



Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie,
Potsdam, Deutschland



IZI

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI),
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB),
Potsdam-Golm, Deutschland

**Fluoreszenzmarkierung und Modifizierung von komplexen Proteinen in
eukaryotischen zellfreien Systemen durch die Etablierung von
orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paaren**

Anne Zemella

Univ.-Diss.

**zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Biochemie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie
der Universität Potsdam**

**angefertigt am
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI)
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB),
Potsdam-Golm, Deutschland**

Ort und Tag der Disputation: Potsdam, 12.11.2019

This work is licensed under a Creative Commons License:
Attribution 4.0 International.
This does not apply to quoted content from other authors.
To view a copy of this license visit
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Hauptbetreuer*in: Prof. Dr. Frank Bier
Betreuer*innen: Dr. Stefan Kubick
Gutachter*innen: Prof. Dr. Frank Bier, Dr. Stefan Kubick, Prof. Dr. Peter Neubauer

Published online at the
Institutional Repository of the University of Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-44236>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-442361>

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anne Zemella, versichere an Eides statt, dass meine hinsichtlich der früheren Teilnahme an Promotionsverfahren gemachten Angaben richtig sind und, dass die eingereichte Arbeit oder wesentliche Teile derselben in keinem anderen Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt worden sind. Ich versichere darüber hinaus, dass bei der Anfertigung der Dissertation die Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der DFG eingehalten wurden, die Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt worden sind und die den benutzten Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Einer Überprüfung der eingereichten Dissertation bzw. der eingereichten Schriften mittels einer Plagiatsprüfungssoftware stimme ich zu.

Potsdam, 07.01.2020

(Anne Zemella)

Danksagung

Im Folgenden möchte ich allen Menschen danken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben und ohne deren Unterstützung die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth und Prof. Dr. Frank Bier für die Möglichkeit meine Arbeit am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Institutsteil Bioanalytik und Bioprozess (IZI-BB) in Potsdam-Golm durchführen zu können, sowie Prof. Dr. Frank Bier für die Begutachtung meiner Arbeit, danken. Die Promotion wurde in der Abteilung „Zellfreie und zellbasierte Bioproduktion“ unter der Leitung von Dr. Stefan Kubick durchgeführt, welcher mich in den vergangenen Jahren ausgezeichnet beraten und unterstützt hat. Ich möchte mich ebenfalls bei Dr. Stefan Kubick für die vielen fachlichen Diskussionen, Inspirationen, aber auch konstruktiven Kritiken bedanken, die einen entscheidenden Einfluss auf die vorliegende Arbeit gehabt haben. Weiterer Dank geht an Prof. Dr. Peter Neubauer für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie an das Prüfungskomitee.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei meiner Kollegin Dr. Lena Thoring für die vielen produktiven Diskussionen, der aufmunternden Worte und der angenehmen Zeit in den letzten Jahren bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei der gesamten Abteilung Zellfreie und zellbasierte Bioproduktion für die Unterstützung bedanken. Besonders zu nennen sind neben Lena Thoring ebenfalls Dana Wenzel und Doreen Wüstenhagen für die Bereitstellung der verschiedensten eukaryotischen Lysate, ohne welche die Umsetzung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an die Master-Studierenden, die ich in den letzten Jahren betreuen durfte und die mich in der alltäglichen Laborarbeit unterstützt haben. Zu nennen sind hierbei Alex Bottke für sein Interesse an den Serotonin- und Dopamin-Transportern, Theresa Richter für ihr Engagement im GPCR-Bereich mit Fokus auf den Adenosin-Rezeptor A2a, Anneliese Krüger für ihre Geduld bei der Synthese von aktiven Porenbildnern, Dennis Bräuer für die umfangreichen Untersuchungen von fluoreszenzmarkierten Ionenkanälen und Jeffrey Schloßhauer für seine Unterstützung in der Etablierung des orthogonalen Systems auf Basis der Pyrrolysin-Synthetase.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Marlitt Stech, Dr. Lena Thoring und Dr. Stefan Kubick für die sorgfältige Revision des Manuskripts und für die konstruktiven Kommentare bedanken.

Die Umsetzung der Analyse des Translationsprozesses wäre nicht ohne die Bereitstellung des ATP-bindenden Aptamers durch Prof. Dr. John Brennan und Prof. Dr. Yingfu Li, sowie der fachlichen Unterstützung von Dr. Monsur Ali möglich gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und sämtlichen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Ideen, aber auch Sorgen hatten.

Allgemeine Zusammenfassung

Die funktionelle Charakterisierung von therapeutisch relevanten Proteinen kann bereits durch die Bereitstellung des Zielproteins in adäquaten Mengen limitierend sein. Dies trifft besonders auf Membranproteine zu, die aufgrund von zytotoxischen Effekten auf die Produktionszelllinie und der Tendenz Aggregate zu bilden, in niedrigen Ausbeuten an aktivem Protein resultieren können. Der lebende Organismus kann durch die Verwendung von translationsaktiven Zelllysaten umgangen werden- die Grundlage der zellfreien Proteinsynthese. Zu Beginn der Arbeit wurde die ATP-abhängige Translation eines Lysates auf der Basis von kultivierten Insektenzellen (*Sf21*) analysiert. Für diesen Zweck wurde ein ATP-bindendes Aptamer eingesetzt, durch welches die Translation der Nanoluziferase reguliert werden konnte. Durch die dargestellte Applizierung von Aptameren, könnten diese zukünftig in zellfreien Systemen für die Visualisierung der Transkription und Translation eingesetzt werden, wodurch zum Beispiel komplexe Prozesse validiert werden können.

Neben der reinen Proteinherstellung können Faktoren wie posttranslationale Modifikationen sowie eine Integration in eine lipidische Membran essentiell für die Funktionalität des Membranproteins sein. Im zweiten Abschnitt konnte, im zellfreien *Sf21*-System, für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Endothelin B sowohl eine Integration in die endogen vorhandenen Endoplasmatisch Retikulum-basierten Membranstrukturen als auch Glykosylierungen, identifiziert werden.

Auf der Grundlage der erfolgreichen Synthese des ET-B-Rezeptors wurden verschiedene Methoden zur Fluoreszenzmarkierung des Adenosin-Rezeptors A2a (*Adora2a*) angewandt und optimiert. Im dritten Abschnitt wurde der *Adora2a* mit Hilfe einer vorbeladenen tRNA, welche an eine fluoreszierende Aminosäure gekoppelt war, im zellfreien Chinesischen Zwerghamster Ovarien (CHO)-System markiert. Zusätzlich konnte durch den Einsatz eines modifizierten tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paares eine nicht-kanonische Aminosäure an Position eines integrierten Amber-Stopcodon in die Polypeptidkette eingebaut und die funktionelle Gruppe im Anschluss an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Aufgrund des offenen Charakters eignen sich zellfreie Proteinsynthesysteme besonders für eine Integration von exogenen Komponenten in den Translationsprozess. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung wurde eine ligandvermittelte Konformationsänderung im *Adora2a* über einen Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer detektiert. Durch die Etablierung der Amber-Suppression wurde darüber hinaus das Hormon Erythropoetin pegyliert, wodurch Eigenschaften wie Stabilität und Halbwertszeit des Proteins verändert wurden.

Zu guter Letzt wurde ein neues tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar auf Basis der *Methanosarcina mazei* Pyrrolysin-Synthetase etabliert, um das Repertoire an nicht-kanonischen Aminosäuren und den damit verbundenen Kopplungsreaktionen zu erweitern. Zusammenfassend wurden die Potenziale zellfreier Systeme in Bezug auf der Herstellung von komplexen Membranproteinen und der Charakterisierung dieser durch die Einbringung einer positionsspezifischen Fluoreszenzmarkierung verdeutlicht, wodurch neue Möglichkeiten für die Analyse und Funktionalisierung von komplexen Proteinen geschaffen wurden.

Abstract

The functional characterization of therapeutically relevant proteins can be limited due to the provision of the target protein in adequate amounts. In particular membrane proteins belong to the so called “difficult-to-express” proteins because of possible cytotoxic side effects and a susceptibility to aggregation. The living organism can be circumvented by using cell lysates – the basic for cell-free protein synthesis. In the beginning of the thesis the ATP-dependent translation process in a cell lysate based on cultured insect (*Sf21*) cells was analyzed. For this purpose the translation of a nanoluciferase was regulated by the addition of an ATP-binding aptamer. The demonstrated application of aptamers in cell-free systems might enable a visualization of transcription and translation and following a potential validation process for high-throughput syntheses.

In addition to the protein synthesis, factors such as posttranslational modifications and a correct integration into a lipid membrane are essential for the functionality of membrane proteins. Therefore, in the second part, integration of the G protein-coupled Endothelin receptor type B (ET-B) into the endogenous endoplasmic reticulum derived membranes and glycosylation were shown to be possible in a *Sf21* cell-free system.

Following to the successful synthesis of the ET-B receptor different fluorescent labeling strategies were applied to the adenosine receptor A2a (*Adora2a*). The first strategy applied precharged tRNAs, coupled to a fluorescently labeled amino acid, to the translation process in a Chinese Hamster Ovary cells (CHO) cell-free system. The second strategy utilized a modified tRNA/aminoacyl-tRNA-synthetase pair to incorporate a non-canonical amino acid at an integrated amber stop codon with a subsequently fluorescent labeling. The open character of cell-free systems enables a feasible integration of exogenous components into the translation process. The site-specific fluorescent labeling was the basis for the detection of a ligand-induced conformational change in the *Adora2a* by a bioluminescence resonance energy transfer. Additionally the amber suppression technique was transferred to the hormone Erythropoietin (EPO) to modify EPO’s stability and half-life period by coupling polyethylene glycol.

Last but not least a novel tRNA/aminoacyl-tRNA-synthetase pair based on the *Methanosarcina mazei* pyrrolysine synthetase was developed to further increase the repertoire of non-canonical amino acids and copper-free click reactions. Summarizing in the present thesis the potentials of cell-free protein systems related to the synthesis of “difficult-to-express” proteins and the characterization of these proteins with site-specific fluorescence labeling are depicted, thereby establishing new methods for the analysis and functionalization of complex proteins.

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM-Azid (DE)PG	Fluorescein-Azid
aAPT	18:1-trans/ 18:1-trans-1,2-dielaidoyl-sn-glycerin-3-phospho-(1'-racglycerin)
Adora2a	ATP-bindendes Aptamer
ADP	Adenosin-Rezeptor A2a
AF647-Alkin	Adenosindiphosphat
ATP	Alexa Fluor 647-Alkin
Amb215	Adenosintriphosphat
Amb153	Amber-Stopcodon an der Position, welche für die Aminosäure 215 codiert
AMP	Amber-Stopcodon an der Position, welche für die Aminosäure 153 codiert
AzF	Adenosinmonophosphat
AzL	p-Azido-L-Phenylalanin
BP-CUA	Azido-Lysin
BP-GAA	BODIPY-Tetramethylrhodamin-Lysin gekoppelt an eine Alanin-tRNA, die das Amber-Stopcodon adressiert
BRET	BODIPY-Tetramethylrhodamin-Lysin gekoppelt an eine Alanin-tRNA, die Phenylalanin-Codons adressiert
C	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer IRES aus dem Cricket Paralysis Virus (Nomenklatur für DNA-Konstrukte)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cAPT	Kontroll-Aptamer
CFP	Cyan-Fluoreszenzproteins
CIP	Alkaline Phosphatase
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CTD	C-terminale Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
CECF	<i>Continuous exchange cell-free technology</i>
CHO	Ovarien-Zellen aus dem Chinesischen Zwerghamster
CrPV	<i>Cricket Paralysis Virus</i>
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Klick-Chemie
CuSO ₄	Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat
ddH ₂ O	Doppelt demineralisiertes Wasser
DDM	4,4'-Diaminodiphenylmethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
eAzFRS	<i>E. coli</i> modifizierte Tyrosin-tRNA-Synthetase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Zellen
<i>EcTyrRS/EctRNA</i>	Orthogonales System bestehend aus der Tyrosin-Synthetase und passender tRNA aus <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Endothelin
eYFP	<i>Enhanced yellow</i> Fluoreszenzprotein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FUT8	Fucosyltransferase 8

GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa	Henrietta Lacks-Zellen
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HTS	Hochdurchsatzverfahren
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>Lysogeny broth</i>
L-His	L-Histidin
M	Melittin (Nomenklatur für DNA-Konstrukte)
Mel	Melittin
MF	Mikrosomale Fraktion
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
<i>MmPyIRS/tRNA</i>	Orthogonales System bestehend aus der Pyrrolysin-Synthetase und passender tRNA aus <i>Methanosarcina mazei</i>
mRNA	<i>Messenger</i> (Boten)-Ribonukleinsäure
N	Regulatorische Sequenzen (Nomenklatur für DNA-Konstrukte)
NaAsc	Natriumascorbat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOAc	Natriumacetat
nkAs	Nicht-kanonische Aminosäure
Nluc	Nanoluziferase
NMR	Kernspinresonanz
NTC	<i>No template control</i>
NTD	N-terminale Domäne
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PERK	Protein Kinase RNA-ähnliche ER Kinase
PF	Pelletierte Fraktion
pPa	p-Propargyloxy-L-Phenylalanin
ProtK	Proteinase K
PyIRS-AF	<i>Methanosarcina mazei</i> modifizierte Pyrrolysin-Synthetase
PyIRS _{CHO}	Pyrrolysin-Synthetase translatiert in einem zellfreien CHO-System
PyIRS _{E. coli}	Pyrrolysin-Synthetase translatiert in einem zellfreien <i>E. coli</i> -System
PyIRS _{Sf21}	Pyrrolysin-Synthetase translatiert in einem zellfreien <i>Sf21</i> -System
PyIRS _{WG}	Pyrrolysin-Synthetase translatiert in einem zellfreien Weizenkeim-System
RF1	Terminationsfaktor 1
RLU	Relative Lichteinheiten
rpm	Umdrehungen per Minute
SCO	Cyclooctin-L-Lysin

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21 Zellen
SiR	Silikon-Rhodamin-Azid
SN	Überstand
SOC	Super optimiertes Nährmedium
SPAAC	<i>Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
SPIEDAC	<i>Strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition</i>
TBE	Tris Base Borat EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCO	Trans-Cycloocten-L-Lysin
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TM	Translationsmix
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
tRNAPyICUA	Suppressions-tRNA für das <i>MmPylRS/tRNA</i> orthogonale System
tRNATyrCUA	Suppressions-tRNA für das <i>EcTyrRS/EctRNA</i> orthogonale System
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
ZFPS	Zellfreie Proteinsynthese

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Allgemeine Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	12
1.1. Inhalt der Arbeit	12
1.2. Zellbasierte Protein Produktion.....	13
1.2.1. Prokaryotische Expressionssysteme.....	14
1.2.2. Eukaryotische Expressionssysteme.....	14
1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	16
1.2.4. Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	18
1.3. Zellfreie Proteinsynthese	19
1.3.1. Zellfreie Proteinsynthese in prokaryotischen Zellextrakten	20
1.3.2. Zellfreie Proteinsynthese in eukaryotischen Zellextrakten	22
1.4. Modellproteine	23
1.4.1. Nanoluziferase.....	23
1.4.2. Endothelin-Rezeptoren.....	24
1.4.3. Adenosin-Rezeptoren mit Fokus auf den Adenosin-Rezeptor A2a.....	25
1.4.4. Erythropoetin	26
1.5. Erweiterung des genetischen Codes	27
1.5.1. Methoden zur ortsspezifischen Integration von nicht-kanonischen Aminosäuren.....	27
1.5.2. Orthogonale Systeme auf Basis der Tyrosin-Synthetase aus <i>E. coli</i> (<i>EcTyrRS/EctRNA</i>) und der Pyrrolysin-Synthetase aus <i>Methanosarcina mazei</i> (<i>MmPylRS/tRNA</i>).....	29
1.5.3. Anwendungen	31
2. Materialien und Methoden	33
2.1 Materialien.....	33
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.2. Puffer und Lösungen.....	36
2.1.3. DNA Analytik.....	36
2.1.4. Glykosidase Assay	37
2.1.5. Heiße TCA Fällung und Szintillationsmessung	37
2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.1.7. SDS-PAGE.....	37
2.1.8. Enzyme.....	38

2.1.9.	<i>Medien</i>	38
2.1.10.	<i>Zelllinien</i>	39
2.1.11.	<i>Kits</i>	39
2.1.12.	<i>Plasmide</i>	39
2.1.13.	<i>DNA Primer</i>	40
2.1.14.	<i>Aptamere</i>	40
2.1.15.	<i>Verbrauchsgegenstände</i>	41
2.1.16.	<i>Geräte</i>	41
2.1.17.	<i>Softwares</i>	42
2.2.	<i>Methoden</i>	43
2.2.1.	<i>Generierung von linearen DNA-Templaten mittels Expressions-Polymerase-Kettenreaktion (E-PCR)</i>	43
2.2.2.	<i>Generierung von Expressionsplasmiden</i>	45
2.2.3.	<i>Restriktionsverdau</i>	45
2.2.4.	<i>Ligation</i>	45
2.2.5.	<i>Transformation der Plasmid DNA</i>	46
2.2.6.	<i>Kolonie-PCR</i>	46
2.2.7.	<i>Plasmidpräparation</i>	46
2.2.8.	<i>Analyse von Nukleinsäuren</i>	47
2.2.9.	<i>Zellfreie Proteinsynthese</i>	47
2.2.10.	<i>Zellfreie Proteinsynthese im Batch-Format</i>	48
2.2.11.	<i>Herstellung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen</i>	51
2.2.12.	<i>Herstellung von Suppressions-tRNA (tRNA^{Tyr}CUA und tRNA^{Py}ICUA)</i> ..	53
2.2.13.	<i>Zellfreie Synthese von modifizierten Proteinen durch die Einführung von nicht-kanonischen Aminosäuren</i>	54
2.2.14.	<i>Selektive Modifikation der reaktiven Gruppen der eingebauten nicht-kanonischen Aminosäuren</i>	54
2.2.15.	<i>Analyse der Einbaueffizienz von verschiedenen nicht-kanonischen Aminosäuren</i>	56
2.2.16.	<i>Analyse der ligandabhängigen Konformationsänderung des Adora2a</i> ...56	
2.2.17.	<i>Bestimmung der Proteinausbeute durch heiße TCA-Fällung</i>	57
2.2.18.	<i>Qualitative Protein Analyse durch SDS-PAGE und Autoradiographie</i>	58
2.2.19.	<i>Deglykosylierungs- und Protease-Assay</i>	58
2.2.20.	<i>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie</i>	58
3.	<i>Ergebnisse</i>	60
3.1.	<i>Analyse des Translationsprozesses des zellfreien Sf21-Systems</i>	60
3.1.1.	<i>Charakterisierung des aAPT und des cAPT</i>	60

3.1.2.	<i>Einfluss des aAPT und des cAPT auf die zellfreie Proteinsynthese</i>	61
3.1.3.	<i>Analyse der Spezifität des aAPT im eukaryotischen zellfreien System</i>	62
3.2.	<i>Zellfreie Synthese des komplexen GPCRs Endothelin-B-Rezeptors</i>	64
3.2.1.	<i>Synthese des ET-B-Rezeptors</i>	64
3.2.2.	<i>Translokation und Vesikelintegration des ET-B-Rezeptors</i>	65
3.3.	<i>Modifizierung von therapeutisch relevanten Proteinen durch Amber-Suppression</i>	67
3.3.1.	<i>Adressierung des Amber-Stopcodons</i>	69
3.3.2.	<i>Bioorthogonale Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die reaktive Gruppe der nkAs</i>	72
3.3.3.	<i>Proteinmodifikation und Funktionalitätsstudien auf Basis der Amber-Suppression</i>	78
3.4.	<i>Etablierung des PyIRS-AF/tRNAPyICUA-Paares im zellfreien CHO-System</i>	82
4.	<i>Diskussion</i>	89
4.1.	<i>Limitierungen und Anwendungen von Aptameren in zellfreien Systemen</i>	90
4.2.	<i>Analyse des ET-B-Rezeptors im zellfreien Sf21-System</i>	93
4.3.	<i>Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren durch Amber-Suppression</i>	97
4.4.	<i>Klickreaktionen und ihre Anwendung</i>	100
4.5.	<i>Etablierung des PyIRS-AF/tRNAPyICUA-Paares im zellfreien CHO-System</i>	107
5.	<i>Fazit</i>	112
6.	<i>Referenzen</i>	114
7.	<i>Anhang</i>	137
8.	<i>Lebenslauf</i>	139
9.	<i>Publikationen, Vorträge, Posterpräsentationen und Preise</i>	140

1. Einleitung

1.1. Inhalt der Arbeit

Die Bereitstellung von rekombinant hergestellten Proteinen ist sowohl in der wissenschaftlichen Forschung als auch für therapeutische Anwendungen essentiell. Aus diesem Grund wurden in den letzten drei Jahrzehnten Forschungsschwerpunkte auf die Entwicklung von universalen und optimalen Expressionssystemen gelegt. Heutzutage gibt es eine Vielzahl von zellbasierten Expressionssystemen auf der Basis von eukaryotischen und prokaryotischen Organismen, die eine Überexpression einer Vielzahl an therapeutisch relevanten Proteinen ermöglichen^{1,2}. Besonders die Klassen der Membranproteine³, toxischen Proteine⁴, bestimmte Wachstumsfaktoren⁵ sowie spezielle Enzyme⁶ stellen eine Herausforderung für zellbasierte Expressionssysteme dar, da die Erhaltung des Organismus durch die exprimierten Proteine negativ beeinflusst werden kann. Um die Erhaltung des Organismus umgehen zu können, wurden alternative Systeme entwickelt, die auf die Translationsmaschinerie, entkoppelt vom lebenden Organismus, zurückgreifen⁷. Diese sogenannten zellfreien Systeme beruhen auf einem Zellysat in welchem sämtliche Translationsfaktoren, Ribosomen, tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in einer aktiven Form vorliegen. Durch die Zugabe von Aminosäuren, Energie, einem Energie-Regenerationssystem und einem geeigneten DNA-Templat wird die Proteinsynthese innerhalb von wenigen Stunden ermöglicht. Spezialisierte eukaryotische zellfreie Systeme sind besonders für die Synthese von Membranproteinen und translozierten Proteinen geeignet, da durch einen milden Aufschluss endogene Membranstrukturen auf der Basis des Endoplasmatischen Retikulums erhalten werden können⁸⁻¹⁰. In diese sogenannten Mikrosomen können Membranproteine kotranslational integriert werden. Des Weiteren werden posttranslationale Modifikationen auf der Basis des ERs, wie Kernglykosylierungen, Lipidierungen, Disulfidverbrückung und Phosphorylierungen ermöglicht¹¹, welche essentiell für die Aktivität von Proteinen sein können. Neben der Synthese von sogenannten „schwerherstellbaren-Proteinen“ ist die ortsspezifische Modifizierung von Proteinen ein wichtiger Bestandteil sowohl in der *in vivo* als auch in der *in vitro* Produktion¹². Modifizierungen umfassen homogene Glykosylierungen und PEGylierungen zur Verbesserung der allgemeinen Proteinqualität insbesondere von Stabilität und Halbwertszeiten, sowie Fluoreszenzmarkierungen zur Durchführung von Interaktions- und Bindungsstudien.

Der Fokus in dieser Studie liegt auf der zellfreien Synthese und ortsspezifischen Modifizierung von schwerherstellbaren Proteinen auf Basis von *Spodoptera frugiperda* (Sf21)^{13,14}- und Chinesischen Hamster Ovarien (CHO)^{9,15}-Zellysaten. Für die Umsetzung wurde die Methodik der Amber-Suppression in Kombination mit bestehenden orthogonalen Systemen optimiert, sowie ein neues orthogonales System etabliert, um verschiedenste nicht-kanonische Aminosäuren mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen in das Zielprotein einzubauen. Die in dieser Studie etablierte Methode zur ortsspezifischen Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an das Zielprotein kann zukünftig für automatisierte Screening-Analysen von Interaktionspartnern und Liganden genutzt werden. Erste Resultate zu dieser Thematik wurden durch Quast et al.^{16,17} erzielt, auf denen die Optimierung des bestehenden orthogonalen Systems beruht.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden vier Teilbereiche adressiert:

Im ersten Abschnitt wurde die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige zellfreie Proteinsynthese des Sf21-Systems analysiert und modifiziert. Für diesen Zweck wurde ein *linked* System verwendet, in dem als Templat eine im Vorfeld transkribierte mRNA eingesetzt wurde. Durch die räumliche Trennung von Transkription und Translation wurde in der anschließenden Translation eine definierte Energiemenge in Form von ATP der Synthese zugeführt. Die Zugabe eines Anti-ATP-Aptamer ermöglichte eine Regulierung der zellfreien Proteinsynthese. Das Anti-ATP-Aptamer komplexiert spezifisch das Nukleotid ATP, wodurch freies ATP für die Verwendung in der Proteintranslation entfernt wurde. Der Einfluss des Aptamers auf die zellfreie Synthese wurde mit Hilfe des Modelproteins NanoLuziferase (Nluc) analysiert. Die erhaltenen Resultate sollen eine Möglichkeit aufzeigen, um die zellfreie Proteinsynthese zu regulieren und einzelne Moleküle gezielt zu analysieren.

Im zweiten Abschnitt wurde die zellfreie Synthese eines komplexen Proteins, des G-Proteingekoppelten Rezeptors Endothelin B, analysiert. Als DNA Templat wurde ein PCR-Produkt verwendet, welches die Gensequenz des ET-B Rezeptors, sowie ein C-terminal fusioniertes Gen für das Fluoreszenzprotein eYFP trägt. In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Synthesedauer auf die zellfreie Proteinsynthese des ET-B-eYFP-Rezeptors analysiert. Des Weiteren wurde die Integration in die mikrosomalen Membranen und die Orientierung des Membranproteins bestimmt. Zusätzlich wurden grundlegende biologische Prozesse wie die Translokation eines Membranproteins in endogene Membranen während der zellfreien Synthese analysiert, um im Folgenden eine Grundlage für die ortsspezifische Modifizierung von komplexen Membranproteinen und translozierten Proteinen zu etablieren.

Im dritten Abschnitt wurden zwei pharmazeutisch relevante Proteine, der G-Proteingekoppelte Adenosin-Rezeptor A2a (Adora2a), fusioniert an eine Nluc, sowie der Wachstumsfaktor Erythropoetin statistisch und ortsspezifisch in eukaryotischen zellfreien Systemen modifiziert. Die Modifizierung erfolgte durch zwei Methoden. Die erste befasste sich mit der Nutzung von kommerziell erhältlichen vorbeladenen tRNAs. Diese tRNAs wurden im Vorfeld chemisch an eine fluoreszenzmarkierte Aminosäure aminoacyliert und adressieren abhängig vom Anticodon der tRNA restespezifisch das Codon eines Phenylalanins oder ortsspezifisch das Amber-Stopcodon. Die zweite Methode befasste sich mit der Verwendung eines bereits etablierten orthogonalen Systems auf Basis einer modifizierten *E. coli* Tyrosin-tRNA-Synthetase^{18,19} sowie der passenden Suppressions-tRNA. Dieses System wurde optimiert und im Hinblick auf pharmazeutische Anwendungen wie der PEGylierung erweitert.

Im vierten Abschnitt wurde ein neues orthogonales System, welches auf der Verwendung einer modifizierten *Methanosarcina mazei* Pyrrolysin-Synthetase und der passenden Suppressions-tRNA beruht²⁰, entwickelt und optimiert. Mit diesem System können nicht-kanonische Aminosäuren mit neuen reaktiven Gruppen wie zum Beispiel Cyclooctine ortsspezifisch in das Zielprotein eingebaut werden. Durch die neuen reaktiven Gruppen wird das Repertoire an anschließenden kupfer-freien Klick-Reaktionen erweitert.

1.2. Zellbasierte Protein Produktion

In den letzten 15 Jahren wurden in den USA und in Europa über 100 neue Biopharmazeutika für den Markt zugelassen²¹. Für die bisher insgesamt 200 zugelassenen biologischen Stoffe wird ein Marktvolumen von 140 Millionen US Dollar²¹ geschätzt. Ein Großteil von diesen biologischen Stoffen sind rekombinant hergestellte Proteine. Die Verwendung von Proteinen für therapeutische Ansätze ist auf die Vielseitigkeit der Biomoleküle zurückzuführen, die in verschiedensten physiologischen Funktionen im menschlichen Körper involviert sind²². Proteine fungieren als Katalysatoren und Rezeptoren, bilden Transporter für Makromoleküle

und sind in der Verbreitung von Zellsignalen, der Zelladhäsion und dem Zellzyklus, sowie in der Immunantwort involviert²³.

Die *in vivo* Herstellung von rekombinanten Proteinen wurde durch zwei entscheidende Faktoren in den letzten 40 Jahren drastisch verbessert: zum einen durch die Einführung von rekombinanten DNA Technologien, die 1973 im ersten *in vitro* synthetisierten Plasmid resultierte²⁴ und zum anderen durch die Fortschritte in der Zellkultivierung durch die Verwendung von Zelllinien-spezifischen Medien²⁵. Heutzutage basieren weit verbreitete Protein-Produktions-Systeme auf kultivierten Bakterien-, Hefen-, Pilzen-, Algen-, Insekten- und Säugetierzellen²⁶.

1.2.1. Prokaryotische Expressionssysteme

Weniger komplexe therapeutische Proteine werden hauptsächlich in *E. coli* basierten Expressionssystemen hergestellt und besitzen einen Marktanteil von ca. 30 %²⁷. *E. coli* basierte Expressionssysteme zeichnen sich durch eine hohe Produktivität bei niedrigen Kultivierungskosten aus²⁸. Des Weiteren sind kommerziell erhältliche Vektoren für eine Transformation in *E. coli* verfügbar, wodurch die Gensequenz des Zielproteins in den Organismus eingebracht werden kann²⁹. Das erste funktionsfähige rekombinante humane Protein wurde 1977 in *E. coli* hergestellt³⁰. Das Peptidhormon Somatostatin, inhibiert die Bildung des Wachstumshormones Somatotropin in der Hypophyse. 5 Jahre später folgte die Produktion von humanen Insulin ebenfalls in *E. coli*³¹. Limitierend in prokaryotischen Expressionssystemen ist die Synthese von komplexen humanen Proteinen³². Aufgrund der fehlenden Zellorganellen, wie Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat, sind posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Disulfidverbrückungen begrenzt bzw. mit Zusätzen möglich³³. Das Fehlen von endogener Protein-Disulfidisomerase im Zytoplasma und der damit fehlenden Ausbildung von Disulfidbrücken resultiert oftmals in fehlgefalteten Proteinen, die in Proteinaggregaten akkumulieren können³⁴. Um deren natürliche und aktive Konformation zu rekonstituieren, sind oftmals aufwendige Faltungsprozeduren und Löslichkeitsprotokolle nötig. Diese Prozeduren können jedoch in einer drastischen Verringerung der Proteinausbeute und im Verlust von aktiven Proteinen resultieren³⁵. Die Ausbildung von Disulfidbrücken konnte in einem speziell genetisch veränderten *E. coli*-Stamm in Gegenwart von reduzierenden Bedingungen erreicht werden^{36,37}. Ein weiterer Nachteil einer Proteinproduktion in *E. coli* ist das Vorhandensein von Endotoxinen. Lipopolysaccharide, Bestandteile in der bakteriellen Zellmembran, werden durch den Toll-like Rezeptor 4 erkannt und können eine inflammatorische Signalkaskade im menschlichen Körper auslösen³⁸. Endotoxine können entweder durch Ultrafiltration, Detergenzbehandlung oder Austauschchromatographie entfernt werden³⁹. Eine weitere Alternative wurde durch die Etablierung einer genetisch veränderten Lipopolysaccharid-freien bakteriellen Zelllinie geschaffen³⁸.

1.2.2. Eukaryotische Expressionssysteme

Um die gelisteten Limitierungen der Proteinproduktion in prokaryotischen Organismen zu umgehen, liegt heutzutage der Fokus auf der Entwicklung von eukaryotischen Expressionssystemen. Die am häufigsten verwendeten Expressionssysteme nutzen kultivierte Säugetier- und Hefezellen. Jedes dieser Systeme besitzt eigene Herausforderungen, aber auch Vorteile in der Proteinexpression. Expressionssysteme basierend auf *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* Zellen zeichnen sich durch eine preisgünstige Kultivierung aus^{40,41}. Es können Einzelkopien oder Mehrfachkopien des Gens des Zielproteins in das

Genom der jeweiligen Hefe integriert werden⁴². Im Vergleich zu *E. coli* basierten Translationssystemen ist zwar eine geringere Auswahl an Vektoren und Promotoren vorhanden, jedoch ermöglichen Hefen posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen, die essentiell für die Funktionalität und Stabilität der Zielproteine sein können⁴⁰. Im Vergleich zu komplexen humanen Glykosylierungen ermöglichen Hefezelllinien eine Hyper-Mannosylierung, die allergische Reaktionen im menschlichen Körper auslösen können⁴³. Um die Hyper-Mannosylierung zu einer human-ähnlichen Mannose-reduzierten Form zu trimmen, können Mannosyltransferase-Gene im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi der Hefen ausgeschaltet werden⁴⁴. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Deletion der Mannosyltransferasen Cellulasen mit einem Tri-Mannose-Kern glykosyliert werden, der wiederum die Grundlage für komplexe Glykosylierungen bilden kann. Die Proteinexpression der Cellulasen konnte durch diesen Schritt zusätzlich verbessert werden⁴⁵. Neben der nicht-humanen Glykosylierung ist eine limitierte Sekretion von bestimmten Zielproteinen in Hefezellen beschrieben, wodurch die Zielproteine in der Zelle verbleiben und häufig nur mit aufwendigen Isolationsprozessen erhalten werden können²⁶. Durch die Identifikation und Veränderung von spezifischen Genen konnte die Sekretion einer α -Amylase wesentlich verbessert werden²⁶. Aus diesen Gründen liegt gegenwärtig der Fokus auf der Entwicklung von Säugetier-Expressionssystemen. Die Entwicklung von Zelllinien auf der Basis von Säugetierzellen begann bereits in den 1960er-Jahren mit der Einführung von HeLa, CHO und 3T3 Zelllinien. Dieses Spektrum wurde im Laufe der Jahre um BHK-, HEK293- und viele weitere Zelllinien erweitert⁴⁶. Das prominenteste Produktionssystem basiert auf einer immortalisierten Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters, in dem gegenwärtig 70 % aller therapeutischen Proteine hergestellt werden⁴⁷. Im Allgemeinen weisen Säugetierzelllinien eine passende Umgebung für die Produktion von komplexen Proteinen mit einem human-ähnlichen Glykosylierungsmuster auf⁴⁸. Aufgrund der Komplexität der Säugetierzellen erfordert die Proteinproduktion eine Adaptierung der jeweiligen Zelllinie an definierte Kultivierungsbedingungen und an ein Serum-freies, komplexes Medium, um die Produktqualität aufrecht zu erhalten sowie „Batch-to-Batch-Variationen“ einzuschränken, wodurch die Proteinproduktion aufwendiger und kostenintensiver wird⁴⁹. Die Einführung des Zielgens in das Genom einer Säugetierzelle ist im Vergleich zu Bakterien und Hefen aufgrund der natürlichen Resistenz gegen Fremd-DNA und der Dezentralisierung von Transkription und Translation erschwert. Des Weiteren ist die Selektion von Klonen und die Erhaltung der transfektierten Zelllinien aufwendig und kostenintensiv²⁶. Durch die Entwicklung von neuen Gen-Editierungsmethoden wie z. B. CRISPR/Cas können Gene gezielt eingefügt, entfernt oder ausgeschaltet werden, wodurch die Einbringung eines Zielgens stark erleichtert wurde^{50,51}. So wurde zum Beispiel die Fucosyltransferase 8 (FUT8) in CHO-Zellen ausgeschaltet⁵². Das Vorhandensein von Fucose in der Glykosylierung, welches in einer α -1,3-Verknüpfung vorliegt, kann zu allergischen Reaktionen führen. Durch das Ausschalten des FUT8-Gens konnte gezeigt werden, dass Antikörper, die in diesen CHO-Zellen produziert worden sind, eine verbesserte Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität aufweisen. Ein weiterer Unterschied im Glykosylierungsmuster von Proteinen, die in CHO-Zellen produziert wurden, liegt in der Verknüpfung der Sialinsäuren. Humane Glykosylierungen zeichnen sich durch eine α -2,6-Sialisierung aus, eine Verknüpfung, die in CHO-Zellen nicht produziert werden kann. Die Überexpression von Glykosyltransferasen wie z. B. der α -2,6-Sialyltransferase, ermöglicht in diesem Zusammenhang eine weitere Anpassung des Glykosylierungsmuster. Für das Hormon Erythropoetin konnte der Anteil an Sialinsäuren um 26 % erhöht werden, wodurch die Stabilität des Hormons verbessert werden konnte⁵³.

