

**Optimierung von Fermentationsprozessen zur Herstellung
rekombinanter, spezifisch und unspezifisch isotopenmarkierter
G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in *Escherichia coli***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Diplom-Ingenieur Christian Berger

geb. am: 05.04.1981 in: Schönebeck/Elbe

Gutachter:

Prof. Dr. Daniel Huster

PD Dr. Hauke Lilie

PD Dr. Klaus Gawrisch

Halle/Saale, den 09.02.2010

*„Meiner Freundin, meiner Familie,
meinen Freunden, meinen Kollegen.“*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	THEMATISCHE GRUNDLAGEN.....	6
2.1	G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN.....	6
2.1.1	<i>Die gemeinsame Identität aller GPCRs.....</i>	6
2.1.2	<i>Klassifizierungssysteme für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....</i>	8
2.1.3	<i>Die Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren - die Entwicklung des Ternary Complex-Modells.....</i>	11
2.2	DARSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN.....	15
2.2.1	<i>Der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2.....</i>	15
2.2.2	<i>Der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2.....</i>	18
2.3	MÖGLICHKEITEN ZUR UNTERSUCHUNG DER DREIDIMENSIONALEN STRUKTUREN VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN.....	22
2.3.1	<i>Die Röntgenstrukturanalyse und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....</i>	23
2.3.2	<i>Die NMR-Spektroskopie und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....</i>	25
3	MATERIALIEN UND METHODISCHE GRUNDLAGEN.....	30
3.1	MATERIALIEN UND METHODISCHE GRUNDLAGEN CANNABINOID-REZEPTOR TYP 2.....	30
3.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	30
3.1.2	<i>Materialien und Kits.....</i>	31
3.1.3	<i>Geräte.....</i>	32
3.1.4	<i>Expressionsplasmid.....</i>	32
3.1.5	<i>Expressionsstamm.....</i>	32
3.1.6	<i>Lösungen.....</i>	33
3.1.7	<i>Methoden.....</i>	37
3.2	MATERIALIEN UND METHODISCHE GRUNDLAGEN NEUROPEPTID Y-REZEPTOR TYP 2.....	45
3.2.1	<i>Chemikalien.....</i>	45
3.2.2	<i>Materialien und Kits.....</i>	46
3.2.3	<i>Geräte.....</i>	46
3.2.4	<i>Expressionsplasmid.....</i>	47
3.2.5	<i>Expressionsstamm.....</i>	48
3.2.6	<i>Lösungen.....</i>	48
3.2.7	<i>Methoden.....</i>	53
4	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE.....	66
4.1	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE CANNABINOID-REZEPTOR TYP 2.....	66
4.1.1	<i>Adaption des Expressionssystems an unterschiedliche Medientypen.....</i>	66
4.1.2	<i>Analyse der biomassespezifischen CB2R-Ausbeute in Abhängigkeit vom Medientyp.....</i>	69
4.1.3	<i>Analyse der biomassespezifischen CB2R-Ausbeute in Abhängigkeit von der optischen Dichte bei Induktion.....</i>	71
4.1.4	<i>Einfluss der Temperatur nach Induktion auf die Ausbeuten und die Funktionalität der exprimierten CB2-Rezeptoren.....</i>	74
4.1.5	<i>Untersuchung der zeitabhängigen Expression anhand der Konzentration und Funktionalität des Cannabinoid-Rezeptor Typ 2.....</i>	75
4.1.6	<i>Maximierung der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2-Ausbeuten zur spezifischen Isotopenmarkierung mit ¹⁵N-¹⁵N-Tryptophan.....</i>	79
4.1.7	<i>Mathematische Beschreibung des Fermentationsprozesses zur aminosäurespezifischen Isotopenmarkierung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2.....</i>	84
4.2	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE NEUROPEPTID Y-REZEPTOR TYP 2.....	88
4.2.1	<i>Adaption des Expressionssystems an unterschiedliche Medientypen.....</i>	88
4.2.2	<i>Optimierung der Mineralsalzmedienzusammensetzung für eine optimale Biomasseausbeute von Rosetta R3-phY2.....</i>	88
4.2.3	<i>Bestimmung der Parameter zur Erstellung eines Open Loop Feed-Profiles.....</i>	90
4.2.4	<i>Bestimmung der Y2-Rezeptor-Ausbeute exprimiert auf der Basis von LB-Komplexmedium.....</i>	91
4.2.5	<i>Bestimmung der zeitabhängigen NPY2R-Ausbeute exprimiert auf der Basis von Mineralsalzmedien.....</i>	92
4.2.6	<i>Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression des NPY2R in Rosetta R3.....</i>	95

Inhaltsverzeichnis

4.2.7	<i>Einfluss der Induktorkonzentration auf die Y2-Rezeptor-Expression</i>	97
4.2.8	<i>Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes nach Induktion auf den NPY2R-Gehalt in Rosetta R3</i>	99
4.2.9	<i>Ermittlung der optimalen Feedingstrategie zur Maximierung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Y2-Rezeptor-Ausbeuten in Rosetta R3</i>	101
4.2.10	<i>Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Fermentationsführung auf Biomasse- und Produktbildung</i>	103
4.2.11	<i>Mathematische Beschreibung der Fermentationsprozesse zur Untersuchung der prozessparameterabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2</i>	106
5	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	108
5.1	BEWERTUNG DER EXPRESSIONSSTRATEGIEN	109
5.1.1	<i>Bewertung der Prozessführungsstrategien</i>	109
5.1.2	<i>Bewertung der Einflüsse der genutzten Kohlenstoffquelle auf die Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 und Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2</i>	112
5.2	BEWERTUNG DER EXPRESSIONSAUSBEUTEN DER PRODUZIERTEN G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	115
5.3	MINIMIERUNG DER KOSTEN FÜR DAS EINZUSETZENDE SUBSTRAT ZUR PRODUKTION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2	117
5.4	ÜBERTRAGBARKEIT DER EXPRESSIONSMETHODIK AUF ANDERE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN	120
5.5	ZUSAMMENFASSUNG	120
6	REFERENZEN	122
7	ANHANG	131

ERKLÄRUNGEN ZUR FORMATIERUNG

Die in dieser Arbeit verwendeten englischen Fachbegriffe und lateinischen Namen wurden kursiv dargestellt. Zitate aus Büchern und wissenschaftlichen Publikationen in Zeitschriften wurden mit Ziffern gekennzeichnet und in einer Referenzliste zusammengefasst. Quellen, die sich auf das Internet beziehen, wurden fortlaufend als Fußnoten im Text ausgewiesen. Dezimaltrennzeichen wurden mit einem Punkt dargestellt.

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMSM	Aminosäure-Mineralmedium
AP	Adaptionsphase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASG	Aminosäuregruppe
AU	<i>Absorbance Units</i>
β ₂ AR	β ₂ -Adrenerger Rezeptor
BFM	Biofeuchtmasse
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney 21</i> Zelllinie
BL21-130	mit dem Plasmid pAY130 transformierter <i>Escherichia coli</i> -Stamm BL21(DE3)
Bq	Becquerel, SI-konforme Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes (1 Bq $\hat{=}$ 1 s ⁻¹ $\hat{=}$ 2.7*10 ⁻¹¹ Ci)
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BTM	Biotrockenmasse(-konzentration)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB2R	Cannabinoid-Rezeptor Typ 2
Ci	Curie, nicht SI-konforme Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes (1 Ci $\hat{=}$ 3.7*10 ¹⁰ Bq)
Chl	Chloramphenicol
CMC	kritische Mizellkonzentration (<i>Critical Micell Concentration</i>)
CP55,940	2-[(1S,2R,5S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol
[³ H]-CP55,940	Tritiummarkiertes 2-[(1S,2R,5S)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol
C _{sp}	biomassespezifische Proteinkonzentration
cv	Säulenvolumen (<i>Column Volume</i>)
C _{volsp}	kulturvolumenspezifische Konzentration
dA	diese Arbeit
DAB	Diaminobenzidin
DCU	<i>Digital Control Unit</i>
DM	<i>Dodecyl Maltoside</i>
DPM	<i>Disintegrations per Minute</i> (Zerfälle pro Minute), (1 Bq $\hat{=}$ 60 DPM)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Gα _i	α _i -Untereinheit des inhibierenden heterotrimeren G-Proteins ¹
Gα _s	Adenylatcyclase stimulierendes Gα-Protein
Gβ ₁ γ ₂	Komplex der β ₁ - und γ ₂ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins ¹
GCRDb	<i>G Protein-Coupled Receptor Database</i>
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GlcS	Glucosestammlösung
GlyS	Glycerinstammlösung
GPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
G-Protein	heterotrimeres Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
GPS	<i>GPCR Proteolytic Domain</i> ²
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
[³⁵ S]-γ-GTP	mit synthetischem Radioisotop [³⁵ S]-markiertes Guanosin-5'(-γ-Thio)-triphosphat
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i> Zelllinie
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidase CA1 aus dem Meerrettich)
IB	<i>Inclusion Body</i>
IL	Intrazellulärer <i>Loop</i>
Kan	Kanamycinsulfat
k _D	Dissoziationskonstante
KM	Komplexmedium
LB	<i>Lysogeny Broth</i> ³
LC-MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> (Hochleistungs-Triplequadrupol-Massenspektrometer mit HPLC gekoppelt)

Abkürzungsverzeichnis

LMBB	<i>Laboratory of Membrane Biochemistry and Biophysics</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MCH	<i>Melanin Concentrating Hormone</i>
MD	Messdaten
M _{DC}	<i>Precision Plus Protein[®] Dual Color Standard</i>
MECA	Melanocortin-, Endothelial Differentiation-, Cannabinoid-, Adenosin-Rezeptoren
MFCs	<i>MultiFermenter Control System</i>
M _{LW}	<i>Low Molecular Weight Marker</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MSM	Mineralsalzmedium
NaP	Natriumphosphatpuffer aus Dinatriumhydrogen- und Natriumdihydrogenphosphat
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
NK	Negativkontrolle
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>)
NP	Neuropeptid
NPY	Neuropeptid Y
NPY2R	Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
OD	Optische Dichte
OD _{ind}	Optische Dichte bei Induktion
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEI	Polyethylenimin
pI	isoelektrischer Punkt
PK	Positivkontrolle
PP	<i>Pancreatic Peptide</i>
ProtInhL	Proteaseinhibitorlösung
PTH	<i>Parathormone</i>
PTHrP	<i>Parathormone related Protein</i>
PYY	Peptid YY
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SEL	Spurenelementelösung
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21-Zelllinie
Sim	Simulationsergebnis
SK	Schüttelkolben
SL	Stammlösung
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	SOB + Glucose
SOG	Somatostatin-, Opioid- und Galanin-Rezeptoren
STE2/3	Genbezeichnungen der Hefepheromon-Rezeptoren (Pheromon α -Faktor-Rezeptoren)
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TGS	Tris-Glycin-SDS
TM	Transmembranhelix
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
Trp	Tryptophan
trxA	Thioredoxin A
Wnt	sequenzzomologe Glycoproteine, die Einfluss in der Embryonalentwicklung von Tieren zeigen (zusammengesetzt aus Wg - Wingless (<i>Drosophila</i>) und int-1 (Maus)) ⁴
YT	<i>Yeast Tryptone</i>
ZM241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)-[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)-phenol ⁵
ZSL	Zitronensäurestammlösung

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ZUSAMMENFASSUNG DER EVOLUTIONÄR BASIERTEN EINTEILUNG DER G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN NACH KOLAKOWSKI (1994)..... 9

TABELLE 2: ZUSAMMENFASSUNG DES KLASSIFIZIERUNGSSYSTEMS FÜR G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN VON HORN (2003)..... 9

TABELLE 3: ZUSAMMENFASSUNG DES GRAFS KLASSIFIZIERUNGSSYSTEMS FÜR G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN NACH SCHIÖTH UND FREDRIKSSON (2003/2004)..... 10

TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG GRUNDLEGENDER EIGENSCHAFTEN DES CANNABINOID-REZEPTORS TYP 2..... 16

TABELLE 5: ZUSAMMENFASSUNG GRUNDLEGENDER EIGENSCHAFTEN DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2..... 20

TABELLE 6: VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER EXPRESSIONSSYSTEME ZUR PRODUKTION VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN DURCH ERZIELTE KULTURVOLUMENSPEZIFISCHE PROTEINAUSBEUTEN..... 28

TABELLE 7: EINTEILUNG DER VERWENDETEN AMINOSÄURE-MINERALSALZMEDIEN ANHAND DER AMINOSÄUREKONZENTRATIONEN..... 35

TABELLE 8: ZUSAMMENFASSUNG DER ZUNAHME DER MAXIMALEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATEN VON BL21-130 IN JEDER ADAPTIONSPHASE FÜR DIE MEDIENTYPEN MSM-CB2 GLUCOSE, MSM-CB2 GLYCERIN UND M9..... 67

TABELLE 9: ZUSAMMENFASSUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER GEBILDETEN BIOMASSE VON BL21-130 VON DER MEDIENZUSAMMENSETZUNG IN MSM-CB2 UND M9 BEI EINER GLUCOSEKONZENTRATION VON 1 G/L..... 68

TABELLE 10: ZUSAMMENFASSUNG DER MAXIMALEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATEN DER 1. ADAPTIONSPHASE VON BL21-130 IN AMSM 1..... 69

TABELLE 11: ZUSAMMENFASSUNG DER ZUNAHME DER MAXIMALEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATEN VON ROSETTA R3-PHY2 IN JEDER ADAPTIONSPHASE FÜR UNTERSCHIEDLICHE MEDIENTYPEN..... 88

TABELLE 12: BESTIMMUNG DER AUSBEUTEKOEFFIZIENTEN BIOMASSE AUS SUBSTRAT Y_{XS} DES EXPRESSIONSSYSTEMS ROSETTA R3-PHY2 AUS GLUCOSE BZW. GLYCERIN IN MSM-Y2-OPT..... 91

TABELLE 13: ZUSAMMENFASSUNG DER GENUTZTEN RANDBEDINGUNGEN ZUR ERSTELLUNG DER *OPEN LOOP FEED*-PROFILE ZUR UNTERSUCHUNG DER ZEITABHÄNGIGEN PRODUKTBILDUNG DES EXPRESSIONSSYSTEMS ROSETTA R3-PHY2 IN ABHÄNGIGKEIT DER KOHLENSTOFFQUELLE..... 93

TABELLE 14: VERGLEICH DER ERHALTENEN BIOMASSE- UND PROTEINDATEN IN ABHÄNGIGKEIT DER INDUKTORKONZENTRATION FÜR ROSETTA R3-PHY2..... 98

TABELLE 15: ZUSAMMENFASSUNG DER ESSENTIELLEN DATEN ZUR BEURTEILUNG DER REPRODUZIERBARKEIT DER BATCH-FEDBATCH-FERMENTATIONEN ZUR EXPRESSION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2..... 104

TABELLE 16: ZUSAMMENFASSUNG DER ERREICHTEN BIOMASSESPEZIFISCHEN REZEPTORKONZENTRATIONEN FÜR DEN CB2- UND Y2-REZEPTOR UND GEGENÜBERSTELLUNG MIT ERREICHTEN WERTEN AUS DER LITERATUR FÜR DIE EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*..... 116

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DER ARBEITSMETHODIK ZUR OPTIMIERUNG BZW. MAXIMIERUNG DER AUSBEUTEN REKOMBINANT IN *ESCHERICHIA COLI* HERGESTELLTER G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN MIT DEM ZIEL EINER SPEZIFISCHEN BZW. UNSPEZIFISCHEN ISOTOPENMARKIERUNG DER PRIMÄRSEQUENZ. 5

ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DES ALLGEMEINEN AUFBAUS EINES G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTORS IN EINER MEMBRAN..... 6

ABBILDUNG 3: MECHANISTISCHE DARSTELLUNG DER SIGNALTRANSDUKTION VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN 11

ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER ENTWICKLUNG VON MODELLEN ZUR BESCHREIBUNG VON REZEPTOR-LIGAND-INTERAKTIONEN IN DREI STUFEN BIS ZUM *TWO STATE*-MODELL..... 13

ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES *TERNARY COMPLEX MODEL EVIDENCING R** ZUR BESCHREIBUNG DER LIGAND-REZEPTOR-G-PROTEIN-INTERAKTION FÜR G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN 15

ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE ZUORDNUNG DER PRIMÄRSEQUENZ DES CANNABINOID-REZEPTORS TYP 2 IN HYDROPHILE UND HYDROPHOBE, TRANSMEMBRANE BEREICHE UND ZUORDNUNG WEITERER BESTIMMTER CHARAKTERISTIKEN 17

ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IN HYDROPHOBE, TRANSMEMBRANE BEREICHE UND HYDROPHILE, INTRA- BZW. EXTRAZELLULÄRE *LOOP*-REGIONEN EINGETEILTEN PRIMÄRSEQUENZ DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2 MIT DER ZUORDNUNG WEITERER BISHER BESTIMMTER CHARAKTERISTIKEN 21

ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DER VIER BISHER BESTIMMTEN KRISTALLSTRUKTUREN VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN..... 22

ABBILDUNG 9: 5-PUNKT-KALIBRIERUNG ZUR BESTIMMUNG DES GLUCOSEGEHALTES IM FERMENTATIONSMEDIUM MIT DEM *ASSURE® 3 BLOOD GLUCOSE MONITORING SYSTEM* 40

ABBILDUNG 10: GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE DES SOLUBILISIERTEN NPY2R 59

ABBILDUNG 11: AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DES NPY2R AUS *INCLUSION BODIES* NACH DER UMPUFFERUNG MIT HILFE DER GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE..... 61

ABBILDUNG 12: UV-SPEKTRUM EINER CA. 95 BIS 98 % REINEN Y2-REZEPTOR-PROBE IM BEREICH VON 240 BIS 340 NM 63

ABBILDUNG 13: COOMASSIEFÄRBUNG UND *HIS-TAG*-SPEZIFISCHER WESTERN BLOT DER PROBEN DER REINIGUNGSSCHRITTE DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2 64

ABBILDUNG 14: NORMIERTE DARSTELLUNG DER WACHSTUMSKURVEN IN DEN ADAPTIONSPHASEN DES EXPRESSIONSSYSTEMS BL21-130 IN MSM-CB2 MIT 5 G/L GLUCOSE 66

ABBILDUNG 15: EXPRESSIONSTESTS IN MSM-CB2 AUF DER GRUNDLAGE UNTERSCHIEDLICHER KOHLENSTOFFQUELLEN..... 70

ABBILDUNG 16: WESTERN BLOT-ANALYSE DER EXPRESSIONSAUSBEUTEN DES CB2-REZEPTORS BEI DER INDUKTIONS-OD 1.0 FÜR MSM-CB2 IN ABHÄNGIGKEIT UNTERSCHIEDLICHER KOHLENSTOFFQUELLEN..... 71

ABBILDUNG 17: EXPRESSIONSTEST ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER OPTISCHEN DICHTEN BEI INDUKTION AUF DIE GEBILDETE BIOMASSESPEZIFISCHE CB2R-KONZENTRATION. 72

ABBILDUNG 18: ANALYSE DES BIOMASSESPEZIFISCHEN CB2R-GEHALTES IN ABHÄNGIGKEIT VON DER OPTISCHEN DICHTEN BEI INDUKTION MITTELS WESTERN BLOT 72

ABBILDUNG 19: ABHÄNGIGKEIT DES RELATIVEN BIOMASSESPEZIFISCHEN CB2R-GEHALTES VON DER OPTISCHEN DICHTEN BEI INDUKTION..... 73

ABBILDUNG 20: ANALYSE DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER EXPRIMIERTEN CB2-REZEPTOREN IN EINEM G-PROTEIN-AKTIVIERUNGSTEST 74

ABBILDUNG 21: ANALYSE DES EINFLUSSES DER TEMPERATUR AUF DIE CB2R-KONZENTRATION UND -FUNKTIONALITÄT IN MEMBRANFRAGMENTEN..... 75

ABBILDUNG 22: WACHSTUMSVERHALTEN WÄHREND DES EXPRESSIONSTESTS IN UNTERSCHIEDLICHEN MINERALSALZMEDIIEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ZEITABHÄNGIGEN PRODUKTION DES CANNABINOID-REZEPTOR TYP 2..... 76

ABBILDUNG 23: ZEITLICHER VERLAUF DER RELATIVEN CB2R-KONZENTRATION WÄHREND EINER 42-STÜNDIGEN EXPRESSIONSPHASE DES PRODUKTIONSSYSTEMS BL21-130 IN UNTERSCHIEDLICHEN MINIMALMEDIIEN..... 77

ABBILDUNG 24: ZEITLICHER VERLAUF DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER IN UNTERSCHIEDLICHEN MINERALSALZMEDIIEN EXPRIMIERTEN CANNABINOID-REZEPTOREN DES TYP 2 77

ABBILDUNG 25: LIGANDENBINDUNGSTEST AN AUSGEWÄHLTEN PROBEN DER UNTERSUCHUNG DER ZEITABHÄNGIGEN EXPRESSION IN UNTERSCHIEDLICHEN MINERALSALZMEDIIEN 78

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 26:	WACHSTUMSVERHALTEN VON BL21-130 IN EINER FERMENTATION MIT DEM MINIMAL-MEDIUM MSM-CB2 GLUCOSE, BEI DER ZUR INDUKTIONSZEIT 200 MG/L L-TRYPTOPHAN ZUGESETZT WURDE	80
ABBILDUNG 27:	ANALYSE DES GESAMTPROTEINSPEZIFISCH NORMIERTEN CB2R-GEHALTES IN MEMBRANFRAGMENTEN AUS ÄQUIVALENTEN FERMENTATIONEN IN MSM-CB2 GLUCOSE MIT UND OHNE ZUGABE VON 200 MG/L L-TRYPTOPHAN ZUR INDUKTIONSZEIT	81
ABBILDUNG 28:	ANALYSE DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER EXPRIMIERTEN CANNABINOID-REZEPTOREN DES TYP 2 IM ZEITLICHEN VERLAUF VON FERMENTATIONEN IN MSM-CB2 GLUCOSE MIT UND OHNE ZUGABE VON 200 MG/L L-TRYPTOPHAN ZUR INDUKTIONSZEIT	81
ABBILDUNG 29:	WACHSTUMSVERHALTEN UND GLUCOSEVERBRAUCH DES SYSTEMS BL21-130 IN EINER FERMENTATION AUF DER GRUNDLAGE DES MEDIUMS MSM-CB2, DEM 2 STUNDEN VOR INDUKTION 225 MG/L ¹⁵ N- ¹⁵ N-TRYPTOPHAN ZUGESETZT WURDE	83
ABBILDUNG 30:	VERLAUF DER RELATIVEN PROTEINKONZENTRATION UND DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER EXPRIMIERTEN ZIELPROTEINE IN DER FERMENTATION ZUR SPEZIFISCHEN ISOTOPENMARKIERUNG DES CANNABINOID-REZEPTORS TYP 2 NUR AN DEN ENTHALTENEN TRYPTOPHANEN	83
ABBILDUNG 31:	KORRELATION DER OPTISCHEN DICHTEN BEI 600 NM ZUR BIOTROCKENMASSEKONZENTRATION DES EXPRESSIONSSYSTEMS BL21-130 IN ABHÄNGIGKEIT DER TEMPERATUR	85
ABBILDUNG 32:	VERGLEICH DER MESSDATEN MIT DEM MATHEMATISCH ERFASTEN VERLAUF DER DATEN FÜR BIOMASSE, GLUCOSE UND PRODUKT FÜR DAS EXPRESSIONSSYSTEM BL21-130 IN DER FERMENTATION ZUR HERSTELLUNG EINES SPEZIFISCH ¹⁵ N ₂ -TRYPTOPHAN ISOTOPENMARKIERTEN CANNABINOID-REZEPTORS TYP 2	87
ABBILDUNG 33:	VERGLEICH DER ERREICHTEN OPTISCHEN DICHTEN DES SYSTEMS ROSETTA R3-PHY2 IN DEN MEDIENTYPEN MSM-Y2 UND MSM-Y2-OPT (GLUCOSE)	89
ABBILDUNG 34:	BESTIMMUNG DES KORRELATIONSFAKTORS KF FÜR DEN ZUSAMMENHANG DER OPTISCHEN DICHTEN BEI 600 NM UND DER IM MEDIUM ENTHALTENEN BIOTROCKENMASSEKONZENTRATION FÜR DAS SYSTEM ROSETTA R3-PHY2	90
ABBILDUNG 35:	WACHSTUMSVERHALTEN DES EXPRESSIONSSYSTEMS ROSETTA R3-PHY2 IN LB-KOMPLEXMEDIUM MIT INDUKTION BEI EINER OPTISCHEN DICHTEN VON 60	91
ABBILDUNG 36:	ABHÄNGIGKEIT DER MAXIMALEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE VON DER INKUBATIONSTEMPERATUR FÜR DAS EXPRESSIONSSYSTEM ROSETTA R3-PHY2 IN MSM-Y2-OPT MIT DER KOHLENSTOFFQUELLE GLYCERIN	92
ABBILDUNG 37:	VERLAUF DER DATEN DER OPTISCHEN DICHTEN (600 NM) UND DER BERECHNETEN FEEDPROFILE FÜR DAS EXPRESSIONSSYSTEM ROSETTA R3-PHY2 WÄHREND DER FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ZEITABHÄNGIGEN EXPRESSION DES NPY2R AUF DER BASIS DER KOHLENSTOFFQUELLEN GLUCOSE UND GLYCERIN	94
ABBILDUNG 38:	VERLAUF DER BIOMASSE- UND KULTURVOLUMENSPEZIFISCHEN NEUROPEPTID Y-REZEPTOR TYP 2-KONZENTRATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT DER INKUBATIONSZEIT NACH INDUKTION UND DER GEWÄHLTEN KOHLENSTOFFQUELLE	94
ABBILDUNG 39:	DARSTELLUNG DER GESETZTEN PROFILE FÜR TEMPERATUR UND FEED ZUR UNTERSUCHUNG DER TEMPERATURABHÄNGIGEN EXPRESSION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2 IN ROSETTA R3	96
ABBILDUNG 40:	VERLÄUFE DER DATEN DER GEMESSENEN OPTISCHEN DICHTEN IN ALLEN FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER TEMPERATURABHÄNGIGEN EXPRESSION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2	96
ABBILDUNG 41:	ABHÄNGIGKEIT DER EXPRESSION DES NPY2R VON DER TEMPERATUR NACH INDUKTION	97
ABBILDUNG 42:	WACHSTUMSVERHALTEN VON ROSETTA R3 IN FERMENTATIONEN ZUM NACHWEIS DES EINFLUSSES DER INDUKTORKONZENTRATION AUF DIE BIOMASSE- UND KULTURVOLUMENSPEZIFISCHE Y2-REZEPTOR-AUSBEUTE	98
ABBILDUNG 43:	DARSTELLUNG DER VORGEgebenEN PROFILE FÜR pH-WERT UND FEEDZULAUF IN DEN FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER pH-WERT-ABHÄNGIGKEIT DER NEUROPEPTID Y-REZEPTOR TYP 2-EXPRESSION IN ROSETTA R3-PHY2	99
ABBILDUNG 44:	VERLAUF DER GEMESSENEN OPTISCHEN DICHTEN BEI 600 NM DER FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER pH-WERT-ABHÄNGIGEN EXPRESSION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2 DURCH DAS ZELLSYSTEM ROSETTA R3-PHY2	100
ABBILDUNG 45:	ZUSAMMENFASSUNG DER ERMITTELTEN BIOMASSE- UND KULTURVOLUMENSPEZIFISCHEN AUSBEUTEN DES NPY2R IN ABHÄNGIGKEIT DES pH-WERTES NACH INDUKTION	100
ABBILDUNG 46:	DARSTELLUNG DER BERECHNETEN FEEDPROFILE ZUR UNTERSUCHUNG DER Y2-REZEPTOR-PRODUKTION IN ABHÄNGIGKEIT DER GESETZTEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE NACH INDUKTION	101

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 47: ZUSAMMENFASSUNG DER GEMESSENEN OPTISCHEN DICHTEN IN ALLEN FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATZULAUFABHÄNGIGEN EXPRESSION DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2 IN ROSETTA R3	102
ABBILDUNG 48: ABHÄNGIGKEIT DER BIOMASSE- UND KULTURVOLUMENSPEZIFISCHEN NPY2R-AUSBEUTEN VON DER GESETZTEN SPEZIFISCHEN WACHSTUMSRATE NACH INDUKTION	102
ABBILDUNG 49: DARSTELLUNG DER REPRODUZIERBARKEIT DER DATEN DER OPTISCHEN DICHTEN VON ZWEI FERMENTATIONEN	103
ABBILDUNG 50: VERANSCHAULICHUNG DER REPRODUZIERBARKEIT DER FERMENTATIONSFÜHRUNG ANHAND DER VERBRAUCHTEN BASE ALLER DURCHFÜHRTEN FERMENTATIONEN ZUR MAXIMIERUNG DES NPY2R-GEHALTES IN ROSETTA R3	104
ABBILDUNG 51: DARSTELLUNG DER REDUKTION DER AUF DEN MITTELWERT BEZOGENEN RELATIVEN ABWEICHUNGEN DER OPTISCHEN DICHTEN AM BATCHENDE UND 30 MINUTEN VOR INDUKTION ALLER DURCHFÜHRTEN FERMENTATIONEN ZUR MAXIMIERUNG DES NPY2R-GEHALTES IN ROSETTA R3	105
ABBILDUNG 52: DARSTELLUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE FERMENTATIONEN ZUR UNTERSUCHUNG DER TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER NEUROPEPTID Y-REZEPTOR TYP 2-EXPRESSION	107
ABBILDUNG 53: DARSTELLUNG DES SIMULATIONSERGEBNISSES FÜR EINE FERMENTATIONEN ZUR STEIGERUNG DES KULTURVOLUMENSPEZIFISCHEN NPY2R-GEHALTES	117
ABBILDUNG 54: DARSTELLUNG DES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN DER KULTURVOLUMENSPEZIFISCH EINGESetzten GLYCERINMENGE UND DER DARAUS PRODUZIERTEN MENGEN DES NEUROPEPTID Y-REZEPTORS TYP 2	118

1 Einleitung

Die Forschung an Proteinen und Proteinstrukturen gewinnt stetig an Bedeutung, da der fortschreitenden Ausbildung von Zivilisationskrankheiten häufig eine Verbindung zu diesen Molekülen nachgewiesen werden kann. Durch eine Vielzahl von molekulargenetischen, molekularbiologischen, bioverfahrenstechnischen, biochemischen und biotechnologischen Techniken können fundamentale Entdeckungen und Entwicklungen auf diesem Gebiet gemacht werden. Ein Gegenstand der Proteinforschung und -analyse in den letzten Jahren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Das Interesse an diesen Proteinen, das sich in einem beinahe exponentiellen Wachstum der Anzahl an Publikationen äußert,⁶ gründet auf der Entdeckung und weit verbreiteten Ansicht, dass, vielfältig beziffert in der Literatur, 50 %^{7,8}, 60 %⁹ oder sogar 70 %¹⁰ aller verabreichten oder in der Entwicklung befindlichen Medikamente eine Wirkung auf diese große Proteinklasse besitzen, ohne dabei Kenntnis über die Mechanismen der Wirkung zu haben.

Seit der Entdeckung der strukturellen Anordnung der Primärsequenz von Rhodopsin in 7 α -helikale membrandurchspannende Domänen,¹¹⁻¹⁴ das strukturelle Charakteristikum von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren,¹⁵ am Anfang der 1980iger Jahre konnten ~ 800 ¹⁶ im humanen Genom codierte GPCRs identifiziert werden, von denen 108 *orphan* (der Ligand ist bisher nicht identifiziert) Rezeptoren sind.¹⁷ Weitere strukturelle Gemeinsamkeiten betreffen das Vorhandensein eines extrazellulären N- und eines intrazellulären C-Terminus, sowie die alternierende Verbindung der Transmembranhelices (TM) durch intra- und extrazelluläre *Loop*-Regionen.¹⁶ Während die Transmembrandomänen über alle GPCRs eine relativ große Homologie aufweisen, sind vor allem der N-Terminus, der C-Terminus und der intrazelluläre *Loop*, der TM5 und TM6 verbindet, nicht konserviert und unterscheiden sich daher stark zwischen unterschiedlichen Rezeptoren.¹⁶

Es existieren bis dato mehrere Kristallstrukturen von Rhodopsin in unterschiedlichen Konformationen.¹⁸⁻²¹ Diese wurden durch die besonderen biochemischen und strukturellen Eigenschaften und die hohe lokale Konzentration in natürlichen Geweben möglich.²² Dieser GPCR weist eine beträchtliche Stabilität auf, die auch unter Bedingungen, die andere GPCRs längst denaturieren lassen, die Funktionalität aufrecht erhält.¹⁶ Diese Besonderheiten stellen allerdings die Anwendung von Rhodopsin als Homologiemodell besonders für nicht rhodopsin-ähnliche GPCRs aber auch für die Rhodopsinähnlichen in Frage. Des Weiteren wurden für die drei bisher zusätzlich zum Rhodopsin kristallisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (β_1 -, β_2 -Adrenerger Rezeptor und A_{2A} -Adenosin-Rezeptor)^{5,23,24} im Vergleich zu diesem Rezeptor

verschiedene strukturelle Eigenschaften nachgewiesen. Aus diesem Grund, der bereits weit fortgeschrittenen Charakterisierung des Rhodopsins in funktionaler und auch struktureller Hinsicht und der Bezifferung der spezifischen Wirkung von mehr als 50 % der verabreichten Medikamente auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und dem damit verbundenen Hinweis auf eine Vielzahl von GPCR assoziierten Krankheiten ist eine umfassende Charakterisierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu einem herausragenden und bedeutungsvollen Ziel geworden. Die Assoziationen von GPCRs zu Krankheiten zeigen schwerwiegende Symptome und Verläufe. Beispiele aus der Literatur zeigen Verbindungen des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 zur Ausbildung von Adipositas,²⁵ des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 zu chronischen Entzündungserscheinungen, die sich in Leberfibrose, Osteoporose, Multiple Sklerose und weiteren äußern,²⁶ des β_1 -Adrenergen Rezeptors zur Regulation der Herz-tätigkeit,²⁴ oder des Chemokin-Rezeptors Typ 5 zur Bindung des HI-Virus (humanes Immundefizienz-Virus).²⁷ Die Charakterisierung dieser GPCRs ist allerdings aufgrund der geringen Gewebskonzentrationen und der besonderen Charakteristiken des Rhodopsins nicht mit für diesen Rezeptor entwickelten Protokollen durchführbar. Die Möglichkeiten der funktionalen und strukturellen Untersuchungen sind an eine rekombinante Expression gebunden. Es stehen mehrere potentielle pro- und eukaryontische Expressionssysteme zur Verfügung. Die Wahl des rekombinanten Produktionssystems kann jedoch nicht nur aufgrund der beabsichtigten Funktionalität der Rezeptoren getroffen werden. Die Festlegung muss sich ebenfalls an den zur Verfügung stehenden Methoden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und auch Dynamik von Proteinen orientieren. Grundsätzlich kann die Röntgenstrukturanalyse, die eine Kristallisation des Zielproteins erfordert, oder die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), die eine unspezifische bzw. spezifische Isotopenmarkierung der Aminosäuren der Rezeptoren erfordert, für dieses Ziel herangezogen werden. Für beide Methoden werden Mengen des Rezeptors von mehreren 100 mg benötigt.

Die Kristallisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist in der Regel mit Problemen behaftet. Eine Stabilisierung dieser Proteine ist mit dieser Methode unumgänglich. Die Methoden, die zur Stabilisation bzw. Kristallisation von bereits mit der Röntgenkristallographie untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (β_1 - und β_2 -Adrenergen Rezeptor bzw. A_{2A} -Adenosin-Rezeptor) führten, umfassten eine weitreichende Mutation.^{5,23,24} Das weitaus größte Problem bei der Kristallisation ist die Heterogenität der Konformationen, die durch eine hohe Flexibilität dieser Moleküle bedingt wird.¹⁶ Diese Flexibilität ist für die funktionelle Konformationsänderung von GPCRs unerlässlich.¹⁶ Eine weitere Schwierigkeit bei der Kristallisation entsteht durch eine strukturelle Heterogenität der Proben durch

posttranslationale Modifikationen (unterschiedliche Phosphorylierungen, Glycosylierungen, Palmytoylierungen), die zur erfolgreichen Kristallbildung durch Mutagenese oder enzymatische Abspaltungen entfernt werden müssen.¹⁶ Ungeachtet dieser starken Manipulationen könnten auch dem nativen Zustand nahe Konformationen gebildet werden, jedoch kann diese Methode nur starre Proteinmoleküle oder -teile abbilden²² und ist damit nicht befähigt, gerade die für die Liganden- und G-Protein-Bindung wichtigen hochflexiblen Regionen des Rezeptors zu identifizieren. Diese Stabilisierungsmaßnahmen sind für eine Untersuchung der dreidimensionalen Struktur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nicht erforderlich und zudem ermöglicht diese eine Charakterisierung in einer naturnahen Umgebung.²⁸ Die NMR-Spektroskopie macht vor allem die Bestimmung von dynamischen Aspekten der GPCR-Struktur und der Liganden- bzw. G-Protein-Bindung möglich,²² sodass, nicht unbedingt an die Bestimmung der Gesamtstruktur gebunden, Aminosäuren zur spezifischen Ligandenbindung oder Domänen, die eine konformationelle Änderung durchlaufen, zugeordnet werden können.²² Dies bedeutet dann eine Anwendbarkeit in der Medikamentenentwicklung oder die weitreichende Erweiterung des mechanistischen Verständnisses der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.²²

Die Anwendbarkeit dieser Methode und die Nutzbarkeit der großen Vorteile gegenüber der Röntgenstrukturanalyse ergeben sich jedoch erst nach einer Inkorporation von stabilen Isotopen (¹³C, ¹⁵N) in die Primärsequenz der Rezeptoren.²⁹ Bisher wurden keine entsprechenden Protokolle veröffentlicht, die einen effizienten (> 95 %) und vor allem kostenorientierten Einbau der Isotopen zulassen. Die Problematik der effizienten und kostenorientierten Isotopenmarkierung ergibt sich aus der in der Literatur häufigsten Anwendung von eukaryontischen Expressionssystemen, die in der Mehrheit die Nutzung komplexer oder stark aminosäurenangereicherter Medien zur Kultivierung fordern.³⁰ Die Zusammensetzungen bieten daher unterschiedliche, teilweise auch undefinierte Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, sodass die Effizienz einer Isotopenmarkierung sehr gering ausfällt oder mit hohen Kosten verbunden ist. Die Wahl dieser rekombinanten Systeme wird allerdings mehrheitlich auf der funktionalen Expression dieser Proteine begründet. Unter der Betrachtung der in der Literatur angestrebten Untersuchungen der strukturellen Anordnung mit Hilfe der Röntgenkristallographie, die eine starke Modifikation und eine Entfernung der in den genutzten Expressionssystemen produzierten und als Vorteil dargestellten posttranslationalen Modifikationen erfordert, ergibt sich eine nur geringe Effizienz dieser Anwendungen. Zusammen mit sehr geringen Rezeptorausbeuten von in der Regel unter 2.5 mg/L Medium,^{9,31-34} den hohen Anforderungen an Kultivierungsbedingungen und Sterilität, sowie langen Wachstumszeiten³⁰

ist die Wahl von eukaryontischen Expressionssystemen zur Herstellung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für eine Strukturanalyse nicht sinnvoll. In etwas abgeschwächterer Form treffen diese Behauptungen auch für die Nutzung von Hefen zu, jedoch wurden höhere Zielproteinkonzentrationen von 4 bis 12 mg funktionales Protein/L Medium erreicht.^{9,35,36} Bakterien weisen grundsätzlich bei allen genannten Gründen das Gegenteil aus und machen eine Anwendung der Isotopenmarkierung durch den Einsatz minimaler Medien³⁷ mit einer beträchtlichen Effizienz möglich. Zudem können prokaryontische Expressionssysteme, wenn trotz der Nachteile die Röntgenstrukturanalyse angewendet werden soll, eine homogene Zielproteinprobe herstellen, da posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glycosylierungen nicht bewerkstelligt werden können.¹⁶ Eine Ausbildung von Disulfidbrücken im zu produzierenden Rezeptor ist jedoch möglich, wenn eine Lokalisierung der Rezeptoren in der Bakterienmembran erreicht wird.³⁸

Aus diesen Gründen ist eine Verbindung des Expressionssystems *Escherichia coli* und der Messmethode der NMR-Spektroskopie die optimale Anordnung zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und der in der Liganden- und G-Protein-Bindung beteiligten Aminosäuren mit dem Ziel der Anwendbarkeit in der Medikamentenentwicklung und der Bestimmung der Domänen, die bei Aktivierung des Rezeptors einer Konformationsänderung unterliegen sind, zur Verbesserung des Verständnisses der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Daher sollen in dieser Arbeit die Möglichkeiten und die Essentialität einer optimalen Fermentationsstrategie zur Herstellung von humanen Proteinen, insbesondere von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, herausgestellt werden. Dabei wird das Augenmerk auf den Einfluss der Wahl des Expressionssystems und der Fermentationsbedingungen auf die Ermöglichung struktureller Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie gerichtet. In diesem Zusammenhang wurden zwei unterschiedliche Expressionsstrategien allerdings in einem Expressionssystem, *Escherichia coli* BL21 bzw. einem Derivat dieses Stammes, vergleichend angewendet (Abbildung 1). Dabei wurde die Expression eines aktiven G-Protein-gekoppelten Rezeptors, des humanen peripheren Cannabinoid-Rezeptors Typ 2, optimiert. Die zweite Expressionsstrategie der optimalen Produktion eines inaktiven GPCRs, des humanen Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2, eingelagert in intrazellulären Einschlusskörpern (*Inclusion Bodies*) und der Notwendigkeit der Rückfaltung in die aktive Form unterlegen, wurde gegenübergestellt. Im Vordergrund standen die maximalen Proteinausbeuten in der jeweilig angestrebten Form. Die Strategie der Rückfaltung des inaktiven GPCRs war nicht Bestandteil dieser Arbeit.

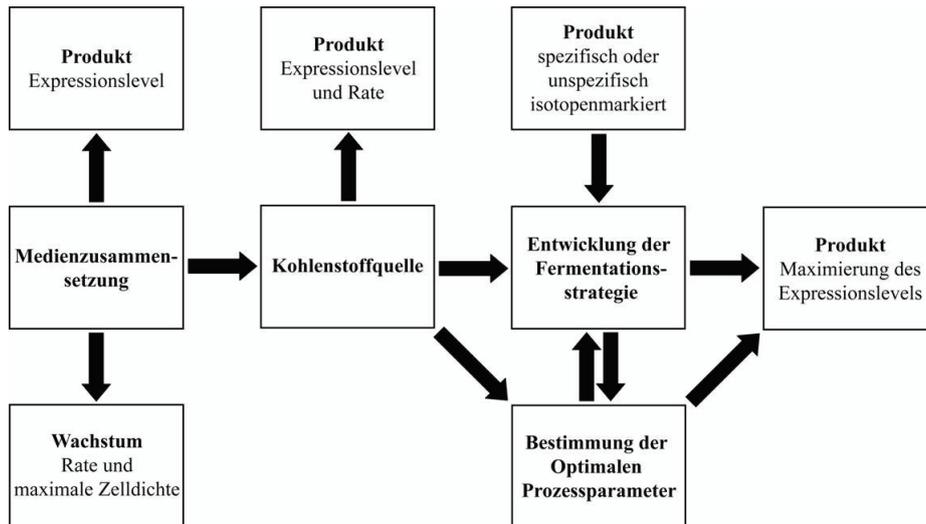


Abbildung 1: Darstellung der Arbeitsmethodik zur Optimierung bzw. Maximierung der Ausbeuten rekombinant in *Escherichia coli* hergestellter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit dem Ziel einer spezifischen bzw. unspezifischen Isopenmarkierung der Primärsequenz.

2 Thematische Grundlagen

2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

2.1.1 Die gemeinsame Identität aller GPCRs

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in jeder humanen Zelle lokalisiert sind⁹, stellen mit einer Anzahl von etwa 1000³⁹ bisher in Wirbeltieren identifizierten GPCRs die größte Klasse³⁹ membranständiger Zelloberflächenrezeptoren dar, die eine gemeinsame Grundstruktur und Wirkungsweise besitzen.⁴⁰

Die Grundstruktur von GPCRs ist aus einer einzelnen zusammenhängenden Polypeptidkette organisiert,⁴¹ die sieben transmembrane, stark hydrophobe Domänen ausbildet,⁴¹ die generell eine lokale Sekundärstruktur in Form von α -Helices darstellen.⁴⁰ Die sieben transmembranen Helices sind alternierend extra- und intrazellulär durch hydrophile *Loop*-Regionen verbunden.⁴² Weiterhin existiert bei beinahe allen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren klassifizierten Proteinen eine Verbindung der Transmembranhelix 3 zum zweiten extrazellulären *Loop* über eine Disulfidbrücke.⁴³

Das C-terminale Ende der Primärsequenz von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist auf der intrazellulären Membranseite lokalisiert⁴⁴ und kann unterschiedlich ausgebildet und modifiziert sein (A, B, C in Abbildung 2).

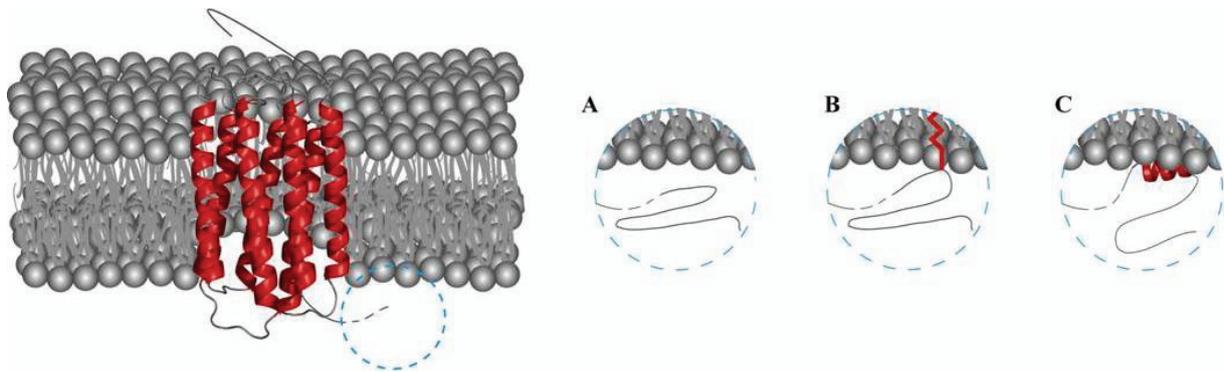


Abbildung 2: Darstellung des allgemeinen Aufbaus eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors in einer Membran (links). Diese weisen sieben transmembrane, hydrophobe α -Helices (rot) auf, die alternierend intra- und extrazellulär durch hydrophile *Loop*-Regionen (grau) verbunden sind. Das C-terminale Ende der Rezeptoren kann unmodifiziert (A) oder lipidmodifiziert (B) sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Ausbildung einer achten Helix (C), die mit der Membran unterschiedlich interagiert.

Die Modifikation äußert sich entweder in einem Nichtkontakt (A) bzw. Kontakt (B = Lipidmodifikation einer oder mehrerer Aminosäuren & C = Ausbildung einer achten Helix, die nur teilweise oder auch ganz in die Membran integriert ist, wobei auch eine Kombination aus B und C möglich ist) des C-Terminus mit den Lipiden der umgebenden Membran.

Die Ausbildung einer Lipidmodifikation von GPCRs am intrazellulären Peptidkettenende ist grundsätzlich auf eine Thioacylierung begrenzt. Diese bewirkt eine Thioesterbindung zwischen ein oder mehreren Cysteinen, meist zwischen der 10. und 14. Aminosäure nach der 7. Transmembranhelix lokalisiert, und Palmitinsäure, einer äußerst häufigen Fettsäure in tierischen und pflanzlichen Lebewesen.⁴⁵ Das Vorliegen einer achten α -Helix, die grundsätzlich kleiner ist als die transmembranen, wurde für unterschiedliche Rezeptoren beschrieben (zum Beispiel PAR1⁴⁶ (*Protease Activated Receptor Type 1*) und Rhodopsin¹⁹) und wird nach bisherigen Erkenntnissen nur den rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugewiesen.⁴⁷

Die Gemeinsamkeit aller GPCRs in ihrer Wirkungsweise besteht in der selektiven Bindung eines extrazellulären Liganden (mit Ausnahme von Rhodopsin, dessen Ligand kovalent gebunden ist und durch den extrazellulären Stimulus Licht die Konformation ändert) und der Weiterleitung des Signals über die Membran durch eine konformationelle Änderung der Rezeptoren zur selektiven Auslösung physiologischer Prozesse mit Hilfe eines intrazellulär gebundenen G-Proteins als Signalüberträger. Dabei können Kurzzeit- (Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration) und Langzeiteffekte (Auslösung von Gentranskription) generiert werden.⁴¹

Die funktionale Bedeutung des C-Terminus erstreckt sich von der essentiellen Bedeutung für die G-Protein-Bindung,^{46,47} über die Lokalisierung an der Membran⁴⁷ bis zur Aktivierbarkeit der Rezeptoren selbst.⁴⁷ Es wurde ebenfalls beschrieben, dass bei Verlust des C-Terminus auch eine erhöhte Bindungsfähigkeit von G-Proteinen bzw. eine erhöhte Basalaktivität generiert werden kann oder sogar eine Bindung von G-Proteinen möglich wird, die sonst keine oder nur geringe Affinität zum Rezeptor aufweisen.⁴⁴ Damit wird dem C-Terminus für bestimmte GPCRs eine regulatorische Funktion bei der selektiven Bindung eines bestimmten G-Proteins zugewiesen.

Das N-terminale Ende der Polypeptidkette befindet sich grundsätzlich auf der extrazellulären Seite⁴² der Membran und ist in vielen Fällen an der Ligandenbindung beteiligt.⁴⁸ Weiterhin wird den extrazellulären *Loop*-Regionen und auch den transmembranen Helices eine Beteiligung in der Ligandenbindung bei einer Vielzahl von GPCRs zugeschrieben.⁴⁴ Liganden, die eine Aktivierung des Rezeptors und damit eine zelluläre Antwort auslösen, werden als Agonisten bezeichnet.⁴⁹ Diese werden weiterhin nach ihrer Wirksamkeit kategorisiert, sodass ein Voll-Agonist die maximale Antwort und ein partieller Agonist eine submaximale Antwort unter definierten Bedingungen auslöst.⁴⁹ Diese Kategorien werden ebenfalls für inverse Agonisten definiert, die Liganden darstellen, die den gegenteiligen Effekt zum Agonisten aus-

lösen.⁴⁹ Ein Antagonist löst selbst keine Effekte aus, jedoch blockiert dieser die Wirkung von Agonisten und inversen Agonisten.⁴⁹ Die Ligandenbindung kann allerdings nicht weiter allgemein definiert werden, da diese für jeden GPCR verschieden ist. Die extrazellulären Stimuli, die eine Signaltransduktion bei GPCRs auslösen, sind äußerst verschieden und umfassen biogene Amine, Aminosäuren, Duftstoffe, Lipide, Ionen, Proteasen, Nukleotide, Peptide und Licht.⁹

2.1.2 Klassifizierungssysteme für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im Jahr 1975 wurde erstmals die „ungewöhnliche“ Struktur von Rhodopsin erkannt, ohne einen konkreten Vorschlag für die Struktur zu äußern. N. W. Downer und S. W. Englander vermuteten eine großflächige Interaktion der Primärsequenz von Rhodopsin mit Membranen.⁵⁰ Die Definition des G-Protein-gekoppelten Rezeptors bovines Rhodopsin als 7-transmembran-helikales Protein erfolgte durch P. A. Hargrave et al. in den Jahren 1982/1983 und J. Nathans et al. im Jahr 1983.¹¹⁻¹⁴ Daraufhin nahm die Anzahl der als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren definierten Primärsequenzen vor allem des menschlichen Genoms bedingt durch signifikante technische Entwicklungen zur Charakterisierung von GPCRs stark zu.¹³ Die großen Unterschiede der Primärsequenzen der bekannten GPCRs führte zu einer phylogenetisch basierten Klassifizierung (Homologien der charakteristischen Transmembranhelices) von 240 rhodopsinähnlichen Vertretern durch Attwood und Findlay (1993),^{13,51} die die Zusammenstellung später noch einmal auf 393 Vertreter aus unterschiedlichen Spezies erweiterten.¹³

Die in der Literatur bevorzugte Grundlage für die Klassifizierung, auf der Einteilung nach den Klassen A bis F und O basierend, wurde 1994 von L. F. Kolakowski Jr. definiert.^{13,52} Kolakowski entwickelte eine Datenbank speziell für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GCRDb), die eine Sammlung der unterschiedlichsten Eigenschaften und Experimente für die bekannten Rezeptoren, wie Genstrukturdaten, Chromosomenlokalisierung, Mutationsanalysen, spektroskopische Eigenschaften, Ligandenbindung, Signaltransduktionsuntersuchungen und Strukturanalyseergebnisse, vereinen und zur Verfügung stellen sollte. Die Einteilung der Klassen sollte nicht nur das Finden des gesuchten Proteins in der Datenbank erleichtern, sondern klassifizierte die 787 (1993) Eintragungen nach Sequenzhomologien und damit nach der phylogenetischen Verwandtschaft der Rezeptoren. Mit diesen Homologien wurde die in Tabelle 1 dargestellte Einteilung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vorgenommen.⁵²

Tabelle 1: Zusammenfassung der evolutionär basierten Einteilung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach Kolakowski (1994).⁵²

Familie	Familiename	Subkategorie	Vertreter
A	Rhodopsin/ β_2 -Adreno-Rezeptoren	1	Olfaktorische/Adenosin-Rezeptoren
		2	Biogene Amin-Rezeptoren
		3	NP-Rezeptoren/Photorezeptoren (Vertebraten)
		4	Photorezeptoren (Invertebraten)
		5	Parakrine/Autokrine Rezeptoren
		6	andere
B	Parathyroid Hormon-/Calcitonin-/Sekretin-Rezeptoren	1	Calcitonin-Rezeptoren und Ähnliche
		2	PTH-/PTHrP-Rezeptoren
		3	Sekretin-Rezeptoren und Ähnliche
C	Metabotropische Glutamat-Rezeptoren	-	Metabotropische Glutamat-Rezeptoren
D	Hefepheromon-Rezeptoren	1	STE2
		2	STE3
E	<i>D. discoideum</i> cAMP-Rezeptoren	-	cAMP-Rezeptoren
F	<i>H. halobium</i> Bacteriorhodopsin	-	Opsine der Archaeabakterien
O	<i>D. melanogaster</i> BOSS	-	Proteine mit 7 TM ohne G-Protein-Kopplung

Eine Weiterentwicklung auf der Basis des Klassifizierungssystems von Kolakowski wurde von Florence Horn et al. 2003 in einer neuen Datenbank (GPCRDB) zusammengefasst und stellte die gleichen Anforderungen an die Verfügbarkeit der oben genannten Daten für die Gesamtheit der Interessierten. Die Einteilung erfolgte in die Gruppen A bis F.⁵³

Tabelle 2: Zusammenfassung des Klassifizierungssystems für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von Horn (2003).⁵³

Familie	Familiename	Klassifizierungsgrundlage
A	Rhodopsinähnliche Rezeptoren	Bindung von Peptiden, biogenen Aminen und lipidähnlichen Substanzen
B	Sekretinähnliche Rezeptoren	Bindung von „großen“ Peptiden wie Sekretin, Glucagon, Calcitonin, ...
C	Metabotrope Glutamat-Rezeptoren	Bindung von Glutamat, die Aktivierung erfolgt über einen indirekten metabotropischen Prozess
D	Pheromon-Rezeptoren	Rezeptoren, die von Organismen zur chemischen Kommunikation genutzt werden
E	cAMP-Rezeptoren	cAMP-Rezeptoren von Schleimpilzen mit Funktionen in deren Signalsystem
F	<i>Frizzled-/Smoothened-</i> Rezeptoren	Bindung von Wnt und Beteiligung als Regulatoren in der embryonalen Tierentwicklung

Weiterhin wurde auf der Grundlage der entsprechenden Liganden und der Funktionen der GPCRs eine Einteilung in Sub- bzw. Sub-Subkategorien vorgenommen.⁵³

2004 erschien ein weiteres Klassifizierungssystem für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das in den Grundzügen ebenfalls denen von Kolakowski und Horn entsprach, jedoch eine Unterscheidung zwischen Sekretin- und Adhäsions-Rezeptoren vornahm, da diese aufgrund der cysteinhaltigen N-terminalen Domäne fälschlicherweise in einer Gruppe zusammengefasst

wurden.² Das GRAFS Klassifizierungssystem von Schiöth und Fredriksson führte auf der Grundlage phylogenetischer Studien der sieben transmembranen Helices der bis dato bekannten Sequenzen der humanen GPCRs den Beweis für die in Tabelle 3 dargestellte Einteilung.² Es erfolgte eine Unterteilung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Klassen Glutamat- (G), Rhodopsin- (R), Adhäsions- (A), *Frizzled-/Taste2-* (F) und Sekretin- (S) Rezeptoren mit weiteren 4 Subkategorien und insgesamt 13 Sub-Subkategorien der Rhodopsin-Rezeptoren nach streng phylogentischen Kriterien. Die 4 Subkategorien wurden mit α (unterteilt in Prostaglandin-, Amin-, Opsin-, Melatonin- und MECA-Rezeptoren),⁵⁴ β (nur bestimmte Peptid-bindende GPCRs),^{2,54} γ (unterteilt in SOG-, MCH- und Chemokin-Rezeptoren)⁵⁴ und δ (*MAS related-*, Geruchs-, Purin- und Glycoprotein-Rezeptoren)^{2,54} bezeichnet. Wenige bekannte Rezeptoren, die sich nicht mit diesem Klassifizierungssystem einordnen ließen, wurden in der Gruppe „*Other 7 TM Receptors*“ zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung des GRAFS Klassifizierungssystems für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nach Schiöth und Fredriksson (2003/2004).^{2,54}

Klan	Familie	Familiename	Anzahl humaner Vertreter	weitere Gemeinsamkeiten
A	R	Rhodopsin-Rezeptoren	701	Motiv NSxxNPxxY in TM7; DRY-Motiv D(E)-R-Y(F) am Übergang TM3 zu IL2; generell kurze N-Termini
B	S	Sekretin-Rezeptoren	15	lange N-Termini (60-80 AS) mit konservierten Disulfidbrücken; Bindung von großen parakrinen Peptidliganden, die mit dem N-Terminus interagieren
C	G	Glutamat-Rezeptoren	>15 (+ orphane und Pheromonrezeptoren)	Glutamat als Ligand; Ligandenbindungsdomäne im relativ langen N-Terminus, der zwei von einander abstehende „Flügel“ ausbildet (bezeichnet als Venusfliegenfalle)
-	A	Adhäsions-Rezeptoren	33	EGF- und GPS-Domänen im N-Terminus; lange N-Termini; ein hoher Anteil an Serinen und Threoninen, die als O- oder N-Glycosilierungsstellen fungieren und zu einer beinahe linearen von der Membran abstehenden Form des N-Terminus führen
-	F	<i>Frizzled-/Taste2-</i> Rezeptoren	>41	die N-Termini weisen ca. 200 AS mit konservierten Cysteinen auf, die in der Bindung von Wnt beteiligt sind, die evolutionäre Korrelation der <i>Frizzled-</i> und <i>Taste2-</i> Rezeptoren wurde allerdings bezweifelt
-	O	<i>Other 7 TM Receptors</i>	23	-

2.1.3 Die Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren - die Entwicklung des Ternary Complex-Modells^{55,56}

Die mechanistische Darstellung der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abbildung 3) beschreibt die Koexistenz eines extrazellulär lokalisierten Liganden mit dem membrandurchspannenden, inaktiven Rezeptor und führt durch die Bindung zur Aktivierung des GPCRs, was sich als Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur äußert, und ermöglicht damit die intrazelluläre Bindung eines ternären G-Protein-Komplexes, der als Signalüberträger für die zelluläre Antwort fungiert.

