



Eukaryotické expresní systémy



Exkurze

Aplikovaná bioinformatika, Jaro 2014



Eukaryotické expresní systémy

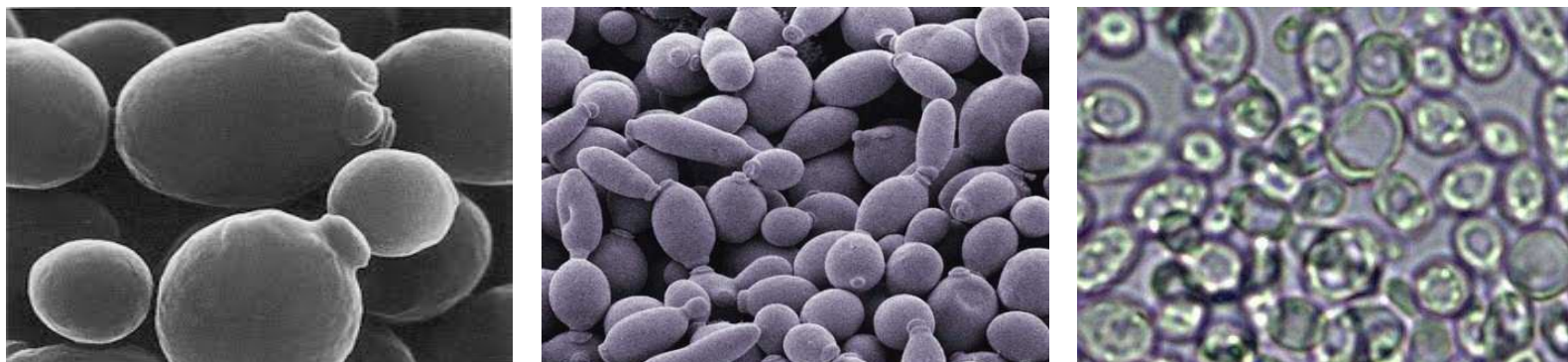
- **Kvasinky**, rostliny, houby, **savčí buňky**, hmyzí buňky, **živočichové**, *in vitro* translace
- + umožňují posttranslační modifikace proteinů
 - **glykosylace**, fosforylace, acetylace, ubikvitinace...
- + vyšší pravděpodobnost funkčního produktu
- buňky citlivější na manipulaci
- nižší výtěžky rekombinantních produktů
- náročnější na kultivační podmínky a čas
- dražší média a speciální vybavení

Kvasinky
x
„humanizované“
kvasinky



Saccharomyces cerevisiae
(vystresovaná hladem)

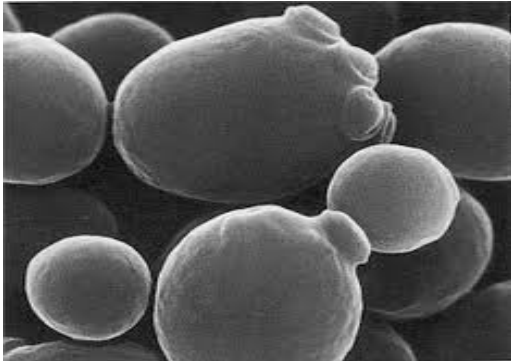
Saccharomyces cerevisiae



- kvasinka
- + **jednoduchá** transfekce a **kultivace**
- + snadná velkoobjemová fermentace, **rychlý nárůst kultury**
- nutnost často **zdlouhavé optimalizace** kultivačních podmínek
- **vysoká mannosylace proteinů**
 - možnost využití „humanizovaných“ kmenů