1.2.3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Da ein Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit auf der Synthese von Membranproteinen, im Besonderen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) liegt, werden GPCRs in diesem Abschnitt gesondert betrachtet. Membranproteine sind in jeder biologischen Membran vorhanden und können unterteilt werden in integrale Membranproteine, welche die Lipiddoppelschicht der Membran durchspannen, und periphere Membranproteine, welche an eine Seite der Membran assoziiert sind⁵⁴. Aufgrund der Omnipräsenz in sämtlichen Zellen und den unterschiedlichsten Funktionen als Transporter, Kanäle, Enzyme und Rezeptoren ist es nicht verwunderlich, dass Membranproteine durch zirka 30 % des humanen Genoms kodiert werden⁵⁵ und 50 % aller pharmazeutischen Medikamente Membranproteine adressieren⁵⁶. Eine der größten Unterklassen der Membranproteine sind GPCRs, welche durch ca. 800 verschiedene Gene kodiert werden⁵⁷ und in 5 weitere Untergruppen abhängig von ihrer Sequenz und Funktion unterteilt werden können. Man unterscheidet die Rhodopsin-, Glutamat-, Sekretin-, Adhäsion-, und die Frizzled/Taste2-Rezeptor-Familie (Abbildung 1).

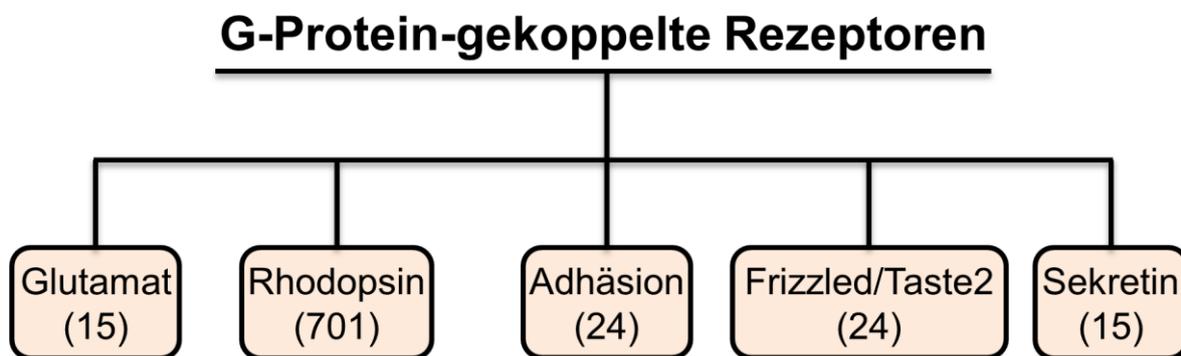


Abbildung 1. Übersicht der GPCR-Familie. Dargestellt sind die fünf Untergruppen von GPCRs. Die Anzahl der jeweiligen Mitglieder einer Untergruppe ist in Klammern angegeben. Modifiziert nach⁵⁸

Rhodopsin-Rezeptoren stellen hierbei die am besten charakterisierte Klasse dar, da sie mit über 700 Vertretern auch die am häufigsten vorkommenden Rezeptoren sind. Aufgrund der hohen Anzahl an Rhodopsin-Rezeptoren sind die Proteine dieser Klasse sehr heterogen in ihrer Struktur. Konservierte Motive lassen sich in der Transmembrandomäne 3 (E/DRY-Motiv⁵⁹), 6 (CWxP-Motiv⁶⁰) und 7 (NPxxY-Motiv⁶¹) finden. Darüber hinaus sind diese GPCRs zumeist durch eine Disulfidbrücke gekennzeichnet, die den ersten und dritten extrazellulären Loop mit einander verbindet⁶². Zu den Rhodopsin-Rezeptoren gehören pharmazeutisch relevante Targets, wie z. B. Serotonin- und Dopamin-, Opioid-, Somatostatin-, Angiotensin- und olfaktorische Rezeptoren, sowie die in dieser Arbeit betrachteten Endothelin und Adenosin-Rezeptoren⁶³. Sekretin-Rezeptoren sind besonders in der Regulierung des Hormonhaushaltes involviert und durch eine lange N-terminale Domäne (120-160 Aminosäurereste) gekennzeichnet, die mit peptidbasierten Liganden interagiert⁶⁴. Glutamat-Rezeptoren werden durch Neurotransmitter, Glutamat und GABA, aktiviert. Darüber hinaus sind sie im Empfinden der Geschmäcker süß und Umami, sowie in der Regulation von Kalzium-Rezeptoren involviert⁶⁵. Gekennzeichnet sind Glutamat-Rezeptoren durch eine extrazelluläre Venus Fliegenfalle-Domäne, eine zweilappige Struktur, in deren Öffnung sich die Bindungsstelle befindet⁶⁵. Adhäsions-Rezeptoren erkennen hauptsächlich Zellmembran- und extrazelluläre Matrixproteine, aber auch Polysaccharide, Fettsäuren, sowie Phospho- und Glykolipide. Ein besonderes Merkmal von Adhäsions-GPCRs ist eine große extrazelluläre Domäne, die aus 300-6000 Aminosäureresten bestehen kann und spezifische Bindemotive für Interaktionspartner, wie z. B. den epidermalen Wachstumsfaktor, aufweisen kann⁶⁶. Darüber

hinaus zeichnet sich diese Rezeptorklasse durch eine einzigartige autoproteolytisch-induzierte Domäne (GAIN) aus, die in der Spaltung der großen extrazellulären Domäne resultiert. Durch eine heterologe Zusammenlagerung von extrazellulärer Domäne und einem C-terminalen Fragment wird eine hohe strukturelle und funktionelle Diversität der Rezeptorklasse ermöglicht⁶⁷. Die Homologie der Frizzled-Rezeptor-Familie, im Vergleich zu den anderen GPCR-Familien, ist beschränkt auf das Vorhandensein der sieben Transmembrandomänen. Zusätzlich konnte ein konserviertes Motiv (KTXXXW) gefunden werden, welches eine nahe Verwandtschaft zu den Geschmacksrezeptoren (Taste2) aufweist⁶⁸. Frizzled-Proteine sind in der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges involviert⁶⁹, Taste2-Rezeptoren in der Empfindung der Geschmacksrichtung bitter⁷⁰.

Trotz der individuellen Charakteristika der verschiedenen Klassen von GPCRs, sind diese Proteine im Allgemeinen durch 7 Transmembrandomänen mit jeweils drei extra- und intrazellulären Loops gekennzeichnet sowie einem vergleichbaren Mechanismus der Aktivierung⁷¹. Nach Bindung eines Liganden an den extrazellulären Bereich des GPCRs erfolgt eine strukturelle Änderung der intrazellulären Bereiche. Davon betroffen ist das Ende der TM6, welche nach der Bindung des Agonisten in Richtung TM5 rotiert^{72,73}. Diese Rotation wird durch das Auflösen der ionischen Interaktion des E/DRY-Motivs am Ende der TM3 mit dem Ende der TM6 erreicht^{74,75}. Durch die Konformationsänderung der intrazellulären Bereiche wird das Koppeln und somit die Aktivierung der G-Proteinen ausgelöst⁷⁶. G-Proteine bestehen aus einer $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit⁷⁷. Die $G\alpha$ -Untereinheit besitzt im inaktivierten Zustand ein gebundenes GDP, welches nach der GPCR-Aktivierung freigesetzt und durch GTP ersetzt wird. Zusätzlich dissoziieren die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von der $G\alpha$ -Untereinheit, wodurch die G-Proteine im aktiven Zustand vorliegen und Effektormoleküle wie Kalzium, Kaliumkanäle, Adenylatzyklasen, Phospholipasen A_2 , C(- β), Phosphoinositid-3-Kinase und Proteinkinasen regulieren⁷⁸. Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt über die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP⁷⁷. Das einfachste Modell um die Kinetik der Aktivierung eines GPCRs zu beschreiben ist das „Zwei-Zustände-Modell“. In diesem Modell wird angenommen, dass der GPCR hauptsächlich in zwei Zuständen, dem inaktiven Zustand (R) und dem aktiven Zustand (R*) vorliegt. In Abwesenheit eines Liganden wird die basale Aktivität eines GPCRs aus dem Äquilibrium zwischen R und R* bestimmt. Die Effektivität eines Liganden wird anhand dieses Modells, das Äquilibrium entweder in den R- oder R*-Status zu verschieben, beschrieben⁷⁹. Studien zeigen zusätzlich, dass neben der aktiven und inaktiven Form intermediäre Konformationen von GPCRs nachweisbar sind, die einen höchst dynamischen Prozess der Ligandbindung bis zur Signalwegaktivierung ermöglichen^{80,81}. Nichtsdestotrotz sind heutzutage die Liganden von ca. 100 GPCRs sowie deren Funktion unbekannt. Diese *orphan* Rezeptoren sind besonders für therapeutische Zwecke interessant, da sie neue Targets für die Entwicklung und Adressierung von Medikamenten darstellen⁸². Die Identifikation von Liganden erfolgte zumeist über die Expression des jeweiligen *orphan* Rezeptors in einem zellbasierten System und der Zugabe von großen Liganden-Bibliotheken im Hochdurchsatzverfahren⁸³. Neuere Methoden basieren auf den Fortschritten in der Strukturaufklärung von GPCRs. Durch die Entwicklung von optimierten Kristallisationsprozeduren, wie z. B. der Kristallisation in einer Lipid-Mesophase⁸⁴ und der Femto-Sekunde-Kristallisation⁸⁵, sowie der Stabilisierung der Zielproteine durch die Einführung von Mutationen und der Konstruktion von Fusionsproteinen, konnten in den letzten Jahren 100 Strukturen von 46 verschiedenen GPCRs in unterschiedlichen Konformationen aufgeklärt werden^{58,86}. Durch die erhaltenen Kristallstrukturen konnte der Fokus zur Identifikation von Liganden auf virtuelle Ligand-Screening Methoden gelegt werden⁸⁷. Nach wie vor ist jedoch die Problematik der Expression von GPCRs in ausreichenden Mengen

gegeben. Daher soll im nächsten Abschnitt die Herstellung von GPCRs in zellbasierten Systemen betrachtet werden.

1.2.4. Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

GPCRs sind besonders in die Übertragung von extrazellulären Signalen, ausgelöst durch Duftstoffe, Licht, Peptide, Neurotransmitter, Hormone und kleine Moleküle, über die Membranbarriere in den intrazellulären Raum involviert⁸⁸. Gerade durch anschließende Signalkaskaden, welche die Zellproliferation aber auch den Zelltod stimulieren können, ist eine Überexpression von GPCRs in lebenden Zellen kritisch, da zytotoxische Nebeneffekte auftreten können⁸⁹. Um diese zu umgehen, können induzierbare Expressionssysteme verwendet werden⁹⁰. Die Induktion kann durch externe Faktoren wie Veränderung der Temperatur und Addition von Chemikalien erfolgen⁹¹. Durch die natürlich vorkommende geringe Konzentration an Membranproteinen in der Zellmembran ist eine *in vivo* Produktion und die anschließende Isolation aufwendig und kostenintensiv⁹². Des Weiteren kann eine Überexpression von Membranproteinen die Integrität der Plasmamembran stören⁹³. Durch die natürlich vorhandenen, hydrophoben Transmembrandomänen tendieren Membranproteine zur Aggregation, was in einer Fehlfaltung und einem Verlust der Funktion resultieren kann. Nur wenige GPCRs konnten aus Proteinaggregaten korrekt rückgefaltet werden^{94,95}. Ein wesentlicher Unterschied zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Expressionssystemen liegt in der Elongationsrate der Polypeptidkette. Während in *E. coli* zirka 10-20 Aminosäuren pro Sekunde an die Polypeptidkette angefügt werden, liegt dieser Wert in eukaryotischen Systemen im Bereich von 3-8 Aminosäuren. Für eine geringere Elongationsrate konnte eine bessere Faltung der synthetisierten Proteine identifiziert werden⁹⁶. Für eine korrekte Faltung können wiederum spezifische Chaperone nötig sein, die im ausgewählten Expressionssystem in niedrigen Konzentrationen oder gar nicht vorliegen. Besonders in prokaryotischen Expressionssystemen ist eine korrekte Faltung problematisch, da keine spezifischen G-Proteine oder Interaktionspartner für GPCRs vorhanden sind, die die Faltung unterstützen können^{97,98}. Als Alternative können Proteine, wie das hochlösliche Maltose-Bindeprotein⁹⁹ oder Proteine der äußeren *E. coli*-Membran (OmpF)¹⁰⁰ an das Zielprotein fusioniert werden, wodurch die Aggregatbildung des Zielproteins reduziert werden kann¹⁰¹. Darüber hinaus kann das MBP aufgrund der spezifischen Bindung zu Amylose als Isolationstag eingesetzt werden¹⁰². Zusätzlich unterscheiden sich die Membranen der einzelnen Expressionssysteme in ihrer Lipidzusammensetzung. Die Stabilisierung der Membran wird in Säugetierzellen unter anderen durch Cholesterin unterstützt, ein Steroid, welches in Membranen von Hefen durch Ergosterol ersetzt wird. Insektenzellen besitzen eine geringere Konzentration an Cholesterin in ihrer Membran und *E. coli* weist keinerlei Cholesterin auf¹⁰³.

Eine weitverbreitete Strategie in der Überexpression von GPCRs nutzt rekombinante Viren, da diese zum einen sehr effektiv ihr Genmaterial in die Zelle einschleusen können und effiziente Promotoren für eine hohe Proteinexpression besitzen¹⁰⁴. Auf Insektenzell-Basis ist hier das Baculovirus-Expressionssystem zu nennen¹⁰⁵. Mehr als 80 Kristallstrukturen von GPCRs konnten mit Hilfe einer Synthese im Baculovirus-Expressionssystem gelöst werden¹⁰⁶. Auch in Säugetierzell-Expressionssysteme kommen rekombinante Viren zum Einsatz. Besonders zu beachten ist hier jedoch, dass das Virus zwar die Zielzelle infizieren, sich aber nicht in dieser replizieren kann¹⁰⁷. Diese Kriterien erfüllt das *Semliki Forest Virus* (SFV), welches bei Nagetieren vorkommt, aber keine Symptome beim Menschen auslöst. Mit Hilfe des SFV Expressionssystems konnten mehr als 100 verschiedene GPCRs exprimiert

werden¹⁰⁸. Trotz der Erfolge in der GPCR-Produktion verbleibt häufig ein großer Anteil der hergestellten Polypeptidkette im ER als fehlgefaltetes und nicht-funktionsfähiges Protein¹⁰⁹. Für den Vasopressin-Rezeptor wurde z. B. nur ein Anteil von 0,005 % als aktiver GPCR bestimmt¹¹⁰. Darüber hinaus ist das SFV Expressionssystem im Vergleich zu Hefe- und bakteriellen Expressionssystemen teuer und aufwendig. Vor allem die Herstellung von hohen Mengen an RNA für die Virusproduktion ist kostenintensiv. Außerdem verlangen viele Staaten, dass aufgrund des verwendeten Virus im Sicherheitsbereich der Stufe 2 gearbeitet wird¹⁰⁹.

Aufgrund der gelisteten Limitationen bei der Synthese von Membranproteinen sowie den angeführten Problemen bei der Synthese von posttranslationalen Modifikationen, besonders im Hinblick auf Glykosylierungen, werden alternative Proteinsynthesemethoden auch weiterhin entwickelt. Ein bereits etabliertes System ist die zellfreie Proteinsynthese, die im nächsten Abschnitt näher betrachtet wird.

1.3. Zellfreie Proteinsynthese

Die Grundlage der zellfreien Proteinsynthese (ZFPS) wurde bereits in den 1960er-Jahren von Matthaei und Nirenberg geschaffen¹¹¹. Der damalige Fokus lag auf der Untersuchung des Proteintranslationsprozesses in *E. coli*. Aufbauend auf dieser Forschung wurden, neben dem erwähnten prokaryotischen System, verschiedenste eukaryotische Zellfreisysteme entwickelt. Zu diesen gehören Protozoen-, Pilz (*Saccharomyces cerevisiae*)-, Pflanzen (Weizenkeim, Tabak BY-2)-, Insekten (*Spodoptera frugiperda* 21)- und Säugetier (Kaninchen Retikulozyten, Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters, HEK293, HeLa)-basierte zellfreie Systeme¹¹². Trotz des unterschiedlichen Ursprunges, basiert jedes System auf translationsaktiven Zelllysaten, welche die komplette Translationsmaschinerie enthalten und somit eine Proteinsynthese ermöglichen. Für die Zelllysatzgewinnung werden ausgewählte Zelllinien fermentiert und bei einer definierten Zelldichte aufgeschlossen. Während der Zellkern, Zelltrümmer sowie endogene RNA entfernt werden, bleiben essentielle Bestandteile für die Proteinsynthese wie z. B. Ribosomen, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Translationsfaktoren und Chaperone erhalten¹¹. Der erhaltene Zellextrakt wird anschließend mit Energie in Form von ATP und GTP, einem Energie-Regenerationssystem und Aminosäuren ergänzt. Die Zugabe des Nukleinsäure-Templates kann als zirkuläre oder lineare DNA („gekoppelt“)^{113,114} oder als im Vorfeld transkribierte mRNA (*linked*)¹¹⁵ erfolgen. Im *linked* Modus wird die Translation durch einen Gelfiltrationsschritt von der Transkription getrennt, wodurch eine Einstellung der optimalen Parameter wie Temperatur, Pufferbedingungen und Salzkonzentration ermöglicht wird¹⁴. Das allgemeine Prinzip der ZFPS ist in Abbildung 2 dargestellt.

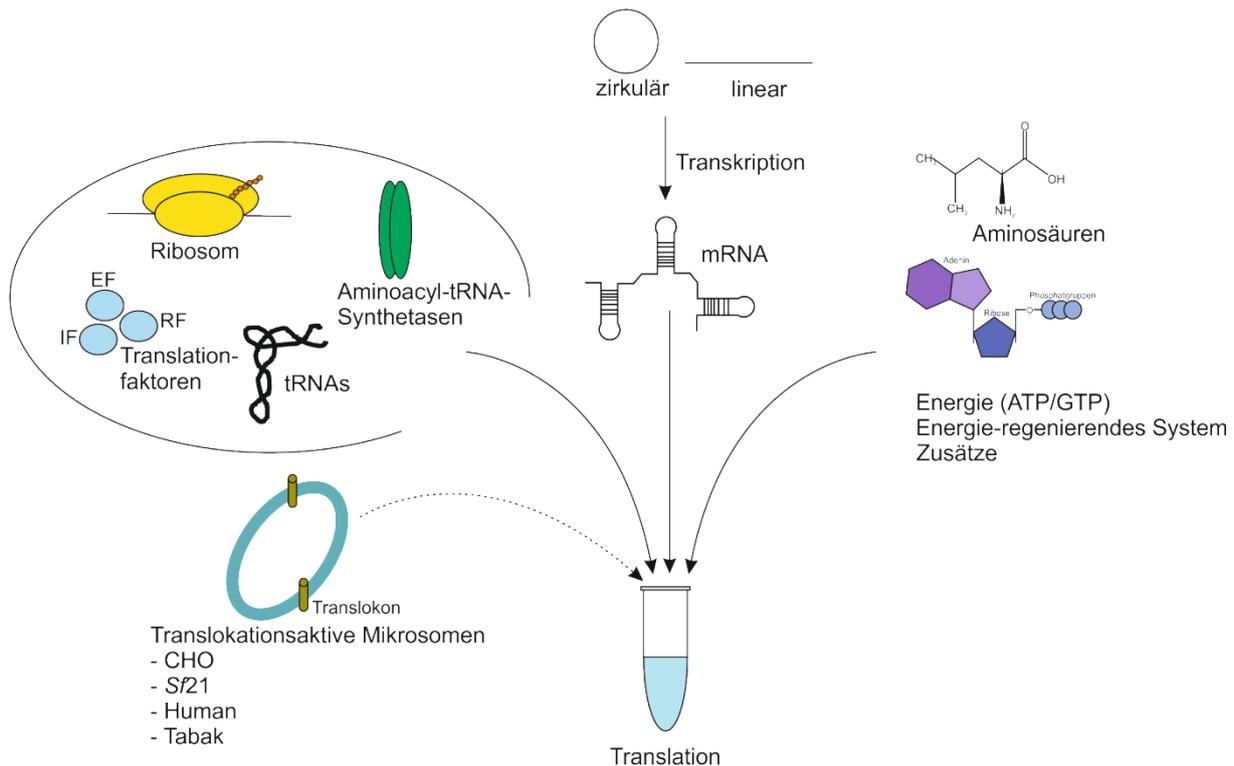


Abbildung 2. Prinzip der zellfreien Proteinsynthese. Dargestellt sind die Bestandteile einer Batch-basierten zellfreien Reaktion. Diese beinhalten ein translationsaktives Lysat prokaryotischen oder eukaryotischen Ursprungs, ein DNA-Templat in zirkulärer oder linearer Form, Aminosäuren, sowie Energie und ein Energie-Regenerationssystem. In bestimmten eukaryotischen Zellysaten wie z. B. in CHO-, Sf21-, Human- und Tobacco-basierte zellfreien Systemen liegen endogene Membranstrukturen vor, die eine kotranslationale Integration von Membranproteinen ermöglicht. Modifiziert aus¹¹²

Der einfachste Reaktionsmodus, eine sogenannte „Eintopf-Reaktion“ (Batch), in dem sämtliche Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben werden, zeichnet sich durch eine schnelle Proteinsynthese von wenigen Stunden aus⁷. Die Proteinausbeute ist jedoch limitiert, da Energiekomponenten aufgebraucht werden und inhibitorische Phosphate akkumulieren¹¹⁶. Durch die Korrelation der Produktivität der Proteinsynthese und der Langlebigkeit der Reaktion wurden Reaktionsverfahren entwickelt, die dem Verbrauch der Energiekomponenten entgegenwirken, sowie akkumulierende inhibitorische Phosphate kontinuierlich entfernen¹¹⁷. Diese Dialyse-Systeme bestehen aus zwei Kammern: einer Reaktionskammer, die vergleichbar mit der Batch-Reaktion ist, sowie einer Versorgungskammer, durch welche die Batch-Reaktion kontinuierlich mit frischen Komponenten wie Energie, Aminosäuren und Salzen beliefert wird (*continuous-exchange cell-free system*, CECF)¹¹⁸. Die beiden Kammern sind durch eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von 10 kDa getrennt, wodurch die Zufuhr von frischen Komponenten ermöglicht wird, das Zielprotein jedoch in der Reaktionskammer verbleibt. Mit Hilfe des Dialyse-Verfahrens konnte die Proteinsynthese von ca. zwei Stunden auf mehrere Tage verlängert werden¹¹⁹.

1.3.1. Zellfreie Proteinsynthese in prokaryotischen Zellextrakten

In prokaryotischen zellfreien Systemen wurden durch das CECF-System Proteinausbeuten von mehreren mg/ml erreicht⁷. Besonders in prokaryotischen Zellfreisystemen fokussiert sich die Entwicklung auf preisgünstigere Energie-Regenerationssysteme. Während der Proteinsynthese werden energiereiche Moleküle wie ATP und GTP für die mRNA Synthese, die Beladung von Aminoacyl-tRNAs und die Aktivierung von Translationsfaktoren benötigt.

Darüber hinaus arbeiten Proteine wie Helikasen und Chaperone ATP-abhängig¹²⁰. Für eine effiziente Energieregeneration wurde zu Beginn das energiereiche Anion der Phosphoenolbrenztraubensäure (PEP) eingesetzt, dessen Phosphatgruppe durch die Pyruvatkinase auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen wird und in der Bildung von ATP resultiert¹¹³. Durch einen rapiden Abbau von PEP zu Pyruvat und anorganischem Phosphat eignete sich dieses energiereiche Molekül nur bedingt zur Energiebereitstellung, sodass ein weiteres Regenerationssystem auf Basis von Glukose-6-phosphat entwickelt wurde¹¹⁶. Nach pH-Stabilisierung und einer Anpassung der Phosphatkonzentration konnten mit diesem System vergleichbare Proteinausbeuten erzielt werden, während die relativen Produktkosten um den Faktor 2,2 verringert wurden¹²¹. Um die Qualität der Proteinsynthese weiterhin zu verbessern, wurden gereinigte Komponenten aus *E. coli* für die Transkription und Translation eingesetzt¹²². In diesem PURE (*protein synthesis using recombinant elements*) System wurden ausgewählte Komponenten so modifiziert, dass sie gezielt aus der Translationsreaktion entfernt werden können. Zum Beispiel wurde der Terminationsfaktor 1 (RF1) entfernt, welcher durch die Bindung an das Amber-Stopcodon die Translation beendet¹²². Durch die Reduktion des RF1 konnte ein effizienter Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure am Amber-Stopcodon in das Zielprotein erreicht werden¹². Dieser Ansatz wurde erweitert durch die genetische Veränderung des *E. coli* Stamms C321.ΔA, in welchem die 321 vorkommenden Amber-Stopcodons zu ochre-Stopcodons umgebaut wurden¹²³. Mit dieser Methode konnte die nicht-kanonische Aminosäure p-Acetyl-L-Phenylalanin an bis zu 40 Amber-Stopcodon Positionen in ein Elastin-ähnliches Polypeptid eingebaut werden¹²⁴. Darüber hinaus wurde die Methode der Amber-Suppression genutzt, um z. B. ein N-Acetylglucosamin-Zucker an eine eingeführte Azid-Gruppe zu koppeln, um Limitierungen in posttranslationalen Modifikationen in *E. coli* zu umgehen¹²⁵. Besonders das Fehlen von natürlichen Membranen schränkt die Fähigkeit von posttranslationalen Modifikationen in prokaryotischen zellfreien Systemen ein¹²⁶. Dies ist besonders für die Herstellung von Membranproteinen kritisch, da die fehlenden natürlichen Membranen durch membran-ähnliche Strukturen in Form von Mizellen-bildenden Detergenzien, Liposomen, Nanodiscs oder exogene Mikrosomen ersetzt werden müssen^{127,128}. Mit Hilfe der erwähnten Zusätze kann die Präzipitation des Zielproteins sowie ein Re-Solubilisierungsprozess, der die Proteineigenschaften negativ beeinflussen kann, vermieden werden¹²⁹. Für Detergenzien wie 4,4'-Diaminodiphenylmethan (DDM), Triton X-100, sowie Brij- und Tween-Derivate konnte gezeigt werden, dass kein negativer Einfluss auf die Proteinsynthese vorliegt und eine Mizellbildung bei einer definierten Konzentration induziert werden kann¹³⁰. Durch synthetische Membranen wie Nanodiscs und Liposomen konnte die Proteinfaltung und Funktionalität von Membranproteinen ebenfalls verbessert werden. Die zufällige Einbettung der Membranproteine in Nanodiscs bzw. die passive Integration in Liposomen ermöglicht eine Adressierung extrazellulärer als auch intrazellulärer Domänen, wodurch Interaktionspartner identifiziert werden können. Für die Analytik von richtungs-abhängigen Prozessen wie z. B. der Transport von Ionen und kleinen Molekülen durch Ionenkanäle und Transporter in der Lipid-Doppelschicht, sind Nanodiscs und Liposomen begrenzt geeignet, da nicht alle synthetisierten Proteine die passende Orientierung aufweisen¹³¹. Während viele zellfreie Reaktionen im kleinen Maßstab angesetzt und für analytische Zwecke genutzt werden, konnte ein zellfreies *E. coli*-System erstmalig bis zu einem für die industrielle Produktion geeigneten Maßstab skaliert werden. Das disulfidverbrückte Protein GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 L mit einer Konzentration von 700 mg/l produziert¹³².

1.3.2. Zellfreie Proteinsynthese in eukaryotischen Zellextrakten

Trotz der höheren Kultivierungskosten und der im Vergleich zu prokaryotisch basierten zellfreien Systemen geringeren Proteinausbeuten werden für die Synthese von komplexen humanen Proteinen eukaryotische zellfreie Systeme bevorzugt¹³³. Während jedes der im Abschnitt 1.2 erwähnten Systeme Vorteile und Nachteile bietet, hängt die Wahl des Systems vom Ursprung und den Eigenschaften des jeweiligen Proteins ab⁷. Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich aufgrund ihrer kosteneffizienten Kultivierung, der hohen Produktivität und der Fähigkeit korrekt gefaltete und posttranslational modifizierte Proteine zu synthetisieren¹³⁴, als Ausgangsmaterial für ein ZFPS System. Bereits in den 1970er wurde ein solches System etabliert¹³⁵, welches als Grundlage für die detaillierte Analyse der Cap-abhängigen und Cap-unabhängigen Translationsinitiation diente¹³⁶. Durch Optimierungsprozesse in den Kultivierungsbedingungen¹³⁷, der Extraktpräparation¹³⁸, in der Generierung des Templates¹³⁹, der Energieversorgung, sowie der Entfernung von inhibitorischen Nebenprodukten¹⁴⁰ konnte ein robustes und leistungsfähiges ZFPS System entwickelt werden mit Ausbeuten im µg/ml Bereich. Parallel wurden ZFPS Systeme auf der Basis von translational aktiven Pflanzenextrakten entwickelt. Bereits 1973 entdeckten Roberts und Paterson eine effiziente Translation von *Tobacco mosaic Virus* mRNA und beschrieben die Hasen Globin 9S RNA Translation in Weizenkeimen¹⁴¹. Die Anpassung von Magnesium, Kalium und der Aminosäure-Konzentration sowie der Supplementierung eines Energie-Regenerationssystems und Spermidin resultierte in einer Steigerung der Produktivität des ZFPS Systems^{142,143}. Durch die Nutzung des Dialyse-Systems können derzeit im zellfreien Weizenkeimsystem Proteinausbeuten im mg/ml-Bereich erreicht werden, wodurch das System konkurrenzfähig zu zellfreien *E. coli*-Systemen ist¹⁴⁴. Ein Nachteil findet sich in der aufwendigen Lysatproduktion, die mehrere Waschschriffe benötigt, um die inhibitorischen Effekte von Nukleasen und Proteasen im Endosperm der Weizenkeim-Embryonen zu minimieren¹⁴⁵. Darüber hinaus, ähnlich zu *E. coli*-basierten Systemen, sind posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen, nicht möglich¹⁴⁶. Ein zweites pflanzenbasierte zellfreie System wurde in den letzten Jahren auf Basis von Tabak BY-2 Zellen entwickelt^{147,148}. Dieses System zeichnet sich durch eine vereinfachte, in wenigen Stunden durchführbare, Lysatpräparation aus. Erste Studien zeigen die erfolgreiche Synthese eines glykosylierten, disulfidverbrückten und aktiven Vollängenantikörpers¹⁴⁹. Weitere Analysen von komplexen Proteinen sowie Optimierungsprozesse und Hochskalierungen des BY-2 Systems sind essentiell. Wie in 1.1.5 erwähnt, zeichnet sich das Baculovirus Expressionssystem *in vivo* durch eine erfolgreiche Synthese von komplexen und funktionell aktiven Proteinen aus. Aus diesem Grund wurde ein ZFPS System auf der Basis von kultivierten *Spodoptera frugiperda* Zellen entwickelt^{13,14}. Das Besondere an diesem System liegt in der milden Aufschlussmethode der Zellen, wodurch das endoplasmatische Retikulum nicht vollständig entfernt wird. Die erhaltenen ER-Strukturen im System verbleiben als definierte membranäre Strukturen, sogenannte Mikrosomen, die eine kotranslationale Translokation von Membranproteinen in eine nahe natürliche Membran ermöglichen¹⁵⁰.

Wie auch *in vivo* konnte im zellfreien Insekten-System die Translokation durch die Fusion des Melittin-Signalpeptides des Apitoxin aus der Honigbiene gesteigert werden^{151,152}. Neben der Translokation zeichnet sich das zellfreie Insekten-System durch posttranslationale Modifikationen wie Signalpeptidabspaltung¹⁵³, Lipidierung¹⁵⁴, Glykosylierung¹³, Phosphorylierung¹⁵⁵ und Disulfidverbrückung¹⁵⁶ aus. Die Produktivität des zellfreien Insekten-Systems im Batch-Format liegt im µg/ml-Bereich und ist damit im Vergleich zum Weizenkeim- oder *E. coli*-basierten ZFPS System niedrig. Aus diesem Grund wurden verschiedene

Strategien zur Produktivitätssteigerung angewandt. Besonders Optimierungen in der 5'-untranslatierten Region wie die Einführung eines Baculovirus-basierten Polyhedrin-Verstärkers oder die Einbringung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) führten zu Erfolgen in der Syntheseleistung. Im Batch-System konnten im Folgenden Ausbeuten bis zu 50 µg/ml erreicht werden¹⁵⁷. In Kombination mit einem CECF-System konnten die Proteinausbeuten des hochmolekularen komplexen Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor auf 285 µg/ml¹⁵⁵ und des viralen glykosylierten Hüllprotein gp120 auf 860 µg/ml⁸ gesteigert werden.