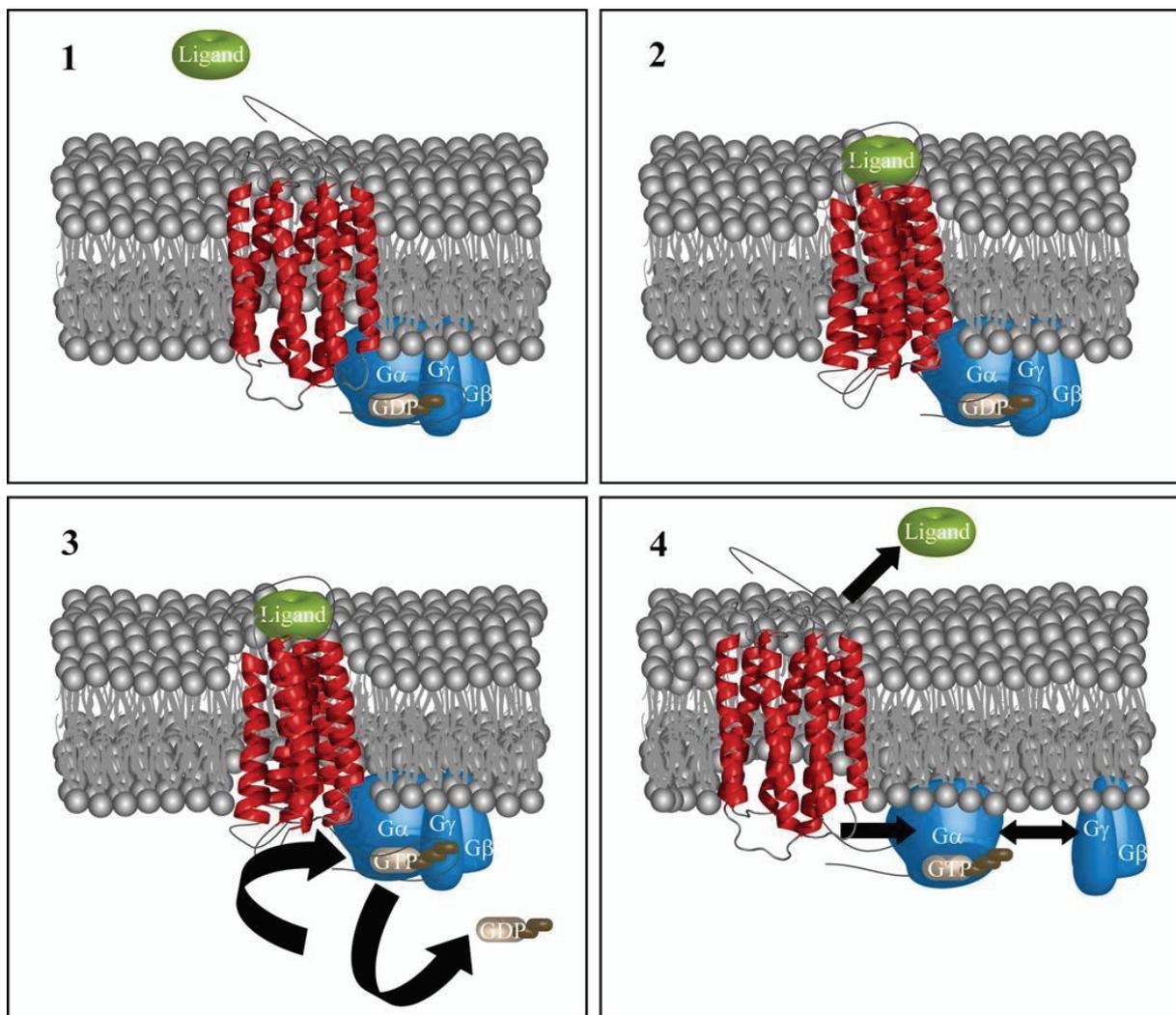


Abbildung 3: Mechanistische Darstellung der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Teil 1 beschreibt die Koexistenz von Ligand und Rezeptor bzw. die räumliche Nähe oder den bereits gebundenen Zustand vom G-Protein zum Rezeptor. Die Ligandenbindung (Teil 2) verursacht eine konformationelle Änderung des GPCRs und erhöht damit die Affinität des G-Protein-Komplexes (α -GDP- $\beta\gamma$) zum Rezeptor bzw. führt zur Aktivierung des G-Proteins durch den Austausch des α -gebundenen GDPs gegen GTP (Teil 3). Dies bewirkt die Dissoziation (Teil 4) des α -GTP- vom $\beta\gamma$ -Komplex und ebenfalls die Dissoziation der G-Protein-Komplexe vom Rezeptor. Die Komplexe interagieren mit unterschiedlichen Effektorproteinen, die eine zelluläre Antwort bewirken. Die Bindung von Ligand und Rezeptor kann auch aufrechterhalten werden und weiterhin eine Aktivierung von G-Protein-Komplexen bewirken.

Es wurden bisher 16 verschiedene α -Untereinheiten, 4 β -Untereinheiten und mehrere γ -Untereinheiten (es wurden 4 unterschiedliche Isotypen durch die Isolation von cDNA bestimmt; die Analyse der Peptidsequenzen von gereinigten γ -Untereinheiten ließe allerdings den Schluss auf 2 weitere zu) von G-Proteinen bestimmt.⁵⁷ Durch die Kombinationen der verschiedenen α -Untereinheiten mit den möglichen β - γ -Komplexen ergibt eine hohe Anzahl möglicher Zellantworten zur spezifischen Wirkung der Rezeptoren.

Die Bindung des G-Protein-Komplexes an den aktivierten Rezeptor verursacht den Austausch von an die α -Untereinheit gebundenem GDP durch GTP und eine anschließende Dissoziation der α -Untereinheit vom β - γ -Komplex.⁵⁷ Ein Rezeptor kann auch mehrere G-Protein-Komplexe aktivieren bzw. zur Dissoziation bewegen. Die GTP-gebundene α -Untereinheit bzw. der β - γ -Komplex können mit weiteren Effektorproteinen interagieren und somit das Signal spezifisch weiterleiten. Die Effektorproteine können Ionenkanäle oder Enzyme darstellen, die regulatorische Moleküle oder sekundäre Botenstoffe generieren.⁵⁷ Die mathematische Erfassung der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entwickelte sich in unterschiedlichen Modellen.

Die ersten Modelle zur Beschreibung einer Rezeptor-Ligand-Interaktion basierten auf der Annahme, dass Agonisten und kompetitive Antagonisten die gleiche Bindestelle am Zielmolekül besitzen. Antagonisten blockieren dabei jegliche Signalübertragung und konformationelle Änderung des Rezeptors. Damit haben Antagonisten keine intrinsische Aktivität und werden als neutrale Antagonisten bezeichnet. Es wurden allerdings Rezeptor-Ligand-Interaktionen beobachtet, bei denen nicht der übliche, sondern der gegenteilige Effekt bestimmt wurde. Daher musste die Vorstellung über diese Interaktionen mit der Wirkung eines inversen Agonisten, auch negative Antagonisten genannt, erweitert werden.

Die *Receptor Occupancy*-Theorie (Abbildung 4) vereinigte die Basis einer Rezeptor-Ligand-Interaktion nach dem Massewirkungsgesetz (Langmuir-Gleichung von Hill und Clark) mit empirischen Proportionalkonstanten zur Beschreibung der Fähigkeit eines Liganden eine Antwort auszulösen, die resultierende Stärke der Antwort zu modulieren und zur Beschreibung der intrinsischen Aktivität oder Wirksamkeit. Bei diesem Modell wurde allerdings die Signaltransduktion selbst nicht mit einbezogen und liefert daher nur generelle Aussagen über Affinitäten einer Rezeptor-Ligand-Interaktion.

Die Weiterentwicklung dieses Modells führte zum Del Castillo-Katz-Modell für GPCRs (Abbildung 4) von Jose Del Castillo und Sir Bernard Katz (1957), die für nicotinsche Rezeptoren erkannten, dass Cholin-Derivate unterschiedliche Affinitäten basierend auf unterschiedlichen Konformationen der Rezeptoren aufweisen. Diese Konformationen wurden als eine

„geschlossene“ und eine „geöffnete“ Konformation sowie als ein Intermediat dieser beiden beschrieben⁵⁸ (Wyman und Allen erkannten dies bereits 1951 für die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin). Sie berücksichtigten damit einen Transduktionsmechanismus. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang eine hundertprozentige inaktive Konformation der Rezeptoren in Abwesenheit des Liganden postuliert.

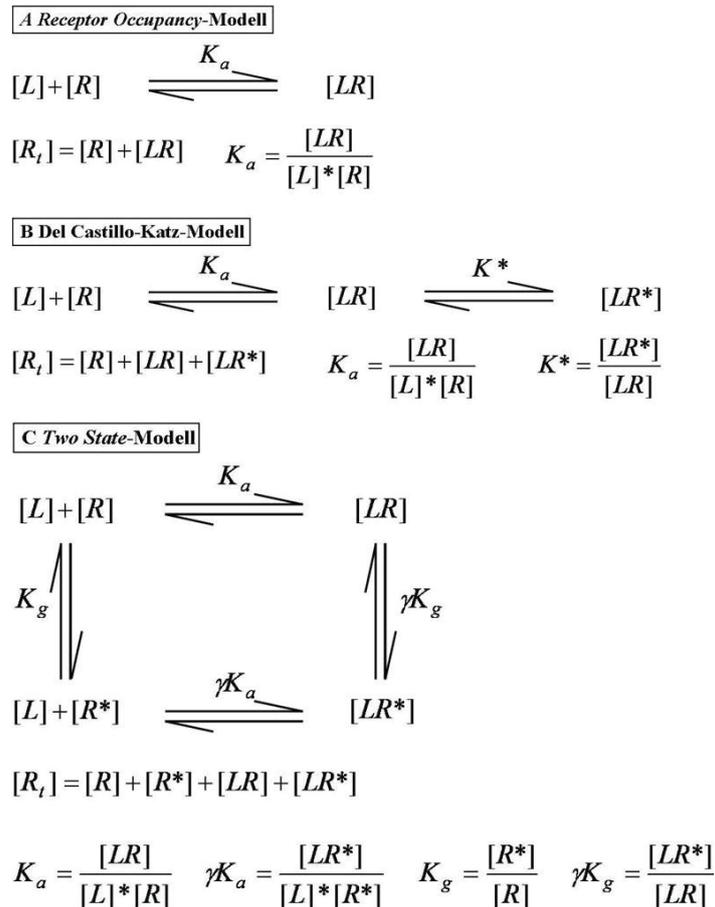


Abbildung 4: Darstellung der Entwicklung von Modellen zur Beschreibung von Rezeptor [R]-Ligand [L]-Interaktionen in drei Stufen. $[R_t]$ stellt die totale Rezeptorkonzentration dar, $[R^*]$ kennzeichnet die aktive Konformation der Rezeptoren. Das *Receptor Occupancy*-Modell (A) ist durch eine Gleichgewichts-Assoziationskonstante (Assoziation beschreibt die Zusammenlagerung von [L] und [R]) K_a gekennzeichnet. Im Modell von Del Castillo und Katz (B) wurde entsprechend dem Modell (A) eine Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_a (R - LR) und zusätzlich eine Gleichgewichtskonstante K^* für die „geöffnet“-„geschlossen“ Isomerisierung der Rezeptoren definiert. Das *Two State*-Modell (C) definiert die Koexistenz der aktiven und inaktiven Konformation der Rezeptoren. Analog zu den Modellen (A)/(B) beinhaltet dieses Gleichgewichts-Assoziationskonstanten: K_a (R - LR) und γK_a (R* - LR*). Weiterhin wurden zwei Gleichgewichts-Allosteriekonstanten (Allosterie beschreibt die Konformationsänderung der Rezeptoren) K_g (R - R*) und γK_g (LR - LR*) eingeführt.

Dieser Annahme wurde im *Two State*-Modell (Abbildung 4), eigentlich zur allgemeinen Beschreibung allosterischer Enzyme, von Jacques Monod et al. aus dem Jahr 1964⁵⁹ entgegengewirkt, indem ein Gleichgewicht der aktiven und inaktiven Form auch in Abwesenheit eines Liganden als Grundlage gesetzt wurde. Ein Ligand, der eine höhere Affinität zur aktiven Kon-

formation besitzt ($\gamma > 1$) und somit das Gleichgewicht zur aktiven Konstellation verschiebt, wurde als Agonist definiert. Der Ligand mit der Präferenz zur inaktiven Konformation ($\gamma < 1$) und der daraus resultierenden Gleichgewichtsverschiebung zum inaktiven Rezeptor wurde als inverser Agonist bestimmt. Die Definition des Antagonisten wurde in die des inversen Agonisten mit einbezogen ($\gamma < 1$ und die Affinität ist gleich zum aktiven und inaktiven Rezeptor). Allerdings war damit auch keine konkrete Beschreibung aller Zustände von GPCRs möglich, da die Bindung des G-Proteins selbst nicht beschrieben werden konnte.

Eine konkrete Anpassung eines Interaktionsmodells für Liganden mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit der Berücksichtigung der G-Protein-Rezeptor-Interaktion und unterschiedlichen Affinitäten und Wirksamkeiten von Liganden fand sich zum ersten Mal im einfachen *Ternary Complex*-Modell von De Lean et al. von 1980,⁶⁰ das von Samama et al. im Jahr 1992 auf das *Extended Ternary Complex*- oder auch *Allosteric Ternary Complex*-Modell erweitert wurde.⁶¹ Die Erweiterung im Vergleich zum einfachen Modell verwarf die Bedingung, dass die Rezeptoraktivierung eine agonistinduzierte Formierung eines aktiven ternären Komplexes aus Ligand, Rezeptor und G-Protein erfordert. Anstelle dessen wurde die Option auf einen konstitutiv aktiven, allerdings mutierten Rezeptor geschaffen, was eine Verbindung des *Two State*-Modells mit dem einfachen *Ternary Complex*-Modell darstellte.⁶¹ Es wurde eine weitere hoch komplexe Theorie von Weiss et al. (1996) zu den Rezeptor-Ligand-G-Protein-Interaktionen veröffentlicht, die als *Cubic Ternary Complex Receptor Occupancy*-Modell oder *Multistate Tripartite Receptor*-System bezeichnet wurde. Diese Theorie bietet eine äußerst genaue Möglichkeit zur Beschreibung thermodynamischer Zustände über 8 Rezeptorspezies und 12 Gleichgewichtskonstanten. Allerdings ist eine praktische Anwendung sehr schwierig, da einige der Gleichgewichtskonstanten nicht bestimmbar wären.⁵⁶

Das Modell, das einer praktischen Anwendung zugänglich ist, wurde von Laurent Daeffler und Yves Landry im Jahr 2000 als *Ternary Complex Model Evidencing R** (Abbildung 5) bezeichnet. Diese Theorie beschreibt grundsätzlich das einfache *Ternary Complex*-Modell. Dabei besteht das System aus Rezeptor [R], Ligand [L] und membrangebundenen Proteinen, den G-Proteinen [G]. Weiterhin wird in dieser Theorie postuliert, dass die Zell-, bzw. Gewebeantwort von der Aktivierung eines G-Proteins durch einen aktiven Rezeptor ausgelöst wird. Der Faktor γ , der bereits für das *Two State*-Modell erfasst wurde, beschreibt den Effekt des Agonisten auf die Rezeptor-G-Protein-Interaktion und somit auch die Wirksamkeit von Agonisten. Das Modell erfasst ein Gleichgewicht aller möglichen Interaktionszustände bzw. Konformationen der beteiligten Elemente. Die vorliegenden Konzentrationen der einzelnen Elemente können dabei die gezielt ausgelöste aber auch die basale Aktivität beeinflussen.

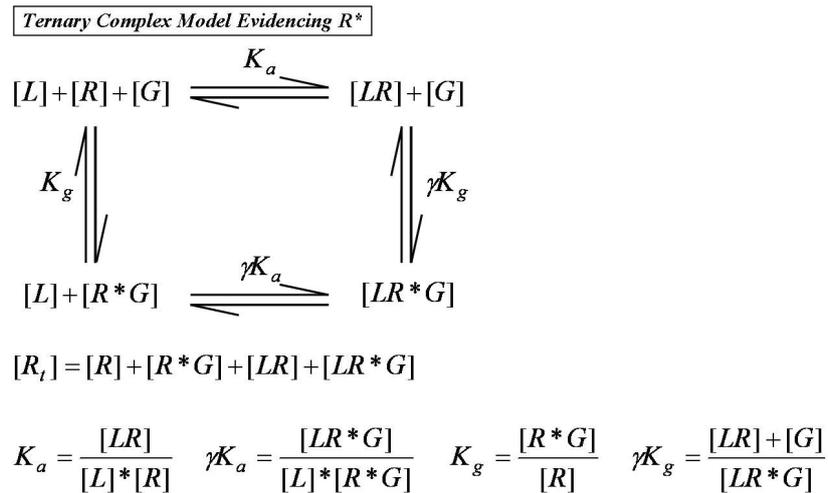


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *Ternary Complex Model Evidencing R** zur Beschreibung der Ligand [L]-Rezeptor [R]-G-Protein [G]-Interaktion für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. R_t stellt die totale Rezeptorkonzentration dar. K_a und γK_a sind die Gleichgewichts-Assoziationskonstanten für die Zustände R - LR und R*G - LR*G sowie K_g und γK_g die Gleichgewichts-Allosteriekonstanten für R - R* und LR - LR*G.

2.2 Darstellung der untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

2.2.1 Der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2

Die humanen Cannabinoid-Rezeptoren ordnen sich in die rhodopsinähnlichen (Klasse A bzw. R) G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ein.^{8,54} Innerhalb der rhodopsinähnlichen Klasse von GPCRs werden die CB-Rezeptoren in die Subkategorie α eingeordnet.^{13,54} Die zwei bisher identifizierten Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 unterscheiden sich durch ihre Lokalisation im humanen Organismus.⁶² Der Subtyp 1 wird vorrangig im Gehirn exprimiert. Jedoch wurden weitere Lokalisationen allerdings in wesentlich geringeren Konzentrationen in Nebenniere, Herz, Lunge, Prostata, Uterus, Eierstock, Hoden, Knochenmark, Mandeln, Milz und Leukozyten nachgewiesen.^{62,63} Der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 wurde dagegen nicht im Gehirn identifiziert, sondern in bemerkenswert hohen Konzentrationen in immunologischen Geweben bestätigt. Das dabei häufigste Vorkommen wurde in B-Lymphozyten bestimmt, gefolgt von natürlichen Killerzellen, Monozyten und weiteren.⁶³ Damit konnte eine gewebsspezifische Zuordnung der beiden Subtypen erfolgen: CB1R wurde als zentraler und CB2R als peripherer Cannabinoid-Rezeptor definiert.⁶³ Die Identität der Aminosäuresequenzübereinstimmung beider Subtypen liegt bei 44 % bei Betrachtung der gesamten Primärstruktur und bei 68 %, wenn nur die transmembranen Bereiche zu Grunde gelegt werden.⁶³

Eine Gemeinsamkeit beider CB-Rezeptor-Subtypen ist die Vermittlung der zellulären Effekte über die Pertussistoxin-sensitiven GTP-bindenden regulatorischen Proteine G_i ^{62,64} und G_o ⁶⁴

(das Gift Pertussistoxin [z.B. produziert von den Bakterien *Bacillus pertussis* und *Haemophilus pertussis*, die als Erreger für Keuchhusten identifiziert wurden^{65,66}] entkoppelt die funktionale Bindung von $G_{i/o}$ und Rezeptor).⁶⁷ Die G-Proteine der Familie $G_{i/o}$ stehen in Zusammenhang mit der Inhibition von Adenylylcyclasen⁶⁸ und der Aktivierung von MAP-Kinasen.⁶⁹ Der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 vermittelt im Gegensatz zu CB1R keine Regulation von Calcium- bzw. Kaliumionenkanälen, was damit auch die CB2R-Defizienz des zentralen Nervensystems erklärt.⁶⁹ Die Cannabinoid-Agonisten mit jeweils unterschiedlichen Affinitäten zu den Subtypen 1 & 2 werden nach ihrer chemischen Struktur in vier Klassen eingeteilt: i. klassische Cannabinoide ii. bicyclische Cannabinoide iii. Aminoalkylindole und iiiii. Fettsäureamine und -ester.⁷⁰

Das Interesse an der Untersuchung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 gründet auf der großflächigen Assoziation des Rezeptors zum Immunsystems des menschlichen Körpers und den damit verbundenen Berührungspunkten zu den unterschiedlichsten Krankheiten. Die Kenntnis der physikalischen, funktionalen und strukturellen Eigenschaften könnte die Entwicklung spezifisch wirkender Medikamente ohne unerwünschte Nebenwirkungen für diese Krankheiten strukturieren und voran bringen.⁷¹ Die Literatur beschreibt den Zusammenhang der Agonisten und der Rezeptoren selbst zu Entzündungserscheinungen und neurogenem Schmerz,^{26,69} Leberfibrose,^{26,72} Osteoporose,^{26,72} Atherosklerose,^{26,72} Multiple Sklerose,⁷³ zur Regulation des Immunsystems z.B. der funktionalen Aktivität von Phagozyten⁷⁴ und der Δ^9 -THC induzierten Inhibition von natürlichen Killerzellen und weiteren.⁷⁴

Grundlegende Eigenschaften des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 sind in Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Zusammenfassung grundlegender Eigenschaften des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2. (Kalkulation basierend auf www.expasy.ch)

Größe	Wert
Anzahl der Aminosäuren	360
molekulare Masse	39680.7 Da
pI	8.52

Die bisher bestimmten strukturellen Eigenschaften des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 wurden in Abbildung 6 zusammengefasst. Die Einteilung in hydrophobe bzw. hydrophile Bereiche sowie die dargestellte Glycosylierungsstelle bei Asparagin (N11) und die Modifizierung der Serine (S335, S336 und S352) durch Phosphorylierung zu Phosphoserin wurden mit Hilfe von www.expasy.ch vorgenommen. Die Ausbildung einer achten cytoplasmatischen bzw. teilweise membranassoziierten α -Helix von Serin (S303) bis Lysin (K318) wurde über strukturelle Untersuchungen des C-terminalen Peptidkettenendes mittels Circularem Dichroismus und NMR von G. Choi et al. (2002) ermittelt^{71,75} und in Abbildung 6 eingefügt. Weiterhin

konnte eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb der Transmembranhelix 6 zwischen dem Stickstoffatom des Indolrings des Tryptophan (W258) und der Carbonylgruppe des Leucin (L255) sowie eine potentielle Brücke des Tryptophan (W258) und Isoleucin (I256) nachgewiesen werden.⁷⁶ Tryptophan wird als Stabilisator von α -helikalen Proteinbestandteilen in Membranen beschrieben.^{76,77} Prolin (P260) verursacht eine typische Aufbrechung der α -helikalen Struktur der TM6, was die Möglichkeit schafft, dass Cystein (C257) wahrscheinlich im hydrophilen extrazellulären Raum lokalisiert und somit in die durch den Agonist induzierte Aktivierung des Rezeptors sowie in der Ligandenbindung selbst involviert ist.⁷⁶ Weitere Proline sind in TM4 (P168) und TM7 (P296) lokalisiert, sodass auch in diesen eine Unterbrechung der helikalen Struktur zu erwarten ist.

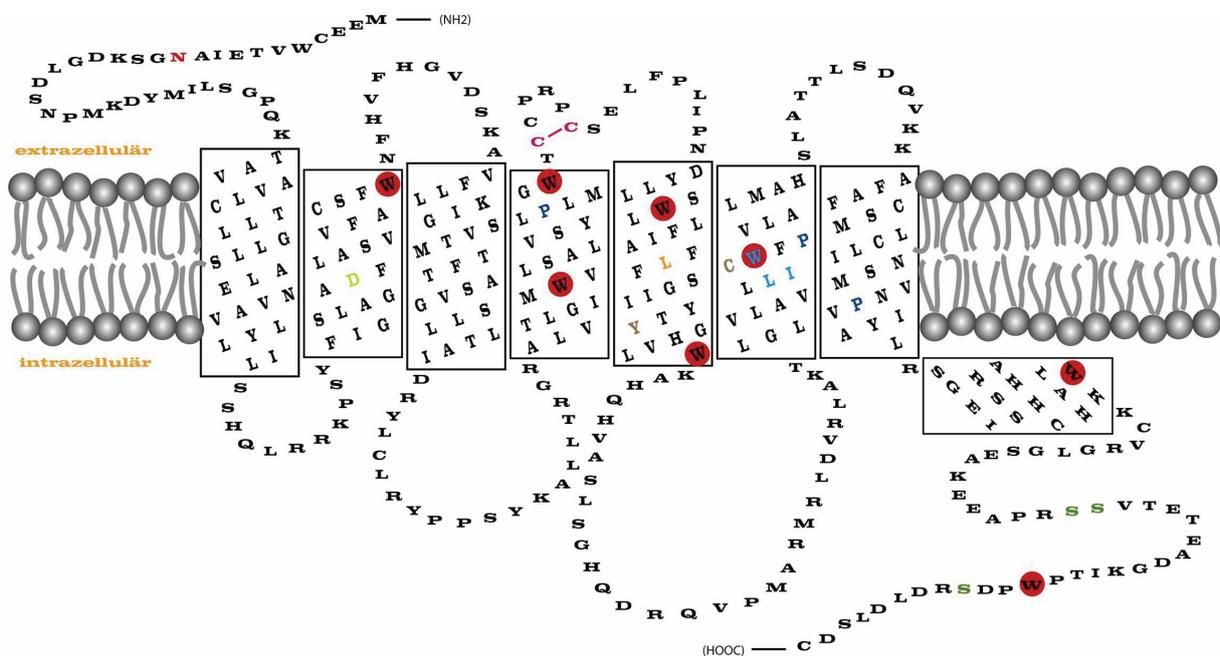


Abbildung 6: Schematische Zuordnung der Primärsequenz des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 in hydrophile und hydrophobe, transmembrane Bereiche. Die Darstellung wurde mit erweiterten strukturellen Charakteristiken bestimmter Aminosäuren versehen: N11...potentiell glycosyliert, D80...selektiv für G-Protein-Bindung, P168, P260 und P296...Aufbrechen der α -helikalen Struktur der Transmembrandomänen mit Essentialität für funktionale Struktur der Rezeptoren,⁷⁸ C173 & C179...Disulfidbrücke, L210...essentiell für Agonistenbindung, Y209...essentiell für Funktionalität, W258 & L255...Wasserstoffbrücke, W258 & I256...potentielle Wasserstoffbrücke, C257...vermittelt Aktivierbarkeit des Rezeptors, beteiligt an Ligandenbindung, S335, S336 und S352...potentielle Phosphorylierung (Serin zu Phosphoserin). Die rot hinterlegten Tryptophane stellen die Lokalisation der beabsichtigten Isotopenmarkierungen dar. Für W158 und W172 wurde eine Rolle für Ligandenbindung und strukturelle Ausprägung beschrieben.⁷⁹ Tryptophan (W317) ist in der achten cytoplasmatischen Helix lokalisiert, die in die Bindung der G-Proteine involviert ist.

Ein entscheidender Unterschied zu allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist ein durch ein Leucin (L210) ersetztes konserviertes Prolin innerhalb der TM5 (für 86 % aller GPCRs), dass für die Bindung von Agonisten essentiell ist.⁷⁰ Des Weiteren ist Tyrosin (Y209) innerhalb der

TM5 ebenfalls essentiell für die Funktionalität der Rezeptoren.⁷⁰ Innerhalb des zweiten extrazellulären *Loops* wird eine Disulfidbrücke zwischen Cystein (C173) und Cystein (C179) erwartet.⁸⁰ Es erfolgt keine Kennzeichnung weiterer bisher bestimmter Aminosäuren in Abbildung 6, die in der Bindung von Agonisten beteiligt sind, da diese für unterschiedliche Agonisten ebenfalls divergieren.^{71,81} Für die selektive Bindung des G-Proteins wurde Asparaginsäure (D80) bestimmt. Eine kritische Rolle für die Rezeptor-Ligand-Interaktion spielen Tryptophane bei den unterschiedlichsten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.⁷⁹ Innerhalb der Transmembranhelix 4 ist ein Tryptophan in allen bekannten GPCRs konserviert und lässt damit die Vermutung zu, dass diese Aminosäure eine entscheidende Rolle für Struktur und Funktion dieser Art Rezeptoren spielt. Für den Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 ist dieses Tryptophan innerhalb der Primärsequenz an Stelle 158 lokalisiert.⁷⁹ Dem zweiten in der Transmembranhelix 4 auftretenden Tryptophan (W172) wird eine Funktion in der Ligandenbindung zugeschrieben.⁷⁹ Die cytoplasmatische Helix 8, die eine Rolle in der Bindung der G-Proteine hat,⁷⁵ enthält ein weiteres Tryptophan (W317).

Der Umstand, dass die im Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 enthaltenen Tryptophane von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität sind, und die äußerst geringe Häufigkeit von Tryptophan innerhalb der Primärsequenz des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 (8 Tryptophane) macht mit Hilfe dieser Aminosäure eine Bestimmung konformationeller Änderungen bedingt durch die Ligandenbindung bzw. Aktivierung des Rezeptors äußerst interessant. Die bis dato einzige Möglichkeit, nur bestimmte Aminosäuresignale zu detektieren, wird durch die NMR-Spektroskopie durch eine spezifische Isotopenmarkierung der gewünschten Aminosäure geboten. Weitere Vorteile der NMR gegenüber einer Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Transmembranproteinen mittels Röntgenstrukturanalyse werden im Kapitel 2.3 ausgeführt. Daher wurde eine Methode zur selektiven Isotopenmarkierung von Tryptophanen innerhalb von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit der Möglichkeit der Erweiterung auf weitere geeignete Aminosäuren etabliert und verifiziert. Die entwickelte Methode erlaubt weiterhin eine unspezifische Markierung mittels ¹³C und ¹⁵N der Aminosäuren von ligandenbindungsfähigen und funktionalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in *Escherichia coli*.

2.2.2 Der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2

Die fünf bisher identifizierten Neuropeptid Y-Rezeptoren NPY1R, NPY2R, NPY4R, NPY5R und NPY6R ordnen sich ebenfalls in die Klasse A bzw. R (Rhodopsinähnliche) der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ein, fallen jedoch im Gegensatz zu den Cannabinoid-Rezeptoren in die Subkategorie β .^{13,54} Weitere Gemeinsamkeiten der fünf Rezeptoren sind die Lokalisa-

tionen im Hypothalamus, im Stammhirn und peripheren Geweben. Zudem nutzen diese äquivalente Signaltransduktionswege wie die Inhibierung der cAMP-Akkumulation⁸² über die Inhibition der membranständigen Adenylylcyclase⁸³ und die Auslösung der zellinternen Effekte über die Pertussistoxin-sensitiven G-Proteine der Familie $G_{i/o}$.^{78,84} Der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 3 wurde nur über eine pharmakologische Relevanz (einige Effekte von NPY können nicht von PYY ausgelöst werden, sodass ein spezifischer, ausschließlich NPY-bindender Rezeptor existieren muss)⁸⁵ beschrieben und könnte aus einem der anderen fünf Typen durch posttranslationale Modifizierung entstehen.⁸⁶ Entgegen anderer Beispiele für Subtypen eines GPCRs, die den gleichen Liganden binden, ist die Sequenzhomologie der Y-Rezeptoren äußerst gering.⁸⁶ Allerdings sind die Y1-, Y4- und Y6-Rezeptoren gegenüber dem Y2- bzw. dem Y5-Rezeptor evolutionär näher korreliert und fassen diese in einer Gruppe zusammen.^{84,86}

Eine konkrete Lokalisierung des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde im Hippokampus, in der lateralen Scheidewand von Muskeln, in der Amygdala und im Locus caeruleus (ein Teil des Gehirns zur Steuerung der Orientierung und Aufmerksamkeit) des Gehirns beschrieben.⁸⁷ Die Umstrukturierung bzw. das Wachstum von Knochen ist der Kontrolle des zentralen Nervensystems über Signalwege der im Hypothalamus (Teil des Zwischenhirns zur Steuerung des vegetativen Nervensystems und der Energiehomeostase) lokalisierten Neuropeptid Y-Rezeptoren, konkret auch für den Y2-Rezeptor beschrieben,^{25,82} unterlegen, denen auch eine Assoziation zur Regulation der Endocannabinoid-Konzentrationen im Gehirn zugewiesen wird.⁷² Dem Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 werden ebenfalls regulatorische Effekte in der Knochenbildung beigemessen,⁷² sodass sich zwischen den beiden untersuchten Rezeptoren dieser Arbeit überschneidende und sich gegenseitig beeinflussende Funktionen ergeben. Weiterhin beeinflusst die Konzentration des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 die Konzentration des NPY1R in Osteoblasten, sodass dem Y2-Rezeptor auch in dieser Hinsicht eine regulatorische Eigenschaft zugewiesen werden kann.⁸² Weiterhin sind Assoziationen des NPY2R zur Regulation von Calcium-Ionenkanälen,⁷⁸ zur Inhibierung bzw. Regulation der Neurotransmitterausschüttung am Axonende,⁸³ zur Modulierung der Gedächtnisspeicherzeit,⁸³ des Weiteren zur Regulation des Angstgefühls,⁸⁷ zur Ausbildung von Fettleibigkeit^{25,88} und des metabolischen Syndroms⁸⁸ bekannt. Außerdem konnte eine Beteiligung des NPY2R in der Steuerung der Nahrungsaufnahme^{25,89} und des damit in Zusammenhang stehenden Hungergefühls²⁵ sowie in der Regulation der Energiehomeostase des Organismus nachgewiesen werden.⁹⁰ Einen Überblick über die grundlegenden Eigenschaften des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 bietet Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammenfassung grundlegender Eigenschaften des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2. (Kalkulation basierend auf www.expasy.ch)

Größe	Wert
Anzahl der Aminosäuren	381
molekulare Masse	42731.1 Da
pI	6.79

Eine Darstellung der bisher bestimmten strukturellen Eigenschaften des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 und dessen Assoziation zum Liganden NPY befindet sich in Abbildung 7. Die Einteilung der Primärsequenz in *Loop*-Regionen und hydrophobe Bereiche, sowie die Festlegung einer potentiellen Glykosylierungsstelle bei Asparagin (N11),^{91,92} der Disulfidbrücke zwischen Cystein (C123) und Cystein (C203) sowie der Lipidmodifikation von Cystein (C342) mit Palmitinsäure wurden über www.expasy.ch ermittelt. Weder der extrazelluläre N-Terminus noch die potentielle Glycosylierungsstelle (N11) ist in der direkten Bindung des NPY involviert, allerdings wurde die Essentialität des N-Terminus für das Halten des Liganden in der Bindungstasche des Rezeptors bestätigt.⁹¹ Eine Aminosäure des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2, die zur Bindung der NPY-Liganden identifiziert wurde, ist Asparaginsäure (D292), die eine ionische Bindung zum Arginin (R33) des NPY ausbildet.^{93,94} Glutaminsäure (E205) wurde ebenfalls als in die Ligandenbindung involvierte Aminosäure bestätigt.^{93,94}

Der Ligand der Neuropeptid Y-Rezeptoren NPY, der im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird,⁹⁵ wurde erstmalig von Kazuhiko Tatemoto 1982 aus dem zentralen Nervensystem von Schweinen isoliert und formulierte aufgrund der Sequenzhomologien zum PYY (70 %) und PP (50 %) eine neue Peptidfamilie (Peptidhormone), die die Gemeinsamkeit besitzen, die Sekretin stimulierte Bauchspeicheldrüsensekretion zu inhibieren.⁹⁶ Die Primärsequenz des humanen Neuropeptid Y, bestehend aus 36 Aminosäuren,⁹⁷ unterscheidet sich nur durch ein Methionin (M17) vom NPY aus Schweinen, das an dieser Stelle ein Leucin (L17) enthält.⁹⁵ Eine extrazelluläre Lokalisation des Peptids ermöglicht eine direkte Bindung von NPY in Lösung zum Rezeptor oder nach einer vorangehenden Assoziation mit der rezeptorumgebenden Membran über eine in der Membran-Wassergrenzschicht (bei einer physiologischen Zusammensetzung der Membran) lokalisierten amphiphatischen α -Helix, deren geladene Aminosäuren aus der Membran herausragen.⁹⁷ Die bisher bestimmten strukturellen Eigenschaften wurden in Abbildung 7 zusammengefasst. Diese beinhaltet eine Ausbildung der amphiphatischen α -Helix durch die Aminosäuren Alanin (A14) bis Tyrosin (Y36) des amphiphilen Peptidhormons. Die amphiphatischen Eigenschaften der α -Helix verursachen gegebenenfalls auch eine Dimerisierung von NPY über die hydrophoben Anteile. Die Amino-

säuren Tyrosin (Y1) bis Prolin (P13) zeigen keinerlei Präferenz für eine geordnete Struktur, noch für eine Interaktion mit Membranen oder dem Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 und sind äußerst flexibel.⁹⁸ Das C-terminale Ende des Neuropeptids Y ist amidiert.^{95,97} Aminosäuren des NPY, die eine spezifische Bindung zum Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 bedingen, sind Arginin (R25),⁹³ Arginin (R33),^{84,93} Arginin (R35),^{84,95,99} Glutamin (G34),⁹⁹ Histidin (H26),⁸⁵ Leucin (L30),⁹⁹ Threonin (T32),⁸⁴ und Tyrosin (Y36),^{95,99} sowie die Amidgruppe des C-terminalen Endes.⁸⁵

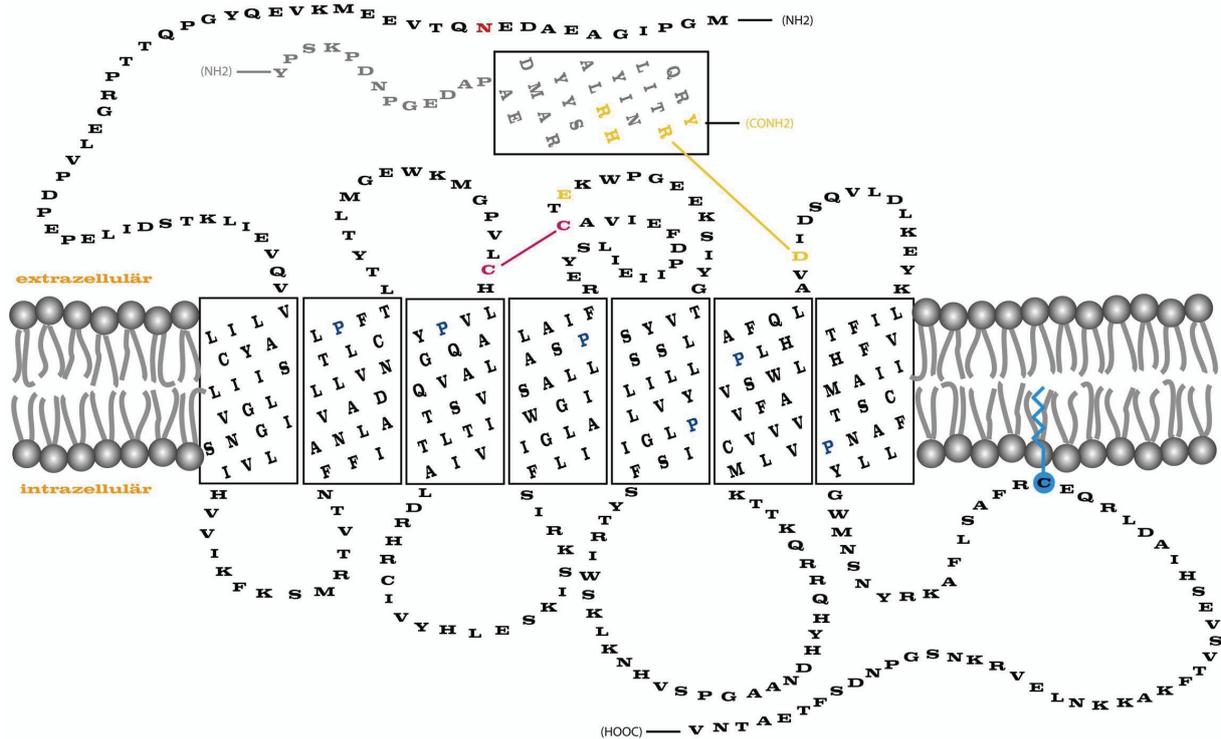


Abbildung 7: Schematische Darstellung der in hydrophobe, transmembrane Bereiche und hydrophile, intra- bzw. extrazelluläre *Loop*-Regionen eingeteilten Primärsequenz des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 (schwarz). Die gesondert gekennzeichneten Aminosäuren stellen bisher ermittelte strukturelle Besonderheiten dar: N11...potentiell glycosyliert, P105, P127, P182, P231, P283 & P322...Aufbrechen der α -helikalen Struktur der Transmembrandomänen mit Essentialität für funktionale Struktur der Rezeptoren,⁷⁸ C123 & C203...potentielle Disulfidbrücke, D292...ionische Bindung zum Liganden NPY (R33), C342...lipidmodifiziert (Palmitinsäure). Die Primärsequenz des Neuropeptids Y (grau) wurde in den N-terminalen unstrukturierten, flexiblen Teil (Y1-P13) und die amphiphatische α -helikale Domäne (A14-Y36) eingeteilt. Die Aminosäuren R25, H26, Y36 und die Amidierung des C-Terminus spielen gegenüber den anderen genannten AS in der Bindung zum NPY2R eine herausragende Rolle.

Die weitreichende pharmakologische Beteiligung des Rezeptors in Krankheiten und regulatorischen Prozessen des Körpers erfordern aus genannten Gründen eine Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 im aktiven und aktivierten Zustand. Die Wahl zur Expression dieses Rezeptors fiel auf eine Produktion im inaktiven Zustand (Akkumulation in *Inclusion Bodies*), da mit dieser Methodik generell eine um eine

bis zwei Zehnerpotenzen erhöhte Produktivität (bezogen auf das Kulturvolumen und die Biomasse) möglich ist. Die Möglichkeit der Renaturierung dieser unlöslichen Aggregate wurde bereits verifiziert,¹⁰⁰ sodass die Expression im inaktiven Zustand für den Y2-Rezeptor angewendet werden konnte. Da der Einsatz der äußerst kostenintensiven Substrate zur Isotopenmarkierung so gering wie möglich ausfallen musste, wurde durch die Wahl des Expressionssystems und einer entsprechenden Optimierungsstrategie des Fermentationsprozesses ein maximales Ausbeute-Kosten-Verhältnis beeinflusst.

2.3 Möglichkeiten zur Untersuchung der dreidimensionalen Strukturen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Das große Interesse an der dreidimensionalen Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren förderte eine schnell fortschreitende Ausbildung der Kenntnisse zur Herstellung, Isolierung und Stabilisierung von GPCRs. Es wurden bis dato insgesamt vier Kristallstrukturen dieser aus mehr als 1000 Vertretern bestehenden Proteinklasse veröffentlicht (Abbildung 8).

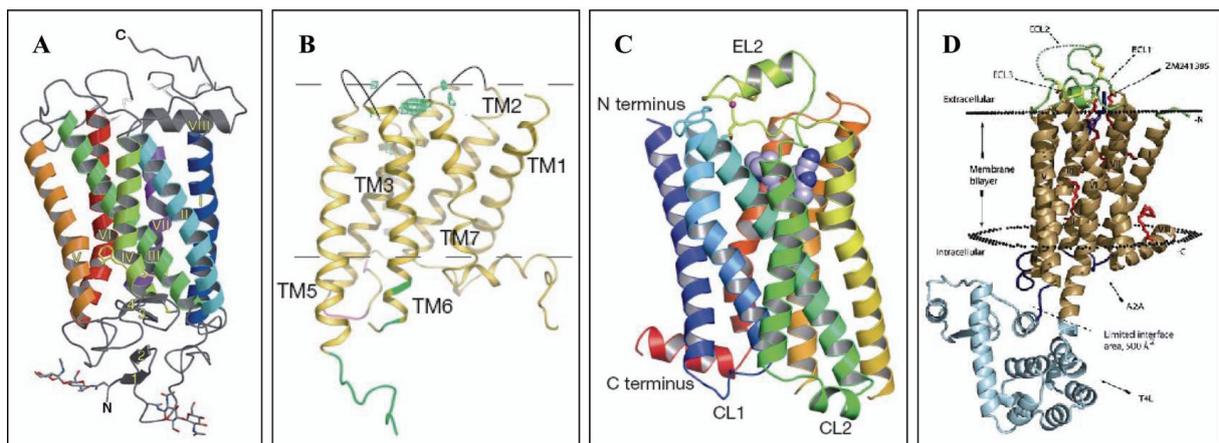


Abbildung 8: Darstellung der vier bisher bestimmten Kristallstrukturen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. A. Bovines Rhodopsin,¹⁹ B. Humaner β_2 -Adrenerger Rezeptor,²³ C. β_1 -Adrenerger Rezeptor des Truthahns,²⁴ D. Humaner A_{2A} -Adenosin-Rezeptor.⁵

Grundsätzlich bieten sich im Zusammenhang mit der Bestimmung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von Proteinen zwei Messmethoden, deren Anwendbarkeit jeweils vom zu untersuchenden System abhängt. Die Nutzbarkeit der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wird im Folgenden ausgeführt. Bisher wurde keine dreidimensionale Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors als Gesamtprotein mittels NMR ermittelt. Allerdings wurde mit Hilfe der Lösungs-NMR der Nachweis über einen hochflexiblen, unstrukturierten C-Terminus des bovines Rhodopsins von AS 334 bis AS 348 erbracht.³⁴ Dies war nicht durch die Kristallisation von Rhodopsin nachweisbar.

Weitere allgemeine Aussagen zu strukturellen Änderungen bei Aktivierung und zur Flexibilität des Rhodopsins konnten ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie bewiesen werden.¹⁰¹

2.3.1 Die Röntgenstrukturanalyse und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Bei der Verwendung der Röntgenkristallographie als Methode zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ergeben sich in der Regel große Schwierigkeiten. Es bleibt dabei natürlich unbestritten, dass die bisher analysierten GPCRs mit dieser Methode untersucht wurden und Ergebnisse erbrachten, die die Vorstellung über die Struktur dieser Proteinklasse erheblich verbesserten.

Um die Kristallbildung der β_1 - und β_2 -Adrenergen Rezeptoren bzw. des humanen A_{2A} -Adenosin-Rezeptors erst möglich zu machen, mussten diese auf unterschiedliche Weisen stabilisiert werden. Die angewendeten Methoden für den β_1 -Adrenergen Rezeptor des Truthahns sahen die Erhöhung der Thermostabilität und die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiver Agonisten- und inaktiver Antagonistenkonformation auf die Seite der inaktiven Struktur durch sechs Punktmutationen, die Verbesserung der funktionalen Expression durch eine weitere Punktmutation sowie die Eliminierung der Palmytoylierungsstelle des C-Terminus durch eine Punktmutation, die Erhöhung des Expressionslevels durch die Deletion von 30 Aminosäuren des N-Terminus, von 30 Aminosäuren des dritten intrazellulären *Loops* und von 115 Aminosäuren des C-Terminus sowie die Stabilisierung der Struktur mit Hilfe des hochaffinen Antagonisten Cyanopindolol vor.²⁴ Des Weiteren war die Affinität dieses Rezeptors zu den üblichen Agonisten Noradrenalin und Isoprenalin um einen Faktor von 2.47 bzw. 650 geringer als die Affinität des Wildtyprezeptors.²⁴ Die ermittelte dreidimensionale Struktur wurde weiterhin auf der Grundlage von Rezeptoren, die aus einer Detergentienlösung kristallisiert wurden, bestimmt und konnte auch nicht die Eigenschaften des N-Terminus, des dritten intrazellulären *Loops* und des C-Terminus aufgrund hoher Flexibilität klären.²⁴

Zur Kristallisation des β_2 -Adrenergen Rezeptors wurde ein monoklonaler Antikörper, der an einen nativen aber nicht an einen denaturierten bzw. nicht nativen Rezeptor bindet und auch nicht die Bindungsaffinität von Agonisten oder Antagonisten beeinflusst, an den dritten intrazellulären *Loop* zur Erhöhung der polaren Oberfläche für Kristallkontakte gebunden.²³ Eine Stabilisierung des Rezeptors wurde über die Deletion von 48 Aminosäuren des C-Terminus und die Antagonistenbindung (Carazolol) erreicht.²³ Das erhaltene Modell konnte ebenfalls nicht die hochflexiblen Teile des Rezeptors, wie den N-Terminus, die drei extrazellulären *Loops*, den dritten intrazellulären *Loop*, große Teile des C-Terminus sowie die in der extra-

zellulären Membrangrenzschicht lokalisierten Aminosäuren der Transmembranhelices, abbilden.²³

Bei der Kristallisation des humanen A_{2A}-Adenosin-Rezeptors wurden gleichermaßen die bereits genannten Stabilisierungsmaßnahmen angewendet. Die Kristallbildung wurde durch die Deletion von 95 Aminosäuren des C-Terminus, den Austausch der Aminosäuren des nahezu gesamten dritten intrazellulären *Loops* gegen Lysozym der T4-Bacteriophage und die Bindung zum A_{2A}-subtypspezifischen Antagonisten ZM241385 ermöglicht.⁵ Die Affinität zu Agonisten des Konstrukts wurde durch weitere Zusätze zur Kristallisation wie Natriumchlorid stark minimiert. Teile des N- bzw. C-Terminus und des zweiten extrazellulären *Loops* konnten nicht im Strukturmodell dargestellt werden.

Rhodopsin stellt in diesem Zusammenhang eine Ausnahme dar und trennt diesen GPCR von anderen durch funktionelle und biochemische Charakteristiken.²² Ein sehr großer Vorteil von Rhodopsin gegenüber anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist, dass dieses Protein zum Einen nur in einem Gewebe lokalisiert ist und damit nur eine Funktion erfüllt und zum Anderen so gut wie keine Basalaktivität bei Anwesenheit des spezifischen G-Proteins aufweist.²² Da dieser GPCR nur eine Funktion ausübt, besitzt dieser im Gegensatz zu anderen auch nur eine geringe Flexibilität. Das bedeutet, dass andere Rezeptoren, die teilweise sehr vielfältige Funktionen besitzen, ein hohes Maß an Flexibilität der Struktur gewährleisten müssen, um mit unterschiedlichen Liganden und G-Proteinen interagieren zu können.²² Dies verursacht einen sehr stabilen Grundzustand des Rhodopsins. Weiterhin erfolgt eine Stabilisierung des Rezeptors natürlich über den kovalent gebundenen Liganden 11-cis-Retinal, das durch Photoisomerisierung in die all-trans-Form die Signaltransduktion des Rezeptors auslöst. Zusätzlich ist die Struktur des Rhodopsin-Moleküls auf einen Schutz des Liganden vor äußerer chemischer Einwirkung durch ein zum β -Sheet geformten extrazellulären *Loop* und die Bildung einer schirmähnlichen Mikrodomäne des N-Terminus ausgerichtet.²² Diese Eigenschaften konnten bisher keinem anderen GPCR nachgewiesen werden.²² Außerdem kann dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor in großen Mengen aus natürlichen Geweben in nativer Form extrahiert werden. Dies ermöglichte die Bestimmung einer großen Anzahl von Kristallstrukturen des Rhodopsins.¹⁰² Die erste Kristallstruktur wurde im Grundzustand des Liganden und somit auch des Rezeptors analysiert,¹⁹ gefolgt von einer komplettierten Struktur im Grundzustand,¹⁸ der Struktur für Metarhodopsin I²⁰ und Metarhodopsin II.²¹

Aus diesen Grundlagen wird ersichtlich, dass mit der Ausnahme von Rhodopsin eine Kristallisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren generell eine äußerst unnatürliche Stabilisierung bzw. Umgebung erfordert. Die Anwesenheit von Detergentien, die zur Solubilisierung

und Isolation unbedingt erforderlich sind, sowie die hohe Flexibilität der Rezeptoren selbst und vor allem der hydrophilen *Loops* machen eine Kristallisation von nativen Rezeptoren beinahe unmöglich.³² Detergentien können abhängig von der genutzten Konzentration, den Pufferbedingungen und auch der Temperatur in detergentienreiche und detergentienarme Phasen separieren, was die Bildung von Kristallen unterdrückt.⁶ Da eine Kristallbildung auch an eine relativ hohe Konzentration des Zielproteins gekoppelt ist, werden Konzentrationserhöhungsschritte, wie die Konzentrierung der Rezeptoren durch Zentrifugation durch eine Membran, herangezogen.⁶ Die Problematik bei dieser Methode ist die gleichzeitige Erhöhung der Detergentienkonzentration, die zum Einen negative Effekte auf die Stabilität oder auch Konformation der Rezeptoren hat und zum Anderen wiederum die Kristallbildung erschwert.⁶ Sich der häufig verwendeten stabilisierenden und die native Konformation unterstützenden Detergentien auf die gewünschte Konzentration mit Hilfe einer Dialyse zu entledigen, stellt sich ebenfalls schwierig dar, da eine Dialyse von Substanzen mit äußerst geringen CMCs unmöglich ist.⁶ Diese Umstände führen häufig zur Nichtreproduzierbarkeit und Fehlern in der beabsichtigten Präparation.⁶ Ein genereller Nachteil der Kristallisation von Proteinen ist eine festgelegte Konformation, die nicht geändert werden kann und somit im Speziellen für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine Untersuchungen zur Dynamik der ligandenunabhängigen Struktur, Ligandenbindung, Ligandendissoziation, Signaltransduktion, G-Protein-Bindung und -Aktivierung zulässt.²² Dies wäre nur möglich, wenn alle Zustände einzeln untersucht würden, was die Kristallisation unter jeweils verschiedenen Bedingungen erfordert.²² Unter dem Umstand betrachtet, dass die Präparation eines Kristalls, der eine Auflösung unter 3 Å bietet, mehrere Jahre dauern kann,¹⁰³ macht diesen Ansatz einer Nutzung nicht zugänglich.

2.3.2 Die NMR-Spektroskopie und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die NMR-Spektroskopie stellt auf keinen Fall eine einfache Lösung zur Strukturaufklärung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Allerdings wird diese Methode nicht durch die für die Kristallisation genannten Probleme beeinflusst. Detergentien und Lipide sowie Pufferbedingungen zeigen keinen Effekt auf die Messmethode. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Kristallisation stellt sich in der atomaren Auflösung des zu untersuchenden Moleküls bis 0.1 Å dar.¹⁰⁴ Die NMR-Spektroskopie ist eine Methode zur Messung des Kernspindrehimpulses, der durch die Kernspinquantenzahl charakterisiert wird.¹⁰⁵ Kerne mit ungerader Massen- bzw. Nukleonenzahl besitzen eine halbzahlige Kernspinquantenzahl (Kategorie 1). Kernen mit gerader Massenzahl und gerader Ladungs- bzw. Ordnungszahl wird die

Kernspinnquantenzahl Null zugeordnet (Kategorie 2), und Kerne mit gerader Massenzahl und ungerader Ladungszahl haben eine ganzzahlige Kernspinnquantenzahl (Kategorie 3).¹⁰⁵ Da die NMR einen Kernspin erfordert, sind Kerne der Kategorie 2 NMR-inaktiv. Die Kerne der Kategorie 3 weisen bedingt durch eine nicht sphärische Ladungsverteilung zusätzlich ein elektrisches Quadrupolmoment auf, das eine wesentlich geringere Lebensdauer des magnetisierten Zustandes im Vergleich zu Kernen der Kategorie 1 bewirkt und eine starke Linienverbreiterung der Resonanzsignale im Spektrum zur Folge hat.¹⁰⁵ Dies kann zu Problemen und Schwierigkeiten in der Auswertung führen.¹⁰⁵ In Biomolekülen eignen sich vor allem die folgenden Kerne (in Klammern natürliche Häufigkeit) der Kategorie 1: ^1H (99.98 %), ^{13}C (1.11 %), ^{15}N (0.36 %) und ^{31}P (100 %), bzw. der Kategorie 3: ^2H (0.02 %).¹⁰⁵ Begründet auf der natürlichen Häufigkeit müssen für die Untersuchung der Struktur von Proteinen mit Hilfe der Kerne ^{13}C , ^{15}N , und ^2H Präparationsmethoden etabliert werden, die allerdings die Verwendung teurer, künstlich mit dem jeweiligen Isotop angereicherte Prekursoren erfordern. Die geringe natürliche Häufigkeit bietet aber auch den Vorteil der Ermöglichung der aminosäurespezifischen Isotopenmarkierung und damit einer hochpräzisen Zuordnung von Resonanzsignalen zu den jeweiligen Aminosäuren. Damit kann eine aminosäurespezifische Markierung von Proteinen an unterschiedlichen Aminosäuren eine Zuordnung innerhalb des unspezifisch isotopenmarkierten Proteins erleichtern und die Komplexität der Resonanzsignalzuweisung minimieren.

Die Möglichkeiten zur Untersuchung von GPCRs, die sich durch die NMR bieten, sind äußerst vielfältig.²² Diese eröffnen eine Detektion von Rezeptor-Ligand-, Rezeptor-Ligand-G-Protein- und Rezeptor-G-Protein-Interaktionen und allgemein dynamische Aspekte der GPCR Struktur mit dieser Methode im hochauflösenden Bereich.²² Die Anwendung der aminosäurespezifischen Isotopenmarkierung bietet diese Möglichkeit auch ohne eine komplexe Gesamtzuordnung der Resonanzsignale und macht daher strukturelle Untersuchungen anhand weniger relativ einfach zu zuordnender Resonanzsignale sehr sinnvoll. Sobald eine Zuordnung der Resonanzsignale gelungen ist, können mit Hilfe der durch die Bindung von Molekülen induzierten chemischen Verschiebung die Aminosäuren identifiziert werden, die in der Assoziation beteiligt sind, oder sogar die Änderung der Konformation von Rezeptoren nachvollzogen werden.²² Die Schwierigkeiten, die sich in diesem Zusammenhang ergeben, sind die Zuordnungen der großen Anzahl von Resonanzsignalen des Gesamtrezeptors²² und die relativ große Unempfindlichkeit der NMR, die wie bei der Röntgenkristallographie eine hohe Konzentration und Homogenität der Probe erfordert. Die Unempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie ergibt sich aus der Maxwell-Boltzmann-Statistik.¹⁰⁶ Danach ist der Besetzungszahl-

unterschied zwischen den energieärmeren Spins, die parallel zum Magnetfeld ausgerichtet sind, und den energiereicheren Spins, die antiparallel zum Magnetfeld ausgerichtet sind, nur sehr gering, daher baut sich die makroskopisch detektierte Magnetisierung aus nur sehr wenig Spinmomenten auf, die zu detektieren sind.¹⁰⁶ Dieser geringen Häufigkeit muss mit der Erhöhung der Konzentration und Homogenität der Probe Rechnung getragen werden. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von GPCRs mittels Kernspinresonanzspektroskopie ergeben sich generell zwei Limitationen, die die Größe dieser Proteine in der Messung und die Probenpräparation, die die Expression von ausreichenden Mengen des Proteins, die Isotopenmarkierung und die Reinheit der Proben betrifft, umfassen.²² Die molekulare Masse der Probe wird nicht nur durch die des zu untersuchenden Rezeptors bestimmt, da die mit der Stabilität und Funktionalität assoziierten Pufferbestandteile die molekulare Masse der Probe in der Weise erhöhen,¹⁰⁷ dass die Detergentien bzw. Phospholipide die hydrophoben Bereiche des Rezeptors gegen die hydrophile Pufferlösung abschirmen und somit ständig an den GPCR gebunden sind. Detergentsmizellen sind dabei natürlich ein hochflexibles System, das durch einen stetigen Austausch mit der umgebenden Pufferlösung gekennzeichnet ist.⁶ Trotz dessen sind im Mittel stets große Mengen dieser Stoffe mit dem Rezeptor assoziiert und erhöhen somit die molekulare Masse beträchtlich, was eine für die Lösungs-NMR benötigte schnelle Rotation des Moleküls verhindert.¹⁰³ Allerdings sind Anwendungen bekannt bei denen Proteinkomplexe mit molekularen Massen > 200 kDa mittels Lösungs- (100 kDa)¹⁰⁸ (Rhodopsin-DM-Komplex hat eine molekulare Masse von 100 kDa)³⁴ und Festkörper-NMR untersucht wurden.²⁹ Die Anwendung der Festkörper-NMR kommt zum Tragen, wenn es sich bei der Probe um Moleküle handelt, die durch eine stark verlangsamte bzw. nicht auftretende Rotation gekennzeichnet sind.¹⁰³ Dies ist der Fall, wenn die Moleküle eine molekulare Masse von 100 kDa überschreiten, was die Untersuchung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in mizellärem bzw. lipidassoziiertem Zustand vorliegen, möglich macht, sodass die Analyse von GPCRs in einem natursimulierten Umfeld (Bicellen, Liposomen) durchgeführt werden kann.¹⁰³ Nicht zuletzt werden Projekte, die eine qualitative und quantitative Untersuchung der biologischen und strukturellen Eigenschaften von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zum Inhalt haben, als äußerst risikobehaftet und finanziell intensiv eingestuft.²² Diese Gründe erklären die Motivation zur Anfertigung dieser Arbeit mit dem Ziel der Optimierung der gesamten Expressionsstrategie zur kostenoptimierten Produktion von nativen und in *Inclusion Bodies* eingelagerten GPCRs, die die Anwendbarkeit von *E. coli* und die Vorteile gegenüber anderen Expressionssystemen im Zusammenhang mit der Produktausbeute von GPCRs herausstellt. Zur Produktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind generell alle zurzeit

genutzten Expressionssysteme (Beispiele und Vergleich in Tabelle 6) denkbar, doch müssen bei der Wahl des entsprechenden Produktionswirts die unterschiedlichsten Bewertungskriterien erfasst werden. Die Bewertung umfasst den Metabolismus, die Wachstumsbedingungen, die im Fall der Isotopenmarkierung des Produkts äußerst wichtige Medienzusammensetzung, die Kontrollierbarkeit des Wachstums, die Produktivität, die Möglichkeit einer effizienten Reinigung und nicht zuletzt die Notwendigkeit posttranslationaler Modifikationen des Zielprodukts.

Tabelle 6: Vergleich unterschiedlicher Expressionssysteme zur Produktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch erzielte kulturvolumenspezifische Proteinausbeuten.