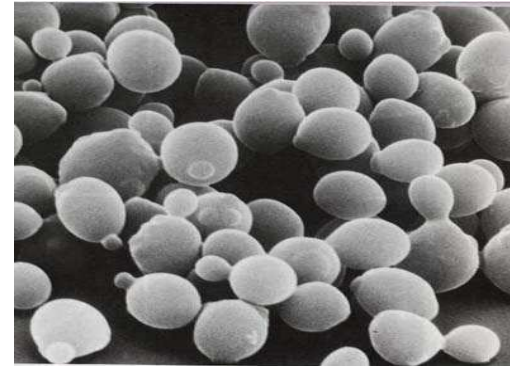
Kvasinkové expresní systémy

Saccharomyces cerevisiae



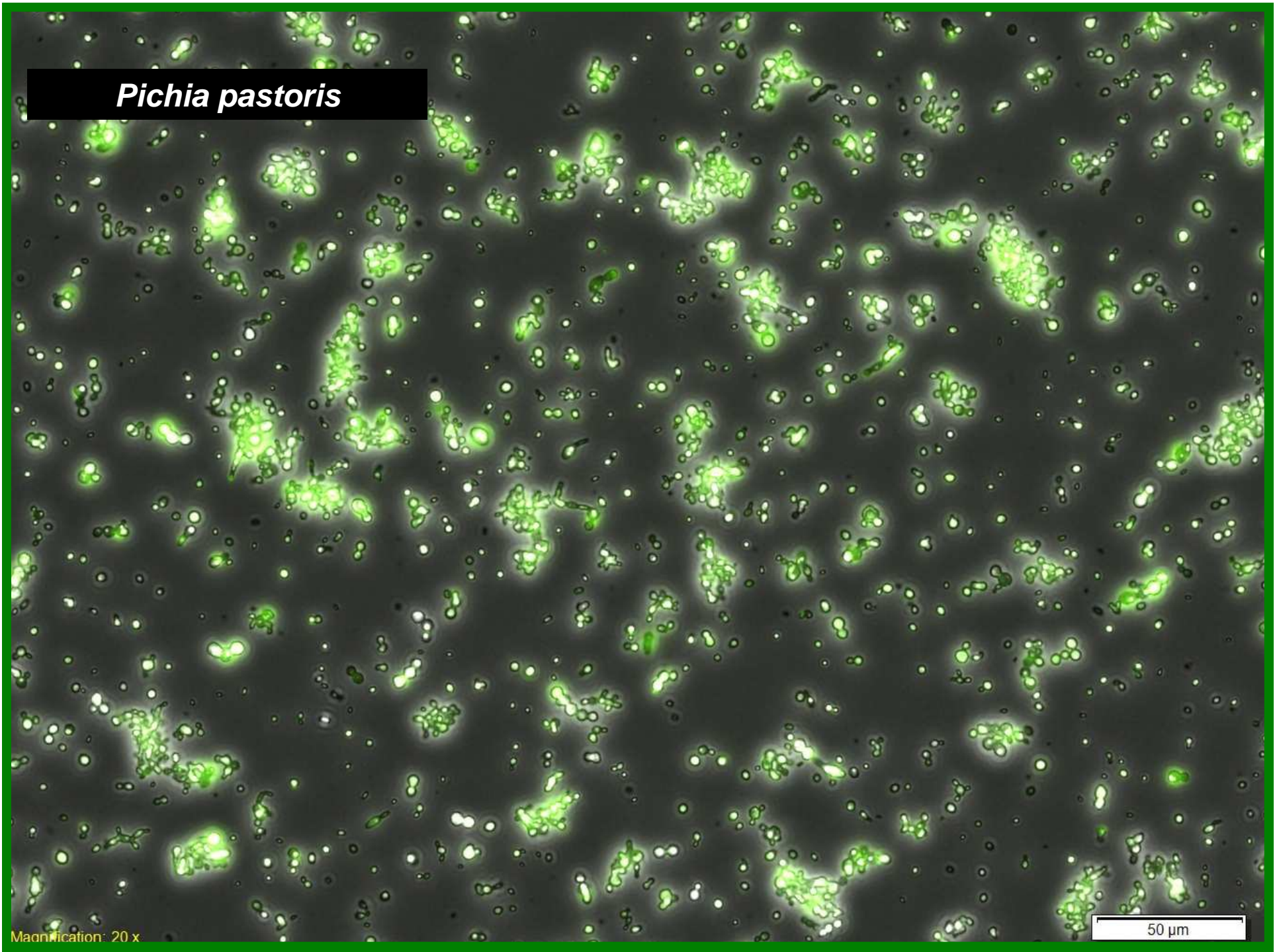
- plasmid nezačleňuje do genomu
- vysoká mannosylace proteinů – antigennost pro člověka

Pichia pastoris



- začleňuje plasmid do genomu – linearizace
- 1/3 mannosylace oproti *S. cerevisiae*