Ein erstes zellfreies Säugetier-System wurde auf der Basis von Hasen Retikulozyten etabliert¹⁵⁸. Ursprünglich wurde dieses ZFPS System genutzt, um die einzelnen Schritte der Proteintranslation auf molekularer Ebene zu untersuchen. 1958 wurde die erfolgreiche Proteinproduktion durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren am Beispiel des Hämoglobins gezeigt¹⁵⁸. Die Lysatherstellung erfolgt durch die Isolation von Retikulozyten aus anämischen Hasen. Durch den Verdau von endogener mRNA durch den Einsatz einer *Micrococcus* Nuklease konnte das Zielprotein ohne die Hintergrundsynthese von endogenen Proteinen erfolgen¹⁵⁹, wodurch dieses zellfreie System, dem heutzutage entwickelten, sehr ähnlich ist. Jedoch besitzt dieses System keine endogenen Membranstrukturen, wodurch ähnlich wie beim *E. coli* basierten ZFPS System, Lipidstrukturen in Form von Nanodiscs oder Mikrosomen zusätzlich supplementiert werden müssen. Ein weiterer Nachteil liegt in der niedrigen Produktivität des Systems mit Ausbeuten im geringen µg/ml-Bereich. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung von viralen Verstärkern, ähnliche Strukturen zur IRES-Sequenz, die Proteinausbeute um den Faktor 10 erhöht werden konnte¹⁶⁰. Zusätzlich zum zellfreien Insekten-System wurden Systeme auf kultivierten Säugetierzellen etabliert, welche ebenfalls mikrosomalen Strukturen aufweisen. Dies gelang sowohl für CHO als auch für ein auf kultivierten humanen Zellen basiertes zellfreies System. Eine Steigerung der Proteinausbeute im CHO-System konnte weiterhin durch die Einführung der *Intergenic Region* der *Cricket Paralysis Virus* (CrPV) IRES in die Gensequenz erreicht werden¹⁵⁷. Die IRES fungiert wie auch im zellfreien Insekten-System als Initiationsfaktor-unabhängiger Start der Translation, wodurch Proteinausbeute-limitierende Schritte wie Phosphorylierung von Initiationsfaktoren umgangen werden können^{161,162}. Ebenfalls konnte durch die Kombination der IRES mit dem CECF System Ausbeuten von mehreren Hundert µg/ml erreicht werden, wodurch sich das CHO ZFPS System durch eine hohe Produktivität auszeichnet¹⁶³. ZFPS Systeme auf Basis von kultivierten humanen Zellen besitzen den Vorteil einer natürlichen Codon Nutzung, wodurch besonders die Produktion von hochmolekularen Proteinen gefördert wird, da Terminationsprodukte aufgrund einer nicht optimalen Codon-Nutzung vermieden werden können¹⁶⁴. So konnten u.a. komplette virusartige Partikel synthetisiert werden¹⁶⁵.

1.4. Modellproteine

1.4.1. Nanoluziferase

Biolumineszenz kann nicht nur in den uns bekannten Glühwürmchen gefunden werden, sondern ebenfalls in Bakterien, Pilzen und besonders in marinen Organismen¹⁶⁶. Biolumineszenz entsteht, wenn ein Photon-emittierendes Substrat durch das Enzym Luziferase oxidiert wird, wodurch Licht emittiert wird¹⁶⁷. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Prozesses werden Luziferasen als Reporterproteine für die Quantifizierung von Expressionslevel, zur Proteinkonzentrationsbestimmung, zur Ermittlung der Zellviabilität, und

für Apoptose- und Interaktionsstudien verwendet. Die am besten untersuchten und dadurch am meist verwendeten Luziferasen stammen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (Firefly) und der Seefeder *Renilla reniformis* (Renilla). Mit ihrem Molekulargewicht von 61 kDa (Firefly) und 36 kDa (Renilla) sind diese Enzyme relativ groß und eignen sich daher nur begrenzt für die Fusion an Proteine mit geringerem Molekulargewicht für deren Detektion¹⁶⁷. Aus diesem Grund wurden weitere Luziferasen aus den Ruderfußkrebsen wie die *Gaussia princeps* (20 kDa)¹⁶⁸ und die *Metridia longa* (24 kDa)¹⁶⁹ entwickelt, die sich durch ein wesentlich geringeres Molekulargewicht auszeichnen. Trotz der Weiterentwicklung der Luziferasen wird die Probenhandhabung durch den schnellen Intensitätsverlust des emittierten Lichts, der Instabilität und die hohe Autolumineszenz des Substrates Coelentrazin erschwert und die Assaysensitivität reduziert¹⁷⁰. Die Luziferase aus der Tiefseeegarnele *Oplophorus gracilirostris* zeichnet sich durch ein Lumineszenzsignal mit hoher Quanteneffizienz und geringem Hintergrund aus, nutzt jedoch ebenfalls Coelentrazin als Substrat und ist mit vier Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 118 kDa verhältnismäßig groß¹⁷¹. Durch eine Aminosäuresequenzoptimierung der 19 kDa großen Untereinheit konnte die Lumineszenzaktivität erhalten bleiben und die Stabilität dieser Untereinheit erhöht werden¹⁷². Zusätzlich wurde durch den Einsatz eines neuen Coelenterazin-Analogons (Furimazin) eine hellere Lumineszenzintensität sowie stabilere physikalische und chemische Eigenschaften im Vergleich zu kommerziellen Luziferasen erreicht¹⁷². Zusätzlich ist für viele der genannten Luziferasen bekannt, dass kleinste Änderungen im N- und/oder C-Terminus zu einem Funktionalitätsverlust des Enzyms führen können^{173,174}. Dadurch sind diese Luziferasen nur begrenzt für eine Fusionierung an ein Zielprotein geeignet. Dieses Problem tritt bei der Nluc nicht auf. Aufgrund der verbesserten Eigenschaften der Nluc wurde diese Luziferase als Reporterprotein für die zellfreie Proteinsynthese verwendet.

1.4.2. Endothelin-Rezeptoren

Die Endothelin-Rezeptoren A und B gehören zu den Klasse A GPCRs. Sie werden im vaskulären Endothel, in den Lungen, im Gehirn, in den Nieren und in, an der Blutzirkulation beteiligten, Organen exprimiert¹⁷⁵. Im der Großhirnrinde des menschlichen Gehirns befindet sich die höchste Dichte an ET-B-Rezeptoren¹⁷⁶. Im Allgemeinen lassen sich ET-A-Rezeptoren und ET-B-Rezeptoren in ihrer konträren Wirkung unterscheiden. Während die Aktivierung des ET-A-Rezeptors zur Gefäßverengung (Vasokonstriktion) führt, wird durch den ET-B-Rezeptor eine Stickstoffmonoxid vermittelte Vasodilatation induziert¹⁷⁷. Aufgrund des Blutgefäß-erweiternden Effekts des ET-B-Rezeptors ist dieses Protein von pharmazeutischer Relevanz für die Entwicklung von potenten Agonisten, die zum einen für einen verbesserten Transport von Medikamenten, aber auch zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden können¹⁷⁸. Darüber hinaus agiert der ET-B-Rezeptor in Neuronen und Astrozyten als „*anti-aging*-Protein“, wodurch Neurone vor Apoptose geschützt werden¹⁷⁹. ET-Rezeptoren werden durch drei 21 Aminosäuren lange Peptide (ET-1, ET-2 und ET-3) mit hochspezifischen Affinitäten im piko- bis nanomolaren Bereich aktiviert. Während ET-1 und ET-2 vergleichbare Affinitäten zu beiden Endothelin-Rezeptoren aufweisen, besitzt der ET-3 Agonist eine um zwei Größenordnungen höhere Affinität zum ET-B-Rezeptor¹⁸⁰. Der ET-B-Rezeptor besitzt am Aminosäurerest Asparagin 59 eine Glykosylierungsstelle. Glykosylierungen sind im Allgemeinen entscheidend für die Stabilität von GPCRs, der Lokalisierung und der Ligandbindung¹⁸¹. In Sf9 Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Glykosylierungsstelle keinen Einfluss auf die Eigenschaften des ET-B-Rezeptors hatte¹⁸². Eine weitere essentielle posttranslationale Modifikation für die Erhaltung der Konformation ist die Disulfidverbrückung zwischen den Resten Cys174 und Cys255¹⁸³. Hier gibt es kontroverse

Ergebnisse. Während Mutationen der Cysteine zu Alanin in *E. coli* zu einem Verlust der Ligandbindung führte¹⁸³, konnte in einem zellfreien System unter reduzierenden Bedingungen, die eine Disulfidverbrückung verhindern, Ligandbindung gezeigt werden¹⁸⁴. Neben den strukturerhaltenen posttranslationalen Modifikationen ist eine Lipidierung, wie die Palmitoylierung ein Kennzeichen vieler Membranproteine. Der ET-B-Rezeptor wird typischerweise auf der zytoplasmatischen Seite palmitoyliert. Eine Kopplung des ET-B-Rezeptors an ein G α -Protein ist ohne Palmitoylierung nicht möglich¹⁸⁵. Eine Analyse von vorhandenen posttranslationalen Modifikationen im zellfreien System wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

1.4.3. Adenosin-Rezeptoren mit Fokus auf den Adenosin-Rezeptor A2a

Die Adenosin-Rezeptoren können in 4 Subtypen unterteilt werden Adora1, Adora2a, Adora2b sowie Adora3, und weisen eine unterschiedliche mittlere Konzentration (EC₅₀) ihres endogenen Liganden Adenosin auf¹⁸⁶. Während das endogene Level an Adenosin im Gehirn von 20-200 nM ausreichend ist, um Adora1, Adora2a und Adora3 zu aktivieren, werden für die Aktivierung des Adora2bs Adenosinkonzentrationen im μ M-Bereich benötigt¹⁸⁷. Der Effekt des jeweiligen Adenosinrezeptors hängt von der Adenosinkonzentration sowie dem Expressionslevel des Subtyps ab. Adora1 und Adora3 Rezeptoren aktivieren nach ihrer Kopplung an G β -Proteine, K⁺-Kanäle und inhibieren Spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle sowie die cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) Bildung. Trotz unterschiedlicher Kopplungsmechanismen des Adora2as an G β - Proteine und Adora2b an G β , G α und G β - Proteine weisen diese beiden Rezeptoren ähnliche Wirkungsmechanismen auf, die z. B. in der Bildung von cAMP resultieren¹⁸⁶. Darüber hinaus sind Adora2a und Adora2b in verschiedenste biologische Funktionen involviert, wie die Regulation des Schlafrhythmus, der Bewegungsfähigkeit, der menschlichen Wahrnehmung und der Angiogenese. Adora2a und Adora2b sind pharmazeutisch relevant, da sie in der Ausbildung von verschiedenen Krankheitsbildern, wie Entzündungskrankheiten, Blutmangel und neurodegenerativen Krankheiten beteiligt sind¹⁸⁸. Mit Ausnahme des Adora3-Rezeptors ist für die Adenosinrezeptoren bekannt, dass sie durch natürlich vorkommende Xanthin-Derivate wie z. B. Koffein inhibiert werden. Eine epidemische Verteilung indiziert, dass Kaffeetrinker möglicherweise ein geringeres Risiko haben, an Parkinson zu erkranken¹⁸⁹. Dieser Effekt wird auf die Inhibierung des Adora2a zurückgeführt, da dieser durch Interaktionen mit dem Dopamin D2- und dem metabotropischen Glutamatrezeptor motorische Fähigkeiten in den Basalganglien beeinflussen kann¹⁸⁹. Aufgrund der besonderen pharmakologischen Relevanz des Adora2a wird sich der nächste Abschnitt besonders mit diesem Subtyp beschäftigen.

Ähnlich zum ET-B-Rezeptor wird der Adora2a in nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Die höchste Dichte des Adora2a befindet sich im Gehirn und in Zellen des Immunsystems¹⁹⁰. Durch die Kristallstrukturaufklärung aus dem Jahr 2008 mit einer Auflösung von 2.6 Å wurde die Basis geschaffen, um selektivere Liganden für die Behandlung von Parkinson, Huntington oder Asthma zu identifizieren¹⁹¹. Bis heute existieren lediglich zwei von der FDA zugelassene Adora2a Antagonisten, weshalb sich die Forschung weiterhin auf den Adora2a fokussiert¹⁹². Aufgrund der Flexibilität von GPCRs, welche zwischen verschiedenen Konformationen wechseln können, gestaltet sich die Kristallisation schwierig. Im Falle des Adora2a wurde der dritte zytoplasmatische Loop durch Lysozym aus dem T4 Bakteriophagen ausgetauscht, sowie der C-terminale Bereich (Aminosäure 317-412) deletiert, um die Stabilität des Rezeptors zu erhöhen¹⁹¹. Im Vergleich zu bis dahin gelösten Kristallstrukturen wie die des β 2-adrenergen Rezeptors und des Rhodopsin, wurden drei wesentliche Unterschiede im

Adora2a erkennbar: Die Anordnung der extrazellulären Loops unterscheidet sich stark von den genannten Klasse A GPCRs. Darüber hinaus erfolgt die Bindung des eingesetzten Antagonisten ZM241385 senkrecht zur Membran und liegt auf einer Geraden mit der Transmembrandomäne VII, wodurch eine erweiterte Bindungstasche kreiert wird. Zu guter Letzt liegen die Helices in einer abweichenden Konformation vor, wodurch die Interaktion des Antagonisten von Helices III und V zu den Helices VI und VII verschoben wird¹⁹¹. Trotz der unterschiedlichen Effekte der Antagonisten, ist die Aktivierung durch einen Agonisten wie Adenosin oder NECA vergleichbar mit der Aktivierung von anderen GPCRs aus der Klasse der Rhodopsinrezeptoren. Die größte strukturelle Änderung zwischen der Agonist-ungebundenen und der Agonist-gebundenen Konformation erfolgt in den Helices V und VI, die nach ihrer Konformationsänderung eine räumliche Entfernung von ca. 5-6 Å zum Rezeptorkern zurücklegen¹⁹³. Durch diese Bewegung entsteht eine Lücke zwischen den cyclisch angeordneten Helices, in die der C-Terminus des G-Proteins binden kann¹⁹³. Aufgrund der drastischen Konformationsänderung der Helices V und VI wird diese Strukturänderung zur Visualisierung der Aktivierung des Rezeptors genutzt. So kann die Bewegung der Transmembrandomäne VI durch einen entfernungsabhängigen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) verfolgt werden¹⁹⁴. Durch das Einbringen eines Cyan-Fluoreszenzproteins (CFP) in den dritten extrazellulären Loop zwischen Helices V und VI sowie der Fusionierung eines C-terminalen YFPs konnte die spezifische Aktivierung durch den Agonisten Adenosin und die Inhibierung durch den Antagonisten Theophyllin gezeigt werden¹⁹⁴. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell angepasst, indem ein Fluorophor in den dritten extrazellulären Loop integriert wurde, welcher durch eine an den C-Terminus des Adora2as fusionierte Nluc, angeregt wurde. Mit Hilfe dieses Sensorproteins wurde eine konzentrationsabhängige Ligandbindung im zellfreien CHO-System gezeigt.

1.4.4. Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) reguliert im menschlichen Körper als endogen vorkommendes Hormon die Proliferation, Differentiation und Reifung von roten Blutkörperchen. Therapeutisch wird EPO für die Behandlung von Blutarmut¹⁹⁵ als Folge von z. B. chronischem Nierenversagen¹⁹⁶, chirurgischen Eingriffen und Chemotherapie eingesetzt¹⁹⁷. Rekombinantes EPO wird seit 1984¹⁹⁸ in verschiedensten Zelllinien basierend auf Insekten¹⁹⁹, Bakterien¹⁹⁸, Hefen²⁰⁰ und Pflanzen²⁰¹ exprimiert und isoliert. Aufgrund des hohen Glykosylierungsanteils von bis zu 40% des Gesamtmolekulargewichtes (30 kDa) wird EPO heutzutage hauptsächlich in Säugetierzellbasierten Expressionssystemen produziert, um humanidentische komplexe Glykosylierungen zu erhalten²⁰². Die Reproduzierbarkeit von Glykosylierungsmustern ist aufgrund des komplexen Prozesses der Glykosylierung sowie der Beeinflussung von äußeren Faktoren wie Zelltyp, Entwicklungsstadium, Umgebung und metabolischer Zustand beinahe unmöglich. Aus diesem Grund können sich die finalen Glykosylierungsmuster in der Monosaccharidzusammensetzung und im Glykosylierungstyp, sowie der Verknüpfung der einzelnen Zucker unterscheiden^{203,204}. Darüber hinaus kann sich zusätzlich die Adressierung der drei N-Glykosylierungsstellen, sowie der O-Glykosylierungsstelle unterscheiden, wodurch sowohl endogen als auch rekombinant ein heterogenes Gemisch an EPO produziert wird²⁰³, welches starke Variationen in der biologischen Aktivität und Stabilität aufzeigen kann²⁰⁵. Bis heute werden Produktionsverfahren optimiert und entwickelt, um EPO mit homogenen Glykosylierungen herstellen zu können. Diese reichen vom Zelllinienengineering²⁰⁶ über einen enzymatischen oder chemischen Umbau²⁰⁷ bis hin zu vollsynthetischen EPO-Molekülen²⁰⁸. In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit die O-Glykosylierungsstelle spezifisch

durch die Verwendung nicht-kanonischer Aminosäuren (nkAs) adressiert, um die Heterogenität im Glykosylierungsmuster von EPO durch die Kopplung eines definierten Biopolymers zu reduzieren.

1.5. Erweiterung des genetischen Codes

Proteine werden natürlicherweise aus den ubiquitär vorkommenden 20 kanonischen Aminosäuren aufgebaut. Zusätzlich kann die Aminosäure Selenocystein durch die Selenylierung von L-Serin synthetisiert und in ausgewählte Proteine wie in das menschliche Selenoprotein P eingebaut werden²⁰⁹. Pyrrolysin, ein Derivat des L-Lysins, kann hingegen nur in bestimmten methanbildenden Archaeen- und Bakterienarten gefunden werden, da diese Aminosäure in Enzymen des Methan-Stoffwechsels vorhanden ist²¹⁰. Jede der 20 kanonischen Aminosäuren wird in einem ersten Schritt an ihre zugehörige tRNA mit Hilfe der jeweiligen Aminoacyl-tRNA-Synthetase aminoacyliert²¹¹. In einem zweiten Schritt wird die Aminoacyl-tRNA durch einen Elongationsfaktor zum Ribosom geleitet, wo die Aminosäure in die Polypeptidkette eingegliedert wird. Von den 64 vorhandenen Codons, bestehend aus einem Triplet der Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin (Uracil im mRNA-Transkript), codieren 61 Kombinationen für eine spezifische kanonische Aminosäure, während drei Kombinationen in einem Stopcodon (TAG, TAA, TGA) und einer damit verbundenen Terminationsfaktor induzierten Beendigung der Translation resultieren²¹². Durch die limitierende Anzahl an 20 kanonischen Aminosäuren bestehen Grenzen in den biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der gebildeten Proteine²¹³. In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der Proteintranslation als Grundlage für die Erweiterung des genetischen Codes mit nkAs mit verschiedensten reaktiven Gruppen verwendet, um Proteine zu analysieren und diese mit neuen Charakteristiken zu erstellen. Im nächsten Abschnitt werden die genutzten Methoden vorgestellt, um nkAs ortsspezifisch in ein Protein integrieren zu können.

1.5.1. Methoden zur ortsspezifischen Integration von nicht-kanonischen Aminosäuren

Die enzymatische Aminoacylierung einer tRNA mit der passenden Aminosäure unterliegt verschiedenen Selektionsmechanismen. Abhängig von der Bindungstasche der Aminoacyl-tRNA-Synthetase wird die passende Aminosäure selektiert und unter einer ATP-abhängigen Bildung eines Aminoacyl-Adenylates aktiviert. Die zu der Aminosäure zugehörige tRNA wird meistens anhand des Anticodons der tRNA selektiert. Struktur motive im Akzeptorstamm oder spezifische Haarnadelstrukturen, wie z. B. bei der Alanyl-tRNA-Synthetase, können ebenfalls zur Selektion der tRNA beitragen²¹⁴. Darüber hinaus besitzen manche Synthetasen, wie von DNA-Polymerasen bekannt, einen „*Proof-Reading*“-Mechanismus, durch welchen die Bindung zwischen einer fehlerhaft beladenen tRNA und der Aminosäure gelöst werden kann²¹⁵. Trotz der verschiedensten Selektionsmechanismen können vereinzelt Aminosäuren fehlerhaft beladen werden. Dies geschieht mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10000:1²¹⁶. Diese Missacylierung diente als Grundlage der ersten Methodik zum Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren. Durch Mutagenese-Experimente konnte die Substratspezifität von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen so verändert werden, dass Aminosäure-Derivate in das Zielprotein integriert wurden²¹⁷. Trotz dieser vielversprechenden Entdeckung zeigte sich, dass die katalytische Aktivität der Aminoacyl-tRNA-Synthetase stark reduziert wurde. Aus diesem Grund befasst sich die zweite Methodik mit der synthetischen Beladung von tRNAs²¹⁸. Durch diesen Prozess können tRNAs mit Aminosäuren, die Fluoreszenzfarbstoffe oder Biotin tragen, aminoacyliert werden^{219,220}. Nachteilig sind zum einen die hohen Produktionskosten, sowie der

experimentelle Aufwand, den eine chemische Aminoacylierung hervorruft, und die sterische Behinderung der kovalenten Gruppe während der Proteintranslation, die den Einbau der nichtkanonischen Aminosäuren beeinträchtigen kann²²⁰. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Integration von Codons, die nur in einem veränderten Leserahmen zum Einbau der nKAs führen. Für diesen Zweck wurden z. B. vier- und fünfbasige Codons in die Gensequenz integriert²²¹. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung dieser Strategie ist die Synthese von modifizierten tRNAs, die einen erweiterten Anticodon-Bereich aufweisen, welcher komplementär zum gewählten vier- oder fünfbasigem Codon ist. Durch die Anpassung der umliegenden Codons resultiert der natürliche Triplet-Codon-Leserahmen in einem verfrühten Terminationsprodukt, welches vom Volllängenprotein mit integrierter nKAs unterschieden werden kann²²¹. Diese Technik wurde sowohl für synthetisch als auch enzymatisch aminoacylierte tRNAs angewandt. Die am meisten genutzte Variante um nKAs ortsspezifisch in ein Protein zu integrieren basiert auf der Amber-Stopcodon-Suppressions-Technologie²²² (Abb. 3). Bei dieser Methodik wird ein Amber-Stopcodon (TAG) in einer ausgewählten Position in die Gensequenz eingebracht. Durch die Addition einer Suppressions-tRNA, welche ein zum Amber-Stopcodon komplementäres Anticodon trägt, wird die Translation am Stopcodon fortgeführt. Die Aminoacylierung kann, wie bereits beschrieben, auf chemischem oder enzymatischem Weg erfolgen. Aufgrund der vorhandenen Terminationsfaktoren liegt bei der Amber-Stopcodon-Methode eine Konkurrenz zwischen Suppression-tRNA und Terminationsfaktoren bei der Adressierung des Stopcodons vor. Dies hat zur Folge, dass zwei Produkte entstehen: das verkürzte Terminationsprodukt sowie das Volllängenprodukt. Wie im Abschnitt 1.2.1 beschrieben, kann in *E. coli* dieses Problem umgangen werden mit der Entfernung des Terminationsfaktors 1²². In eukaryotischen Systemen findet dieser Ansatz keine Anwendung, da der Terminationsfaktor 1 alle Stopcodons bindet²²³. Da in der vorliegenden Arbeit die Amber-Suppressions-Technologie in Kombination mit orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paaren umgesetzt wurde, wird im nächsten Abschnitt auf die verwendeten orthogonalen Systeme eingegangen.

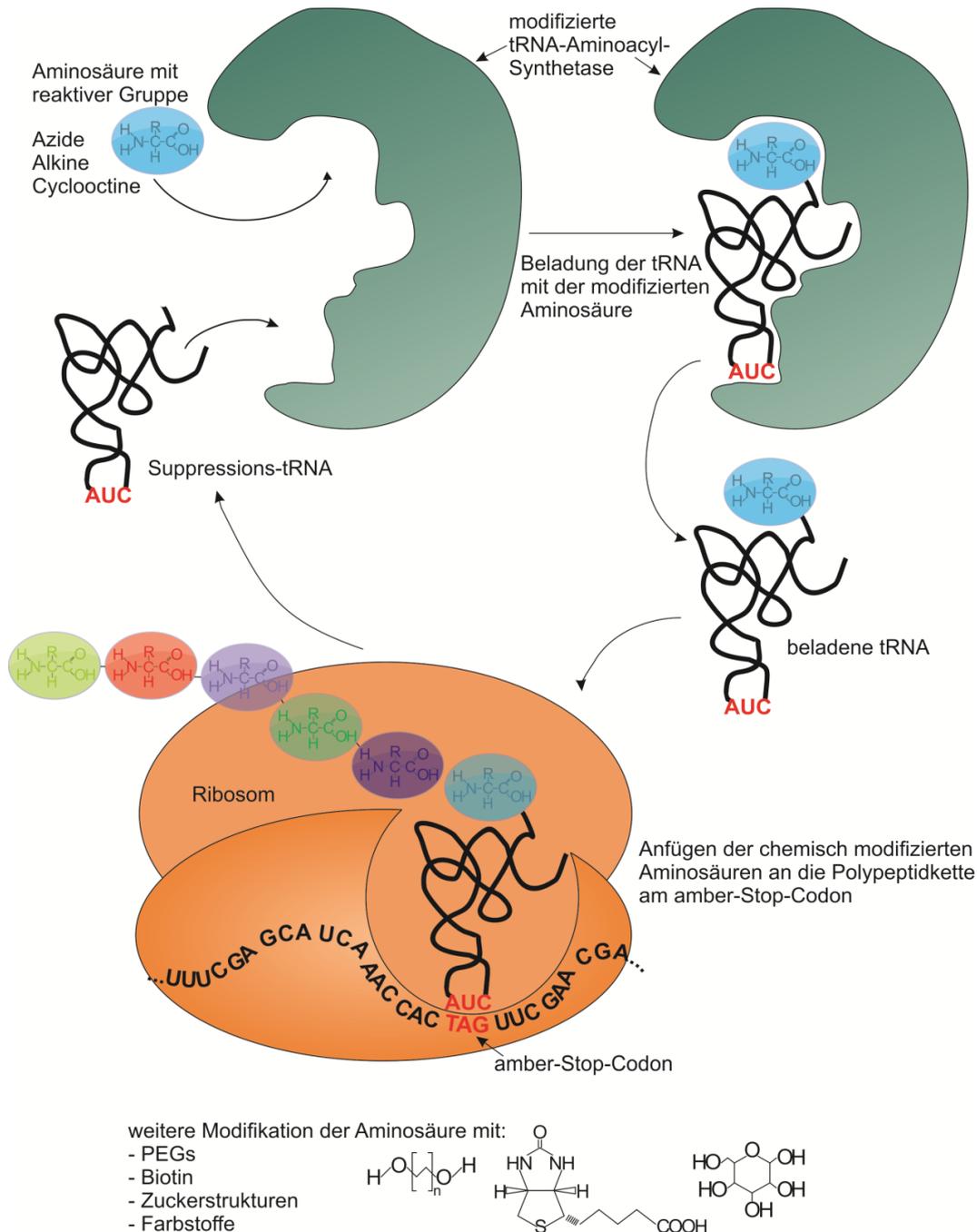


Abbildung 3. Prinzip der Amber-Stopcodon-Suppression. Dargestellt ist die Aminoacylierung der Suppressions-tRNA durch die orthogonale Synthetase mit der nicht-kanonischen Aminosäure, sowie deren Integration in die Polypeptidkette. Mögliche Modifikationen der reaktiven Gruppe der nicht-kanonischen Aminosäure sind aufgezeigt.

1.5.2. Orthogonale Systeme auf Basis der Tyrosin-Synthetase aus *E. coli* (*EcTyrRS/EctRNA*) und der Pyrrolysin-Synthetase aus *Methanosarcina mazei* (*MmPyIRS/tRNA*)

Durch die Veränderung von Aminosäuren in der Bindungstasche der jeweiligen Synthetasen können nkAs, zumeist dem ursprünglichen Substrat-ähnliche Strukturen, mit einer höheren Spezifität als das natürliche Substrat erkannt werden²¹⁷. Die in diesem Abschnitt ausgewählten Synthetasen zeichnen sich durch eine hohe Effektivität in der Aminoacylierung aus. Eins der ersten entwickelten tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paare basiert auf der Tyrosin-Synthetase aus *E. coli*¹⁸. Diese Synthetase wurde ausgewählt, da das Anticodon GUA ihrer

zugehörigen tRNA sich in nur einem Nukleotid zum Amber-Stopcodon CUA unterscheidet. Die Einführung der strukturell kleineren Purinbase Cytosin führte jedoch zu einer fehlenden Interaktion der Synthetase mit der tRNA. Durch den Austausch der Asparaginsäure an Position 265 durch Arginin, welches eine längere Seitenkette besitzt, konnte die Interaktion zum Cytosin wiederhergestellt werden, sodass die Tyrosin-basierte tRNA mit einem CUA-Anticodon von der Tyrosin-Synthetase aminoacyliert wird¹⁹. Durch die Einführung von drei weiteren Mutationen (Threonin 37, Serin 182, Alanin 183, p-AzidoPheRS-6 (eAzFRS))¹⁸ wurde die Substratspezifität sowie die Aminoacylierungseffizienz weiter erhöht, wodurch Phenylalanin-Derivate mit Aziden oder Alkinen in der Parastellung erfolgreich in das Zielprotein eingebaut werden können. Das *EcTyrRS/EctRNA*-Paar erfüllt in Bezug auf eukaryotische Systeme sämtliche Orthogonalitäts-Kriterien:

1. Die orthogonale Synthetase aminoacyliert keine endogenen tRNAs.
2. Die orthogonale tRNA wird nicht durch endogene Synthetasen aminoacyliert.
3. Die orthogonale Synthetase erkennt die nkAs mit einer hohen Spezifität im Gegensatz zu endogenen Aminosäuren.
4. Die nkAs wird nicht als Substrat für endogene Synthetasen erkannt.

Durch diese Kriterien wird in eukaryotischen Systemen an der Amber-Stop-Position die nkAs in die Polypeptidkette integriert. Als nkAs wurden in der vorliegenden Arbeit Phenylalanin-Derivate mit einer Alkin- (p-propargyloxy-L-Phenylalanin, pPa) oder Azid- (p-Azido-L-Phenylalanin, AzF) Gruppe in der para- Position verwendet.

Durch den Ursprung der Tyrosin-Synthetase aus *E. coli* ist dieses System nicht orthogonal zu prokaryotischen Systemen. Aus diesem Grund wurde ein zweites System etabliert, welches sowohl zu eukaryotischen als auch zu prokaryotischen Systemen orthogonal ist und auf der Pyrrolysin-Synthetase (PylRS) aus *Methanosarcina mazei* (*MmPylRS*) basiert.

Pyrrolysin wird bereits natürlicherweise am Amber-Stopcodon in Proteine integriert, sodass eine natürlich vorkommende tRNA mit passender Synthetase vorliegt²²⁴. Die als Homodimer vorliegende Synthetase kann in einen N- und C-terminalen Bereich unterteilt werden. Während der C-terminale Bereich die katalytische Untereinheit enthält, ist der N-Terminus für die Bindung der tRNA verantwortlich^{224,225}. An jedes Synthetasedimer binden zwei tRNA-Moleküle, die über spezifische Nukleotide, sowie über die charakteristische Tertiär-Struktur der tRNA erkannt werden. Besonders die Basen-Paarung G1:C72 und die helikale Struktur des Akzeptor-Stammes führen das 3'-Ende der tRNA zum aktiven Zentrum der Synthetase²²⁶. Eine weitere Besonderheit der *MmPylRS* liegt in der Interaktion mit ihrem endogenen Substrat, dem Pyrrolysin. Die Erkennung des Pyrrolysin durch die *MmPylRS* erfolgt hauptsächlich über strukturelle Interaktionen. Durch die Größe des Pyrrolysin ist die Bindetasche der zugehörigen *MmPylRS* wesentlich größer, wodurch kleinere Aminosäuren mit dem aktiven Zentrum der Synthetase nicht interagieren können²²⁵. Durch die Einführung der Mutationen Alanin 306 und Phenylalanin 384 (PylRS-AF) konnte die geringe Aminoacylierungseffizienz erhöht werden und die Bindungstasche weiter ausgedehnt werden, sodass auch Aminosäuren mit großen cyclischen Ringen (5-, 6-, und 8-Ringe) von der Synthetase als Substrat genutzt werden²⁰. Durch die Möglichkeit verschiedenste nkAs mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen in das Zielprotein zu integrieren ist das *MmPylRS*/tRNA-Paar das derzeit meist genutzte orthogonale System *in vivo*. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit das *MmPylRS*/tRNA-Paar im zellfreien CHO-System etabliert, um den Einbau von Lysinen mit einer Cyclooctin- oder Azid-Gruppe in das Modellprotein Adora2a zu realisieren. Für diesen Zweck wurden die nkAs Cyclooctin-L-Lysin (SCO), Trans-Cycloocten-L-Lysin

(TCO) und Azido-Lysin verwendet (AzL). Durch die erfolgreiche Integration des SCOs konnte die Cyclooctin-Gruppe mit Hilfe der Tetrazin-Ligation an einen Cy5-Farbstoff in einem kupferfreien Reaktionsmechanismus gekoppelt werden.

1.5.3. Anwendungen

Bioorthogonale Kopplungsreaktionen umfassen Reaktionen, welche nicht mit natürlichen biochemischen Prozessen kreuzreagieren und somit in lebenden Zellen durchgeführt werden können. Verschiedene Kriterien sollten dafür erfüllt werden. Erstens, die Kopplungsreaktion sollte selektiv zwischen den beteiligten reaktiven Gruppen sein und darf keine unspezifischen Reaktionen mit natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen auslösen. Zweitens, die entstandene kovalente Bindung sollte chemisch inert sein und die Struktur und Funktionalität des gekoppelten Moleküls nicht beeinflussen. Drittens, die Reaktionen sollten sich durch eine hohe Umsetzungsgeschwindigkeit auszeichnen, sodass Prozesse wie Molekülbewegung oder strukturelle Veränderungen detektiert werden können. Viertens, die beteiligten Reaktionspartner, sowie Katalysatoren sollten keinen toxischen Einfluss auf die zu analysierenden Moleküle oder Proteine haben²²⁷. Viel genutzte Klickreaktionen, die diese Kriterien zum großen Teil erfüllen, sind die Staudinger-Ligation und die Kupfer-katalysierte Click-Reaktion (CuAAC). Die Staudinger Ligation wurde erstmals 1919 von Hermann Staudinger und Jules Meyer beschrieben und umfasst die Reaktion zwischen einem Azid und einem Phosphin²²⁸. Da das erhaltene Produkt Iminophosphin mit Wasser zu einem unerwünschten Edukt reagierte, wurde diese ursprüngliche Reaktion im Jahr 2000 von Bertozzi und Raines optimiert^{229,230}. Durch die Einführung einer Ringstruktur an die Phosphin-Gruppe konnte die Instabilität in Wasser umgangen werden. Die Staudinger-Ligation zeichnet sich durch eine hohe Selektivität aus, da sowohl Azide als auch Phosphine in der Natur nicht vorkommen. Zusätzlich ist diese Reaktion nicht toxisch und kann in wässriger Umgebung durchgeführt werden. Nachteilig ist eine mögliche Oxidation durch z. B. Luft der Phosphin-Gruppe, wodurch die Klickreaktion inhibiert wird, sowie die langsame Kinetik der Reaktion. Die CuAAC ist eine Variante der Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition, welche bereits in den 1960er-Jahren etabliert wurde²³¹. Ursprünglich zeichnete sich diese Reaktion durch die Bildung eines 1,2,3-Triazol-Rings mit geringer Regioselektivität aus, welcher unkatalysiert in Gegenwart von hohen Temperaturen gebildet wird. Durch die Entdeckung von Cu(I) als Katalysator in 2002^{232,233} konnte die Regioselektivität drastisch verbessert werden, sodass nur das 1,4-Regioisomer gebildet wird. Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 10^7 beobachtet, wodurch die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. Generell ist die CuAAC durch eine hohe Stabilität (pH 4-12), Wasserkompatibilität und einer hohen Umsetzung charakterisiert, wodurch sie heutzutage die meist eingesetzte Klickreaktion darstellt²²⁷.