Expressions-system	Zelltyp	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	kulturvolumenspezifische Rezeptorausbeute [mg/L]
Säugerzellen	<i>HEK293S</i>	bovines Rhodopsin	2.1 ³⁴
	<i>BHK-21</i> (<i>Semliki Forest Virus</i>)	humaner A _{2A} -Adenosin-Rezeptor	2.2 ^{9,32}
Insektenzellen (Baculovirus)	<i>High Five</i>	humaner μ -Opioid-Rezeptor	0.4 ³³
	<i>High Five/Sf21</i>	humaner A _{2A} -Adenosin-Rezeptor	2 ^{9,31}
Hefen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	humaner A _{2A} -Adenosin-Rezeptor	4 ^{9,35}
	<i>Pichia pastoris</i>	humaner μ -Opioid-Rezeptor	12 ³⁶
Bakterien (Membranlokalisation durch Fusionsprotein)	<i>Escherichia coli</i>	humaner A _{2A} -Adenosin-Rezeptor	0.15 ^{9,109}
		humaner Cannabinoid-Rezeptor Typ 2	1 ¹¹⁰
Bakterien (<i>Inclusion Body-Expression</i>)	<i>Escherichia coli</i>	humaner Leukotrien-B4-Rezeptor Typ 1	10 ¹¹¹
		humaner Neurokinin-Rezeptor Typ 1	5 ¹¹²
zellfrei	-	β_2 -Adrenerger Rezeptor (Fusion mit Thioredoxin A und G α -Untereinheit)	450 (1000 ^{9,113})

Die Notwendigkeit von posttranslationalen Modifikationen spricht im Gegensatz zu den übrigen genannten Bewertungspunkten nicht für die Verwendung von *Escherichia coli* als Expressionswirt, da diese in der Regel nicht in vivo ausgebildet werden können.⁹ Jedoch konnte für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten GPCRs nachgewiesen werden, dass eine posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung und Glycosylierung) für die Funktionalität nicht von Bedeutung ist.^{100,110} Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch eine Isotopenmarkierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Säugerzellen (HEK-293) gelingt,³⁴ allerdings ist eine erreichte Effizienz der Isotopeninkorporierung von 49 %³⁴ bei Weitem nicht ausreichend. Auch die Nutzung markierter Aminosäuren erhöht die Kosten dieser

Methode sehr stark. Vorteile, die *Escherichia coli* gegenüber den anderen Expressionssystemen aufweist, umfassen eine einfache genetische Manipulation durch die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Vektoren und nicht zuletzt durch die breiten Kenntnisse über den Metabolismus, die durch extensive Studien in den Jahren 1960 bis 1970 *Escherichia coli* zum am meist verstandenen Organismus überhaupt gemacht haben.³⁷ Weitere hervorzuhebende Charakteristiken von *Escherichia coli* sind die einfach zu realisierende Wachstumsbedingungen³⁷ (Wachstum in Hochzelldichten im Bioreaktor) mit einer sehr hohen spezifischen Wachstumsrate¹¹⁴ und die Anwendbarkeit einer definierten Medienzusammensetzung³⁷ basierend auf wenigen Salzen, einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle¹¹⁵ für eine hocheffiziente unspezifische und spezifische Isotopenmarkierung mit ¹³C und ¹⁵N. Es muss in diesem Zusammenhang auch die äußerst einfache und reproduzierbare Kontrolle des Wachstums, die bemerkenswert hohen biomassespezifischen Proteinausbeuten und bei einer Einlagerung des Zielprodukts in *Inclusion Bodies* einfache Separation hervorgehoben werden.⁹ Die einfache Manipulierbarkeit, geringe Komplexität und hervorragende Kontrollierbarkeit des Systems *Escherichia coli* gründet auf dem im Vergleich zu anderen Expressionssystemen kleinen Genom (*E. coli* K-12 Genom¹¹⁶: 4.64 Mio. Basenpaare (Bp), 4288 proteincodierende Sequenzen (pcS), *Pichia Pastoris* Genom¹¹⁷: 9.4 Mio. Bp, 5313 pcS, menschliches Genom¹¹⁸: 2.85 Mrd. Bp, 25000 pcS). Diese von *Escherichia coli* erfüllten Kriterien mit einer Assoziation zur NMR-basierten strukturellen Untersuchung der dreidimensionalen Anordnung rechtfertigen die Wahl des Bakteriums als Expressionswirt für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die zellfreie Expression von GPCRs kann als konkurrenzfähiges System betrachtet werden. Es weist grundsätzlich die gleichen Eigenschaften wie *E. coli* auf, da Extrakte dieses Bakteriums zur Durchführung der Methode genutzt werden.¹¹⁹ Dennoch ist eine Übertragung dieses Systems in einen für die NMR-Spektroskopie geeigneten Maßstab zurzeit nicht möglich, da die bereitgestellten Mengen an Rezeptor in einem Bereich von ca. 450 µg liegen bzw. nur ein maximales Reaktionsvolumen von etwa 1 ml zulassen und eine Erhöhung des Ansatzes zu einer dramatischen Verringerung der Ausbeuten führt.⁹ Weiterhin ist eine unspezifische Markierung (das bedeutet: alle Aminosäuren mit ¹³C- bzw. ¹⁵N-Isotopen angereichert) sehr kostenintensiv,⁹ da all die benötigten Aminosäuren dann separat isotopenmarkiert sein müssen. Auch fehlen die posttranslationalen Modifikationen der produzierten GPCRs und eine Renaturierung muss ebenfalls erreicht werden. Ein weiterer Nachteil dieser Expressionsmethode ist die Essentialität von Fusionspartnern für die Expression von GPCRs.⁹

3 Materialien und methodische Grundlagen

3.1 Materialien und methodische Grundlagen Cannabinoid-Rezeptor Typ 2

3.1.1 Chemikalien

L-Alanin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Antifoam 204</i>	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Arginin-Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Asparagin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
BSA	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with EDTA</i>	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA
CP55,940	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
[³ H]-CP55,940	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
L-Cystein	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Cystin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>DAB Metal Concentrate (10 x)</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
DL-DTT	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Eisen-(III)-chlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Gα ₁	präpariert nach ⁶⁴ vom LMBB, NIH, MD, USA
Gβ ₁ γ ₂	präpariert nach ⁶⁴ vom LMBB, NIH, MD, USA
GDP	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Glycin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
[³⁵ S]-γ-GTP	Perkin Elmer LAS Inc., Waltham, MA, USA
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Histidin-Monohydrochlorid-Monohydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-4-Hydroxyprolin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>INDIA His Probe[®] HRP</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Laemml Sample Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
L-Leucin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Lysin-Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Mangansulfat-Monohydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Methanol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Methionin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
MOPS	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
PBS (10 x)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Pepton	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
o-Phosphorsäure (85%)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Prolin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Precision Plus Protein[®] Dual Color Standard</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Salzsäure (37%)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Scintisafe Plus 50% SX25-5	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Scintisafe Econo F SX22-5	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
<i>Stable Peroxide Substrate Buffer (1 x)</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
L-Serin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
TBS (10 x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
TGS (10 x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Threonin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
<i>Transblot Buffer (10 x)</i>	Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA
Tris	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
¹⁵ N ₂ -L-Tryptophan	Cambridge Isotopes, Andover, MA, USA
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
L-Valin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
2 x YT	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Zitronensäure-Dihydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Zinksulfat-Hepthydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

3.1.2 Materialien und Kits

<i>Costar[®] 3599 Clear Microtiter Plate</i>	Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA, USA
<i>DC Protein Assay</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
<i>MF-Millipore[®] Membrane Filters 0.45μm</i>	Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
<i>MultiScreen_{HTS} FB, 1.0/0.65 μm, opaque</i>	Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
<i>Ready Gel[®] Blotting Sandwiches (0.45 μm)</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
<i>Ready Gels[®] Tris-HCl Gel (4 %/10 %)</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

3.1.3 Geräte

<i>Assure</i> [®] 3 Blood Glucose Monitoring System	Arkray USA, Edina, MN, USA
<i>BioFlow</i> [®] 110 Benchtop Fermentor (3 L) mit NBS BioCommand [®] Plus Software	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
<i>ISFET IQ125 miniLab Professional pH Meter</i>	TerraChem, Shawnee Mission, KS, USA
<i>French</i> [®] Pressure cell press	SLM Instruments, Rochester, NY, USA
<i>LS 6500 Scintillation Counter</i>	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
<i>Optima</i> [®] TLX Ultracentrifuge mit Rotor TLN100	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
<i>Sonifier</i> [®] S250-A	Branson Corp., Danbury, CT, USA
<i>Synergy</i> [®] HT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA

3.1.4 Expressionsplasmid¹²⁰

Das verwendete Plasmid pAY130 wurde von Dr. Alexei Yeliseev (*Section of Nuclear Magnetic Resonance*, LMBB, NIAA, NIH, 5625 Fishers Lane, Rockville, MD 20852, USA) auf der Basis des Plasmids pMal-p2 (New England Biolabs) und pRG611/pRG1023 (entwickelt von Dr. R. Grisshammer (*Membrane Protein Structure and Function Unit*, NINDS, NIH, 5625 Fishers Lane, Rockville, MD 20852, USA)) entwickelt.^{110,120}

Das Plasmid codierte ein Fusionsprotein aus Maltose-Bindungsprotein (MBP), gefolgt von der TEV-Protease-Bindesequenz und dem Affinitäts-tag *Strep-tag* III. Dieser tag war direkt mit der vollständigen Sequenz des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 N-terminal fusioniert. Die Sequenz des CB2-Rezeptors war C-terminal mit einem Dekahistidin-tag fusioniert. Der Fusionspartner MBP stellte den Transport in die innere Membran des Wirtsorganismus und die stabile Lokalisation des Rezeptors in der Membran sicher. Dabei lagert sich die Signalsequenz des MBP ebenfalls in die innere Membran ein. Das MBP selbst ist im Periplasma von *E. coli* lokalisiert.¹²¹ Die TEV-Protease-Bindesequenz (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) ermöglichte die hochspezifische Bindung der TEV-Protease zur Abspaltung des Maltose-Bindungsproteins von der tag-Rezeptor-tag-Fusion zwischen Gln-Gly. Der tag *Strep-tag* III (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)¹²² bzw. der Dekahistidin-tag (10 x His) wurden zur spezifischen Anreicherung und Reinigung genutzt. Die Verwendung beider Affinitätssequenzen stellte das Erhalten des vollständig synthetisierten Rezeptors aus der Reinigung sicher.

3.1.5 Expressionsstamm

Die Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 wurde im *Escherichia coli*-Stamm BL21(DE3) (Stratagene Corp., La Jolla, CA, USA) untersucht und optimiert.

3.1.6 Lösungen

Medienstammlösungen

Alle nicht gesondert gekennzeichneten Stammlösungen wurden bei 121°C (30 min) autoklaviert. Mit * gekennzeichnete Stammlösungen wurden sterilfiltriert. Nachfolgend werden Fermentationen im Schüttelkolben als Schüttelkolbenversuche bzw. -experimente und Fermentationen im Bioreaktor als Fermentation bezeichnet.

Induktionsmittel

Die Expression des Zielproteins wurde für alle Medientypen mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid induziert.

IPTG* (1000 x)	500 mM	≐	119.15 g/L	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
-------------------	--------	---	------------	------------------------------------

YT-Komplexmedium

AMP* (500 x)	143 mM	≐	50.00 g/L	Ampicillin
-----------------	--------	---	-----------	------------

GlcS-KM (1250 x)	2.78 M	≐	550.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
---------------------	--------	---	-----------	--------------------------

2 x YT (1 x)			10.00 g/L	Hefeextrakt
	93.4 mM	≐	5.00 g/L	Natriumchlorid
			16.00 g/L	Pepton

Mineralsalzmedium MSM-CB2 (modifiziert auf der Basis¹²³)

AMP* (500 x)	143 mM	≐	50.00 g/L	Ampicillin
-----------------	--------	---	-----------	------------

GlcS (100 x im Schüttelkolben, 25 x in Fermentationen)	2.78 M	≐	550.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
---	--------	---	-----------	--------------------------

GlyS (25 x)	13.7 M	≐	1260 g/L	Glycerin (≐ 100%)
----------------	--------	---	----------	-------------------

MgSO ₄ (200 x)	974 mM	≐	240.0 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
------------------------------	--------	---	-----------	-----------------------------

MSM-Salze CB2 (10 x)	510 mM	≐	27.30 g/L	Ammoniumchlorid
	838 mM	≐	146.0 g/L	Dikaliumhydrogenphosphat
	261 mM	≐	52.92 g/L	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
	327 mM	≐	46.45 g/L	Natriumsulfat

SEL* (125 x)	1.40 mM $\hat{=}$ 0.2075 g/L	Calciumchlorid-Dihydrat
	0.22 mM $\hat{=}$ 0.0525 g/L	Cobaltchlorid-Hexahydrat
	14.9 mM $\hat{=}$ 4.3425 g/L	EDTA
	15.4 mM $\hat{=}$ 2.5060 g/L	Eisen-(III)-chlorid
	0.10 mM $\hat{=}$ 0.0250 g/L	Kupfersulfat-Pentahydrat
	0.15 mM $\hat{=}$ 0.0250 g/L	Mangansulfat-Monohydrat
	0.16 mM $\hat{=}$ 0.0450 g/L	Zinksulfat-Heptydrat
Thiamin* (2000 x)	593 mM $\hat{=}$ 200.0 g/L	Thiamin-Hydrochlorid
ZSL (pH 7.0) (variable Konzentration)	1.1 M $\hat{=}$ 297.0 g/L	Zitronensäure-Dihydrat

M9-Minimalmedium¹²⁴

AMP* (500 x)	143 mM $\hat{=}$ 50.00 g/L	Ampicillin
MgSO ₄ (1000 x)	974 mM $\hat{=}$ 240.0 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
CaCl ₂ (1000 x)	1.0 M $\hat{=}$ 111.0 g/L	Calciumchlorid-Dihydrat
GlcS (250 x)	2.78 M $\hat{=}$ 550.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
M9-Salze (10 x)	187 mM $\hat{=}$ 10.00 g/L	Ammoniumchlorid
	423 mM $\hat{=}$ 60.00 g/L	Dinatriumhydrogenphosphat
	220 mM $\hat{=}$ 30.00 g/L	Kaliumdihydrogenphosphat
	86 mM $\hat{=}$ 5.00 g/L	Natriumchlorid
Thiamin* (10000 x)	29.7 mM $\hat{=}$ 10.00 g/L	Thiamin-Hydrochlorid

Aminosäure-Mineral Salzmedien (AMSM)

Die verwendeten Aminosäuren wurden anhand der eingesetzten Konzentrationen kategorisiert:

ASG 1: 4-Hydroxyprolin

ASG 2: L-Alanin, L-Arginin-Monohydrochlorid, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Cystin, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, Glycin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin-Monohydrochlorid, L-Methionin, L-Serin, L-Threonin, L-Valin

ASG 3: L-Histidin-Monohydrochlorid-Monohydrat, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Tyrosin

Die folgenden unterschiedlichen Zusammensetzungen des AMSM enthielten die Komponenten des MSM-CB2 (AMP, MgSO₄, MSM-Salze CB2 ohne Ammoniumchlorid, SEL, Thiamin) in den oben genannten Konzentrationen. Auf die Zugabe von Glucose bzw. Ammoniumchlorid wird an entsprechender Stelle hingewiesen.

Tabelle 7: Einteilung der verwendeten Aminosäure-Mineralsalzmedien anhand der Aminosäurekonzentrationen.

Medium	ASG 1 [mg/L]	ASG 2 [mg/L]	ASG 3 [mg/L]	Zugabe von L-Tryptophan bei Induktion
AMSM 1	50	100	200	-
AMSM 2	100	200	400	-
AMSM 3	100	200	400 (- L-Trp)	+

Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE

Laufpuffer CB2	10 % TGS (10 x)	(25 mM Tris/HCl pH 8.3 192 mM Glycin 3.5 mM SDS)
Probenpuffer CB2	95 % <i>Laemmli Sample Buffer</i> 5 % β -Mercaptoethanol	(62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 0.15 mM Bromphenolblau 3.4 M Glycerin 69.3 mM SDS)

Western Blot

Blockpuffer	0.45 mM $\hat{=}$ 30.00 g/L	BSA in TBST
<i>HIS Probe</i> [®] -SL (1000 x)	0.10 mM $\hat{=}$ 4.00 g/L	<i>INDIA His Probe</i> [®] HRP
HIS-Reagens	99.9 % Blockpuffer 0.1 % <i>HIS Probe</i> [®] -SL	
Reaktionslösung W	5 % <i>DAB Metal Concentrate</i> (10 x) 95 % <i>Stable Peroxide Substrate Buffer</i> (1 x)	
TBST	10 % TBS (10 x) 0.05 % TWEEN 20	(20 mM Tris/HCl pH 7.4 500 mM NaCl)
Transferpuffer	10 % <i>Transblot Buffer</i> (10 x) 20 % Methanol	(310 mM Tris 2.4 M Glycin)

Lösungen zur Präparation von *E. coli* - Membranfragmenten

Fragmentpuffer	10 % PBS (10 x) 10 % ProtInhL 292 mM $\hat{=}$ 100.0 g/L	Saccharose
PBS	10 % PBS (10 x)	(100 mM NaP pH 7.4 1.54 M NaCl)
ProtInhL	2 Tabletten <i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with EDTA</i> in 12 ml PBS	

Lösungen für Ligandenbindungstest

Bindungspuffer	50 mM $\hat{=}$ 6.06 g/L 0.021 mM $\hat{=}$ 1.40 g/L 1.00 mM $\hat{=}$ 0.29 g/L 3.00 mM $\hat{=}$ 0.29 g/L	Tris/HCl pH 7.5 BSA EDTA Magnesiumchlorid
CP55,940-SL	10 μ M $\hat{=}$ 3.8 mg/L	CP55,940 in Ethanol
[³ H]-CP55,940-SL	600 nM $\hat{=}$ 0.28 mg/L	[³ H]-CP55,940 in Ethanol
PEI-Lösung	1.5 mM $\hat{=}$ 3.00 g/L	Polyethylenimin

Lösungen für G-Protein-Aktivierungstest

CP55,940-G	20 μ M $\hat{=}$ 7.6 mg/L	CP55,940 in Puffer G
G α ₁ -SL	10 mM $\hat{=}$ 2.09 g/L 40 μ M $\hat{=}$ 16.14 mg/L	MOPS pH 7.5 G α ₁
G β ₁ γ ₂ -SL	10 mM $\hat{=}$ 2.09 g/L 14 μ M $\hat{=}$ 0.52 mg/L 14 μ M $\hat{=}$ 0.11 mg/L	MOPS pH 7.5 G β ₁ G γ ₂
MOPS-Puffer	10 mM $\hat{=}$ 2.09 g/L	MOPS pH 7.5
Puffer G	10 mM $\hat{=}$ 2.09 g/L 15 μ M $\hat{=}$ 1.00 g/L	MOPS pH 7.5 BSA
Reaktionsmix G	125 mM $\hat{=}$ 26.20 g/L 0.114 mM $\hat{=}$ 7.50 g/L 2.5 mM $\hat{=}$ 0.39 g/L 2.5 mM $\hat{=}$ 0.73 g/L 10 μ M $\hat{=}$ 4.43 mg/L 0.25 μ M $\hat{=}$ 134.8 μ g/L 7.5 mM $\hat{=}$ 0.71 g/L 297 mM $\hat{=}$ 17.36 g/L	MOPS pH 7.5 BSA DL-DTT EDTA GDP [³⁵ S]- γ -GTP Magnesiumchlorid Natriumchlorid

[³⁵S]- γ -GTP besaß eine spezifische Aktivität von 1250 Ci/mmol bzw. 46.25 TBq und wies eine Halbwertszeit von 87.4 Tagen auf.

Stopplösung	20 mM $\hat{=}$	2.43 g/L	Tris/HCl pH 8.0
	25 mM $\hat{=}$	2.38 g/L	Magnesiumchlorid
	100 mM $\hat{=}$	5.84 g/L	Natriumchlorid

3.1.7 Methoden

Adaption des Expressionswirts an die Minimalmedien

Alle Adaptionen wurden in 125 ml Schüttelkolben mit 25 ml des jeweiligen Mediums bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 230 rpm und einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Es wurde von bereits mit dem Plasmid pAY130 transformierten *Escherichia coli* BL21(DE3) (BL21-130) ausgegangen. Diese in 10 % Glycerin gelagerten Zellen wurden in 2 x YT kultiviert und als Startpunkt einer Zellbank für die Adaption an die jeweiligen Medienzusammensetzungen als Glycerinstocks (10 % Glycerin, Lagerung bei -80°C) angelegt. Die Adaption von BL21-130 an die unterschiedlichen Minimalmedien wurde mit der Beimpfung der in 2 x YT kultivierten Zellen in die Medien initiiert. Das Verfolgen des Wachstums (stündliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm) ermöglichte die Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate, die als Maß zur Bewertung der Adaption herangezogen wurde. Die Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} erfolgte dabei über den Ansatz einer für das Wachstum von Mikroorganismen gültigen Exponentialfunktion¹¹⁵

$$OD_{600\text{ nm}} = OD_{600\text{ nm},0} * e^{(\mu_{\max} * t)} \quad (1)$$

mit der optischen Dichte $OD_{600\text{ nm}}$ bei einem beliebigen Zeitpunkt t [h], der optischen Dichte $OD_{600\text{ nm},0}$ zum Startzeitpunkt und der zu bestimmenden maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} [g/(gh)], die sich aus der Gleichung¹²⁵

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x \quad (2)$$

herleitet.¹²³ Bei dieser Gleichung wird die Biomassekonzentration x [g/L] durch die optische Dichte $OD_{600\text{ nm}}$ ersetzt, da ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen existiert.¹²⁶ Mit dieser Annahme ergibt sich die Gleichung

$$\frac{d(OD_{600\text{ nm}})}{dt} = \mu * (OD_{600\text{ nm}}) \quad (3)$$

die nach der Lösung Gleichung (1) zum Ergebnis hat. Die aus der ersten Adaptionsphase stammenden Zellen wurden noch vor dem Übergang in die stationäre Phase geerntet und in 10 % Glycerin bei -80°C eingelagert. Diese Zellen wurden nach gleichem Protokoll den nächsten Adaptionsphasen zugeführt. Wenn keine Erhöhung der maximalen spezifischen Wachstumsrate zur vorhergehenden Adaptionsphase zu verzeichnen war, wurde die Adaption von BL21-130 an die jeweilige Medienzusammensetzung als abgeschlossen betrachtet. Diese Zellen wurden für alle Folgeuntersuchungen verwendet.

Expressionstests

Alle Expressionstests wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, in 125 ml Schüttelkolben mit 25 ml des jeweiligen Mediums bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 230 rpm und einer Temperatur vor Induktion von 37°C bzw. nach Induktion von 20°C durchgeführt. Für alle Experimente wurde ein Inkrement zur Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm von 60 Minuten gewählt. Die Induktion der Synthese des Zielproteins wurde mit 0.5 mM IPTG induziert, begleitet vom gleichzeitigen Shift der Temperatur. Die Inkubationszeiten nach Induktion variierten in den Experimenten und werden im Ergebnisteil ausgewiesen. Die Zeitpunkte der Probenahme zur Quantifizierung des Rezeptorgehaltes in den Zellen und für den Nachweis der Funktionalität des Zielproteins waren ebenfalls unterschiedlich und werden an entsprechender Stelle gekennzeichnet. Diese Proben wurden 3 Minuten bei $16000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C bis zum Zeitpunkt der entsprechenden Tests gelagert.

Fermentationen

Fermentationsparameter

Die Fermentationen wurden in einem 3.0 L *BioFlow[®] Bench-Top*-Fermenter mit einem Kulturvolumen von 1 L durchgeführt. Weiterhin wurde die Regelung und Aufzeichnung der Prozessparameter von der *NBS BioCommand[®] Plus Software* übernommen. Die Kultivierung erfolgte im Batchverfahren mit der Zugabe von Glucose und Ammoniumchlorid im Verhältnis von 4:1 bei Bedarf. Der Sollwert für den gelösten Sauerstoff (Sauerstoffpartialdruck) lag bei 30 % und wurde über eine Kaskade des Luftzustroms, der Rührergeschwindigkeit sowie durch den Zustrom reinen Sauerstoffs realisiert. Des Weiteren wurde der pH-Wert des Kulturmediums auf einen Wert von 7.0 festgelegt und mit Hilfe der Zugabe von 10 % Natriumhydroxid bzw. 10 % o-Phosphorsäure geregelt. Die Bildung von Schaum im Fermentationsmedium wurde durch die manuelle Zugabe des Antischaummittels *Antifoam 204* reali-

siert. Die Vorgabe eines Temperaturprofils ermöglichte die Reduktion der Temperatur von 37°C auf 20°C innerhalb von 30 Minuten bis zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von 0.5 mM IPTG.

Inokulum

Zur Herstellung des Inokulums für die Fermentation wurden die adaptierten Zellen in 2 x 25 ml Medium der entsprechenden Zusammensetzung über Nacht bis zu einer optischen Dichte von ca. 1.0 angezogen und am Folgetag in 300 ml frisches Medium überimpft, sodass die optische Dichte kurz vor Beginn der Fermentation einen Maximalwert von 3.0 erreicht hatte. Es wurde anschließend das zu überimpfende Volumen des Kulturmediums mit Hilfe der Gleichung

$$V_{\text{benötigt}} = \frac{V_{\text{Fermentation}} * OD_{600 \text{ Start}}}{OD_{600 \text{ SK}}} \quad (4)$$

mit der gemessenen optischen Dichte im Schüttelkolben $OD_{600 \text{ SK}}$, dem zu überimpfenden Volumen aus dem Schüttelkolben in die Fermentation $V_{\text{benötigt}}$ [L], der gewünschten Start-OD der Fermentation $OD_{600 \text{ Start}}$ und dem Startvolumen der Fermentation $V_{\text{Fermentation}}$ [L] abgeschätzt, um eine Start-OD in der Fermentation von 1.0 zu erreichen. Das errechnete Kulturvolumen wurde steril zentrifugiert und in 50 ml Leitungswasser resuspendiert, gefolgt vom Überimpfen in den Fermenter.

Probenahme

Die Probenahme zur Bestimmung des Wachstums, bzw. der Substratkonzentration im Medium erfolgte in den Fermentationsprozessen halbstündlich. Zur Bestimmung des CB2R-Gehaltes bzw. der Funktionalität des Zielproteins wurden unterschiedliche Zeitpunkte gewählt, auf die im Ergebnisteil gesondert hingewiesen wird.

Kontrolle des Wachstums

Das Wachstum von BL21-130 wurde anhand der Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration wurde mit Hilfe des *Assure*[®] 3 Blood Glucose Monitoring System bestimmt. Vor dem Fermentationsstart wurde eine 5-Punkt-Kalibrierungskurve für die ausge-

gebenen Messwerte des Gerätes bei der Messung bekannter Konzentrationen von in Fermentationsmedium gelöster Glucose erstellt. Ein Beispiel einer 5-Punkt-Kalibrierung findet sich in Abbildung 9. Die Messung der Proben in den Fermentationen erfolgte nach der Sedimentation der Zellen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 16000 x g.

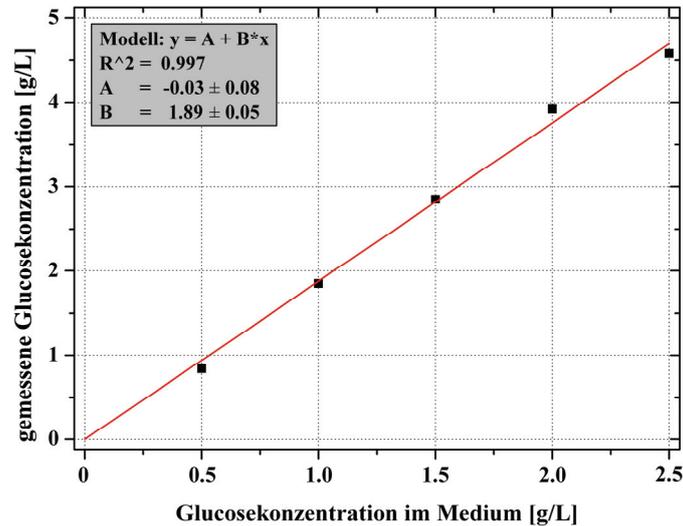


Abbildung 9: 5-Punkt-Kalibrierung zur Bestimmung des Glucosegehaltes im Fermentationsmedium. Erstellt wurde die Kalibrierung im Messbereich des *Assure® 3 Blood Glucose Monitoring System* mit Glucosekonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 g/L (MSM-CB2).

Bestimmung der Korrelation zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration erfolgte aus Proben einer Fermentation. Dazu wurde jeweils 1 ml des Kulturmediums in einer Dreifachbestimmung zu Zeitpunkten, an denen die optische Dichte bei 600 nm bestimmt wurde, in getrockneten (3 Tage bei 90°C im Trockenschrank) und gewogenen Reaktionsgefäßen aliquotiert, gefolgt von einer Zentrifugation (10 min, 16000 x g) und dem Verwerfen des Überstandes. Das Zellpellet wurde bis zur Massenkonstanz bei 90°C getrocknet.¹²⁷ Die Biotrockenmassekonzentration wurde nach Gleichung (5) mit der Masse der getrockneten Zellpellets m_{BTM} [g] und dem aliquotierten Volumen V_A [L] berechnet.

$$BTM = \frac{m_{BTM}}{V_A} \quad (5)$$

Die lineare Korrelation zwischen der errechneten Biotrockenmassekonzentration und der gemessenen optischen Dichte¹²⁸ konnte mit der Gleichung

$$BTM = KF * OD_{600 \text{ nm}} \quad (6)$$

die die berechnete Biotrockenmassekonzentration BTM [g/L], den Korrelationsfaktor KF [g/(L*OD)] und die gemessene optische Dichte bei 600 nm $OD_{600\text{ nm}}$ [OD] enthält, beschrieben werden.

Membranfragmentpräparation

Analysen zur Funktionalität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Hilfe eines In-vitro-G-Protein-Aktivierungstests sind nur möglich, wenn C- und N-Terminus des betreffenden Rezeptors zugänglich sind. Eine Möglichkeit diese Zugänglichkeit im verwendeten Produktionssystem zu erreichen, ist die Herstellung von *E. coli*-Membranfragmenten, in denen die Rezeptoren in einer möglichst genau simulierten natürlichen Umgebung vorliegen.

Es erfolgte eine Probenahme in Schüttelkolben- und Fermentationsexperimenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Volumen von jeweils 15 ml der Zellsuspension. Die Proben wurden bei 4°C und 4500 x g für 30 Minuten zentrifugiert, gefolgt vom Verwerfen des Überstandes und der Lagerung des Zellpellets bei -20°C bis zur Präparation der Membranfragmente.

Die gesamte Präparation erfolgte auf Eis bzw. mit gekühlten Puffern (4°C). Das zu präparierende Zellpellet wurde in 4 ml PBS + 1 ml ProtInhL resuspendiert. Mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators bei einem Druck von 55 bar wurden die Membranfragmente der Zellen generiert. Eine anschließende Zentrifugation der Suspension bei 14000 x g (30 min) sedimentierte große Membranfragmente bzw. nicht aufgeschlossene Zellen. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation bei 365000 x g (60 min) zugeführt. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet aus Membranfragmenten wurde zweimal mit PBS gewaschen und in Fragmentpuffer resuspendiert und homogenisiert. Die Aliquote von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung eingelagert.

Western Blot

Die biomassespezifisch bzw. gesamtproteinspezifisch normierten Proben, auf deren Normierung in den folgenden Abschnitten eingegangen wird, wurden mit Hilfe der Standard SDS-PAGE in *Ready Gels[®] Tris-HCl Gel (4%/10%)* analysiert. Als Molekularmassenreferenz wurde der *Precision Plus Protein[®] Dual Color Standard* (vorgefärbter Molekularmassenstandard mit Referenz-Molmassen von 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa) eingesetzt. Ein anschließendes Elektroblothen auf eine Nitrocellulosemembran (*Ready Gel[®] Blotting Sandwiches (0.45 µm)*) wurde von der 1-stündigen Inkubation in Blockpuffer gefolgt, der eine unspezifische Bindung des verwendeten Reagens an die Membran unterbinden sollte.

Anschließend wurde die hochspezifische Bindung der *His Probe*[®] HRP an ein Protein, das in der Primärstruktur mindestens 6 aufeinanderfolgende Histidine besitzt, durch eine 1-stündige Inkubation mit dem HIS-Reagens ermöglicht. Dieser Schritt wurde von mehrmaligem Waschen mit TBST gefolgt. Ausgelöst wurde die Farbreaktion an den Stellen, an denen das Reagens gebunden hatte, durch die Zugabe der Reaktionslösung W. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Wasser.

Analyse des biomassespezifischen CB2R-Gehaltes

Die vergleichende Analyse des CB2R-Gehaltes in der Zellmembran der intakten Zellen konnte nach einer biomassespezifisch normierten Probenahme aus Schüttelkolbenexperimenten und Fermentationen erfolgen. Als Referenz für jede Untersuchung wurde jeweils die gleiche Probe herangezogen und machte eine Vergleichbarkeit für alle Experimente möglich. Die Eigenschaften und das Laufverhalten unterschiedlicher Gele, die Zeit der Inkubation mit dem HIS-Reagens und die Zeit des Substratumsatzes spielten somit keine Rolle. Bei der herangezogenen Referenz handelte es sich um eine Probe des Rezeptors im gleichen Expressionssystem, der in Komplexmedium exprimiert wurde. Für diesen Standard wurden Expressionslevel, Ligandenbindungsfähigkeit und Funktionalität bestimmt bzw. nachgewiesen.¹²⁰

Die zu untersuchenden Proben wurden nach der Probenahme (Normierung auf 500 µl einer optischen Dichte bei 600 nm von 0.822) für 3 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 80 µl Probenpuffer resuspendiert, gefolgt von einer standardisierten Behandlung mit Ultraschall (6 Pulse à 1 Sekunde mit 1 Sekunde Pause und einer Leistung von 27 % mit einer 3 mm Mikrospritze). Die Probe wurde erneut einer Zentrifugation bei 16000 x g für 12 Minuten unterzogen, um den entstandenen Schaum zu beseitigen. Die Lagerung bis zur Analyse mittels Western Blot erfolgte bei -20°C.

Analyse des gesamtproteinspezifischen CB2R-Gehaltes in Membranfragmenten

Der Vergleich des CB2R-Gehaltes in präparierten Membranfragmenten erfolgte über die Normierung auf die Gesamtproteinkonzentration der Proben. Als Referenz wurde der im Abschnitt „Analyse des biomassespezifischen CB2R-Gehaltes“ beschriebene Standard verwendet, der ebenfalls einer Membranfragmentpräparation unterzogen wurde. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit dem *DC Protein Assay* nach Herstellerangaben mit der Erstellung einer Kalibrierungskurve mit BSA als Standard in einer Doppelbestimmung, bei der die BSA-Konzentrationen 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 und 2.0 mg/ml verwendet wurden. Die Gesamtproteinkonzentration der präparierten Membranfragmente wurde eben-

falls mit dem *DC Protein Assay* in einer Doppelbestimmung vermessen. Mit diesen Daten erfolgte die Normierung der Proben für den Western Blot auf 5.6 µg Gesamtprotein in 80 µl PBS. Nach der Zugabe von Probenpuffer (1:1) wurden die Proben der Analyse mittels Western Blot zugeführt.

Ligandenbindungstest

Die Bestimmung der Ligandenbindungsfähigkeit der exprimierten Rezeptoren wurde an den in Membranfragmenten enthaltenen Proteinen durchgeführt. Dem Auftauen auf Eis folgte die oben beschriebene Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels *DC Protein Assay*. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 31.2 µg/ml Gesamtprotein in Bindungspuffer (4°C) normiert. Jeder Reaktionsansatz (jeweils dreifach bestimmt) wurde in einem Volumen von 200 µl angelegt, der 5 µg Gesamtprotein und die folgenden Konzentrationen an tritiummarkiertem CP55,940, einem bicyclischen Analogon des Δ^9 -THC,¹²⁹ enthielt: 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.5 und 6.0 nM. Zusätzlich wurde zur Kalkulation der unspezifischen Bindung des hydrophoben Liganden an die Membranfragmente die gleiche Prozedur durchgeführt, allerdings wurde durch die Zugabe von 1 µM unmarkiertem CP55,940 vor der Zugabe des tritiummarkierten Liganden die Sättigung der Bindungsstellen der verfügbaren Zielrezeptoren durch den im großen Überschuss vorliegenden unmarkierten Liganden erreicht. Vor der Überführung der Reaktionsansätze in die *MultiScreen_{HTS} FB*-Platten, die mit PEI-Lösung zur Verringerung der Porengröße der in den Platten enthaltenen Membranen inkubiert¹²⁰ und anschließend zweimal mit Bindungspuffer gewaschen wurden, wurde eine 1-stündige Inkubation bei 30°C durchgeführt. Der Bindungspuffer mit ungebundenen Liganden wurde über die Membranen vom Reaktionsansatz getrennt. Drei anschließende Waschschrte mit Bindungspuffer sollten die Trennung vervollständigen. Die Membranen wurden für eine Stunde getrocknet und anschließend in 4 ml *Scintisafe Plus 50% SX25-5* aufgenommen. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben im *LS 6500 Scintillation Counter* vermessen. Die Messung wurde jeweils nach 3 Stunden wiederholt. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung (7) mit der spezifischen Bindung B_{sp} [DPM], der totalen Bindung B_{total} [DPM] und der unspezifischen Bindung B_{unsp} [DPM].

$$B_{sp} = B_{total} - B_{unsp} \quad (7)$$

Die ermittelten spezifischen Bindungen für jede Ligandenkonzentration wurden zur Kalkulation der Dissoziationskonstanten k_D [nM] herangezogen, die ein Maß für die Affinität der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung darstellt. Niedrigere k_D -Werte bedeuten dabei eine

höhere Affinität. Weiterhin ist der Maximalwert der spezifischen Bindung B_{\max} ein Maß für die Anzahl der zugänglichen Bindungsstellen, sodass über diesen Wert eine qualitative Abschätzung des Expressionslevels ligandenbindungsfähiger Rezeptoren bei unterschiedlichen Experimenten möglich war. Die Bestimmung dieser Parameter wurde mit Hilfe der Gleichung (8) vorgenommen. Diese beschreibt einen hyperbolischen Verlauf und kann für Ligand-Rezeptor-Bindungen unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie genutzt werden.

$$B_{sp} = \frac{B_{\max} * c_{Lig}}{k_D + c_{Lig}} \quad (8)$$

mit der spezifischen Bindung B_{sp} [DPM], dem Maximalwert der spezifischen Bindung B_{\max} [DPM], der Dissoziationskonstanten k_D [nM] und der Konzentration des tritiummarkierten Liganden c_{Lig} [nM].

G-Protein-Aktivierungstest

Um die Funktionalität der produzierten CB2-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die in Membranfragmenten enthaltenen Proteine einem G-Protein-Aktivierungstest unterzogen. Dieser Test basierte auf der Aktivierung eines C-terminal gebundenen G-Protein-Komplexes durch die N-terminale Bindung des Liganden an den Rezeptor (Kapitel 2.1.3). Dieser G-Protein-Komplex ist in der Lage bereits gebundenes, unmarkiertes GDP gegen [^{35}S]-markiertes GTP auszutauschen, wenn eine Aktivierung stattfindet. Im angewendeten Test wurde mit einer konstanten Konzentration von Ligand, G-Proteinen und Gesamtprotein (0.75 bzw. 1.5 μg in 10 μl MOPS-Puffer) gearbeitet. Dies machte eine verlässliche qualitative Aussage über die Menge funktionaler CB2-Rezeptoren möglich.

Auf dieser Grundlage wurde der Reaktionsansatz jeweils in einer Dreifachbestimmung in gekühlten, silikonbeschichteten Glasröhrchen in folgender Reihenfolge zusammengestellt: Puffer G wurde mit jeweils 5 μl für alle Proben vorgelegt, gefolgt von der Zugabe von 10 μl der Probe. Anschließend folgten 5 μl des Liganden CP55,940-G und 10 μl der zuvor vorbereiteten G-Protein-Lösung (5 μl $\text{G}\alpha_{i1}$ -SL + 27 μl $\text{G}\beta_1\gamma_2$ -SL + 238 μl MOPS-Puffer). Die Zugabe von 20 μl des Reaktionsmix G startete die angestrebte Umsetzung. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und nach 20 Minuten mit 2 ml Stopplösung behandelt. Der Abbruch der Reaktion wurde zusätzlich durch das Abkühlen auf 4°C unterstützt. Nach der Filtration des Ansatzes über die *MF-Millipore*[®] *Membrane Filters* und dem dreimaligen Waschen mit Stopplösung wurden die Filtermembranen getrocknet. Anschließend wurden die Filter mit 5 ml *Scintisafe Econo F SX22-5* behandelt und der Messung der Radioaktivität zugeführt. Als

Negativkontrolle wurde Reaktionsmix G (20 µl) auf den Filtermembranen herangezogen. Die genutzte Positivkontrolle, die für alle Experimente als 100 % aktiv definiert wurde, stammte aus der Expression des CB2-Rezeptors im Komplexmedium. Die unspezifische Bindung des [³⁵S]-markierten GTP an den G-Protein-Komplex, also ohne Aktivierung, wurde entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll mit der Varianz des Ersetzens der Probe durch Puffer G realisiert.

Die Auswertung erfolgte auf äquivalenter Berechnungsgrundlage zum Ligandenbindungstest (Gleichung (7)). Die gemessene Radioaktivität bestimmt die spezifische Aktivität A_{sp} [DPM], indem die unspezifische Aktivität A_{unsp} [DPM], verursacht durch die G-Proteine selbst, von der totalen Aktivität der Proben A_{total} [DPM] abgezogen wird. Um die Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Einsatzmengen von Gesamtprotein (0.75 und 1.5 µg) zu erhöhen, wurde eine gesamtproteinspezifische Aktivität nach der Gleichung

$$A_{sp,GP} = \frac{A_{sp}}{m_{GP}} \quad (9)$$

mit der auf die Gesamtproteinmenge normierten spezifischen Aktivität $A_{sp,GP}$ [DPM/µg], der ermittelten spezifischen Aktivität A_{sp} und der eingesetzten Menge an Gesamtprotein m_{GP} [µg] ermittelt.

3.2 Materialien und methodische Grundlagen Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2

3.2.1 Chemikalien

30 % Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
di-Ammoniumhydrogencitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>Antifoam 204</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Bromphenolblau-Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>Coomassie G250 Brilliant Blue</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>DAB Metal Concentrate (10 x)</i>	Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, DEU
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
DL-DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Eisen-(III)-chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU

Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>INDIA His Probe[®] HRP</i>	Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, DEU
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>Low Molecular Weight Marker</i>	GE Healthcare Europe GmbH, München, DEU
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Mangansulfat-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
o-Phosphorsäure (85%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>Precision Plus Protein[®] Dual Color Standard</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DEU
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Salzsäure (37%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
<i>Stable Peroxide Substrate Buffer (1 x)</i>	Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, DEU
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Thiamin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEU
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU
Zinksulfat-Heptyhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DEU

3.2.2 Materialien und Kits

<i>HiPrep[®] 26/10 Desalting Column</i>	GE Healthcare Europe GmbH, München, DEU
<i>HiPrep[®] FF 16/10 Column</i>	GE Healthcare Europe GmbH, München, DEU
<i>Electroporation Cuvettes 25x4 mm gap</i>	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DEU

3.2.3 Geräte

ACCU CHEK [®] Aviva	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DEU
Äkta [®] FPLC [®] mit Unicorn [®]	GE Healthcare Europe GmbH, München, DEU
BIOSTAT [®] C-DCU mit MFCS/win 1.0	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen, DEU
Gaulin Homogenisator Lab 60	APV Homogeniser GmbH, Lübeck, DEU
<i>Ultrospec[®] 4000 UV/Visible Spectrophotometer</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Wien, AUT

3.2.4 Expressionsplasmid^{130,A}

Die Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde auf der Grundlage des Plasmids phY2_pET41b(+) (im Folgenden pHY2 bezeichnet), welches von Dr. Peter Schmidt (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde, untersucht und optimiert. Das Plasmid codierte den vollständigen Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 fusioniert mit einer C-terminalen *tag*-Sequenz für 8 Histidine, die zur spezifischen Anreicherung und Identifizierung genutzt wurde.

Die Grundlage einer bacteriophagen Polymerase zur Überexpression von Proteinen in Bakterien, die das verwendete Plasmid nutzt, wurde von Studier und Moffatt 1986 entwickelt.¹³¹ Dieses Expressionsplasmid wurde aufgrund der Tatsache gewählt, dass nur die bakterioophage T7-RNA-Polymerase an den T7-Promotor der pET-Vektoren binden kann. Die *E. coli*-Polymerase ist nicht in der Lage eine Bindung mit dem T7-Promotor einzugehen, daher führt das Vorhandensein dieser Polymerase auch nicht zur Synthese des Zielproteins. Die Initiation der Transkription durch beide Polymerasen, die an den entsprechenden Promotor gebunden sind, wird durch die Bindung von IPTG an den *lac*-Repressors bei Induktion und der anschließenden Verdrängung des Repressor-IPTG-Komplexes vom Operator aufgrund der Ausbildung einer Konformation des Repressors, die keine Affinität zum Operator besitzt, ermöglicht. Die artifizielle DE3-Nukleotidsequenz im Genom von *Escherichia coli* (zum Beispiel bei BL21(DE3)) codiert für die T7-RNA-Polymerase selbst, deren Expression ebenfalls durch die Zugabe von IPTG induziert wird. Diese Kombination beider Polymerasen führt zu einer sehr geringen bis nicht vorhandenen Basalexpression, die bei der Produktion des NPY2R angestrebt wurde, da menschliche, stark hydrophobe Proteine toxische Effekte auf die Zelle zeigen können. Die Überexpression in *Inclusion Bodies* kann zudem Proteinmembrankomplexe beeinflussen, die in der Bildung von ATP bei der Atmung involviert sind, und führt zur Einlagerung von Ausgangsstoffen und Sekretionsproteinen in die kompakten Proteinaggregate.¹³² Weiterhin wurde für α -helikale, hydrophobe, antimikrobielle Peptide der Nachweis geführt, dass diese keinen Effekt auf Säugerzellen zeigen, jedoch bei *E. coli* und weiteren Bakterien (grampositiv und gramnegativ) zu gehemmtem Wachstum bis hin zum Zelltod führen. Es besteht die Annahme, dass diese Peptide durch ihren hydrophoben Charakter transmembrane Poren in den Membranen von Bakterien bilden, die zur Membranpermeabilisierung und den damit verbundenen Effekten, wie Ionen- und Metabolitverlust sowie Depolarisierung, führen.¹³³⁻¹³⁵

^A Novagen, pET System Manual, 11th Edition, verfügbar unter http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/literature/c_gfib.s1O0vMAAAEjhaVumAom

3.2.5 Expressionsstamm¹³⁶

Für die Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde der *Escherichia coli*-Stamm BL21(DE3)-R3-pRARE2 (EMD, Novagen Brand, Madison, USA), auch Rosetta R3, gewählt. Dieses Derivat des BL21(DE3) verfügte über die bekannte Defizienz der Proteasen *lon*, verantwortlich für die proteolytische Degradation von „ungewöhnlichen“, also rekombinanten bzw. zellfremden Proteinen,¹³⁷ und *ompT*, einer Protease der äußeren Membran, die einige rekombinant hergestellte Proteine schneidet.¹³⁸ Weiterhin zeichnete sich dieses Derivat durch eine T1-Phagen-Resistenz und ein zusätzliches Plasmid aus, welches für die in *E. coli* seltenen und in Eukaryonten häufigeren tRNAs der Codons AGA (Arginin), AGG (Arginin), CGG (Arginin), AUA (Isoleucin), CUA (Leucin), GGA (Glycin) und CCC (Prolin) codiert. Dies führt zur Nutzung dieses Stammes als Universalübersetzer für den Großteil eukaryontischer Proteine. Eine Defizienz von benötigten tRNAs führt zu unterschiedlichen Fehlexpressionstypen, wie Translationsabbrüchen, Translationssprüngen oder dem Austausch von Aminosäuren.^B

3.2.6 Lösungen

Medienstammlösungen

Die Sterilität aller Stammlösungen wurde durch Autoklavieren bei 121°C (30 min) erreicht. Stammlösungen, die mit * gekennzeichnet sind, wurden sterilfiltriert.

Induktionsmittel

Die Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde mit IPTG induziert.

IPTG*	500 mM	≐ 119.15 g/L	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
(500 x)			

SOC-Komplexmedium¹³⁹

SOC (1 x)	20.0 mM	≐ 3.96 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
		5.00 g/L	Hefeextrakt
	2.50 mM	≐ 0.19 g/L	Kaliumchlorid
	10.0 mM	≐ 0.95 g/L	Magnesiumchlorid
	10.0 mM	≐ 2.46 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	10.0 mM	≐ 0.58 g/L	Natriumchlorid
		20.00 g/L	Pepton

^B Novagen, pET System Manual, 11th Edition, verfügbar unter http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/literature/c_gfib.s1O0vMAAAEjhaVumAom

LB-Komplexmedium (Schüttelkolben)

Chl* (2000 x)	210 mM $\hat{=}$	68.00 g/L	Chloramphenicol in Ethanol
Kan* (500 x)	103 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Kanamycinsulfat
LB-SK (1 x)	85.6 mM $\hat{=}$	5.00 g/L 5.00 g/L 10.00 g/L	Hefeextrakt Natriumchlorid Pepton

LB-Komplexmedium (Batch-Fermentation)

Chl* (2000 x)	210 mM $\hat{=}$	68.00 g/L	Chloramphenicol in Ethanol
GlcS-KM (24 x)	667 mM $\hat{=}$	132.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
MgSO ₄ -KM (24 x)	66 mM $\hat{=}$	16.3 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
Kan* (500 x)	103 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Kanamycinsulfat
LB-Batch (1.2 x)	11.2 mM $\hat{=}$	60.00 g/L 0.60 g/L	Hefeextrakt Ammoniumchlorid
K ₂ HPO ₄ -KM (12 x)	758 mM $\hat{=}$	132.0 g/L	Dikaliumhydrogenphosphat

LB-Komplexmedium (Feed-Fermentation)

Chl* (2000 x)	210 mM $\hat{=}$	68.00 g/L	Chloramphenicol in Ethanol
Kan* (500 x)	103 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Kanamycinsulfat
LB-Feed (1 x)	1.39 M $\hat{=}$	275.0 g/L 300.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat Hefeextrakt

Mineralsalzmedium¹²³ MSM-Y2

Chl* (2000 x)	210 mM $\hat{=}$	68.00 g/L	Chloramphenicol in Ethanol
GlcS (100 x im Schüttelkolben, 25 x im Batch der Fermentationen, 1.25 x im Feed)	2.78 M $\hat{=}$	550.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat

GlyS (252 x im Schüttelkolben, 63 x im Batch der Fermentationen, 3.15 x im Feed)	13.7 M $\hat{=}$	1260 g/L	Glycerin ($\hat{=}$ 100%)
Kan* (500 x)	103 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Kanamycinsulfat
MgSO ₄ (200 x)	974 mM $\hat{=}$	240.0 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MSM-Salze Y2 (10 x)	94 mM $\hat{=}$	5.00 g/L	Ammoniumchlorid
	44 mM $\hat{=}$	10.00 g/L	di-Ammoniumhydrogencitrat
	186 mM $\hat{=}$	24.60 g/L	Ammoniumsulfat
	838 mM $\hat{=}$	146.0 g/L	Dikaliumhydrogenphosphat
	178 mM $\hat{=}$	36.00 g/L	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
	141 mM $\hat{=}$	20.00 g/L	Natriumsulfat
SEL Y2* (500 x)	5.00 mM $\hat{=}$	0.740 g/L	Calciumchlorid-Dihydrat
	0.88 mM $\hat{=}$	0.210 g/L	Cobaltchlorid-Hexahydrat
	59.1 mM $\hat{=}$	17.28 g/L	EDTA
	61.6 mM $\hat{=}$	10.00 g/L	Eisen-(III)-chlorid
	0.40 mM $\hat{=}$	0.100 g/L	Kupfersulfat-Pentahydrat
	0.60 mM $\hat{=}$	0.100 g/L	Mangansulfat-Monohydrat
	0.64 mM $\hat{=}$	0.180 g/L	Zinksulfat-Hepthydrat
Thiamin* (2000 x)	593 mM $\hat{=}$	200.0 g/L	Thiamin-Hydrochlorid

Mineralsalzmedium MSM-Y2-opt

Chl* (2000 x)	210 mM $\hat{=}$	68.00 g/L	Chloramphenicol in Ethanol
GlcS (100 x im Schüttelkolben, 25 x im Batch der Fermentationen, 1.25 x im Feed)	2.78 M $\hat{=}$	550.0 g/L	D-(+)-Glucose-Monohydrat
GlyS (252 x im Schüttelkolben, 63 x im Batch der Fermentationen, 3.15 x im Feed)	13.7 M $\hat{=}$	1260 g/L	Glycerin ($\hat{=}$ 100%)
Kan* (500 x)	103 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Kanamycinsulfat
MgSO ₄ (200 x)	974 mM $\hat{=}$	240.0 g/L	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
NH ₄ Cl-SL (50 x im Schüttelkolben, 25 x im Batch der Fermentation, 50 x im Feed)	935 mM $\hat{=}$	50.00 g/L	Ammoniumchlorid pH 7.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ -SL (50 x im Schüttelkolben, 25 x im Batch der Fermentation, 50 x im Feed)	1.86 M $\hat{=}$	246.0 g/L	Ammoniumsulfat pH 7.0

MSM-Salze Y2-opt (5 x)	838 mM $\hat{=}$ 146.0 g/L	Dikaliumhydrogenphosphat
	201 mM $\hat{=}$ 40.70 g/L	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
	327 mM $\hat{=}$ 46.44 g/L	Natriumsulfat
SEL Y2-opt* (100 x)	1.40 mM $\hat{=}$ 0.2075 g/L	Calciumchlorid-Dihydrat
	0.22 mM $\hat{=}$ 0.0525 g/L	Cobaltchlorid-Hexahydrat
	14.9 mM $\hat{=}$ 4.3425 g/L	EDTA
	15.4 mM $\hat{=}$ 2.5060 g/L	Eisen-(III)-chlorid
	0.10 mM $\hat{=}$ 0.0250 g/L	Kupfersulfat-Pentahydrat
	0.15 mM $\hat{=}$ 0.0250 g/L	Mangansulfat-Monohydrat
	0.16 mM $\hat{=}$ 0.0450 g/L	Zinksulfat-Heptahydrat
Thiamin* (2000 x)	593 mM $\hat{=}$ 200.0 g/L	Thiamin-Hydrochlorid

Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE

Laufpuffer Y2 (6 x)	125 mM $\hat{=}$ 15.14 g/L	Tris
	960 mM $\hat{=}$ 72.00 g/L	Glycin
	17.4 mM $\hat{=}$ 5.00 g/L	SDS
Probenpuffer Y2 (2 x)	60 mM $\hat{=}$ 7.27 g/L	Tris/HCl pH 6.8
	5.53 mM $\hat{=}$ 3.30 g/L	Bromphenolblau-Xylencyanol
	4.10 M $\hat{=}$ 378.0 g/L	Glycerin
	717 mM $\hat{=}$ 56.00 g/L	β -Mercaptoethanol
	292 mM $\hat{=}$ 100.0 g/L	Saccharose
	173 mM $\hat{=}$ 50.00 g/L	SDS
Sammelgel	125 mM $\hat{=}$ 15.14 g/L	Tris
	819 mM $\hat{=}$ 58.20 g/L	Acrylamid
	1.45 mM $\hat{=}$ 0.33 g/L	APS
	11.7 mM $\hat{=}$ 1.80 g/L	Bisacrylamid
	3.50 mM $\hat{=}$ 1.00 g/L	SDS
	4.47 mM $\hat{=}$ 0.52 g/L	TEMED
Trenngel	375 mM $\hat{=}$ 45.42 g/L	Tris
	1.72 M $\hat{=}$ 122.2 g/L	Acrylamid
	1.53 mM $\hat{=}$ 0.35 g/L	APS
	11.7 mM $\hat{=}$ 3.78 g/L	Bisacrylamid
	3.50 mM $\hat{=}$ 1.00 g/L	SDS
	5.59 mM $\hat{=}$ 0.65 g/L	TEMED
Färbelösung	4.7 mM $\hat{=}$ 4.00 g/L	<i>Coomassie G250 Brilliant Blue</i>
	1.75 M $\hat{=}$ 105.0 g/L	Essigsäure
	11.09 M $\hat{=}$ 355.5 g/L	Methanol
Entfärbelösung	1.75 M $\hat{=}$ 105.0 g/L	Essigsäure
	9.86 M $\hat{=}$ 316.0 g/L	Methanol

Western Blot

Blockpuffer Y2	0.45 mM $\hat{=}$	30.00 g/L	BSA in TBST Y2
<i>HIS Probe</i> [®] -SL (1000 x)	0.10 mM $\hat{=}$	4.00 g/L	<i>INDIA His Probe</i> [®] HRP
HIS-Reagens	99.9 % Blockpuffer Y2 0.1 % <i>HIS Probe</i> [®] -SL		
Reaktionslösung W	5 % <i>DAB Metal Concentrate</i> (10 x) 95 % <i>Stable Peroxide Substrate Buffer</i> (1 x)		
TBST Y2	2.0 mM $\hat{=}$ 50.0 mM $\hat{=}$ 0.45 mM $\hat{=}$	0.24 g/L 2.92 g/L 0.56 g/L	Tris/HCl pH 7.4 Natriumchlorid TWEEN 20
Transferpuffer Y2	31.3 mM $\hat{=}$ 240 mM $\hat{=}$ 4.9 M $\hat{=}$	3.79 g/L 18.00 g/L 158.0 g/L	Tris Glycin Methanol

Puffer zur Inclusion Body-Präparation

IB-Puffer A	100 mM $\hat{=}$ 10.0 mM $\hat{=}$	12.11 g/L 2.92 g/L	Tris/HCl pH 7.0 EDTA
IB-Puffer B	100 mM $\hat{=}$ 60.0 mM $\hat{=}$ 1.5 M $\hat{=}$ 102 mM $\hat{=}$	12.11 g/L 17.54 g/L 87.66 g/L 63.60 g/L	Tris/HCl pH 7.0 EDTA Natriumchlorid Triton X-100
MgCl ₂ -SL	1.0 M $\hat{=}$	95.21 g/L	Magnesiumchlorid

Puffer zur Solubilisierung der präparierten Inclusion Bodies

Solubilisierungs- puffer	100 mM $\hat{=}$ 50.0 mM $\hat{=}$ 1.0 mM $\hat{=}$ 15.0 mM $\hat{=}$	12.11 g/L 7.71 g/L 0.29 g/L 4.33 g/L	Tris/HCl pH 8.0 DL-DTT EDTA SDS
-----------------------------	--	---	--

Puffer zur chromatographischen Reinigung

Die Grundlage der verwendeten Puffer zur chromatographischen Reinigung war die Herstellung der Basispuffer i. 500 mM Dinatriumhydrogenphosphat und ii. 500 mM Natriumdihydrogenphosphat. Aus diesen wurden Stammlösungen der Konzentration 500 mM NaP mit den unten angegebenen pH-Werten hergestellt, indem eine Korrektur des pH-Wertes des vorgelegten Puffers durch die Titration des jeweils anderen Puffers vorgenommen wurde.

Entsalzungspuffer	50.0 mM		NaP pH 5.7
	15.0 mM	≐ 4.33 g/L	SDS
Äquilibrierungs- puffer	50.0 mM		NaP pH 8.0
	15.0 mM	≐ 4.33 g/L	SDS
Elutionspuffer	50.0 mM		NaP pH 4.5
	15.0 mM	≐ 4.33 g/L	SDS

3.2.7 Methoden

Transformation von Rosetta R3 mit phY2 mittels Elektroporation¹³⁹

Die Transformation des *E. coli*-Stammes Rosetta R3 mit dem Plasmid phY2 wurde durch Elektroporation erreicht. Dazu erfolgte das Auftauen der elektrokompetenten Zellen und der Plasmid-DNA auf Eis und anschließend die Mischung von Zellen und DNA im Verhältnis von 50:1 (v/v). Die Elektroporation wurde in einer Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand bei einer Spannung von 1.8 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F durchgeführt. Diese Anordnung führte zu optimalen Zeitkonstanten der Pulslänge von 4.8 bis 5.0 ms.¹³⁹ Direkt im Anschluss wurden die Zellen 20:1 (v/v) in SOC-Medium suspendiert und unter Schütteln bei einer Temperatur von 37°C 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Transformanten der Adaption an die Minimalmedien zugeführt.

Adaption des Expressionswirts an die Minimalmedien

Der Start der Adaptionen des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 an die diversen Medientypen unterschied sich grundlegend zur Beschreibung in Kapitel 3.1.7, da die Überführung von bereits in LB-Medium kultivierten Zellen in minimale Medien nicht zum Wachstum führte. Das Ausplattieren der Transformanten auf Medienagar führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Zwar wurde eine Koloniebildung unter Selektionsdruck durch entsprechende Antibiotika auf LB- und Mineralsalz-Agar nachgewiesen, jedoch war eine Überführung in eine Submerskultur nicht möglich. Daher wurden die Transformanten in SOC-Medium (100 μ l) direkt in 25 ml des entsprechenden Mediums überimpft. Das Wachstum wurde durch die stündliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die Adaption und die Bewertung jeder Adaptionsphase erfolgte analog zum Kapitel 3.1.7.

Expressionstests

Der Nachweis des Zielproteins mittels SDS-PAGE bzw. Western Blot analog zu den Untersuchungen für den Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 war nicht möglich. Dies war auf eine Einlagerung des Y2-Rezeptors in *Inclusion Bodies* während der Expression und der damit ver-

bundenen schwierigen Solubilisierung im kleinen Maßstab bzw. in kurzer Zeit (Vergl. Solubilisierung der *Inclusion Bodies*, Seite 58) zurückzuführen. Die Untersuchung von Proben aus Schüttelkolbenversuchen lieferte daher hinsichtlich des Rezeptorgehaltes kein reproduzierbares Ergebnis. Aus diesem Grund wurden die Expressionstests im Fermentationsmaßstab durchgeführt. Die Parameter entsprachen denen, die im anschließenden Absatz dargestellt werden. Die Zeit nach Induktion, auf die an entsprechender Stelle hingewiesen wird, variierte in den unterschiedlichen Fermentationen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 7500 x g für 40 Minuten sedimentiert, vom Überstand getrennt und bei -80°C eingelagert. Zur Bestimmung des NPY2R-Gehaltes der Bakterien wurde die im Folgenden erläuterte *Inclusion Body*-Präparation, Solubilisierung, chromatographische Reinigung und Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

Fermentationen

Fermentationsparameter

Die Kultivierung von Rosetta R3-phY2 erfolgte mit dem 15 L BIOSTAT® C-DCU-Fermenter in einem Mediovolumen von 5 L. Die Regelung der Prozessparameter übernahm die Digitale Steuereinheit (DCU) des Bioreaktors. Eine Aufzeichnung der gemessenen Prozessgrößen wurde über die Software MFCS 1.0 vorgenommen.