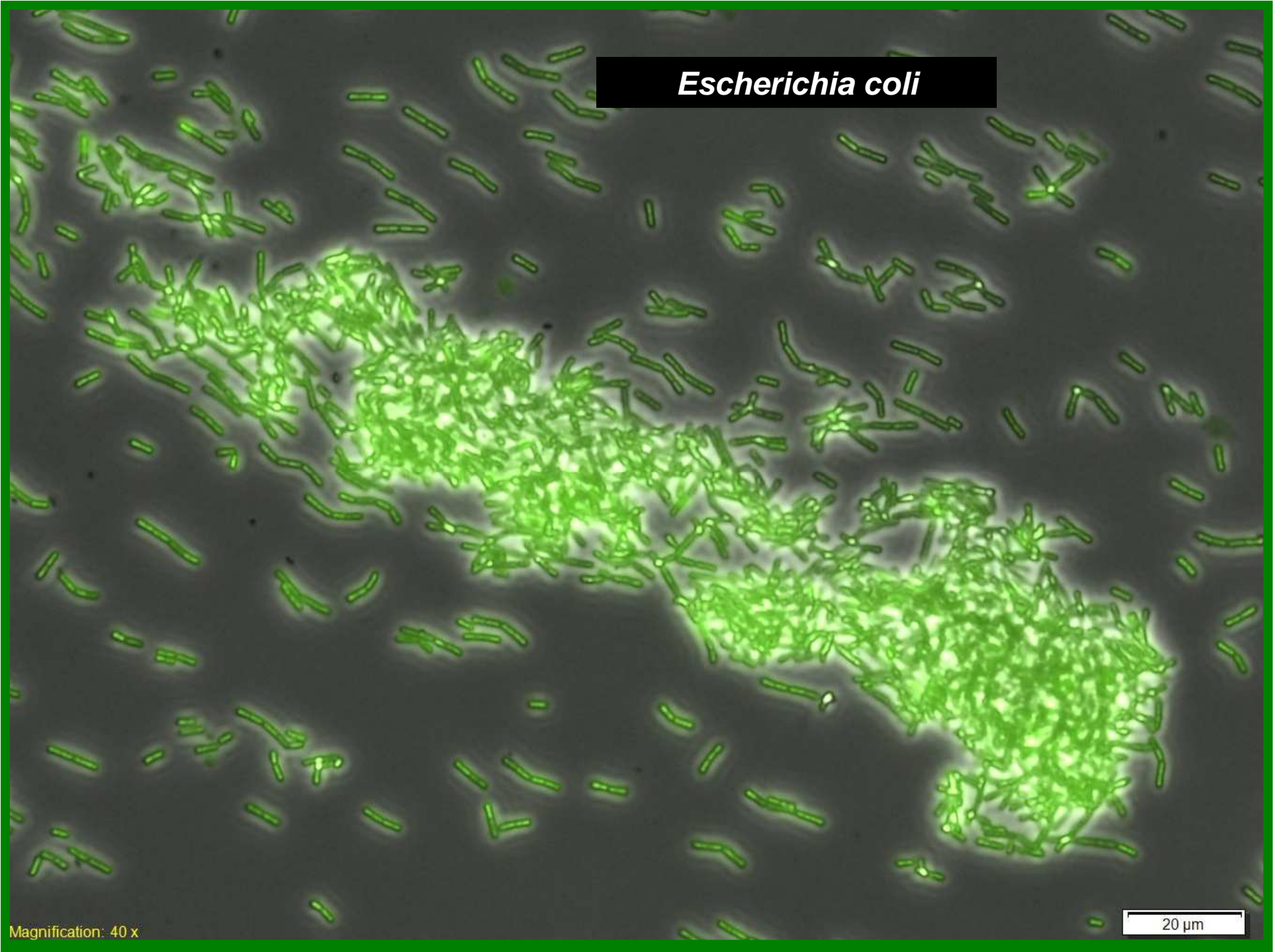
Pichia pastoris



Magnification: 20 x

50 μ m

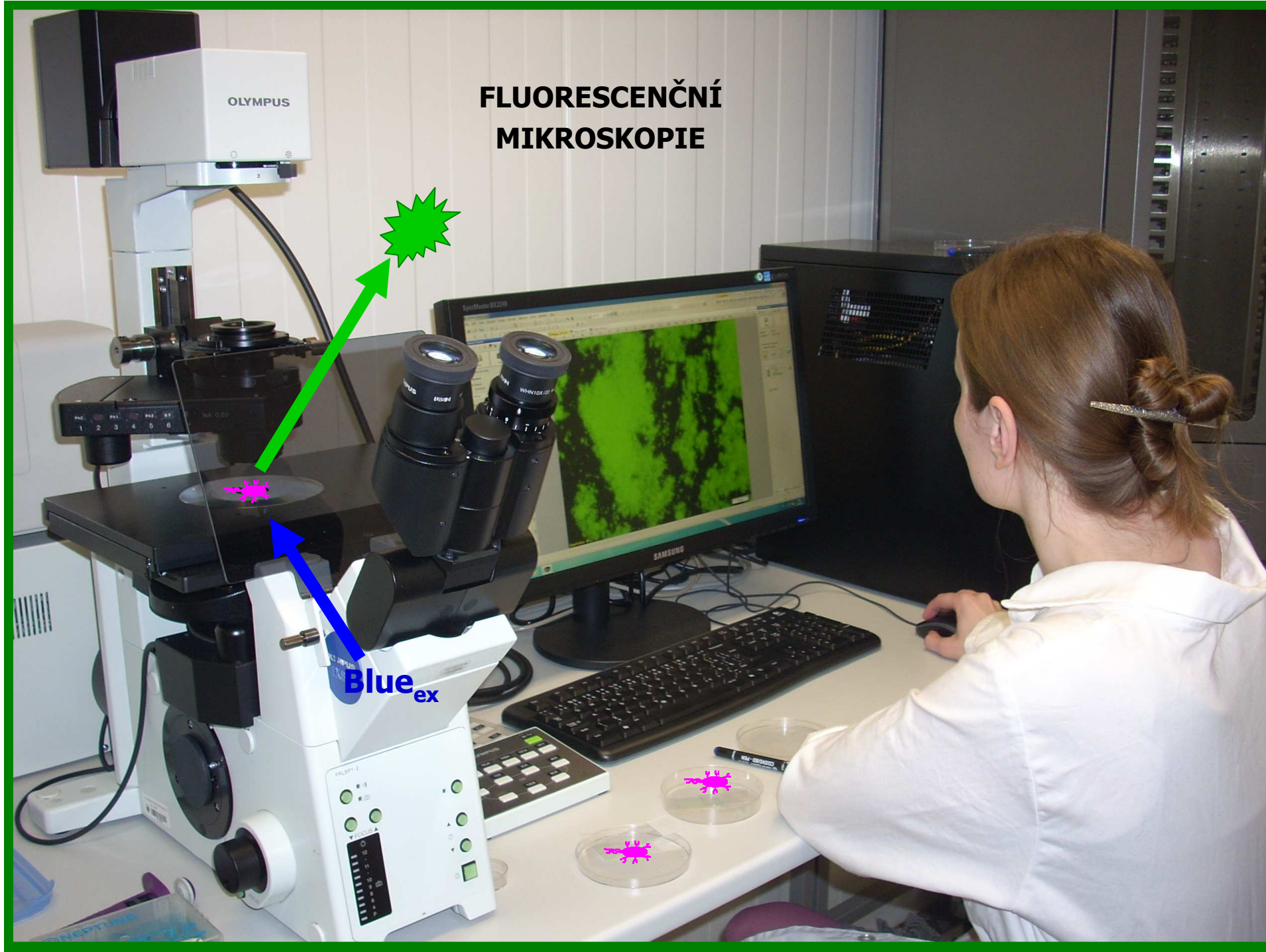
Escherichia coli



Magnification: 40 x

20 μ m

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE





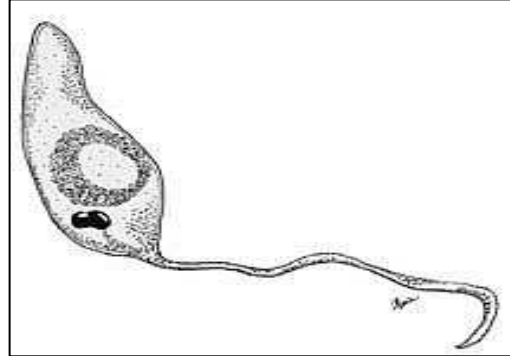
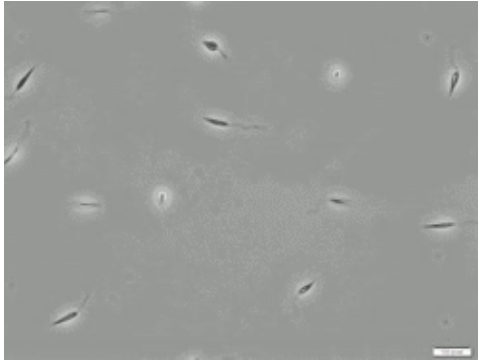
Summary Screen		New Brunswick		Fermentation Mode		
BioFlo 115		28 Nov 2012 09:40				
LoopName	PV	Setpoint	Out%	Mode	Units	Comp.
Agit	300	300	27.7	Auto	RPM	None
Temp	29.9	30.0	16.3	Auto	DegC	None
pH	2.61	5.00	0.0	Off	pH	None
DO	59.2	60.0	-100.0	Off	%DO	None
Air (1)	0.0	0.0	0.0	Off	%	None
O2 (2)	0.0	0.0	0.0	Off	%	None

Summary Calibration Cascade Pumps Setup

BioFlo®/CelliGen® 115
FERMENTOR/BIOREACTOR

Kultivace ve fermentoru

Leishmania tarentolae



- prvok
- + posttranslační **modifikace podobné lidským**
- + růst do vysokých buněčných hustot
- drahá kultivační média
- **zvýšená náročnost** na transfekci
- vyšší časová náročnost



*Leishmania
tarentolae*

http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1838_eukaryotic_expression_system_lexsy.html

The *Leishmania* expression system LEXSY is the proprietary eukaryotic protein expression platform by Jena Bioscience. LEXSY is based on the protozoan host *Leishmania tarentolae* and was designed to combine eukaryotic protein synthesis and modification with simplicity and ease of handling.

http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1838_eukaryotic_expression_system_lexsy.html

LEXSY Brochure:

Overcoming limitations of other expression systems

Prokaryotic expression systems such as *E. coli* lack essential components for protein folding and modification and are therefore, in most cases not suitable for production of functional proteins of higher organisms. Alternative eukaryotic expression systems based on e.g. mammalian or insect cells however, require long development cycles and deliver low