Der Einbau von lichtinduzierbaren nkAs in Proteinen über Amber-Suppression ermöglicht eine lichtabhängige Steuerung der Struktur und der Funktion des Zielproteins. Die lichtinduzierbare nkAs kann dabei eine Schutzgruppe tragen, welche nach Illumination freigesetzt wird. Befindet sich die nkAs z. B. im aktiven Zentrum eines Proteins, so kann durch die sterische Hinderung der Schutzgruppe das Protein in einen inaktiven Zustand vorliegen und durch Licht aktiviert werden. Durch den Einbau eines o-Nitrobenzyl-Tyrosins in den nikotinischen Acetylcholinrezeptors an drei ausgewählten Positionen (93Y, 127Y, 198Y) konnte der Ionenkanal spezifisch durch Illumination aktiviert werden²³⁴. *In vivo* wurde die Protein Kinase A durch den Einbau von o-Nitrobenzyl-Tyrosin in das aktive Zentrum so verändert, dass ATP nicht mehr gebunden werden konnte und die Kinase inaktiv vorlag. Durch Illumination konnte die Kinase spezifisch aktiviert werden²³⁵. Dieser Ansatz ist für Studien von einzelnen Schritten von Signalkaskaden interessant. Alternativ zu der lichtabhängigen Freisetzung der Schutzgruppe kann die nkAs eine Seitengruppe tragen, welche nach Illumination in eine

reaktive Form übergeht und an einen passenden Interaktionspartner koppelt. Besonders für Protein-Protein- und Protein-Ligand-Studien wird diese Methodik angewandt. Die nkAs AzF wurde über Amber-Suppression in die Bindungstasche von Chemokinrezeptoren eingeführt, um nach Lichtaktivierung den natürlichen Liganden T140 kovalent zu binden²³⁶. Die dritte Gruppe von lichtinduzierbaren nkAs besitzt eine Azobenzol-Gruppe, deren Struktur durch die Wellenlängen 365 nm und 460 nm reversibel von einer trans- zu einer cis-Form verändert werden kann. Durch den Einbau einer solchen nkAs in den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor konnten die Aktivierung, die Porenöffnung und die Glycin-Sensitivität gesteuert werden²³⁷.

Neben der kontrollierbaren Aktivierung von Proteinen wird die Amber-Suppression besonders für die Implementierung von posttranslationalen Modifikationen angewandt. Während die Acetylierung und Methylierung von Lysinen besonders in Histonen für die Regulation der Transkription von Bedeutung ist²³⁸, sind posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung, Phosphorylierung und Glykosylierung allgegenwärtig. Aufgrund der Bedeutung der Phosphorylierung in physiologischen Prozessen wie Zellteilung, Zelldifferenzierung, Erhaltung des Zellmetabolismus, der Stressantwort und der Proteinsynthese²³⁹ wurde ein System auf Basis der Amber-Suppression entwickelt, welches die Inkorporation von Phosphoserin in das Zielprotein ermöglicht. Am Beispiel der Malat-Dehydrogenase aus Salmonella konnte gezeigt werden, dass PTMs möglicherweise abhängig von verschiedenen Umweltbedingungen kreuzreagieren können: Während die Phosphorylierung an Serin260 des Enzyms zu einer Inaktivierung führte, wurde die Malat-Dehydrogenase durch eine Acetylierung an Lysin140 aktiviert²⁴⁰. Die Synthese von homogenen Glykosylierungen stellt wie in Kapitel 1.1.3 angesprochen eine Hürde in der Proteinsynthese dar. Aus diesem Grund wurden Zucker in ihrer Aminoxy-Form hergestellt und zu der inkorporierten nkAs 4-Acetylphenylalanin hinzugefügt²⁴¹. Der angefügte Zuckerrest kann durch zusätzliche Glykosyltransferasen und Monosaccharide modifiziert werden. Alternativ kann das komplette Zuckerbäumchen mit einer Aminoxy-Gruppe an die Acetyl-Gruppe des Phenylalanins gekoppelt werden, sodass eine definierte Glykosylierung mittels Amber-Suppression ermöglicht wird²⁴¹. In Abbildung 4 ist eine Auswahl an gebildeten Edukten nach einer Kopplungsreaktion (*Strain-promoted* Cycloaddition, Kupfer-katalysierte Klickreaktion und Staudinger-Ligation) dargestellt. Die einzelnen Kopplungsreaktionen werden im Detail bei ihrem Einsatz in der vorliegenden Arbeit näher erläutert.

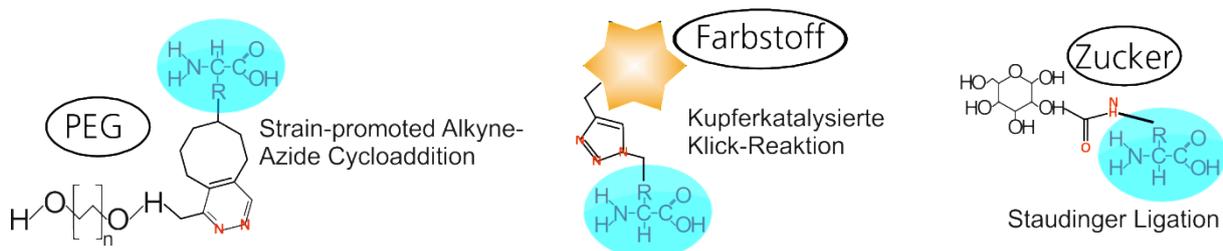


Abbildung 4. Modifikationen von Proteinen. Gezeigt sind verschiedene Modifikationen wie PEGylierung, das Koppeln eines Farbstoffes, sowie das Anbringen von posttranslationalen Modifikationen wie ein Zuckerrest. Zusätzlich sind Verbindungsstrukturen zwischen nicht-kanonischen Aminosäuren und dem gekoppelten Molekül dargestellt. PEG: *Strain-promoted Cycloaddition*, Farbstoff: Kupfer-katalysierte Klickreaktion, Zucker: Staudinger-Ligation

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

¹⁴ C-Leucin	Perkin Elmer
3-Azido-7-hydroxycoumarin	Jena Bioscience
5'Cap m ⁷ G(ppp)G	Warschau Universität, Prof. Darzynkiewicz
Aceton	VWR International GmbH
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Deutschland GmbH
Agar-Agar	Carl Roth GmbH
Alexa Fluor 555-Alkin	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 647-Alkin	Thermo Fisher Scientific
Aminosäuren	Merck KGaA
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH
ATTO 532-Azid	ATTO-TEC GmbH
Azido-Lysin	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH
Blue Oxazin 651-Alkin	Active Motif
BODIPY -520-Alkin	Active Motif
BODIPY-TMR-Lysin-tRNAGAA	Biotech Rabbit GmbH
BODIPY-TMR-Lysin-tRNACUA	Biotech Rabbit GmbH
Caseinhydrolysat	Carl Roth GmbH
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	Promega GmbH
Caspase Inhibitor AC-DEVD-CMK	Santa Cruz Biotechnology
Chloroform	Carl Roth GmbH
Click-IT Alexa Fluor 488 DIBO-Alkin	Thermo Fisher Scientific
Click-IT Alexa Fluor 594 DIBO-Alkin	Thermo Fisher Scientific
Cytidintriphosphat (CTP)	Roche Deutschland GmbH
DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamin 110	Jena Bioscience
DBCO-Sulfo-Cy3	Jena Bioscience
DBCO-Sulfo-Cy5	Jena Bioscience
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH
Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)	Qiagen GmbH
Dithiothreitol (DTT, SDS-PAGE)	Applichem GmbH

Dithiothreitol (DTT, Zusatz zur ZFPS)	Thermo Fisher Scientific
DY-490-Alkin	Dyomics GmbH
DY-530-Alkin	Dyomics GmbH
DY-649-Alkin	Dyomics GmbH
DY-632-Phosphin	Dyomics GmbH
DyLight650-Phosphin	Thermo Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biomol GmbH
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Biomol GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Fluorescein-Azid (6-FAM-Azid)	Lumiprobe GmbH
Glukose	Serva Electrophoresis GmbH
Glycerol	Carl Roth GmbH
Guanosintriphosphat (GTP)	Roche Deutschland GmbH
Hydroxyethyl-1-piperazinyl- ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol GmbH
Isopropanol	VWR International GmbH
Kaliumacetat (KOAc)	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck KGaA
Kreatinphosphat	Roche Deutschland GmbH
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (CuSO ₄)	Sigma-Aldrich GmbH
L-Histidin	Merck KGaA
Luziferase Assay Reagent	Promega GmbH
Luziferase Substrat	Promega GmbH
Lysogeny Broth (LB)	Carl Roth GmbH
Magnesiumacetat (Mg(OAc) ₂)	Merck KGaA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck KGaA
Methanol	Carl Roth GmbH
Natriumacetat (NaOAc)	Merck KGaA
Natriumascorbat (NaAsc)	Carl Roth GmbH
Natriumazid (NaN ₃)	Merck KGaA

Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA
NP-40	New England Biolabs
p-Azido-L-Phenylalanin (AzF)	Iris Biotech GmbH
Pepton	Carl Roth GmbH
PeqGold Universal Agarose	Peqlab
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Biochrom GmbH
PolyG Primer	IBA Lifesciences
p-propargyloxy-L-Phenylalanin (pPa)	Iris biotech GmbH
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega GmbH
Salzsäure	Carl Roth GmbH
Silikon-Rhodamin-Azid (SiR)	Spirochrome
Spermidin	Merck KGaA
Strained cyclooct-2-en-1-methylcarbamat-Lysin (SCO)	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH
Sulfo-Cy3-Azid	Lumiprobe GmbH
Sulfo-Cy5-Azid	Lumiprobe GmbH
Trans-Cyclooct-2-en-L-Lysin (TCO)	Sirius Fine Chemicals SiChem GmbH
Tetramethylrhodamin-(TAMRA)-Azid	Lumiprobe GmbH
Tetrazin-Cy5	Jena Bioscience
Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)	Iris Biotech GmbH
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich GmbH
TRIZOL	Thermo Fisher Scientific
tRNATyrCUA	Eigene Herstellung
tRNAPylCUA	Biotech Rabbit GmbH/ Eigene Herstellung
tSerCUA	Biotech Rabbit GmbH
Tween-20	Sigma-Aldrich GmbH
Uridintriphosphat (UTP)	Roche Deutschland GmbH

2.1.2. Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von sämtlichen Puffern und Lösungen wurde ultrapures Wasser verwendet, welches mit Reversosmose und einem Ionenaustauscher (Arium 611V Laboratory water system, Sartorius) behandelt wurde. Im Folgenden wird das gereinigte Wasser mit ddH₂O abgekürzt.

Synthetase Herstellung

Synthetase Lager Puffer	50 mM HEPES pH 7,6
	10 mM KOAc
	1 mM MgCl ₂
	4 mM DTT

eAzFRS

Strep-Tag Aufreinigung

Strep-Tag Waschpuffer (10X) IBA GmbH

Strep-Tag Elutionspuffer (10X) IBA GmbH

Strep-Tag Regenerationspuffer mit HABA (10X) IBA GmbH

PyIRS-AF

His-Tag Aufreinigung

His-Tag Waschpuffer

50 mM NaH ₂ PO ₄
500 mM NaCl
20 mM Imidazol
pH 8,0

His-Tag Elutionspuffer

50 mM NaH ₂ PO ₄
500 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0

2.1.3. DNA Analytik

2-log DNA-Leiter (0,1-10 kB)	New England Biolabs GmbH
DNA Quantifizierungsstandard	Carl Roth GmbH
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis GmbH
Gel Ladepuffer (6X)	New England Biolabs GmbH
Tris Base Borat EDTA (10X TBE)	Carl Roth GmbH

2.1.4. Glykosidase AssayPNGase F Behandlung

Glykoprotein Denaturierungspuffer (10X)	New England Biolabs GmbH
G7 Reaktionspuffer (10X)	New England Biolabs GmbH
NP-40 (10 %)	New England Biolabs GmbH

Endo H Behandlung

Glykoprotein Denaturierungspuffer (10X)	New England Biolabs GmbH
G5 Reaktionspuffer (10X)	New England Biolabs GmbH

2.1.5. Heiße TCA Fällung und Szintillationsmessung

TCA/ Caseinhydrolysat:	10 % (v/v) TCA
	2 % (w/v) Caseinhydrolysat

TCA Lösung zum Absaugen mittels Vakuumanlage	5 % (v/v) TCA
---	---------------

Quicksafe A Szintillations Cocktail	Zinsser Analytic GmbH
-------------------------------------	-----------------------

2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

HotStar HiFidelity PCR Puffer (5X)	Qiagen GmbH
dNTPs	Qiagen GmbH
10X Taq Puffer	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 SDS-PAGE

NuPAGE MES SDS Laufpuffer (20X)	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE LDS Probenpuffer(4X)	Thermo Fisher Scientific
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Thermo Fisher Scientific
SeeBlue Plus Pre-Stained Standard	Thermo Fisher Scientific
SimplyBlue Safe Stain	Thermo Fisher Scientific

2.1.8. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs GmbH
DNase I	New England Biolabs
Kreatinkinase	Roche Deutschland GmbH
Endoglykosidase H (Endo H)	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase	Qiagen GmbH
Nuklease S7	Roche Deutschland GmbH
Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH
T7-RNA-Polymerase	Agilent

2.1.9. Medien*E. coli* Kultivierung

LB Medium	20 g/l
LB Agar Platten	20 g/l LB Medium 15 g/l Agar
Super optimales Nährmedium mit zugewetzter Glucose (SOC Medium)	20 g/l Pepton 5 g/l Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose pH 7,0
Insekten Zellmedium	Ex-Cell TiterHigh Medium, Sigma Aldrich
CHO Zellmedium	PowerCHO2 CD, Lonza

2.1.10. Zelllinien

<i>E. coli</i> K12 JM109	New England Biolabs GmbH
Spodoptera frugiperda (Sf21)	ECACC
Ovarien-Zellen des Chinesischen Zwerghamsters (CHO-K1)	ECACC

2.1.11. Kits

PureLink™ HiPure Plasmid Midikit Prep	Thermo Fisher Scientific
RTS 500 HY <i>E. coli</i> Kit	Biotech Rabbit GmbH
RTS 100 Wheat Germ CECF Kit	Biotech Rabbit GmbH
NanoGlo Luciferase Kit	Promega
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH
DyeEx 2.0 SpinKit	Qiagen GmbH
StrepTactin Purification Kit	IBA

2.1.12. Plasmide

pIX3.0-Nluc	Fraunhofer IZI
pcDNA3.1-ET-B	Fraunhofer IZI
pIX3.0-NCM-ET-B	Geneart, Thermo Fisher Scientific
pIX3.0-EPO_amb153	Fraunhofer IZI
pMA-RQ-Adora2a-CFP	Geneart, Thermo Fisher Scientific
pIX3.0-NCM-Adora2a-Nluc	In dieser Arbeit kloniert
pMA-RQ-Adora2a_amb215-CFP	Geneart, Thermo Fisher Scientific
pIX3.0-NCM-Adora2a_amb215-Nluc	In dieser Arbeit kloniert
pQE2-eAzFRS-SII	Fraunhofer IZI
pIVEX2.4d-PyIRS-AF	Biotechrabbit GmbH
pIVEX1.3WG-PyIRS-AF	In dieser Arbeit kloniert
pUC1.8k-NC-PyIRS-AF	BioCat GmbH
ptTyr Klon3	Biotechrabbit GmbH
pQE2-tPyICUA	Biotechrabbit GmbH

2.1.13. DNA Primer

Die gelisteten Primer wurden von der Firma IBA bezogen. Die Primer wurden durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von IBA gereinigt. Die folgenden Primersequenzen sind in 5' → 3' Richtung dargestellt.

M13for	GTA AAA CGA CGG CCA GTG
M13rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC
XF-Bio	Biotin –ATG ATA TCT CGA GCG GCC GCT AGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG
XR-Bio	Biotin –ATG ATA TCA CCG GTG AAT TCG GAT CCA AAA AAC CCC TCA AGA C
X-ETB-oeEXFP-R	CTT GCT CAC CTC TAG ACA AGA TGA GCT GTA TTT ATT ACT
eYFP-F	ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
x-EXFP-R	CTT GGT TAG TTA GTT ATT ACT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CG
tCUATyrEc-R (2'O-Me)	<u>TGG</u> TGG TGG GGG AAG GAT TCG
tCUAPylMm-R (2'O-Me)	<u>TGG</u> CGG AAA CCC CGG GAA TCT
tCUATyr-Ec-F	CGA GCT CGC CCA CCG GAA TTC
tCUAPyl-Mm-F	CGA GCT CGC CCA CCG GAA TTC
x-ETB-F	CTT TAA GAA GGA GAT AAA CAA TGC AGC CGC CTC CAA GTC
Mel-R	GTCCGCATAGATGTAAGAAATG
oeMel-Adora2a-F	TCTTACATCTATGCGGACCCCATCATGGGCTCCTCC
Oe-Adora2a-Nluc-R	CTTCGAGTGTGAAGACCTCTAGACAGCCGTTTCAGACGCAG
Nluc-F	CTT TAA GAA GGA GAT AAA CAA TGG TCT TCA CAC TCG AAG
x-Nluc-R	CTT GGT TAG TTA GTT ATT ACG CCA GAA TGC GTT CGC AC
PyIRS-AF-WG-StuI-F	GTTGCCAGGCCTATGTCTGGTTCTCATCATCAT
PyIRS-AF-WG-SmaI-R	TGGCTACCCGGGTTACAGGTTGGTACTAATACC

2.1.14. Aptamere

Anti-ATP-Aptamer (aAPT)

FAM-
TCACTGACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT

Hamilton Universität, Prof. Dr. John
Brennan, Yingfu Li ²⁴²

Kontroll-Aptamer (cAPT)Hamilton Universität, Prof. Dr. John Brennan, Yingfu Li ²⁴²

FAM-

TCACTGACCTGGGCCAGTATTGCGCTGGAAGGT

Block-SequenzHamilton Universität, Prof. Dr. John Brennan, Yingfu Li ²⁴²

CCCAGGTCAGTG-Dabcyl

2.1.15. Verbrauchsgegenstände

µ-Slide, IBIDI	IBIDI GmbH
10 % Bis-Tris Gele NuPAGE	Thermo Fisher Scientific
96-Well Nunc Mikrotiterplatte (Flacher Boden, weiß oder schwarz)	Thermo Fisher Scientific
Amicon Konzentrator (10 kDa und 30 kDa Cut-Off)	Amicon
Elektroporationsküvette (1 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gravity Flow StrepTactin Superflow Säule (0,2 ml)	IBA GmbH
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific GmbH
Glasfaserfilter (MN GF-3)	Macherey-Nagel GmbH
Immersionsöl 518F	Carl Zeiss AG
Ni-NTA Magnetische Beads	Qiagen GmbH
Parafilm	M Pechiney Plastic Packaging
Petrischalen (12 x 12 cm)	Greiner Bio-One International
Rotilabo Blottingpapier (1,0 mm)	Carl Roth GmbH
Szintillationsgefäße	Zinsser Analytic GmbH
Dialyse-Kammern (50 µl und 1 ml Reaktionsvolumen)	Biotechrabbit GmbH
Zeba Micro Spin Desalting Säule (7 kDa Molekularer Gewichts-Cut-Off)	Thermo Fisher Scientific

2.1.16. Geräte

Agarose Gel Bildgerät (Gel iX Imager)	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Agarose Gel System (PerfectBlue Gelsystem)	Peqlab Biotechnologies GmbH
Arium 611V Reinstwassersystem	Sartorius AG
Waagen (BP41005 und BP211D)	Sartorius AG

Bioreaktor Biostat B-DCU II	Sartorius AG
Zentrifugen (5415 D und 5424 R)	Eppendorf AG
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter GmbH
DNA Engine PTC-200 PCR Gerät	Bio-Rad Laboratories
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresesystem	Thermo Fisher Scientific
Vakuumtrockner (Unigeldryer 3545 D)	UniEquip Laborgerätebau und Vertriebs GmbH
Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH
Phosphor-Screen Löschstation	GE Healthcare
Inkubator BD23	BINDER GmbH
Inkubationsschüttler Innova44	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler Multifors	Infors GmbH
LSM 510 (Konfokales Laser-Scanning- Mikroskop)	Carl Zeiss AG
Mithras ² LB 943 Monochromator Plattenlesegerät	Berthold Technologies GmbH
NanoDrop ND2000c Spektrometer	Thermo Fisher Scientific
Orbitalschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH
pH Messgerät Orion Star A211	Thermo Fisher Scientific
pH Elektrode Orion 822BNWP	Thermo Fisher Scientific
Szintillationszähler	Beckman Coulter GmbH
Phosphor Bildschirm	GE Healthcare
Typhoon Trio + Variable Mode Bilderfassungsgerät	GE Healthcare
Amersham RGB	GE Healthcare
Vakuum Filtrationssystem (FH225V)	Hofer, Inc.
Vibrax VXR	IKA
Vortex Genie 2	Scientific Industries
2.1.17. Softwares	
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software
ImageQuantTL	GE-Healthcare
Intas Science Imaging	Intas Science Imaging Instruments GmbH

LSM Image Browser und Zen 2009	Carl Zeiss AG
Mikrowin 2000 und Mikrowin 2010	Berthold Technologies GmbH
NanoDrop 2000c Software	Thermo Fisher Scientific

2.2. Methoden

2.2.1. Generierung von linearen DNA-Templaten mittels Expressions-Polymerase-Kettenreaktion (E-PCR)

Regulatorische Elemente, die essentiell für die Initiation und Termination der *in vitro* Transkription und Translation sind, wurden an die codierende Sequenz des ausgewählten Gens in Form von 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR) mit Hilfe der E-PCR fusioniert²⁴³. Die regulatorischen Elemente setzen sich aus einem T7-Promotor, Haarnadelstrukturen (*stem loop* Sequenzen), einer ribosomalen Bindestelle, und einem T7-Terminator zusammen. Optional kann die Sequenz für einen Affinitätstag für eine spätere Aufreinigung des Zielproteins mit eingeführt werden.

Das DNA-Templat des ET-B-eYFP-Rezeptors wurde mittels einer zweistufigen PCR generiert. In der ersten Stufe wurden genspezifische Primer verwendet, die am 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden Gens ansetzten. Zusätzlich besaßen die Primer der ersten Stufe spezifische 5'Enden, die eine Hybridisierung mit den Primern der zweiten Stufe bzw. dem zu fusionierenden DNA-Fragment (eYFP) ermöglichten. Für die Generierung von linearen DNA-Templaten wurde entweder die HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase (HiFi) oder die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Die HiFi wurde aufgrund der vorhandenen 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (*proof reading*) für PCRs bevorzugt.

Das DNA-Templat des Adenosin-Rezeptors A2a wurde von der Firma GeneArt (GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher) auf Grundlage der veröffentlichten Sequenz der Uniprot Datenbank (P29274) synthetisiert. Dieses Plasmid diente als Grundlage für die Einführung einer dem Gen vorgeschalteten Melittin-Signalsequenz sowie einer nachgeschalteten Nanoluziferase Gensequenz. Die Fusionierung wurde in einer dreistufigen PCR durchgeführt. In der ersten Stufe wurden genspezifische Primer verwendet mit einem Überhang zur Melittin-Signalsequenz und der Nluc Sequenz (oe-Adora2a-Nluc-R). Für die zweite Stufe wurde ein im Vorfeld hergestelltes PCR-Produkt bestehend aus regulatorischen Sequenzen (N), der IRES-Sequenz (C), sowie der Melittin-Signalsequenz (M) benötigt. Dieses Konstrukt wurde aus dem pIX3.0-NCM-Nluc-Plasmid mit den Vorwärtsprimer XF und dem reversen Primer Mel-R amplifiziert. Das NCM-PCR-Produkt wurde in äquimolarer Menge zum Adora2a-PCR-Produkt in der zweiten Stufe eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern XF und dem bereits in der ersten Stufe verwendeten Primer mit dem Überhang zu der Nluc Sequenz (oe-Adora2a-Nluc-R). Bei Verwendung der reversen Primer wurde ein neun Nukleotid großer Spacer zwischen der Adora2a- und Reporterproteinsequenz eingeführt. Für die dritte Stufe wurden im Vorfeld das Gen der Nluc mit genspezifischen Primern (pIX3.0-Nluc mit Nluc-F und Nluc-R) amplifiziert. Die erhaltenen Produkte wurden analog zur zweiten PCR-Stufe in äquimolaren Verhältnissen zum NCM-Adora2a-PCR-Produkt eingesetzt.

Da der pIVEX2.4d-Vektor nicht für eine zellfreie Synthese der PyIRS-AF in einem zellfreien Weizenkeimsystem geeignet ist, wurden über eine PCR spezifische Schnittstellen (Stul und

SmaI) an das Gen der PyIRS-AF für eine Umklonierung angefügt. Die Amplifizierung erfolgte mit den Primern PyIRS-AF-WG-Stul-F und PyIRS-AF-WG-SmaI-R.

Eine Standard-PCR wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Zusammensetzung einer Standard-PCR durchgeführt mit der Taq-DNA-Polymerase oder der HiFi-DNA-Polymerase

Taq-DNA-Polymerase-PCR		HiFi-DNA-Polymerase-PCR	
Komponente	Endkonzentration	Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel	ddH ₂ O	variabel
Taq Puffer	1x	HiFi Puffer	1x
dNTPs	0,2 mM	Primer-F	0,3 µM
Primer-F	0,3 µM	Primer-R	0,3 µM
Primer-R	0,3 µM	DNA Templat	0,4 ng/µl
MgCl ₂	2,5 mM	Polymerase	0,05 U/µl
DNA Templat	0,4 ng/µl		
Polymerase	0,025 U/µl		

Das PCR Protokoll wurde entsprechend der Länge des verwendeten Gens angepasst (Tabelle 2).

Tabelle 2. Standard-PCR Programm. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Primerhybridisierung ermittelt. Die Elongationszeiten wurden entsprechend der Genlänge berechnet.

Cycle Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	30-45x
Annealing	variabel	1 min	
Elongation	72 °C (<2kb)	1 min/1 kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Ende	4 °C		

Die Annealingtemperaturen der eingesetzten Primer wurden anhand folgender Formeln berechnet:

$$\text{Annealingtemperatur} = \text{Schmelztemperatur} - 5\text{ °C}$$

$$\text{Schmelztemperatur} = 2\text{ °C} * (\text{Anzahl an Adenin} + \text{Thymin}) + 4\text{ °C} * (\text{Anzahl an Guanin} + \text{Cytosin})$$

Die Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des Gens bestimmt (1 min/1 kb). Die erhaltenen PCR Produkte wurden mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit den theoretisch berechneten DNA-Fragment-Größen verglichen.

2.2.2. Generierung von Expressionsplasmiden

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine höhere Ausbeute des Zielproteins durch den Einsatz von Expressionsplasmiden erreicht werden konnte²⁴⁴. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zirkuläre DNA Template in Form von Expressionsvektoren hergestellt.

Für die Generierung von Expressionsvektoren wurde das Grundgerüst des Vektors pIX3.0 (Qiagen) verwendet. In diesen wurden die generierten linearen DNA Template nach einem Restriktionsverdau ligiert.

2.2.3. Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte der Adora2a-Konstrukte sowie der pIX3.0-Vektor wurden mit identischen Restriktionsenzymen (NheI und BamHI) verdaut. Das generierte PCR-Produkt für die Umklonierung der PyIRS-AF sowie der pIVEX1.3WG Vektor wurden mit StuI und SmaI verdaut. Durch die Auswahl der Restriktionsenzyme wurden *sticky ends* erzeugt, sodass das PCR-Produkt in nur einer Orientierung ligiert werden konnte. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie angegeben zusammen (Tabelle 3).

Tabelle 3. Reaktion eines Standard-Restriktionsverdaus. Die Restriktionsenzyme wurden anhand der Gensequenz des Adora2a ausgewählt, sodass sie nicht im Gen selbst schneiden.

Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel
Cutsmart Puffer	1x
BamHI	0,25 U/μl
NheI	0,25 U/μl
PCR-Produkt oder Vektor	50 ng/μl

Der Verdau wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsenzyme wurden im Anschluss bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Die verdauten PCR-Produkte bzw. der verdaute Vektor wurden im Anschluss mit einer Größenausschlusschromatographie gereinigt (QIAquick-PCR-Purification Kit, Qiagen) und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.4. Ligation

Der geschnittene pIX3.0-Vektor und der pIVEX1.3WG-Vektor wurde im Folgenden mit der Alkalinen Phosphatase (CIP, 2,5 U/ μg Vektor) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch die CIP werden die 5'- und 3'- Enden des linearisierten Vektors dephosphoryliert, sodass eine Religation unterbunden wird. Das geschnittene PCR-Produkt wurde in einem molaren Verhältnis zum geschnittenen Vektor von 5:1 eingesetzt und mit folgender Formel bestimmt.

$$\text{Volumen PCR Produkt } (\mu\text{l}) = \frac{5 * \text{Menge des Vektors (ng)} * \text{Länge des PCR Produktes (bp)}}{\text{Länge des Vektors (bp)} * \text{Konzentration des PCR Produktes } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

Ein typischer Ligationsansatz wurde wie in Tabelle 4 pipettiert.

Tabelle 4. Reaktion eines Standard-Ligationsansatzes. Es wurden standardmäßig 25 ng verdauter Vektor in einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt.

Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel
T4-DNA-Ligase Puffer	1x
Vektor	2,5 ng/µl
PCR Produkt	Bestimmt nach Formel (3)
T4-DNA-Ligase	1 U/µl

Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C ohne schütteln inkubiert. Die T4-DNA-Ligase wurde im Anschluss bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

2.2.5. Transformation der Plasmid DNA

Es wurden 0,5 µl der ligierten DNA Konstrukte mit 20 µl aufgetauten elektrokompetenten Zellen (*E. coli* JM109 Zellen) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und entsprechend eines Standardprotokolls des Gene Pulser Xcell Electroporation Systems behandelt (Biorad, 1800 V, 5-6 ms Pulszeit). Nach Anlegen des Pulses wurden die transformierten Zellen in 37 °C erwärmtem SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 150 µl dieser Lösung wurden auf LB Agarplatten ausgestrichen (f.c. 100 µg/ml Ampicillin) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weitere Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

2.2.6. Kolonie-PCR

Einzelne Bakterienkolonien wurden von der LB Agar Platte gepickt und in 30 µl ddH₂O resuspendiert. 4 µl der Klonsuspension wurde für eine anschließende PCR mit der Taq-DNA-Polymerase verwendet (Tabelle 1). Das PCR-Programm (Tabelle 2) wurde um einen anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min erweitert. Die restliche Klonsuspension wurde in 200 µl LB-Medium aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die amplifizierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bakterienkolonien die eine erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes zeigten, wurden in einer Übernachtskultur angezogen. Es wurden Glycerinstocks (600 µl Übernachtskultur gemischt mit 200 µl 80 % (v/v) Glycerin) angelegt und diese bei -80 °C gelagert.

2.2.7. Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen wurden mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Es wurden folgende Abweichungen vom Benutzerhandbuch durchgeführt: Die Pelletierung der *E. coli* Zellen erfolgte bei 5000 x g für 10 min und 18 °C. Der Resuspensionspuffer (R3) wurde ohne Zusatz von RNase A verwendet. Um eine effektivere RNA-Fällung zu erreichen wurde ein um 10% erhöhtes Volumen (4,4 ml bei einer Midi-Präparation) des Präzipitationspuffers (N3) eingesetzt. Nach der Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde bei 15000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die luftgetrockneten Pellets wurden in 50-100 µl ddH₂O aufgenommen und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde für 5 min bei 15000 x g zentrifugiert und der Überstand isoliert. Die isolierte DNA wurde quantitativ über NanoDrop-Messung und qualitativ über ein Agarosegel analysiert.

2.2.8. Analyse von Nukleinsäuren

Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels einem 1 % (w/v) Agarosegel. Dafür wurde Agarose in 1 x TBE-Puffer unter Erwärmen gelöst. Nach einer kurzen Abkühlung wurde der Farbstoff DNA Stain Clear G (Serva, 3 µl pro 100 ml Agaroselösung) hinzugefügt und die Lösung in eine Elektrophoresekammer gegeben. Nach der Polymerisation der Agarose wurde die Kammer mit 1 x TBE-Puffer befüllt und die Proben aufgetragen. Die Probe setzte sich standardmäßig aus 1 µl DNA-Templat, 2 µl DNA-Ladepuffer und 9 µl ddH₂O zusammen. Zur Größenidentifizierung wurde eine DNA-Leiter mit definierten Bandengrößen vorbereitet (0,4 µl 2-log DNA Leiter, 2 µl DNA-Ladepuffer und 9,6 µl ddH₂O). Des Weiteren wurde ein 1000 bp Standard mit einer Konzentration von 100 ng/µl mitgeführt (1 µl Standard, 2 µl DNA-Ladepuffer und 9 µl ddH₂O). Die Gelelektrophorese wurde bei 90-120 V für 1-1,5 h durchgeführt. Die DNA-Banden wurden mittels UV-Transilluminator (305 nm) visualisiert.

Für die Analyse von mRNAs wurde, wie eben beschrieben, ein 1% (w/v) Agarosegel verwendet. Die Probenzusammensetzung erfolgte aus 250 ng mRNA, 6 µl MOPS-Probenpuffer und ddH₂O ad 10 µl. Die RNA-Leiter setzte sich aus 2 µl ssRNA Leiter (NEB) und 6 µl MOPS-Probenpuffer zusammen. Die Gelelektrophorese wurde bei 70-90 V für 1-1,5 h durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls mittels Transilluminator bei 305 nm.