Alle Fermentationen wurden mit einem Batchprozess gestartet und zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Biomasse- und Produktbildungsprofile¹⁴⁰ als Fedbatchprozess im *Open Loop Control*-Verfahren (die über das Feed gesetzte spezifische Wachstumsrate μ_{set} ist kleiner als die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max})¹⁴⁰ weitergeführt. Der Sollwert und die Regelungsstrategie für den gelösten Sauerstoff wurden analog zum Kapitel 3.1.7 übernommen. Die Parameter Temperatur und pH-Wert (analoge Regelung zu Kapitel 3.1.7) folgten bei den Optimierungsexperimenten festgelegten Profilen, die an entsprechender Stelle gekennzeichnet werden. Die Unterdrückung der Schaumbildung während des Prozesses wurde durch die sensorgesteuerten Zugabe des Antischaummittels *Antifoam 204* ermöglicht. Die Zielproteinproduktion wurde in allen Fermentationen zu diskreten Zeitpunkten durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, um die Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Experimenten zu gewährleisten. Die Induktionsdauer wird im Ergebnisteil entsprechend ausgewiesen.

Inokulum

Für die Herstellung der konzentrierten Zellmasse (Inokulum) zum Beimpfen des Kulturmediums im Fermenter wurden die adaptierten Zellen in 2 x 25 ml des entsprechenden Mediums

für 24 Stunden inkubiert (37°C, 140 rpm). Die Zellen dieser Vorkultur wurden in 5 x 200 ml Kulturmedium überimpft, um eine optische Dichte (600 nm) von ~3.0 nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei gleichen Parametern zu erreichen. Das Volumen, das zum Erreichen der optischen Dichte von 0.5 zum Start der Fermentation nötig war, wurde mit Hilfe von Gleichung (4) bestimmt und steril zentrifugiert (20 min, 7500 x g, 4°C). Das entstandene Zellpellet wurde in 50 ml sterilem Leitungswasser resuspendiert und anschließend als Inokulum für die Fermentation verwendet.

Probenahme

Während der Fermentationen wurde mit Hilfe einer halbstündlichen Probenahme das Wachstum anhand der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die Probenahme zur Bestimmung der exprimierten Zielproteinmenge erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion, auf die im Ergebnisteil hingewiesen wird.

Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Messung der Glucosekonzentration erfolgte analog zu der in Kapitel 3.1.7 dargestellten mit der Varianz der Nutzung des ACCU CHEK® Aviva-Glucosemessgerätes. Für dieses wurde ebenfalls vor jedem Fermentationsstart eine Kalibrierungskurve erstellt, die eine vergleichbare Linearität des Messverhaltens (Abbildung 9) im Messbereich bis 5 g/L Glucose auswies.

Bestimmung der Korrelation zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der Biotrockenmassekonzentration

Die Korrelation der optischen Dichte bei 600 nm zur Biotrockenmassekonzentration wurde analog zum Kapitel 3.1.7 (Vorgehensweise und Gleichungen (5) und (6)) bestimmt.

Bestimmung des Ausbeutekoeffizient Y_{XS}

Der zur Erstellung eines Feedprofils notwendige Ausbeutekoeffizient Y_{XS} , der die Menge der gebildeten Biomasse aus der jeweiligen Kohlenstoffquelle beschreibt,¹⁴⁰ wurde in mehreren Batchfermentationen ermittelt. Dazu wurde die Kohlenstoffquelle mit einer Konzentration S von jeweils 20 g/L vorgelegt, die daraus gebildete Biomasse mit Hilfe der Korrelation der optischen Dichte zur Biotrockenmassekonzentration (Gleichung (6)) bestimmt und der Ausbeutekoeffizient Y_{XS} mit der Beziehung¹²⁸

$$Y_{XS} = \frac{BTM_{Ende} - BTM_{Start}}{S} \quad (10)$$

ermittelt. Gleichung (10) beinhaltet den Ausbeutekoeffizienten Y_{XS} [g/g], die Biotrockenmassekonzentration zum Beginn der Batchphase BTM_{Start} [g/L], die erreichte Biotrockenmassekonzentration am Ende des Batches BTM_{Ende} [g/L] und die vorgelegte Menge der Kohlenstoffquelle zum Beginn des Batches S [g/L], die bei Ende des Batches vollständig metabolisiert war.

Open Loop Feed Control

Die Versorgung der Mikroorganismen nach dem Ende der Batchphase mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle wurde nach dem Ansatz des *Open Loop Feed Control* bewerkstelligt. Die Festlegung einer gewünschten spezifischen Wachstumsrate μ_{set} auf einen geringeren Wert als die maximale spezifische Wachstumsrate von Rosetta R3-phY2 ermöglichte die Korrektur von unterschiedlichen optischen Dichten am Ende der Batchphase und somit eine wesentlich erhöhte Reproduzierbarkeit der Biomasse- und Proteindaten.¹⁴⁰ Die Unterschiede der erreichten Biomasse am Ende der Batchphase werden durch Abweichungen der Startbiomasse und/oder der Konzentration der Kohlenstoffquelle bedingt.

Gleichung (11) beschreibt die Funktion, mit der definierte Feedprofile erstellt wurden, um die genannten Bedingungen zu erfüllen. Diese beinhaltet den Zustrom des Feedmediums F pro Zeiteinheit [g/h], der sich aus der gewünschten spezifischen Wachstumsrate μ_{set} [g/(g*h)], der Start-Biotrockenmassekonzentration X_{0F} [g/L] zum Zeitpunkt des Feedingstarts, dem Kulturvolumen V_{0F} [L] zum Zeitpunkt des Feedingstarts, dem Ausbeutekoeffizienten Biomasse aus Substrat Y_{XS} [g/g], der Substratkonzentration (Konzentration der Kohlenstoffquelle) im Feed S_F [g/g] und dem Zeitpunkt des Feedingstarts t_F [h] zu einer beliebigen Zeit t [h] errechnet.

$$F(t) = \frac{\mu_{\text{set}} X_{0F} V_{0F}}{Y_{XS} S_F} \exp(\mu_{\text{set}} (t - t_F))^{140} \quad (11)$$

Die Realisierung des errechneten Feedprofils erfolgte über einen gravimetrischen *Flow*-Controller, der auf der Basis des Vergleichs des intern errechneten und des aktuellen Waagenwertes eine Anpassung der Pumpgeschwindigkeit vornahm, um den vorgegebenen Sollwert zu erreichen.

Untersuchungen des Einflusses von Temperatur, pH-Wert und der eingestellten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion auf die Ausbeute des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2

Um eine Vergleichbarkeit der Experimente zur Untersuchung der Einflüsse von Temperatur und pH-Wert auf die Produktbildung zu gewährleisten, wurden alle weiteren Parameter konstant gehalten. Dies schloss bei den Temperaturuntersuchungen, mit denen begonnen wurde,

einen konstanten pH-Wert von 7.0, einen geregelten Sauerstoffpartialdruck von 30 % im Medium, eine konstante Länge der Induktion und ein festgelegtes Feedprofil ein.

Die Untersuchungen der Effekte eines veränderten pH-Wertes auf die Expression wurden bei den oben genannten konstanten Parametern und der ermittelten optimalen Temperatur durchgeführt. Den Abschluss bildeten Experimente mit verändertem Feedprofil nach Induktion bei den optimalen Parametern für Temperatur und pH-Wert.

Zellernte und Lagerung

Die Zellernte erfolgte durch das Ablassen des Kulturmediums mit den enthaltenen Zellen aus dem Fermenter, gefolgt von der Pelletierung der Mikroorganismen durch Zentrifugation bei 7500 x g und 4°C für 40 Minuten. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet gewogen (BFM [g]) und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingelagert.

Bestimmung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten

Die spezifischen Rezeptorausbeuten wurden mit einem standardisierten Protokoll bestimmt, welches die Vorgehensweise für die *Inclusion Body*-Präparation, die Solubilisierung der IBs, die chromatographische Reinigung und die Rezeptorkonzentrationsbestimmung definierte. Die ermittelten Werte der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten wurden zur Beurteilung der Effektivität der Optimierungsstrategie und zum Vergleich mit GPCR-Ausbeuten anderer Expressionssysteme herangezogen.

Inclusion Body-Präparation

Bei der Isolation der in *Inclusion Bodies* eingelagerten Rezeptoren wurde die Tatsache ausgenutzt, dass diese eine relativ hohe spezifische Dichte von ca. 1.3 mg/ml aufweisen,¹⁴¹ sodass die IBs durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Allerdings ist dazu eine äußerst effektive Zellyse erforderlich, um eine Anreicherung des entstehenden Pellets mit Zellbestandteilen und somit eine Verunreinigung der Probe zu verhindern.¹⁴² Daher wurde eine Kombination der in der Literatur¹⁴² vorgeschlagenen Vorgehensweisen, wie den Einsatz von Lysozym, einer Hochdruckdispersion, einer hohen Salzkonzentration im Waschpuffer und eines Detergens, vorgenommen. Bei Beachten dieser Schritte wird eine hoch spezifische Anreicherung des Zielproteins erreicht.¹⁴²

Der erste Schritt der Präparation war die Suspendierung des Zellpellets in IB-Puffer A, dessen Bestandteile Tris zur Pufferung des pH-Wertes und EDTA zur unterstützenden Permeabilisierung bis hin zur Lyse der Membranen eingesetzt wurde,^{143,144} mit einem 3.25-fachen Volu-

men (≈ 3.25 ml auf 1 g BFM) mit Hilfe eines UltraTurrax[®]. Einer halbstündigen Inkubation bei RT folgte entsprechend dem Gesamtvolumen des Ansatzes eine Zugabe von 0.375 mg/ml Lysozym zur Lysierung der Mikroorganismen, 10 Units/ml DNase I zur Fragmentierung der enthaltenen DNA und 3 mM Magnesiumchlorid. Magnesiumionen wirkten als Cofaktor für die DNase.¹⁴⁵ Die Wirksamkeit der Enzyme wurde durch eine Inkubation von weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur sichergestellt. Der darauffolgende Aufschluss des Zellmaterials mittels Hochdruckhomogenisator bei 600 bar (3 Zyklen) brachte eine Effizienz von ca. 98 %¹⁴⁶ pro Zyklus und somit nach 3 Zyklen einen Anteil aufgeschlossener *Escherichia coli*-Zellen von ca. 99.92 %. Dem Ansatz wurde ein halbes Volumen IB-Puffer B zugesetzt, der ebenfalls Tris zur Pufferung des pH-Wertes enthielt. Die weiteren Bestandteile Natriumchlorid (Hochsalzwaschpuffer) und Triton X-100 (Detergens) waren aus den bereits genannten Gründen enthalten. Das im IB-Puffer B enthaltene EDTA sollte nun als Chelator für Kationen mit einer Ladungszahl von $\geq +2$ zur Verhinderung der Oxidation des Zielproteins fungieren.¹⁴⁷ Der 1-stündigen Inkubation des Ansatzes bei 4°C folgte eine Sedimentierung der *Inclusion Bodies* durch Zentrifugation bei 38000 x g und 4°C für 45 Minuten. Dem Verwerfen des Überstandes folgte das Waschen der IBs mit IB-Puffer B (2 x) und IB-Puffer A. Die Waschschritte waren jeweils durch eine Zentrifugation bei den genannten Bedingungen getrennt. Das erhaltene *Inclusion Body*-Pellet wurde gewogen (m_{IB} [g]) und als Aliquanten von je 5 g bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Solubilisierung der *Inclusion Bodies*

Um die hauptsächlich aus Zielprotein bestehenden *Inclusion Bodies* zu solubilisieren, wurde jeweils ein IB-Aliquant mit 50 ml Solubilisierungspuffer versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die verwendete Lösung enthielt Tris zur Pufferung des pH-Wertes, EDTA als Chelator für mindestens zweiwertige Kationen¹⁴⁷ und DTT zur Reduktion von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, die die Effektivität der Solubilisierung von *Inclusion Body*-Proteinen stark vermindern können.¹⁴² Weiterhin wirkte SDS als denaturierendes Detergens, das mit einer CMC von etwa 3.5 bis 4.0 mM¹⁴⁸ in diesem Bereich bereits mizelläre Konstrukte bildet, die zur Stabilisierung der stark hydrophoben transmembranen Bereiche der Rezeptoren in wässriger Lösung notwendig waren.

Umpufferung des Solubilisats

Da das Solubilisat Pufferbestandteile enthielt, welche die Reinigung mit der Affinitätschromatographie (Affinität des Rezeptor-Histidin-tags zu NTA-gebundenen Ni-Ionen) erschweren

bzw. unmöglich machen, musste eine Umpufferung in einen affinitätschromatographisch konformen Puffer erfolgen. DTT wirkt als reduzierendes Agens auf die Nickelionen und wäscht zum Einen die Nickelionen aus dem Ni-NTA-Komplex und verursacht zum Anderen eine wesentlich geringere Bindefähigkeit des His-tags.^C Weiterhin sollten keine Chelatoren wie EDTA in diesem Zusammenhang genutzt werden, da EDTA die Ni-Ionen bindet und diese damit vom Komplex Ni-NTA löst.^C

Das Nutzen einer *HiPrep*[®] 26/10 *Desalting Column* machte den Austausch des proteinumgebenden Puffers gegen den Entsalzungspuffer mit hoher Effizienz und in wesentlich kürzerer Zeit und geringerem Pufferaufwand als bei einer Dialyse möglich. Die Grundlage des Puffertausches war eine Gelfiltrationschromatographie, bei der größere Moleküle (Proteine) die poröse Matrix schneller passierten als kleinere Moleküle (Pufferbestandteile), da diese weiter in die Poren eindringen und damit einen längeren Weg zurücklegen.

Der genutzte Puffer enthielt Natriumphosphat, das in einem äußerst breiten Bereich zur Pufferung des pH-Wertes genutzt werden kann, und SDS zur Aufrechterhaltung des gelösten Zustandes des hydrophoben Rezeptors in wässriger Lösung. Ein Beispiel für die angewendete Gelfiltrationschromatographie zur Umpufferung des NPY2R findet sich in folgender Abbildung.

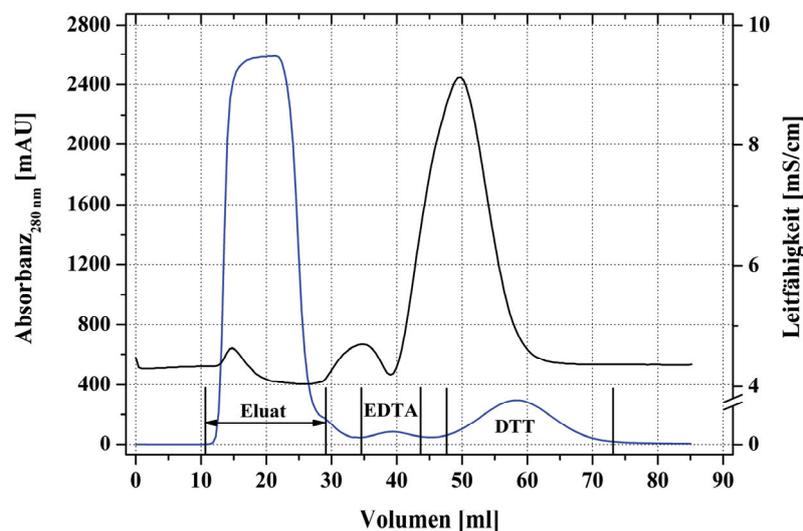


Abbildung 10: Gelfiltrationschromatographie des solubilisierten NPY2R, der in Entsalzungspuffer eluiert wurde, um DTT und EDTA aus der Umgebung des Rezeptors zu entfernen. Das dargestellte Beispiel ist der Reinigungsschritt für die Fermentation bei 38°C nach Induktion, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 h⁻¹. Die *HiPrep*[®] 26/10 *Desalting Column* wurde mit 10 ml solubilisiertem Rezeptor beladen. Das Elutionsvolumen hat ca. 18.8 ml betragen. In blau ist die Absorbanz bei 280 nm und in schwarz die Leitfähigkeit dargestellt.

^C Invitrogen, Ni-NTA Purification System - For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins. Version C, 2006, verfügbar unter: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ninta_system_man.pdf

Bei jedem Chromatographielauf (Flussrate 3 ml/min) wurde eine Äquilibration der *HiPrep*[®] 26/10 *Desalting Column* mit Entsalzungspuffer (2.5 cv) durchgeführt. Das Probevolumen des zuvor zentrifugierten (1 Stunde bei 48000 x g und 15°C) Solubilisats hat pro Lauf zwischen 10 und 11 ml des Gesamtansatzes betragen und hatte jeweils ein Elutionsvolumen von ca. 15 bis 20 ml zur Folge, die in den affinitätschromatographischen Reinigungsschritt überführt wurden.

Die Zuordnung der beiden weiteren Peaks der Absorbanz erfolgte auf der Kenntnis der enthaltenen Pufferbestandteile und der jeweiligen molekularen Massen. EDTA allein ist nicht in der Lage, Licht bei Wellenlängen größer 200 nm zu absorbieren, allerdings sind Metall-EDTA-Komplexe dazu fähig.¹⁴⁹ Damit war eine Zuweisung des ersten Peaks nach der Elutionsfraktion auf EDTA möglich. Der zweite Peak ließ sich DTT zuordnen, da dieses eine geringere Molekularmasse als EDTA aufweist. DTT ist ebenfalls nicht in der Lage Wellenlängen größer als 270 nm zu absorbieren, allerdings absorbiert die oxidierte Form von DTT mit einem Absorptionsmaximum bei 283 nm.¹⁵⁰

Reinigung des NPY2R mittels Affinitätschromatographie

Der C-terminale Histidin-*tag* des Rezeptors weist eine Affinität zu jedem Elektronenakzeptor mit 2 oder mehr positiven Ladungen, die Metallionen wie Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ und andere zur Verfügung stellen, auf. Werden diese Elektronenakzeptoren an einen Chelator, wie NTA, gebunden, sind nur 3 Bindungsstellen durch den Chelator besetzt, sodass weitere Elektronendonatoren, wie Histidin, reversibel binden können.¹⁵¹ Die natürliche mittlere Häufigkeit von Histidinen in Proteinen liegt bei ca. 2 %, ¹⁵² womit Histidin eine der am wenigsten vorkommenden Aminosäuren ist. Dabei sind diese meist auch in der Primärsequenz verteilt, sodass die *tag*-Sequenz des Rezeptors eine wesentlich höhere Affinität zum Ni-NTA-Komplex aufweist. Weitere Vorteile dieser Methode sind die Nutzbarkeit stark denaturierender Bedingungen, geringer Konzentrationen an Detergentien, Hochsalzkonzentrationen und gering konzentrierter Zielproteine.¹⁵³

Mit diesem Hintergrund wurde eine Trennung des mit einem 8-fachen His-*tag* fusionierten Y2-Rezeptors von den noch zusätzlich in den *Inclusion Bodies* enthaltenen Proteinen vorgenommen. Das vereinigte Eluat der Gelfiltrationschromatographie wurde 1:1 mit Äquilibrationspuffer versetzt, um eine Korrektur des pH-Wertes zu erreichen. Die *HiPrep*[®] FF 16/10 *Column* wurde mit 2.5 cv Äquilibrationspuffer für das Auftrag der Probe vorbereitet. Dem Auftragen der gesamten Probe folgte ein Auswaschen der nicht gebundenen Proteine mit Äquilibrationspuffer bis zur UV-Signal-Konstanz. Die Lösung des Ni-NTA-gebundenen

Rezeptors vom Komplex wurde über die Änderung des pH-Wertes (Elution mit Elutionspuffer) der Umgebung des Zielproteins erreicht. Die Reduktion des pH-Wertes hatte eine Protonierung der Histidine zur Folge, was eine Dissoziation vom Ni-NTA-Komplex bewirkte.¹⁵³ Die Darstellung einer affinitätschromatographischen Reinigung des NPY2R ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

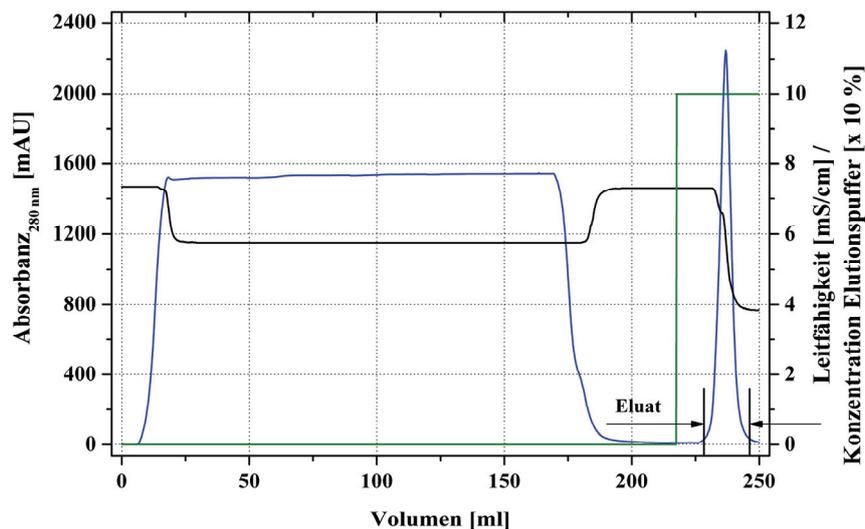


Abbildung 11: Affinitätschromatographische Reinigung des NPY2R aus *Inclusion Bodies* nach der Umpufferung mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie und der 1:1 Verdünnung mit Äquilibrationpuffer. Das dargestellte Beispiel ist der Reinigungsschritt für die Fermentation bei 38°C nach Induktion, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 h⁻¹. Das aufgetragene Volumen belief sich auf 164 ml. Bei einem Volumen von 218 ml wurde die Elution mit 100 % Elutionspuffer gestartet. Das eluierte Volumen von 15.4 ml wies eine maximale Absorbanz bei 280 nm von 2250 mAU auf. In blau ist die Absorbanz bei 280 nm, in schwarz die Leitfähigkeit und in grün die Konzentration des Elutionspuffers dargestellt.

Das aufgetragene Volumen bei der Affinitätschromatographie, das sich aus dem Eluat der Gelfiltrationschromatographie und dem zugefügten Volumen an Äquilibrationpuffer zusammensetzte, lag bei allen Untersuchungen im Bereich von 150 bis 170 ml. Eluiert wurden Volumina V_{Elu} [ml] bei den unterschiedlichen Experimenten von ca. 10 bis 20 ml. Der Wert des Volumens V_{Elu} wurde bei der Bestimmung der Gesamtproteinmenge, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, herangezogen. Die Bestimmung der Reinheit des Eluats wurde mittels SDS-PAGE und die spezifische Identifizierung des Zielproteins mittels Western Blot-Analyse durchgeführt.

Bestimmung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen NPY2R-Konzentration

Die Kalkulation der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten wurde durch die Bestimmung der Proteinkonzentration der Eluate der Affinitätschromatographie und die entsprechende Umrechnung durchgeführt. Eine Methode zur Bestimmung von Konzen-

trationen eines reinen Proteins in Lösung ist die Messung der Extinktion (auch Absorbanz) der Probe bei 280 nm. Die im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, disulfidverbrückte Cysteine und zu einem vernachlässigbar geringem Anteil Phenylalanin^{154,155} weisen jeweils eine Absorption bei 280 nm auf, die bei Kenntnis der primären Aminosäuresequenz und dem damit verbundenen molaren Extinktionskoeffizienten dazu genutzt werden können, die Konzentration des Zielproteins zu bestimmen.¹⁵⁵ Dabei musste weiterhin beachtet werden, ob im Rezeptor enthaltenen Cysteine disulfidverbrückt (Cystin) waren, da nur Cystine aber nicht die reduzierte Form eine Absorption bei 280 nm aufweisen. Die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ des Y2-Rezeptors wurde mit dem von www.expasy.ch zur Verfügung gestellten *ProtParam-Tool* durchgeführt. Die Kalkulation erfolgte auf der Basis der folgenden Gleichung^D

$$\epsilon = n_{\text{Tyrosin}} \epsilon_{\text{Tyrosin}} + n_{\text{Tryptophan}} \epsilon_{\text{Tryptophan}} + n_{\text{Cystin}} \epsilon_{\text{Cystin}} \quad (12)$$

mit dem molaren Extinktionskoeffizienten des Gesamtproteins ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], der Anzahl n_X [-] bzw. dem Extinktionskoeffizienten ϵ_X [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] der jeweiligen Aminosäuren bzw. des Disulfides.^D Die Literatur beschreibt diese Berechnungsgrundlage analog.^{155,156} Damit wurde der molare Extinktionskoeffizient der cystinhaltigen Form des NPY2R mit $\epsilon_C = 54360$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] und für die reduzierte Form auf $\epsilon_R = 53860$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] kalkuliert. Der Zusatz von DTT bei der Solubilisierung des Y2-Rezeptors bewirkte die Reduzierung der Cystine des Rezeptors, sodass ϵ_R für die Umrechnung der gemessenen Extinktion des affinitätschromatographisch gereinigten Zielproteins in die Y2-Rezeptor-Konzentration C_{Elu} mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung (13))¹⁵⁶ genutzt wurde.

$$E_{280\text{nm}} = \epsilon * C_{\text{Elu}} * d \quad (13)$$

mit der Extinktion E_{280} [-] bei einer Wellenlänge des eingestrahnten Lichts von 280 nm, dem molaren Extinktionskoeffizienten des Y2-Rezeptors ohne Cystine ϵ_R [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$], der Konzentration der Probe C_{Elu} [M] und der Schichtdicke d [cm]. Ein Beispiel der Messung eines UV-Spektrums (Verdünnung: 10-fach) ist in Abbildung 12 dargestellt. Es wurden jeweils Spektren, bei denen das Extinktionsspektrum des Elutionspuffers als Referenz genutzt wurde, von 240 bis 340 nm aufgenommen, um eventuelle Verunreinigungen der Proben mit DNA nachzuweisen. Bei in Proteinproben enthaltener DNA kann eine Überlagerung der Extinktionsspektren zu falschen Ergebnissen führen. Ist jedoch bei diesen Spektren kein lokales Maximum der Extinktion bei 260 nm zu verzeichnen,¹⁵⁷ ist die Probe nicht verunreinigt.

^D <http://www.expasy.ch/tools/protparam-doc.html>

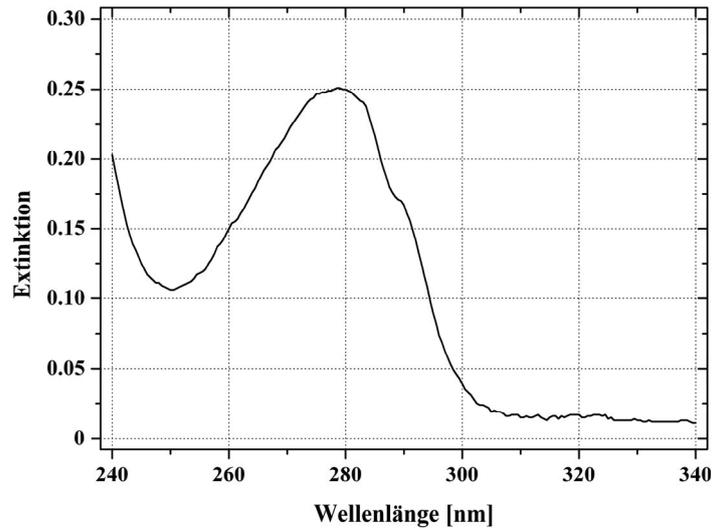


Abbildung 12: UV-Spektrum einer ca. 95 bis 98 % reinen Y2-Rezeptor-Probe im Bereich von 240 bis 340 nm. Dargestellt ist ein 10-fach-verdünntes Eluat der affinitätschromatographischen Reinigung einer Probe der Fermentation bei 38°C nach Induktion, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 h⁻¹. Die Referenz, die als Nullwert der Messung definiert wurde, war der Elutionspuffer. Der Wert der Extinktion bei 280 nm wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen.

Mit der ermittelten Proteinkonzentration des Eluates C_{Elu} [mg/ml] und dem eluierten Volumen der Affinitätschromatographie V_{Elu} [ml] konnte die Gesamtmenge des gereinigten Rezeptors m_{Rez} [mg] bestimmt werden (Gleichung (14)).

$$m_{Rez} = C_{Elu} * V_{Elu} \quad (14)$$

Die Berechnung der biomassespezifischen Proteinkonzentration des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde mit Hilfe von Gleichung (15) vorgenommen. Diese Gleichung zog zur Berechnung der biomassespezifischen Proteinkonzentration C_{sp} [mg NPY2R/g BFM] die eingesetzte Biomasse zur IB-Präparation m_{BFM} [g], die erhaltene Menge *Inclusion Bodies* aus der IB-Präparation m_{IB} [g], die eingesetzte Menge IBs zur Solubilisierung m_{IBsol} [g] und die ermittelte Gesamtmenge des Rezeptors nach der Affinitätschromatographie m_{Rez} [mg] heran.

$$C_{sp} = \frac{m_{Rez}}{m_{IBsol}} * \frac{m_{IB}}{m_{BFM}} \quad (15)$$

Aus der Gleichung zur Berechnung der biomassespezifischen Proteinkonzentration ließ sich die in der Fermentation produzierte Gesamtmenge des Y2-Rezeptors m_{ges} [mg] ableiten:

$$m_{ges} = C_{sp} * m_{BFM} = \frac{m_{Rez}}{m_{IBsol}} * m_{IB} \quad (16)$$

Durch die Division der Gesamtmenge des Rezeptors m_{ges} [mg] durch das Endvolumen der Fermentation V_{ges} [L] ließ sich die kulturvolumenspezifische Rezeptormenge $C_{V_{\text{olsp}}}$ [mg/L] bestimmen (Gleichung (17)).

$$C_{V_{\text{olsp}}} = \frac{m_{\text{ges}}}{V_{\text{ges}}} \quad (17)$$

SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des NPY2R

Es wurden zwei aufeinander aufbauende Analysemethoden zum Nachweis des Rezeptors verwendet. Der Nachweis der Reinheit und der Molekularmasse des exprimierten NPY2R wurde mit der SDS-PAGE^{158,159} und der spezifische Nachweis des Zielproteins mit der Western Blot-Analyse geführt. Ein Beispiel für die Anwendung dieser Nachweismethoden findet sich in der folgenden Abbildung.

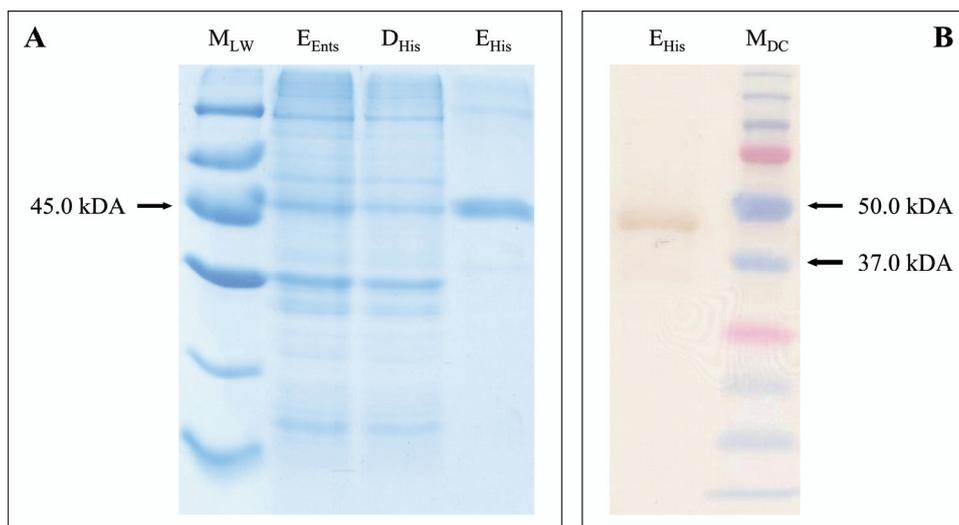


Abbildung 13: Coomassiefärbung (A) und His-tag-spezifischer Western Blot (B) der Proben der Reinigungsschritte des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 aus der Fermentation bei 38°C nach Induktion, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14h^{-1} . Als Marker zur Blaufärbung diente M_{LW} , der *Low Molecular Weight Marker*, und als Marker beim Western Blot diente M_{DC} , der *Precision Plus Protein® Dual Color Standard*. Die Probenbezeichnungen sind folgendermaßen zuzuordnen: E_{Ents} , Eluat der *HiPrep® 26/10 Desalting Column*, D_{His} , Durchlauf der *HiPrep® FF 16/10 Column*, E_{His} , Eluat der *HiPrep® FF 16/10 Column*.

Die Vorgehensweise zur Herstellung der Gele und zum Färben der Proteine mit Coomassie entsprach den Literaturangaben.^{158,159} Der in diesem Zusammenhang genutzte Molekularmassenmarker war der *Low Molecular Weight Marker*. Dieser besaß keine vorgefärbten Banden wie der *Precision Plus Protein® Dual Color Standard*, der optimal für die Durchführung der Western Blot-Analyse war, da die Farbreaktion, wie sie nach dem Protokoll in Abschnitt 3.1.7 entsteht, nicht unspezifisch an der Molekularmassenreferenz stattfand. Die Durch-

führung der Western Blot-Analyse war analog zu Kapitel 3.1.7. Für jede durchgeführte Fermentation wurden die Analysen angewendet, um eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Reinheit zu entwickeln. Der Schluss aus diesen Nachweismethoden war eine ca. 95 bis 98 % reine Zielproteinprobe nach der affinitätschromatographischen Reinigung und ein hochspezifischer Nachweis des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 mit einer molekularen Masse von 43.8 kDa.

4 Experimentelle Ergebnisse

4.1 Experimentelle Ergebnisse Cannabinoid-Rezeptor Typ 2

4.1.1 Adaption des Expressionssystems an unterschiedliche Medientypen

Um die Vergleichbarkeit der Adaptionfähigkeit des Expressionssystems BL21-130 an unterschiedliche Medientypen zu gewährleisten, wurden die Adaptionen aus einem Glycerinstock (YT-Komplexmedium) gestartet. Die bereits beschriebene Beurteilung der Adaption erfolgte mit Hilfe der spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} bzw. der damit korrelierten Verdopplungszeit t_D [h] der Mikroorganismen, die sich aus Gleichung (1) ableitet.¹²⁵

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (18)$$

Die Zunahme der maximalen spezifischen Wachstumsrate von Adaptionsphase zu Adaptionsphase ist für die Adaption von BL21-130 an MSM-CB2 5 g/L Glucose ohne Zusatz von Zitronensäure in der folgenden Abbildung visualisiert. Die optischen Dichten (600 nm) beim Start der Experimente wurden auf einen beliebigen Wert von 0.1 normiert, um bei unterschiedlichen Startwerten die Zunahme der Wachstumsrate sichtbar zu machen.

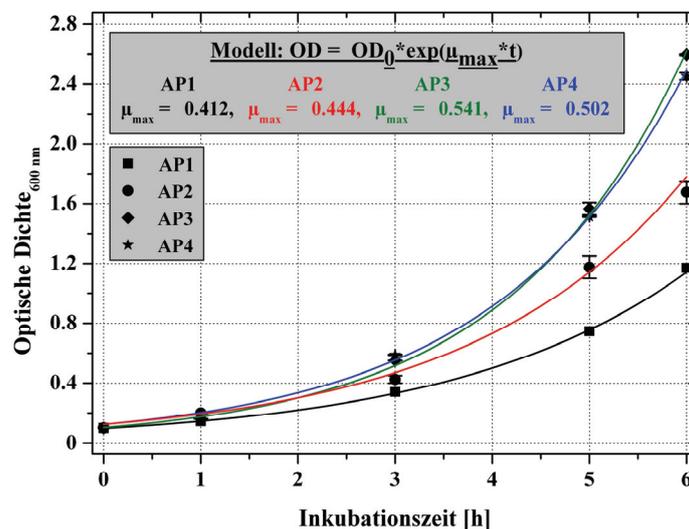


Abbildung 14: Normierte Darstellung der Wachstumskurven in den Adaptionsphasen des Expressionssystems BL21-130 in MSM-CB2 mit 5 g/L Glucose ohne Zusatz von Zitronensäure. Alle gemessenen Werte der optischen Dichte (Doppelbestimmung) wurden entsprechend der Normierung des Startwertes auf $OD = 0.1$ angepasst. Die maximale spezifische Wachstumsrate wurde entsprechend Kapitel 3.1.7 bestimmt. Die Zellen der AP3 wurden als adaptiert an die Medienzusammensetzung betrachtet, da keine weitere Zunahme der spezifischen Wachstumsrate zu verzeichnen war. Für die erste Adaptionsphase wurden die Daten nach der Überwindung einer 1-stündigen *lag*-Phase herangezogen.

Die in Abbildung 14 visualisierte Adaption wurde für die unterschiedlichen Medientypen in Tabelle 8 und Tabelle 10 zusammengefasst. Weiterhin erfolgte in der 1. Adaptionsphase eine Beurteilung der maximal erreichten Biomassen in den Medientypen YT-Komplexmedium, M9-Minimalmedium und MSM-CB2 mit Zitronensäure in den Konzentrationen 0, 0.5, 1.0 und 2.0 g/L als zusätzliche Kohlenstoffquelle bei einer konstanten Glucosekonzentration (Tabelle 9). Zitronensäure als Kohlenstoffquelle in der Form von di-Ammoniumhydrogen-citrat wurde in der Literatur als Zusatz für ein Minimalmedium beschrieben.¹²³ Das Ersetzen dieses Stoffes durch Zitronensäure eliminierte eine zusätzliche Stickstoffquelle, sodass eine effizientere, kostenorientierte, unspezifische Markierung mit ¹⁵N-Isotopen ermöglicht wurde. Allerdings stellte diese weiterhin eine zusätzliche C-Quelle dar. Entweder wären bei Verwendung der zusätzlichen Kohlenstoffquelle höhere Kosten für eine uniforme ¹³C-Isotopenmarkierung des Zielproteins entstanden oder die Effizienz der Isotopeninkorporierung in das Produkt wäre geringer gewesen, wenn das Substrat nicht die stabilen ¹³C-Isotope enthalten hätte. Daher wurde die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Zitronensäurekonzentrationen auf die Wachstumsraten und Biomasseausbeuten bei einer konstanten Glucosekonzentration durchgeführt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Zunahme der maximalen spezifischen Wachstumsraten von BL21-130 in jeder Adaptionsphase für die Medientypen MSM-CB2 Glucose, MSM-CB2 Glycerin und M9. Als Referenz wurde die maximale spezifische Wachstumsrate von BL21-130 in YT-Komplexmedium bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung für die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{\max} [h^{-1}] (in Klammern die Verdopplungszeiten t_D [h]). Der relative Fehler für μ_{\max} lag im Bereich von 0.15 bis 1.5 %.

	YT	MSM-CB2 Glucose				MSM-CB2 Glycerin		M9 Glucose
		0 g/L	0.5 g/L	1.0 g/L	2.0 g/L	0 g/L	2.0 g/L	
		Zitronensäure				Zitronensäure		
AP1	1.355 (0.51)	0.412 (1.68)	0.403 (1.72)	0.392 (1.77)	0.389 (1.78)	0.294 (2.36)	0.294 (2.36)	0.448 (1.55)
AP2	--	0.444 (1.56)	--	--	0.434 (1.60)	0.275 (2.52)	0.261 (2.66)	--
AP3	--	0.541 (1.28)	--	--	0.508 (1.36)	0.277 (2.50)	0.272 (2.55)	--
AP4	--	0.502 (1.38)	--	--	0.502 (1.38)	--	--	--

Die Entscheidung, welche Adaptionen an die jeweilige Medienzusammensetzung weitergeführt werden sollten, entstand zum Einen aus der Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate der 1. Adaption und zum Anderen aus dem Experiment, das die Bestimmung der erreichten Biomasseausbeute in Abhängigkeit der Medienzusammensetzungen bei konstanter Glucosekonzentration (1 g/L) beinhaltete. Dabei wurde die Differenz OD_{Diff} aus der

maximal erreichten und der zu Beginn des Experiments bestimmten optischen Dichte als Bewertungskriterium für die Biomasseausbeute herangezogen (Tabelle 9). Eine Bestimmung dieses Zusammenhangs für die Nutzung von Glycerin als Kohlenstoffquelle in MSM-CB2 stellte keine Vergleichbarkeit zur Anwendung von Glucose als C-Quelle in den diversen Medientypen her, da der Ausbeutekoeffizient Y_{XS} vom jeweiligen Substrat abhängt. Somit wäre der Einfluss der Kohlenstoffquelle und nicht der Einfluss der Medienzusammensetzung bestimmt worden. Daher wurde der Zusammenhang der gebildeten Biomasse aus Glycerin als Substrat nicht zum Vergleich in Tabelle 9 herangezogen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Abhängigkeit der gebildeten Biomasse von BL21-130 von der Medienzusammensetzung in MSM-CB2 und M9 bei einer Glucosekonzentration von 1 g/L. Als Referenz wurde die Kultivierung der Mikroorganismen in YT-Komplexmedium herangezogen. Die Bewertung der gebildeten Biomasse erfolgte anhand der Differenz OD_{Diff} aus der maximal erreichten und zu Beginn der Experimente bestimmten optischen Dichten bei 600 nm. Es wurde der Mittelwert aus einer Doppelbestimmung gebildet.

	YT	MSM-CB2 Glucose				M9 Glucose
		0 g/L	0.5 g/L	1.0 g/L	2.0 g/L	
		Zitronensäure				
OD_{Diff} (in AP1)	4.665 ± 0.086	0.755 ± 0	0.703 ± 0.008	0.675 ± 0.004	0.635 ± 0.021	0.398 ± 0.080

Aus diesem Experiment wurde der Schluss gezogen, dass die Medienzusammensetzung von M9 im Vergleich zu MSM-CB2 wesentlich geringere Biomasse aus gleichem Substrat generiert. Bei der Isotopenmarkierung des Zielproteins auf der Basis einer ^{13}C -Isotopen-markierten Kohlenstoffquelle hätte dies den Einsatz von etwa 90 % mehr des hochpreisigen Substrates erfordert. Somit wurde die Verwendung der M9-Medienzusammensetzung für weiterführende Experimente verworfen. Der Einsatz von Zitronensäure zeigte eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate und der Biomasseausbeute von BL21-130 in MSM-CB2 mit zunehmender Konzentration dieser zusätzlichen Kohlenstoffquelle. Im Vergleich zum Einfluss der M9-Zusammensetzung ließe sich der gleiche Schluss ziehen, allerdings waren zu diesem Zeitpunkt keine Schlüsse auf Effekte der Zitronensäure auf die Produktbildung zulässig. Weiterhin wäre ein um 20 % erhöhter Glucoseverbrauch bei höheren Zielproteinkonzentrationen vertretbar, daher wurde die Adaption von BL21-130 an MSM-CB2 Glucose und 2 g/L Zitronensäure fortgesetzt.

Die Aminosäuremedien wurden getrennt von den übrigen betrachtet, da diese, bedingt durch ihre Zusammensetzung, zwar absolut geeignet sind, um spezifisch und unspezifisch isotopenmarkierte Proteine herzustellen, aber einen sehr hohen Kostenaufwand bedeuten. Zum Anderen wären durch teilweise sehr niedrigen Löslichkeiten hochvolumige Ansätze zur

Produktion von größeren Biofeuchtmassen notwendig gewesen. Die Ergebnisse der Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate, der Verdopplungszeit und der Biomasseausbeute für AMSM 1 sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Eine 2. Adaptionphase und die Steigerung der Aminosäurekonzentrationen (AMSM 2 und AMSM 3) führten zu keinerlei Änderungen in der maximalen spezifischen Wachstumsrate, sodass alle weiteren Experimente bezüglich der Aminosäuremedien aus dieser Adaption erfolgten. Weiterhin war keine Abhängigkeit der maximalen spezifischen Wachstumsrate von der Ammoniumchloridkonzentration (0 oder 2.7 g/L) in den Aminosäuremedien bestimmbar. Die erreichten Biomassekonzentrationen von AMSM 2 und AMSM 3 wurden nicht zur Beurteilung herangezogen. Diese ließen sich aufgrund einer möglichen Limitation des Sauerstoffeintrags in Schüttelkolben¹¹⁴ bei erreichten optischen Dichten über 4 bzw. 5 und einem damit verbundenen veränderten Wachstumsverhalten nicht vergleichbar bestimmen.

Tabelle 10: Zusammenfassung der maximalen spezifischen Wachstumsraten der 1. Adaptionphase von BL21-130 in AMSM 1 angereichert mit Ammoniumchlorid und unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose. Dargestellt sind die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{\max} [h^{-1}], die Verdopplungszeiten t_D [h] und die Differenzen OD_{Diff} der maximal erreichten und zu Beginn gemessenen optischen Dichten bei 600 nm.

Aminosäure-MSM 1		
Glc	0 g/L	2 g/L
NH_4Cl	2.7 g/L	2.7 g/L
μ_{\max} [h^{-1}]	1.896 ± 0.005	1.903 ± 0.006
t_D [h]	0.366 ± 0.001	0.364 ± 0.001
OD_{Diff}	1.009 ± 0.005	3.369 ± 0

4.1.2 Analyse der biomassespezifischen CB2R-Ausbeute in Abhängigkeit vom Medientyp

Die Analyse der exprimierten Menge des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 in den unterschiedlichen Medientypen erfolgte mit Hilfe der semiquantitativen Western Blot-Analyse an biomassespezifisch normierten Zelllysaten. Diese Analyse stellte eine Vergleichbarkeit der gebildeten Proteinmenge her, indem stets die gleiche Standardprobe (BL21-130 kultiviert in YT-Komplexmedium) verwendet wurde. Alle Proben wurden in gleicher Weise normiert (Kapitel 3.1.7). Die auftretenden Unterschiede, bedingt durch das Laufverhalten der Gele oder etwa die Länge der Inkubation mit dem HIS-Reagens und der Substratlösung, spielten durch den Einsatz der Referenz keine Rolle. Diese stellte eine Vergleichbarkeit der Analysen der Bandenintensitäten (Referenzintensität $I_R = 1.0$) mit der *Kodak Molecular Imaging Software* (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) zwischen unterschiedlichen Blots her. Es konnte damit eine Bewertung erfolgen, die eine Aussage relativ zur Referenz zuließ.

Die Expressionstests für den Vergleich der Produktausbeuten in den diversen Medien wurden auf der Basis der optimalen Parameter, die für die maximale Expression des funktionalen Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 in YT-Komplexmedium bestimmt wurden,¹¹⁰ durchgeführt. Dies bedeutete eine Kultivierung der Zellen bis zur Induktion bei 37°C und eine Absenkung der Temperatur auf 20°C bei Induktion. Die Inkubationsdauer nach Induktion, die mit 0.5 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 1.0 erfolgte, wurde auf 40 Stunden festgelegt.

In Abbildung 15 sind die während der Kultivierung gemessenen optischen Dichten in MSM-CB2 Glucose mit und ohne Zitronensäure und in MSM-CB2 Glycerin ohne Zitronensäure nachvollziehbar. Der Übersichtlichkeit halber wurden die letzten gemessenen optischen Dichten 40 Stunden nach Induktion, die den letzten dargestellten Messdaten entsprachen, nicht in die Abbildung eingefügt.

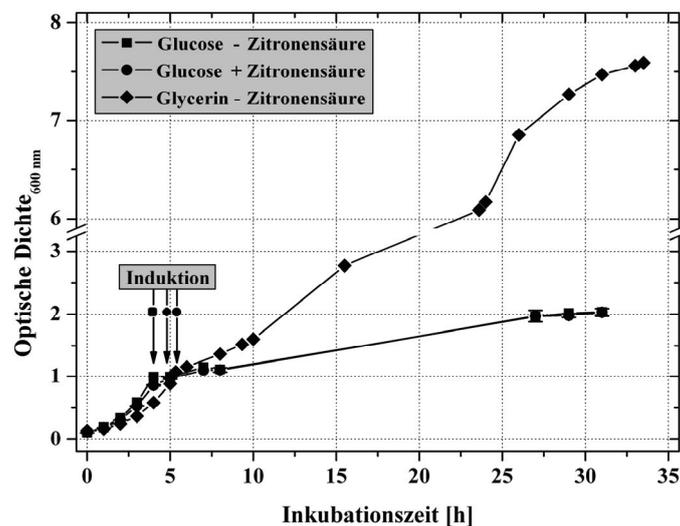


Abbildung 15: Expressionstests in MSM-CB2 auf der Grundlage unterschiedlicher Kohlenstoffquellen. Die Induktion, die bei einer optischen Dichte von 1.0 mit 0.5 mM IPTG erfolgte, wurde von der gleichzeitigen Änderung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 20°C begleitet. Nach dem letzten dargestellten Messpunkt der optischen Dichte bis zum Ende (Induktionszeit 40 Stunden) war kein weiteres Wachstum, also eine konstante optische Dichte, zu verzeichnen.

Die exprimierte biomassespezifische Ausbeute, die mit der Western Blot-Analyse bestimmt wurde, ist in Abbildung 16 nachvollziehbar. Es wurden zwei Membranen zur Analyse herangezogen. Die erste Membran stellt die biomassespezifische Proteinausbeute von MSM-CB2 Glucose in einer Doppelbestimmung (Bahn 1 & 2: 0 g/L Zitronensäure, Bahn 3 & 4: 2 g/L Zitronensäure) dar. Die zweite Membran zeigt die biomassespezifisch normierte Probe von MSM-CB2 Glycerin (Bahn 5: 0 g/L Zitronensäure) nach einer Induktionszeit von 40 Stunden. Die entsprechenden Marker und Positivkontrollen der Membranen wurden zur Identifizierung und Vergleichbarkeit mit visualisiert. Die Negativkontrolle war eine Probe aus dem nicht induzierten System in MSM-CB2 Glucose (0 g/L Zitronensäure).

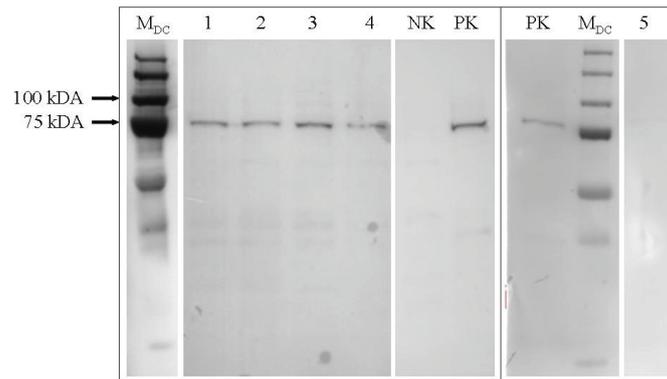


Abbildung 16: Western Blot-Analyse der Expressionsausbeuten des CB2R nach 40 Stunden Induktionszeit bei der Induktions-OD 1.0 für MSM-CB2 Glucose (Bahn 1 & 2: -Zitronensäure, Bahn 3 & 4: + Zitronensäure) und MSM-CB2 Glycerin (Bahn 5: -Zitronensäure). Weiterhin sind die Molekularmassenmarker M_{DC} und die Positivkontrollen PK der jeweiligen Membranen gezeigt. NK ist die Negativkontrolle der Membran 1.

Der offensichtliche Effekt der Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin äußerte sich nicht nur im Wachstumsverhalten nach Induktion, sondern spiegelte sich auch in der ermittelten biomassespezifischen Konzentration des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 wider. Glycerin als Substrat wurde nach diesem Experiment als ungeeignet für eine weitere Optimierung der Proteinausbeute in MSM-CB2 befunden. Zitronensäure als zusätzliche Kohlenstoffquelle zeigte weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die erhaltene Zielproteinkonzentration und veränderte das Wachstumsverhalten nach Induktion nicht. Da allerdings mit diesem Experiment der Einfluss von Zitronensäure auf die Funktionalität des CB2R nicht geklärt werden konnte, wurden die Untersuchungen mit und ohne Zugabe dieser C-Quelle fortgeführt.

Der Expressionstest für BL21-130 in den Aminosäuremedien erfolgte analog zu diesem Experiment und hatte vergleichbare Bandenintensitäten für das Zielprotein der biomassespezifisch normierten Proben wie in MSM-CB2 Glucose zur Folge.

4.1.3 Analyse der biomassespezifischen CB2R-Ausbeute in Abhängigkeit von der optischen Dichte bei Induktion

Der Einfluss der optischen Dichte bei Induktion auf die Produktbildung des Expressionssystems BL21-130 wurde für das Medium MSM-CB2 Glucose mit und ohne Zugabe von Zitronensäure untersucht. Dazu wurden Expressionstests in der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Weise vorgenommen. Die Induktion erfolgte bei den optischen Dichten 0.5, 1.0, 3.0, 4.5, 5.5, 6.0 und 12.0. Für die Induktion bei den optischen Dichten von 6.0 und 12.0 wurde jeweils die doppelte bzw. vierfache Menge des Standardvolumens von 25 ml vorgelegt, mit BL21-130 beimpft und bei Erreichen einer OD von 3.0 steril zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Resuspendieren in 25 ml frischem Medium (bei OD_{Ind} 12.0: 10 g/L Glucose), direkt gefolgt von

der Induktion (0.5 mM IPTG) und der Änderung der Inkubationstemperatur auf 20°C. Die Zellen wurden für 40 Stunden nach Induktion inkubiert. Die resultierenden Wachstumskurven des Expressionswirtes in MSM-CB2 Glucose ohne Zitronensäure (äquivalentes Wachstumsverhalten nach Induktion bei Zusatz von Zitronensäure) findet sich in Abbildung 17.

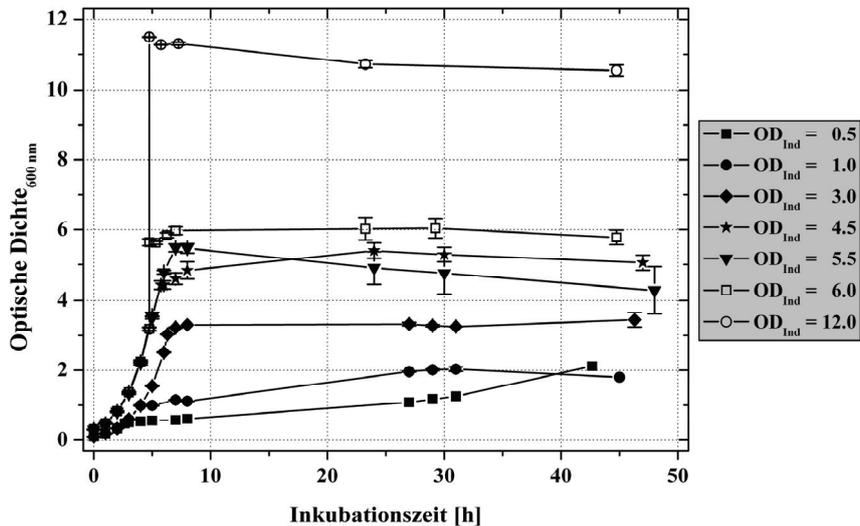


Abbildung 17: Expressionstest zur Untersuchung des Einflusses der optischen Dichte bei Induktion auf die gebildete biomassespezifische CB2R-Konzentration 40 Stunden nach Induktion. Induziert wurde die Proteinexpression bei optischen Dichten von 0.5, 1.0, 3.0, 4.5, 5.5, 6.0 und 12.0 mit 0.5 mM IPTG. Jede Bedingung wurde in einer Doppelbestimmung untersucht, deren Mittelwert dargestellt ist. Für die Induktions-ODs 6.0 und 12.0 wurden die Zellen steril durch Zentrifugation und Resuspendieren in frischem Medium aufkonzentriert. Die Temperatur vor Induktion hat 37°C und nach Induktion 20°C betragen.

Die Bestimmung der gebildeten Rezeptormenge wurde mit der Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der biomassespezifischen CB2-Rezeptor-Konzentration 40 Stunden nach Induktion durchgeführt (Abbildung 18).

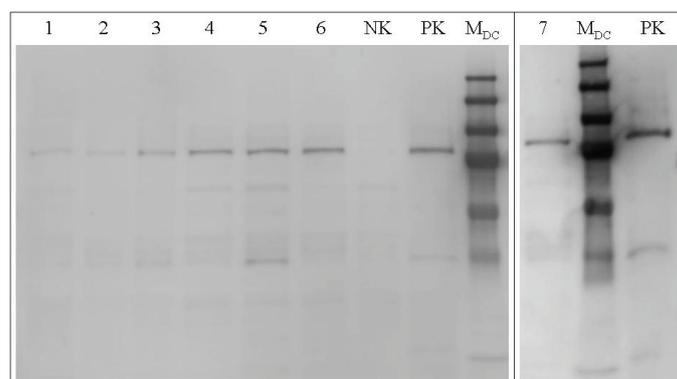


Abbildung 18: Analyse der Abhängigkeit des biomassespezifischen CB2R-Gehaltes des Expressionssystems BL21-130 von der optischen Dichte bei Induktion mittels Western Blot. Die untersuchten Proben waren: 1 $OD_{Ind} = 0.5$, 2 $OD_{Ind} = 1.0$, 3 $OD_{Ind} = 3.0$, 4 $OD_{Ind} = 4.5$, 5 $OD_{Ind} = 5.5$, 6 $OD_{Ind} = 6.0$ und 7 $OD_{Ind} = 12.0$. Als Referenz wurde die Positivkontrolle PK (CB2R exprimiert in YT-Komplexmedium, $OD_{Ind} = 0.5$), eine Negativkontrolle NK (nichtinduziertes BL21-130-System) und eine Molekularmassenreferenz M_{DC} herangezogen.

Die eindeutige Zunahme des biomassespezifischen Rezeptorgehaltes der Zellen wurde quantitativ erfasst, indem die Bandenintensität der Positivkontrolle (CB2R exprimiert in YT-Komplexmedium, $OD_{\text{Ind}} = 0.5$) auf einen Wert von 1.0 gesetzt und alle weiteren ermittelten Bandenintensitäten auf diese bezogen wurden. Die Zuordnung der relativen Produktausbeute zur optischen Dichte bei Induktion erfolgte graphisch in Abbildung 19 und zeigt die Bestätigung der getroffenen Aussage, dass eine Induktion bei höheren optischen Dichten zur Formierung höherer Zielproteinkonzentrationen führte.

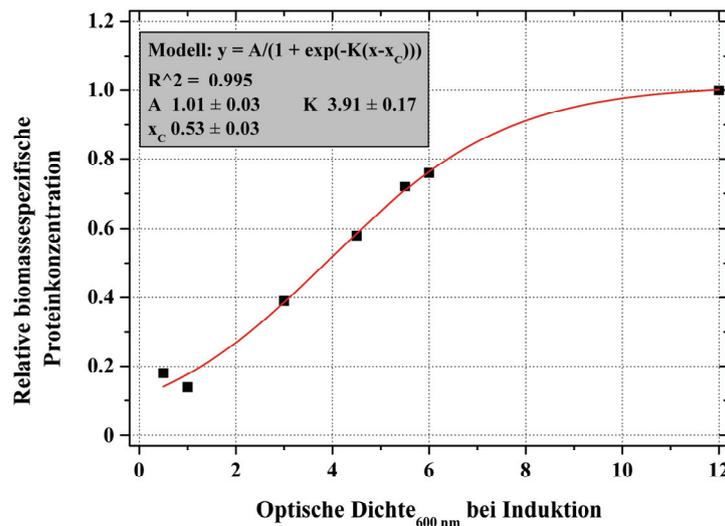


Abbildung 19: Abhängigkeit des relativen biomassespezifischen CB2R-Gehaltes von der optischen Dichte (600 nm) bei Induktion. Der CB2R-Gehalt wurde über die Analyse der Bandenintensität, resultierend aus der Western Blot-Analyse, bestimmt. Als Referenz wurde die Bandenintensität des CB2-Rezeptors, exprimiert in YT-Komplexmedium ($OD_{\text{Ind}} = 0.5$), auf einen Wert von 1.0 gesetzt. Der rein mathematische, logistisch-sigmoide Fit der Kurve wurde mit der Gleichung $y = A/(1 + \exp(-K(x-x_c)))$ vorgenommen.

Da die exprimierte Rezeptormenge keinen Schluss auf die Funktionalität zuließ, wurde für alle angegebenen Proben (außer $OD_{\text{Ind}} = 5.5$) ein G-Protein-Aktivierungstest durchgeführt. Die Proben wurden der Membranfragmentpräparation, der Normierung des eingesetzten Gesamtproteins (0.75 μg) mit Hilfe des *DC Protein Assay* und dem Aktivierungstest in einer Dreifachbestimmung (Kapitel 3.1.7) unterzogen. Als Standard für den G-Protein-Aktivierungstest wurden erneut in Komplexmedium exprimierte Cannabinoid-Rezeptoren des Typs 2 ($OD_{\text{Ind}} = 0.5$) herangezogen. Diese Referenz wurde analog zu den genannten Proben nach beschriebenen Protokollen behandelt.

Die erhaltenen Ergebnisse des Tests wurden auf 1 μg Gesamtprotein normiert und in Abbildung 20 dargestellt. Die Resultate des G-Protein-Aktivierungstests implizierten ebenfalls eine biomassespezifische Zunahme der Funktionalität (der Menge an funktionalen Rezeptoren) mit einer steigenden optischen Dichte bei Induktion.

