 1970)	Human vaccine production ⇒ Poliovirus
Namalwa	Human burkitt's lymphoma cells ATCC CRL-1432 (Finter, N.B.) Malignant	α -interferone
Vero	Normal african green monkey kidney cells ATCC CCL-81 (Hann, W., Rhim, J.S.) (Yasumara and Kawakita 1963)	Human vaccine production ⇒ Poliovirus
WI-38	Normal human lung fibroblast cells ATCC CRL-75 (Hayflick, L.) (Hayflick and Moorhead 1961)	Human vaccine production ⇒ Poliovirus

CHO-Zellen in serumhaltigen und proteinfreiem Medium

**Adhärenzte
Zellen**

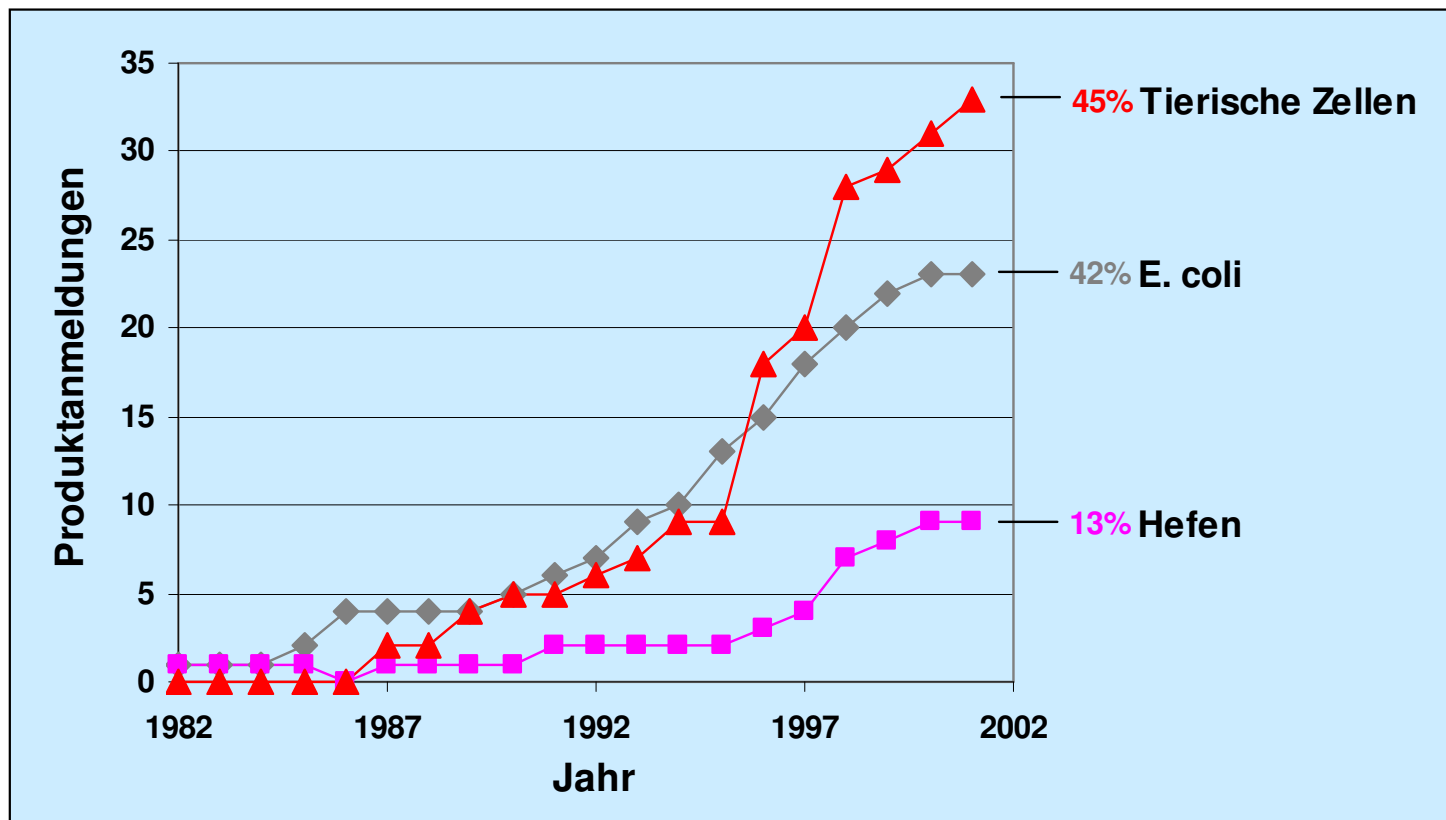