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm. Die Konzentration wurde durch Nutzung der folgenden Formeln bestimmt:

$$Absorption(260nm) = 1 = 40 \frac{\mu g}{ml} (RNA)$$

$$Absorption(260 nm) = 1 = 50 \frac{\mu g}{ml} (DNA)$$

Die Reinheit der DNA bzw. RNA Probe wurde aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bestimmt.

Sequenzierung

Plasmide, die nach einem Restriktionsverdau das erwartete Bandenmuster aufzeigten, wurden sequenziert. Für diesen Zweck wurde eine Plasmidlösung mit einer Konzentration von 100 ng/µl bzw. eine PCR-Produkt-Lösung von 40 ng/µl hergestellt und dem Sequenzierservice LGC Genomics (Berlin) übergeben. Der Standardvektor pIX3.0 wurde mit einem M13-21F-Primer sowie einem M13-24R-Primer, die jeweils an die M13-Regionen des Plasmides binden, sequenziert. Die Konstrukte mit einem pVEX1.3WG-Rückrat wurden mit den Primern (M13-F und pVEX1.3WG-R) vorgemischt und eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm CloneManager 8 analysiert.

2.2.9. Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese wurde auf Basis von Lysaten aus kultivierten *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) Zellen und kultivierten Zellen aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (CHO) durchgeführt. Die Herstellung der Lysate wurde durch Lena Thoring, Dana Wenzel und Doreen A. Wüstenhagen übernommen. Sf21-Zellen wurden in

Schüttelkolben bei 27 °C in einem chemisch definierten und serumfreien Zellmedium kultiviert, bis eine Zelldichte von ca. 4×10^6 Zellen/ml erreicht wurde. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 200 x g für 10 min geerntet und in einem Aufschlusspuffer resuspendiert (40 mM, HEPES-KOH pH 7,6, 100 mM KOAc und 4 mM DTT). Die resuspendierte Zelllösung wurde durch eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 20 Gauge gedrückt, sodass die Plasmamembran mechanisch aufgebrochen wurde. Nach dem Aufschluss wurde die Zelllösung bei 6500 x g für 10 min zentrifugiert, um den Zellkern und die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte Sephadex G-25 Säule gegeben. Es wurden die Elutionsfraktionen mit dem höchsten Quotienten aus RNA zu Protein gesammelt und vereint. Endogene mRNA wurde mit der S7 *Micrococcal* Nuklease (10 U/ml) in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 bei Raumtemperatur für 20 min verdaut. Die Inaktivierung der kalziumabhängigen Nuklease erfolgte durch die Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen mit 6,7 mM EGTA. Für die spätere Regeneration von ATP wurde das Lysat mit dem Energie-generierenden Enzym Kreatinkinase supplementiert (finale Konzentration von 100 µg/ml), welches ATP aus Kreatinphosphat und ADP generiert. Das hergestellte Lysate wurde aliquotiert und nach der Schockfrierung mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Die Herstellung von Lysaten auf Basis von CHO-Zellen erfolgte analog zur eben beschriebenen Lysatherstellung. Die Kultivierung erfolgte in einem Biostat B-DCU II Bioreaktor (Sartorius Stedim Biotech GmbH) bei 37 °C mit einem chemisch definierten und serumfreien Zellmedium bis zu einer Zelldichte von $3,5\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Aufschluss wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Im Aufschlusspuffer wurde 100 mM NaOAc anstatt KOAc verwendet. Die Entfernung des Zellkerns sowie der Zelltrümmer erfolgte bei einer Zentrifugation von 6500 x g für 15 min. Zusätzlich wurde der Verdau mit der S7 *Micrococcal* Nuklease auf eine Zeit von 2 min reduziert. Die gewonnenen Lysate wurden in Aliquoten nach dem Schockfrostern mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

2.2.10. Zellfreie Proteinsynthese im Batch-Format

Die zellfreie Proteinsynthese im Batch-Format kann in zwei verschiedenen Modi durchgeführt werden. Im gekoppelten Modus finden Transkription und Translation parallel in einem Reaktionsgefäß statt. Im *linked* Modus werden Transkription und Translation nacheinander in separierten Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Zellfreie Proteinsynthese im *linked* Modus im Sf21-Lysat

Für die Transkriptionsreaktion wurden DNA-Templates mit einem T7-Promotor eingesetzt. Die verwendeten Komponenten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Standard-Transkriptionsreaktion. Die eingesetzten Komponenten wurden in vorbereiteten Mixen eingesetzt.

Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel
Transkriptionspuffer	1x
NTP-Mix	1x
Enzym-Mix	1x
DNA-Templat	60 ng/µl

Die Transkriptionsreaktion wurde über Nacht bei 37 °C und 500 rpm durchgeführt. Die erhaltene mRNA wurde bei 12000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Überstand mittels Gelfiltration von Salzen und niedrigmolekularen Stoffen gereinigt (DyeEx Spin Columns, Qiagen). Die Konzentration der gereinigten mRNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Darüber hinaus wurde die Integrität der mRNA durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Die anschließende Translationsreaktion setzte sich aus den in Tabelle 6 dargestellten Komponenten zusammen.

Tabelle 6. Verwendete Komponenten in der Translationsreaktion im Sf21-Lysat im *linked* Modus

Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel
Sf21-Lysat	40% (v/v)
HEPES-KOH (pH 7,6)	30 mM
Aminosäuren	200 µM
Mg(OAc) ₂	2,5 mM
KOAc	75 mM
Spermidin	0,25 mM
Kreatinphosphat	20 mM
Kreatinkinase	100 µg/ml
ATP	0-5 mM (Standard: 1,75 mM)
GTP	0,3 mM
mRNA	300-400 ng/µl

Die Reaktion wurde bei 27 °C für 2 h unter leichtem Schütteln (500 rpm) durchgeführt.

Regulation der zellfreien Proteinsynthese im *linked* Sf21-Lysat durch ein ATP-bindendes Aptamer

Durch die Zugabe eines ATP-bindendes Aptamer (aAPT) zur zellfreien Synthese wurde der Einfluss von freien ATP auf die Proteinausbeute analysiert. Zu Beginn wurde das Aptamer auf seine Fähigkeit ATP zu binden überprüft. Für diesen Zweck wurden 1 µM des aAPT im Vergleich zu einem 1 µM konzentriertem Kontroll-Aptamer (cAPT), welches kein ATP bindet, mit einer komplementären DNA-Sequenz (1,5 µM) inkubiert, welche das Carboxyfluorescein (FAM) am 5'-Ende des jeweiligen Aptamers quencht. Im Anschluss wurden 3 mM ATP zum Ansatz gegeben. Die jeweilige Intensitätsänderung in der Fluoreszenz des FAMs wurde bei einer Anregung bei 485 nm und einer Emission von 520 nm gemessen.

Die Zugabe des jeweiligen Aptamers zur zellfreien Proteinsynthese des Modelproteins Nluc erfolgte in den Konzentrationen 0, 1, 10, 20, 50 und 100 µM. Der Effekt des jeweiligen

Aptamers auf die Synthese wurde über Autoradiographie und der Messung der Lumineszenz der Nluc ermittelt.

Zellfreie Proteinsynthese im gekoppelten Modus im Sf21- und CHO-Lysat

Die zellfreie Proteinsynthese im gekoppelten Modus setzte sich aus den in Tabelle 7 dargestellten Komponenten zusammen:

Tabelle 7. Verwendete Komponenten in der Translationsreaktion im Sf21- und CHO-Lysat im gekoppelten Modus

Komponente	Endkonzentration (Cap-abhängig)	Endkonzentration (IRES-abhängig)
ddH ₂ O	variabel	variabel
Lysat	40% (v/v)	40% (v/v)
HEPES-KOH (pH 7,6)	30 mM	30 mM
Aminosäuren	100 µM	100 µM
Mg(OAc) ₂	2,5 mM	3,9 mM
KOAc	75 mM	150 mM
Spermidin	0,25 mM	0,25 mM
Kreatinphosphat	20 mM	20 mM
Kreatinkinase	100 µg/ml	100 µg/ml
ATP	1,75 mM	1,75 mM
GTP, CTP, UTP	0,3 mM	0,3 mM
m ⁷ G(ppp)G-Cap	0,33 mM	0,1 mM
T7 RNA Polymerase	1 U/µl	1 U/µl
DTT	2,5 mM	2,5 mM
PolyG (IRES)	10 µM	10 µM
DNA	60 ng/µl	60 ng/µl
Temperatur	27 °C (Sf21)	27 °C (Sf21) 30 °C (CHO)

Für die folgende Analytik wurde sowohl im *linked* als auch im gekoppelten Modus ¹⁴C-Leucin (30-60 µM) in der Synthese eingesetzt. Durch den statistischen Einbau des ¹⁴C-Leucins in das *de novo* synthetisierte Protein kann im Folgenden eine quantitative und qualitative Analyse erfolgen.

Zellfreie Synthese von markierten Proteinen durch die Nutzung von vorbeladenen tRNAs (BODIPY-TMR-Lysin)

Für die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen können vorbeladene tRNAs verwendet werden, die im Vorfeld an eine Aminosäure mit einem gekoppelten Farbstoff aminoacyliert wurden. Abhängig vom Anticodon der ausgewählten tRNA können spezifische Codons adressiert werden. In dieser Arbeit wurde zum einen eine vorbeladene tRNA verwendet, deren Anticodon (GAA) sich gegen das Phenylalanin-Codon UUC richtet und somit zu einem statistischen Einbau der fluoreszierenden Aminosäure in das Zielprotein führt. Zum anderen wurde eine vorbeladene tRNA verwendet, deren Anticodon (CUA) komplementär zum Amber-Stopcodon UAG ist, wodurch sich das Fluoreszenzlabel an einer ausgewählten Stelle im Protein befindet. Nach der Erkennung des entsprechenden Codons wird ein Lysin an die Polypeptidkette angefügt, welches an einen BODIPY-Tetramethylrhodamin-Farbstoff gekoppelt ist. Die jeweilige tRNA wurde in einer Endkonzentration von 2 μM der zellfreien Synthese zugeführt.

2.2.11. Herstellung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

E. coli Tyrosin-tRNA-Synthetase (eAzFRS)

Die Synthese der eAzFRS vom Plasmid pQE2-eAzFRS-SII erfolgte im „RTS500 *E. coli* HY Kit“ nach Angaben des Benutzerhandbuches. Es wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 100 mM) zur Induktion der Synthese zugeführt. Die Endkonzentration des eingesetzten Plasmides betrug 100 ng/ μl . Die Reaktion wurde über 24 h bei 30 °C in einem Zweikammersystem mit einem Reaktionsvolumen von 1 ml und einem Versorgungsvolumen von 11 ml durchgeführt. Nach Reaktionsabschluss wurde das Gemisch bei 16000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um den löslichen Anteil zu erhalten. Der lösliche Anteil der Synthetase wurde über den C-terminalen Strep-Tag II unter Verwendung von StrepTactin Gravity Flow Columns (0,2 ml, IBA) nach den Angaben im Benutzerhandbuch isoliert. Es wurde von jeder Fraktion ein Aliquot aufgefangen und mittels SDS-PAGE auf ihren Anteil an isolierter Synthetase überprüft. Die Elutionsfraktionen mit isolierter Synthetase wurden vereint und mit Hilfe von Zeba™ Micro Spin Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific) mit einem Molekulargewichts-Cut-Off von 7 kDa umgepuffert. Für die Umpufferung wurde der Synthetase-Lagerpuffer verwendet. Im Anschluss wurde die Synthetase durch die Verwendung von Amicon Centrifugal Filter Devices (0,5 ml, 10 kDa cut-off) aufkonzentriert. Die Konzentration wurde mittels Absorptionsmessung unter Verwendung des Molekulargewichtes und des Extinktionskoeffizienten am Nanodrop 2000 c Spektralphotometer bestimmt. Die erhaltene Synthetase wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Aliquoten bei -80 °C gelagert.

Methanosarcina mazei Pyrrolysin-tRNA-Synthetase (PyIRS-AF)

Die Herstellung der PyIRS-AF vom Plasmid pIVEX2.4d-PyIRS-AF erfolgte analog zur Herstellung der eAzFRS im RTS500 *E. coli* HY Kit nach Angaben des Benutzerhandbuches. Der lösliche Anteil der Synthetase wurde nach einer Zentrifugation bei 16000 x g, 4 °C und 10 min gewonnen. Die Isolation erfolgte über den N-terminalen 6 x Histidin-Tag unter Verwendung von „Ni-NTA Magnetic Agarose Beads“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die gesammelten Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, mittels SDS-PAGE analysiert und die Elutionsfraktionen mit enthaltener Synthetase vereint. Die Umpufferung, Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung erfolgte analog zur eAzFRS. Die Lagerung erfolgte nach der Behandlung mit flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

Zusätzlich erfolgte die Herstellung der PyIRS-AF im zellfreien Weizenkeim-, Sf21- und CHO-Dialyse-System, um ein optimales Herstellungsverfahren der PyIRS-AF zu identifizieren. Die Synthese im zellfreien Weizenkeimsystem erfolgte vom Plasmid pIVEX1.3WG-PyIRS-AF analog zu den Angaben des Herstellers mit dem RTS 100 Wheat Germ CECF Kit von BiotechRabbit.

Die zellfreie Synthese im Dialysemodus mit Sf21- oder CHO-Lysat vom Plasmid pUC1.8k-NC-PyIRS-AF erfolgte wie in Tabelle 8 dargestellt. Die Analyse der Funktionalität der PyIRS-AF erfolgte über den direkten Einsatz des Überstandes in eine zweite zellfreie Reaktion.

Tabelle 8. Verwendete Komponenten in der Translationsreaktion im Sf21- und CHO-Lysat im Dialysemodus. Durch ein x gekennzeichnet sind diejenigen Komponenten, welche ebenfalls im Feeding Mix vorhanden waren.

Komponente	Reaktionsmix (Sf21)	Feeding Mix	Reaktionsmix (CHO)	Feeding Mix
ddH ₂ O	variabel	x	variabel	x
Lysat	40% (v/v)		40% (v/v)	
HEPES-KOH (pH 7,6)	30 mM	x	30 mM	x
Aminosäuren	100 µM	x	100 µM	x
Mg(OAc) ₂	3,9 mM	x	22 mM	x (3,9 mM)
KOAc	150 mM	x	150 mM	x
Spermidin	0,25 mM	x	0,25 mM	x
Kreatinphosphat	20 mM	x	18,5 mM	x
Kreatinkinase	100 µg/ml		100 µg/ml	
ATP	1,75 mM	x	1,75 mM	x
GTP, CTP, UTP	0,3 mM	x	0,3 mM	x
m ⁷ G(ppp)G-Cap	0,1 mM	x	-	
T7 RNA Polymerase	1 U/µl		1 U/µl	
DTT	2,5 mM	x	2,5 mM	x
Natriumazid	0,02 %	x	0,02 %	x
DNA	60 ng/µl		90 ng/µl	
PolyG (IRES)	10 µM	x		
Caspase Inhibitor (Z-VAD-FMK)	30 µM	x	30 µM (AC-DEVD CMK)	x
Temperatur	27	x	30 °C	x
Dauer	24 h	x	48 h	x

Für die folgende Analytik wurde ^{14}C -Leucin ($10\ \mu\text{M}$) der Synthese hinzugesetzt. Durch den statistischen Einbau des ^{14}C -Leucins in das *de novo* synthetisierte Protein kann im Folgenden eine quantitative und qualitative Analyse erfolgen.

2.2.12. Herstellung von Suppressions-tRNA (*tRNA^{Tyr}CUA* und *tRNA^{Py}ICUA*)

Die Herstellung der tRNA erfolgte nach einem dreistufigen Protokoll bestehend aus PCR-Produkt Herstellung, Generierung des RNA Transkriptes und der RNA Isolation und Faltung. In der ersten Stufe wurde ein PCR-Produkt unter Verwendung eines genspezifischen Forward- sowie eines genspezifischen und methylierten Reverse-Primers (2'-OMe) hergestellt. Durch die Methylierung wird verhindert, dass in der anschließenden Transkription durch die T7 RNA Polymerase unspezifische Nukleotide an das 3'-Ende der tRNA angefügt werden. Die Amplifikation des Templates erfolgte wie in Tabelle 9 beschrieben. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes wurde dieses in der anschließenden Transkriptionsreaktion eingesetzt.

Tabelle 9. Transkriptionsreaktion. Die eingesetzten Komponenten wurden in vorbereiteten Mixen eingesetzt.

Komponente	Endkonzentration
ddH ₂ O	variabel
Transkriptionspuffer	1x
NTP-Mix	1x
Enzym-Mix	1x
DNA-Templat	8 ng/ μl

Die Transkriptionsreaktion wurde über Nacht bei $37\ ^\circ\text{C}$ und 500 rpm inkubiert. Das erhaltene Transkript wurde für eine Minute bei $12000\ \times\ \text{g}$ zentrifugiert und der Überstand für die folgende DNase I (1 U DNase I pro $1\ \mu\text{g}$ DNA, 10 min $37\ ^\circ\text{C}$, 500 rpm) Behandlung verwendet. Die RNA Isolation erfolgte mittels einer TRIzol/Chloroform-Isolation. Es wurde ein dreifaches Volumen an TRIzol zu der Transkriptionsreaktion pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden $200\ \mu\text{l}$ Chloroform pro Milliliter TRIzol hinzugefügt, gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde für 15 min bei $12000\ \times\ \text{g}$ und $4\ ^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Aus den drei entstandenen Phasen wurde die wässrige Phase isoliert und mit $500\ \mu\text{l}$ Isopropanol pro eingesetzten Milliliter TRIzol gemischt und über Nacht bei $4\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Gemisch wurde am nächsten Tag für mindestens eine Stunde bei $15000\ \times\ \text{g}$ und $4\ ^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 75 % Ethanol überschichtet und für 30 min bei $-20\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Ethanol wurde nach einer Zentrifugation bei $7500\ \times\ \text{g}$, 10 min und $4\ ^\circ\text{C}$ entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in Wasser gelöst und am NanoDrop vermessen. Die hergestellte tRNA wurde anschließend im PCR-Cycler durch eine langsame Kühlung der Temperatur von $80\ ^\circ\text{C}$ auf $25\ ^\circ\text{C}$ gefaltet. Die Lagerung erfolgte nach einer Schockfrierung in flüssigem Stickstoff bei $-80\ ^\circ\text{C}$.

2.2.13. Zellfreie Synthese von modifizierten Proteinen durch die Einführung von nicht-kanonischen Aminosäuren

Der Einbau von verschiedenen nicht-kanonischen Aminosäuren durch Amber-Suppression erfolgte durch die Zugabe eines spezifischen tRNA/tRNA-Synthetase-Paares. Die verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren mit dem jeweiligen orthogonalen Paar sind in Tabelle 10 dargestellt. Eine Übersicht der nkAs mit den entsprechenden Reaktionspartnern befindet sich in Abbildung S1 im Anhang.

Tabelle 10. Nicht-kanonische Aminosäuren und orthogonale Paare, die in der Arbeit für die Modifizierung von Proteinen verwendet wurden

Nicht-kanonische Aminosäure (nkAs)	Suppressions-tRNA	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
p-Azido-L-Phenylalanin (AzF)	tRNATyrCUA	eAzFRS
p-Propagyoxy-L-Phenylalanin (pPa)	tRNATyrCUA	eAzFRS
Azido-L-Lysin (AzL)	tRNAPylCUA	PylIRS-AF
Cyclooctin-L-Lysin (SCO)	tRNAPylCUA	PylIRS-AF
Trans-Cyclooct-2-en-L-Lysin (TCO)	tRNAPylCUA	PylIRS-AF

Optimale Konzentrationen von nicht-kanonischer Aminosäure, Suppressions-tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase wurden in dieser Arbeit bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 1-2 mM der jeweiligen nkAs, 3-5 μ M der Suppressions-tRNA sowie 3-5 μ M der eAzFRS bzw. der Überstand der PylIRS-AF zur zellfreien Reaktion zugeführt. Die zellfreie Reaktion wurde wie in Tab. 7 beschrieben durchgeführt.

Für die anschließende Markierungs-Reaktion wurde die zellfreie Reaktion fraktioniert. Die Fraktionierung des Translationsmixes erfolgte durch Zentrifugation bei 16000 x g, 15 min und 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Pellet in PBS resuspendiert. Für das Lösen des Pellets wurde ein äquivalentes Volumen zum Translationsmix verwendet. Das gelöste Pellet wurde für die nachfolgende Markierungsreaktion des Adora2a genutzt. Für die Markierung von EPO erfolgte die Resuspendierung des Pellets in PBS mit 0,2 % DDM, um EPO aus dem Lumen der Mikrosomen heraus zu lösen.

2.2.14. Selektive Modifikation der reaktiven Gruppen der eingebauten nicht-kanonischen Aminosäuren

Staudinger-Ligation

Das reaktive Azid der eingebauten AzF oder AzL kann in einem weiteren Schritt mit einem Phosphin reagieren. Dieser Mechanismus wurde für die Fluoreszenz-Markierung mit DyLight650-Phosphin (Thermo Fisher Scientific) angewandt. Nach der zellfreien Synthese wurde die mikrosomale Fraktion (MF) in PBS gelöst und mit 3 μ M DyLight650-Phosphin für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde während der Inkubationszeit abgedunkelt.

Kupfer(I)-katalysierte Klick-Chemie (CuAAC)

Zur Durchführung der CuAAC wurde Azidocoumarin mit verschiedenen Alkin-modifizierten Molekülen (Alexa Fluor 647-Alkin (AF647-Alkin) oder die nkAs pPa) sowie mit verschiedenen Cu(I)-stabilisierende Liganden (THPTA oder L-Histidin) inkubiert. Die erfolgreiche Umsetzung der Klickreaktion wurde anhand des entstandenen fluoreszierenden Moleküls durch die Aufnahme eines Spektrums im Bereich von 435 nm bis 545 nm detektiert. Die Zusammensetzung der analysierten Ansätze ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Ansätze wurden für zwei Stunden inkubiert.

Tabelle 11. Analyse der optimalen Zusammensetzung einer CuAAC. Angegeben sind die verwendeten Endkonzentrationen.

Ansatz	Azido-coumarin	CuSO ₄	NaAsc	pPa	AF647-Alkin	THPTA	L-Histidin
1	50 µM	100 µM	5 mM	100 µM	-	300 µM	-
2	50 µM	100 µM	5 mM	100 µM	-	-	300 µM
3	50 µM	100 µM	5 mM	-	100 µM	300 µM	-
4	50 µM	100 µM	5 mM	-	100 µM	-	300 µM
5	50 µM	-	5 mM	100 µM	-	300 µM	-
6	50 µM	-	5 mM	100 µM	-	-	300 µM
7	50 µM	-	5 mM	-	100 µM	300 µM	-
8	50 µM	-	5 mM	-	100 µM	-	300 µM
9	50 µM	-	-	-	-	-	-

Für die CuAAC wurde ein Phenylalanin-Derivat mit einer Alkin-Gruppe in Para-Position in das Zielprotein eingebaut. Die Alkin-Gruppe kann in einer kupfer-katalysierten Reaktion mit einem Azid zu einem Tetrazol-Ring verbunden werden. Für diese Reaktion wurde im Vorfeld ein Labeling-Mix pipettiert (Tabelle 12).

Tabelle 12. Komponenten des Labeling-Mixes für eine kupfer-katalysierte Klick-Reaktion

Komponente	Endkonzentration
Kupfer(II)-Sulfat (CuSO ₄)	0-500 µM
Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA)	0-1500 µM (3x c(CuSO ₄))
Natriumascorbat (NaAsc)	5 mM

Der Labeling-Mix wurde zu 5-10 µl des resuspendierten Pellets gegeben. Der Farbstoff Sulfo-Cy5-Azid wurde in einer Endkonzentration von 3 µM, der Farbstoff Silizium-Rhodamin-Azid wurde in einer Endkonzentration von 0-20 µM eingesetzt. PEG-Azid wurde in einer finalen Konzentration von 10 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit erfolgte für maximal zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) und strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition (SPIEDAC)

Bei der SPAAC und SPIEDAC handelt es sich um kupferfreie Klick-Reaktionen. Für diese Reaktionen wurden nicht-kanonische Aminosäuren mit einer Alkin-Gruppe in einer Ringstruktur verwendet (SCO und TCO). Durch den Zusatz von 5 μM Sulfo-Cy5-Azid zu SCO wird ebenfalls ein Tetrazol-Ring ausgebildet. Außerdem wurden beide nicht-kanonischen Aminosäuren mit einem Tetrazin-Farbstoff (Tetrazin-Cy5 für SCO und TCO, 6-Methyl-Tetrazin-Sulfo-Cy5 für TCO) behandelt. Die Inkubation der jeweiligen Klick-Reaktion erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln.

2.2.15. Analyse der Einbaueffizienz von verschiedenen nicht-kanonischen Aminosäuren

Für die Optimierung der beiden verwendeten orthogonalen Systeme auf Grundlage der eAzFRS und PyIRS-AF wurde ein Reporter-Gen-Assay etabliert, um die Einbaueffizienz von verschiedenen nicht-kanonischen Aminosäuren bestimmen zu können. Dieser Assay beruht auf der Verwendung der Nanoluziferase (Nluc), deren Gensequenz sich nachgeschaltet zum Amber-Stopcodon befindet. Dementsprechend wird die Nluc translatiert, sofern das Amber-Stopcodon von der Suppressions-tRNA adressiert und die nkAs an die Polypeptidkette angefügt wird. Die Bestimmung der Suppressionseffizienz erfolgte durch die Messung der Nluc-Aktivität, welche komplementär zu der erfolgreichen Suppression des Amber-Stopcodons (RLU_{amb}) ist. Als Referenz wurde ein Konstrukt ohne Amber-Stopcodon (RLU_{WT}) verwendet. Die Suppressionseffizienz ergibt sich aus:

$$\text{Suppressions – Effizienz (\%)} = \frac{RLU_{amb}}{RLU_{WT}} * 100$$

Für den Nluc Assay wurden 5 μl der zu analysierenden Fraktion abgenommen und in ein Well einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Nluc Substrat wurde entsprechend den Herstellerangaben 1:50 im Nluc-Puffer verdünnt und auf Raumtemperatur akklimatisiert. Die Bestimmung der Nluc-Aktivität erfolgte mit dem Multimode Plattenreader System Mithras² LB 943 (Berthold). Das Gerät wurde 60 Zyklen mit Wasser, 60 Zyklen mit 70 % Ethanol und abermals mit 60 Zyklen Wasser gespült. Das verdünnte Nluc Substrat wurde über die Prime-Funktion des Gerätes aufgenommen und die zu analysierenden Wells ausgewählt. Für die Analytik wurden 50 μl des Nluc Substrates in die Wells der vorbereiteten Mikrotiterplatte durch den Mithras injiziert und mittels eines Graufilters die Lumineszenz detektiert. Das restliche Nluc Substrat wurde entfernt und das Gerät mit 60 Zyklen Wasser gewaschen.

2.2.16. Analyse der ligandabhängigen Konformationsänderung des Adora2a

Der Adora2a_amb215-Nluc wurde wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben durch den Einsatz der vorbeladenen tRNA BODIPY-TMR-Lysin-tRNACUA fluoreszenzmarkiert. Die mikrosomale Fraktion der Synthese wurde in PBS aufgenommen. 5 μl dieser Lösung wurden mit 5 μl Adenosin, ebenfalls gelöst in PBS, vermischt. Es wurden Endkonzentrationen von 0 μM , 100 μM , 1000 μM und 5000 μM Adenosin eingestellt. Die erhaltenen 10 μl wurden für die Lumineszenz und Fluoreszenzmessung eingesetzt. Zuerst wurde die Lumineszenz detektiert (siehe Abschnitt 2.2.15) und im Folgenden die Emission des BODIPYs, welches durch die Nluc angeregt wurde. Als Kontrolle wurde das Adora2a_amb215-Nluc in Gegenwart einer vorbeladenen tRNA, durch welche ein Serin an Position des Amber-Stopcodons integriert wird

(tSerCUA), mit den gleichen beschriebenen Konditionen behandelt, um das Hintergrundsignal des breiten Emissionsspektrums der Nluc und eine mögliche Interaktion mit dem Adenosin zu bestimmen. Der BRET-Ratio wurde wie folgt berechnet:

$$BRET_{ratio} = \frac{Fluoreszenz (Probe)}{Lumineszenz (Probe)} - \frac{Fluoreszenz (Kontrolle)}{Lumineszenz (Kontrolle)}$$

2.2.17. Bestimmung der Proteinausbeute durch heiße TCA-Fällung

Die Bestimmung der Proteinausbeute erfolgte über den statistischen Einbau des eingesetzten ^{14}C -Leucins in das *de novo* translatierte Protein. Nach der Synthese wurden 3-5 μl des Translationsmixes (TM), des Überstandes (SN) und der mikrosomalen Fraktion abgenommen und mit 3 ml 10 % TCA (v/v) und 2 % Casein-Hydrolysat (w/v) versetzt und in einem Wasserbad bei 80 °C für 15 min inkubiert. Durch diesen Schritt werden ^{14}C -Leucin-tRNAs hydrolysiert, sodass überschüssiges ^{14}C -Leucin von inkorporierten ^{14}C -Leucin abgetrennt werden kann. Im Anschluss wurden die Proteine für 30 min auf Eis präzipitiert und auf die MN GF-3 Glasfilter der Vakuum-getriebenen Absauganlage gegeben. Die Filter wurden zweimal mit 5 % TCA und Aceton gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die getrockneten Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 3 ml Szintillationscocktail versetzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die radioaktiv markierten Proteine mit Hilfe des LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter analysiert. Die Berechnung der Proteinausbeute erfolgte auf Basis der spezifischen Radioaktivität und der Einbeziehung von Protein-spezifischen Parametern.

$$\text{Spezifische Radioaktivität} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{pmol}} \right) = \frac{\text{Radioaktivität von } ^{14}\text{C} - \text{Leucin} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{pmol}} \right)}{\frac{c[\text{Leucin}_{\text{gesamt}}] + c(^{14}\text{C} - \text{Leucin})]}{c(^{14}\text{C} - \text{Leucin})}}$$

$$\text{Proteinkonzentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Anzahl an Counts} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{ml}} \right) * \text{Molekulargewicht} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{pmol}} \right)}{\text{Spez. Radioaktivität} \left(\frac{\text{dpm}}{\text{pmol}} \right) * \text{Anzahl der Leucine}}$$

Proteinausbeuten wurden in zwei oder drei unabhängigen Experimenten in Mehrfachbestimmungen ermittelt. Die sich daraus ergebenden Berechnungen für das arithmetische Mittel (\bar{x}) und die Standardabweichung (SD) sind dargestellt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{a} * (x_1 + x_2 + x_a)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

2.2.18. Qualitative Protein Analyse durch SDS-PAGE und Autoradiographie

¹⁴C markierte Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Dazu wurden 5 µl der ausgewählten Fraktion der zellfreien Reaktion mit 45 µl Wasser und 150 µl eiskaltem Aceton gemischt und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Aceton-haltige Überstand wurde von den präzipitierten Proteinen entfernt und das Proteinpellet für mindestens 30 min bei 45 °C und 1200 rpm getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl NuPAGE LDS-Probenpuffer (1X) mit 50 mM DTT aufgenommen und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben wurden in die vorgesehenen Taschen der NuPAGE 10 % Bis-Tris Gele geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 185 V für 35 min durchgeführt. Die SDS-PAGE Gele wurden anschließend dreimal mit Wasser gewaschen und mit einem Triphenylmethanfarbstoff (SimplyBlue SafeStain, Thermo Fisher Scientific) für 10 min gefärbt. Die gefärbten Gele wurden für 60 min bei 70 °C getrocknet (Unigeldryer 3545D) und in Phosphor-Schirmen für mindestens drei Tage gelagert. ¹⁴C-markierte Proteine wurden mittels einem Phosphor-Bildverarbeitungssystem (Typhoon TRIO + Imager, GE Healthcare) detektiert. Fluoreszenzmarkierte Proteine wurden, wie oben beschrieben, in einer 10 % SDS-Page getrennt. Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese für 5-10 min in Wasser inkubiert und, abhängig vom verwendeten Farbstoff, mit dem Phosphor-Bildverarbeitungssystem analysiert (DyLight650-Phosphin und Cy5-Farbstoffe: Anregung bei 633 nm, Emission bei 670 nm; Cy3- und BODIPY-TMR-Farbstoffe: Anregung bei 530 nm, Emission bei 580 nm; 6-FAM-Azid: Anregung bei 488 nm, Emission bei 526 nm).

2.2.19. Deglykosylierungs- und Protease-Assay

Die Deglykosylierung wurde mit den Glykosidasen Endo H und PNGase F durchgeführt. Es wurden 5 µl der mikrosomalen Fraktion entsprechend den Angaben des Herstellers mit den jeweiligen Glykosidasen behandelt und, wie oben beschrieben, mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Für die Bestimmung der Orientierung von Membranproteinen in der mikrosomalen Membran wurde ein Proteinase K (ProtK) Verdau durchgeführt. Proteinsegmente, welche sich außerhalb der mikrosomalen Membran befinden, sind für den Verdau der ProtK zugänglich, sodass nur geschützte Bereiche im Lumen der Mikrosomen im Autoradiogramm detektiert werden. Es wurden 5 µl der mikrosomalen Fraktion mit 10 ng/µl ProtK (Promega) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Protease wurde im Anschluss mit 6,25 mM Phenylmethylsulfonsäure inaktiviert und die Probe einer Acetonfällung unterzogen, sowie mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.2.20. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Es wurden sowohl Fusions-Konstrukte mit eYFP, als auch fluoreszenzmarkierte Proteine mit verschiedenen Farbstoffen mikroskopisch analysiert. Der Translationsmix wurde hierfür, wie oben beschrieben, zentrifugiert, um die mikrosomale Fraktion abzutrennen und in PBS zu resuspendieren. Es wurde eine Probe von 20 µl bestehend aus 5 µl mikrosomaler Fraktion und 15 µl PBS gemischt, um hypoosmotische Bedingungen zu schaffen, die ein Schwellen der Mikrosomen hervorrufen. Die Probe wurde in ein Well eines IBIDI-Objektträgers gegeben und mit einem LSM 510 meta (Zeiss) Laser-Scanning-Mikroskop, ausgestattet mit einem Plan-Achromat 60x Objektiv (Olympus), analysiert. eYFP Fusionsproteine wurden mit dem 488 nm Laser angeregt und die Emission über einen Langpassfilter (>505 nm) detektiert. Diese

Einstellungen wurden ebenfalls für die Detektion von 6-FAM-Azid-konjugierten Proteinen verwendet. Die Fluoreszenz von Sulfo-Cy5-Azid-konjugierten Proteinen wurde mit dem 633 nm Laser angeregt und mit einem Langpassfilter (>670 nm) detektiert.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des Translationsprozesses des zellfreien Sf21-Systems

In biologischen Prozessen wie der Zellteilung, der Zelldifferenzierung und der Metabolismuserhaltung dient ATP als Hauptenergielieferant. Zusätzlich fungiert ATP als Signalmolekül und Cofaktor für Kinasen, Ionenporter, in der DNA-Replikation und der Proteinsynthese. Besonders während der Proteinsynthese ist ATP unerlässlich, da es in der Translationsinitiation, der Aminoacylierung, der Elongation und der Faltung von Proteinen involviert ist²⁴⁵. Für ein besseres Verständnis des Proteintranslationsprozesses sind Synthesysteme, die eine definierte Einstellung der ATP-Konzentration ermöglichen, unumgänglich. Aufgrund des offenen Charakters von zellfreien Synthesystemen kann eine definierte Konzentration an ATP der Proteintranslation zugeführt werden. Zusätzlich können ATP-konsumierende Effekte während der Transkription, wie die komplementäre Basenpaarung aufgrund der räumlichen und zeitlichen Trennung der Transkription und der Translation im beschriebenen *linked* Modus, vermieden werden. Der Einfluss der vorliegenden freien ATP-Konzentration während der Proteintranslation in einem zellfreien System wurde durch den Einsatz eines ATP-bindenden Aptamers (aAPT²⁴²) analysiert. Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund einer spezifischen dreidimensionalen Struktur ihr Zielmolekül mit hochspezifischen Bindungsaffinitäten im piko- bis nanomolaren Bereich erkennen können. Im Vergleich zu Antikörpern können auch kleine Moleküle mit einer molekularen Größe von unter 1000 Da, ohne eine zusätzliche Fusionierung des kleinen Moleküls an ein Trägerprotein, detektiert werden²⁴⁶. Im ersten Kapitel wurde der Einfluss des aAPT im Vergleich zu einem nicht-ATP-bindenden Aptamer (cAPT²⁴²) auf die zellfreie Synthese der Nanoluziferase analysiert. Zu Beginn wurden beide Aptamere auf ihre Fähigkeit ATP zu binden charakterisiert. Zusätzlich wurde die Spezifität des aAPT zu ATP gezeigt und der Einfluss von verschiedenen aAPT-Konzentrationen auf die zellfreie Proteinsynthese evaluiert.