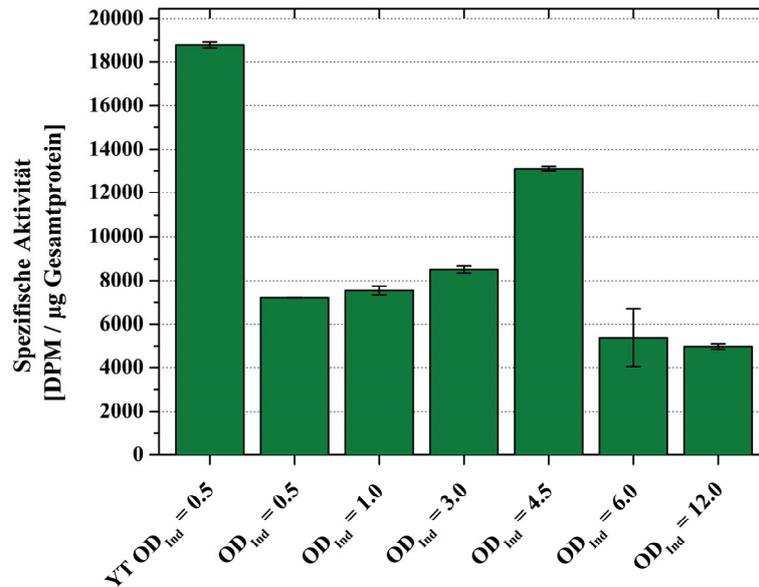


Abbildung 20: Analyse der spezifischen Aktivität der exprimierten CB2-Rezeptoren in einem G-Protein-Aktivierungstest, deren Expression bei unterschiedlichen optischen Dichten (0.5, 1.0, 3.0, 4.5, 6.0 und 12.0) induziert wurde. Bestimmt wurde die spezifische Aktivität der Rezeptoren nach einer 40-stündigen Expressionsphase. Als Referenz wurde eine Probe, produziert in YT-KM (OD_{Ind} = 0.5), genutzt. Es wurde 0.75 µg Gesamtprotein analysiert.

Die von dieser Behauptung abweichenden Aktivitäten bei OD_{Ind} = 6.0 und OD_{Ind} = 12.0 resultierten aus der Behandlung der Zellen während des Expressionstests. Das Aufkonzentrieren der Zellen direkt vor Induktion, bzw. die Inkubation bei sehr hohen Zelldichten im Schüttelkolben können Einfluss auf die Funktionalität genommen haben. Auf diese Behauptung wird im Verlauf der Arbeit noch eingegangen. Weiterhin wurden für den Zusatz von 2 g/L Zitronensäure in MSM-CB2 Glucose die gleichen Untersuchungen durchgeführt und absolut äquivalente Ergebnisse erzielt, sodass kein positiver Effekt der Zitronensäure weder auf das Wachstum der Zellen noch auf die funktionale Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 nachgewiesen werden konnte. Daher wurde aufgrund des störenden Einflusses der zusätzlichen Kohlenstoffquelle in der Isotopenmarkierung keine weitere Optimierung der Expression des Cannabinoid Rezeptors Typ 2 in dieser Zusammensetzung vorgenommen.

4.1.4 Einfluss der Temperatur nach Induktion auf die Ausbeuten und die Funktionalität der exprimierten CB2-Rezeptoren

Für die Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 in Komplexmedium wurde eine optimale Temperatur nach Induktion von 20°C ermittelt.¹¹⁰ Dieser Parameter wurde ebenfalls für die Expression im Minimalmedium untersucht, indem ein Expressionstest bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurde. Entsprechend vorhergehender Tests wurde das Expressionssystem BL21-130 bei einer Temperatur von 37°C bis zur Induktion (OD_{Ind} = 0.5) kultiviert. Anschließend folgte die Änderung der Inkubationstemperatur auf 16, 20 und 27°C.

Das Wachstumsverhalten wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (Daten nicht gezeigt) verfolgt, der gesamtproteinspezifische CB2R-Gehalt in Membranfragmenten mittels Western Blot-Analyse bestimmt und der Einfluss der Temperatur nach Induktion auf die Anzahl der funktionalen Rezeptoren über einen G-Protein-Aktivierungstest ermittelt. Die Resultate wurden in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Es erfolgte eine Normierung des gesamtproteinspezifischen CB2R-Gehaltes in Membranfragmenten und der spezifischen Aktivität auf die Standardreferenzprobe (BL21-130 kultiviert in YT-Komplexmedium und induziert bei OD = 0.5). Die Referenz wurde bei beiden Verfahren als 100 % definiert.

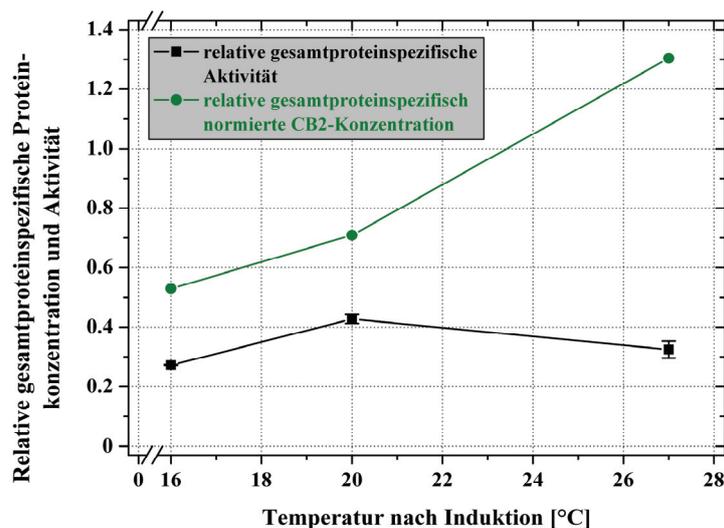


Abbildung 21: Analyse des Einflusses der Temperatur auf die CB2R-Konzentration und -Funktionalität in Membranfragmenten. Die Rezeptoren wurde auf der Basis von MSM-CB2 Glucose (ohne Zitronensäure) exprimiert. Die Darstellung erfolgte relativ zur Referenz (YT-Komplexmedium, $OD_{Ind} = 0.5$). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bandenintensität des CB2-Rezeptors in der gesamtproteinspezifisch normierten Western Blot-Analyse ermittelt. Die Aktivität wurde auf Grundlage des gesamtproteinspezifisch normierten G-Protein-Aktivierungstests an Membranfragmenten (0.75 µg Gesamtprotein) bestimmt.

4.1.5 Untersuchung der zeitabhängigen Expression anhand der Konzentration und Funktionalität des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2

Bei der bisherigen Gestaltung der Experimente wurden die Grundlagen der optimalen Expressionsparameter im Komplexmedium verwendet, um Aussagen über die Nutzbarkeit der Medienzusammensetzungen zur Proteinexpression zu gewinnen. Dies bot die Möglichkeit der Reduktion der Probenanzahl für die weiteren Optimierungsschritte. Zwar hatte sich ebenfalls eine optimale Expressionstemperatur von 20°C für die Minimalmedien ergeben, allerdings waren damit keine Aussagen zum Einfluss der Medienzusammensetzung auf die zeitabhängige Funktionalität des Rezeptors in der Expression zulässig. Daher wurden Expressionstests zur Untersuchung dieses Zusammenhangs für MSM-CB2 Glucose und die Aminosäure-

medien durchgeführt. Dazu wurden jeweils 400 ml Medium in 2 L Schüttelkolben der Zusammensetzungen I. MSM-CB2 5 g/L Glucose, II. AMSM 2 2 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid, III. AMSM 2 2 g/L Glucose 2.73 g/L Ammoniumchlorid, IV. AMSM 2 0 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid und V. AMSM 3 0 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid genutzt. AMSM 3 wurde zum Zeitpunkt der Induktion mit 400 mg/L Tryptophan angereichert. Die Induktion erfolgte bei den Medien I. bis IV. bei einer optischen Dichte von 1.0. Um den Verdünnungseffekt durch die Zugabe der Tryptophan-Stammlösung in Medium V. zu berücksichtigen, wurden die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1.1 kultiviert, das Tryptophan steril zugegeben und induziert. Es wurde eine Temperatur von 20°C nach Induktion mit 0.5 mM IPTG für alle Medientypen festgelegt. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Expressionsrate und Funktionalität der Zielproteine bestimmen zu können, erfolgte eine Probenahme 4, 10, 18, 28 und 42 Stunden nach Induktion. Diese Proben wurden auf die gesamtproteinspezifische CB2R-Konzentration und -Aktivität in Membranfragmenten untersucht. Die resultierenden Wachstumskurven sind in Abbildung 22 dargestellt.

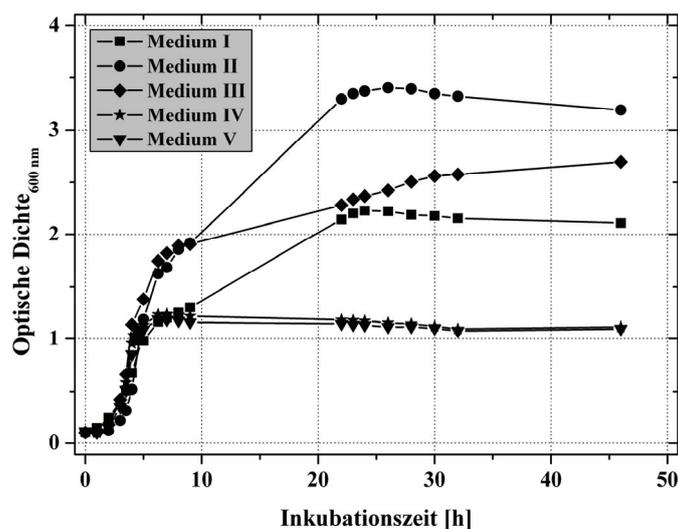


Abbildung 22: Wachstumsverhalten während des Expressionstests in unterschiedlichen Mineralsalzmedien zur Untersuchung der zeitabhängigen Produktion des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2. Die Induktion der Expression in den verwendeten Medientypen, I. MSM-CB2 5 g/L Glucose, II. AMSM 2 2 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid, III. AMSM 2 2 g/L Glucose 2.73 g/L Ammoniumchlorid, IV. AMSM 2 0 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid und V. AMSM 3 0 g/L Glucose 0 g/L Ammoniumchlorid mit Zugabe von Tryptophan (400 mg/L) bei Induktion, erfolgte bei einer optischen Dichte von 1.0 mit einer IPTG-Konzentration von 0.5 mM. Die Inkubationstemperatur von 37°C wurde bei Induktion auf 20°C geändert.

Die Proben der genannten Stunden wurden einer Membranfragmentpräparation unterzogen und der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes zugeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des CB2R-Gehaltes mittels Western Blot-Analyse (Abbildung 23) und der Funktionalität mit Hilfe des G-Protein-Aktivierungstests (Abbildung 24).

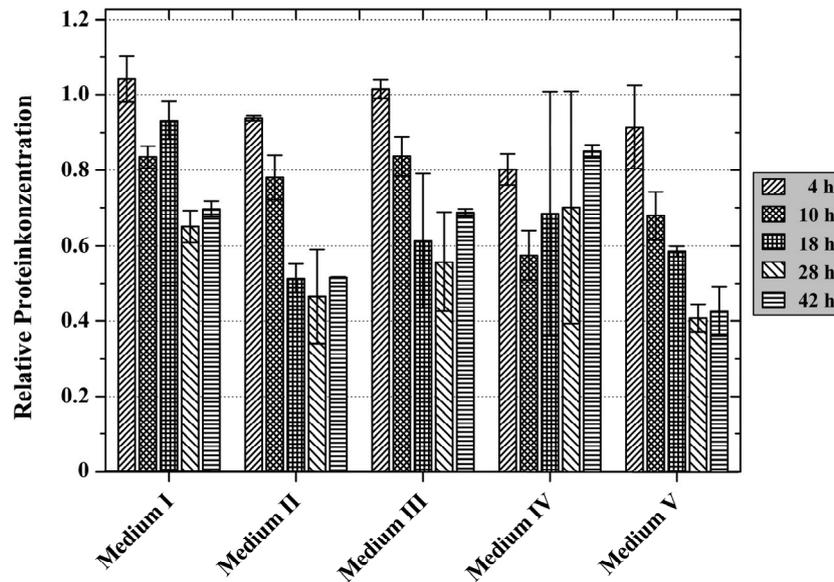


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der relativen CB2R-Konzentration während einer 42-stündigen Expressionsphase des Produktionssystems BL21-130 in unterschiedlichen Minimalmedien. Die Kultivierung wurde in folgenden Medien vorgenommen: I. MSM-CB2 5 g/L Glucose, II. AMSM 2 2 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl , II. AMSM 2 2 g/L Glucose 2.73 g/L NH_4Cl , IV. AMSM 2 0 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl , V. AMSM 3 0 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl mit Zugabe von 400 mg/L Tryptophan bei Induktion, die mit 0.5 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 1.0 für alle Medien erfolgte. Die Proben zur Analyse mittels Western Blot wurden zu den Zeitpunkten 4, 10, 18, 28 und 42 Stunden nach Induktion entnommen und biomassespezifisch und gesamtproteinspezifisch in Membranfragmenten normiert. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert der auf die Referenz (YT-KM, $\text{OD}_{\text{Ind}} = 0.5$) bezogenen Proben aus beiden Normierungen.

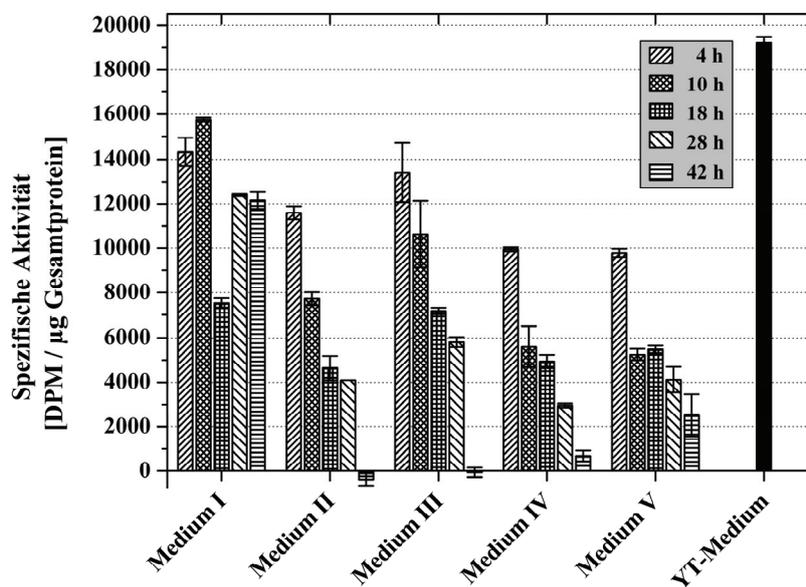


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität der in unterschiedlichen Mineralsalzmedien exprimierten Cannabinoid-Rezeptoren des Typs 2. Die Expression wurde in folgenden Medien untersucht: I. MSM-CB2 5 g/L Glucose, II. AMSM 2 2 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl , III. AMSM 2 2 g/L Glucose 2.73 g/L NH_4Cl , IV. AMSM 2 0 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl und V. AMSM 3 0 g/L Glucose 0 g/L NH_4Cl mit Zugabe von 400 mg/L Tryptophan bei Induktion. Die Proteinsynthese wurde bei einer optischen Dichte von 1.0 induziert. Es erfolgte eine Analyse der spezifischen Aktivität von 0.75 μg Gesamtprotein mit dem G-Protein-Aktivierungstest an Proben 4, 10, 18, 28 und 42 Stunden nach Induktion in einer Doppelbestimmung.

Die Analyse des CB2R-Gehaltes der Proben mittels Western Blot erfolgte über die biomasse-spezifische und gesamtproteinspezifische Normierung in Membranfragmenten. Aus den ermittelten Bandenintensitäten für alle genannten Proben aus beiden Normierungen wurde der Mittelwert gebildet und anschließend bezogen auf die Referenz (YT-KM, $OD_{\text{Ind}} = 0.5$, gesetzt als 100 %) dargestellt (Abbildung 23). Diese Proben wurden ebenfalls auf ihre spezifische Aktivität in einem gesamtproteinspezifisch normierten G-Protein-Aktivierungstest untersucht, um die Funktionalität der exprimierten Rezeptoren bzw. die Quantität der funktionalen Rezeptoren im Verlauf der Produktionsphase zu ermitteln (Abbildung 24). Als zusätzliches Mittel zur Beurteilung der Funktionalität der Rezeptoren und zur Verifizierung der erhaltenen Daten aus dem G-Protein-Aktivierungstest wurden vier repräsentative Proben einem Ligandenbindungstest unterzogen. Diese Proben waren jeweils die 4. und 18. Stunde nach Induktion der Medien I und III. Die ermittelten Ergebnisse finden sich in Abbildung 25.

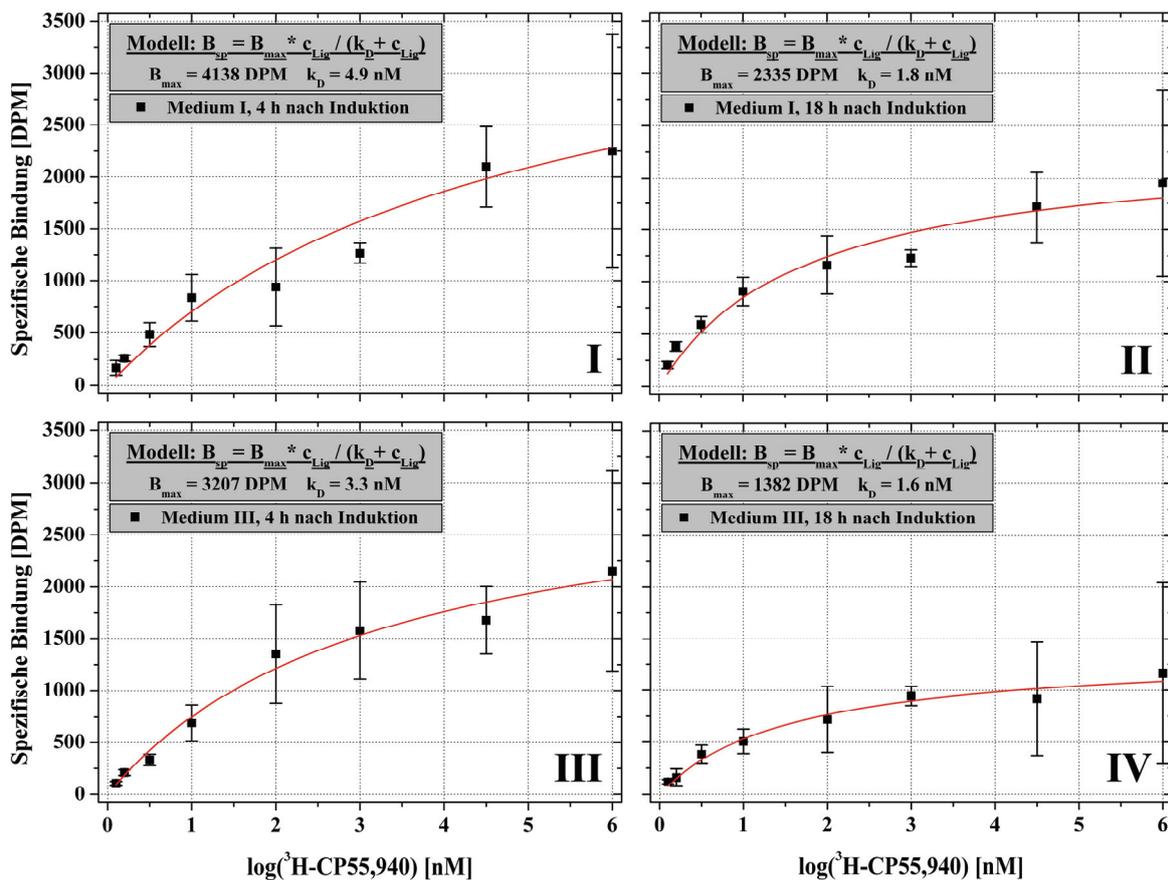


Abbildung 25: Ligandenbindungstest an ausgewählten Proben der Untersuchung der zeitabhängigen Expression in unterschiedlichen Mineralsalzmedien. Es wurde die 4. bzw. 18. Stunde nach Induktion der Expressionstests in den Medien I. MSM-CB2 5 g/L Glucose (Bild I: 4. Stunde, Bild III: 18. Stunde) und III. AMSM 2 2 g/L Glucose 2.73 g/L NH_4Cl (Bild II: 4. Stunde, Bild IV: 18. Stunde) auf Ligandenbindefähigkeit untersucht. Die gesamtproteinspezifisch normierten Proben (10 μg) wurden in einer Dreifachbestimmung für totale und unspezifische Bindung jeweils mit 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.5 und 6.0 nM tritiummarkiertem Liganden CP55,940 inkubiert, gewaschen und vermessen. Dargestellt sind die ermittelten Bindungskurven nach Berücksichtigung der unspezifischen Bindung.

Die Resultate des Ligandenbindungstests erlauben aber aufgrund der großen Fehler, die durch die unspezifische Bindung des stark hydrophoben Liganden CP55,940⁶² an die Membranfragmente entstanden, nur folgende Aussagen. Analog zur Messung der Aktivität konnte eine Abnahme der Anzahl bindefähiger Rezeptoren, bestimmt über die Höhe der Asymptoten B_{\max} der angewendeten Gleichung, im Verlauf der Inkubationszeit nach Induktion nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine hohe Affinität des Liganden zu den Cannabinoid-Rezeptoren mit einem k_D -Wert im niedrigen, einstellig nanomolaren Bereich gezeigt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse aus diesen Experimenten ließen den Schluss auf negative Effekte von Aminosäuren als Kohlenstoffquelle für die Funktionalität der produzierten Rezeptoren zu. Bei der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle zeigte sich die starke Abnahme der Funktionalität der gesamtproteinspezifisch normierten Proben mit der Inkubationszeit nicht. Dieser Effekt, vereint mit der Erkenntnis, dass höhere optische Dichten bei Induktion höhere biomassenspezifische Rezeptorkonzentrationen verursachen, führte zur Weiterentwicklung der Optimierungsstrategie, die im nächsten Abschnitt ausgeführt wird. Die Aminosäuremedien waren zwar sehr gut geeignet, um die spezifische Isotopenmarkierung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 mit ^{15}N - ^{15}N -L-Tryptophan in einer kurzen Expressionsphase vorzunehmen, allerdings war eine kostenorientierte Nutzung dieses Medientyps zur Expression des CB2-Rezeptors nicht möglich. Der Grund dafür lag in der Begrenzung der maximalen optischen Dichten durch die maximale Löslichkeit einiger Aminosäuren. Die Strategie des Aufkonzentrierens der Zellen konnte ebenfalls nicht angewendet werden, da für dieses Vorgehen negative Effekte auf die Funktionalität des Cannabinoid-Rezeptors nachgewiesen wurden (Kapitel 4.1.3).

4.1.6 Maximierung der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2-Ausbeuten zur spezifischen Isotopenmarkierung mit ^{15}N - ^{15}N -Tryptophan

Die Maximierung der CB2R-Ausbeuten und -Funktionalität, exprimiert im Mineralsalzmedium, wurde im Fermentationsmaßstab weitergeführt, da dabei eine wesentlich verbesserte Prozesskontrolle und erhöhte Reproduzierbarkeit gegeben ist. Um das Ziel eines spezifisch Tryptophan- ^{15}N -isotopenmarkierten Rezeptors zu erreichen, wurden zwei Fermentationen analog mit MSM-CB2 Glucose durchgeführt. Die Zugabe von 200 mg/L unmarkiertem L-Tryptophan zur Induktionszeit erfolgte allerdings nur in einer Fermentation, um die Auswirkungen dieses Medienzusatzes zu studieren. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 10.0 mit 0.5 mM IPTG. Die resultierende Wachstumskurve und die gemessene Glucosekonzentration im Medium der Fermentation mit Zugabe von Tryptophan ist in

Abbildung 26 visualisiert. Die gemessenen Daten der optischen Dichte wurden mit der Verdünnung, die durch die Zugabe von Glucose und Ammoniumchlorid entstand, korrigiert.

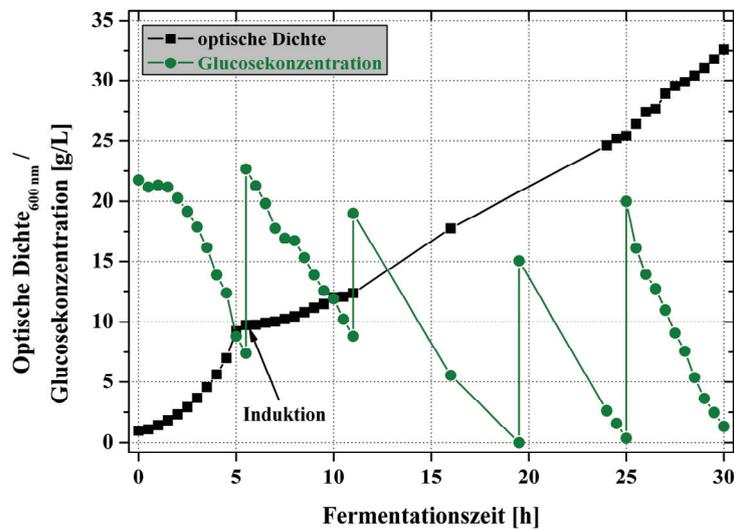


Abbildung 26: Wachstumsverhalten von BL21-130 in einer Fermentation mit dem Minimalmedium MSM-CB2 Glucose, bei der zur Induktionszeit 200 mg/L L-Tryptophan zugesetzt wurde. Dargestellt sind die Daten der optischen Dichte, gemessen bei 600 nm, und der Glucosekonzentration im Medium, bestimmt mit dem *Assure[®] 3 Blood Glucose Monitoring System*. Die Induktion erfolgte nach Absenkung der Temperatur von 37°C auf 20°C bei einer optischen Dichte von 10.0 mit 0.5 mM IPTG. Die Inkubation nach Induktion wurde für 24 Stunden fortgeführt.

Zur Durchführung der Untersuchungen zum Zielproteingehalt und zur Funktionalität der exprimierten Rezeptoren wurden bei beiden Fermentationen zu den Zeitpunkten 4, 10, 18 und 24 Stunden nach Induktion Proben genommen. Zusätzlich wurde bei der Fermentation, bei der Tryptophan zugegeben wurde, eine Probenahme 2.5 Stunden nach Induktion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Schulter im Verlauf der gemessenen Glucosekonzentration sichtbar, die den Schluss auf eine veränderte Glucoseaufnahme der Zellen zuließ. Dieser Effekt war nicht bei der Fermentation ohne Zugabe von Tryptophan feststellbar. Sämtliche Proben der Fermentationen wurden in der Western Blot-Analyse und im G-Protein-Aktivierungstest untersucht. Für beide Methoden wurden die Proben in Membranfragmenten gesamtproteinspezifisch normiert. Bei der Western Blot-Analyse wurden die gemessenen Bandenintensitäten auf die Referenz (YT-Komplexmedium $OD_{\text{Ind}} = 0.5$, als 100 % definiert) bezogen, deren Ergebnis in Abbildung 27 dargestellt ist. Die Analyse der Fähigkeit der exprimierten Rezeptoren, in Abhängigkeit der Expressionszeit G-Proteine zu aktivieren, ist in Abbildung 28 zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Referenz (YT-KM, $OD_{\text{Ind}} = 0.5$) mit analysiert. Die Ergebnisse des Tests wiesen auf eine Verschiebung der maximalen Anzahl funktionaler Rezeptoren von 10 auf 4 Stunden nach Induktion bei Zugabe von Tryptophan bei

sonst konstanten Bedingungen hin, wobei etwa die gleiche Anzahl G-Protein-aktivierender Rezeptoren bestimmt wurde.

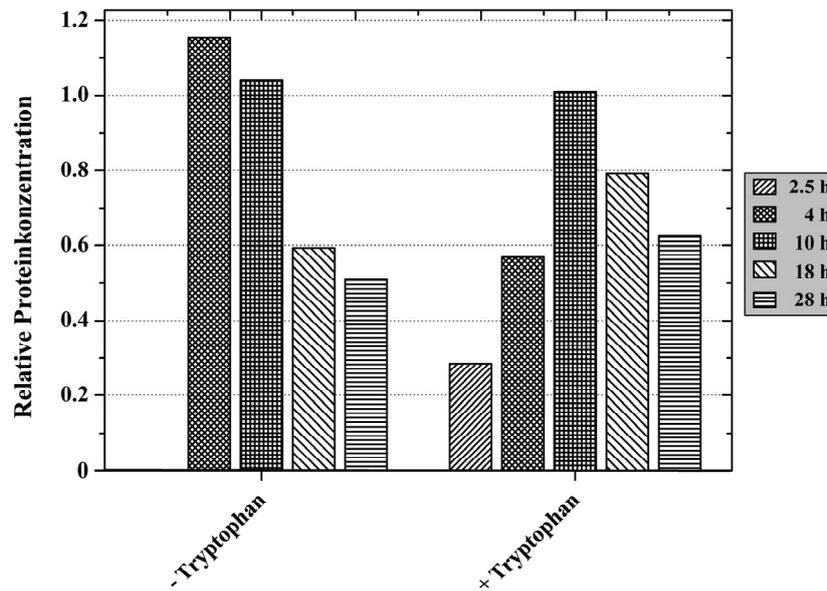


Abbildung 27: Analyse des gesamtproteinspezifisch normierten CB2R-Gehaltes in Membranfragmenten aus äquivalenten Fermentationen in MSM-CB2 Glucose mit dem Unterschied der Zugabe von 200 mg/L L-Tryptophan zur Induktionszeit in der zweiten Fermentation. Die optische Dichte bei Induktion mit 0.5 mM IPTG war jeweils 10.0. Die Zeitpunkte der Analyse wurden auf (2.5), 4, 10, 18 und 24 Stunden festgelegt. Die Normierung der jeweiligen Bandenintensitäten erfolgte anhand der Referenz (YT-Komplexmedium $OD_{Ind} = 0.5$), die als 100 % definiert wurde.

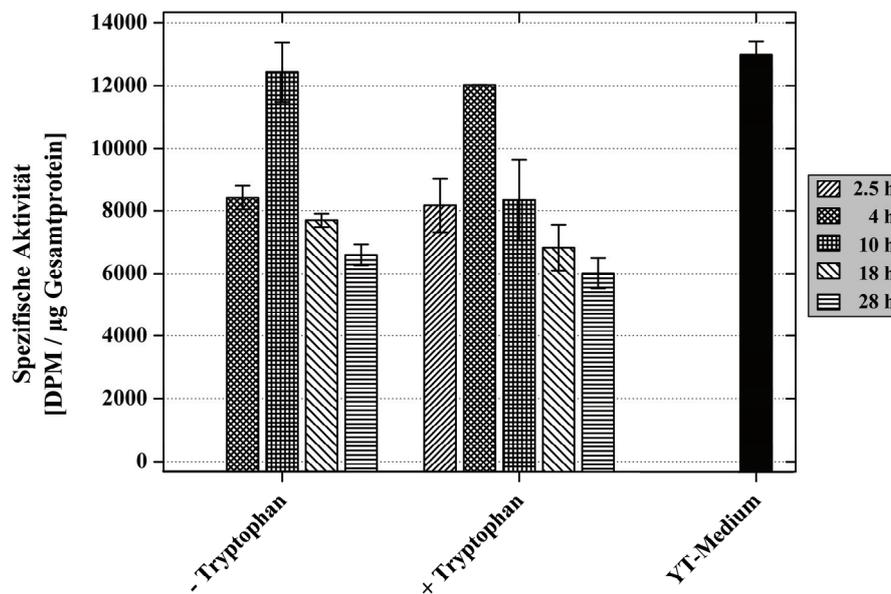


Abbildung 28: Analyse der spezifischen Aktivität der exprimierten Cannabinoid-Rezeptoren des Typs 2 im zeitlichen Verlauf von Fermentationen in MSM-CB2 Glucose. Bei der zweiten Fermentation wurde zur Induktionszeit 200 mg/L L-Tryptophan zum Medium hinzugefügt. Die Proben (2.5), 4, 10, 18 und 24 Stunden nach Induktion wurden gesamtproteinspezifisch normiert und jeweils 0.75 µg Gesamtprotein dem G-Protein-Aktivierungstest unterzogen.

Die erhaltenen Ergebnisse dieses G-Protein-Aktivierungstests bestätigten eine weitere Zunahme der Anzahl funktionaler Cannabinoid-Rezeptoren des Typs 2 im Expressionssystem BL21-130 mit einer steigenden optischen Dichte nach Induktion (Abbildung 20). Mit diesem Resultat konnte die Behauptung in Kapitel 4.1.3, dass die Vorgehensweise des Aufkonzentrierens der Zellen bzw. die hohen optischen Dichten (6.0 und 12.0) im Schüttelkolben die Funktionalität der Rezeptoren beeinflussten, verifiziert werden. Dieser bewiesene Zusammenhang und die Erkenntnisse aus den Expressionstests im Fermentationsmaßstab für die Verwendung von Tryptophan als zusätzliche Kohlenstoffquelle führten zu der optimalen Strategie, um eine maximale kulturvolumenspezifische Anzahl an funktionalen, spezifisch Tryptophan-¹⁵N-isotopenmarkierten Cannabinoid-Rezeptoren in *Escherichia coli* zu produzieren.

Da eine optische Dichte von 10.0 bei Induktion positive Effekte auf die Ausbeute allgemein und an funktionalen Rezeptoren hatte und keine Reduktion dieser Ausbeute bei höheren Zelldichten zu erwarten war, wurde die optische Dichte zur Induktionszeit auf 20.0 für die Fermentation mit ¹⁵N-Isotopen angereichertem Tryptophan festgelegt. Damit konnte eine Erhöhung des kulturvolumenspezifischen Rezeptorgehaltes erwartet werden. Weiterhin sollte die Erhöhung der Induktorkonzentration auf 1 mM bei doppelter Zellzahl bei Induktion eine zu den bisherigen Experimenten vergleichbare Verfügbarkeit für alle Zellen sichern. Das erhaltene Glucosekonzentrationsprofil in der Fermentation mit unmarkiertem Tryptophan, bei dem eine geringere Substrataufnahmerate etwa 2 Stunden nach Zugabe der Aminosäure festgestellt wurde, deutete auf die Aufnahme des Tryptophans hin. Aus diesem Grund wurde die Induktionszeit auf 2 Stunden nach Zugabe von 225 mg/L ¹⁵N-¹⁵N-Tryptophan festgelegt. Der Zusatz der Aminosäure erfolgte bei Erreichen der Inkubationstemperatur zur Expression von 20°C (optimale Temperatur bestimmt in Kapitel 4.1.4). Die Inkubationszeit nach Induktion wurde auf 4 Stunden verkürzt, da bei der Zugabe von Tryptophan eine maximale Anzahl an funktionalen Rezeptoren zu diesem Zeitpunkt bestimmt wurde (Abbildung 28).

Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Weiterhin wurde die Glucosekonzentration gemessen und eine stündliche Probenahme nach Induktion für die Durchführung der Analysen der relativen Proteinkonzentration bzw. Funktionalität vorgenommen. Die gemessenen Daten der optischen Dichte, die mit der Verdünnung durch die Zugabe von Glucose, Ammoniumchlorid und Tryptophan korrigiert wurden, sowie der Verlauf der Substratkonzentration dieser Fermentation finden sich in Abbildung 29. Die Analyse des gesamtproteinspezifisch normierten Rezeptorgehaltes der präparierten Membranfragmente der Fermentationsroben wurde analog zu vorherigen Experimenten durch eine referenznormierte Intensitätsbestimmung der aus dem Western Blot resultierenden Banden vor-

genommen (Abbildung 30). Eine zeitabhängige qualitative Beurteilung der Anzahl funktionaler Rezeptoren, die in der Fermentation zur spezifischen Isotopenmarkierung produziert wurden, erfolgte über den G-Protein-Aktivierungstest und wurde relativ zur Referenz (CB2R produziert in YT-KM, $OD_{Ind} = 0.5$) dargestellt (Abbildung 30).

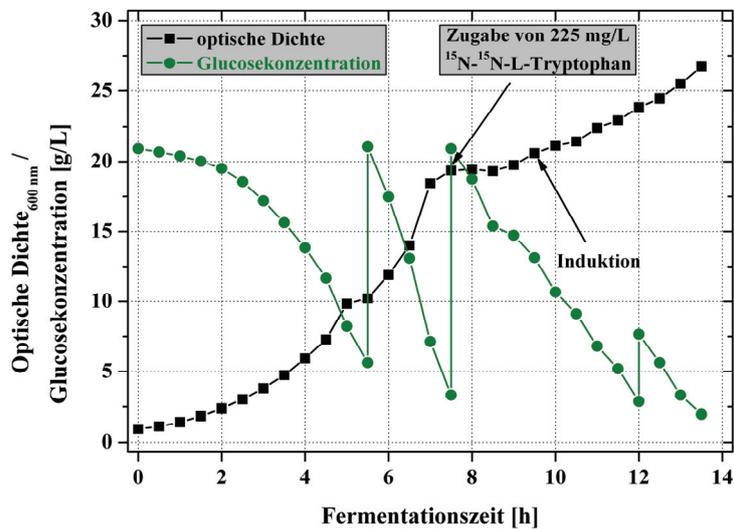


Abbildung 29: Wachstumsverhalten und Glucoseverbrauch des Expressionssystems BL21-130 in einer Fermentation auf der Grundlage des Mediums MSM-CB2 Glucose, dem 2 Stunden vor Induktion 225 mg/L $^{15}\text{N}_2$ -L-Tryptophan zugesetzt wurde. Die Reduktion der Temperatur von 37°C auf die optimale Expressionstemperatur von 20°C erfolgte innerhalb von 30 Minuten beginnend bei Stunde 7. Bei Erreichen der Expressionstemperatur wurde dem Medium isotopenmarkiertes Tryptophan zugesetzt. Nach Ablauf von weiteren 2 Stunden erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Die Probenahme für die Western Blot-Analyse und den G-Protein-Aktivierungstest erfolgte stündlich beginnend bei Induktion.

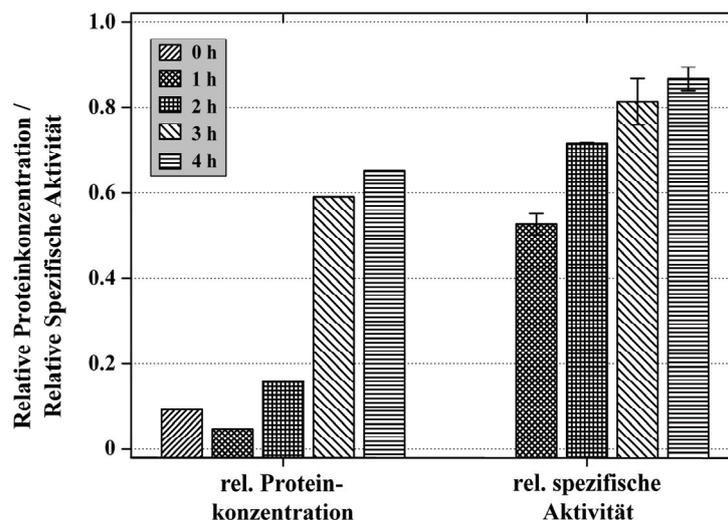


Abbildung 30: Verlauf der relativen Proteinkonzentration und der relativen spezifischen Aktivität der exprimierten Zielproteine in der Fermentation zur spezifischen Isotopenmarkierung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 nur an den enthaltenen Tryptophanen. Zur Analyse im Western Blot und G-Protein-Aktivierungstest wurde eine gesamtproteinspezifische Normierung in Membranfragmenten durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse ergaben sich durch das Beziehen der Messergebnisse auf die Referenz (YT-Komplexmedium $OD_{Ind} = 0.5$, definiert als 100 %).

Die weitere Charakterisierung der hergestellten Cannabinoid-Rezeptoren des Typs 2 wurde von Dr. Alexei Yeliseev, Dr. Tomohiro Kimura und Lioudmila Zoubak (*Section of Nuclear Magnetic Resonance, LMBB, NIH, Rockville, MD, USA*) vorgenommen. Es erfolgte eine Reinigung des Cannabinoid-Rezeptors, gefolgt von einer Rekonstitution. Die erhaltene Menge aus 1 Liter Kulturmedium an reinem, rekonstituiertem Rezeptor wurde mit 2 mg bestimmt.¹⁶⁰ Die Analyse der Effizienz der Inkorporation des ¹⁵N₂-L-Tryptophans in die Primärsequenz des CB₂-Rezeptors wurde von Dr. Jenny T.C. Ho und Dr. Sonja Hess (*Proteome Exploration Laboratory, Beckman Institute, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA*) mittels LC-MS/MS untersucht.¹⁶⁰ Das verwendete Protokoll¹⁶¹ wurde bereits für den Neurotensin-Rezeptor Typ 1 erfolgreich angewendet und sah die Behandlung des gereinigten Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 mit Bromcyan und anschließend mit Trypsin zur Spaltung in bestimmte Peptidsequenzen vor, die dann auf ihre molekulare Masse untersucht wurden. Dabei liefert ein ¹⁵N eine um 1 u (1 u (atomare Masseneinheit) $\hat{=}$ 1 Da) erhöhte atomare Masse im Vergleich zum ¹⁴N. Damit war eine Unterscheidung spezifisch ¹⁵N-markierter Tryptophane von Tryptophanen mit ¹⁴N-Atomen möglich. Die Untersuchungen zeigten eine Effizienz der Tryptophaninkorporierung in den Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 von mindestens 95 %.¹⁶⁰ Allerdings wurde der Verlust des ¹⁵N-Atoms der α -Aminogruppe des Tryptophans nachgewiesen.¹⁶⁰

4.1.7 Mathematische Beschreibung des Fermentationsprozesses zur aminosäurespezifischen Isotopenmarkierung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2

Es wurde für die rein mathematische Erfassung der Prozessgrößen ein einfaches Simulationsmodell etabliert. Bei weiteren Untersuchungen der Einflüsse unterschiedlicher Prozessparameter (pH-Wert, Feedstrategie) wäre die Entwicklung eines komplexeren Modells möglich, das diese Einflüsse in Biomasse- und Produktverläufe einbezieht.

Da die Simulation auf einer Massenbilanzierung basierte, wurde die Korrelation der optischen Dichte bei 600 nm zur Biotrockenmassekonzentration (entsprechend Kapitel 3.1.7) bestimmt. Mikroorganismen zeigen im Allgemeinen eine Tendenz, bei einer Abnahme der Umgebungstemperatur unter die optimale Wachstumstemperatur Stoffe wie Kohlenhydrate^{162,163} zu akkumulieren bzw. zu speichern und des Weiteren auch Flagellen (*E. coli* und andere) auszubilden.¹⁶³ Dies ist mit einem Anstieg der Biotrockenmasse pro Zelle und damit des Korrelationsfaktors zur optischen Dichte verbunden. Die optische Dichte wird dabei nicht beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Korrelation vor und nach der Absenkung der Temperatur von 37°C auf 20°C (Abbildung 31) ermittelt.

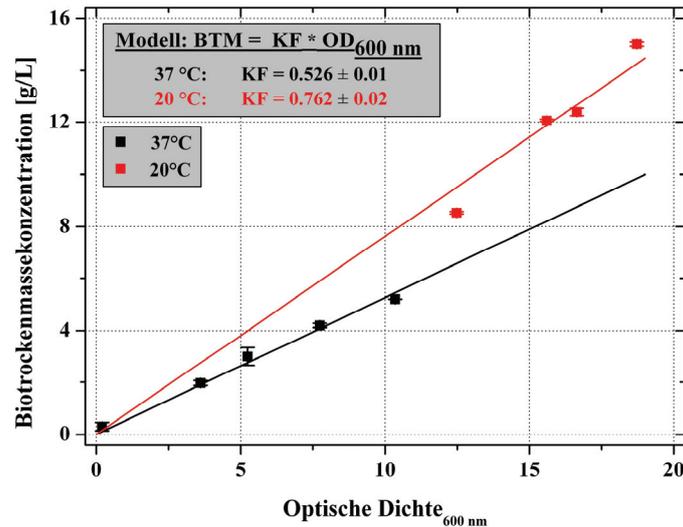


Abbildung 31: Korrelation der optischen Dichte bei 600 nm zur Biotrockenmassekonzentration des Expressionssystems BL21-130 in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur. Die Ermittlung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung von je 1 ml Zellsuspension. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, bis zur Massekonstanz getrocknet und gewogen. Die lineare Regression wurde mit der Bedingung des Schnittpunktes mit der Ordinate bei 0 g/L durchgeführt.

Die Daten der optischen Dichte wurden in der Weise in die Biotrockenmassekonzentrationsdaten umgewandelt, dass bis zum Beginn der Reduktion der Temperatur der Korrelationsfaktor für 37°C $KF_{37^\circ\text{C}}$ genutzt wurde. Danach wurde eine lineare Erhöhung des Korrelationsfaktors über 2 Stunden bis auf $KF_{20^\circ\text{C}}$ angenommen. Die Daten der Proteinkonzentration wurden über die Messwerte des G-Protein-Aktivierungstests (Abbildung 30) zur ermittelten Endkonzentration von 2 mg CB2R/L Medium 4 Stunden nach Induktion korreliert. Die Bilanzierung des Reaktorraumes wurde grundlegend vereinfacht, indem keine Zu- und Abströme zugelassen wurden. Dies war aus dem Grund möglich, da die Biomassedaten bereits mit der Verdünnung korrigiert wurden und der Verdünnungseffekt durch die Base zur pH-Regelung auf die Glucose- bzw. Ammoniumchloridkonzentration vernachlässigbar klein war. Daraus folgte der Differentialgleichungsansatz (Gleichung (19)), der die Zustandsgrößen Biomasse (X), Substrat- (S) und Produktkonzentration (P) zu einem beliebigen Zeitpunkt t, zusammengefasst im Zustandsvektor \vec{c} , nur von der jeweiligen Reaktionsrate abhängig machte. Die spezifischen Raten des Wachstums (μ), des Substratverbrauchs (σ) und der Produktbildung (π) wurden im Ratenvektor \vec{R} zusammengefasst.

$$\frac{d\vec{c}}{dt} = \vec{R} \quad \text{mit} \quad \vec{c} = \begin{bmatrix} X \\ S \\ P \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad \vec{R} = \begin{bmatrix} \mu \\ -\sigma \\ \pi \end{bmatrix} * X \quad (19)$$

Weiterhin wurde die spezifische Wachstumsrate (μ) und die spezifische Substrataufnahmerate (σ) in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration wie folgt eingesetzt

$$\mu = \frac{dx}{dt} * \frac{1}{x} \quad \text{mit} \quad \mu = Y_{XS} * \sigma \quad \text{zu} \quad \sigma = \frac{dx}{dt} * \frac{1}{Y_{XS} * x} \quad (20)$$

Der genutzte Ansatz zur Beschreibung der spezifischen Substrataufnahmerate (C-Quelle) und analog der spezifischen Ammoniumchloridaufnahme war die Monod-Kinetik, die mit Hilfe der maximalen spezifischen Substrataufnahmerate σ_{\max} [1/h], der aktuellen Substratkonzentration S [g/L] und der Monod-Konstanten K_S [g/L] die spezifische Aufnahmerate definiert:

$$\sigma = \sigma_{\max} * \frac{S}{K_S + S} \quad (21)$$

Um den Einfluss des Produktes und der Produktbildung auf die Biomasse und das Wachstum einzubeziehen, wurden in die Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate (Gleichung (22)) zwei zusätzliche Terme eingefügt. ($a * P/X$) sollte das gebildete Protein als Biomassezuwachs definieren und ($\pi * W_{fprod} * P/X$) der Last der Produktbildung auf die Zelle Rechnung tragen.

$$\mu = Y_{XS} * \sigma + \frac{P}{X} * a - \frac{P}{X} * \pi * W_{fprod} \quad (22)$$

Die Beschreibung der Produktbildungskinetik wurde mit einem Ansatz für einen sigmoiden Verlauf vorgenommen (Gleichung (23)).

$$\pi = \pi_{\max} * \left[1 - \frac{P}{P_{\max}} \right] * \left[1 - \exp\left(-\frac{t - T_{ind}}{t_{lag}}\right) \right] \quad (23)$$

Die Differentialgleichungen wurde durch die Anwendung des Euler-Algorithmus gelöst, bei dem dc in Gleichung (19) durch Δc bei hinreichend kleinen Inkrementen Δt ersetzt werden kann.

In der mathematischen Beschreibung wurde grundsätzlich kein Wachstum zugelassen, wenn einer der limitierenden Stoffe (C-Quelle bzw. Ammoniumchlorid) eine Konzentration von 0 g/L hatte. Die Beschreibung der Ammoniumchloridkonzentration wurde in die Prozessbeschreibung als wachstumslimitierende Größe eingefügt, da vor der ersten Zugabe von Ammoniumchlorid eine Stagnation des Wachstums aufgrund der vollständig metabolisierten Stickstoffquelle zu verzeichnen war. Mit der Kenntnis der Konzentration der Stickstoffquelle zu Beginn der Fermentation konnten die notwendigen Parameter zur Beschreibung in guter Näherung bestimmt werden. Die Werte für Ammoniumchlorid und Glucose wurden bei den Zeitpunkten, bei denen die manuelle Zugabe in der Fermentation erfolgte, neu eingelesen. Weiterhin wurden Faktoren zur Beschreibung der Wachstums- und Substrataufnahmereduk-

tion aufgrund der Temperaturabsenkung, der *lag*-Phase vor der ersten Zugabe von Ammoniumchlorid, der *lag*-Phase in der Substrataufnahme bei Tryptophanassimilation und dem veränderten Ausbeutefaktor sowie der veränderten Glucoseaufnahmerate durch die Tryptophanaufnahme eingeführt. Die Belegung der Parameter und die genutzten Werte sind im Anhang (A1) zusammengefasst. Das Ergebnis der Prozesssimulation mittels MatLab 7.0.1 findet sich in der folgenden Abbildung und zeigt einen Vergleich der Messdaten (MD) mit der mathematischen Beschreibung (Sim).

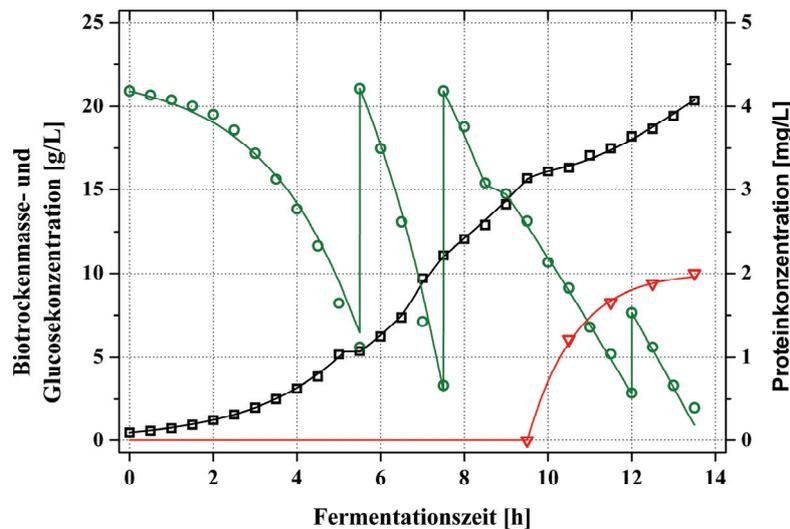


Abbildung 32: Vergleich der Messdaten mit dem mathematisch erfassten Verlauf der Daten für Biomasse- (schwarz, Punkte - MD, Linie - Sim), Glucose- (grün, Punkte - MD, Linie - Sim) und Proteinkonzentration (rot, Punkte - MD, Linie - Sim) für das Expressionssystem BL21-130 in der Fermentation zur Herstellung eines spezifisch $^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan isotopenmarkierten Cannabinoid-Rezeptors Typ 2. Die Simulation erfolgte in einem abgeschlossenen Bilanzierungsraum ohne Zu- und Abströme.

Das erstellte mathematische Modell wurde im Grundsätzlichen auch auf die Fermentation mit unmarkiertem Tryptophan übertragen. Es wurde jedoch den unterschiedlichen Bedingungen Rechnung getragen, die die Induktion direkt nach der Absenkung der Temperatur mit gleichzeitiger Zugabe des Tryptophans und die halbierte Produktausbeute (kulturvolumenspezifisch) durch Induktion bei einer optischen Dichte von 10 anstatt 20 beinhalteten. Weiterhin wurde die Fermentation auch nur bis 4 Stunden nach Induktion simuliert, und der erste Datenpunkt wurde verworfen, da in der ersten halben Stunde keine maximale spezifische Wachstumsrate bestimmt werden konnte. Alle weiteren Parameter, wie Ausbeutefaktoren und die kinetischen Konstanten wurden analog übernommen. Die Simulation beider Fermentationen zeigte eine gute Übereinstimmung (Vergleich der Messdaten mit mathematisch erfasstem Verlauf ist im Anhang (A2) ersichtlich).

4.2 Experimentelle Ergebnisse Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2

4.2.1 Adaption des Expressionssystems an unterschiedliche Medientypen

Nach der Transformation des verwendeten *Escherichia coli*-Stammes mit dem für den Y2-Rezeptor codierenden Plasmid wurden die Transformanden direkt in das jeweilige Medium überimpft. Analog zur Adaption des Expressionssystems BL21-130 wurde die Adaption des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 anhand der maximalen spezifischen Wachstumsrate (Gleichung (1)) bzw. der Verdopplungszeit (Gleichung (18)) in jeder Phase beurteilt. Bei einer konstanten Wachstumsrate im Vergleich zur vorhergehenden Adaptionsphase wurde das System als adaptiert betrachtet. Die Zusammenfassung der Adaptionen an die unterschiedlichen Medientypen wurde in Tabelle 11 dargestellt. An dieser Stelle wird die Adaption an das Medium MSM-Y2-opt, die für neue Transformanden durchgeführt wurde, der Optimierung der Medienzusammensetzung vorweggenommen, die in Kapitel 4.2.2 behandelt wird. Für die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde in der optimierten Medienzusammensetzung eine höhere spezifische Wachstumsrate im Vergleich zur Kultivierung in MSM-Y2 festgestellt. Die Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle zur Kultivierung von Rosetta R3-phY2 zeigte den gegenteiligen Effekt in der maximalen spezifischen Wachstumsrate in den beiden Medienzusammensetzungen.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Zunahme der maximalen spezifischen Wachstumsraten von Rosetta R3-phY2 in jeder Adaptionsphase für die Medientypen LB-Komplexmedium als Referenz, MSM-Y2 und MSM-Y2-opt jeweils mit Glucose und Glycerin als Kohlenstoffquellen. Angegeben sind die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung für die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{\max} [h^{-1}] und in Klammern die Verdopplungszeiten t_D [h]. Der relative Fehler für μ_{\max} lag im Bereich von 0.8 bis 4.0 %.

	LB	MSM-Y2		MSM-Y2-opt	
		Glucose	Glycerin	Glucose	Glycerin
AP1	1.104 (0.63)	0.2026 (3.42)	0.2563 (2.70)	0.226 (3.07)	0.1805 (3.84)
AP2	--	0.3254 (2.13)	0.2546 (2.72)	0.2967 (2.34)	0.2685 (2.58)
AP3	--	0.3245 (2.14)	--	0.2808 (2.47)	0.3048 (2.27)
AP4	--	--	--	--	0.3242 (2.14)
AP5	--	--	--	--	0.2997 (2.31)

4.2.2 Optimierung der Mineralsalzmedienzusammensetzung für eine optimale Biomasseausbeute von Rosetta R3-phY2

Es erfolgte eine Bewertung der genutzten Medienzusammensetzungen über die maximal erreichbare Biomasse, die aus der Zusammensetzung ohne Limitation der Kohlenstoffquelle

generiert werden konnte. Diese Untersuchung wurde für die an MSM-Y2 adaptierten Zellen (AP3 für Glucose, AP2 für Glycerin) durch die Bestimmung der maximal erreichten optischen Dichten durchgeführt. Die Fermentationen hatten für beide Kohlenstoffquellen eine maximale optische Dichte bei 600 nm von ca. 14 zum Ergebnis (Abbildung 33 für MSM-Y2 Glucose), was eine sehr geringe Ausbeute darstellte und eine Optimierung der Medienzusammensetzung erforderte.

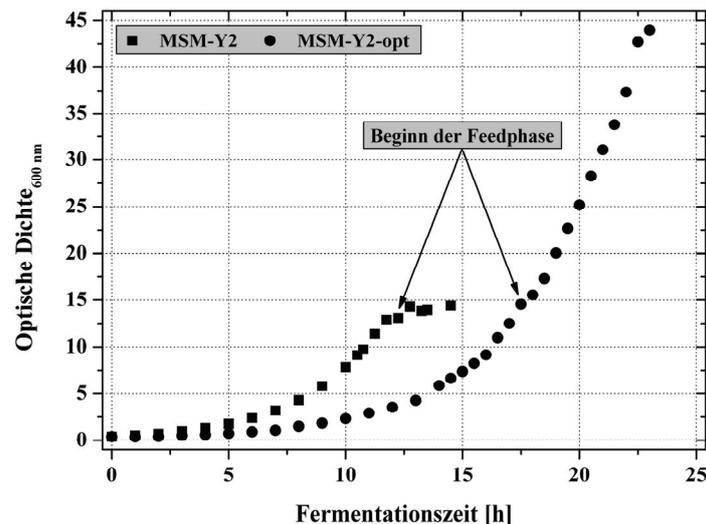


Abbildung 33: Vergleich der erreichten optischen Dichten des Systems Rosetta R3-phY2 in den Medientypen MSM-Y2 und MSM-Y2-opt ohne Limitation der Kohlenstoffquelle (Glucose). Dargestellt sind die Daten der optischen Dichte bei 600 nm in Abhängigkeit der Fermentationszeit. Die maximal erreichte optische Dichte bei MSM-Y2 lag bei ca. 14 und konnte nicht durch das Feed erhöht werden. Bei MSM-Y2-opt wurde eine maximale optische Dichte von ca. 44 erreicht.

Die Optimierung wurde in einer weiteren Fermentation mit MSM-Y2 vorgenommen, bei der die einzelnen Bestandteile des Mediums bei Erreichen der maximalen optischen Dichte erneut steril zugegeben wurden. Anhand der Rührerdrehzahl, die einen kaum zeitlich verzögerten Aufschluss über den Sauerstoffverbrauch der Zellen und somit über das Wachstum gibt, wurde beurteilt, ob der zugegebene Medienbestandteil einen positiven Effekt auf das Wachstum hatte. Es wurde festgestellt, dass die Limitation mit einem großen Anteil von der Stickstoffquelle, jedoch in Kombination mit den anderen Mineralsalzen, ausging. In der Literatur¹²³ wurde die Nutzung von Ammoniak zur Regelung des pH-Wertes beschrieben. Allerdings kann in einer Fermentation zur Isotopenmarkierung des Zielproduktes diese zusätzliche Stickstoffquelle nicht verwendet werden, da diese die Kosten stark erhöhen würde. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der Stickstoffquellen im Batchmedium erhöht. Weiterhin musste die zusätzliche Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle Ammoniumhydrogencitrat eliminiert werden. Diese hätte die Effizienz einer ¹³C- oder ¹⁵N-Isotopenmarkierung gemindert, wenn die Kohlenstoffquelle nicht die stabilen Isotope enthalten hätte. Andernfalls

wären die Kosten dieser Isotopenmarkierung gestiegen. Diese Festlegungen, vereint mit einer zusätzlichen Erhöhung der Spurenelementkonzentrationen, führte zur Zusammensetzung von MSM-Y2-opt, auf dessen Basis eine Fermentation mit Glucose als Kohlenstoffquelle durchgeführt wurde, um den erreichten Grad der Optimierung beurteilen zu können. Dieser Fermentation ging eine Adaption an die Zusammensetzung voraus (Kapitel 4.2.1). Die resultierenden Daten der optischen Dichte dieser Fermentation wurden im Vergleich zu denen der Fermentation im unoptimierten Medium in Abbildung 33 dargestellt. Die Umstellung der Medienzusammensetzung auf MSM-Y2-opt hatte eine Verdreifachung der maximal erreichten optischen Dichte zur Folge. Das optimierte Medium wurde für alle weiteren Optimierungsschritte verwendet.

4.2.3 Bestimmung der Parameter zur Erstellung eines Open Loop Feed-Profiles

Zur Erstellung eines *Open Loop Feed*-Profils (Gleichung (11)) waren mehrere Parameter notwendig, die in unterschiedlichen Fermentationen bestimmt wurden. Die Korrelation zwischen der gemessenen optischen Dichte bei 600 nm und der im Medium enthaltenen Biotrockenmassekonzentration wurde analog zum Kapitel 3.1.7 in einer Fermentation des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 mit Komplexmedium bei einer Temperatur 37°C bestimmt. Die erhaltene Korrelation wurde in der folgenden Abbildung visualisiert und bestimmt einen Korrelationsfaktor KF von 0.558 g/(L*OD).

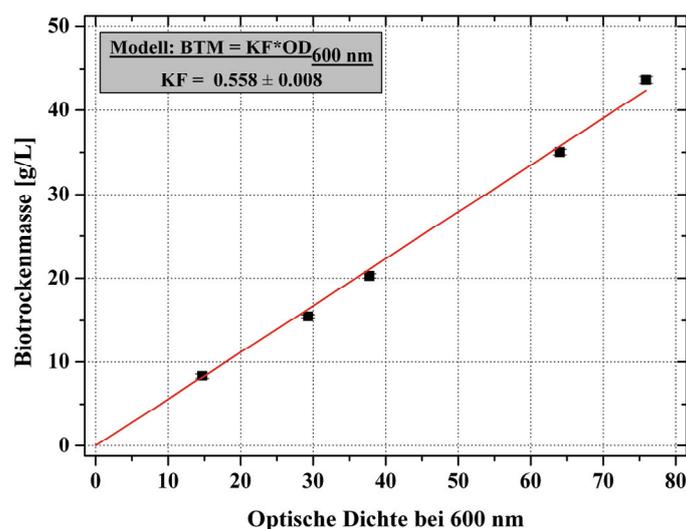


Abbildung 34: Bestimmung des Korrelationsfaktors KF für den Zusammenhang der optischen Dichte bei 600 nm und der im Medium enthaltenen Biotrockenmassekonzentration für das System Rosetta R3-phY2. Die Ermittlung der BTM erfolgte in einer Dreifachbestimmung von je 1 ml Zellsuspension. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, bis zur Massekonstanz getrocknet und anschließend gewogen. Die lineare Regression wurde mit Bedingung des Schnittpunktes mit der Ordinate bei 0 g/L erstellt.