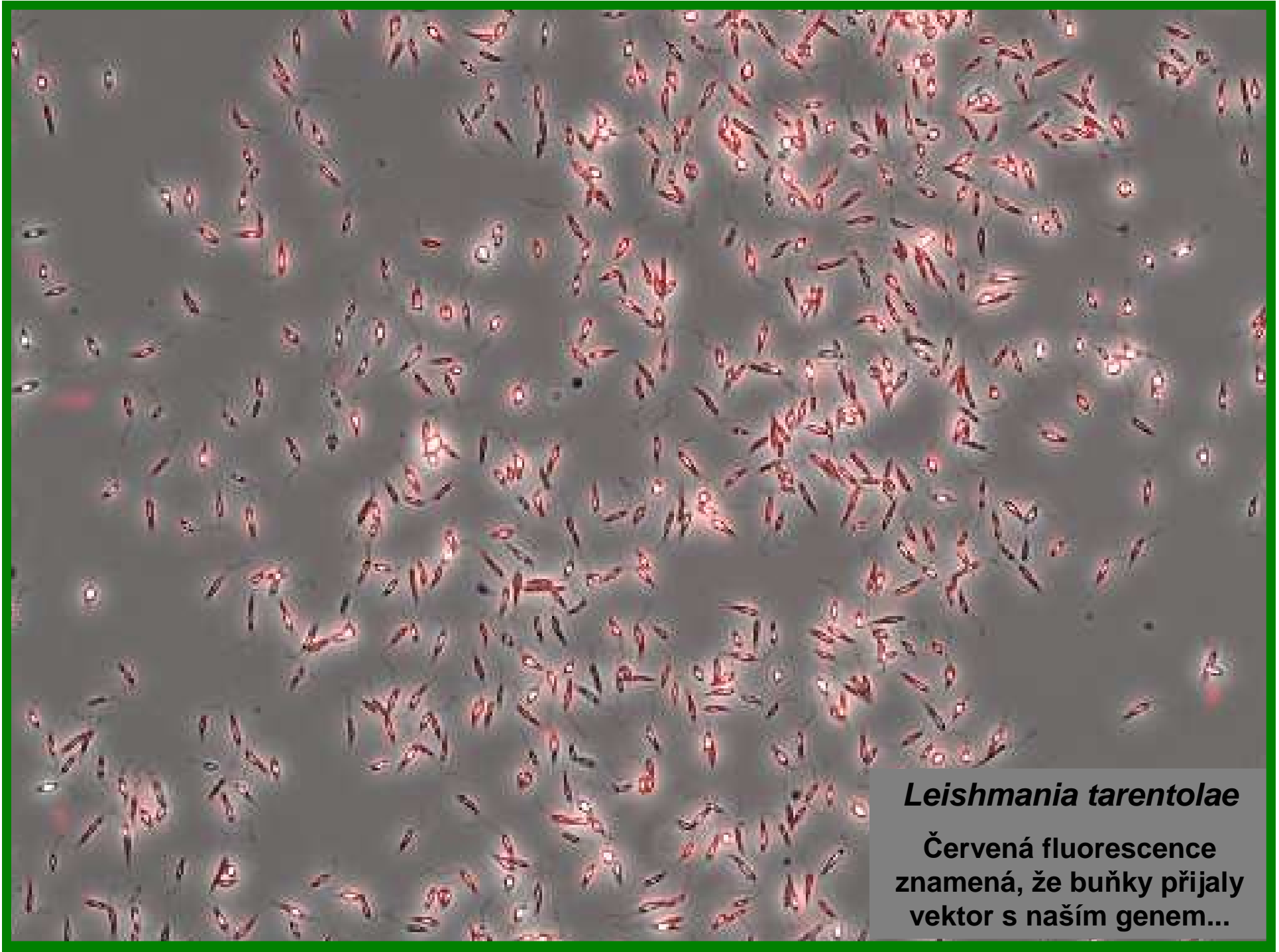
protein yields resulting in costs that are magnitudes above those of *E. coli*-produced proteins.

Hence, LEXSY was developed in order to make use of its eukaryotic protein synthesis and folding/modification machinery and its simplicity and ease of handling.

PROTEIN SYNTHESIS AND FOLDING/MODIFICATION MACHINERY

LEXSY FEATURES:

- Eukaryotic protein synthesis for correct folding (no inclusion bodies)
- Full range of Post-Translational Modifications including mammalian-type N-glycosylation, glypiation, phosphorylation, acetylation, prenylation, myristoylation, ADP-ribosylation, proteolytic processing and oligomerisation
- High expression-success rates with yields of up to 500 mg per litre of culture (Figure 2)



Leishmania tarentolae

Červená fluorescence
znamená, že buňky přijaly
vektor s naším genem...



Leishmania tarentolae

Červená fluorescence
znamená, že buňky přijaly
vektor s naším genem...

Leishmania tarentolae

Tyto buňky jsou transformované vektorem a navíc pěkně živé. Než stihnete ukončit fluorescenční focení, utečou...Super 😊



LEXY
Eukaryotic Protein Expression
with *Leishmania tarentolae*

- Overview -



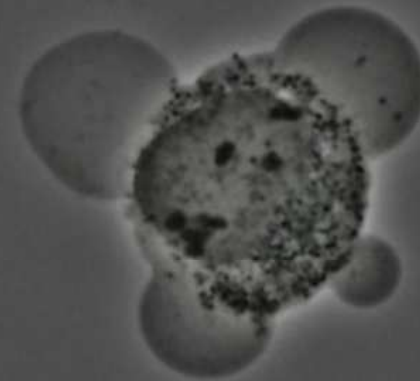
Spolehlivý maskot
je nezbytný...



HEK 293

(Human Embryonic Kidney 293 cells)

Tahle není zrovna v nejlepší kondici...



Magnification: 40 x

20 μ m

HEK 293

Jsou mnohem citlivější a náročnější na manipulaci než kvasinkové nebo bakteriální buňky.

Magnification: 40 x

20 μ m