3.1.1. Charakterisierung des aAPT und des cAPT

Die hier verwendeten Aptamere besitzen am 5'-Ende ein 6-Carboxyfluorescein (FAM), welches nach Bindung einer komplementären Sequenz durch das Dabcyl am 3'-Ende gequencht wird. Nach Bindung des Zielmoleküls ATP erfolgt eine strukturelle Änderung des aAPT, wodurch die Quenchersequenz gelöst wird und die FAM-Fluoreszenz nicht länger reduziert wird (Abbildung 5A).

Durch vier Nukleotidveränderungen in der Sequenz des cAPT bindet dieses Aptamer nicht an ATP, sodass die Zugabe von ATP keinen Einfluss auf die Intensität der gequenchten Fluoreszenz haben sollte. Der Effekt der Quencher-Sequenz und zugefügtem ATP ist in Abbildung 5A gezeigt. Die Zugabe von 1,5 μM Quencher zu 1 μM aAPT oder cAPT resultierte in einer Reduktion des Fluoreszenzsignals um 98%. Während in der Probe mit dem aAPT das Fluoreszenzsignal nach Zugabe von 3 mM ATP um 20 % wiederhergestellt werden konnte, wurde dieser Effekt beim cAPT nicht beobachtet (Abb. 5B).

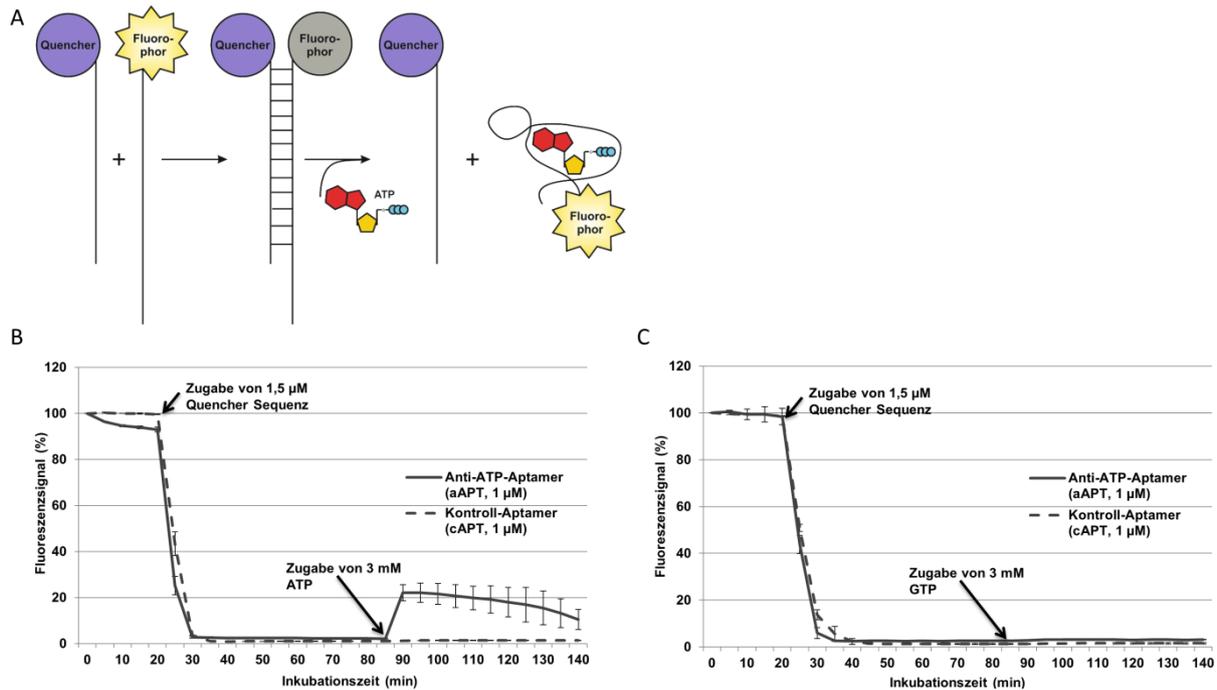


Abbildung 5. Funktionsweise des aAPT und Charakterisierung des Fluoreszenzsignals von aAPT und cAPT in Gegenwart von ATP oder GTP. A) In Gegenwart der komplementären Quenchersequenz wird das aAPT gebunden und das FAM-Fluorophor gequencht. Aufgrund der höheren Affinität des aAPT zu ATP löst sich das Aptamer von der Quenchersequenz und bindet ATP, wodurch das FAM-Fluorophor nicht länger gequencht wird. B) + C) Die Fluoreszenz des 5'-FAMs des Kontroll-Aptamers (gestrichelte Linie) und des Anti-ATP-Aptamers (durchgezogene Linie) wurde bestimmt. Dafür wurden die Aptamere auf eine Konzentration von 1 μM in PBS mit 100 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 verdünnt. Anschließend wurde 1,5 μM der komplementären Quenchersequenz, sowie 3 mM ATP (B) oder 3 mM GTP (C) hinzugefügt. Die jeweiligen Zeitpunkte der Zugabe sind durch Pfeile markiert.

Zur Analyse der Spezifität des aAPT wurde anstelle von ATP das Nucleosidtriphosphat GTP nach einer Inkubation mit der komplementären Quenchersequenz hinzugefügt. Die 98%ige Reduktion der Fluoreszenz des aAPT und des cAPT durch den Quencher konnte durch die Zugabe von GTP nicht verändert werden (Abb. 5C).

3.1.2. Einfluss des aAPT und des cAPT auf die zellfreie Proteinsynthese

Um den Einfluss der Aptamere auf die zellfreie Synthese zu untersuchen wurde das Modellprotein Nluc im *linked* Modus translatiert. Der Translation wurde eine definierte Menge von 1 mM ATP hinzugefügt. Der Effekt des jeweiligen Aptamers auf die Nluc Synthese wurde durch einen Lumineszenz-Assay (Abb. 6A) und Autoradiographie (Abb. 6B) bestimmt. Die Zugabe von 1 μM aAPT oder cAPT zu der zellfreien Synthese zeigte keinen Effekt in der Aktivität der Luziferase. Durch die Zugabe von 10 μM aAPT wurde eine Reduktion der Lumineszenz um 70% ermittelt, während die Zugabe von 10 μM cAPT eine Reduktion von 5 % hervorrief. Eine weitere Erhöhung des aAPT (20 μM) resultierte in einem 95 % niedrigeren Lumineszenzsignal im Vergleich zur unbehandelten Probe. Der Einsatz von 20 μM cAPT verringerte das Lumineszenzsignal um 20 %. Bei höheren Konzentrationen von über 20 μM cAPT wurde ein negativer Effekt des cAPT und eine Reduktion der Nluc-Lumineszenz um 70 % beobachtet. Die ermittelten Nluc-Aktivitäten sind vergleichbar mit den aus der Autoradiographie erhaltenen Ergebnissen (Abb. 6A und B).

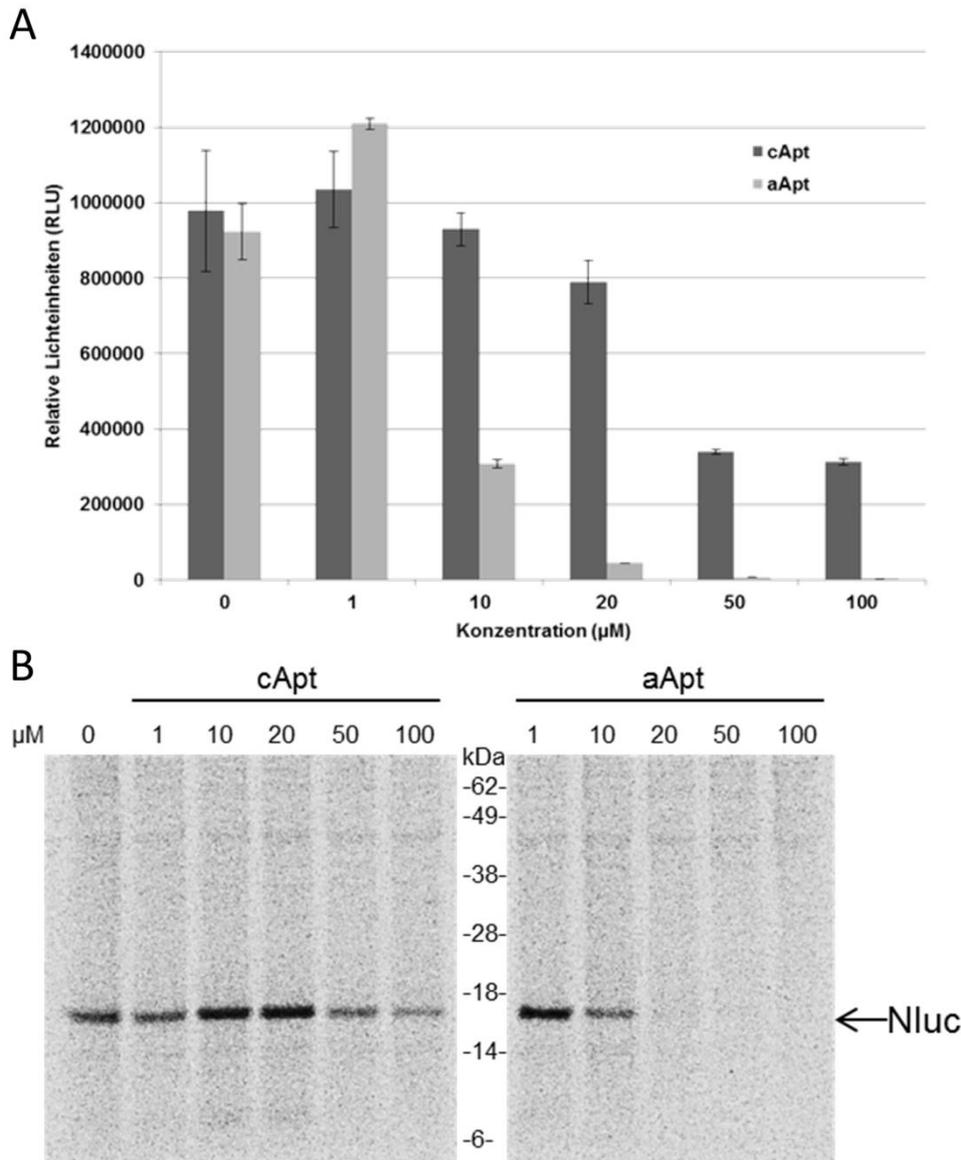


Abbildung 6. Zellfreie Proteinsynthese in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von cAPT und aAPT. A) Das Modelprotein Nluc wurde in Gegenwart von 0-100 μM des jeweiligen Aptamers synthetisiert. Nach der Synthese wurden 5 μl des Translationsmixes für einen Lumineszenz-Assay zur Bestimmung der Nluc-Aktivität verwendet. B) Für die Analyse der ^{14}C -markierten Nluc mittels Autoradiographie wurden 5 μl des Translationsmixes abgenommen.

3.1.3. Analyse der Spezifität des aAPT im eukaryotischen zellfreien System

Die spezifische Bindung des aAPT in einer PBS-Lösung wurde bereits in 3.1.1 gezeigt. Im zellfreien Synthesystem sind neben ATP weitere niedermolekulare Moleküle wie Nukleosidtriphosphate, Ionen, Nukleinsäuren und Membranbestandteile vorhanden. Diese verschiedenen Moleküle könnten ebenfalls mit dem aAPT interagieren, wodurch die Proteintranslation inhibiert werden könnte, auch wenn keine Komplexierung von ATP stattfindet. Um die Spezifität des aAPT in einer heterogenen Umgebung zu untersuchen wurden verschiedene Konzentrationen an ATP während der zellfreien Proteinsynthese der Nluc eingesetzt. Durch die Komplexierung von ATP sollte die Synthese in Gegenwart des aAPT ein abweichendes ATP-Optimum im Vergleich zur zellfreien Synthese unter Standardbedingungen zeigen. Während in Abwesenheit des aAPT die höchste Nluc-Aktivität in Gegenwart von 1 mM ATP ermittelt werden konnte, wurde in Gegenwart des aAPT eine

maximale Lumineszenz bei 2 mM ATP detektiert (Abb. 7A und B). Eine Erhöhung der ATP-Konzentration auf 2 mM reduzierte in Abwesenheit des aAPT das Lumineszenzsignal um 90 %. Eine weitere Erhöhung resultierte in einer 99 % Reduktion (3-4 mM) bis das Lumineszenzsignal nicht mehr detektierbar war (5 mM). In Gegenwart des aAPT zeigte die Erhöhung der ATP-Konzentration auf 2 mM eine Steigerung der Nluc-Aktivität um den Faktor 2. Bei höheren Konzentrationen von 3-5 mM nahm das Lumineszenzsignal ebenfalls ab. Die erhaltenen Lumineszenzwerte spiegeln sich im Autoradiogramm wieder. Während ohne aAPT eine intensive Nluc-Bande in Gegenwart von 1 mM ATP zu erkennen war, wurde diese Bande schwächer, bis in Gegenwart von 3-5 mM ATP keine Nluc-Bande detektiert wurde. In Gegenwart des aAPT wurden Banden bei einer Synthese mit 1-3 mM ATP detektiert mit einer höchsten Bandenintensität bei 2 mM ATP.

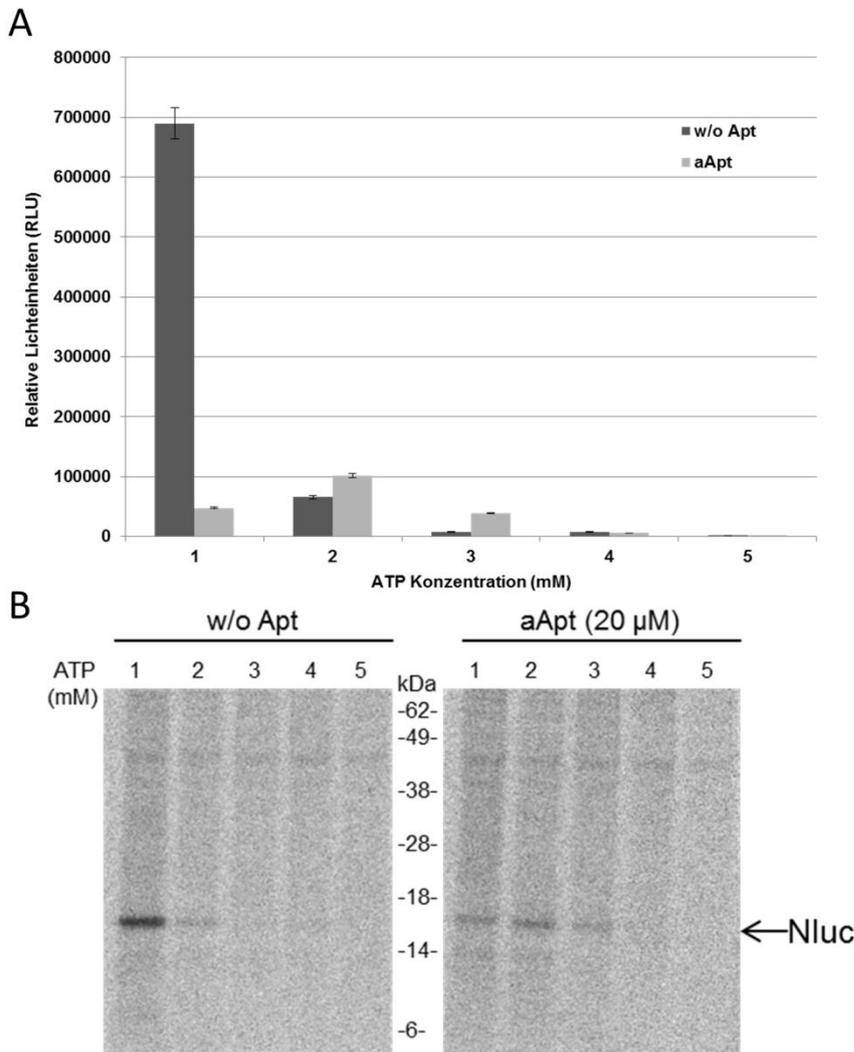


Abbildung 7. Zellfreie Synthese der Nluc in Gegenwart von verschiedenen ATP-Konzentrationen. A) Das Modelprotein Nluc wurde in Abwesenheit oder Anwesenheit des aAPT (20 μ M) mit verschiedenen ATP-Konzentrationen (1-5 mM) in einem zellfreien System translatiert. Nach der Synthese wurden 5 μ l des Translationsmixes für einen Lumineszenz-Assay zur Bestimmung der Nluc-Aktivität verwendet. B) Für die Analyse der 14 C-markierten Nluc mittels Autoradiographie wurden 5 μ l des Translationsmixes abgenommen.

3.2. Zellfreie Synthese des komplexen GPCRs Endothelin-B-Rezeptors

Im ersten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Translation in einem zellfreien Insekten-System spezifisch durch die Komplexbildung von ATP reguliert werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das unmodifizierte zytosolische Protein Nluc in aktiver Form, konzentrationsabhängig von ATP synthetisiert werden konnte. Mit dieser Grundlage wird im nächsten Abschnitt ein komplexer GPCR synthetisiert und analysiert. GPCRs sind, wie in Abschnitt 1.1.4 beschrieben, das Ziel von 34 % der erhältlichen pharmazeutischen Medikamente²⁴⁷. Aufgrund der erschwerten Produktion *in vivo* werden stetig bestehende Expressionssysteme optimiert und neue Expressionssysteme entwickelt. Ob das hier verwendete eukaryotische zellfreie Proteinsynthesesystem ein Alternativ-Synthesesystem darstellt, wird im Folgenden analysiert. Als Modelprotein wurde der Endothelin-B-Rezeptor ausgewählt, welcher zwischen den Cysteinen 174 und 255 disulfidverbrückt ist und zusätzlich am Asparagin 59 eine Glykosylierung besitzt. Das zellfreie Sf21-System eignet sich für die Synthese des ET-B-Rezeptors (ET-B) aufgrund der endogen vorhandenen Mikrosomen, die eine kotranslationale Translokation und Integration des Rezeptors in die mikrosomale Membran ermöglichen. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel neben der Optimierung der Synthese des ET-Bs die Integration in die mikrosomale Membran und das Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen analysiert.

3.2.1. Synthese des ET-B-Rezeptors

Für die Analyse der Synthese des ET-B-Rezeptors wurde ein PCR-Produkt generiert, welches für die Gensequenz des Fusionsproteins ET-B-eYFP codierte. Die Synthese wurde im *linked* Modus durchgeführt und über einen Zeitraum von 6h analysiert (Abb. 8). Eine maximale Proteinausbeute von 12 µg/ml wurde nach einer Translationszeit von 3-4 h erreicht. Geringere oder höhere Translationszeiten führten zu niedrigeren Ausbeuten im Bereich von 4-10 µg/ml (Abb. 8A).

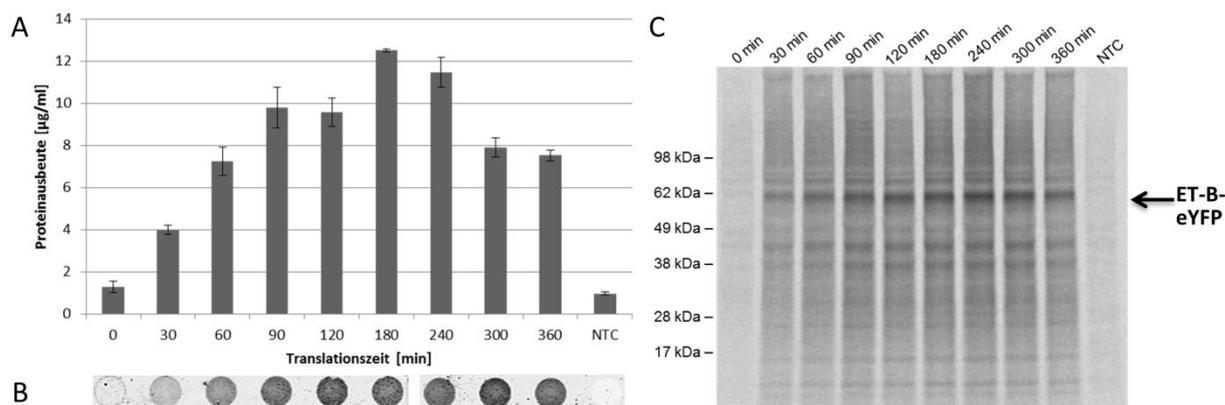


Abbildung 8. Synthese des Fusionsproteins ET-B-eYFP-Rezeptor mit anschließender Charakterisierung. A) 5 µl des Translationsmixes wurden für die Proteinausbeutebestimmung verwendet. B) 5 µl des Translationsmixes wurden mit 15 µl PBS gemischt, auf einen IBIDI aufgetragen und die Fluoreszenz des eYFPs analysiert. C) Für die Autoradiographie des ¹⁴C-markierten ETB-eYFP-Rezeptor wurden 5 µl für die Aceton-Präzipitation und SDS-PAGE verwendet.

Betrachtet man die Fluoreszenz des fusionierten eYFPs, so konnte eine Intensitätssteigerung von 0 min bis 120 min erkannt werden. Nach 120 min ist keine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu detektieren, sodass eine Syntheszeit von 120 min gewählt wurde (Abb. 8B). Im Autoradiogramm zeigte sich nach einer Syntheszeit von 30 min eine Bande auf der Höhe der 62 kDa Markerbande. Die Intensität der Bande blieb ab einer Syntheszeit von

90 min konstant. Darüber hinaus wurden zusätzliche Banden auf einer Höhe von 38 und 42 kDa sowie unterhalb von 28 kDa detektiert, deren Intensität kongruent zu der Bande auf der Höhe von 62 kDa war (Abb.8C).

3.2.2. Translokation und Vesikelintegration des ET-B-Rezeptors

Im Folgenden wird die Adressierung der im Lysat enthaltenen Mikrosomen analysiert. Dafür wurde die zellfreie Synthese des ET-B-eYFP-Rezeptors über vier Stunden unter dem konfokalen Mikroskop dokumentiert (Abb. 9). Während zum Start der Synthese kein Fluoreszenzsignal detektierbar war, wurde nach 60 min ein Fluoreszenzsignal des eYFP-fusionierten GPCRs ermittelt, welches nach 180 min seine maximale Intensität erreichte. Das Fluoreszenzsignal der Aufnahmen nach drei und vier Stunden zeigte keine Veränderung. Zusätzlich ist eine heterogene konglomeratartige Verteilung des Fluoreszenzsignals in der Probe (60-240 min) zu erkennen, welche in der NTC nicht auftrat. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder nach 240 min zeigte auf, dass die Konglomerate in der Probe mit den Sf21-Mikrosomen kolokalisierten, während in der NTC keine spezifische Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu den Mikrosomen möglich war.

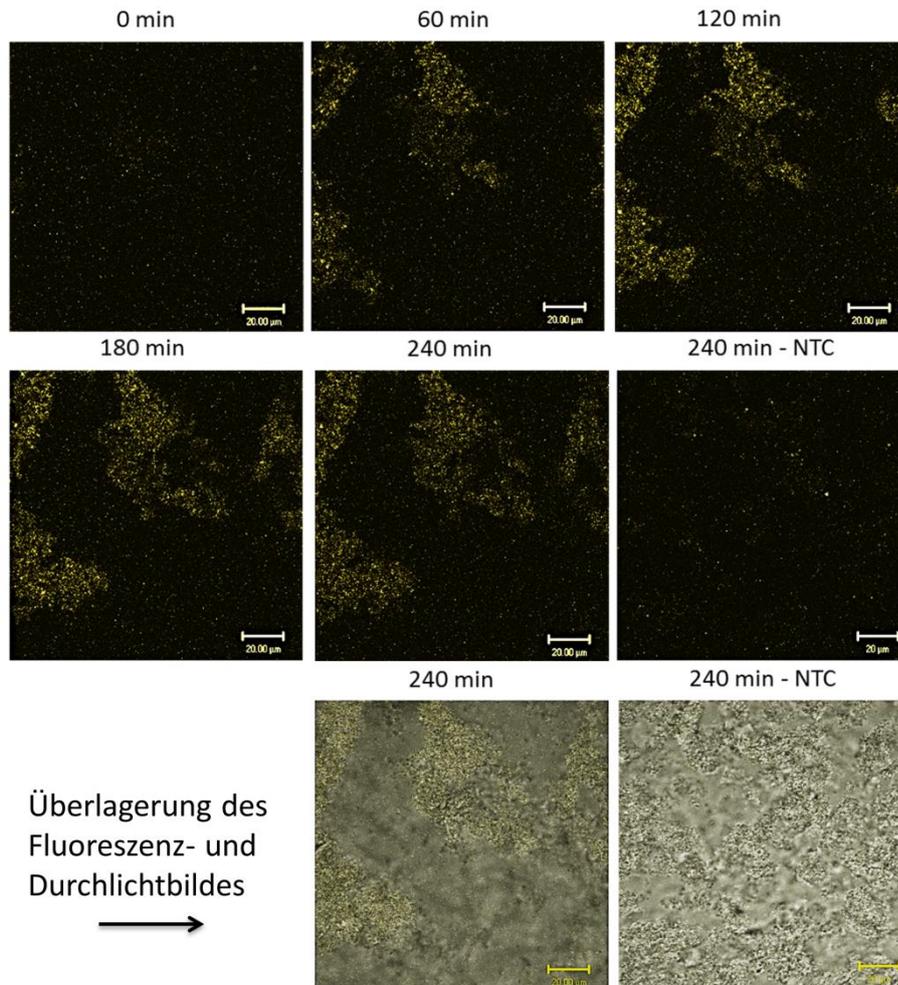


Abbildung 9. Analyse der Lokalisation des Fusionsproteins ET-B-eYFP. Die Synthese des eYFP-fusionierten GPCRs wurde in einem 20 µl Ansatz über 4 Stunden auf einem IBIDI Objektträger durchgeführt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die ersten sechs Bilder zeigen das ermittelte Fluoreszenzsignal des eYFPs. Die Bilder in der dritten Reihe zeigen die Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit den jeweiligen Durchlichtbildern nach 4 Stunden.

Anhand der Fluoreszenzbilder ist eine Aussage über die korrekte Integration und Orientierung des ET-B-Rezeptors in die mikrosomale Membran nicht möglich. Für die Bestimmung der Orientierung wurde ein Plasmid-basiertes Konstrukt verwendet, welches eine zusätzliche IRES und eine Melittin-Signalsequenz besitzt. Melittin ist ein in Honigbienen vorkommendes kationisches Polypeptid, bestehend aus 26 Aminosäuren, welches Hauptbestandteil des Apitoxins ist¹⁵¹. Das Melittin-Signalpeptid zeichnet sich durch eine hohe Translokationseffizienz aus, wodurch die Integration des ET-B-Rezeptors in die mikrosomale Membran erhöht werden sollte. Der ET-B-Rezeptor wurde in diesem Abschnitt zusätzlich zu der ¹⁴C-Leucin-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY-TMR markiert. Die Markierung erfolgte über eine tRNA mit dem Anticodon GAA (Erkennung von Phenylalanin-Codons), welche im Vorfeld mit einem BODIPY-TMR-Lysin aminoacyliert wurde. Die Fluoreszenzmarkierung zeichnet sich im Vergleich zur radioaktiven Markierung durch eine höhere Sensitivität aus. Dies ist besonders für den hier durchgeführten Proteinase K (ProtK)-Verdau entscheidend, da kleine Peptidfragmente entstehen können, die wenig oder kein Leucin enthalten und somit nicht radioaktiv markiert werden können. ProtK hydrolysiert eine Vielzahl an Peptidbindungen, ist jedoch nicht membrangängig, sodass Bereiche des ET-B-Rezeptors welche im Lumen der Mikrosomen gelegen sind, nicht verdaut werden können (Abb. 10A).

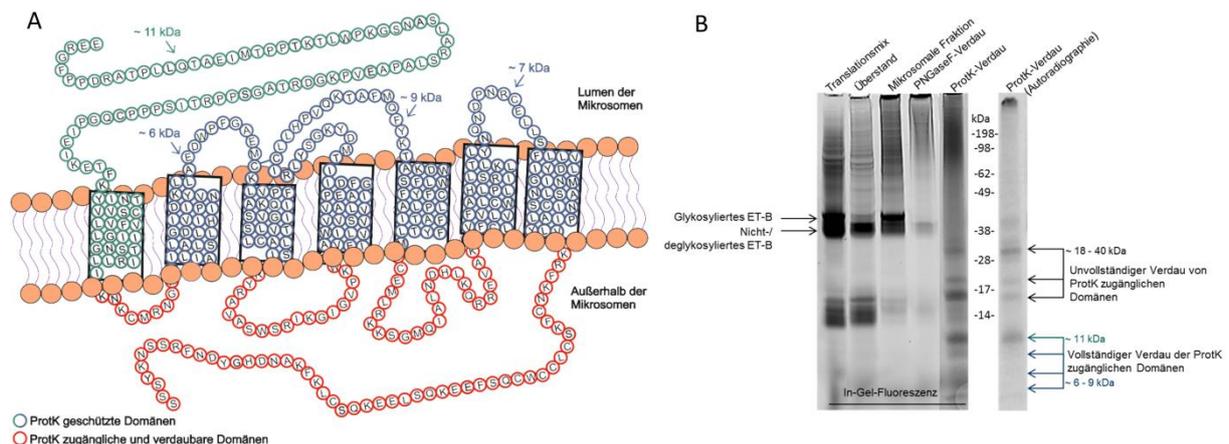


Abbildung 10. Analyse der Orientierung des ET-B-Rezeptors in mikrosomalen Membranen. A) Schematische Darstellung der erwarteten Orientierung des ET-B-Rezeptors in einer mikrosomalen Membran. Rot markiert sind ProtK-zugängliche Bereiche. In grün und blau markiert sind ProtK-geschützte Bereiche. B) In-Gel-Fluoreszenz des markierten ET-B-Rezeptors. Gezeigt sind Fraktionierung, Glykosidase und ProtK-Verdau. Für den Glykosidase- und ProtK-Verdau wurden 5 μ l der mikrosomalen Fraktion eingesetzt. Modifiziert aus²⁴⁸.

Zu Beginn wurde der Translationsmix durch eine 10-minütige Zentrifugation in den Überstand und die mikrosomale Fraktion getrennt. In der In-Gel-Fluoreszenz ist in jeder der drei Fraktionen eine Bande auf der Höhe von 38 kDa zu erkennen, die sich in den einzelnen Fraktionen unterscheidet (Abb. 10B). Während im Translationsmix und in der mikrosomalen Fraktion eine intensive zusätzliche Bande oberhalb von 38 kDa zu erkennen ist, ist diese Bande im Überstand schwach ausgeprägt. Nach einem Glykosidase-Verdau der MF mit PNGase F ist diese Bande nicht mehr detektierbar. Dieses Ergebnis deutet auf eine Glykosylierung hin und somit auf eine Translokation des N-Terminus in das Lumen der Mikrosomen. Zusätzlich ist eine intensive Bande auf Höhe der 17 kDa Markerbande zu erkennen. Diese Bande resultiert aus der überschüssigen, vorbeladenen tRNA, deren fluoreszenzmarkierte Aminosäure nicht in den ET-B-Rezeptor eingebaut worden ist. Aufgrund der vorhandenen Translokation des N-Terminus, welche besonders in der MF detektierbar war, wurde diese Fraktion für den ProtK-Verdau verwendet. Als Ergebnis zeigten sich

spezifische Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 6-9 kDa, 11 kDa und 18-40 kDa in der In-Gel-Fluoreszenz und im Autoradiogramm Banden. Aufgrund der unterschiedlich markierten Aminosäuren (¹⁴C-Leucin im Vergleich zu fluoreszenzmarkiertem Lysin, welches an der Position von Phenylalanin-Codons statistisch eingebaut wurde) sind die erhaltenen Banden im Fluoreszenzgel und im Autoradiogramm unterschiedlich stark ausgeprägt. Die drei Banden im Bereich von 6-9 kDa korrelieren mit den Berechneten molekularen Größen der im Inneren der Mikrosomen gelegenen Loops mit den assoziierten Transmembrandomänen. Die ausgeprägte Bande auf der Höhe von 11 kDa entsprach dem berechneten Molekulargewicht des N-terminalen Peptides inklusive der ersten Transmembrandomäne. Banden, die oberhalb von 18 kDa liegen, deuten auf einen unvollständigen Verdau des ET-B-Rezeptors durch ProtK hin. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die vorliegenden Ergebnisse Bestandteil einer 2017 erschienenen Publikation sind, in der zusätzlich die Funktionalität des ET-B-Rezeptors über einen Radioliganden-Bindungsassay gezeigt werden konnte²⁴⁸. Zusammenfassend wird durch dieses Kapitel deutlich, dass sich die zellfreie Proteinsynthese auf Basis eines eukaryotischen Lysates für die Synthese von zytosolischen und komplexen Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen eignet. Zusätzlich ermöglichen die endogen enthaltenen Mikrosomen eine Einbettung von Membranproteinen in eine nahezu natürliche Membran. Auf Grundlage dieser Ergebnisse werden im dritten Kapitel zwei ausgewählte pharmazeutisch relevante Proteine, welche eine vergleichbare Komplexität zum ET-B-Rezeptor aufzeigen, erst statistisch und nachfolgend ortsspezifisch modifiziert.