Die Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten von Biomasse zu Substrat Y_{XS} wurde für Rosetta R3-phY2 aus den Kohlenstoffquellen Glycerin und Glucose in MSM-Y2-opt in mehreren Fermentationen durchgeführt. Für die auf der Basis von Gleichung (10) bestimmten Ausbeutekoeffizienten wurde der Mittelwert gebildet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Bestimmung der Ausbeutekoeffizienten Biomasse aus Substrat Y_{XS} des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 aus Glucose bzw. Glycerin in MSM-Y2-opt. Die Bestimmung erfolgte aus dem Quotienten der gebildeten Biomasse und dem verbrauchten Substrat in Mehrfachbestimmungen und der Bildung des Mittelwertes.

	MSM-Y2-opt Glucose	MSM-Y2-opt Glycerin
Anzahl der Bestimmungen	4	5
Y_{XS}	0.340 ± 0.026	0.416 ± 0.012

4.2.4 Bestimmung der Y2-Rezeptor-Ausbeute exprimiert auf der Basis von LB-Komplexmedium

Die maximierte Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 auf der Basis von Mineral-salzen sollte mit einer Standardmethode verglichen werden. Daher wurde eine Fermentation mit Komplexmedium durchgeführt und die Menge an exprimiertem Zielprotein 4 Stunden nach Induktion bestimmt. Die Daten der optischen Dichte dieser Referenzfermentation sind in Abbildung 35 dargestellt. Die biomassespezifische Ausbeute des NPY2R wurde nach der IB-Präparation, Solubilisierung von 5 g *Inclusion Bodies* und der chromatographischen Reinigung mit $122 \mu\text{g}$ NPY2R/g BFM bestimmt. Dies ergab eine kulturvolumenspezifische Ausbeute von $17.9 \text{ mg NPY2R/L Medium}$ und bei einem Kulturvolumen von 6 Litern eine Gesamtausbeute von etwa 107 mg reinem Protein.

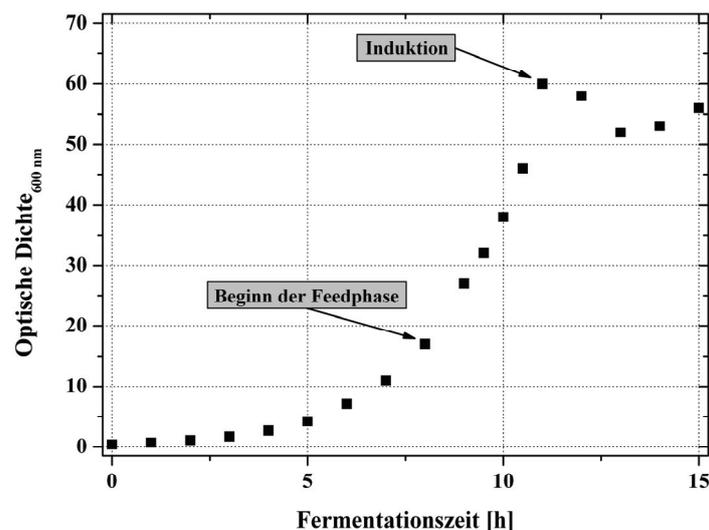


Abbildung 35: Wachstumsverhalten des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 in LB-Komplexmedium. Nach dem Ende des Batches bei einer optischen Dichte von 17 wurde eine pO_2 orientierte manuelle Feedstrategie verfolgt. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 60 mit 1 mM IPTG . Die Gesamtbiofeuchtmasse betrug ca. 880 g .

4.2.5 Bestimmung der zeitabhängigen NPY2R-Ausbeute exprimiert auf der Basis von Mineralsalzmedien

Um die zeitabhängige Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 im Mineralsalzmedium mit der zusätzlichen Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle vergleichbar untersuchen zu können, wurde jeweils eine Fermentation mit der entsprechenden C-Quelle (Glucose und Glycerin) bei sonst identischen Parametern durchgeführt. Das Kulturvolumen wurde auf 6 L, die Inkubationstemperatur auf 37°C, der pH-Wert auf 7.0 und die optische Dichte bei Induktion auf 25 festgelegt. Weiterhin schloss dies ein entsprechendes Feedprofil mit ein, das auf der Grundlage der in Kapitel 4.2.3 bestimmten Parameter erstellt wurde. Das Profil realisierte eine gesetzte spezifische Wachstumsrate von 0.14 g/(g*h) nach Induktion, um die Untersuchung unter der Bedingung einer Limitation der Kohlenstoffquelle vergleichbarer zu machen und des Weiteren eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf weitere Optimierungsschritte zu gewährleisten. Die Übertragbarkeit bezog sich in diesem Zusammenhang auf die Temperaturabhängigkeit der maximalen spezifischen Wachstumsrate, die in Abbildung 36 für die Kultivierung mit Glycerin als Kohlenstoffquelle ersichtlich ist. Dabei musste, um die limitierenden Bedingungen aufrecht zu erhalten, das generierte Feedprofil eine geringer gesetzte spezifische Wachstumsrate nach Induktion vorgeben, als das System im Bereich der zu untersuchenden Temperatur minimal bietet. Die Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate von Rosetta R3-phY2 wurde in Schüttelkolbenexperimenten mit einem Volumen von 25 ml mit der entsprechend gewählten Temperatur jeweils in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

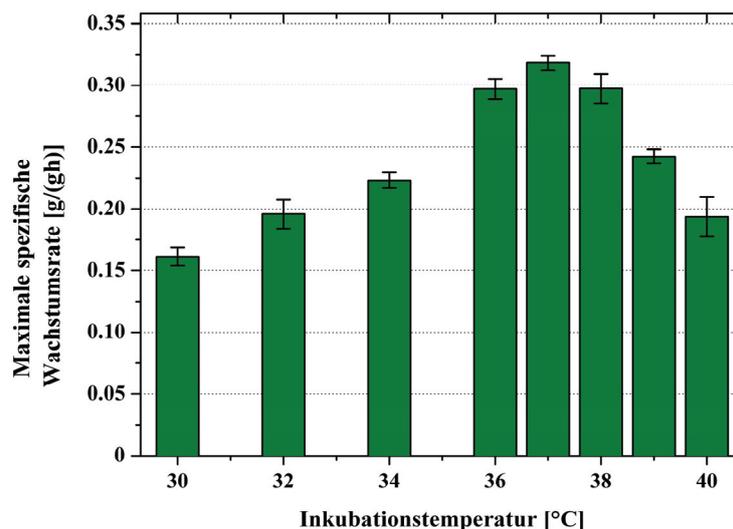


Abbildung 36: Abhängigkeit der maximalen spezifischen Wachstumsrate von der Inkubationstemperatur für das Expressionssystem Rosetta R3-phY2 in MSM-Y2-opt mit der Kohlenstoffquelle Glycerin. Die Aufnahme der Wachstumskurven erfolgte bei der jeweiligen Temperatur in 25 ml Medium in einer Doppelbestimmung. Die Daten der optischen Dichte (600 nm) wurden mit Gleichung (1) beschrieben und der Wert der maximalen spezifischen Wachstumsrate ermittelt.

Für die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde die geringste maximale spezifische Wachstumsrate bei 30°C mit 0.17 g/(g·h) und für Glucose bei gleicher Temperatur von 0.15 g/(g·h) bestimmt.

Die Feedprofile zur Untersuchung der zeitabhängigen Expression des NPY2R sahen eine stündliche Probenahme, vom Zeitpunkt der Induktion beginnend, von je 400 ml aus dem Kulturvolumen vor. Die tatsächliche Probenahme erfolgte dann allerdings auf der Basis eines biomassenormierten Volumens (400 ml einer optischen Dichte von 24.48 bzw. einer entsprechenden Biotrockenmassekonzentration von 13.66 g BTM/L Medium), um eine Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse bezüglich der Proteinkonzentration herzustellen. Das Probenahmevolumen wurde sofort nach der Messung der optischen Dichte und anschließenden Umrechnung aus dem Fermenter entnommen. Aufgrund der unterschiedlichen maximalen spezifischen Wachstumsraten und Ausbeutekoeffizienten unterschieden sich die Feedprofile voneinander, deren Randbedingungen in Tabelle 13 zusammengefasst wurden.

Tabelle 13: Zusammenfassung der genutzten Randbedingungen zur Erstellung der *Open Loop Feed-Profile* zur Untersuchung der zeitabhängigen Produktbildung des Expressionssystems Rosetta R3-phY2 in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle.

Randbedingung	Kohlenstoffquelle	
	Glucose	Glycerin
$\mu_{\max, 37^\circ\text{C}}$ [g/(g·h)]	0.30	0.32
$\mu_{\text{set, vor Ind.}}$ [g/(g·h)]	0.23	0.28
$\mu_{\text{set, nach Ind.}}$ [g/(g·h)]	0.14	0.14
X_{0F} [g/L]	7.8	9.5
W_{0F} [L]	6.2	6.2
Y_{XS} [g/g]	0.340	0.416
S_F [g/g]	0.40	0.40

Die ermittelten Daten der optischen Dichte beider Fermentationen sowie die angewendeten Feedprofile wurden in Abbildung 37 visualisiert. Es erfolgte eine Normierung der Fermentationszeit auf den Induktionszeitpunkt, um die Vergleichbarkeit sichtbar zu machen. Die Daten der Batchphase waren nur zum Teil verfügbar, da die Fermentationen am Vorabend gestartet wurden.

Alle Proben zur Untersuchung des Rezeptorgehaltes der Zellen wurden direkt im Anschluss an die Probenahme zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bis zur Weiterbehandlung bei -80°C eingelagert. Jedes Zellpellet wurde in analoger Weise einer IB-Präparation unterzogen. Anschließend wurden die *Inclusion Bodies* solubilisiert und der chromatographischen Reinigung unterzogen.

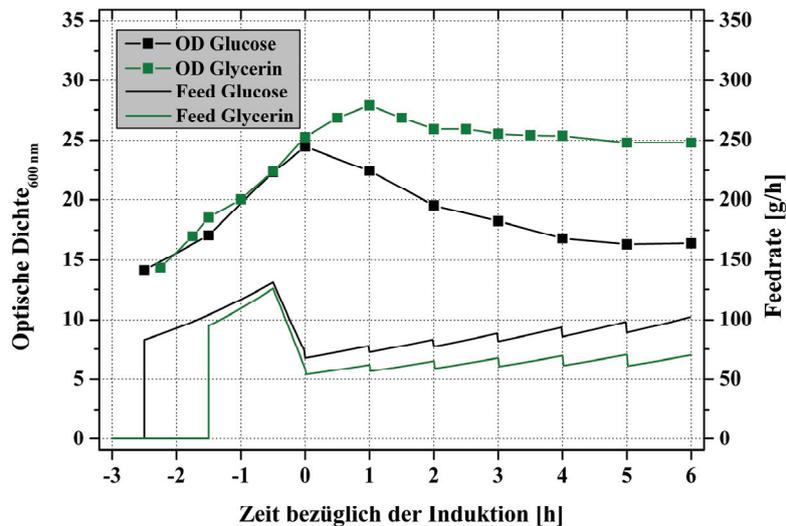


Abbildung 37: Verlauf der Daten der optischen Dichte (600 nm) und der berechneten Feedprofile für das Expressionssystem Rosetta R3-phY2 während der Fermentationen zur Untersuchung der zeitabhängigen Expression des NPY2R auf der Basis der Kohlenstoffquellen Glucose bzw. Glycerin. Die Daten wurden normiert zum Induktionszeitpunkt dargestellt. Es erfolgte eine stündliche, biomassenormierte Probenahme (beginnend mit dem Induktionszeitpunkt) mit 400 ml der BTM-Konzentration 13.66 g BTM/L Medium.

Die biomasse- und kulturvolumenspezifischen Ausbeuten konnten damit in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach Induktion und der eingesetzten Kohlenstoffquelle ermittelt werden. Die erhaltenen Daten der Ausbeuten wurden in Abbildung 38 zusammengefasst.

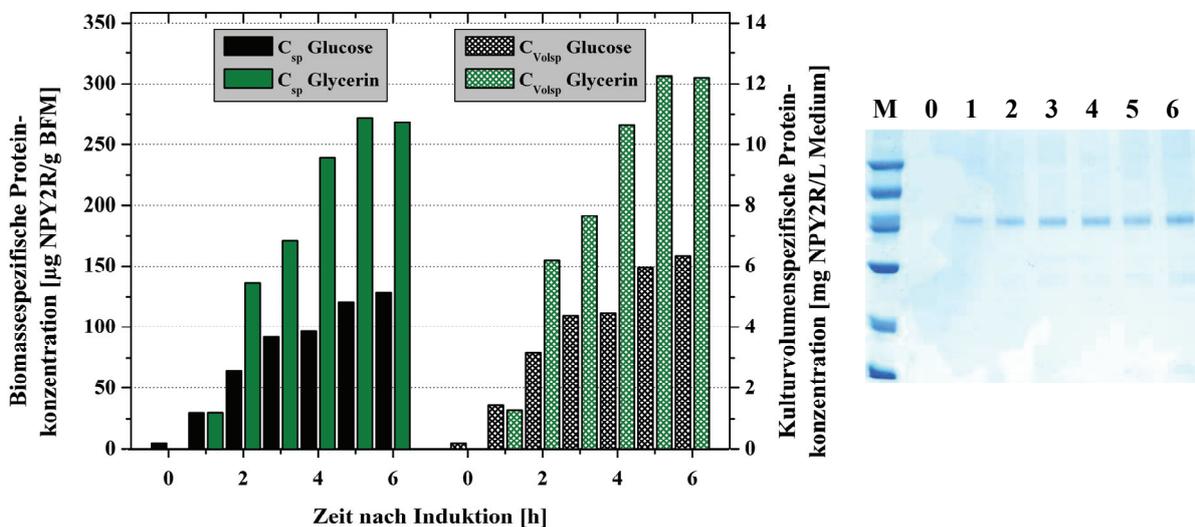


Abbildung 38: Verlauf der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2-Konzentrationen in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach Induktion und der gewählten Kohlenstoffquelle. Die Fermentationen erfolgten analog mit dem Unterschied des Einsatzes von Glucose bzw. Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die Probenahme wurde auf ein Volumen von 400 ml der optischen Dichte 24.48 bzw. der Biotrockenmassekonzentration 13.66 g BTM/L Medium normiert. Die erhaltene Biomasse wurde der IB-Präparation, der Solubilisierung, der chromatographischen Reinigung und der Proteinkonzentrationsbestimmung unter normierten Bedingungen unterzogen. links: Die quantitative Erfassung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Proteinkonzentrationen. rechts: Die qualitative Erfassung der biomassenspezifischen Proteinkonzentration der Fermentation mit Glucose als C-Quelle mittels SDS-PAGE. (M: Marker M_{LW} , 0 - 6: 0 bis 6 Stunden nach Induktion.)

Die kulturvolumenspezifische Ausbeute wurde anhand des entnommenen Probevolumens, der Masse des durch Zentrifugation gewonnenen Zellpellets und der biomassespezifischen Ausbeute berechnet. Es wurde eine zweifache Rezeptorausbeute für die Verwendung von Glycerin im Vergleich zu Glucose als Kohlenstoffquelle bestimmt, die zudem bereits nach 5 Stunden Induktionszeit ein Maximum erreichte. Die höhere Produktbildungsrate bei Verwendung von Glycerin bedeutete eine Minimierung der zuzuführenden Kohlenstoffquelle und somit der Kosten für eine unspezifische Isotopenmarkierung. Aus diesen Gründen wurde die weitere Optimierung auf der Grundlage von Glycerin als Kohlenstoffquelle fortgeführt.

Es wurde zusätzlich zur Analyse des biomassespezifischen Rezeptorgehaltes eine Bestimmung der Menge der im Medium enthaltenen Rezeptoren durchgeführt. Diese Möglichkeit bestand aus dem Grund, dass aus den lysierten Zellen stammende freie Lipide die Proteine solubilisieren könnten. Weiterhin wurde der Verlust des Zielproteins in den Schritten der *Inclusion Body*-Präparation untersucht. In beiden Fällen konnte mit keiner der oben genannten Methoden ein Verlust bestätigt werden.

4.2.6 Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression des NPY2R in Rosetta R3

Die Gewährleistung einer aussagekräftigen Bestimmung der temperaturabhängigen Expression des NPY2R wurde mit einer standardisierten Wahl der Fermentationsparameter erbracht. Dies schloss ein Batchvolumen von 5 L, ein festgelegtes Feedprofil (Abbildung 39), einen pH-Wert von 7.0, einen kaskadengeregelten Sauerstoffpartialdruck von 30 %, eine Inkubationstemperatur vor Induktion von 37°C, die Dauer der Induktion von 5 Stunden und die definierte Medienzusammensetzung mit ein. Die Änderung der Temperatur von 37°C auf die untersuchten Temperaturen von 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39 und 40°C nach Induktion wurde innerhalb einer halben Stunde (Abbildung 39) in dem Zeitraum realisiert, in dem die Feedrate linear reduziert wurde, um eine spezifische Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) einzustellen. Die Induktion erfolgte in allen Fällen mit 1 mM des Induktors IPTG. Die Festlegung der Induktionszeit auf 5 Stunden erfolgte auf der Grundlage des in Kapitel 4.2.5 bestimmten maximalen biomasse- und kulturvolumenspezifischen Y2-Rezeptor-Gehaltes. Diese Festlegung wurde unabhängig davon gemacht, dass nach einer längeren Induktionszeit bei einer anderen Temperatur eine Erhöhung der zur Beurteilung genutzten Rezeptorkonzentrationen erreicht werden kann. Dies gründete auf dem Umstand, dass eine Verlängerung der Fermentationszeit mit einer unter Umständen drastischen Erhöhung der benötigten kostenintensiven Substrate verbunden gewesen wäre. Die erzielten Verläufe der optischen Dichte, gemessen bei 600 nm,

und die resultierenden spezifischen Proteinkonzentrationen nach der entsprechenden Isolation und Reinigung finden sich in Abbildung 40 und Abbildung 41.

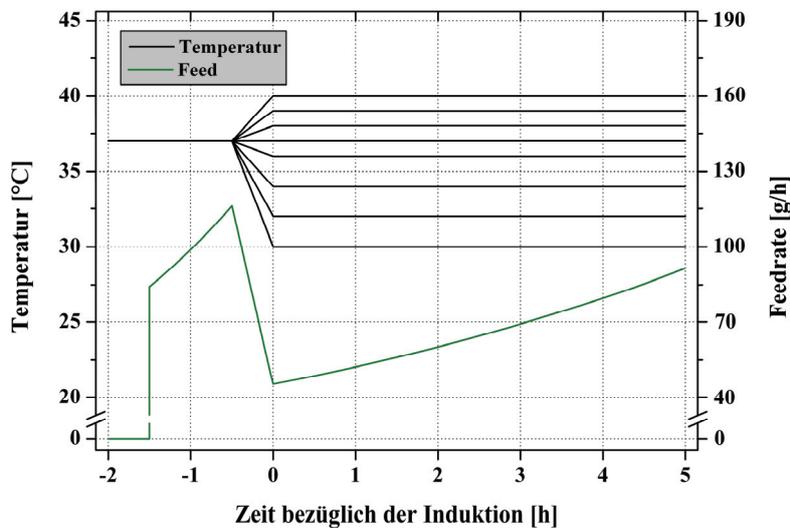


Abbildung 39: Darstellung der gesetzten Profile für Temperatur und Feed zur Untersuchung der temperaturabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 in Rosetta R3. Die Expression wurde bei den Temperaturen 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39 und 40°C auf der Basis der Kohlenstoffquelle Glycerin mit festem Feedprofil und sonst konstanten Fermentationsparametern untersucht. Die Änderung der Temperatur von 37°C vor Induktion auf die jeweilige Temperatur erfolgte innerhalb einer halben Stunde vor Induktion analog zur Reduktion der gesetzten spezifischen Wachstumsrate mit Hilfe des Substratzustroms.

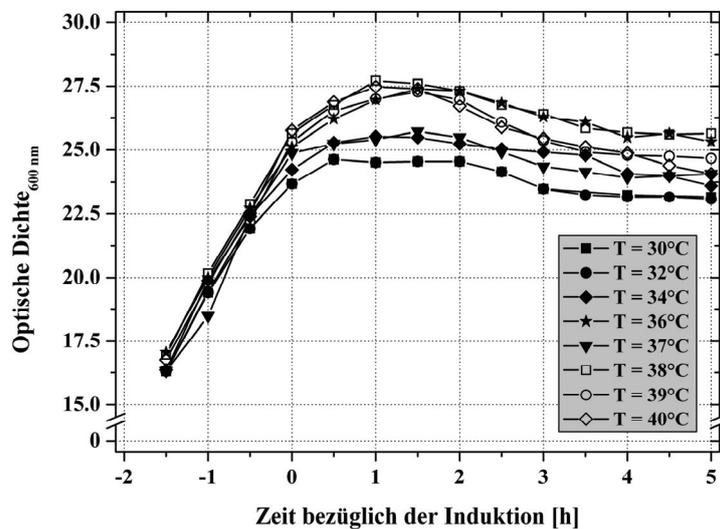


Abbildung 40: Verläufe der Daten der gemessenen optischen Dichten in allen Fermentationen zur Untersuchung der temperaturabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2. Dargestellt sind die Messdaten vom Beginn des *Open Loop Feed Control*. Die Änderung der Temperatur erfolgte gleichzeitig mit der Reduktion der gesetzten spezifischen Wachstumsrate auf 0.14 g/(gh) innerhalb von 30 Minuten bis zur Induktion.

Die kulturvolumenspezifischen Angaben (Abbildung 41) wurden auf das sich aus Batchvolumen und der Volumenzunahme durch Base- und Feedzuströme ergebende Endvolumen jeder Fermentation bezogen.

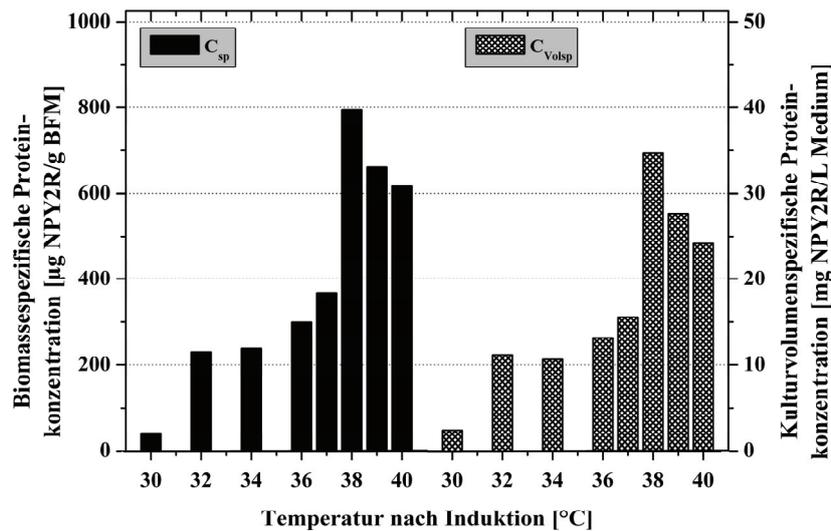


Abbildung 41: Abhängigkeit der Expression des NPY2R von der Temperatur nach Induktion. Die ermittelten Ergebnisse für die biomasse- und kulturvolumenspezifischen Proteinkonzentrationen wurden nach einer Induktionszeit von 5 Stunden mit Hilfe der IB-Präparation, der Solubilisierung (jeweils 5 g *Inclusion Bodies*) und der affinitätschromatographischen Reinigung bestimmt. Die kulturvolumenspezifischen Angaben beziehen sich auf das erreichte Endvolumen, das sich aus Batchvolumen und der Volumenzunahme durch die Zuströme aus Base und Feed zusammensetzt.

Das Ergebnis einer maximalen biomasse- und kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeute bei einer Fermentationstemperatur von 38°C wurde als Grundlage für die weiteren Optimierungsschritte gesetzt.

4.2.7 Einfluss der Induktorkonzentration auf die Y2-Rezeptor-Expression

Der Einfluss der IPTG-Konzentration auf die NPY2R-Konzentration wurde bei einer Fermentationstemperatur nach Induktion von 30°C untersucht. Diese Temperatur wurde gewählt, da in der Untersuchung der temperaturabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 (Kapitel 4.2.6) die biomassespezifische Produktbeladung der *Escherichia coli*-Zellen äußerst gering war und somit ein maximaler Effekt der Induktorkonzentration nachgewiesen werden konnte, ohne in die Limitation der spezifischen Produktbeladung der Zellen zu gelangen. Es wurden zwei analoge Fermentationen mit den in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Prozessparametern durchgeführt. Die einzige Variation in diesen Prozessen bestand im Einsatz von 1 mM bzw. 2 mM IPTG zur Induktion der Proteinsynthese. Der geringe Einfluss der Induktorkonzentration auf das Wachstumsverhalten kann in Abbildung 42 nachvollzogen werden und weist eine hohe Reproduzierbarkeit der Fermentationsführung aus. Die Proteindaten, die aus der *Inclusion Body*-Präparation, Solubilisierung und chromatographischen Reinigung erhalten wurden, sind in Tabelle 14 vergleichend dargestellt. Kulturvolumenspezifische Angaben basieren auf dem Gesamtvolumen, bestehend aus Batchvolumen und der

Volumenzströme aus Feed und Base bis zum Ende der Fermentation. Es wurde die durch die Erhöhung der Induktorkonzentration verursachte Änderung der zur Beurteilung essentiellen Daten von Biomasse und Proteinkonzentration angegeben und zusätzlich mit den in Kapitel 4.2.10 bestimmten maximalen Fehlern korrigiert.

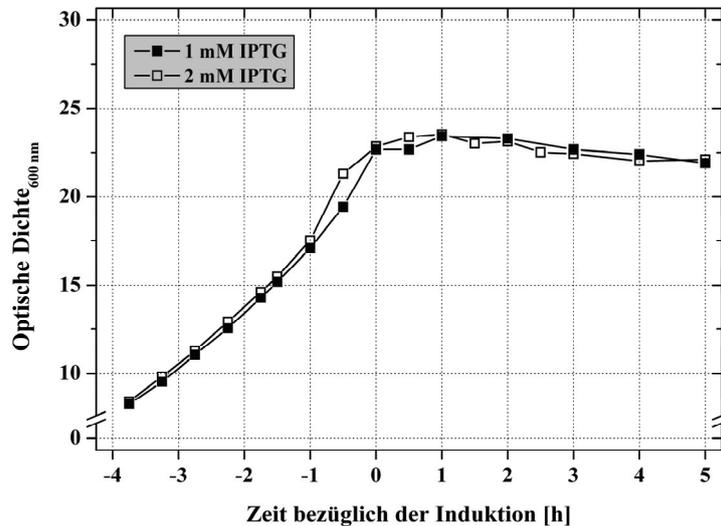


Abbildung 42: Wachstumsverhalten von Rosetta R3 in Fermentationen zum Nachweis des Einflusses der Induktorkonzentration auf die biomasse- und kulturvolumenspezifische Y2-Rezeptor-Ausbeute. Die in Kapitel 4.2.6 gewählten Prozessparameter wurden analog geführt. Die Temperatur nach Induktion wurde auf 30°C festgelegt, um einen maximalen Effekt der Verdopplung der Induktorkonzentration (1 mM und 2 mM) sichtbar zu machen, ohne in die Limitation der spezifischen Produktbelastung zu gelangen.

Unter Beachtung der Reproduzierbarkeitsuntersuchungen in Kapitel 4.2.10 wurde eine Erhöhung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Proteinkonzentrationen um etwa 20 % erreicht (Tabelle 14). Dieses Ergebnis kann zur Ausführung der optimalen Fermentation genutzt werden, jedoch wurde für die weiteren Fermentationsoptimierungsschritte eine Induktorkonzentration von 1 mM IPTG beibehalten, um die Vergleichbarkeit der aus den unterschiedlichen Experimenten gewonnenen Daten zu erhalten.

Tabelle 14: Vergleich der erhaltenen Biomasse- und Proteindaten in Abhängigkeit der Induktorkonzentration. Mit dargestellt ist die prozentuale Änderung der angegebenen Werte bei Verdopplung der IPTG-Konzentration (in Klammern unter Berücksichtigung der maximalen Abweichungen, bestimmt in Kapitel 4.2.10).

IPTG-Konzentration	1 mM	2 mM	Änderung [%]
BFM [g]	261.3	266.9	2.1 (4.0)
IBs [g]	28.6	27.6	-3.5 (-22)
NPY2R/BFM [$\mu\text{g/g}$]	40	50	25 (17)
NPY2R/Volumen [mg/L]	1.86	2.35	26 (22)
NPY2R _{Gesamt} [mg]	10.5	13.3	27 (20)

4.2.8 Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes nach Induktion auf den NPY2R-Gehalt in Rosetta R3

Das experimentelle Vorgehen zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes nach Induktion auf die Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurde analog zum Kapitel 4.2.6 übernommen. Die *E. coli*-Zellen wurde vor Induktion bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7.0 kultiviert. Die Temperatur nach Induktion wurde auf die optimale Expressionstemperatur von 38°C festgelegt. Die Temperatur und die pH-Werte 6.0, 6.5, 7.5 und 8.0 wurden innerhalb einer halben Stunde bis zur Induktion eingestellt (Abbildung 43). Als Referenz wurde die Fermentation bei 38°C und pH 7.0 aus den Temperaturuntersuchungen herangezogen (Kapitel 4.2.6).

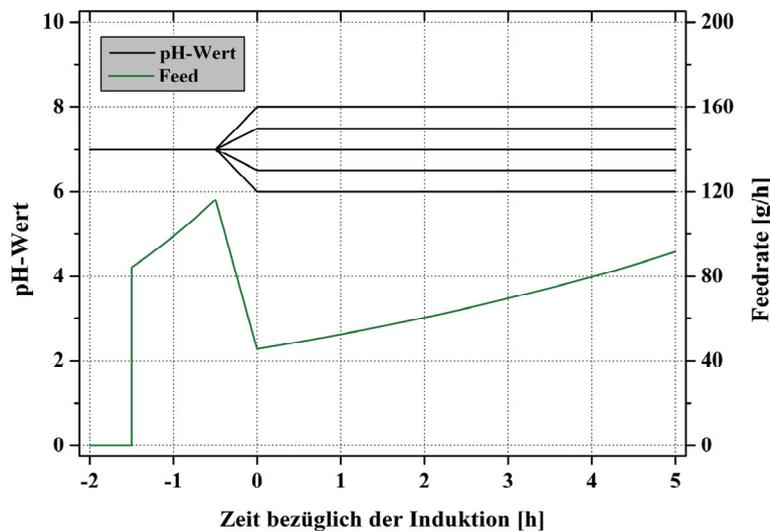


Abbildung 43: Darstellung der vorgegebenen Profile für pH-Wert und Feedzulauf in den Fermentationen zur Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2-Expression im Expressionssystem Rosetta R3-phY2. Die pH-Werte nach Induktion wurden in vier Fermentationen in einem Bereich von pH 6.0 bis pH 8.0 in Inkrementen von 0.5 pH-Einheiten variiert. Alle weiteren Fermentationsparameter wurden konstant gehalten. Die in Kapitel 4.2.6 bestimmte optimale Expressionstemperatur wurde analog zur Senkung bzw. Erhöhung des pH-Wertes (pH-Wert von 7.0 bis zur Änderung) bzw. der Reduktion des Substratzustroms innerhalb einer halben Stunde bis zur Induktion von 37°C auf 38°C erhöht. Die Induktion wurde für 5 Stunden aufrecht erhalten. Die Fermentation aus den Temperaturuntersuchungen bei 38°C und einem pH-Wert von 7.0 nach Induktion wurde als Referenz herangezogen.

Durch die Messung der optischen Dichte (600 nm) wurde das Wachstumsverhalten von Rosetta R3 verfolgt und beurteilt (Abbildung 44). Die Daten des Batchprozesses waren nur begrenzt verfügbar, da dieser über Nacht stattfand. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer 5-stündigen Expressionsphase erfolgte die Zellernte. Das erhaltene Zellpellet wurde der *Inclusion Body*-Präparation unterzogen, gefolgt von der Solubilisierung von 5 g IBs und der standardisierten chromatographischen Reinigung sowie der Analyse der biomasse- bzw. kulturvolumenspezifischen Ausbeuten des Y2-Rezeptors (Abbildung 45).

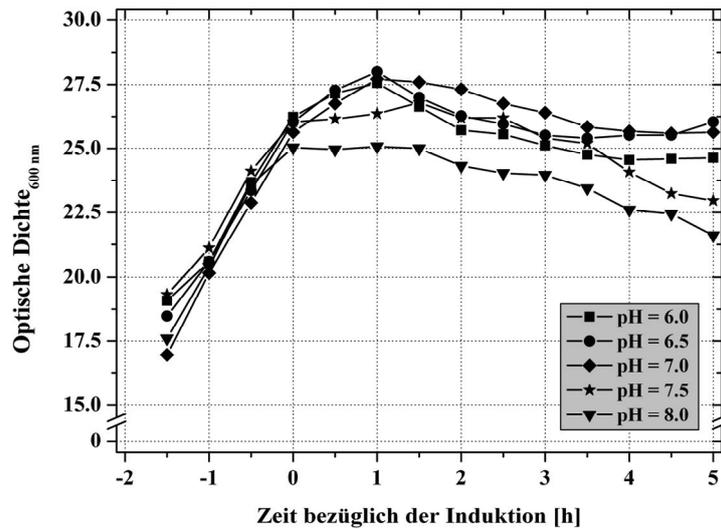


Abbildung 44: Verlauf der gemessenen optischen Dichten bei 600 nm der Fermentationen zur Untersuchung der pH-Wert-abhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 durch das Zellsystem Rosetta R3-phY2. Die Einstellung der pH-Werte von 7.0 auf 6.0, 6.5, 7.5 und 8.0, die Reduktion der spezifischen Wachstumsrate auf 0.14 g/(gh) durch den Feedzulauf und die Änderung der Temperatur von 37°C auf 38°C erfolgte innerhalb von 30 Minuten bis zum Induktionszeitpunkt. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Die ermittelten Daten sind vom Beginn der Feedphase an dargestellt.

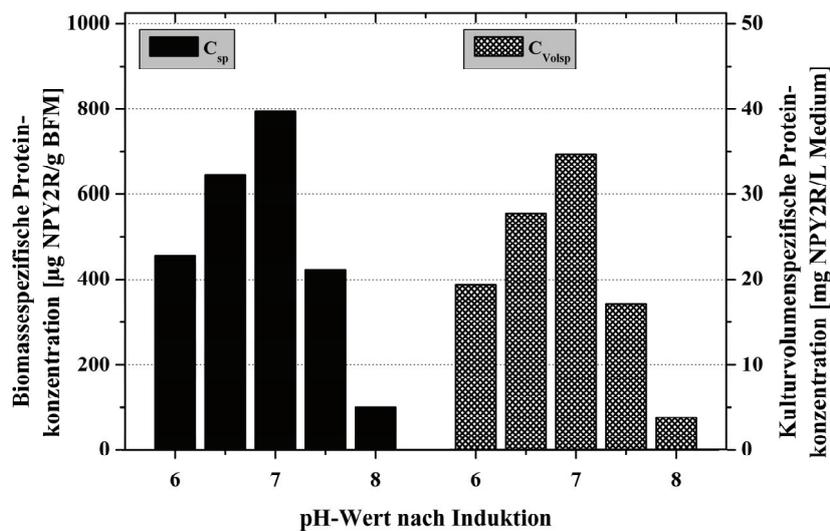


Abbildung 45: Zusammenfassung der ermittelten biomasse- und kulturvolumenspezifischen Ausbeuten des NPY2R in Abhängigkeit des pH-Wertes nach Induktion, der in einem Bereich von pH 6.0 und 8.0 in Inkrementen von 0.5 pH-Einheiten untersucht wurde. Das aus den Fermentationen gewonnene Zellpellet wurde der IB-Präparation unterzogen. Die Solubilisierung von 5 g IBs ermöglichte die chromatographische Reinigung und Bestimmung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Konzentrationen des NPY2R. Die kulturvolumenspezifischen Angaben wurden für das Endvolumen der Fermentationen bestimmt, das sich aus Batchvolumen und zugeführten Volumina von Base/Säure und Feed ergab.

Aus den erhaltenen Ergebnissen zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Rezeptorproduktion konnte ein optimaler pH-Wert von 7.0 bestimmt werden, der neben der optimalen Expressionstemperatur von 38°C für den folgenden Optimierungsschritt der Untersuchung der optimalen Feedstrategie übernommen wurde.

4.2.9 Ermittlung der optimalen Feedingstrategie zur Maximierung der biomasse- und kulturvolumensspezifischen Y2-Rezeptor-Ausbeuten in Rosetta R3

Der Einsatz einer limitierenden Feedingstrategie nach Induktion war sehr sinnvoll, um die Vergleichbarkeit der Rezeptorausbeuten, unter dem Gesichtspunkt der Variation der Prozessparameter (Kultivierungstemperatur und pH-Wert nach Induktion), und die Reproduzierbarkeit der Fermentationen zu gewährleisten. Allerdings war damit kein Zusammenhang bekannt, der den Schluss des Effektes der eingestellten, feedrealisierten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion auf die ausschlaggebenden Rezeptorausbeuten zuließ. So bestand die Möglichkeit einer Erhöhung der Y2-Rezeptor-Ausbeuten bei einer veränderten Feedstrategie. Aus dieser Grundlage heraus wurde die Untersuchung der Abhängigkeit der gebildeten Rezeptormenge von der gesetzten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion durchgeführt. Dabei wurden die in Kapitel 4.2.6 und 4.2.8 bestimmten optimalen Fermentationsparameter der Temperatur von 38°C nach Induktion und des konstanten pH-Wertes von 7.0 in analoger Weise realisiert. Die Versorgung des Expressionssystems mit Substrat nach Induktion wurde über die Änderung der gesetzten spezifischen Wachstumsrate durch den Feedstrom in einem Bereich von 0.10 g/(gh) bis 0.16 g/(gh) in Inkrementen von 0.02 g/(gh) variiert. Die sich daraus ergebenden Profile der Substratzufuhr wurden in Abbildung 46 dargestellt.

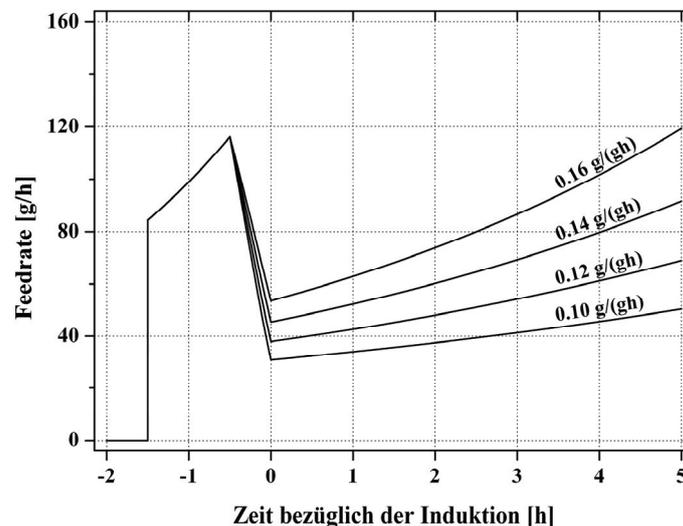


Abbildung 46: Darstellung der berechneten Feedprofile zur Untersuchung der Y2-Rezeptor-Produktion in Abhängigkeit der gesetzten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion für einen Bereich von 0.10 bis 0.16 g/(gh) in Inkrementen von 0.02 g/(gh).

Die Fermentation mit der optimalen Expressionstemperatur von 38°C (pH-Wert 7.0) und der gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) nach Induktion wurde erneut als Referenzfermentation bestimmt. Die Induktion erfolgte jeweils durch die Zugabe von 1 mM IPTG und wurde für 5 Stunden aufrecht erhalten. Das aus der Anwendung der berechneten Feedpro-

file und der in Kapitel 4.2.6/4.2.8 ermittelten optimalen Werte für Temperatur und pH-Wert resultierende Wachstumsverhalten von Rosetta R3-phY2 wurde in Abbildung 47 zusammengefasst. Die Daten der optischen Dichte (600 nm) wurden auf die Induktionszeit normiert.

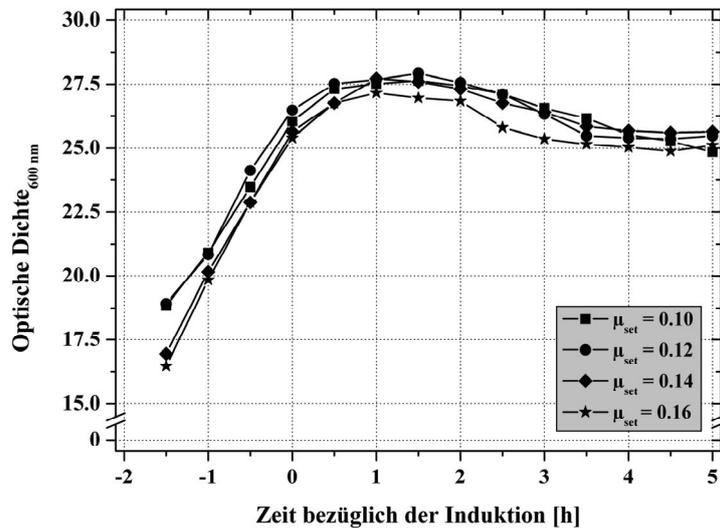


Abbildung 47: Zusammenfassung der gemessenen optischen Dichten bei 600 nm in allen Fermentationen zur Untersuchung der substratzulaufabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 in Rosetta R3. Dargestellt sind die Messdaten vom Beginn der Feedphase. Die Einstellung der Temperatur von 38°C nach Induktion erfolgte analog zur Reduzierung des Feedprofils, das eine spezifische Wachstumsrate von 0.10, 0.12, 0.14 oder 0.16 (g/gh) vorgab, innerhalb von 30 Minuten bis zum Zeitpunkt der Induktion mit 1 mM IPTG. Der pH-Wert wurde auf einen Wert 7.0 festgelegt. Die Expressionszeit betrug 5 Stunden.

Es erfolgte die Bestimmung der spezifischen Y2-Rezeptor-Konzentrationen (Abbildung 48).

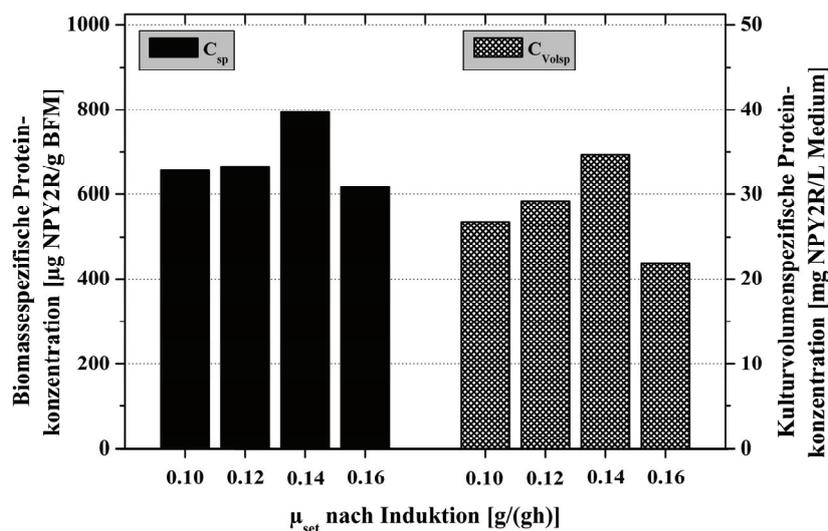


Abbildung 48: Abhängigkeit der biomasse- und kulturvolumenspezifischen NPY2R-Ausbeuten von der gesetzten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion. Die Untersuchung wurde in einem Bereich der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate nach Induktion von 0.10 bis 0.16 g/(gh) in Inkrementen von 0.02 g/(gh) geführt. Die Induktion wurde nach Reduktion des Feeds und Einstellung der Fermentationstemperatur auf 38°C mit 1 mM IPTG durchgeführt und für 5 Stunden aufrecht erhalten. Die Proteinkonzentrationsanalyse wurde mit den in Kapitel 3.2.7 dargestellten Protokollen durchgeführt. Die Endvolumina wurden aus Batchvolumen und Volumenzunahme durch Feed und Base kalkuliert.

Die aus jedem Prozess nach 5 Stunden Induktionszeit erhaltene Biomasse wurde nach den entsprechenden Protokollen aus Kapitel 3.2.7 behandelt. Die kulturvolumenspezifische Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2-Konzentration wurde auf das erreichte Endvolumen der jeweiligen Fermentation bezogen, das sich aus Batchvolumen und der Volumenzunahme, verursacht durch Base und Feed, zusammensetzte. Die ermittelten Rezeptorkonzentrationen wiesen das Ergebnis aus, das eine gesetzte spezifische Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) nach Induktion als Optimum zur maximalen biomasse- und kulturvolumenspezifischen Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2-Expression definierte.

4.2.10 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Fermentationsführung auf Biomasse- und Produktbildung

Um die Reproduzierbarkeit der Fermentationsprozesse beurteilen zu können, wurden zwei Fermentationen bei einer Temperatur von 37°C, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) nach Induktion in analoger Weise geführt. Die Bewertung der Wiederholbarkeit erfolgte anhand der Biomasse- (Abbildung 49) und Produktdaten (Tabelle 15).

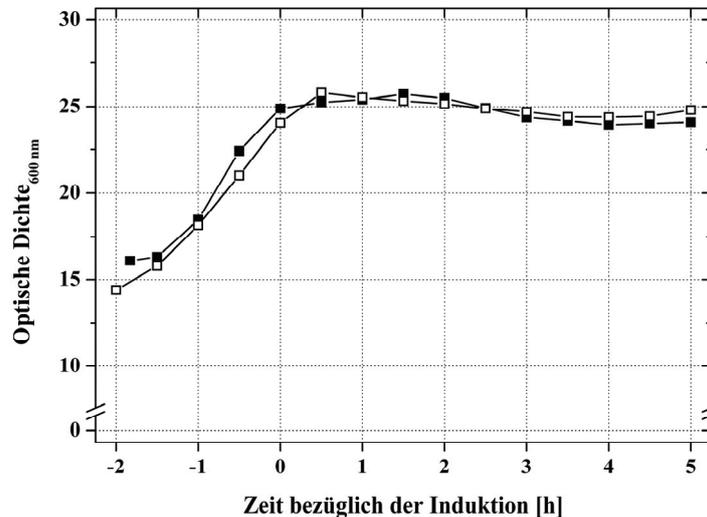


Abbildung 49: Darstellung der Reproduzierbarkeit der Daten der optischen Dichte bei zwei Fermentationen mit einer Temperatur von 37°C, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) nach Induktion. Die Induktion der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2-Synthese in Rosetta R3 erfolgte mit 1 mM IPTG und wurde für 5 Stunden aufrecht erhalten.

Die Daten der optischen Dichte bei 600 nm wiesen geringe relative Abweichungen im Bereich von 0.2 bis 1.5 % (3 Ausnahmen mit ca. 5 %) auf. Die Abweichungen der erhaltenen Biofeuchtmassen lagen bei etwa 1 %. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Protein-

daten brachte eine maximale Abweichung vom Mittelwert von ca. 3 % für die biomassespezifische und von ca. 2 % für die kulturvolumenspezifische Proteinkonzentration (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammenfassung der essentiellen Daten zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Batch-Fedbatch-Fermentationen zur Expression des NPY2R bei 37°C, einem pH-Wert von 7.0 und einer gesetzten spezifischen Wachstumsrate von 0.14 g/(gh) nach Induktion in einer Doppelbestimmung. Die Analyse der Produktausbeute wurde über die IB-Präparation, Solubilisierung und chromatographische Reinigung vorgenommen. Zusätzlich dargestellt wurde der Mittelwert aus den ermittelten Werten und die prozentuale Abweichung von diesem.

	1	2	Mittelwert	Abweichung [%]
BFM [g]	243.9	248.4	246.15	0.9
IBs [g]	30.8	24.3	27.55	10.5
NPY2R/BFM [$\mu\text{g/g}$]	368	343	355.5	3.4
NPY2R/Volumen [mg/L]	15.57	15.0	15.29	1.8
NPY2R_{Gesamt} [mg]	89.7	85.2	87.45	2.5

Weiterhin wurden alle durchgeführten Fermentationen zur Untersuchung der fermentationsparameterabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 anhand der Profile der verbrauchten Base bis zum Zeitpunkt der Änderung der Fermentationsparameter auf Reproduzierbarkeit untersucht. Die folgende Abbildung zeigt die Baseprofile aller Fermentationen unter der Angabe des Mittelwertes und eines 5 %igen Vertrauensbereiches.

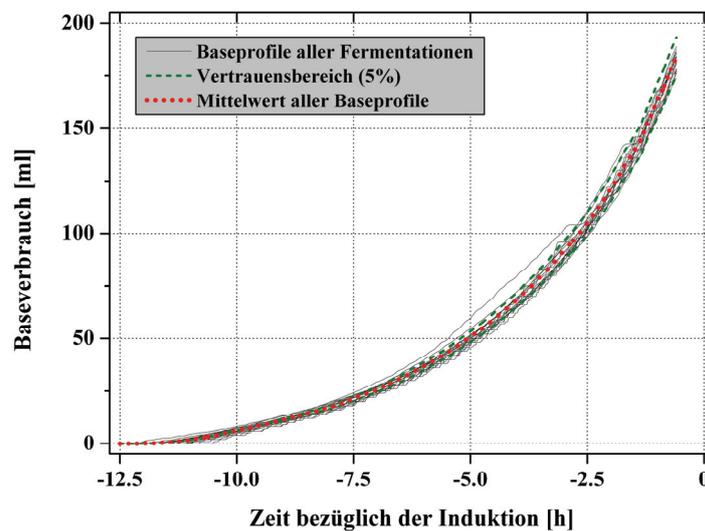


Abbildung 50: Veranschaulichung der Reproduzierbarkeit der Fermentationsführung anhand der verbrauchten Base aller durchgeführten Fermentationen zur Maximierung des NPY2R-Gehaltes in Rosetta R3 nach 5 Stunden Induktionszeit. Die Profile wurden gemittelt und zusätzlich ein Vertrauensbereich von 5 % angegeben. Die Darstellung erfolgte bis 30 Minuten vor Induktion, da ab diesem Zeitpunkt die Prozessparameter geändert wurden.

Die in Abbildung 50 gezeigten Baseprofile verdeutlichen eine hohe Reproduzierbarkeit in der Fermentationsführung. Der Grad der Reproduzierbarkeit der Fermentationsführung wurde zusätzlich durch die erreichten optischen Dichten zu diskreten Zeitpunkten bestimmt, indem

der Mittelwert der optischen Dichten aus allen durchgeführten Fermentationen zu diesen Zeitpunkten gebildet und ein Vergleich relativ zum Mittelwert (Abbildung 51) geführt wurde. Die gewählten Zeitpunkte, i. das Ende der Batchphase ii. der Zeitpunkt der Feedphase, bevor die Änderung der Prozessparameter begann (30 Minuten vor Induktion), stellten eine Vergleichbarkeit her, da die Fermentationen in diesem Zeitrahmen noch keine Unterschiede in der Prozessführung aufwiesen. Außerdem konnte anhand dieser Punkte zusätzlich die Wirkung des *Open Loop Feed Control* nachvollzogen werden, denn die feedgesteuerte Begrenzung der spezifischen Wachstumsrate, die unterhalb der maximalen spezifischen Wachstumsrate des Expressionssystems lag, musste eine Reduktion der relativen Fehler bezogen auf den Mittelwert bewirken.

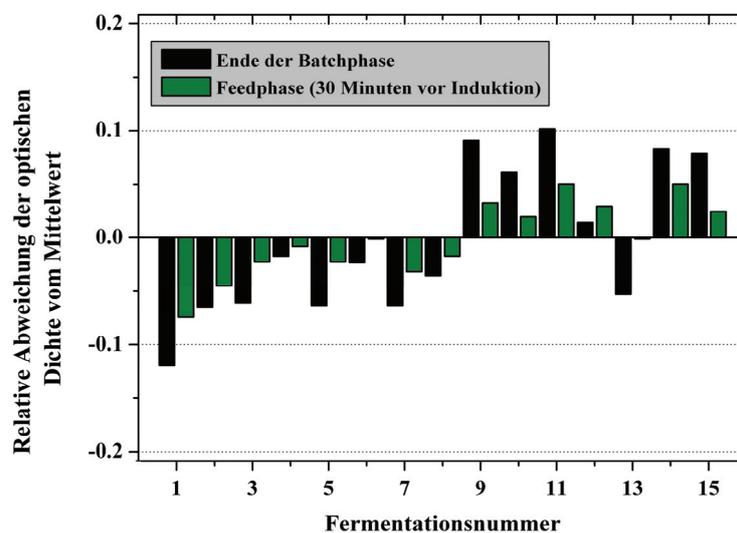


Abbildung 51: Darstellung der Reduktion der auf den Mittelwert bezogenen relativen Abweichungen der optischen Dichten (600 nm) am Batchende und 30 Minuten vor Induktion. Es wurde der Mittelwert der Messdaten aller zur Untersuchung der prozessparameterabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 durchgeführten Fermentationen gebildet. Die Abweichungen der Messdaten wurden relativ zum Mittelwert dargestellt. Die Belegung der Fermentationsnummern: 1 - 8 Fermentationen zur Untersuchung der temperaturabhängigen Expression (Kapitel 4.2.6) (aufsteigend), 9 - 12 Fermentationen zur Untersuchung der pH-Wert-abhängigen Expression (Kapitel 4.2.8) (aufsteigend), 13 - 15 Fermentationen zur Untersuchung der μ_{set} -abhängigen Expression (Kapitel 4.2.9) (absteigend).

Es wurde mit einer Ausnahme für jede Fermentation eine Reduktion der relativen Fehler der Messdaten der optischen Dichten bezogen auf den Mittelwert durch das Nutzen des *Open Loop Feed Control* nachgewiesen. Dies bedeutet, dass die Abweichungen in der Fedbatchphase im Vergleich zur Batchphase reduziert wurden. Die Abweichungen vom Mittelwert konnten grundsätzlich in einen Bereich von 0.1 - 5 % geführt werden (eine Abweichung mit ca. 7 %) und beschreiben damit fortführend zur Beurteilung der Wiederholbarkeitsuntersuchungen mit Hilfe der Baseprofile eine reproduzierbare Prozessführung.

4.2.11 Mathematische Beschreibung der Fermentationsprozesse zur Untersuchung der prozessparameterabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2

Die mathematische Erfassung der gemessenen Daten aller durchgeführten Fermentationen in einem Prozessmodell wurde auf der Grundlage der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Gleichungen (19) bis (23) durchgeführt. Der Unterschied zu der Prozesssimulation der Produktion des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 war die Bilanzierung des Reaktorraumes, die den Zustrom von Base und Säure bzw. des Feeds zuließ und damit eine Änderung des Gesamtvolumens bzw. der Gesamtmasse mit der Zeit kalkulierte. Dazu wurden die Onlinedaten dieser Größen herangezogen und dem Einfluss auf die Biomasse-, Base- und Produktdaten Rechnung getragen. Die Ergebnisse der Simulation für Biomasse-, Base- und Produktverläufe der Fermentationen zur Untersuchung der temperaturabhängigen Expression des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 wurden in Abbildung 52 zusammengefasst.

Alle weiteren erhaltenen Ergebnisse für die Fermentationen zur pH- bzw. feedabhängigen Expression des NPY2R sowie das erstellte Prozessmodell sind im Anhang A3 dargestellt. Der Wichtung der einzelnen Einflüsse (Temperatur, pH-Wert, Feedstrategie) auf das Wachstum bzw. die Produktausbeute wurde durch das Erstellen und Einbeziehen entsprechender Peakfunktionen entsprochen. Dies ermöglichte innerhalb des Bereiches, in dem die Peakfunktionen Gültigkeit besaßen, die freie Wahl der Prozessparameter zur Vorhersage der erwarteten Verläufe für Biomasse, Base und Produkt. Die Parameter der Produktbildungskinetik (π_{\max} und t_{lag}) wurden mit Hilfe der Fermentation zur Untersuchung der zeitabhängigen Expression des NPY2R mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (Kapitel 4.2.5) bestimmt.

Die mit Hilfe des Prozessmodells simulierten Verläufe der entscheidenden Größen der Fermentationen weisen eine gute Näherung der gemessenen Daten für Biomasse, Base und Zielprotein für alle durchgeführten Fermentationen auf. Dadurch besitzt das Prozessmodell eine gute Vorhersagequalität bei frei wählbaren Fermentationsparametern für Temperatur, pH und Feedrate innerhalb der untersuchten Bereiche. Allerdings traten auch Abweichungen der simulierten Verläufe von den Messdaten auf. Dies war vor allem den angewendeten Peakfunktionen geschuldet, die die Einflüsse an den Grenzen der untersuchten Bereiche von Temperatur, pH-Wert und gesetzter spezifischer Wachstumsrate nicht hinreichend genau beschrieben. Somit ist eine Extrapolation mit Hilfe des Prozessmodells außerhalb der untersuchten Bereiche der Fermentationsparameter nicht möglich. Allerdings kann auf der Basis eines solchen Simulationsmodells eine Abschätzung der optimalen Prozessparameter erfolgen.

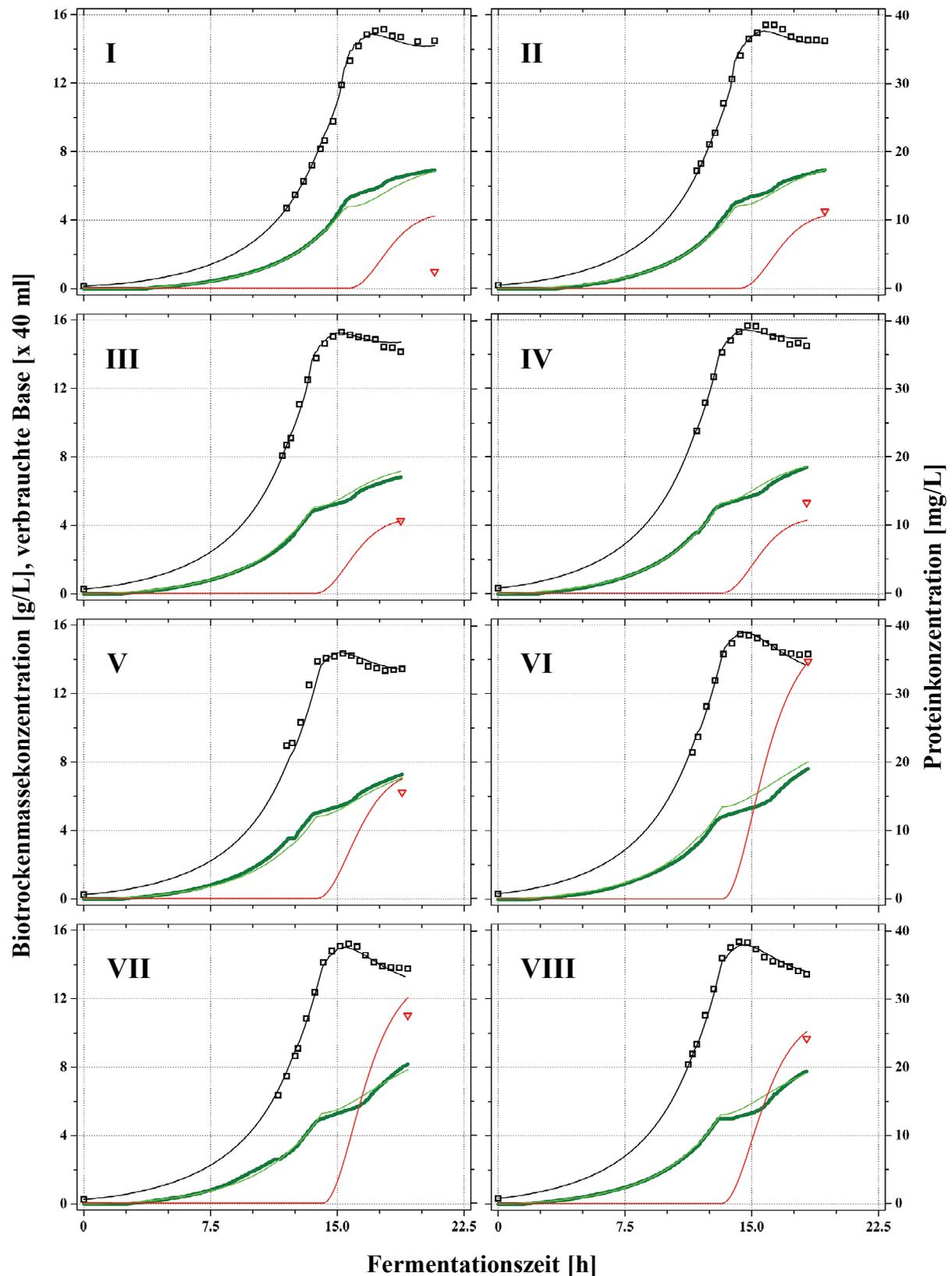


Abbildung 52: Darstellung der Simulationsergebnisse für die Fermentationen zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der NPY2R-Expression (I. 30°C, II. 32°C, III. 34°C, IV. 36°C, V. 37°C, VI. 38°C, VII. 39°C, VIII. 40°C). Gezeigt sind die Verläufe der Biomassekonzentration (schwarz, Punkte - MD, Linie - Sim), verbrauchte Base (grün - MD, helles grün - Sim) und Proteinkonzentration (rot, Punkte - MD, Linie - Sim). Die gesetzte spezifische Wachstumsrate wurde auf einen Wert von 0.14 g/(gh) und der pH-Wert auf 7.0 festgelegt.