**Suspensionsadaptierte
Zellen**

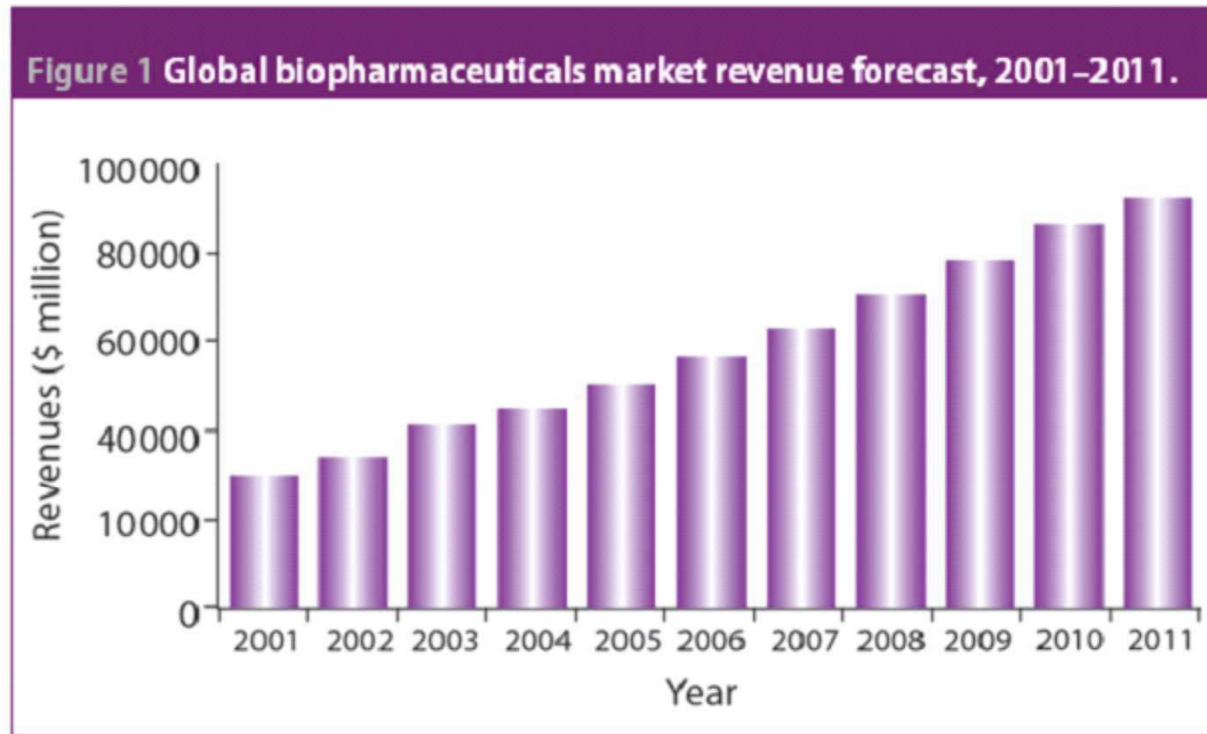


Technologische Verwendung verschiedener Wirtszelllinien

- Bakterien und niedere Eukaryonten
- Höhere Eukaryonten



2010 Biopharmazeutika Markt



2010 Biopharmazeutika Markt

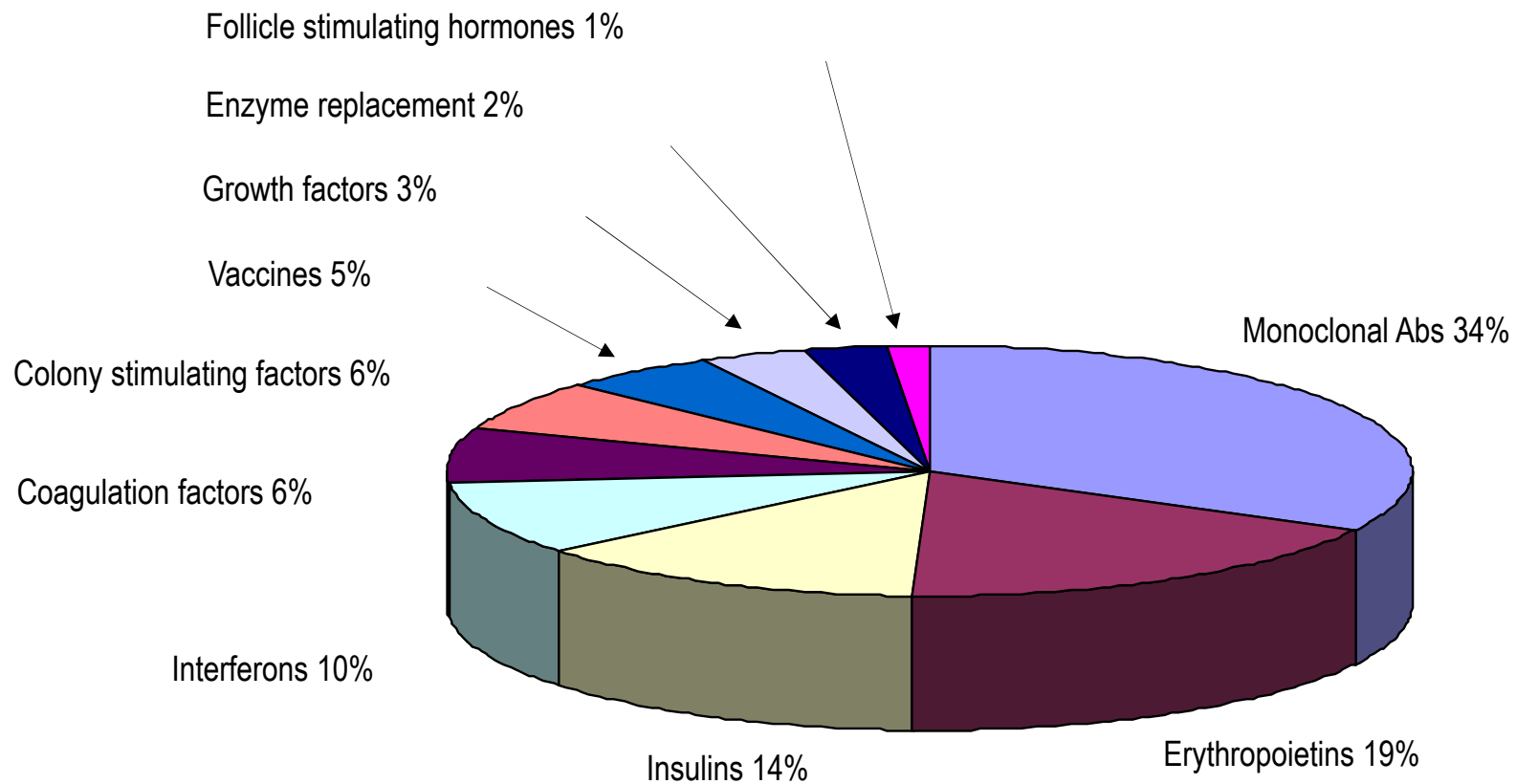


Tabelle zur Selbstkontrolle

	Bakterien	Tierische Zellen
Medienansprüche	Proteinhydrolysate, C-Quelle, Salze	Aminosäuren, Vitamine, C-Quelle, Ionen, Spurenelemente, Supplemente
Zelldurchmesser, Volumen (Umrechnung)	1 μm	10 μm
Teilungsrate	20 min bis Stunden	ein bis mehrere Tage
Maximale Zelldichte		1-10 mio cells per ml
Umrechnungen von cells/ml auf BTS/ml bzw. qP zw. Pro- und Eukaryonten		
Promotoren (Beispiele)	bakterielle oder Phagen-Promotoren	zelluläre oder virale Promotoren
Genetischer code	universell	universell
Signalsequenzen (Beispiele)	Keine oder pelB (pectin lyase B)	Autolog oder eukaryotic elongation factor (eEF) 1A-1
PTMs (Beispiele)	nicht vorhanden oder einfach	komplex
Nennen sie 3 Produktionsstämme oder Wirtszelllinien		