3.3. Modifizierung von therapeutisch relevanten Proteinen durch Amber-Suppression

Die Herstellung von therapeutischen Proteinen ist ein hoch komplexer Prozess und kann mehrere Tausend einzelne Produktionsschritte beinhalten²⁴⁹. Aufgrund von komplexen dreidimensionalen Strukturen können Proteine meistens nicht komplett über chemische Ligation synthetisch hergestellt werden und müssen deshalb in lebenden Zellen produziert werden. Die Charakteristika des hergestellten Proteins hängen dabei von der Wahl der Zelllinie, dem Ursprung der Spezies und den Kultivierungsbedingungen ab. Besonders posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen können durch heterologe Expressionssysteme inkorrekt ausgebildet werden, wodurch die Funktionalität des Proteins beeinflusst werden kann. Durch Protein-Engineering werden Eigenschaften von ausgewählten Targets so verändert, dass z. B. die Serum-Halbwertszeit und somit die Wirkung von Therapeutika verlängert wird, aber auch die Erkennung und Funktionalität der Therapeutika verbessert werden. Für eine Erhöhung der Serum-Halbwertszeit können Therapeutika durch PEGylierung derivatisiert oder an Albumin- und Fc-Fragmente fusioniert werden. Zusätzlich können Signalpeptide angefügt oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugate generiert werden, um toxische Effekte durch eine unspezifische Bindung zu reduzieren und im Gegenzug die spezifische Erkennung des Therapeutikums zu erhöhen²⁴⁹. Verschiedene Methoden wie Zelllinien-Engineering, rationales Proteindesign oder gerichtete Evolution der Proteinstruktur werden oftmals angewandt, um Proteine mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Erweiterung von reaktiven Seitengruppen, wie sie bei Lysinen und Cysteinen vorkommen durch die Einbringung von nicht-kanonischen Aminosäuren. Durch die Verwendung der Amber-Suppressions-Methodik (Kapitel 1.4.1, Abb. 3) können nkAss an ausgewählten Positionen im Protein eingebracht werden. Eine schematische Übersicht des Arbeitsablaufes für das Kapitel 3.3 befindet sich in Abbildung 11.

1. Identifikation von geeigneten Positionen für die Integration der nicht-kanonischen Aminosäure

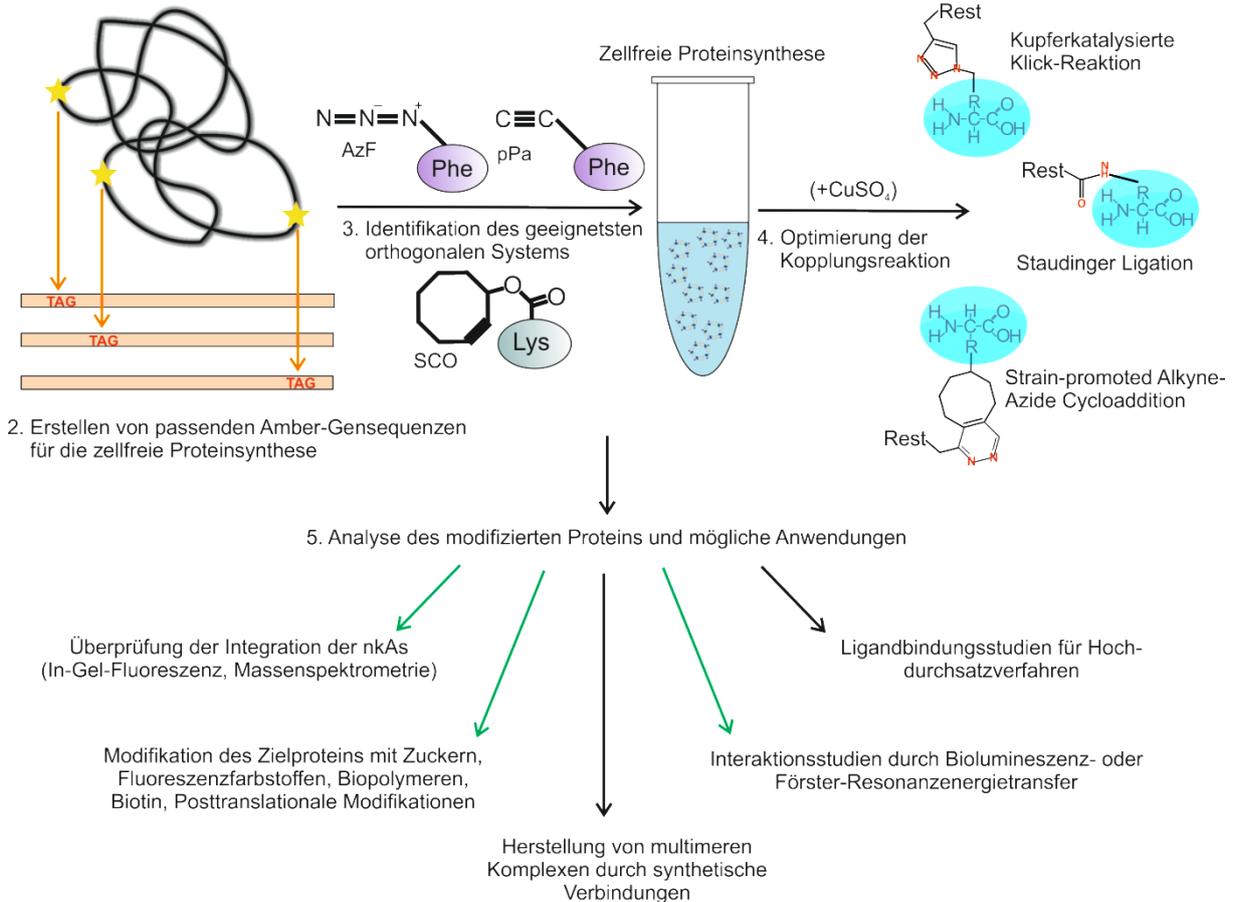


Abbildung 11. Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Generierung von modifizierten Proteinen durch Amber-Suppression. Dargestellt sind die einzelnen Schritte, beginnend mit der Identifikation von geeigneten Positionen für die Integration eines Amber-Stopcodons in eine Gensequenz bis hin zu Analysen des modifizierten Proteins und möglichen Anwendungen. Die grünen Pfeile implizieren Analysemethoden und Anwendungen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Schwarze Pfeile implizieren weitere mögliche Anwendungen.

Im folgenden Abschnitt werden die nkAs pPa und AzF verwendet. Beide Aminosäuren sind strukturell ähnlich zum Tyrosin, sodass eine modifizierte *E. coli* Tyrosin-Synthetase eingesetzt werden konnte, um die erwähnten nkAs spezifisch an eine Suppressions-tRNA aminoacylieren zu können^{18,19}. Zusätzlich sind für die vorhandenen Alkin (pPa) und Azid- (AzF)-Gruppen verschiedene chemoselektive Reaktionen bekannt, die unter physiologischen Bedingungen ablaufen können. Im ersten Teil wird die Adressierung des Amber-Stopcodons durch eine vorbeladene tRNA betrachtet sowie der Einbau von pPa und AzF in das Fusionsprotein Adora2a_amb215-Nluc analysiert und optimiert (Abb. 12). Im zweiten Schritt wird die Kopplungsreaktion zwischen der Alkin-Gruppe des pPa mit Fluoreszenzfarbstoffen adressiert, um im dritten Schritt die erhaltenen Ergebnisse auf die Modifizierung des therapeutischen Proteins Erythropoetin anzuwenden. Zusätzlich werden in diesem Abschnitt erste Funktionalitätsassays mit dem fluoreszenzmarkiertem Adora2a_Nluc etabliert.

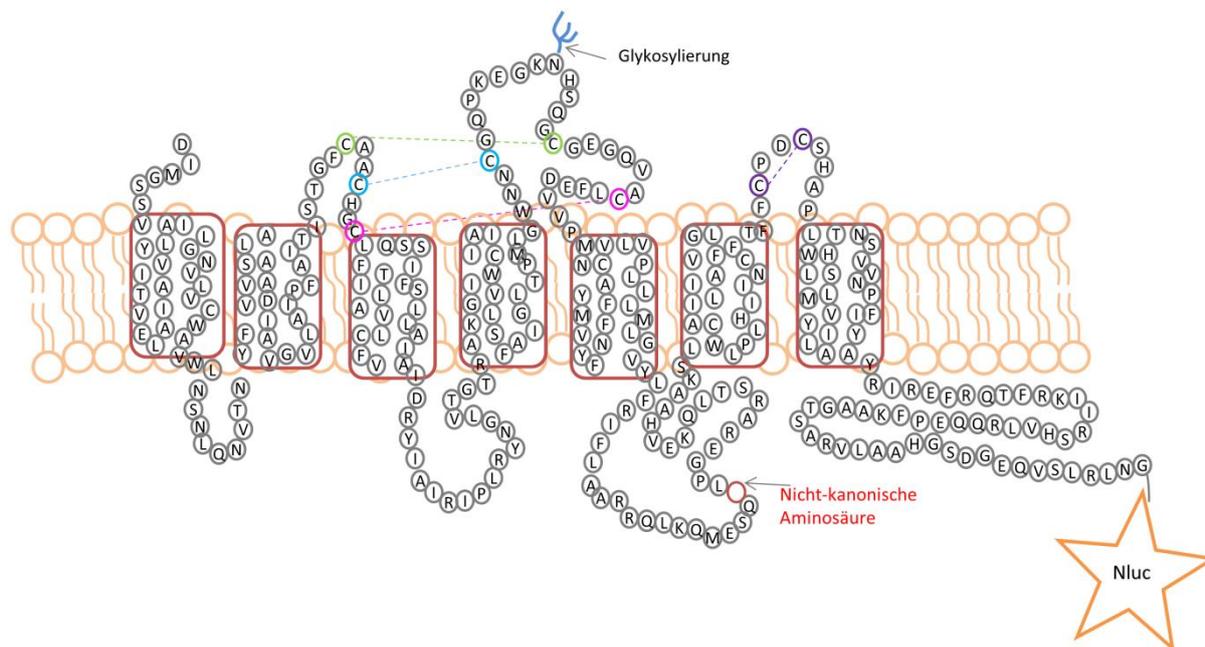


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Modellprotein Adora2a_amb215-Nluc. Der Adora2a besitzt am Codon, welches für die Aminosäure 215 codiert ein Amber-Stopcodon. *Downstream* des Amber-Stopcodons wurde eine Nluc fusioniert, welche nach einer Adressierung des Amber-Stopcodons translatiert wird. Modifiziert aus ²⁵⁰.

3.3.1. Adressierung des Amber-Stopcodons

In Abschnitt 3.2.2 wurde der ET-B-Rezeptor durch den Einbau eines fluoreszierenden BODIPY-TMR-Lysins statistisch markiert. Die Markierung erfolgte über den Einsatz der vorbeladenen tRNA, deren Anticodon Phenylalanin-Codons (BP-GAA) adressierte. Im Gegensatz dazu, wurde in den folgenden Ergebnissen eine tRNA verwendet, welche ebenfalls ein BODIPY-TMR-Lysin trägt, aber als Anticodon ein CUA besitzt und somit das Amber-Stopcodon adressierte (BP-CUA). Die erfolgreiche Adressierung des Amber-Stopcodons wurde über In-Gel-Fluoreszenz (Abb. 13A), über die Translation der Nluc durch einen Lumineszenz-Assay (Abb. 13B) im Vergleich zum Volllängenkonstrukt ohne internes Amber-Stopcodon in Gegenwart der BP-CUA sowie über Autoradiographie (Abb. 13C) anhand der erhaltenen Volllängen-Proteinbande analysiert. Als Kontrolle wurde das Amber-Konstrukt in einer zellfreien Synthese mit dem BP-GAA inkubiert. Die In-Gel-Fluoreszenz zeigt eine spezifische Bande auf einer Höhe von 38 kDa bei einer Synthese des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes in Gegenwart der BP-CUA (Abb. 13A). Die Supplementierung der BP-GAA zum Amber-Konstrukt zeigt eine Fluoreszenzbande auf Höhe von ca. 17 kDa, welche mit dem berechneten molekularen Gewicht des Terminationsproduktes übereinstimmt. Eine Volllängenbande ist in diesem Ansatz nicht detektierbar. Das Konstrukt ohne Amber-Stopcodon resultiert in Gegenwart der BP-CUA in keiner detektierbaren Proteinbande auf einer Höhe von 38 kDa. Stattdessen war ebenfalls eine schwache Bande auf der Höhe von 17 kDa erkennbar, welche nicht im Autoradiogramm detektiert wurde. Diese Bande korrelierte mit der freien BODIPY-TMR-Lysin-tRNA. Das Autoradiogramm zeigt vergleichbare Ergebnisse mit dem Unterschied, dass eine Volllängenbande in der Synthese des Konstruktes ohne Amber-Stopcodon zu erkennen ist. Die Fraktionierung des Translationsmixes in SN und MF ergibt einen höheren Anteil an Zielprotein in der SN-Fraktion im Vergleich zur MF-Fraktion. Die erhaltenen Ergebnisse aus In-Gel-Fluoreszenz und Autoradiographie spiegeln sich ebenfalls im Nluc-Assay wieder. Lumineszenzwerte konnten für die Synthese des Adora2a-Nluc-Konstrukts sowie für das Adora2a_amb215-Nluc-Konstrukt in Gegenwart der BP-CUA

erhalten werden. 75 % der erhaltenen Lumineszenzwerte konnten im Überstand detektiert werden. Der Vergleich der Synthese des Adora2a-Nluc zum Adora2a_amb215-Nluc-Konstrukt zeigt, dass ca. eine 20%ige Adressierung des Amber-Stopcodons mit der BP-CUA erreicht werden konnte. Die Synthese des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes in Gegenwart der BP-GAA resultierte in einem Lumineszenzsignal von 2 % im Vergleich zum Volllängenprotein.

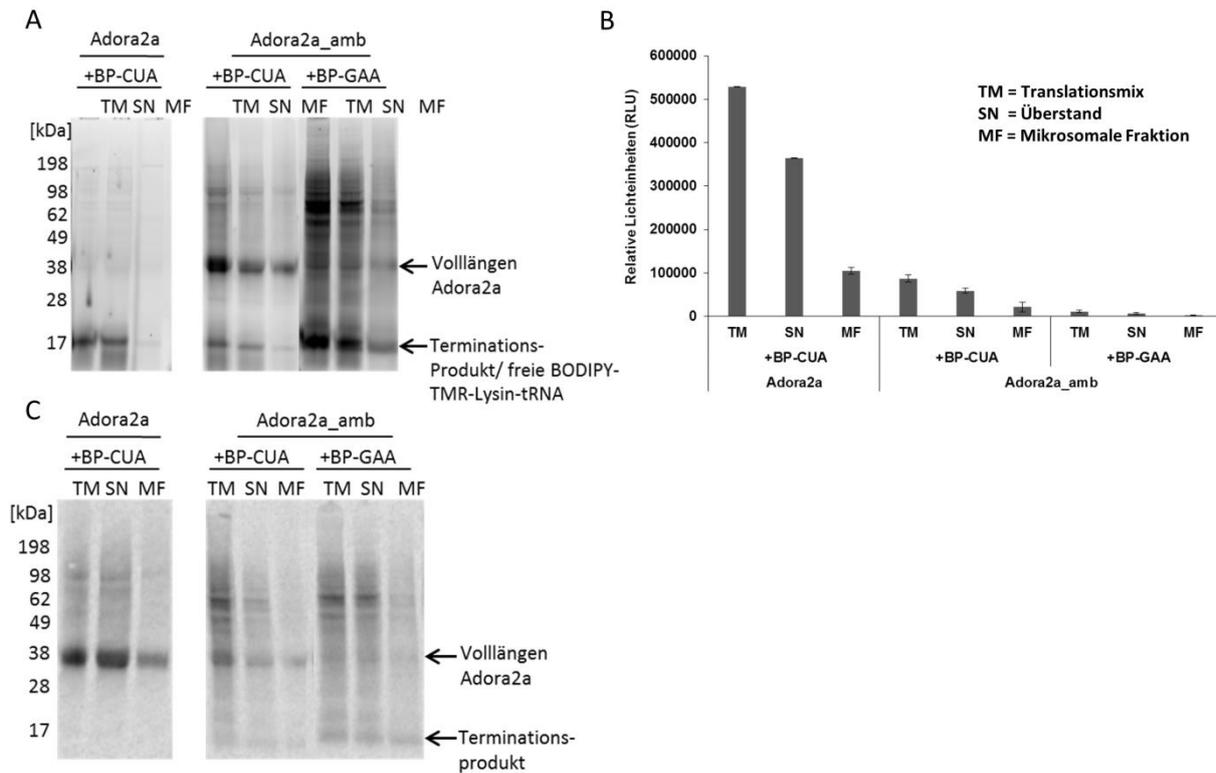


Abbildung 13. Fluoreszenzmarkierung des Adenosinrezeptors mit vorbeladenen tRNAs. A) In-Gel-Fluoreszenz des Adora2a-Nluc mit und ohne Amber-Stopcodon in Gegenwart der tRNA BP-CUA oder BP-GAA. Der Translationsmix (TM) wurde in den Überstand (SN) und in die mikrosomale Fraktion (MF) fraktioniert. B) Analyse der Translation des Reporterproteins Nluc, fusioniert an den C-Terminus des Adora2a durch die Messung der Lumineszenz. C) Autoradiogramm des *de novo* synthetisierten Adora2a durch den statistischen Einbau von ^{14}C -Leucin während der zellfreien Reaktion. Modifiziert aus ²⁵⁰.

Im Gegensatz zu der verwendeten halb-synthetischen vorbeladenen tRNA kann die eingesetzte Suppressions-tRNA (tRNA^{Tyr}CUA) durch eine modifizierte Tyrosin-Synthetase (eAzFRS) enzymatisch mit der nicht-kanonischen Aminosäure aminoacyliert. Durch die enzymatische Aminoacylierung wird der natürliche Prozess der Beladung der tRNA mit der spezifischen Aminosäure nachgestellt, wodurch ein Recycling der tRNA möglich ist. Eine Übersicht der eingesetzten nkAs mit den möglichen Kopplungsreaktionen befindet sich in der Abbildung S1 im Anhang. Im folgenden Abschnitt werden AzF und pPa in das Modelprotein mit dem Ziel integriert, eine möglichst hohe Suppressionseffizienz zu erreichen. Die Suppressionseffizienz wurde im Vergleich zum Adora2a-Nluc ohne Amber-Stopcodon bestimmt. Der Einbau der nkAs AzF ist in Abbildung 14 dargestellt. Es wurden Suppressionseffizienzen zwischen 14 und 22 % erreicht, welche somit vergleichbar zu der Adressierung des Amber-Stopcodons durch den Einsatz von BP-CUA waren. Die höchste Suppressionseffizienz (22 %) wurde durch den Einsatz von 2 mM AzF, 3 μM tRNA^{Tyr}CUA und 3 μM eAzFRS erreicht. Eine Erhöhung der Synthetasekonzentration auf 5 μM reduzierte die Suppressionseffizienz um 6 %. Die Erhöhung der Suppressions-tRNA auf 5 μM resultierte in einer Suppressionseffizienz von 19 %. Die Reduktion von tRNA oder Synthetase während

der zellfreien Proteinsynthese zeigte ebenfalls einen negativen Effekt auf den Einbau der nkAs. In den Negativkontrollen wurde die zellfreie Synthese in der Abwesenheit von nkAs, tRNA oder Synthetase durchgeführt. Es wurden Suppressionseffizienzen von 0,25 % (Synthese ohne Suppression-tRNA bzw. ohne Synthetase) und 2 % (Synthese ohne nkAs) erhalten. Durch die geringe Einbaueffizienz der nkAs AzF konnte im Autoradiogramm kein Volllängenprotein Adora2a-Nluc detektiert werden.

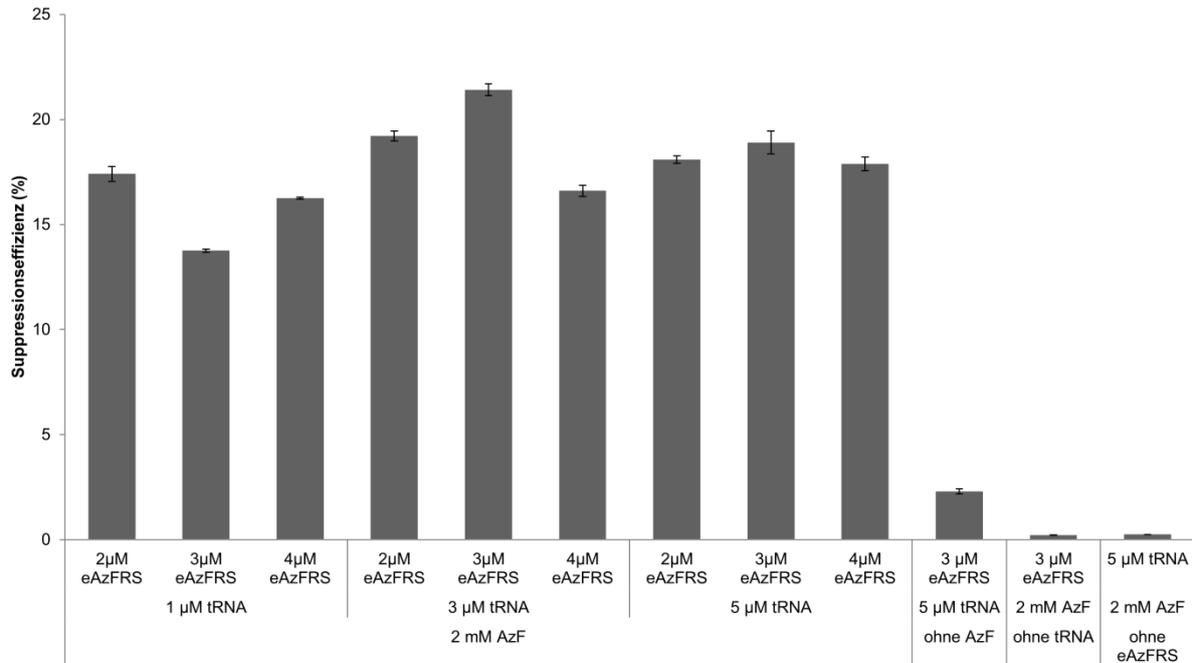


Abbildung 14. Einfluss der orthogonalen Komponenten auf die Suppressionseffizienz. Für die Bestimmung der Suppressionseffizienzen wurden Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an tRNA (1-5 μM) und Synthetase (2-4 μM) in Gegenwart von 2 mM AzF präpariert. Die Einbaueffizienz wurde anhand der translatierten Nluc bestimmt und auf die Synthese des Volllängenproteins ohne Amber-Stopcodon in der Gensequenz normiert.

Im Vergleich zur Inkorporation von AzF konnte durch den Einsatz von pPa eine wesentlich höhere Suppressionseffizienz zwischen 63 und 81 % erreicht werden (Abb. 15A). Eine maximale Suppressionseffizienz von 81 % wurde durch den Einsatz von 2 mM pPa, 2 μM tRNA^{TyrCUA} und 3 μM eAzFRS erreicht. Während eine Variation der Konzentration von Suppressions-tRNA in einer Änderung von maximal 6 % in der Suppressionseffizienz resultiert, zeigt die Erhöhung der Synthetasekonzentration von 2 μM auf 3 oder 4 μM eine Erhöhung von 18 bzw. 7 %. In Abwesenheit einer der orthogonalen Komponenten während der zellfreien Synthese wurden, wie auch bei der Inkorporation von AzF, wesentlich niedrigere Einbaueffizienzen detektiert, welche einen prozentualen Anteil von 4 % (ohne pPa), 0,3 % (ohne tRNA) und 0,7 % (ohne Synthetase) aufzeigten. Im Autoradiogramm wurde eine spezifische Bande auf der Höhe von 38 kDa in Gegenwart von tRNA, Synthetase und nkAs detektiert (Abb. 15B). Die Intensitäten der Banden unterschieden sich zwischen den verschiedenen Konzentrationen kaum. Das Fehlen einer Komponente für die Amber-Suppression (tRNA, pPa oder eAzFRS) während der zellfreien Synthese führte zu keinem detektierbaren Volllängenprotein.

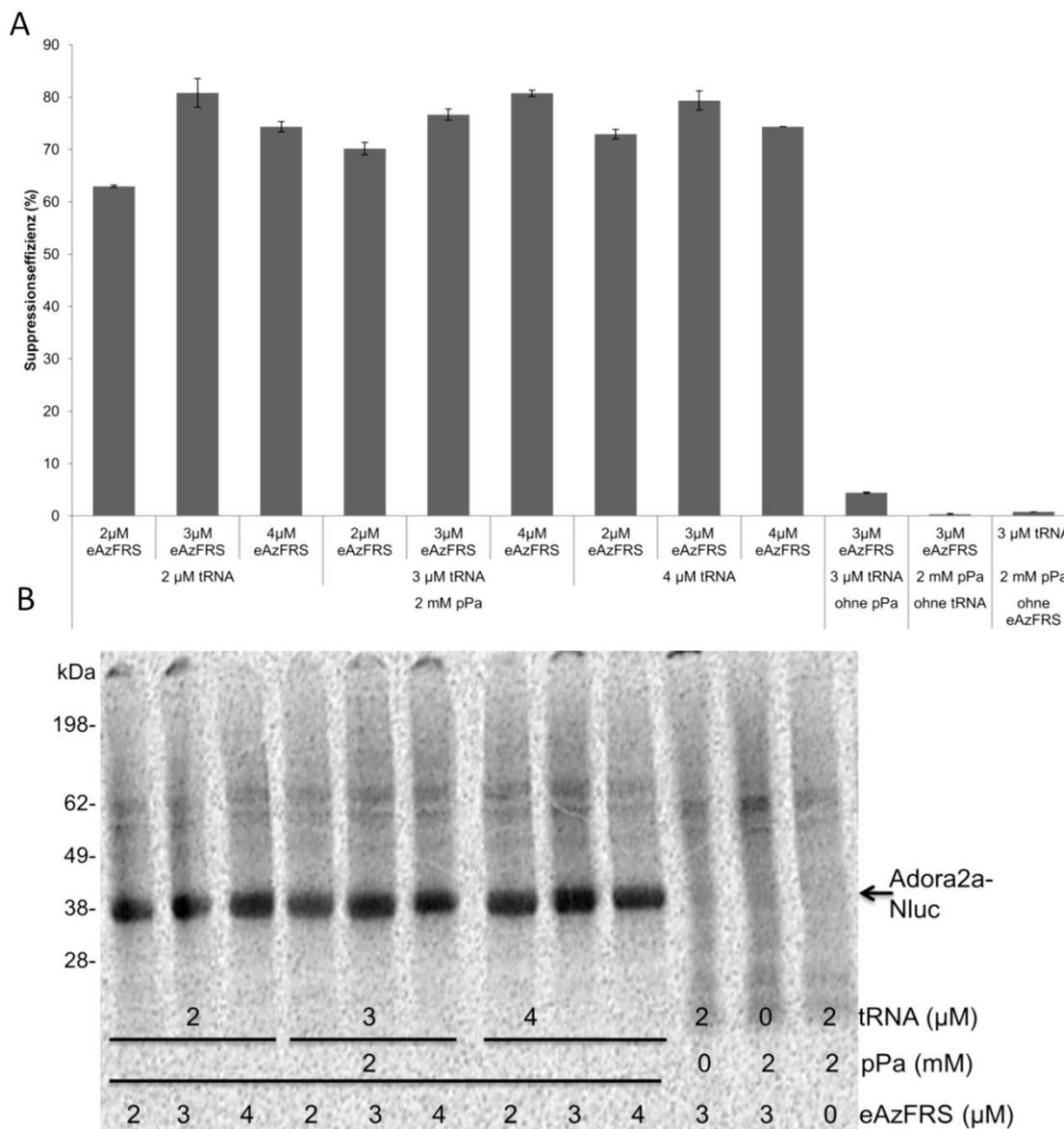


Abbildung 15. Einfluss der orthogonalen Komponenten auf die Suppressions-Effizienz. Für die Bestimmung der Suppressions-Effizienz wurden Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an tRNA (2-4 μ M) und Synthetase (2-4 μ M) in Gegenwart von 2 mM pPa präpariert. Die Einbau-Effizienz wurde anhand der translatierten Nluc bestimmt und auf die Synthese des Volllängenproteins ohne Amber-Stopp-Codon in der Gensequenz normiert.

3.3.2. Bioorthogonale Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die reaktive Gruppe der nkAs

Aufgrund der geringeren Einbaueffizienz der nkAs AzF in das Adora2a_amb215-Nluc-Konstrukt wurde die Kopplungsreaktion von Azid-konjugierten Farbstoffen an die Alkin-Gruppe des pPas untersucht. Der erste Abschnitt des Kapitels befasst sich mit der Analyse der kupferkatalysierten Klickreaktion. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Cu(I)-stabilisierende Komponenten (THPTA und L-His) sowie zwei Alkin-modifizierte Moleküle (pPa und Alexa Fluor 647-Alkin, AF647-Alkin) miteinander verglichen. Bei einer erfolgreichen Kopplung der Alkingruppe mit der Azid-Gruppe des nicht-fluoreszierenden Stoffes Azidocoumarin entsteht ein fluoreszierender Triazol-Coumarin-Komplex mit einem Emissionsmaximum bei 470 nm. Die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums der Kombination von verschiedenen Stabilisatoren und Alkin-Derivaten mit Coumarin ist in Abbildung 16 dargestellt. Wie erwartet, konnte ein

Emissionsmaximum bei 470 nm in den Ansätzen mit pPa und THPTA, pPa und L-His sowie AF647-Alkin und THPTA detektiert werden. Die Intensität zeigte für den Ansatz mit pPa und THPTA im Vergleich zum Stabilisator L-His und zum Alkin-modifizierten AF647 ein deutlich höheres Signal. Für den Ansatz mit AF647-Alkin und L-His sowie für die Kontrollen, welche den Katalysator in Form von CuSO_4 nicht enthielten, konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden.

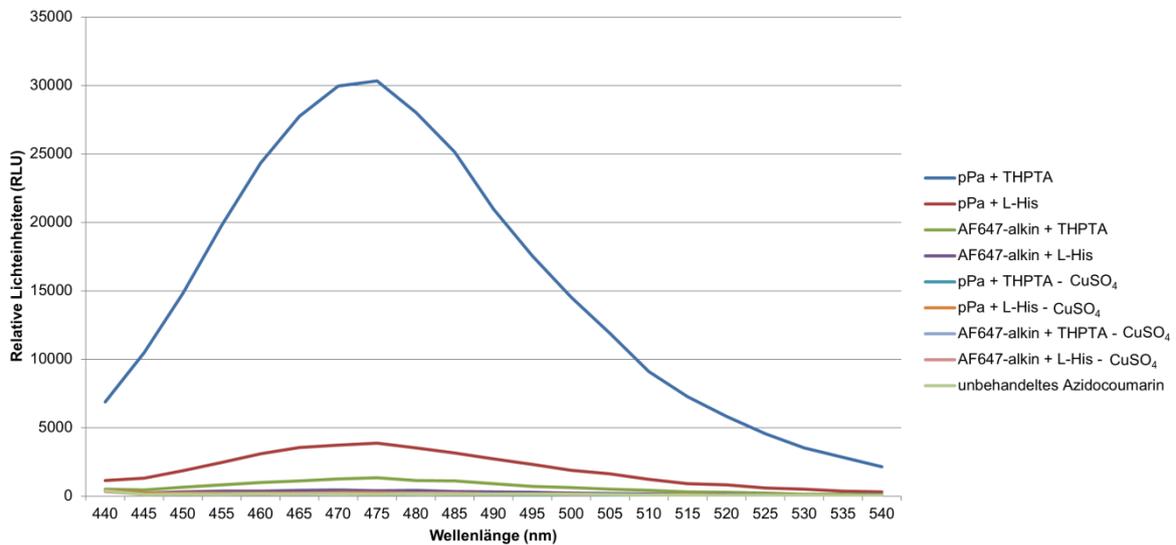


Abbildung 16. Analyse der Fluoreszenzintensität des Triazol-Coumarin-Komplexes nach der CuAAC. Der Einfluss von verschiedenen Parametern (Stabilisatoren und Alkine) auf die Umsetzung von Azidocoumarin zu Triazol-Coumarin durch die CuAAC wurde analysiert. Die Proben wurden bei 405 nm angeregt und ein Emissionsspektrum von 440– 540 nm aufgenommen.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde THPTA als Stabilisator für die folgenden Klickreaktionen verwendet. In einem zweiten Schritt wurde die CuAAC auf das Modelprotein Adora2a-Nluc mit inkorporierter nkAs pPa angewandt. Um der negativen Wirkung von freien Cu(I) -Ionen auf das Protein entgegenzuwirken²⁵¹, wurde eine minimale CuSO_4 -Konzentration bestimmt, welche den Ablauf der CuAAC mit dem Farbstoff Silikon-Rhodamin-Azid (SiR-Azid) gewährleistet, aber die Proteinstruktur möglichst intakt hält. Es wurden CuSO_4 -Konzentrationen im Bereich von 0 μM bis 500 μM eingesetzt (Abb. 17A). Die In-Gel-Fluoreszenz (Abb. 17A) zeigte eine spezifische Bande ab dem Einsatz von 100 μM CuSO_4 mit einem Intensitätsmaximum bei 200 μM . Bei einer CuSO_4 -Konzentration kleiner als 100 μM war keine Fluoreszenzbande zu detektieren. Bei einer CuSO_4 -Konzentration von 500 μM war die Intensität der Fluoreszenzbande weniger intensiv als bei 100 oder 200 μM CuSO_4 . Eine zellfreie Proteinsynthese in Abwesenheit der tRNATyrCUA zeigte bei keiner verwendeten CuSO_4 -Konzentration eine spezifische Fluoreszenzbande. Im Autoradiogramm (Abb. 17B) waren die intensivsten Proteinbanden bei CuSO_4 -Konzentrationen von 0-50 μM zu erkennen. Bei CuSO_4 -Konzentrationen von 100-200 μM war die Proteinbande schwächer, während sie bei 500 μM CuSO_4 beinahe verschwand. Die Synthesen in Abwesenheit von tRNATyrCUA zeigten keine Vollängenbanden des Adora2a-Nluc. Dafür war eine intensive Bande auf der Höhe des zu erwartenden Terminationsproduktes zu erkennen. Aufgrund der intensiven Fluoreszenzbande bei einer CuSO_4 -Konzentration von 200 μM und der detektierbaren Proteinbande in der Autoradiographie wurde diese Konzentration in den folgenden Experimenten verwendet.