5 Diskussion der Ergebnisse

Das Interesse an der Struktur und Wirkungsweise von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hat eine große Anzahl von Methoden zur Untersuchung dieser Proteine hervorgebracht. Das grundlegende Problem der Präparation von Proben liegt dabei allerdings bereits am Anfang dieser Prozeduren. Die Expression von GPCRs ist mit Schwierigkeiten verbunden. Unterschiedliche, vor allem eukaryontische, Expressionssysteme bieten dabei Vorteile, die die Ausbildung der nativen Strukturen günstig beeinflussen. Allerdings sind diese Expressionssysteme kaum in der Lage, die für strukturelle Untersuchungen notwendigen Mengen herzustellen. Weiterhin werden die möglichst nativ hergestellten Zielproteine für die bisherige Herangehensweise zur Untersuchung mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse stark modifiziert (Entfernung von posttranslationalen Modifikationen, Nutzung von Fusionspartnern, Stabilisierung durch einen Antagonisten, Einführung von Punktmutationen, Deletionen von teilweise über 150 Aminosäuren), um eine Kristallbildung erst möglich zu machen. Dies bedeutet nun, dass die äußerst schwierige und zeitaufwendige Kultivierung der Zellen und die Expression eines posttranslational modifizierten Rezeptors umgangen werden kann, wenn die gewünschten Modifikationen zur Strukturanalyse am Ende wieder entfernt werden. Eine Anwendbarkeit der NMR-Spektroskopie, die den Vorteil einer Untersuchung eines nicht konformationell gebundenen Proteins bietet, ergibt sich mit den eukaryontischen Expressionssystemen ebenfalls nur mit mittlerer bis geringer Effizienz, da in den meisten Fällen nur eine Kultivierung mit Hilfe komplexer Medien möglich ist und somit die Inkorporierung der für die NMR notwendigen Isotopen nicht vorhersagbar wird. Die Lösung dieser Probleme ist die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit Hilfe von Bakterien, die eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber eukaryontischen Wirten aufweisen. Dabei spielt die Verwendung von definierten Medienzusammensetzungen eine übergeordnete Rolle. Aber auch die hohen erreichbaren Zelldichten und die hohen biomassespezifischen Produktausbeuten favorisieren diesen Zelltyp.

Diesen Behauptungen wurde in der vorliegenden Arbeit in der Weise Rechnung getragen, dass eine Methodik entwickelt wurde, die eine hocheffiziente Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in nativer und nicht nativer, spezifisch und unspezifisch isotonenmarkierter Form in *Escherichia coli* für Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie ermöglicht. Dabei wurde für den nativ exprimierten Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 eine zu eukaryontischen Expressionssystemen vergleichbare kulturvolumenspezifische Ausbeute erzielt, die aber den Vorteil der hocheffizienten (> 95 %) spezifischen und unspezifischen

Isotopenmarkierung der Aminosäuren bietet. Die Kultivierung ist zudem wesentlich kontrollierbarer und benötigt weniger Zeit. Außerdem wurde für diesen Rezeptor eine Funktionalität in Form der Ligandenbindungs- und der G-Protein-Aktivierungsfähigkeit nachgewiesen, so dass die in der Natur auftretenden posttranslationalen Modifikationen zumindest nicht in detektierbarem Maße für die Aktivität des CB2R notwendig sind. Die Ausbildung der extrazellulären Disulfidbrücke des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 war allerdings durch die enge Lokalisation zum Dsb-System (Dsb *Disulfide bond*, DsbA und DsbB: Disulfidausbildung, DsbC und DsbD: Disulfidisomerisierung)³⁸ von *Escherichia coli* möglich.³⁸ Die genannten Vorteile einer hohen Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit, sowie die geringen Kultivierungszeiten treffen ebenfalls für die Herstellung des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 zu. Die Notwendigkeit der posttranslationalen Modifikationen für die funktionelle Aktivität der Rezeptoren konnte ebenfalls nicht verifiziert werden, da die in der Literatur beschriebene Ligandenbindungsfähigkeit von aus *Inclusion Bodies* renaturierten und rekonstituierten Neuropeptid Y-Rezeptoren des Typs 2¹⁰⁰ einen Aufschluss auf die native Konformation zulässt. Außerdem sind die maximal erreichten kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten im Vergleich mit anderen Expressionssystemen (Tabelle 6) teilweise um eine Zehnerpotenz höher. Bei einer geeigneten Prozessführungsstrategie, die im Folgenden betrachtet wird, kann im entwickelten System eine Effizienz der unspezifischen Markierung des NPY2R mit ¹⁵N-Isotopen etwa in einem Bereich > 98 % und mit ¹³C-Isotopen etwa in einem Bereich > 95 % erreicht werden.

5.1 Bewertung der Expressionsstrategien

5.1.1 Bewertung der Prozessführungsstrategien

Zur rekombinanten Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten GPCRs wurden unterschiedliche Prozessführungsstrategien verwendet. Diese gründeten aus den unterschiedlichen Zielstellungen. Der Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 wurde für die spezifische Isotopenmarkierung der Tryptophane der Primärsequenz in einem Batchverfahren kultiviert. Es könnte zwar ähnlich dem Beispiel des NPY2R von einer substratlimitiert bedingten Steigerung der biomasse- und kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten ausgegangen werden, jedoch war diese Methodik aus folgenden Gründen die geeignete Wahl. Die Anwendung einer Feedstrategie, die zu einer Limitation der Kohlenstoffquelle führt, würde wahrscheinlich nicht in großem Maße die Tryptophanaufnahme der Zellen beeinflussen. Allerdings würde die Effizienz der ¹⁵N-Isotopenmarkierung nur an Tryptophanen beträchtlich gemindert, da diese zusätzliche Kohlenstoffquelle unter Limitation der primären C-Quelle (Glucose) zum Wachstum metabo-

lisiert würde. Damit wäre eine Verschiebung der Stickstoffatome in andere Aminosäuren oder Zellbestandteile verbunden. Das Design des Expressionssystems ist damit direkt korreliert, da dieses auf eine geringe Expressionsrate ausgelegt wurde, sodass die Zellmorphologie möglichst gering durch die Expression der hydrophoben Proteine beeinflusst wird und somit ein Zellsterben verhindert. Dies verursacht allerdings auch ein beinahe unverändertes Wachstumsverhalten der Zellen nach Induktion, sodass bei der Zuführung der zusätzlichen Kohlenstoffquelle Tryptophan unter limitierenden Bedingungen von Glucose die Aminosäure verstoffwechselt würde. Das Absenken der Expressionstemperatur mindert ebenfalls die Expressionsrate und bewirkt zusätzlich eine beträchtliche Erhöhung von ungesättigten Fettsäuren in der Membran von *Escherichia coli*,¹⁶³ die positiven Einfluss auf die Funktionalität von GPCRs zeigen.¹⁶⁴ Die geringe Expressionsrate, verursacht durch die niedrige Temperatur, fördert natürlich auch die native Rezeptorkonformation¹¹⁰ und verringert die Bildung von *Inclusion Bodies*.^{165,166}

Für die unspezifische Markierung mit ¹⁵N-Isotopen des CB2-Rezeptors vermindert die Batchstrategie die Effizienz der Inkorporierung nicht, wenn bereits zu Beginn der Fermentation die Stickstoffquelle zugesetzt würde. Allerdings könnte durch die Anwendung einer Fedbatchprozessführung die biomasse- und kulturvolumenspezifische Rezeptorausbeute gesteigert werden. Weiterhin kann ebenfalls die Menge funktionaler Rezeptoren erhöht werden, da durch die substratlimitierende Feedstrategie auch eine Reduktion der Produktbildungsrate erreicht bzw. das Verhältnis von Wachstumsrate zu Produktbildungsrate positiv beeinflusst werden kann.

Im Fall einer angestrebten unspezifischen Markierung des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 mit ¹³C ist eine Limitation der Kohlenstoffquelle unbedingt zu gewährleisten. Zum Einen mindert dies die Menge des benötigten, teuren Substrats und zum Anderen wird die in Kapitel 4.1.7 beschriebene Akkumulation von Kohlenhydraten und weiteren Stoffen unterdrückt, die bei der Reduktion der Temperatur auftritt. Die Unterdrückung der Akkumulation ist äußerst wichtig, da die gespeicherte ¹²C-Quelle in der Produktionsphase des Rezeptors die Effizienz der Isotopenmarkierung beträchtlich senken würde. Um das zu verhindern, wäre der Einsatz der markierten Kohlenstoffquelle vom Beginn der Fermentation notwendig, was jedoch nicht sinnvoll ist. Es würde sonst nur Biomasse und kein Produkt in der Wachstumsphase vor Induktion aus der Kohlenstoffquelle gebildet. Die Zuführung der isotopenmarkierten Kohlenstoffquelle ist ca. 1 bis 0.5 Stunden vor Induktion sinnvoll, wenn eine Reduktion der Feedrate bewerkstelligt wird, sodass die unter Umständen akkumulierten Stoffe und die im Medium enthaltenen Kohlenstoffquellen vor Induktion möglichst vollständig metabolisiert werden.

Für die Produktion eines spezifisch isotoopenmarkierten Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 kann eine andere Methodik als für den CB2-Rezeptor herangezogen werden. Unter der Bedingung von Glycerin als Kohlenstoffquelle kann eine substratlimitierte Feedstrategie angewendet werden. Die durch die Verdünnung durch Base- bzw. Feedzuströme korrigierten Werte der gemessenen optischen Dichten nach Induktion zeigten keine Zellyse wie im Fall von Glucose als Kohlenstoffquelle bzw. wie im Fall von LB als Medium, sondern vermittelten lediglich eine Stagnation des Wachstums. In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass die Stagnation des Wachstums von Mikroorganismen ein Gleichgewicht aus Zellsterbe- und Zellwachstumsrate darstellt.¹⁶⁷ Das bedeutet, dass das durch die Zellen aufgenommene Glycerin zwar nicht vollständig aber zum großen Teil für die Proteinsynthese und den Erhaltungsstoffwechsel verwendet wird. Somit würde die Effizienz der spezifischen Isotoopenmarkierung sowie die Aminosäurespezifität nur in geringem Maße gemindert. Um diese Minderung zu umgehen, müsste analog zum Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 eine Batchstrategie verwendet werden. Dies ist aber in keiner Weise sinnvoll, da der Überschuss der Kohlenstoffquelle (Beispiel: gesetzte spezifische Wachstumsrate nach Induktion 0.16 g/(gh), Kapitel 4.2.9) die Rezeptorausbeuten beträchtlich mindert.

Die unspezifische Isotoopenmarkierung des NPY2R ist nur unter Anwendung eines Fedbatchverfahrens sinnvoll, da die maximale Rezeptorkonzentration, die unter Substratlimitierung erreicht wird, unabhängig von der Funktionalität betrachtet das Ziel darstellte. Die Behauptung, dass im System Rosetta R3-phY2 eine Effizienz der unspezifischen ¹⁵N-Isotoopenmarkierung des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 von > 98 % erreicht werden kann, stützt sich auf die Voraussetzung, dass die markierten Stickstoffquellen bereits vom Beginn der Fermentation dem Batchmedium und natürlich dem Feed zugesetzt werden. Die vollständige 100 %ige Effizienz ergibt sich natürlich nicht. Die folgenden Gründe lassen dies nicht zu: i. alle genutzten Chemikalien besitzen Verunreinigungen (durchschnittliche Reinheit der verwendeten Chemikalien: 99.5 %), die auch Stickstoff beinhalten, ii. die verwendeten ¹⁵N-Quellen erreichen keine 100 %ige Anreicherung mit dem schweren Isotop, iii. das eingesetzte Inokulum beinhaltet nur ¹⁴N, sodass dies als weitere Verunreinigung hinzu kommt. Dies stellt sich ähnlich für die Effizienz der ¹³C-Isotoopenmarkierung dar. Des Weiteren ist der Einsatz der markierten Kohlenstoffquelle aus Kostengründen erst ca. 30 Minuten vor Induktion zu empfehlen. Da ab diesem Zeitpunkt auch die Feedrate beträchtlich gesenkt wird, ist eine maximale Metabolisierung im Zeitraum zwischen der Umstellung von ¹²C- auf ¹³C-Glycerin bis zur Induktion sehr wahrscheinlich. Da allerdings die oben angesprochene Stagnation des Wachstums ein Gleichgewicht aus Zellsterbe- und Zellwachstumsrate ist,¹⁶⁷ wird das bis dahin metabolisierte

^{12}C -Glycerin zum Teil wieder frei verfügbar. Daher kann in diesem Fall keine 98 %ige Effizienz der ^{13}C -Inkorporierung in den Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 erreicht werden.

5.1.2 Bewertung der Einflüsse der genutzten Kohlenstoffquelle auf die Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 und Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2

Für die Expression der in dieser Arbeit untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden in Abhängigkeit der jeweilig verwendeten Kohlenstoffquelle sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Diese Unterschiede müssen zum größten Teil auf die Expressionsplasmide zurückzuführen sein, da die Expressionswirte im Wesentlichen übereinstimmten. Der zur Produktion des NPY2R verwendete *E. coli*-Stamm war ein Derivat des BL21(DE3), der zur Herstellung des CB2-Rezeptors Anwendung fand. Das sich stark unterscheidende Wachstumsverhalten der Expressionssysteme im Minimalmedium (Rosetta R3-phY2: $\mu_{\text{max}} = 0.3 \text{ g/(gh)}$, BL21-130: $\mu_{\text{max}} = 0.5 \text{ g/(gh)}$) war auf die höhere Syntheseleistung von Rosetta R3 für die Plasmide zurückzuführen. Zum Einen musste dieser Stamm das zusätzliche Plasmid, das die in *E. coli* seltenen tRNAs zur Verfügung stellte, synthetisieren und zum Anderen wirkte sich die höhere Kopienzahl des Plasmids phY2 (*High Copy*-Plasmid, Anzahl pro Zelle: $\sim 40^{\text{E}}$) auf die maximale spezifische Wachstumsrate der Zellen aus. Dagegen handelte es sich bei dem Plasmid pAY130 zur rekombinanten Herstellung des Cannabinoid-Rezeptors um ein *Low Copy*-Plasmid¹¹⁰ (Anzahl pro Zelle: $\sim 15^{165}$), das eine reduzierte Expressionsrate ermöglichen sollte, um die native Konformation und Lokalisation des Rezeptors in der Membran zu begünstigen.

Der wesentliche Unterschied der Expressionsplasmide, die für den NPY2R und den CB2R codierten, war eine Anwendung unterschiedlicher lac-Promotoren. Im Plasmid pAY130 war der *Escherichia coli*-Wildtyp des lac-Promotors^{168,169} enthalten. Das Plasmid phY2 codierte in der Nukleotidsequenz für eine mutierte Form des lac-Promotors,¹⁷⁰ den lacUV5-Promotor^E. Mit diesen unterschiedlichen Promotoren lassen sich die Einflüsse der Kohlenstoffquellen auf die Produktbildung erklären. Im Fall der Expression des NPY2R wirkte sich der lacUV5-Promotor, dessen Regulation unabhängig von der Wachstumsrate des Expressionswirtes und von der Kohlenstoffquelle in Batch- und Fedbatchverfahren ist,¹⁷¹ nicht auf die gebildete Produktmenge aus. Die Tatsache, dass bei der prozessparameteridentischen Kultivierung und Induktion des Expressionssystems im Komplex- und Mineralsalzmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle nach einer Induktionszeit von 4 Stunden jeweils biomassespezifische Y2-Rezep-

^E Novagen, pET System Manual, 11th Edition, verfügbar unter http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/literature/c_gfib.s1O0vMAAAEjhaVumAom

tor-Konzentrationen in einem Bereich von 100 μg NPY2R/g BFM aber im Mineralsalzmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle etwa 240 μg NPY2R/g BFM erreicht wurden, lässt sich mit dem stabilisierenden Einfluss von Glycerin auf Membranen erklären. Glycerin und andere Gefrierschutzmittel verändern die Membranfluidität, was sich in der Erhöhung der Rigidität von Phospholipidbilayern äußert,¹⁷² und verhindert das Eintreten von Polypeptiden in die Zellmembran.¹⁷³ Damit konnte die Produktion des stark hydrophoben NPY2R auf Basis von Glycerin die Zellmorphologie nur in sehr geringem Maße beeinflussen, sodass eine höhere biomassespezifische Produktausbeute in kürzerer Zeit möglich war. Dies steht ebenfalls mit dem Wachstumsverhalten der Zellen in Einklang, da der stabilisierende Effekt von Glycerin bei dem Einsatz von Glucose und LB nicht zum Tragen kam und damit die starke Zellyse erklärt. Der Unterschied des Wachstumsverhaltens von Rosetta R3-phY2 in Glucose ($\mu_{\text{max}} = 0.3 \text{ g}/(\text{gh})$) und Glycerin ($\mu_{\text{max}} = 0.32 \text{ g}/(\text{gh})$) erklärt sich mit der nachgewiesenen Basalexpression bei Glucose als Kohlenstoffquelle (Kapitel 4.2.5), die sich in einer Reduzierung der Wachstumsrate aufgrund der Syntheseleistung für das Zielprodukt äußerte.

Die Regulation des *Escherichia coli*-Wildtyp lac-Promotors im Plasmid pAY130 ist im Gegensatz zum lacUV5-Promotor kohlenstoffquellen- und wachstumsratenabhängig.¹⁷¹ Die Kohlenstoffquellenabhängigkeit der Regulation für den Wildtyp des lac-Promotors besteht in der Hemmung der nichtinduzierten Basalexpression durch die Anwesenheit von Glucose im Medium, die zusätzlich eine Verringerung der cAMP-Konzentration in den Zellen zur Folge hat.¹⁷⁴ Cyclisches Adenosinmonophosphat wirkt stimulierend auf eine durch das lac-Operon kontrollierte Expression.¹⁷⁴ Bei der Herstellung des CB2R auf der Basis von Glycerin als Kohlenstoffquelle konnte im Western Blot (Kapitel 4.1.2) kein Zielprotein nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zur beschriebenen Kohlenstoffquellenabhängigkeit der Promotorregulation, da in diesem Fall sogar eine Basalexpression nachgewiesen werden müsste.¹⁷⁵ Allerdings kann dieser Effekt mit der oben genannten stabilisierenden Wirkung von Glycerin auf die Membran und die damit verbundene Unterdrückung der Inkorporation der Rezeptoren erklärt werden. Die hohe Basalexpression stand mit der im Vergleich zu Glucose ($\mu_{\text{max}} = 0.5 \text{ g}/(\text{gh})$) als Kohlenstoffquelle stark reduzierten maximalen spezifischen Wachstumsrate ($\mu_{\text{max}} = 0.27 \text{ g}/(\text{gh})$) in Verbindung. Die IPTG-induzierte Expression zeigte einen nur geringen Einfluss auf das Wachstumsverhalten, sodass damit ein weiterer Hinweis auf eine hohe Basalexpression vorlag. Beide Effekte konnten nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Der Grund dafür lag in der Wirkung des Glycerins als Membranstabilisator, sodass eine Expression des CB2R nur in *Inclusion Bodies* vorliegen konnte. Die Untersuchung mit dem Protokoll zur Analyse der biomassespezifischen CB2R-Konzentration ent-

zog sich auch für die Analyse des NPY2R-Gehaltes der Zellen einer Anwendbarkeit (Kapitel 3.2.7, Expressionstests), da die Solubilisierung der *Inclusion Bodies* nicht effektiv war. Somit konnte ein in *Inclusion Bodies* eingelagerter Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 ebenfalls nicht mit der Western Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Die wachstumsabhängige Regulation des lac-Operons, codiert auf dem Plasmid pAY130, besteht im indirekt proportionalen Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der Produktbildungsrate.¹⁷¹ Die Bestätigung findet sich im Vergleich der optimalen Induktionszeit von 40 Stunden für die Kultivierung im Komplexmedium¹¹⁰ ($\mu_{\max} = 1.3 \text{ g/(gh)}$) und von 10 Stunden für die Kultivierung in MSM-CB2 Glucose (Abbildung 24 bzw. Abbildung 28) ($\mu_{\max} = 0.5 \text{ g/(gh)}$). Eine wachstumsabhängige Regulation des lac-Operons konnte für die gesamten Aminosäuremedien, auch für den Einsatz von Tryptophan als einzige Aminosäure in MSM-CB2 Glucose, nicht bestätigt werden. Ungeachtet dessen, dass BL21-130 in diesen Medientypen höhere Wachstumsraten aufwies als für die Kultivierung in MSM-CB2 Glucose, wurde ein Shift der maximalen biomassespezifischen Produktkonzentration von ≤ 10 auf ≤ 4 Stunden Induktionszeit nachgewiesen. Der Grund liegt in der Entkopplung der Regulation der Produktbildungsrate von der Wachstumsrate durch das Angebot von produktspezifischen Grundbausteinen. Es musste ein geringerer Teil der Aminosäuresyntheseleistung durch das Expressionssystem erbracht werden, sodass auch bei hohen Wachstumsraten eine hohe Produktbildungsrate auftreten konnte. Dies ist ebenfalls zutreffend für den Einsatz von Tryptophan als einzige Aminosäure in MSM-CB2 Glucose, da die Synthese eines Tryptophanmoleküls die Energie von 74 Phosphat-Bindungen benötigt, während die Synthese für andere Aminosäuren in der Regel nur die Energie von etwa 10 bis 30 Phosphat-Bindungen verbraucht.¹⁷⁶ Diese hohen Energiekosten für die Synthese von Tryptophan erklärt auch die effiziente Aufnahme dieser Aminosäure durch die Synthese des Systems für den aktiven Transport¹⁷⁷ aromatischer Aminosäuren (der Transporter ist das Genprodukt vom sogenannten aroP-Gen).¹⁷⁸

Für den Verlust eines ^{15}N -Atoms während der $^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan-Aufnahme und Inkorporierung in den Cannabinoid-Rezeptor sind zwei Ansätze zur Erklärung vorhanden. Die unwahrscheinlichere Erklärung bietet der Ansatz, dass das Enthalten von Tryptophan des *E. coli* umgebenden Mediums in diesem Bakterium auch die Synthese der Tryptophanase induziert,^{174,175,179} die Tryptophan in Indol, ein für *Escherichia coli* toxisches Produkt¹⁷⁸ der Umsetzung, Pyruvat und Ammoniak spaltet.¹⁸⁰ Die Synthese der Tryptophanase ist allerdings auch an den Wildtyp lac-Promotor gebunden, der vor Induktion durch hohe Glucose- und niedrige cAMP-Konzentrationen inhibiert wird. Weiterhin ist diese Induzierbarkeit bei nied-

rigeren Temperaturen stark gemindert.¹⁶³ Der Ansatz, der zur Erklärung des Verlustes eines ¹⁵N-Atoms im Tryptophan wesentlich wahrscheinlicher ist, beinhaltet die Wirksamkeit einer Aminotransferase, deren Reaktionsprodukte keine Auswirkungen auf das Wachstum durch eine Toxizität wie bei der Umsetzung durch die Tryptophanase zeigen. Die Wirkung der *E. coli*-Aminotransferase (auch Transaminase) wäre ein Austausch der α -Aminogruppe und somit das Abtrennen des ¹⁵N-Labels.¹⁸¹ Das Stickstoffisotop des Indolrings wäre auch in diesem Fall der massenspektrometrischen und der strukturellen Untersuchung mittels NMR zugänglich.

5.2 Bewertung der Expressionsausbeuten der produzierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die in der Literatur zur Beurteilung der Expressionseffizienz genutzte kulturvolumenspezifische Rezeptorkonzentration macht eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Expressionssysteme erst möglich, da die sich unterscheidenden Messmethoden zur Bestimmung von Biomassekonzentrationen von Prokaryonten und Eukaryonten keine Vergleichbarkeit herstellen. Zwar existieren Zusammenhänge zwischen Zellzahl (häufige Bestimmungsmethode bei Säuger- und Insektenzellen) und der Biotrocken- bzw. Biofeuchtmasse sowie der optischen Dichte (häufige Bestimmungsmethoden für Bakterien und Hefen), allerdings sind die jeweiligen Korrelationen nicht in der Literatur bestimmt oder aufgeführt. Des Weiteren fehlen häufig Wachstumskurven, die zumindest eine Abschätzung der biomassespezifischen Rezeptorkonzentrationen zuließen. Weiterhin kann für die zellfreie Expression keine Biomassemenge angegeben werden. Trotz dieses großen Vorteils der kulturvolumenspezifischen Produktkonzentration ist diese Bewertungsmethode kritisch zu betrachten, da die pro Liter Medium hergestellte Rezeptormenge nur von der gebildeten Biomasse abhängt.

Aus diesen Gründen erfolgte die in Tabelle 16 dargestellte Beurteilung der erreichten biomassespezifischen Rezeptorkonzentration nur anhand von Rezeptoren, die in *Escherichia coli* exprimiert wurden.

Für die in dieser Arbeit untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte gegenüber den in der Literatur beschriebenen GPCRs eine beträchtliche Steigerung der biomassespezifischen Produktkonzentrationen nachgewiesen werden. Eine weitere Steigerung ist die hoch-effiziente Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in einer definierten Medienzusammensetzung, die eine spezifische und unspezifische Isotopenmarkierung der Aminosäureprimärsequenz zulässt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der erreichten biomassespezifischen Rezeptorkonzentrationen für den CB2- und Y2-Rezeptor und Gegenüberstellung mit erreichten Werten aus der Literatur für die Expression in *Escherichia coli*. Die Kalkulation des theoretisch erreichbaren Wertes für den NPY2R basiert auf der in Kapitel 4.2.7 bestimmten Steigerung durch die Erhöhung der Induktorkonzentration.

G-Protein-gekoppelter Rezeptor	Biomassespezifische Rezeptorausbeute [µg/g]	Funktionalität	Bemerkung
Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 (human)^{dA}	24	+	Minimalmedium
A_{2A}-Adenosin-Rezeptor (human)¹⁰⁹	15	+	Komplexmedium
Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 (human)^{dA}	800	-	Minimalmedium
Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 (human)^{dA}	960	-	theoretisch mit 20 %iger Steigerung durch Induktion mit 2 mM IPTG
Neurokinin-Rezeptor Typ 1 (human)¹¹²	250	-	Komplexmedium

Im Vergleich der erreichten kulturvolumenspezifischen Produktkonzentrationen mit anderen Expressionssystemen stellten sich beide Expressionsstrategien als absolut konkurrenzfähig dar. Die Expression des Cannabinoid-Rezeptors Typ 2 zeigte eine maximale Proteinkonzentration von 2 mg funktionalem Protein/L Medium. Der Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 wies in der experimentellen Untersuchung eine maximale kulturvolumenspezifische Proteinkonzentration von 35 mg Protein/L Medium auf.

Eine weitere Steigerung der Rezeptorausbeute für den Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 ist in Abbildung 53 dargestellt, die den theoretischen Verlauf von Biomasse, Base und Produkt für die aus der Prozesssimulation bestimmten optimalen Parameter ausweist. Zur Steigerung der kulturvolumenspezifischen Rezeptorkonzentration wurde eine Steigerung der Biomasse vor Induktion in die Prozesssimulation mit einbezogen. Des Weiteren wurde die in Kapitel 4.2.7 beschriebene Erhöhung der biomassespezifischen Rezeptorkonzentration durch die Erhöhung der Induktorkonzentration in der Simulation angewendet. Es muss jedoch beachtet werden, dass dieser bei einer Temperatur von 30°C bestimmte Effekt nicht zwangsläufig bei einer höheren Fermentationstemperatur zu einer 20 %igen Erhöhung führt. Die aus dieser Prozesssimulation erhaltene kulturvolumenspezifische Rezeptorausbeute erreicht nach 5 Stunden Induktionszeit einen Wert von 48 mg NPY2R/L Medium. Es zeigte sich im Vergleich (Tabelle 6) mit GPCRs exprimiert in *Escherichia coli* bzw. Hefen eine 5- bis 10-fache Steige-

rung und im Vergleich mit GPCRs exprimiert in Insekten- bzw. Säugerzellen eine 25- bis 100-fache Steigerung der kulturvolumenspezifischen Ausbeuten.

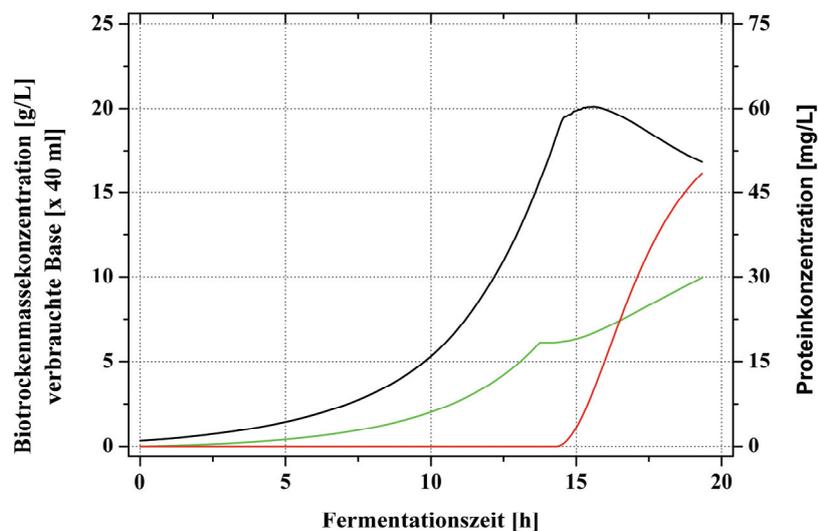


Abbildung 53: Darstellung des Simulationsergebnisses für eine Fermentationen zur Steigerung des kulturvolumenspezifischen NPY2R-Gehaltes. Die Startparameter waren die der Fermentation bei 38°C, pH 7.0 und $\mu_{\text{set}} = 0.14 \text{ g/(gh)}$. Die Werte der Temperatur (38.3°C), des pH-Wertes (6.77) und der gesetzten spezifischen Wachstumsrate (0.135 g/(gh)) nach Induktion waren die aus der Prozesssimulation für alle durchgeführten Optimierungsfermentationen erhaltenen optimalen Werte. Die optische Dichte wurde durch das Feedprofil auf 35 bei Induktion gesteigert. Eine 20 %ige Steigerung der biomassespezifischen Proteinkonzentration durch Induktion mit 2 mM IPTG wurde angenommen. Gezeigt sind die theoretischen Verläufe für Biomassekonzentration (schwarz), verbrauchte Base (grün) und Produkt (rot).

5.3 Minimierung der Kosten für das einzusetzende Substrat zur Produktion des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2

Die benötigten Substrate zur Produktion von ^{13}C -isotopenmarkierten Proteinen sind in der Regel sehr kostenintensiv. Daher ist eine Beurteilung des Nutzen-Kosten-Verhältnisses ein weiterer wichtiger Faktor zur Bewertung der Prozessführungsstrategie. Eine höhere gesetzte spezifische Wachstumsrate nach Induktion, die bis zu $\mu_{\text{set}} = 0.14 \text{ g/(gh)}$ mit einer Steigerung der kulturvolumenspezifischen Y2-Rezeptor-Ausbeute verbunden war, verursacht dementsprechend auch steigende Kosten mit der benötigten Substratmenge. Aus diesem Grund erfolgte eine Beurteilung dieses Nutzen-Kosten-Verhältnisses in Abbildung 54 anhand des eingesetzten Glycerins und der daraus gebildeten Rezeptormenge.

Die Menge des benötigten Glycerins $G \text{ [g/L]}$ wurde aus den entsprechenden Feedprofilen beginnend 30 Minuten vor Induktion errechnet und auf ein Kulturvolumen von 1 Liter normiert. Die Regression wurde mit einer quadratischen Gleichung vorgenommen. Die mathematische Beschreibung der ermittelten Werte der kulturvolumenspezifischen NPY2R-Ausbeuten $C_{\text{Volsp}} \text{ [mg/L]}$ in Abhängigkeit von der gesetzten spezifischen Wachstumsrate wurde mit

einem Polynom 4. Grades durchgeführt. Die Anpassung besaß nur Gültigkeit im dargestellten Bereich. Weiterhin erfolgte die Anpassung ohne das Einbeziehen des Wertes der Rezeptorausbeute bei der gesetzten spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0.12 \text{ g/(gh)}$ nach Induktion. Das Nutzen-Kosten-Verhältnis V_{NK} [mg exprimierter Rezeptor/g eingesetztes Glycerin] wurde mit der folgenden Gleichung ermittelt und ebenfalls in Abbildung 54 eingefügt.

$$V_{\text{NK}} = \frac{C_{\text{Volsp}}}{G} \quad (24)$$

Die Bestimmung des Verlaufes des Nutzen-Kosten-Verhältnisses wies eine optimale gesetzte spezifische Wachstumsrate für das Expressionssystem Rosetta R3-phY2 nach Induktion in einem Bereich von 0.10 bis 0.11 g/(gh) aus. In diesem Bereich wurde ein maximales Nutzen-Kosten-Verhältnis von etwa 1.4 mg NPY2R produziert aus 1 g Glycerin erreicht, sodass dieser Parameter für eine kostenorientierte Produktion in diesem Bereich gewählt werden muss.

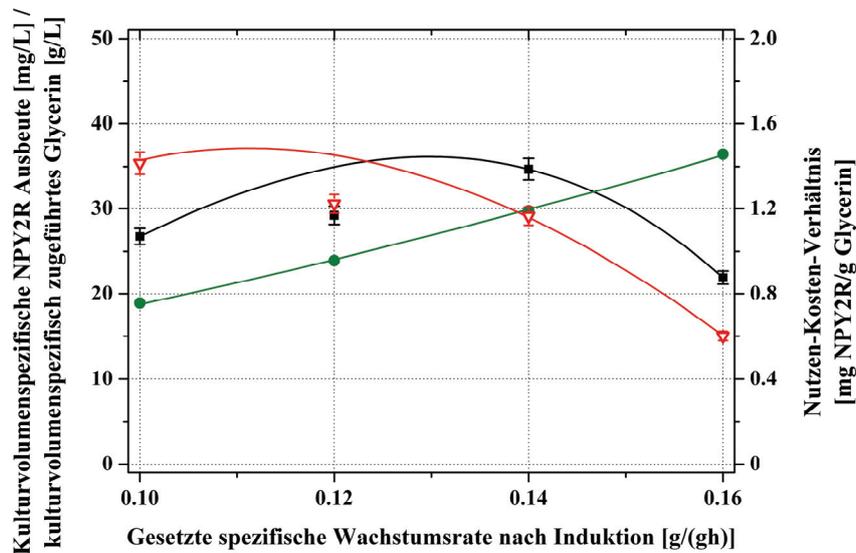


Abbildung 54: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der kulturvolumenspezifisch eingesetzten Glycerinmenge und der daraus produzierten Mengen des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2. Dargestellt sind die experimentell bestimmten kulturvolumenspezifischen Rezeptorausbeuten (schwarze Punkte) mit Angabe der in Kapitel 4.2.10 ermittelten Fehler und der mathematisch ermittelte Fit (schwarze Linie, Polynom 4. Grades, der Wert für $\mu_{\text{set}} = 0.12 \text{ g/(gh)}$ nicht mit einbezogen). Die kulturvolumenspezifisch normierten Mengen des eingesetzten Glycerins (grüne Punkte) wurden durch den Ansatz einer quadratischen Gleichung (grüne Linie) beschrieben. Das aus den Daten ermittelte Nutzen-Kosten-Verhältnis (rote Punkte) wurde durch den Quotienten der erhaltenen Gleichungen der Anpassungen für Glycerin- und Rezeptormenge nach Gleichung (24) funktionell beschrieben (Rote Linie). Die Darstellung besitzt nur im angegebenen Bereich Gültigkeit.

Das Nutzen-Kosten-Verhältnis für den Einsatz der markierten Stickstoffquellen Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat bereits vom Beginn der Fermentation wurde unter der Voraussetzung des Einsatzes von Glycerin als Kohlenstoffquelle und der Anwendung der

optimalen Fermentationsparameter mit der Bildung von 2.33 mg NPY2R aus 1 g Stickstoffquelle ermittelt.

In einem Beispiel zur Produktion des humanen β_2 -Adrenergen Rezeptors im zellfreien Expressionssystem mit zwei Fusionsproteinen wurde jeweils eine Konzentration von 1.5 mM der Aminosäuren im Reaktionsansatz verwendet.¹¹³ Eine Umrechnung der benötigten Menge der Aminosäuren zur Produktion von 1 mg Zielprotein ergab einen Wert von 41.1 mg (Masse aller Aminosäuren) bzw. ein Nutzen-Kosten-Verhältnis von 24.2 mg trxA- β_2 AR-G α_s aus 1 g Aminosäuren. Die Ausbeute des reinen β_2 AR beträgt somit etwa 10.8 mg aus 1 g Aminosäuren. Der Vergleich der erhaltenen Nutzen-Kosten-Verhältnisse spricht natürlich für den Einsatz des zellfreien Expressionssystems zur Herstellung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Werden allerdings die aktuellen Preise für die jeweilige Kohlen- bzw. Stickstoffquelle herangezogen und eine unspezifische Isotopenmarkierung angestrebt, ergibt sich folgendes Bild: Die Herstellung des ^{13}C -isotopenmarkierten NPY2R kostet 43 € pro mg Protein und die ^{15}N -Isotopenmarkierung des NPY2R 7 € pro mg Protein. Unter der Annahme eines mittleren, günstig angesetzten Preises für ^{13}C -Aminosäuren von etwa 1000 € pro 100 mg AS und für ^{15}N -Aminosäuren von etwa 100 € pro 100 mg AS werden Kosten zur ^{13}C -Markierung des β_2 AR von 926 € und zur ^{15}N -Markierung von 93 € pro mg Zielprotein verursacht. Wird zusätzlich die benötigte Menge des zu untersuchenden Proteins für eine Analyse mit Hilfe der NMR-Spektroskopie von 150 μl der Konzentration 0.6 mM (ein Beispiel aus der Literatur)¹⁸² betrachtet, bedeutet dies den Einsatz von etwa 4 mg Protein (4.2 mg β_2 AR bzw. 3.8 mg NPY2R), sodass eine NMR-Probe aus der zellfreien Expression 3700 € (^{13}C , 370 € für ^{15}N) und aus Nutzung von *E. coli* als Expressionswirt 170 € (^{13}C , 28 € für ^{15}N) kosten würde. Der Vergleich des Preises für den selektiv an Tryptophanen (225 mg 600 €) isotopenmarkierten Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 von 300 € pro mg Zielprotein weist eindeutig auf eine kostenorientierte Wahl des zellfreien Systems. Allerdings sind in diesem Zusammenhang die Vorteile des Expressionssystems *Escherichia coli* herausragend, da es sich um einen aktiv exprimierten GPCR und um die erzielte Konzentration des bereits gereinigten und rekonstituierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors handelte. Weiterhin wurde auch nicht eine mögliche Reduktion des Substrates bei gleichbleibender Anzahl funktionaler Rezeptoren bzw. bei gleichbleibender Markierungseffizienz untersucht. Diese Reduktionsmöglichkeit ist aus dem Grund äußerst wahrscheinlich, da die reduzierte Glucoseaufnahmerate in der Fermentation mit Einsatz des unmarkierten Tryptophans (Abbildung 26) für mindestens 20 Stunden nach Zugabe und Induktion angehalten hat.

5.4 Übertragbarkeit der Expressionsmethodik auf andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die kritische Beurteilung der Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf andere zu produzierende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann diese nur unter der Voraussetzung der Schaffung und Nutzung eines absolut äquivalenten Plasmids (gleiche *Codon Usage*) zulassen. Da dies eine beinahe unmöglich zu realisierende Voraussetzung darstellt, ist es grundsätzlich nicht möglich, die ermittelten optimalen Prozessparameter auf die Expression von weiteren GPCRs zu übertragen. Die angewendeten Expressionsmethodiken allerdings, i. die Kultivierung in definierter Medienzusammensetzung, ii. die Expression als native Rezeptoren bzw. inaktive Proteinaggregate und iii. die Optimierungsstrategien, können im Allgemeinen übertragen werden und führen auch bei anderen GPCRs zu einer maximierten Funktionalität bzw. zu einer maximierten biomassespezifischen Produktausbeute. Dies ist zusätzlich an eine weitere Voraussetzung gebunden. Die Funktionalität der zu produzierenden GPCRs muss unabhängig von posttranslationalen Modifikationen sein. Die Essentialität von Disulfidbrücken muss bei der aktiven Expressionsmethodik auf den eher extrazellulären Teil des Rezeptors beschränkt sein. Ein grundlegendes Problem an der Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist die Herstellung des Plasmids, das eine Produktion dieser Proteine zulässt. Vergleichende Untersuchungen zu dieser Thematik zeigten auch für andere Expressionssysteme bei sonst gleichen Bedingungen (Vektor, Stamm und Vorgehensweise) abhängig vom Protein unterschiedliches Expressionsverhalten, wobei die exprimierten Mengen in einem Bereich von nicht exprimiert bis zu sehr guter Expression reichten.^{9,32,112,183}

5.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Fermentationsmethoden für eine hocheffiziente und gegenüber anderen Systemen zeit- und kostensparende Expression von spezifisch und unspezifisch isotopenmarkierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in nativer und in *Inclusion Bodies* eingelagerter Form erarbeitet. Die maximal nachgewiesenen kulturvolumensspezifischen Rezeptorausbeuten lagen für den funktional exprimierten Cannabinoid-Rezeptor Typ 2 bei 2 mg/L Medium und für den inaktiv exprimierten Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2 bei 35 mg/L Medium. Die Fermentationsführung wurde unter der Berücksichtigung der maximalen Effizienz (> 95 %) der Isotopenanreicherung im Zielprotein und dem maximalen Nutzen-Kosten-Verhältnis (gebildetes Protein/eingesetztem Substrat) optimiert. Die Prozessführung wurde jeweils unter dem Gesichtspunkt der spezifischen Aminosäuremarkierung und der unspezi-

fischen Isotopenmarkierung aller im Protein enthaltenen Stickstoff- und Kohlenstoffatome betrachtet. Eine Möglichkeit zur Anreicherung der Rezeptoren mit Deuterium wurde nicht in dieser Arbeit untersucht. Die bisherige Nichtanwendbarkeit dieser Isotopenmarkierung in tierischen Zellen¹⁰⁷ bestätigt allerdings erneut die Verwendung von *Escherichia coli* für die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

6 Referenzen

- 1 Voet,D., Voet,J.G., Pratt,C.W. (2002) *Lehrbuch der Biochemie*, Willey-VCH
- 2 Schioth,H.B. and Fredriksson,R. (2005) The GRAFS Classification System of G Protein-Coupled Receptors in Comparative Perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 94-101
- 3 Bertani,G. (2004) Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *J. Bacteriol.* 186, 595-600
- 4 Cadigan,K.M. and Nusse,R. (1997) Wnt Signaling: A Common Theme in Animal Development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305
- 5 Jaakola,V.P. *et al.* (2008) The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A(2A) Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* 322, 1211-1217
- 6 Wiener,M.C. (2004) A Pedestrian Guide to Membrane Protein Crystallization. *Methods* 34, 364-372
- 7 Gloriam,D.E. *et al.* (2009) Definition of the G Protein-Coupled Receptor Transmembrane Bundle Binding Pocket and Calculation of Receptor Similarities for Drug Design. *J. Med. Chem.* 52, 4429-4442
- 8 Cherezov,V. *et al.* (2007) High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human Beta(2)-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science* 318, 1258-1265
- 9 McCusker,E.C. *et al.* (2007) Heterologous GPCR Expression: A Bottleneck to Obtaining Crystal Structures. *Biotechnol. Prog.* 23, 540-547
- 10 Wedekind,A. *et al.* (2006) Optimization of the Human Adenosine A(2)a Receptor Yields in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnology Progress* 22, 1249-1255
- 11 Hargrave,P.A. *et al.* (1982) The Carboxyl-Terminal 1/3 of Bovine Rhodopsin - Its Structure and Function. *Vision Res.* 22, 1429-1438
- 12 Hargrave,P.A. (1982) Rhodopsin Chemistry, Structure and Topography. *Prog Retin Eye Res* 1, 1-51
- 13 Lagerstrom,M.C. and Schioth,H.B. (2008) Structural Diversity of G Protein-Coupled Receptors and Significance for Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 339-357
- 14 Nathans,J. and Hogness,D.S. (1983) Isolation, Sequence-Analysis, and Intron Exon Arrangement of the Gene Encoding Bovine Rhodopsin. *Cell* 34, 807-814
- 15 Bokoch,M.P. *et al.* (2010) Ligand-Specific Regulation of the Extracellular Surface of a G Protein-Coupled Receptor. *Nature* 463, 108-112
- 16 Kobilka,B.K. (2007) G Protein-Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 794-807
- 17 Howard,A.D. *et al.* (2001) Orphan G Protein-Coupled Receptors and Natural Ligand Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 132-140
- 18 Okada,T. *et al.* (2004) The Retinal Conformation and its Environment in Rhodopsin in Light of a New 2.2 Angstrom Crystal Structure. *J. Mol. Biol.* 342, 571-583
- 19 Palczewski,K. *et al.* (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289, 739-745
- 20 Ruprecht,J.J. *et al.* (2004) Electron Crystallography Reveals the Structure of Metarhodopsin I. *EMBO J.* 23, 3609-3620

- 21 Salom,D. *et al.* (2006) **Crystal Structure of a Photoactivated Deprotonated Intermediate of Rhodopsin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16123-16128
- 22 Kobilka,B.K. and Schertler,G.F.X. (2008) **New G Protein-Coupled Receptor Crystal Structures: Insights and Limitations.** *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 79-83
- 23 Rasmussen,S.G.F. *et al.* (2007) **Crystal Structure of the Human Beta(2) Adrenergic G Protein-Coupled Receptor.** *Nature* 450, 383-388
- 24 Warne,T. *et al.* (2008) **Structure of a Beta(1)-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor.** *Nature* 454, 486-492
- 25 Sainsbury,A. *et al.* (2003) **Synergistic Effects of Y2 and Y4 Receptors on Adiposity and Bone Mass Revealed in Double Knockout Mice.** *Mol. Cell. Biol.* 23, 5225-5233
- 26 Verbist,B.M.P. *et al.* (2008) **5-Sulfonyl-Benzimidazoles as Selective CB2 Agonists.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2574-2579
- 27 Wang,L.Y. *et al.* (2009) **Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Receptors: Future Therapeutics for Complex Physiological Disorders.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 340-348
- 28 Brown,M.F. *et al.* (2009) **Retinal Dynamics During Light Activation of Rhodopsin Revealed by Solid-State NMR Spectroscopy.** *Biochim. Biophys. Acta* In Press, Corrected Proof
- 29 Pellecchia,M. *et al.* (2002) **NMR in Drug Discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 1, 211-219
- 30 Schmid,G. (1996) **Insect Cell Cultivation: Growth and Kinetics.** *Cytotechnology* 20, 43-56
- 31 Akermoun,M. *et al.* (2005) **Characterization of 16 Human G Protein-Coupled Receptors Expressed in Baculovirus-Infected Insect Cells.** *Protein Expr. Purif.* 44, 65-74
- 32 Hassaine,G. *et al.* (2006) **Semliki Forest Virus Vectors for Overexpression of 101 G Protein-Coupled Receptors in Mammalian Host Cells.** *Protein Expr. Purif.* 45, 343-351
- 33 Massotte,D. *et al.* (1999) **Parameters Influencing Human μ Opioid Receptor Over-Expression in Baculovirus-Infected Insect Cells.** *J. Biotechnol.* 69, 39-45
- 34 Werner,K. *et al.* (2008) **Isotope Labeling of Mammalian GPCRs in HEK293 Cells and Characterization of the C-Terminus of Bovine Rhodopsin by High Resolution Liquid NMR Spectroscopy.** *J. Biomol. NMR* 40, 49-53
- 35 Niebauer,R.T. and Robinson,A.S. (2006) **Exceptional Total and Functional Yields of the Human Adenosine (A2a) Receptor Expressed in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.** *Protein Expression and Purification* 46, 204-211
- 36 Sarramegna,V. *et al.* (2005) **Solubilization, Purification, and Mass Spectrometry Analysis of the Human μ -Opioid Receptor Expressed in *Pichia Pastoris*.** *Protein Expression and Purification* 43, 85-93
- 37 Schendel,P.F. (2001) **Overview of Protein Expression in *E. coli*.** *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 16, 16.1.1-16.1.3
- 38 Inaba,K. (2009) **Disulfide Bond Formation System in *Escherichia coli*.** *J. Biochem.* 146, 591-597
- 39 Dunham,J.H. and Hall,R.A. (2009) **Enhancement of the Surface Expression of G Protein-Coupled Receptors.** *Trends Biotechnol.* 27, 541-545
- 40 Eilers,M. *et al.* (2005) **Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation.** *Biochemistry* 44, 8959-8975
- 41 Bohme,I. and Beck-Sickinger,A.G. (2009) **Illuminating the Life of GPCRs.** *Cell Commun. Signal* 7, 1-22

- 42 Wess,J. (1993) **Molecular-Basis of Muscarinic Acetylcholine-Receptor Function.** *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 308-313
- 43 Foreman,J.C., Johansen,T. (2003) *Textbook of Receptor Pharmacology*, CRC Press LLC
- 44 Wess,J. (1998) **Molecular Basis of Receptor/G Protein-Coupling Selectivity.** *Pharmacol. Ther.* 80, 231-264
- 45 Escriba,P.V. *et al.* (2007) **Lipid-Protein Interactions in GPCR-Associated Signaling.** *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 836-852
- 46 Swift,S. *et al.* (2006) **Role of the PAR1 Receptor 8th Helix in Signaling - The 7-8-1 Receptor Activation Mechanism.** *J. Biol. Chem.* 281, 4109-4116
- 47 Conner,M. *et al.* (2008) **Functional and Biophysical Analysis of the C-Terminus of the CGRP-Receptor; A Family B GPCR.** *Biochemistry* 47, 8434-8444
- 48 Wess,J. (1997) **G Protein-Coupled Receptors: Molecular Mechanisms Involved in Receptor Activation and Selectivity of G Protein Recognition.** *FASEB J.* 11, 346-354
- 49 Negus,S.S. (2006) **Some Implications of Receptor Theory for In Vivo Assessment of Agonists, Antagonists and Inverse Agonists.** *Biochem. Pharmacol.* 71, 1663-1670
- 50 Downer,N.W. and Englander,S.W. (1975) **Molecular-Structure of Membrane-Bound Rhodopsin.** *Nature* 254, 625-627
- 51 Attwood,T.K. and Findlay,J.B.C. (1993) **Design of A Discriminating Fingerprint for G Protein-Coupled Receptors.** *Protein Eng.* 6, 167-176
- 52 Kolakowski,L.F. (1994) **GCRDb - A G Protein-Coupled Receptor Database.** *Recept. Channels* 2, 1-7
- 53 Davies,M.N. *et al.* (2007) **On the Hierarchical Classification of G Protein-Coupled Receptors.** *Bioinformatics* 23, 3113-3118
- 54 Fredriksson,R. *et al.* (2003) **The G Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints.** *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272
- 55 Kenakin,T. (2008) **Receptor Theory.** *Curr Protoc Pharmacol* 41, 1.2.1-1.2.28
- 56 Daeffler,L. and Landry,Y. (2000) **Inverse Agonism at Heptahelical Receptors: Concept, Experimental Approach and Therapeutic Potential.** *Fundam Clin Pharmacol* 14, 73-87
- 57 Simon,M.I. *et al.* (1991) **Diversity of G Proteins in Signal Transduction.** *Science* 252, 802-808
- 58 Delcastillo,J. and Katz,B. (1957) **Interaction at End-Plate Receptors Between Different Choline Derivatives.** *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 146, 369-380
- 59 Monod,J. *et al.* (1965) **On Nature of Allosteric Transitions - A Plausible Model.** *J. Mol. Biol.* 12, 88-118
- 60 Delean,A. *et al.* (1980) **A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding-Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic-Receptor.** *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117
- 61 Samama,P. *et al.* (1993) **A Mutation-Induced Activated State of the Beta(2)-Adrenergic Receptor - Extending the Ternary Complex Model.** *J. Biol. Chem.* 268, 4625-4636
- 62 Rinaldi-Carmona,M. *et al.* (1998) **Modulation of CB1 Cannabinoid Receptor Functions After a Long-Term Exposure to Agonist or Inverse Agonist in the Chinese Hamster Ovary Cell Expression System.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 1038-1047
- 63 Galiegue,S. *et al.* (1995) **Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations.** *Eur. J. Biochem.* 232, 54-61

- 64 Glass,M. and Northup,J.K. (1999) Agonist Selective Regulation of G Proteins by Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 1362-1369
- 65 Eldering,G. and Kendrick,P. (1938) *Bacillus Para-Pertussis*: A Species Resembling Both *Bacillus Pertussis* and *Bacillus Bronchisepticus* but Identical with Neither. *J Bacteriol.* 35, 561-572
- 66 Shibley,G.S. and Hoelscher,H. (1934) Studies on Whooping Cough: I. Type-Specific (S) and Dissociation (R) Forms of Hemophilus Pertussis. *J. Exp. Med.* 60, 403-418
- 67 Rosenthal,W. and Schultz,G. (1988) G Proteins and the Modulation of Voltage-Dependent Ion Channels. *Klin. Wochenschr.* 66, 557-564
- 68 Hunyady,L. and Turu,G. (2009) Signal Transduction of the CB1 Cannabinoid Receptor. *J Mol Endocrinol*, 1-27
- 69 Guindon,J. and Hohmann,A.G. (2008) Cannabinoid CB2 Receptors: A Therapeutic Target for the Treatment of Inflammatory and Neuropathic Pain. *Br. J. Pharmacol.* 153, 319-334
- 70 Song,Z.H. and Feng,W.K. (2002) Absence of a Conserved Proline and Presence of a Conserved Tyrosine in the CB2 Cannabinoid Receptor Are Crucial for its Function. *FEBS Lett.* 531, 290-294
- 71 Xie,X.Q. *et al.* (2003) 3D Structural Model of the G Protein-Coupled Cannabinoid CB2 Receptor. *Proteins* 53, 307-319
- 72 Ofek,O. *et al.* (2006) Peripheral Cannabinoid Receptor, CB2, Regulates Bone Mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 696-701
- 73 Zhang,Y.X. and Xie,X.Q. (2008) Biosynthesis, Purification, and Characterization of a Cannabinoid Receptor 2 Fragment (CB2(271-326)). *Protein Expr. Purif.* 59, 249-257
- 74 Howlett,A.C. (2002) The Cannabinoid Receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 619-631
- 75 Choi,G. *et al.* (2002) The Cytoplasmic Helix of Cannabinoid Receptor CB2, A Conformational Study by Circular Dichroism and H-1 NMR Spectroscopy in Aqueous and Membrane-Like Environments. *J. Pept. Res.* 60, 169-177
- 76 Tiburu,E.K. *et al.* (2009) Structural Biology of Human Cannabinoid Receptor-2 Helix 6 in Membrane-Mimetic Environments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 243-248
- 77 Roth,C.B. *et al.* (2008) Stabilization of the Human Beta(2)-Adrenergic Receptor TM4-TM3-TM5 Helix Interface by Mutagenesis of Glu122(3.41), a Critical Residue in GPCR Structure. *J. Mol. Biol.* 376, 1305-1319
- 78 Beck-Sickinger,A.G. (1996) Structural Characterization and Binding Sites of G Protein-Coupled Receptors. *Drug Discov. Today* 1, 502-513
- 79 Rhee,M.H. *et al.* (2000) Functional Role of Tryptophan Residues in the Fourth Transmembrane Domain of the CB2 Cannabinoid Receptor. *J. Neurochem.* 75, 2485-2491
- 80 Nebane,N.M. *et al.* (2008) Residues Accessible in the Binding-Site Crevice of Transmembrane Helix 6 of the CB2 Cannabinoid Receptor. *Biochemistry* 47, 13811-13821
- 81 Gouldson,P. *et al.* (2000) Mutational Analysis and Molecular Modelling of the Antagonist SR 144528 Binding Site on the Human Cannabinoid CB2 Receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 401, 17-25
- 82 Teixeira,L. *et al.* (2009) NPY Revealed as a Critical Modulator of Osteoblast Function In Vitro: New Insights Into the Role of Y1 and Y2 Receptors. *J. Cell. Biochem.* 107, 908-916
- 83 Becksickinger,A.G. *et al.* (1992) A Novel Cyclic Analog of Neuropeptide Y Specific for the Y(2)-Receptor. *Eur. J. Biochem.* 206, 957-964

- 84 Cabrele,C. and Beck-Sickinger,A.G. (2000) **Molecular Characterization of the Ligand-Receptor Interaction of the Neuropeptide Y Family.** *J. Pept. Sci.* 6, 97-122
- 85 Wahlestedt,C. and Reis,D.J. (1993) **Neuropeptide-Y-Related Peptides and Their Receptors - Are the Receptors Potential Therapeutic Drug Targets.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 309-352
- 86 Bettio,A. and Beck-Sickinger,A.G. (2001) **Biophysical Methods to Study Ligand-Receptor Interactions of Neuropeptide Y.** *Biopolymers* 60, 420-437
- 87 Nguyen,N.K. *et al.* (2009) **Effect of Neuropeptide Y Y2 Receptor Deletion on Emotional Stress-Induced Neuronal Activation in Mice.** *Synapse* 63, 236-246
- 88 Kuo,L.E. *et al.* (2007) **Neuropeptide Y Acts Directly in the Periphery on Fat Tissue and Mediates Stress-Induced Obesity and Metabolic Syndrome.** *Nat. Med.* 13, 803-811
- 89 Huang,X.F. *et al.* (2008) **Ventromedial Hypothalamic NPY2 Receptor in the Maintenance of Body Weight in Diet-Induced Obesity in Mice.** *Neurochem. Res.* 33, 1881-1888
- 90 Sainsbury,A. *et al.* (2002) **Important Role of Hypothalamic Y2 Receptors in Body Weight Regulation Revealed in Conditional Knockout Mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8938-8943
- 91 Lindner,D. *et al.* (2009) **Functional Role of the Extracellular N-Terminal Domain of Neuropeptide Y Subfamily Receptors in Membrane Integration and Agonist-Stimulated Internalization.** *Cell. Signal.* 21, 61-68
- 92 Ingenhoven,N. *et al.* (1999) **Molecular Characterization of the Human Neuropeptide YY2-Receptor.** *Biochemistry* 38, 6897-6902
- 93 Merten,N. *et al.* (2007) **Receptor Subtype-Specific Docking of Asp(6.59) with C-Terminal Arginine Residues in Y Receptor Ligands.** *J. Biol. Chem.* 282, 7543-7551
- 94 Lindner,D. *et al.* (2008) **Molecular Recognition of the NPY Hormone Family by their Receptors.** *Nutrition* 24, 907-917
- 95 Becksickinger,A.G. *et al.* (1994) **Complete L-Alanine Scan of Neuropeptide-y Reveals Ligands Binding to Y-1 and Y-2 Receptors with Distinguished Conformations.** *Eur. J. Biochem.* 225, 947-958
- 96 Tatemoto,K. (1982) **Neuropeptide Y Complete Amino-Acid Sequence of the Brain Peptide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5485-5489
- 97 Thomas,L. *et al.* (2009) **The Interaction of Neuropeptide Y with Negatively Charged and Zwitterionic Phospholipid Membranes.** *Eur. Biophys. J.* 38, 663-677
- 98 Haack,M. and Beck-Sickinger,A.G. (2009) **Towards Understanding the Free and Receptor Bound Conformation of Neuropeptide Y by Fluorescence Resonance Energy Transfer Studies.** *Chem Biol Drug Des* 73, 573-583
- 99 Becksickinger,A.G. and Jung,G. (1995) **Structure-Activity-Relationships of Neuropeptide-Y Analogs with Respect to Y-1 and Y-2 Receptors.** *Biopolymers* 37, 123-142
- 100 Schmidt,P. *et al.* (2009) **Prokaryotic Expression, In Vitro Folding, and Molecular Pharmacological Characterization of the Neuropeptide Y Receptor Type 2.** *Biotechnol. Prog.* 25, 1732-1739
- 101 Klein-Seetharaman,J. *et al.* (2004) **Differential Dynamics in the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin Revealed by Solution NMR.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3409-3413
- 102 Mobarec,J.C. *et al.* (2009) **Modern Homology Modeling of G Protein-Coupled Receptors: Which Structural Template to Use?** *J. Med. Chem.* 52, 5207-5216
- 103 Torres,J. *et al.* (2003) **Membrane Proteins: The 'Wild West' of Structural Biology.** *Trends Biochem. Sci.* 28, 137-144

- 104 Ernst,R.R. (1992) **Nuclear-Magnetic-Resonance Fourier-Transform Spectroscopy (Nobel Lecture).** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 805-823
- 105 Cavanagh,J., Fairbrother,W.J., Palmer III,A.G., Skelton,N.J. (1996) *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press
- 106 Markley,J.L. (2007) **NMR Analysis Goes Nano.** *Nat. Biotechnol.* 25, 750-751
- 107 Zou,C. *et al.* (2008) **Biosynthesis and NMR-Studies of a Double Transmembrane Domain from the Y4 Receptor, a Human GPCR.** *J. Biomol. NMR* 42, 257-269
- 108 Klein-Seetharaman,J. *et al.* (2002) **Solution NMR Spectroscopy of [alpha-N-15]Lysine-Labeled Rhodopsin: The Single Peak Observed in Both Conventional and TROSY-Type HSQC Spectra is Ascribed to Lys-339 in the Carboxyl-Terminal Peptide Sequence.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3452-3457
- 109 Weiss,H.M. and Grisshammer,R. (2002) **Purification and Characterization of the Human Adenosine A(2a) Receptor Functionally Expressed in Escherichia Coli.** *European Journal of Biochemistry* 269, 82-92
- 110 Yeliseev,A.A. *et al.* (2005) **Expression of Human Peripheral Cannabinoid Receptor for Structural Studies.** *Protein Sci.* 14, 2638-2653
- 111 Baneres,J.L. *et al.* (2003) **Structure-Based Analysis of GPCR Function: Conformational Adaptation of Both Agonist and Receptor upon Leukotriene B-4 Binding to Recombinant BLT1.** *J. Mol. Biol.* 329, 801-814
- 112 Bane,S.E. *et al.* (2007) **Expression and Purification of Milligram Levels of Inactive G Protein-Coupled Receptors in E. coli.** *Protein Expr. Purif.* 52, 348-355
- 113 Ishihara,G. *et al.* (2005) **Expression of G Protein-Coupled Receptors in a Cell-Free Translational System Using Detergents and Thioredoxin-Fusion Vectors.** *Protein Expr. Purif.* 41, 27-37
- 114 Elbing,K. and Brent,R. (2002) **Escherichia coli: Media Preparation and Bacteriological Tools.** *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 1, 1.1.1-1.1.7
- 115 (2002) **Escherichia coli, Plasmids, and Bacteriophages.** *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 1, 1.0.1-1.0.3
- 116 Blattner,F.R. *et al.* (1997) **The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12.** *Science* 277, 1453-1462
- 117 De Schutter,K. *et al.* (2009) **Genome Sequence of the Recombinant Protein Production Host Pichia pastoris.** *Nat. Biotechnol.* 27, 561-566
- 118 Collins,F.S. *et al.* (2004) **Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome.** *Nature* 431, 931-945
- 119 Klammt,C. *et al.* (2006) **Cell-Free Expression as an Emerging Technique for the Large Scale Production of Integral Membrane Protein.** *FEBS J.* 273, 4141-4153
- 120 Yeliseev,A. *et al.* (2007) **Use of Dual Affinity Tags for Expression and Purification of Functional Peripheral Cannabinoid Receptor.** *Protein Expr. Purif.* 53, 153-163
- 121 Mancina,F. and Hendrickson,W.A. (2007) **Expression of Recombinant G Protein-Coupled Receptors for Structural Biology.** *Mol Biosyst* 3, 723-734
- 122 Junttila,M.R. *et al.* (2005) **Single-Step Strep-Tag (R) Purification for the Isolation and Identification of Protein Complexes from Mammalian Cells.** *Proteomics* 5, 1199-1203
- 123 Jenzsch,M. *et al.* (2006) **Improving the Batch-to-Batch Reproducibility in Microbial Cultures During Recombinant Protein Production by Guiding the Process Along a Predefined Total Biomass Profile.** *Bioprocess Biosyst Eng* 29, 315-321

- 124 Paliy,O. and Gunasekera,T.S. (2007) **Growth of E. Coli BL21 in Minimal Media with Different Gluconeogenic Carbon Sources and Salt Contents.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 1169-1172
- 125 Herbert,D. *et al.* (1956) **The Continuous Culture of Bacteria - A Theoretical and Experimental Study.** *J. Gen. Microbiol.* 14, 601-622
- 126 Jenzsch,M. *et al.* (2006) **Estimation of Biomass Concentrations in Fermentation Processes for Recombinant Protein Production.** *Bioprocess Biosyst Eng* 29, 19-27
- 127 Bratbak,G. and Dundas,I. (1984) **Bacterial Dry-Matter Content and Biomass Estimations.** *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 755-757
- 128 Monod,J. (1949) **The Growth of Bacterial Cultures.** *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371-394
- 129 Ahn,K.H. *et al.* (2009) **Dual Role of the Second Extracellular Loop of the Cannabinoid Receptor 1: Ligand Binding and Receptor Localization.** *Mol. Pharmacol.* 76, 833-842
- 130 Mierendorf,R. *et al.* (1994) **The pET System: Your Choice for Expression.** *in Novations, Newsletter of Novagen Inc.* 1
- 131 Studier,F.W. and Moffatt,B.A. (1986) **Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High Level Expression of Cloned Genes.** *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- 132 Wagner,S. *et al.* (2008) **Tuning Escherichia Coli for Membrane Protein Overexpression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14371-14376
- 133 Duval,E. *et al.* (2009) **KKKKPLFGLFFGLF: A Cationic Peptide Designed to Exert Antibacterial Activity.** *Peptides* 30, 1608-1612
- 134 Suarez,M. *et al.* (2005) **Structure-Function Characterization and Optimization of a Plant-Derived Antibacterial Peptide.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3847-3857
- 135 Ludtke,S.J. *et al.* (1996) **Membrane Pores Induced by Magainin.** *Biochemistry* 35, 13723-13728
- 136 Burgess-Brown,N.A. *et al.* (2008) **Codon Optimization Can Improve Expression of Human Genes in Escherichia Coli: A Multi-Gene Study.** *Protein Expr. Purif.* 59, 94-102
- 137 Fu,G.K. *et al.* (1997) **Bacterial Protease Lon Is a Site-Specific DNA-Binding Protein.** *J. Biol. Chem.* 272, 534-538
- 138 McCarter,J.D. *et al.* (2004) **Substrate Specificity of the Escherichia Coli Outer Membrane Protease OmpT.** *Journal of Bacteriology* 186, 5919-5925
- 139 Dower,W.J. *et al.* (1988) **High-Efficiency Transformation of Escherichia Coli by High-Voltage Electroporation.** *Nucleic Acids Research* 16, 6127-6145
- 140 Jenzsch,M. *et al.* (2006) **Open-Loop Control of the Biomass Concentration within the Growth Phase of Recombinant Protein Production Processes.** *J. Biotechnol.* 127, 84-94
- 141 Lilie,H. *et al.* (1998) **Advances in Refolding of Proteins Produced in E. Coli.** *Current Opinion in Biotechnology* 9, 497-501
- 142 Rudolph,R. and Lilie,H. (1996) **In Vitro Folding of Inclusion Body Proteins.** *FASEB J.* 10, 49-56
- 143 Champlin,F.R. *et al.* (2005) **Effect of Outer Membrane Permeabilisation on Intrinsic Resistance to Low Triclosan Levels in Pseudomonas Aeruginosa.** *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 159-164
- 144 Prachayasittikul,V. *et al.* (2007) **EDTA-Induced Membrane Fluidization and Destabilization: Biophysical Studies on Artificial Lipid Membranes.** *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 901-913

- 145 Mc Carty, M. (1946) **Purification and Properties of Desoxyribonuclease Isolated from Beef Pancreas.** *J. Gen. Physiol.* 29, 123-139
- 146 Kelemen, M.V. and Sharpe, J.E.E. (1979) **Controlled Cell Disruption - Comparison of the Forces Required to Disrupt Different Microorganisms.** *J. Cell. Sci.* 35, 431-441
- 147 Flora, S.J.S. *et al.* (2008) **Heavy Metal Induced Oxidative Stress & Its Possible Reversal by Chelation Therapy.** *Indian J. Med. Res.* 128, 501-523
- 148 Nakamura, H. *et al.* (1998) **Determination of Critical Micelle Concentration of Anionic Surfactants by Capillary Electrophoresis Using 2-Naphthalenemethanol as a Marker for Micelle Formation.** *Anal Sci* 14, 379-382
- 149 Schwedt, G. and Kondratjonok, B. (1989) **Simultaneous Ion Chromatography of Cations and Anions with Different Complexones As Eluents and Selective UV-Detection.** *Fresenius J Anal Chem* 332, 855-861
- 150 Iyer, K.S. and Klee, W.A. (1973) **Direct Spectrophotometric Measurement of Rate of Reduction of Disulfide Bonds - Reactivity of Disulfide Bonds of Bovine Alpha-Lactalbumin.** *J. Biol. Chem.* 248, 707-710
- 151 Lauer, S.A. and Nolan, J.P. (2002) **Development and Characterization of Ni-NTA-Bearing Microspheres.** *Cytometry* 48, 136-145
- 152 White, S.H. (1992) **Amino-Acid Preferences of Small Proteins - Implications for Protein Stability and Evolution.** *J. Mol. Biol.* 227, 991-995
- 153 Crowe, J. *et al.* (1994) **6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification.** *Methods Mol. Biol.* 31, 371-387
- 154 Mclean, D.J. and Giese, A.C. (1950) **Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids After Ultraviolet Irradiation.** *J. Biol. Chem.* 187, 537-542
- 155 Aitken, A. and Learmonth, M. (2002) **Protein Determination by UV Absorption.** In *The Protein Protocols Handbook* (2nd edn) pp. 3-6, Humana Press
- 156 Pace, C.N. *et al.* (1995) **How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of A Protein.** *Protein Science* 4, 2411-2423
- 157 Avery, O.T. *et al.* (1979) **Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types - Induction of Transformation by A Deoxyribonucleic-Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type-Iii.** *J. Exp. Med.* 149, 297-326
- 158 Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4.** *Nature* 227, 680-685
- 159 Shapiro, A.L. *et al.* (1967) **Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820
- 160 Berger, C. *et al.* (2010) **Preparation of Stable Isotope-Labeled Peripheral Cannabinoid Receptor CB2 by Bacterial Fermentation.** *Protein Expr. Purif.*
- 161 Ho, J.T.C. *et al.* (2008) **Analysis of a G Protein-Coupled Receptor for Neurotensin by Liquid Chromatography-Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry.** *Anal. Biochem.* 376, 13-24
- 162 Ng, H. (1969) **Effect of Decreasing Growth Temperature on Cell Yield of Escherichia Coli.** *Journal of Bacteriology* 98, 232-237
- 163 Farrell, J. and Rose, A. (1967) **Temperature Effects on Microorganisms.** *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 101-120
- 164 Gawrisch, K.a.S.O. (2008) **Structure and Dynamics of Polyunsaturated Hydrocarbon Chains in Lipid Bilayers - Significance for GPCR Function.** *Chem. Phys. Lipids* 153, 64-75

- 165 Riggs,P. (2001) **Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions.** *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 16, 16.6.1-16.6.14
- 166 Schein,C.H. and Noteborn,M.H.M. (1988) **Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* is Favored by Lower Growth Temperature.** *Biotechnology* 6, 291-294
- 167 Shuler,M.L., Kargi,F. (2000) *Bioprocess Engineering - Basic Concepts*, Prentice-Hall Of India Pvt. Ltd.
- 168 Skerra,A. *et al.* (1991) **The Functional Expression of Antibody Fv Fragments in *Escherichia-Coli* - Improved Vectors and A Generally Applicable Purification Technique.** *Bio-Technology* 9, 273-278
- 169 Tucker,J. and Grisshammer,R. (1996) **Purification of a Rat Neurotensin Receptor Expressed in *Escherichia coli*.** *Biochem. J.* 317, 891-899
- 170 Maizels,N.M. (1973) **Nucleotide Sequence of Lactose Messenger Ribonucleic Acid Transcribed from UV5 Promoter Mutant of *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3585-3589
- 171 Kuo,J.T. *et al.* (2003) **Growth Rate Regulation of Lac Operon Expression in *Escherichia coli* is Cyclic AMP Dependent.** *FEBS Lett.* 553, 397-402
- 172 Surewicz,W.K. (1984) **Membrane Actions of Water Soluble Fusogens - Effect of Dimethylsulfoxide, Glycerol and Sucrose on Lipid Bilayer Order and Fluidity.** *Chem. Phys. Lipids* 34, 363-372
- 173 Sandvig,K. *et al.* (1984) **Dimethylsulfoxide Protects Cells Against Polypeptide Toxins and Poliovirus.** *Biochem. J.* 219, 935-940
- 174 Pastan,I. and Perlman,R.L. (1968) **Role of Lac Promotor Locus in Regulation of Beta-Galactosidase Synthesis by Cyclic 3' 5'-Adenosine Monophosphate.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61, 1336-1342
- 175 Abou-Sabé,M. *et al.* (1975) **Regulation of Adenosine-3',5'-Monophosphate Synthesis in Bacteria. 1. Effect of Carbon Source Variation on Cyclic-Amp Synthesis in *Escherichia-Coli* B-R.** *Biochimica et Biophysica Acta* 385, 281-293
- 176 Akashi,H. and Gojobori,T. (2002) **Metabolic Efficiency and Amino Acid Composition in the Proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3695-3700
- 177 Brown,K.D. (1970) **Formation of Aromatic Amino Acid Pools in *Escherichia coli* K-12.** *J. Bacteriol.* 104, 177-188
- 178 Burkovski,A. and Kramer,R. (2002) **Bacterial Amino Acid Transport Proteins: Occurrence, Functions, and Significance for Biotechnological Applications.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 265-274
- 179 Perlman,R.L. and Pastan,I. (1968) **Regulation of Beta-Galactosidase Synthesis in *Escherichia Coli* by Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate.** *Journal of Biological Chemistry* 243, 5420-&
- 180 Gooder,H. and Happold,F.C. (1954) **The Tryptophanase-Tryptophan Reaction - the Nature of the Enzyme-Coenzyme-Substrate Complex.** *Biochem. J.* 57, 369-374
- 181 Waugh,D.S. (1996) **Genetic Tools for Selective Labeling of Proteins with Alpha-N-15-Amino Acids.** *J. Biomol. NMR* 8, 184-192
- 182 Park,S.H. *et al.* (2006) **High-Resolution NMR Spectroscopy of a GPCR in Aligned Bicelles.** *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7402-7403
- 183 Michalke,K. *et al.* (2009) **Mammalian G-Protein-Coupled Receptor Expression in *Escherichia Coli*: I. High-Throughput Large-Scale Production as Inclusion Bodies.** *Analytical Biochemistry* 386, 147-155

A1 Programm zur mathematischen Beschreibung der Messdaten der Fermentation zur Herstellung eines spezifisch isotopenmarkierten Cannabinoid-Rezeptor Typ 2

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
%
%
%
%
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

clear all, close all, clf

% Import der Messdaten der Fermentation
% =====

load 'workspace_CB2_all.mat'

% Offlinedaten
% =====

start = ofindex(1,1);
ende = ofindex(1,2);

Tim = atoff(start:ende); % Zeit
Glu = aglof(start:ende); % Glucosedaten
Btm = abtm(start:ende); % Biomassedaten
Prot = aprot(start:ende); % Proteindaten
index = find(Prot~= -1); % Finde mit Werten belegte Daten

% Einlesen der Protein-Offlinedaten
% =====

Protein(index)=Prot(index); % Zuweisung der mit Werten belegten
% Proteindaten

% Onlinedaten
% =====

tF = ton; % Zeit
nF = length(ton); % Länge des Zeitvektors

% Messdaten
% =====

Xoff = abtm; % [g/L] Biomassemesdaten
Soff = Glu; % [g/L] Substratmesdaten

% Ausbeutekoeffizienten
% =====

Yxs = 0.397; % [g/g] Ausbeutekoeffizient
% Glucose-Biomasse
YxsTryp = 0.52; % [g/g] Ausbeutekoeffizient
% Glucose-Biomasse bei Tryptophan-
% aufnahme

% Wachstumsparameter (Monod-Kinetik)
% =====

simax = 1.18; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
simaxred = 0.4; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
% bei Reduktion der Temperatur

```

```

simaxTryplag = 0.22; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
              %      % in der Lag-Phase bei Aufnahme von
              %      % Tryptophan
simaxTryp    = 0.62; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
              %      % bei Aufnahme von Tryptophan
Ks           = 0.2;  % [g/L]  MONOD-Konstante für Substratver-
              %      % brauch
ammmax       = 0.26; % [g/gh] max. spez. Stickstoffverbrauchsrate
ammmaxred    = 0.053; % [g/gh] max. spez. Stickstoffverbrauchsrate
              %      % reduziert durch KF
Kamm         = 0.0011; % [g/L] MONOD-Konstante für Stickstoffver-
              %      % brauch
muredLag     = 0.73; % [-]    Wachstumseinschränkung durch Stick-
              %      % stoffmangel in der Lag-Phase
muredT       = 0.7;  % [-]    Wachstumseinschränkung durch Ab-
              %      % senken der Temperatur

% Parameter zur Beschreibung der Produktbildung
% =====

Pmax         = 0.0020; % [g/L]  Maximalwert des gebildeten
              %      % Produktes
pimax       = 0.00011; % [g/gh] maximale Produktbildungsrate
Tind        = tind(1); % [h]    Induktionszeitpunkt
a           = 0.2;     % [-]    Wichtungsfaktor des Einflusses der
              %      % Last des gebildeten Produktes für
              %      % die Zelle
Wfprod      = 15000000; % [-]    Wichtungsfaktor des Einflusses der
              %      % Produktbildung auf das Zellwachstum
tlag        = 0.0;     % [h]    Lagzeit der Produktbildung

% Startbedingungen
% =====

S0          = Glu(1); % [g/L]  Startglucosekonzentration
X0          = Xoff(1); % [g/L]  Startbiomassekonzentration
P0          = 0.0;     % [g/L]  Startproduktkonzentration
AMM0       = AMMoff(1); % [g/L]  Startammoniumchloridkonzentration
t0          = tF(1); % [h]    Startzeitpunkt
tend        = Tend(1); % [h]    Endzeitpunkt

% Zeitinkremente
% =====

dt          = (tend-t0)/(nF-1); % [h]  Integrationszeitschritt
t(1)        = t0; % [h]    Integrationsstartpunkt für Zeit

% Startwerte der Zustandsgrößen
% =====

X(1)       = X0; % [g/L]  Startpunkt für Biomasse
S(1)       = S0; % [g/L]  Startpunkt für Glucose
P(1)       = P0; % [g/L]  Startpunkt für Produkt
AMM(1)     = AMM0; % [g/L]  Startpunkt für Ammoniumchlorid

% Lösung der Differentialgleichung durch Euler-Algorithmus
% =====

for i=2:nF; % Festlegung des Zeit-
            % raumes

```

```

t(i)= t(i-1)+dt; % Zeitinkremente

amm = ammmax*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
% Ammoniumchloridver-
% brauchsrate (MONOD)
si = simax*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez.
% Substratverbrauchs-
% rate (MONOD)
mu = Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez.
% Wachstumsrate

if S(i-1)<=0; si=0.0;
end
if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
end

pi = 0;

if i>=1652

AMM(1652)=AMMoff(13); % Zugabezeitpunkt von
% Ammoniumchlorid
S(1652)=Glu(13); % Zugabezeitpunkt von
% Glucose
amm = ammmax*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
% Ammoniumchloridver-
% brauchsrate (MONOD)
si = simax*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez.
% Substratverbrauchs-
% rate (MONOD)
mu = Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez.
% Wachstumsrate

if S(i-1)<=0; si=0.0;
end
if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
end

pi = 0;

if t(i)>=5.5
mu = Yxs*si*muredLag+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez.
end % Wachstumsrate in der
% Lag-Phase nach Stick-
% stoffmangel

if t(i)>=6.5
mu = Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
end % Berechnung der spez.
% Wachstumsrate nach
% überwundener Lag-
% Phase

if t(i)>=7.0
mu = Yxs*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
end % Berechnung der spez.
% Wachstumsrate bei
% Temperaturreduktion

if i>=2252

```

```

AMM(2252)=AMMoff(18); % Zugabezeitpunkt von
                        % Ammoniumchlorid
S(2252)=Glu(18); % Zugabezeitpunkt von
                 % Glucose

amm = ammmaxred*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
                                           % Ammoniumchloridver-
                                           % brauchsrate (MONOD)
                                           % durch KF
si = simax*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez.
                                           % Substratverbrauchs-
                                           % rate (MONOD) mit
                                           % Reduktion durch Tem-
                                           % peratur
mu = Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
                                           % Berechnung der spez.
                                           % Wachstumsrate

if S(i-1)<=0; si=0.0;
end
if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
end

pi=0;

if t(i)>=8.0
mu = YxsTryp*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
end % Gleichbleiben der
    % spez. Wachstumsrate
    % in der Lag-Phase zur
    % Aufnahme von Trypto-
    % phan bei geringerer
    % Glucoseaufnahme

if t(i)>=8.5
    si = simaxTryplag*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
end % Verringerung der
    % spez. Glucoseauf-
    % nahmerate in der Lag-
    % Phase zur Aufnahme
    % von Tryptophan

if t(i)>=9.0
    si = simaxTryp*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
end % Berechnung der Glu-
    % coseaufnahmerate auf
    % der Grundlage eines
    % Ausbeutefaktors
    % Glucose/Tryptophan zu
    % Biomasse

if t(i)>=Tind
    pi = pimax*(1-(P(i-1)/Pmax))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
    % Definition der spe-
    % zifischen Produkt-
    % bildung
mu = YxsTryp*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
end

if i>=3602

AMM(3602)=AMMoff(28); % Zugabezeitpunkt von
                       % Ammoniumchlorid

```

```

S(3602)=Glu(28); % Zugabezeitpunkt von
                  % Glucose
amm = ammaxred*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
                  % Ammoniumchloridver-
                  % brauchsrate (MONOD)
                  % durch KF

if S(i-1)<=0; si=0.0;
end
if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
end

mu = YxsTryp*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
                  % Gleichbleiben der
                  % spez. Wachstumsrate
                  % in der Lag-Phase zur
                  % Aufnahme von Trypto-
                  % phan bei geringerer
                  % Glucoseaufnahme

si = simaxTryp*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der Glu-
                  % coseaufnahme rate auf
                  % der Grundlage eines
                  % Ausbeutefaktors Glu-
                  % cose/Tryptophan zu
                  % Biomasse und der Re-
                  % duktion der Tempera-
                  % tur

pi = pimax*(1-(P(i-1)/Pmax))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
                  % Definition der spe-
                  % zifischen Produkt-
                  % bildung

end
end
end

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====

X(i) = X(i-1) + dt*mu*X(i-1);

% Berechnung der Ammoniumkonzentration für Limitation
% =====

AMM(i) = AMM(i-1) - dt*amm*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====

S(i) = S(i-1) - dt*si*X(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====

P(i) = P(i-1) + dt*pi*X(i-1);

end

```



```

% Onlinedaten
% =====

tF = ton; % Zeit
nF = length(ton); % Länge des Zeitvektors

% Messdaten
% =====

Xoff = abtm; % [g/L] Biomassemessdaten
Soff = Glu; % [g/L] Substratmessdaten

% Ausbeutekoeffizienten
% =====

Yxs = 0.39724; % [g/g] Ausbeutekoeffizient
% Glucose-Biomasse
YxsTryp = 0.52; % [g/g] Ausbeutekoeffizient
% Glucose-Biomasse bei Tryptophan-
% aufnahme

% Wachstumsparameter (Monod-Kinetik)
% =====

simax = 1.1771; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
simaxred = 0.4; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
% bei Reduktion der Temperatur
simaxTryplag = 0.22; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
% in der Lag-Phase bei Aufnahme von
% Tryptophan
simaxTryp = 0.62; % [g/gh] max. spez. Glucoseverbrauchsrate
% bei Aufnahme von Tryptophan
Ks = 0.2; % [g/L] MONOD-Konstante für Substratver-
% brauch
ammmmax = 0.26; % [g/gh] max. spez. Stickstoffverbrauchsrate
ammmmaxred = 0.053; % [g/gh] max. spez. Stickstoffverbrauchsrate
% reduziert durch KF
Kamm = 0.0011; % [g/L] MONOD-Konstante für Stickstoffver-
% brauch
muredLag = 0.73; % [-] Wachstumseinschränkung durch Stick-
% stoffmangel in der Lag-Phase
muredT = 0.7; % [-] Wachstumseinschränkung durch Ab-
% senken der Temperatur

% Parameter zur Beschreibung der Produktbildung
% =====

Pmax = 0.0010; % [g/L] Maximalwert des gebildeten
% Produktes
pimax = 0.00011; % [g/gh] maximale Produktbildungsrate
Tind = tind(1); % [h] Induktionszeitpunkt
a = 0.2; % [-] Wichtungsfaktor des Einflusses der
% Last des gebildeten Produktes für
% die Zelle
Wfprod = 15000000; % [-] Wichtungsfaktor des Einflusses der
% Produktbildung auf das Zellwachstum
tlag = 0.0; % [h] Lagzeit der Produktbildung

% Startbedingungen

```

```

% =====

S0      =  Glu(1);           % [g/L]      Startglucosekonzentration
X0      =  Xoff(1);         % [g/L]      Startbiomassekonzentration
P0      =  0.0;            % [g/L]      Startproduktkonzentration
AMM0    =  AMMoff(1);       % [g/L]      Startammoniumchloridkonzentration
t0      =  tF(1);          % [h]        Startzeitpunkt
tend    =  Tend(1);        % [h]        Endzeitpunkt

% Zeitinkremente
% =====

dt      =  (tend-t0)/(nF-1); % [h]        Integrationszeitschritt
t(1)    =  t0;              % [h]        Integrationsstartpunkt für Zeit

% Startwerte der Zustandsgrößen
% =====

X(1)    =  X0;              % [g/L]      Startpunkt für Biomasse
S(1)    =  S0;              % [g/L]      Startpunkt für Glucose
P(1)    =  P0;              % [g/L]      Startpunkt für Produkt
AMM(1)  =  AMM0;           % [g/L]      Startpunkt für Ammoniumchlorid

% Lösung der Differentialgleichung durch Euler-Algorithmus
% =====

for i=2:2851;                % Festlegung des Zeit-
                             % raumes

    t(i)=  t(i-1)+dt;        % Zeitinkremente

    amm =  ammmax*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
                             % Ammoniumchloridver-
                             % brauchsrate (MONOD)

    si =  simax*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez.
                             % Substratverbrauchs-
                             % rate (MONOD)

    mu =  Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1); % Berechnung der spez.
                             % Wachstumsrate

    if S(i-1)<=0; si=0.0;
    end
    if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
    end

    pi =  0;

                             % Definition der spe-
                             % zifischen Produkt-
                             % bildung

if i>=1501

    AMM(1651)=AMMoff(11); % Zugabezeitpunkt von
                             % Ammoniumchlorid
    S(1502)=Glu(12);      % Zugabezeitpunkt von
                             % Glucose
    amm =  ammmax*AMM(i-1)/(Kamm+AMM(i-1)); % Berechnung der spez.
                             % Ammoniumchloridver-
                             % brauchsrate (MONOD)
    si =  simax*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez.

```

```

% Substratverbrauchs-
% rate (MONOD)
mu = Yxs*si+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez.
% Wachstumsrate
pi = pimax*(1-(P(i-1)/Pmax))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
% Definition der spe-
% zifischen Produkt-
% bildung

if S(i-1)<=0; si=0.0;
end
if AMM(i-1)<=0; mu=0.0; amm=0.0;
end

pi = 0;

if t(i)>=5.5
mu = Yxs*si*muredLag+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez.
% Wachstumsrate in der
% Lag-Phase nach Stick-
% stoffmangel
si = simax*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
% Berechnung der spez.
% Substratverbrauchs-
% rate (MONOD) mit
% Reduktion durch Tem-
% peratur
pi = pimax*(1-(P(i-1)/Pmax))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
end
% Definition der spe-
% zifischen Produkt-
% bildung

if t(i)>=6.0
si = simax*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
% Berechnung der spez.
% Substratverbrauchs-
% rate (MONOD) mit
% Reduktion durch Tem-
% peratur
mu = Yxs*si/simaxred*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);

end
% Berechnung der spez.
% Wachstumsrate nach
% überwundener Lag-
% Phase

if t(i)>=7.0

mu = YxsTryp*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Gleichbleiben der
% spez. Wachstumsrate
% in der Lag-Phase zur
% Aufnahme von Trypto-
% phan bei geringerer
% Glucoseaufnahme
si = simaxTryplag*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
% Verringerung der
% spez. Glucoseauf-
% nahmerate in der Lag-
% Phase zur Aufnahme
% von Tryptophan

end

```

```

if t(i)>=7.5

mu = YxsTryp*si*muredT+P(i-1)*a/((X(i-1))*dt)-pi*Wfprod*P(i-1)/X(i-1);
% Gleichbleiben der
% spez. Wachstumsrate
% in der Lag-Phase zur
% Aufnahme von Trypto-
% phan bei geringerer
% Glucoseaufnahme

si = simaxTryp*simaxred*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der Glu-
% coseaufnahmerate auf
% der Grundlage eines
% Ausbeutefaktors Glu-
% cose/Tryptophan zu
% Biomasse und der Re-
% duktion der Tempera-
% tur

end

end

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====

X(i) = X(i-1) + dt*mu*X(i-1);

% Berechnung der Ammoniumkonzentration für Limitation
% =====

AMM(i) = AMM(i-1) - dt*amm*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====

S(i) = S(i-1) - dt*si*X(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====

P(i) = P(i-1) + dt*pi*X(i-1);

end

```

A3 Programm zur mathematischen Beschreibung der Messdaten der Fermentationen zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur, des pH-Wertes und der gesetzten spezifischen Wachstumsrate nach Induktion auf die NPY2R-Ausbeuten

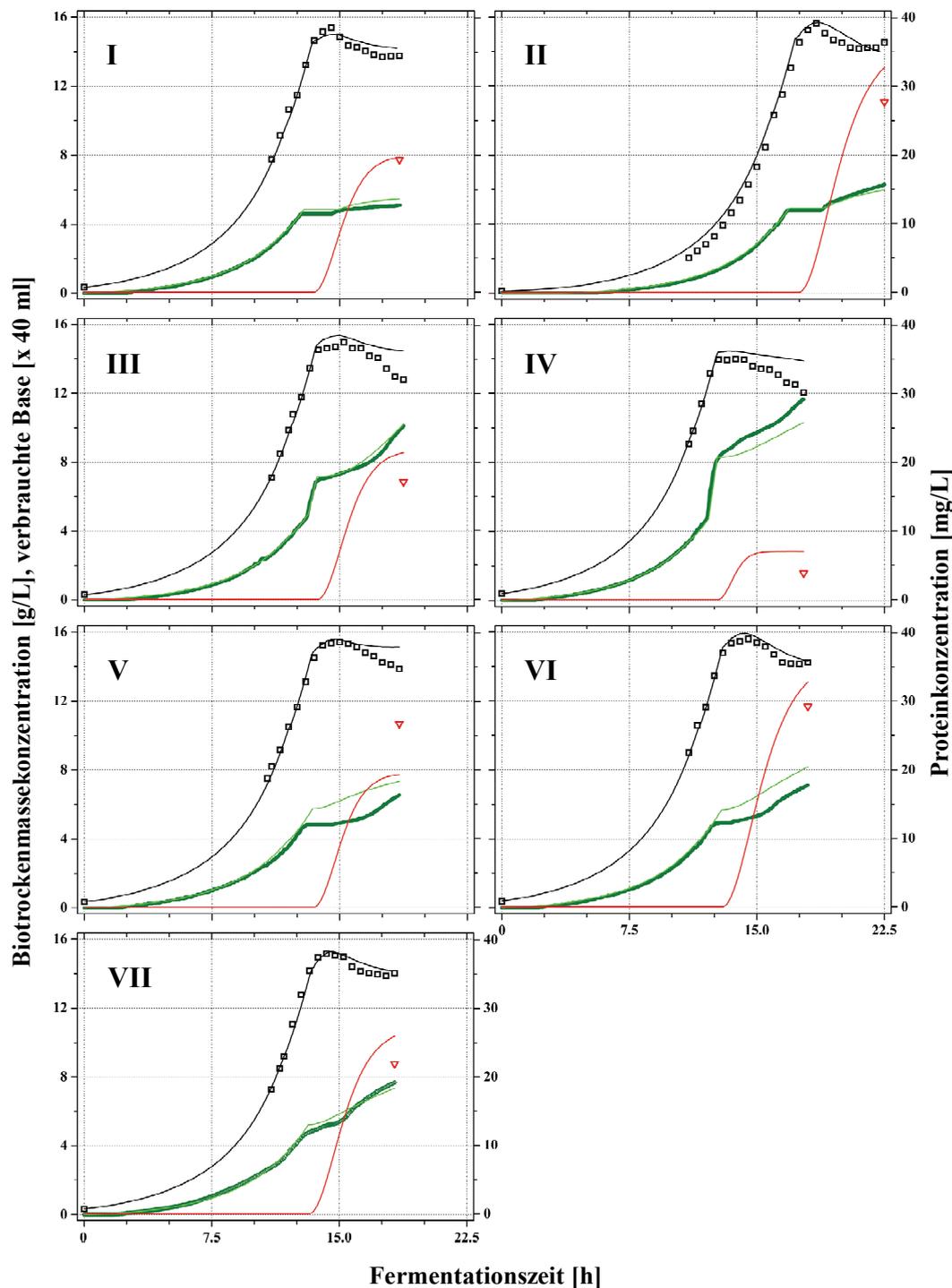


Abbildung 2 Anhang: Darstellung der Simulationsergebnisse für die Fermentationen zur Untersuchung der Abhängigkeit des Expressionslevels des NPY2R vom pH-Wert (I. pH 6.0, II. pH 6.5, III. pH 7.5, IV. pH 8.0) und der eingestellten spezifischen Wachstumsrate (V. 0.10 g/(gh), VI. 0.12 g/(gh), VII. 0.16 g/(gh)) nach Induktion bei 38°C. Gezeigt sind die Verläufe für Biomasse (Schwarz, Punkte - MD, Linie - Sim), verbrauchte Base (Grün - MD, Helles Grün - Sim) und Produkt (Rot, Punkte - MD, Linie - Sim). Die spezifische Wachstumsrate wurde für die Fermentationen mit Änderung des pH-Wertes auf einen Wert von 0.14 g/(gh) und der pH-Wert für die Fermentationen mit Änderung der Wachstumsrate auf 7.0 festgelegt.

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
% Mathematische Beschreibung der Daten der Fermentationen
% für den Neuropeptid Y-Rezeptor Typ 2
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

clear all, close all, clf

% Import der Messdaten der einzelnen Fermentationen
% =====

load 'workspace_NPY2R_all.mat'

% Wahl der zu simulierenden Fermentation
% =====

for SelExp=3:18;

% Definition der Laufparamter und Zuweisung der Offlinedaten
% =====

start = ofindex(SelExp,1); % [-] Laufparameter Anfang
ende   = ofindex(SelExp,2); % [-] Laufparameter Ende

Tim    = atoff(start:ende); % [h] Einlesen der Offlinezeit
Soff   = aglof(start:ende); % [g/kg] Einlesen der Substratdaten
Xoff   = abtm(start:ende); % [g/kg] Einlesen der BTMdaten
Prot   = aprot(start:ende); % [mg/kg] Einlesen der Proteindaten
index  = find(Prot~=1); % [-] Festlegung der Proteindaten
                    % mit Inhalt

% Einlesen der Protein-Offlinedaten
% =====

Protein(index)=Prot(index);

% Definition der Laufparamter und Zuweisung der Onlinedaten
% =====

starton = onindex(SelExp,1); % [-] Laufparameter Anfang
endeon  = onindex(SelExp,2); % [-] Laufparameter Ende

TON     = aton(starton:endeon); % [h] Einlesen der Onlinezeit
Weig    = awei(starton:endeon); % [kg] Einlesen des Gesamtgewichts
Feed    = afee(starton:endeon); % [kg/h] Einlesen des Feeds
AAMM    = aamm(starton:endeon); % [g] Einlesen der Basedaten
AACID   = aacid(starton:endeon); % [g] Einlesen der Säuredaten
ACID    = AACID/1000; % [kg] Umwandlung Säuredaten in kg
BASE    = AAMM/1000; % [kg] Umwandlung Basedaten in kg

% Feed
% =====

tF      = ton; % [h] Zuweisung der Onlinezeit auf
                    % Vektor zugehörig zum Feed
Ft      = Feed; % Vektorneubelegung für Feed
nF      = length(Ft); % Länge des Feedvektors

% Ausbeutekoeffizienten

```

```

% =====
Yxs      = 0.416;          % [g/g] Ausbeutekoeffizient Glycerin
Ypx      = 0.45;          % [g/g] Ausbeutekoeffizient Produkt-BTM
YBX      = 2.7;           % [g/g] Ausbeutekoeffizient Base-BTM
                        % vor Induktion
Ybx      = 0.2;           % [g/g] Ausbeutekoeffizient Base-BTM
                        % nach Induktion
Ybp      = 0.007;         % [g/g] Ausbeutekoeffizient Base-Prod.
Ybppi    = 0.65;         % [g/g] Baseverbrauch bedingt durch die
                        % Produktbildungsrate

% Wachstumsparameter (Monod-Kinetik)
% =====

simax    = 0.7692;        % [g/gh] max.spez. Substrataufnahmerate
Ks       = 0.08;          % [g/kg] MONOD-Konstante

% Parameter zur Beschreibung der Produktbildung
% =====

Pmax     = 19;             % [mg/kg] maximales Produkt bei 37°C
pimax    = 1.8;           % [g/gh] maximale Produktbildungsrate
Tind     = tind(SELExp,1); % [h] Induktionszeitpunkt
a0       = 1;             % [-] Wichtung der spezifischen Wachstumsrate (Tind)
b0       = 1;             % [-] Wichtung des gebildeten Produkts auf das Wachstum (Tind)
c0       = 100;           % [-] Wichtung der spez. Produktbildungsrate auf das Wachstum (Tind)
d        = 0.05;          % [-] Wichtung der spezifischen Wachstumsrate (Tind+1.5)
e        = 1;             % [-] Wichtung des gebildeten Produkts auf das Wachstum (Tind+1.5)
f        = 120;           % [-] Wichtung der spez. Produktbildungsrate auf das Wachstum (Tind+1.5)

% Parameter der Wichtung des Temperatureinflusses auf die Produktbildung
% =====

TEMPAI   = TEMP(SELExp,1); % [°C] Einlesen der Temperatur nach
                        % Induktion
Wf0      = 0.59471;        % [-]
TC       = 38.30955;       % [°C] optimale Temperatur
AWf      = 2.25915;        % [-]
w1       = 2.17002;        % [°C]
w2       = 0.1863;         % [°C]
w3       = 1.57374;        % [°C]

% Wichtungsfunktion des Temperatureinflusses auf die Produktbildung
% =====

Wf = Wf0 + AWf*(1/(1+exp((TEMPAI-TC+w1./2)/(-w2))))*
      (1 - 1/(1+exp((TEMPAI-TC-w1/2)/(-w3))));

% Parameter der Wichtung des Temperatureinflusses auf das Wachstum
% =====

mu0      = 0.51893;        % [-]

```

```

Tc      = 38.25262;          % [°C] optimale Temperatur
w       = 5.49134;          % [°C]
A       = 3.60879;          % [°C]
PII     = 3.1415926535897;  % [-] die Zahl Pi

% Wichtungsfunktion des Temperatureinflusses auf das Wachstum
% =====

muT = mu0 + (A/(w*sqrt(PII/2)))*exp(-2*((TEMPAI-Tc)/w).^2);

% Wichtung der Produktsynthese auf das Wachstum
% =====

Wfsyn  = 1000*Wf;

% Parameter der Wichtung des Einflusses der gesetzten spezifischen
% Wachstumsrate auf die Produktbildung
% =====

musetmax= 0.13506;          % [g/gh] optimale Wachstumsrate
MAXmu    = 0.076125;        % [-]
Wmu      = 0.06222;        % [-]
mumuset  = 1.35255;        % [-]
muset    = MUSET(SelExp,1); % [g/gh] Einlesen der gesetzten spez.
                               % Wachstumsrate nach Induktion

% Wichtungsfunktion des Feedeinflusses auf die Produktbildung
% =====

Wfmu = MAXmu*2*sqrt(mumuset)*exp(gammaln(2^(1./mumuset) - 1))/
      (PII*Wmu*exp(gammaln(mumuset - 0.5)))*
      (1. + 4.*(2^(1./mumuset) - 1)/
      Wmu^2*(muset - musetmax)^2)^(-mumuset);

% Parameter der Wichtung des pH-Werteinflusses auf die Produktbildung
% =====

WpH0    = 0.0;              % [-]
pHOpt   = 6.77512;         % [pH-Einheiten] optimaler pH-Wert
w       = 0.65181;         % [-]
MAX      = 1;              % [-]
ph      = PH(SelExp,1);    % [pH-Einheiten] Einlesen des pH-Wertes
                               % nach Induktion

% Wichtungsfunktion des pH-Einflusses auf die Produktbildung
% =====

Wph = WpH0 + MAX*exp(-0.5*((ph-pHOpt)/w)^2);

% Randbedingungen
% =====

S0      = Soff(1);          % [g/kg] Startsubstratkonzentration
X0      = Xoff(1);          % [g/kg] Startbiomassekonzentration
W0      = Weig(1);         % [kg] Startreaktionsmasse
P0      = 0.0;
t0      = tF(1);           % [h] Startzeitpunkt der Ferm.
tend    = Tend(SelExp,1);  % [h] Endzeitpunkt der Ferm.
Sf      = 400.00;          % [g/kg] Substratkonzentration Feed
Fsample = 0.00;           % [kg/h] Probenahme vernachlässigt

```

```

Fevap = 0.00; % [kg/h] Evaporationsrate vernachlässigt
%
% Wichtungsfaktor zur Änderung der Lag-Phase der Produktbildung in
% Abhängigkeit von der Temperatur
% =====

tlag = 5/Wf; % [-]

% Zeitinkremente
% =====

dt = (tend-t0)/(nF-1); % [h] Integrationszeitschritt
t(1) = t0; % [h] Integrationsstartpunkt für
% Zeit

% Startwerte der Zustandsgrößen
% =====

X(1) = X0; % [g/kg] Integrationsstartpunkt für
% Biomasse
S(1) = S0; % [g/kg] Integrationsstartpunkt für
% Substrat
W(1) = W0; % [kg] Integrationsstartpunkt für
% Reaktionsmasse
Base(1) = 0.0; % [g] Startwert für Base
Acid(1) = 0.0; % [g] Startwert für Säure
Fs(1) = Ft(1); % [kg/h] Startwert für Substratfeed
Fn(1) = 0.0; % [kg/h] Startwert für Nettofeed
P(1) = P0;

% Lösung der Differebtialgleichung für die Batchphase
% =====

for i=2:round(nF*((Tind-1.5)/tend)) % Festlegung des Zeiraumes des Batches

t(i)= t(i-1)+dt; % Laufschleife für den Integrations-
% zeitschritt
si = simax*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez. Substratver-
% brauchrate nach MONOD
pi=0; % spez. Produktbildungsrate
% Def. der spez. Wachstumsrate
mu = Yxs*si+P(i-1)/((X(i-1))*dt)-pi*P(i-1)/X(i-1);
if S(i-1)<=0; si=0.0; mu=0; end % Randbedingung

% Baseverbrauch in Abhängigkeit der Biomasse definiert (unterschiedlich
% aufgrund des Durchlaufens unterschiedlicher Deadbands in der pH-Regelung
% =====
Base(i)=0;
if X(i-1)>0.30;
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000+Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000+
Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;
if SelExp<18
if X(i-1)>1
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000+Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000+
Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;
end
if SelExp<16
if X(i-1)>0.30

```

```

Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000+Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000+
          Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;
if SelExp<10
if X(i-1)>1
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000+Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000+
          Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;
end
if SelExp<9
if X(i-1)>0.30;
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000+Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000+
          Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;
end
end
end
end
end
end
end

% Subatratfeed
% =====
Fs(i) = Ft(i)/1000;

% Säure
% =====
Acid(i) = ACID(i);

% Nettofeedstrom
% =====
Fn(i) = Fs(i) + (BASE(i)) + (Acid(i)) - Fevap;

% Berechnung der Reaktionsmasse
% =====
W(i) = W(i-1) + dt*(Fn(i)-Fsample);

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====
X(i) = X(i-1) + dt*mu*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*S(i-1)*Yxs -
      dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====
S(i) = S(i-1) - dt*si*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*Sf -
      dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====
P(i) = 0;

end

% Lösung der Differebtialgleichung für die Feedphase bis 30 Minuten vor
% Induktion
% =====

% Festlegung des Zeitraumes der
% Feedphase bis 30 Minuten vor
% Induktion
for i=round(nF*((Tind-1.5)/tend)):round(nF*((Tind-0.5)/tend))

```

```

t(i)= t(i-1)+dt; % Laufschiufe für den Integrations-
% zeitschritt
F = Ft(i)/1000; % Zuweisung des aktuellen Feedstromes
si = simax*S(i-1)/(Ks+S(i-1)); % Berechnung der spez. Substratver-
% brauchsrate nach MONOD
if S(i-1)<=0, si=0.0; end % Randbedingung
% Berechnung der spez. Wachstumsrate
mu = Yxs*si+P(i-1)/((X(i-1))*dt)-pi*P(i-1)/X(i-1);
pi = 0; % Randbedingung
WFMU = 1; % Festlegung des Feedeinflusses auf
% die Produktbildung bei  $\mu_{set}=0.14g/gh$ 
if muset~=-1 % Einbeziehung des Feedeinflusses auf
WFMU=Wfmu; % die Produktbildung wenn  $\mu_{set}$  nicht
end % gleich 0.14g/gh

% Baseverbrauch
% =====
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*X(i-1)*W(i-1)/1000 +
Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000 + Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;

% Subatratfeed
% =====
Fs(i) = Ft(i)/1000;

% Säure
% =====
Acid(i) = ACID(i);

% Nettofeedstrom
% =====
Fn(i) = Fs(i) + (BASE(i)-BASE(i-1)) + (Acid(i)-Acid(i-1)) - Fevap;

% Berechnung der Reaktionsmasse
% =====
W(i) = W(i-1) + dt*(Fn(i)-Fsample);

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====
X(i) = X(i-1) + dt*mu*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*S(i-1)*Yxs -
dt*(Fn(i)/W(i))*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====
S(i) = S(i-1) - dt*si*X(i-1) - dt*pi*Wf*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*Sf -
dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====
P(i) = 0;

end

% Lösung der Differentialgleichung in der Feedphase - Parameteränderung
% =====

% Festlegung des Zeitraumes der
% Feedphase bis zur Induktion
for i=round(nF*((Tind-0.5)/tend)):round(nF*(Tind)/tend)

t(i)= t(i-1)+dt; % Laufschiufe für den Integrations-

```

```

% zeitschritt
F = Ft(i)/1000; % Zuweisung des aktuellen Feedstromes
% Berechnung der spez. Substratver-
% brauchsrate nach MONOD unter Einbe-
% ziehung der maximalen Wachstumsrate
% abhängig von der Temperatur

si = simax/muT*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
if S(i-1)<=0, si=0.0; end % Randbedingung
% Berechnung der spez. Wachstumsrate
mu = Yxs*si+P(i-1)/((X(i-1))*dt)-pi*P(i-1)/X(i-1);
pi = 0; % Berechnung der spez. Produktbild-
% ungsrate

% Baseverbrauch
% =====
Base(i) = Base(i-1)+YBX*dt*mu*muT*X(i-1)*W(i-1)/1000 +
Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000 + Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;

if ph<7 % Einfluss des eingestellten pH-Wertes
pHdiff=7-ph; % auf den Baseverbrauch
Base(i)=Base((round(nF*((Tind-0.5)/tend)))-1);
end

if ph>7 % Einfluss des eingestellten pH-Wertes
pHdiff=ph-7; % auf den Baseverbrauch
pHshift=225; % benötigte Base für pH-Änderung
Base(i) = Base(i-1)+pHdiff*dt*pHshift/1000 +
YBX*dt*mu*muT*X(i-1)*W(i-1)/1000 + Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000 +
Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;

end

% Subatratfeed
% =====
Fs(i) = Ft(i)/1000;

% Säure
% =====
Acid(i) = ACID(i);

% Nettofeedstrom
% =====
Fn(i) = Fs(i) + (BASE(i)-BASE(i-1)) + (Acid(i)-Acid(i-1)) - Fevap;

% Berechnung der Reaktionsmasse
% =====
W(i) = W(i-1) + dt*(Fn(i)-Fsample);

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====
X(i) = X(i-1) + dt*mu*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*S(i-1)*Yxs -
dt*(Fn(i)/W(i))*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====
S(i) = S(i-1) - dt*si*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*Sf -
dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====
P(i) = 0;

```

```

end

% Lösung der Differentialgleichung ab Induktion bis + 1.5 h nach Induktion
% =====

                                % Festlegung des Zeitraumes der Feed-
                                % phase von Induktion bis 1.5 h nach
                                % Induktion für Festlegung des Produkt-
                                % einflusses auf das Wachstum
for i=round(nF*((Tind)/tend)):round(nF*((Tind+1.5)/tend))

t(i)=  t(i-1)+dt;                % Lauschleife für den Integrationszeit
                                % schritt
F  =  Ft(i)/1000;                % Zuweisung des aktuellen Feedstromes
                                % Berechnung der spez. Substratver-
                                % brauchsrate nach MONOD unter Einbe-
                                % ziehung der maximalen Wachstumsrate
                                % abhängig von der Temperatur

si  =  simax/muT*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
if S(i-1)<=0, si=0.0; end        % Randbedingung
a(round(nF*((Tind)/tend)))=a0;  % Zuweisung des Startwertes
b(round(nF*((Tind)/tend)))=b0;  % Zuweisung des Startwertes
c(round(nF*((Tind)/tend)))=c0;  % Zuweisung des Startwertes
                                % Änderung der Einflüsse von spez.
                                % Wachstumsrate, gebildetem Produkt und
                                % Produktbildung auf Biomasseverlauf

a(i) = a0-((a0-d)/(round(nF*((Tind+1.5)/tend))-round(nF*((Tind)/tend))))*
        (i-round(nF*((Tind)/tend)));
b(i) = b0-((b0-e)/(round(nF*((Tind+1.5)/tend))-round(nF*((Tind)/tend))))*
        (i-round(nF*((Tind)/tend)));
c(i) = c0+((c0-f)/(round(nF*((Tind+1.5)/tend))-round(nF*((Tind)/tend))))*
        (i-round(nF*((Tind)/tend)));

WPH=1;                          % Festlegung des pH-Werteinflusses auf
                                % die Produktbildung bei pH=7.0

if ph<7                          % Einbeziehung des pH-Werteinflusses
WPH=Wph;                          % auf die Produktbildung
end
if ph>7                          % Einbeziehung des pH-Werteinflusses
WPH=Wph;                          % auf die Produktbildung
end

                                % Definition der spez. Wachstumsrate
                                % unter Berücksichtigung der Parameter-
                                % änderungen
mu  =  Yxs*si*WPH*a(i)+P(i-1)*b(i)/(Wfsyn*muT)/((X(i-1))*dt)-pi*c(i)/
        (Wfsyn*muT)*P(i-1)/X(i-1);
WFMU = 1;                          % Festlegung des Feedeinflusses auf
                                % die Produktbildung bei  $\mu_{set}=0.14\text{g/gh}$ 
if muset~=-1                      % Einbeziehung des Feedeinflusses auf
WFMU=Wfmu;                          % die Produktbildung wenn  $\mu_{set}$  nicht
end                                  % gleich  $0.14\text{g/gh}$ 
                                % Definition der spez. Produktbildungs-
                                % rate
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
if ph>7                          % Definition der spez. Produktbildungs-
                                % rate für veränderten pH-Wert
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*Wph*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
end

```

```

if ph<7                                     % Definition der spez. Produktbildungs-
                                             % rate für veränderten pH-Wert
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*Wph*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
end

if ph>7                                     % Änderung der Wichtungsfaktoren für
Ybx    = 0.2/Wph/(1*pHdiff);                % das Wachstum aufgrund des veränderten
Ybp    = 0.007/Wph/(1*pHdiff);             % pH-Wertes
Ybppi  = 0.65/Wph/(500*pHdiff);
end
if ph<7                                     % Änderung der Wichtungsfaktoren für
Ybx    = 0.2*Wph*2*pHdiff;                 % das Wachstum aufgrund des veränderten
Ybp    = 0.007*Wph*0.2*pHdiff;            % pH-Wertes
Ybppi  = 0.65*Wph*2*pHdiff;
end

% Baseverbrauch
% =====
Base(i) = Base(i-1)+Ybx*dt*mu*muT*X(i-1)*W(i-1)/1000 +
          Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000 + Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;

if ph<7                                     % konstanter Basewert
Base(i)=Base((round(nF*((Tind-0.5)/tend)))-1);
end

% Subatratfeed
% =====
Fs(i)   = Ft(i)/1000;

% Säure
% =====
Acid(i) = ACID(i);

% Nettofeedstrom
% =====
Fn(i)   = Fs(i) + (BASE(i)-BASE(i-1)) + (Acid(i)-Acid(i-1)) - Fevap;

% Berechnung der Reaktionsmasse
% =====
W(i)    = W(i-1) + dt*(Fn(i)-Fsample);

% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====
X(i)    = X(i-1) + dt*mu*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*S(i-1)*Yxs -
          dt*(Fn(i)/W(i))*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====
S(i)    = S(i-1) - dt*si*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*Sf -
          dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====
P(i)    = P(i-1) + dt*pi*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*0.0 -
          dt*(Fn(i)/W(i))*P(i-1);

end

% Lösung der Differentialgleichung ab 1.5 h nach Induktion

```

```

% =====

% Festlegung des Zeitraumes der Feed-
% phase ab 1.5 h nach Induktion bis
% zum Ende der Fermentation

for i=round(nF*((Tind+1.5)/tend)):nF

t(i)=  t(i-1)+dt;          % Lauschleife für den Integrations-
% zeitschritt
F  =  Ft(i)/1000;         % Zuweisung des aktuellen Feedstromes
% Berechnung der spez. Substratver-
% brauchsrate nach MONOD unter Einbe-
% ziehung der maximalen Wachstumsrate
% abhängig von der Temperatur

si  =  simax/muT*S(i-1)/(Ks+S(i-1));
if S(i-1)<=0, si=0.0; end  % Randbedingung

if ph<7                    % Einbeziehung des pH-Werteinflusses
WPH=Wph;                  % auf die Produktbildung
end
if ph>7                    % Einbeziehung des pH-Werteinflusses
WPH=Wph;                  % auf die Produktbildung
end

% Berechnung der spez. Wachstumsrate
mu  =  Yxs*si*WPH*d+(P(i-1)*e/(Wfsyn*muT))/((X(i-1))*dt)-
      (pi*f/(Wfsyn*muT))*P(i-1)/X(i-1);
% Berechnung der spez. Produktbildungs-
% rate
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));

if ph>7                    % Definition der spez. Produktbildungs-
% rate bei verändertem pH-Wert
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*Wph*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
end
if ph<7                    % Definition der spez. Produktbildungs-
% rate bei verändertem pH-Wert
pi=pimax*(1-(P(i-1)/(Pmax*Wf*Wph*WFMU)))*(1-exp((-t(i)-Tind)/tlag));
end

% Baseverbrauch
% =====
Base(i) =  Base(i-1)+Ybx*dt*mu*muT*X(i-1)*W(i-1)/1000 +
          Ybp*P(i-1)*W(i-1)/1000 + Ybppi/Wf*dt*pi*X(i-1)*W(i-1)/1000;

% Subatratfeed
% =====
Fs(i)  =  Ft(i)/1000;

% Säure
% =====
Acid(i) =  ACID(i);

% Nettofeedstrom
% =====
Fn(i)  =  Fs(i) + (BASE(i)-BASE(i-1)) + (Acid(i)-Acid(i-1)) - Fevap;

% Berechnung der Reaktionsmasse
% =====
W(i)   =  W(i-1) + dt*(Fn(i)-Fsample);

```

```
% Berechnung der Biomassekonzentration
% =====
X(i)    =    X(i-1) + dt*mu*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*S(i-1)*Yxs -
             dt*(Fn(i)/W(i))*X(i-1);

% Berechnung der Substratkonzentration
% =====
S(i)    =    S(i-1) - dt*si*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*Sf -
             dt*(Fn(i)/W(i))*S(i-1);

% Berechnung der Proteinkonzentration
% =====
P(i)    =    P(i-1) + dt*pi*X(i-1) + dt*(Fs(i)/W(i))*0.0 -
             dt*(Fn(i)/W(i))*P(i-1);

end
end
```


Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Daniel Huster sehr herzlich für die Vergabe dieses Themas danken. Ich habe in ihm den großartigsten Mentor gefunden, der es immer verstanden hat, zu motivieren, Lösungen zu finden, das eigenständige wissenschaftliche Denken und Arbeiten zu fördern und nicht zuletzt die richtigen Menschen in einer Gruppe zusammen zu führen. Mit diesem Hintergrund war die Arbeit ein Genuss. Weiterhin danke ich ihm für die Ermöglichung des Aufenthaltes in den Vereinigten Staaten von Amerika. Ich bin ihm in noch vielen weiteren Punkten sehr dankbar. Das beinahe Wichtigste ist jedoch, so Vieles in einem freundschaftlichen Umfeld gelernt zu haben.

Dr. Klaus Gawrisch möchte ich für die freundliche und vor allem unkomplizierte Aufnahme in Washington, D.C. danken. Seine Arbeits- und Denkweise hat mich in großem Maße beeinflusst. Die Förderung, Freundlichkeit und Hilfe, die ich erfahren habe, sind mit Worten nicht zu benennen.

Zu immensem Dank bin ich Dr. Alexei Yeliseev verpflichtet. Seine Gabe, Problematiken zu erkennen und die richtige Herangehensweise zu finden, hat hoffentlich ein klein wenig auf mich abgefärbt. Es war eine wunderbare Zusammenarbeit, mit Spaß und vielen Erkenntnissen verbunden. Diese Zusammenarbeit hat mich wohl für mein ganzes Leben beeinflusst.

Dr. habil. Hauke Lilie möchte ich für seine wissenschaftliche Unterstützung, Ideen und unermüdlichen Einsatz bei jeglichem Problem danken. Ohne ihn wäre wohl die Arbeit am Institut zum Erliegen gekommen.

Ich danke Dr. Alexander Vogel für die schöne Zusammenarbeit mit Spaß und Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Ein großer Dank geht an alle Kooperationspartner, insbesondere Prof. Dr. Rainer Rudolph und Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickingen, für die kreative Unterstützung meiner Arbeit und des Gesamtprojektes.

Ich möchte mich bei Dr. Peter Schmidt, Cindy Montag, Sandra Berndt, Stephan Theisgen, Dr. Holger Scheidt, Dr. Guido Reuther, Dr. Andreas Bunge und Bjoern Olausson für mehr als nur die wissenschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe bedanken. Freundschaftliche Gedanken...

Auch bei Lioudmila Zoubak, Dr. Tomohiro Kimura, Dr. Krishna Vukoti und Dr. Olivier Soubias möchte ich mich für die Zusammenarbeit und den schönen Aufenthalt in Washington, D.C. bedanken. Ihr werdet mir auf ewig in Erinnerung bleiben.

Ich danke Prof. Dr. Andrea Sinz und Dr. Christian Ihling für die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Ein großer Dank geht an Dr. Sonja Hess und Dr. Jenny T.C. Ho für die massenspektrometrischen Untersuchungen, die eine Publikation in großem Maße unterstützten.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Torsten Schöneberg und Dr. Doreen Thor für die tolle Kooperation und Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und Messungen.

Weiterer großer Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Biochemie und Biotechnologie, die sich immer mit großem Einsatz in der Instandhaltung der Geräte verdient gemacht haben.

Für ihre Leistungen sei Mathias Bosse, Oliver Hägeholz und Peter Rahfeld gedankt.

Großer Dank geht an das „Exzellenznetzwerk Biowissenschaften - Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“ des Bundeslandes Sachsen-Anhalt für die finanzielle Unterstützung. In diesem Zusammenhang geht ein weiterer großer Dank an den Netzwerkkoordinator Dr. Mathias Strutz.

Ich danke meinen Freunden und der Community Peter, Matze, Frank, Christian, Erdi und Stefan, der mich auch in wissenschaftlicher Hinsicht unterstützt und geprägt hat, für die Ablenkung und teilweise doch großzügige Akzeptanz von schlechter Laune.

Die Möglichkeit des Studiums und somit auch der Doktorarbeit bestand nur, weil meine Familie, insbesondere natürlich meine Eltern, mir den Weg esteint haben. Ich erfuhr Liebe und Unterstützung... und einen vollen Kühlschrank. Allein diesen Weg zu gehen, wäre nicht möglich gewesen.

Meinem größten Schatz Caro verdanke ich das, was in diesen Seiten niedergeschrieben ist... und noch vieles mehr. Deine Liebe, Deine unermüdliche Unterstützung und Zusprache, Deine große Akzeptanz meiner Abwesenheit, Dein Vertrauen in mich und meinen Traum waren einfach großartig und haben mir in jeder Zeit unermesslich geholfen. In Liebe...

Lebenslauf

zur Person

Berger, Christian

Friesenstraße 1

06112 Halle

geboren am 05.04.1981

in Schönebeck/Elbe

ledig

Bildungsweg

- 02/2008 - 04/2008 Dreimonatiger Forschungsaufenthalt am NIH (LMBB, *Section of Nuclear Magnetic Resonance*), Rockville, MD, USA
- seit 07/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand in der Nachwuchsgruppe „Strukturbiologie von Membranproteinen“ am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 07/2006 Erhalt des Diploms, Dipl.-Ing. mit dem Gesamtprädikat „gut“
- 12/2005 - 07/2006 Diplomarbeit zu dem Thema
„Einsatz robuster Regelungsmethoden bei der Hochzelldichtekultivierung rekombinanter *Escherichia coli*-Bakterien“
am Institut für Bioverfahrenstechnik der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
- 10/2000 - 07/2006 Studium der Bioingenieurwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 09/1999 - 08/2000 Absolvierung des Zivildienstes bei der Care Service GmbH in Schönebeck/Elbe
- 07/1999 Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife am „Gymnasium im Malzmühlenfeld“ in Schönebeck/Elbe
- 1991 - 1999 Besuch des „Gymnasiums im Malzmühlenfeld“ in Schönebeck/Elbe
- 1987 - 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Maxim Gorki“ in Schönebeck/Elbe

Halle/Saale, den 09.02.2010

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich mich weder bei der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch bei einer anderen Hochschule mit dieser Arbeit um den Erhalt eines akademischen Titels beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Die aus anderen Werken inhaltlich oder wörtlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, den 09.02.2010