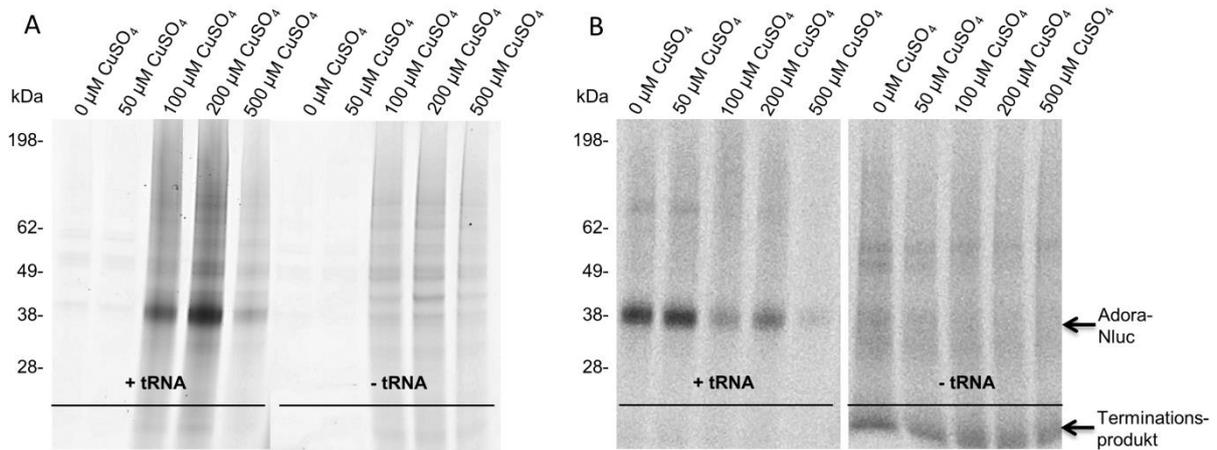


Abbildung 17. Einfluss von verschiedenen Kupfersulfat-Konzentrationen auf die CuAAC und die Proteinintegrität. A) In-Gel-Fluoreszenz des gekoppelten SiR-Azids durch die CuAAC an die Alkin-Gruppe des pPas. Die Proben wurden bei 632 nm angeregt und die Emission bei 670 nm detektiert. B) Autoradiogramm der mit unterschiedlichen Kupfersulfat-Konzentrationen (0-500 µM) behandelten Proben.

Neben der Anpassung der Kupferkonzentration wurde eine Analyse der Farbstoffkonzentration (Abb. 18A) und der Inkubationszeit (Abb. 18B) durchgeführt. Das SiR-Azid wurde in den Konzentrationen von 0-20 µM während der CuAAC eingesetzt. In Abwesenheit des Farbstoffes war keine Fluoreszenzbande detektierbar. Durch den Einsatz von 3 µM ist eine leichte Bande auf der zu erwartenden Höhe zu erkennen, die mit steigender Farbstoffkonzentration an Intensität zunimmt. Die Hintergrundfluoreszenz des SiR-Azides nahm mit steigender Konzentration marginal zu. Die Abwesenheit der tRNATyrCUA während der zellfreien Synthese in Kombination mit der anschließenden Markierungsreaktion führte bei keiner Farbstoffkonzentration zu einer fluoreszierenden Produktbande. Es ist anzumerken, dass die Anpassung der eingesetzten Konzentration zwischen den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen variiert, da zum Beispiel bei den Farbstoffen Sulfo-Cy5-Azid und DyLight650-Phosphin bereits bei geringeren Konzentrationen (3-5 µM) eine intensive Fluoreszenzbande detektiert werden konnte. Das SiR-Azid wurde in einer Konzentration von 20 µM eingesetzt.

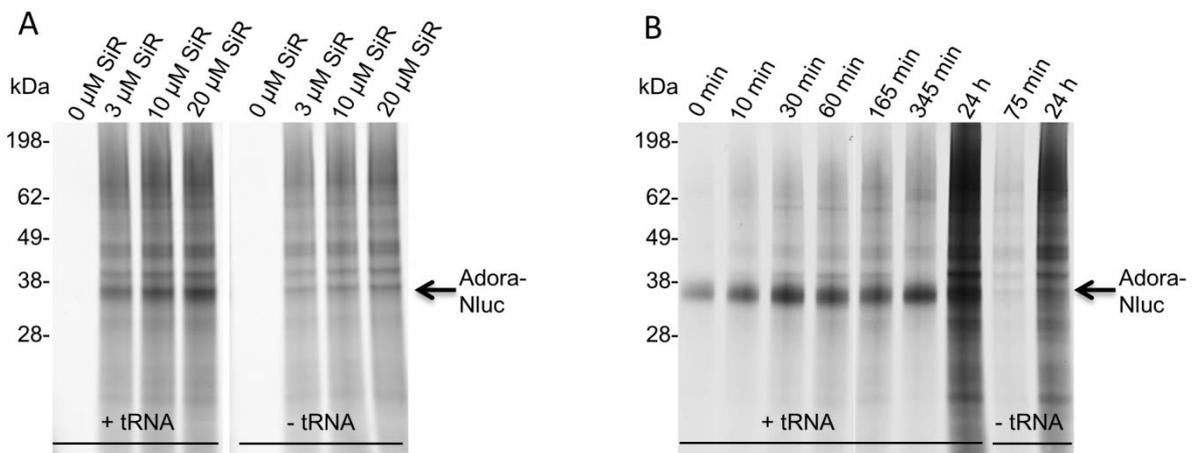


Abbildung 18. Einfluss von verschiedenen Farbstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten auf die In-Gel-Fluoreszenz. A) In-Gel-Fluoreszenz des gekoppelten SiR-Azids durch die CuAAC an die Alkin-Gruppe des pPas. Es wurden verschiedene Konzentrationen an SiR-Azid im Bereich von 0-20 µM eingesetzt. B) In-Gel-Fluoreszenz des gekoppelten SiR-Azids nach verschiedenen Inkubationszeiten zwischen 0 min und 24 Stunden.

Die unterschiedlichen Inkubationszeiten beziehen sich auf die Dauer der Klickreaktion. Das bedeutet, dass ohne zusätzliche Inkubation der Labeling-Mix zu der mikrosomalen Fraktion gegeben und direkt im Anschluss die Aceton-Fällung durchgeführt wurde. Aufgrund der oben genannten Eigenschaften der CuAAC wie Stabilität, Wasserkompatibilität und eine gute Umsatzrate kann vermutet werden, dass diese Reaktion während der Aceton-Fällung weiterhin abläuft. Diese Vermutung wird unterstützt durch die vorhandene Fluoreszenzbande bei einer Inkubationszeit der CuAAC von 0 min (Abb. 18B). Im Vergleich zu längeren Inkubationszeiten der Klickreaktion ist diese Bande weniger intensiv. Nach einer Inkubationszeit von 30 min ist eine Steigerung der Intensität der fluoreszierenden Produktbande zu erkennen. Zusätzlich steigen die Intensität von Nebenbanden sowie der Fluoreszenzhintergrund des Farbstoffes. Während bei einer Inkubationszeit von 0 min kaum Hintergrund zu erkennen war, konnte nach 24 Stunden die Zielproteinbande beinahe nicht vom Hintergrund unterschieden werden. Eine zellfreie Synthese in Abwesenheit der Suppressions-tRNA mit anschließender CuAAC bei unterschiedlichen Inkubationszeiten resultierte in keiner detektierbaren Fluoreszenzbande. Für weitere Experimente wurde eine Inkubationszeit der CuAAC von 30 min gewählt.

Fluoreszenzmarkierte Membranproteine sind insbesondere für Interaktionsstudien oder auch für Ligand-Screening-Verfahren von Interesse. Idealerweise befindet sich das Membranprotein während der Analytik in einer Membran-ähnlichen Umgebung. Durch die Integration der zellfrei hergestellten Membranproteine in die mikrosomale Membran kann diese Grundlage gewährleistet werden. Um Interaktionsstudien wie zum Beispiel Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer zwischen Ligand und fluoreszenzmarkiertem Membranprotein, zwischen einzelnen Untereinheiten des Proteins oder sogar zwischen verschiedenen Proteinen analysieren zu können, sollte im Vorfeld der Einfluss von Farbstoffen auf die Integrität der Mikrosomen analysiert werden. Zusätzlich sollte die Detektion des fluoreszenzmarkierten Proteins in den mikrosomalen Membranen möglich sein. Aus diesem Grund wurden die Mikrosomen mit verschiedenen Farbstoffen inkubiert. Als Beispiel sind im Folgenden die Inkubationen mit den Farbstoffen DyLight488-Phosphin, Sulfo-Cy3-Azid und DyLight650-Phosphin dargestellt (Abb. 19). Die erhaltenen Signale wurden verschiedenen Farben zugeordnet, sogenannten Falschfarben (DyLight488-Phosphin und 6-FAM-Azid: gelb, Sulfo-Cy3-Azid: blau, DyLight650-Phosphin und Sulfo-Cy5-Azid: rot). Die Inkubation der Mikrosomen mit den drei dargestellten Farbstoffen zeigt im Vergleich zu den Proben mit unbehandelten Mikrosomen keinen Unterschied in der Mikrosomenintegrität. Es werden weiterhin Agglomerate mit einem Mikrosomendurchmesser im Bereich von 1- 10 μm gebildet. Während die unbehandelten Mikrosomen bei einer Anregung von 488 und 633 nm keine Fluoreszenzemission oberhalb von 505 nm bzw. 650 nm aufzeigen, ist eine Eigenfluoreszenz durch die Anregung bei 515 nm im Bereich von 550-580 nm zu erkennen. Die Eigenfluoreszenz der Mikrosomen lässt keinen Unterschied zwischen der unbehandelten und mit Sulfo-Cy3-Azid inkubierten Probe erkennen. Die Analyse bei einer Emission oberhalb von 505 nm bzw. 670 nm zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen der unbehandelten Probe und der mit Farbstoff inkubierten Probe. Während keine Fluoreszenz bei den unbehandelten Mikrosomen zu erkennen war, zeigten die mit Farbstoff inkubierten Mikrosomen ein starkes Fluoreszenzsignal, welches mit den Mikrosomen kolokalisierte. Anhand dieser Analyse sind Farbstoffe mit einem Emissionsbereich von 550-580 nm aufgrund der Eigenfluoreszenz der Mikrosomen für mikroskopische Untersuchungen ungeeignet, während Farbstoffe mit einem Emissionsbereich von 505-540 nm bzw. oberhalb von 670 nm für mikroskopische Untersuchungen geeignet sind. Generell zeigte sich eine sehr starke unspezifische Färbung der Mikrosomen durch die eingesetzten Farbstoffe, weshalb ein Screening von 20

verschiedenen Farbstoffen durchgeführt wurde und davon zwei Kandidaten ermittelt werden konnten, welche sich für mikroskopische Anwendungen eigneten. Die mikroskopische Analyse des Modelproteins Adora2a_amb215-Nluc mit den gekoppelten Farbstoffen Sulfo-Cy5-Azid bzw. 6-FAM-Azid ist in Abb. 20 und 21 dargestellt.

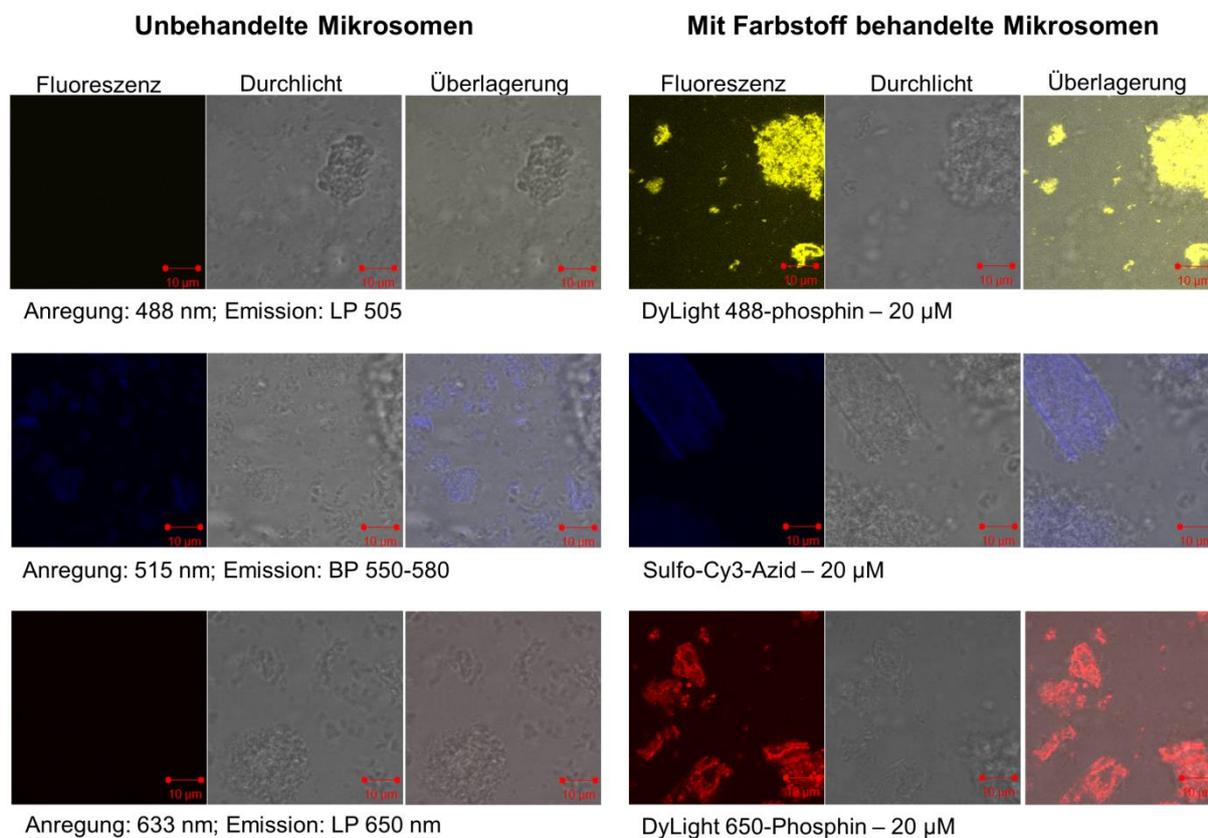


Abbildung 19. Analyse der Mikrosomen in Gegenwart von Fluoreszenzfarbstoffen durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Die mikrosomale Fraktion wurde für zwei Stunden mit 20 µM des jeweiligen Farbstoffes inkubiert und nach einem Waschschrift mit PBS auf einen IBIDI-Objektträger aufgetragen und analysiert. Angegeben sind die verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Während in der In-Gel-Fluoreszenz der Negativkontrolle, welche ohne eAzFRS im zellfreien System translatiert wurde, keine Bande zu erkennen ist, markiert der Farbstoff Sulfo-Cy5-Azid aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ebenfalls unspezifisch die Mikrosomen (Abb. 20, obere Zeile). Im Gegensatz zu den DyLight-Phosphin-Farbstoffen besitzt dieser Farbstoff in wässriger Umgebung zwei Sulfit-Gruppen, wodurch die hydrophobe Eigenschaft reduziert und die Hydrophilie des Moleküls erhöht wird. Dadurch werden die Mikrosomen weniger stark unspezifisch angefärbt als die Mikrosomen in Gegenwart von DyLight-Phosphin. Vergleicht man die unspezifische Färbung des Sulfo-Cy5-Azides mit dem positionsspezifisch markierten Adora2a_amb215-Nluc ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Bei identischen Einstellungen während der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zeigt die Probe mit dem fluoreszenzmarkierten Protein Adora2a-Nluc eine intensivere Färbung der Mikrosomen (Abb. 20, untere Zeile). Zusätzlich zeigt der Farbstoff Sulfo-Cy5-Azid kaum Nebenbanden in der In-Gel-Fluoreszenz, während die Zielproteinbande deutlich detektierbar ist. Zusammenfassend ist dieser Farbstoff sehr gut für analytische Zwecke auf Basis von In-Gel-Fluoreszenz und Mikroskopie geeignet.

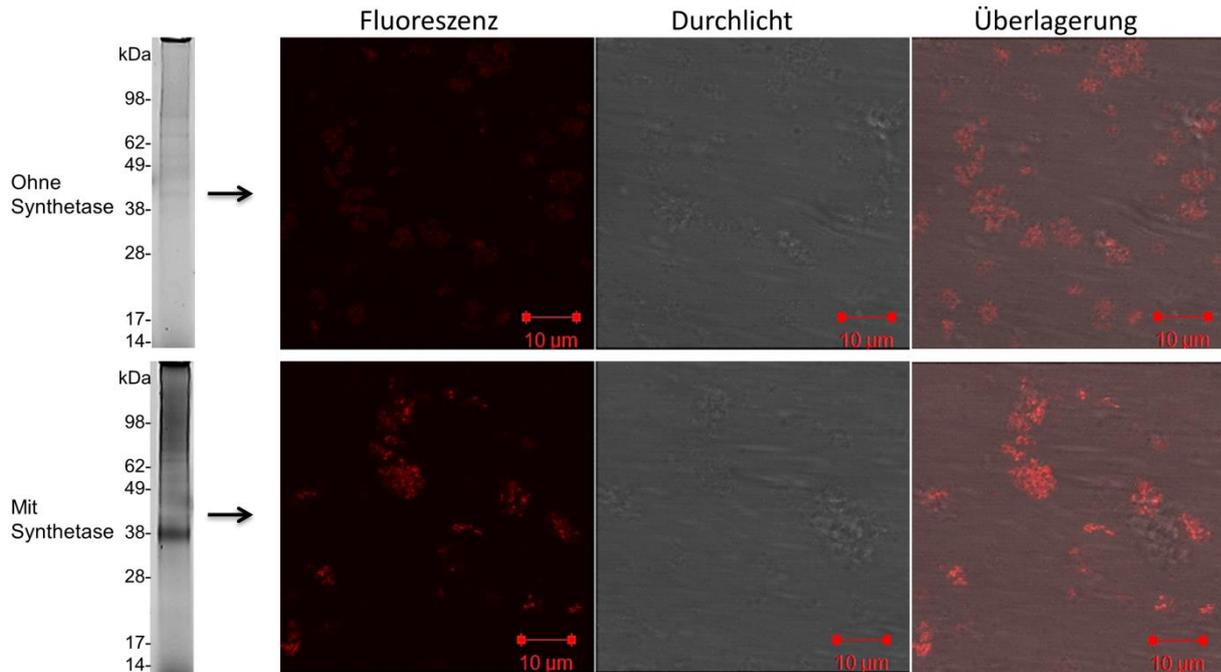


Abbildung 20. Analyse des Farbstoffes Sulfo-Cy5-Azid durch In-Gel-Fluoreszenz und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). Oberes Panel: In-Gel-Fluoreszenz und CLSM der Negativkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Färbung der Mikrosomen durch Sulfo-Cy5-Azid. Als Negativkontrolle diente eine Synthese des Adora2a_amb215-Nluc in Abwesenheit der eAzFRS. Unteres Panel: In-Gel-Fluoreszenz und CLSM des fluoreszenzmarkierten Adora2a_amb-Nluc nach einer zellfreien Synthese in Gegenwart sämtlicher orthogonalen Komponenten. Die Bilder der In-Gel-Fluoreszenz der beiden Proben, als auch die CLSM-Bilder, wurden mit identischen Einstellungen aufgenommen. Modifiziert aus ²⁵⁰.

Die In-Gel-Fluoreszenz des gekoppelten Farbstoffes 6-FAM-Azid resultierte bei der Synthese ohne eAzFRS in einer unspezifischen „Wolke“ auf Höhe der Fluoreszenzbande des Zielproteins (Abb. 21). Diese Wolke wurde wiederholt auf dieser Höhe detektiert, welche mit höheren Farbstoffkonzentrationen in ihrem Durchmesser wuchs. Außerdem war eine Nebenbande auf der Höhe von 15 kDa zu erkennen. Trotz dieser unerwünschten Effekte des 6-FAM-Azides war eine spezifische Fluoreszenzbande des markierten Adora2a_Nlucs, welche wesentlich schärfer und definierter erscheint als die Farbstoffwolke, zu erkennen. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte in der Negativkontrolle eine schwache unspezifische Fluoreszenz des Farbstoffes, welche mit den Mikrosomen kolokalisiert (Abb. 21, obere Zeile). Im Vergleich zum Sulfo-Cy5-Azid erscheint die unspezifische Färbung weniger intensiv. Die Fluoreszenzbilder in Gegenwart des markierten Adora2a_Nlucs resultierten in einem intensiven Fluoreszenzsignal, welches mit den Mikrosomen kolokalisierte (Abb. 21, untere Zeile). Das 6-FAM-Azid besitzt ebenfalls polare Endgruppen in Form von Hydroxygruppen, wodurch eine unspezifische Einlagerung in die hydrophobe Membran der Mikrosomen verringert wird. Zusammenfassend ist dieser Farbstoff ebenfalls für mikroskopische Analysen geeignet sowie begrenzt für die Detektion mittels In-Gel-Fluoreszenz. Eine Übersicht der analysierten Farbstoffe ist in Abbildung S2 im Anhang zu finden.

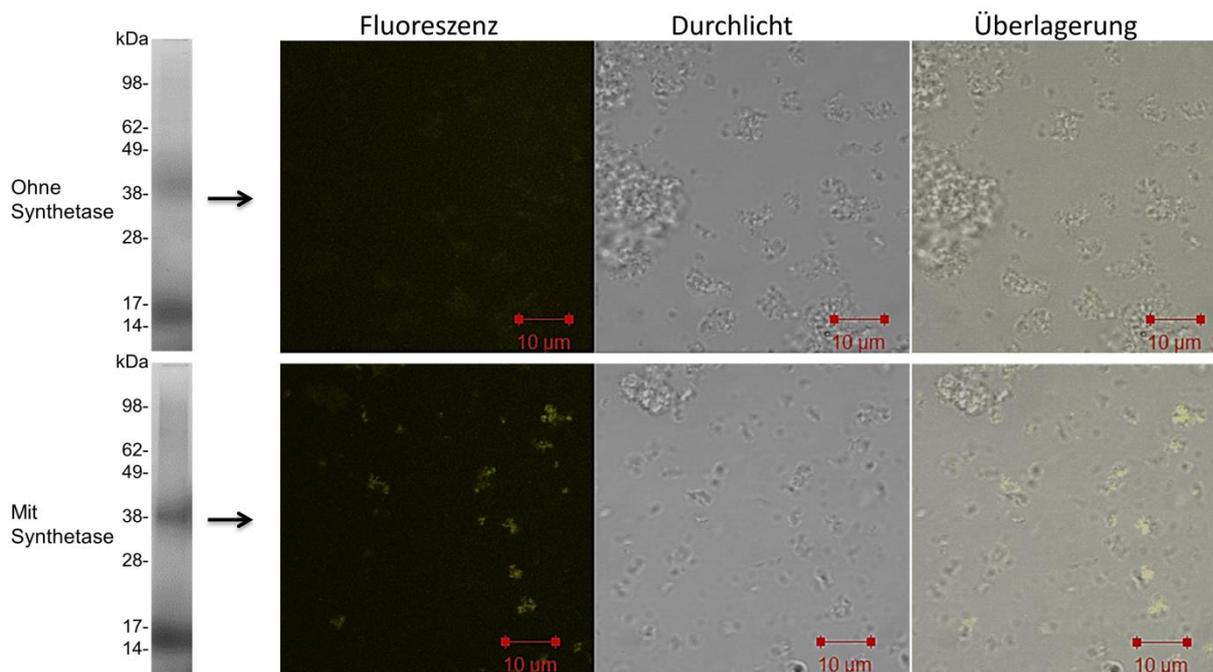


Abbildung 21. Analyse des Farbstoffes 6-FAM-Azid durch In-Gel-Fluoreszenz und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Oberes Panel: In-Gel-Fluoreszenz und CLSM der Negativkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Färbung der Mikrosomen durch 6-FAM-Azid. Die Negativkontrolle besteht aus der Synthese des Adora2a_amb215-Nluc in Abwesenheit der eAzFRS. Unteres Panel: In-Gel-Fluoreszenz und CLSM des fluoreszenzmarkierten Adora2a_amb-Nluc nach einer zellfreien Synthese in Gegenwart sämtlicher orthogonalen Komponenten. Die Bilder der In-Gel-Fluoreszenz der beiden Proben, als auch die CLSM-Bilder wurden mit identischen Einstellungen aufgenommen.

3.3.3. Proteinmodifikation und Funktionalitätsstudien auf Basis der Amber-Suppression

Im anschließenden Kapitel werden zwei Anwendungsbeispiele der Amber-Suppression aufgezeigt. Das erste Beispiel beschäftigt sich wie in Abschnitt 3.3 dargelegt mit der PEGylierung des Hormons EPO. Für die PEGylierung von EPO wurde das Codon der Aminosäure Serin an Position 153, an welcher sich eine O-Glykosylierung befindet, durch das Amber-Stopcodon ausgetauscht. Das Amber-Stopcodon in dem verwendeten Konstrukt ließ sich sowohl von AzF, als auch von pPa adressieren und über Staudinger Ligation bzw. CuAAC mit DyLight650-Phosphin bzw. Sulfo-Cy5-Azid modifizieren (Abb. 22A und B). Auffällig sind die vier definierten Banden, welche in der In-Gel-Fluoreszenz zu erkennen sind. Diese sind zurückzuführen auf die drei vorhandenen N-Glykosylierungsstellen des EPOs. Die unterste Bande korreliert dementsprechend mit dem nicht-glykosylierten, aber fluoreszenzmarkierten Produkt, während die oberste Bande das vollständig (dreifach) glykosylierte und fluoreszenzmarkierte Produkt darstellt. Nach einem Glykosidase-Verdau mit PNGase F sind die Banden des glykosylierten EPOs in der In-Gel-Fluoreszenz nicht mehr detektierbar (Abb. 22A). Während die In-Gel-Fluoreszenz vier definierte Banden zeigte, erschienen die Banden in der Autoradiographie verschwommen. Durch den PNGase F-Verdau entstanden zwei definierte Banden, bei denen es sich um das deglykosylierte Terminations- bzw. Volllängenprodukt handelte. Wurde die zellfreie Synthese in Abwesenheit der nkAs AzF durchgeführt, erschienen die Banden im Autoradiogramm wiederum definierter. Zusätzlich konnte auf einer Höhe von 35 kDa die Bande des dreifach glykosylierten Volllängenproduktes nicht mehr detektiert werden. Nach einem PNGase F-Verdau konnte in dieser Probe nur eine Bande detektiert werden, welche auf das de-glykosylierte Terminationsprodukt zurückzuführen war. Während die Fluoreszenzmarkierung des Adora2a-Nlucs mit Sulfo-Cy5-Azid kaum Nebenbanden in der

In-Gel-Fluoreszenz aufzeigte, wurde am Beispiel des EPOs eine höhere Anzahl an Nebenbanden detektiert (Abb. 22B). Dies kann zum einen auf die unterschiedlichen Proteinausbeuten zurückzuführen sein, die beim Adora2a-Nluc um den Faktor 10 höher waren oder auf den unterschiedlichen Ursprung des verwendeten Lysates. Während der Adora2a-Nluc in einem zellfreien CHO-System translatiert wurde, wurde hier ein zellfreies Insekten-System genutzt. Trotz der Nebenbanden können ebenfalls die einzelnen Stufen der Glykosylierung des Vollängenproteins detektiert werden. Die Autoradiographie zeigt im Gegensatz zum Einbau der AzF definierte Banden. Zusätzlich war die Bande des Terminationsproduktes auf einer Höhe von 14 kDa weniger intensiv als die Banden der Vollängenproteine. Dies deutet abermals auf eine höhere Einbaueffizienz der nkAs pPa im Vergleich zu AzF hin. Der erfolgreiche Einbau des pPas diente als Grundlage für die Kopplung des 10 kDa großen PEG-Azides mit Hilfe der CuAAC. Wird die Klickreaktion in Abwesenheit von Kupfer durchgeführt, entsteht ein zur unbehandelten Probe identisches Bandenmuster, welches weniger intensiv erscheint. In Gegenwart von 200 oder 400 μM CuSO_4 kann eine zusätzliche Bande auf Höhe von ca. 46 kDa detektiert werden. Bei dieser Bande handelte es sich um das dreifach glykosylierte und PEGylierte EPO. Interessanterweise wurden zwischen 38 kDa und 46 kDa keine Banden detektiert. In diesem Bereich müssten die einfach und zweifach glykosylierten und PEGylierten EPO-Proteine liegen. Die PEGylierung schien demnach nur auf das vollständig glykosylierte EPO anwendbar zu sein.

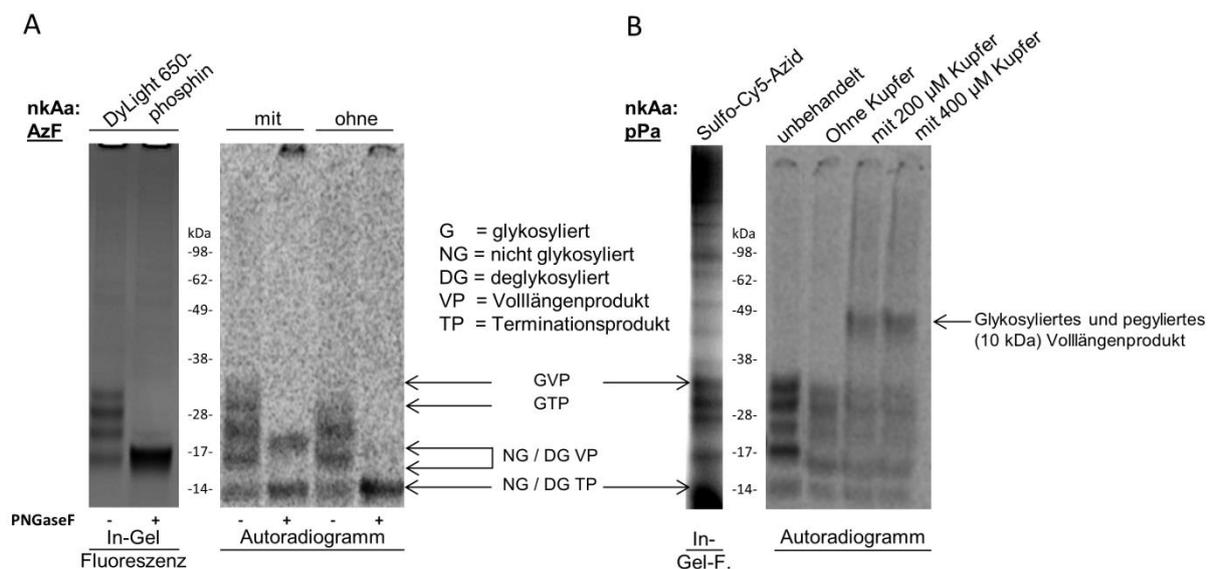


Abbildung 22. Chemoselektive Modifikation des Erythropoetins. A) In-Gel-Fluoreszenz (linkes Bild) von EPO, markiert mit DyLight650-Phosphin. Die markierte Probe wurde im Anschluss mit PNGase F verdaut. Autoradiogramm (rechtes Bild) des unbehandelten und mit PNGase F verdauten EPOs. Die zellfreie Synthese wurde in Gegenwart und in Abwesenheit der nkAs AzF durchgeführt. B) In-Gel-Fluoreszenz (linkes Bild) von EPO, markiert mit Sulfo-Cy5-Azid. Im Autoradiogramm (rechtes Bild) ist die erfolgreiche Kopplung des Azid-modifizierten PEG-Moleküls an die Alkin-Gruppe des pPas gezeigt. Modifiziert aus ²⁵².

Die hier dargestellten Ergebnisse sind Teil einer Publikation aus dem Jahr 2018 in der zusätzlich gezeigt werden konnte, dass der Einbau der nkAss AzF und pPa keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben²⁵². Trotz dieser ersten Hinweise, dass keine Beeinträchtigung der Proteinfunktionalität nach dem Einbau einer nkAs vorliegt, wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Analyse der Funktionalität eines fluoreszenzmarkierten Proteins ermöglicht. Die Grundlage für den Funktionalitätsassay bildet ein Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) zwischen der C-terminalen Nluc des Adora2as und der eingebauten Aminosäure mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff. Das Prinzip des BRET-Assays ist schematisch in Abb. 23 dargestellt.

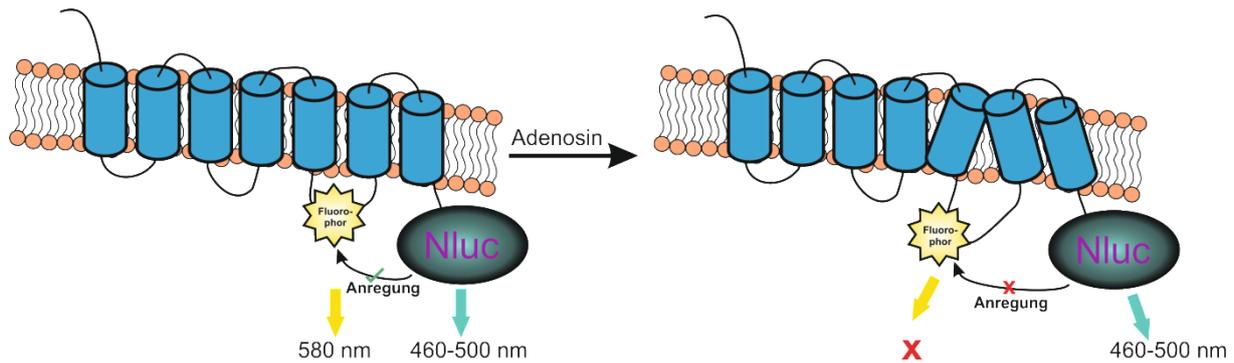


Abbildung 23. Schematische Darstellung des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers. Dargestellt ist die Interaktion der Nluc mit dem Farbstoff im inaktiven Zustand (linke Hälfte), sowie im aktiven Zustand nach Zugabe des Liganden Adenosins (rechte Hälfte). Nach Bindung des Liganden erfolgt eine strukturelle Änderung, sodass sich der Abstand zwischen Nluc und Fluorophor verändert. Diese Änderung kann im Folgenden im gemessenen BRET-Signal detektiert werden.

Die Voraussetzung für einen BRET-Assay bildet die räumliche Nähe eines Donor-Moleküls, hier der Nluc mit einem Akzeptor-Molekül, dem Farbstoff BODIPY-TMR. Durch die Aktivierung der Nluc wird Energie in Form von Licht mit einem Emissionsmaximum von 460 nm erzeugt. Durch diese Energie kann das räumlich nahe Fluorophor angeregt werden. Eine Anregung ist jedoch nur möglich bei einer Überlappung des Emissionsspektrums der Nluc mit dem Anregungsspektrum des BODIPY-TMR-Farbstoffes. Zur Bestimmung einer möglichen ligandabhängigen strukturellen Veränderung des Adora2as mit C-terminal fusionierter Nluc wurde das Fluorophor in den dritten extrazellulären Bereich inseriert und ein BRET-Assay durchgeführt. Im Ligand-ungebundenen Zustand des Adora2as liegen diese Bereiche räumlich nah beieinander, wodurch ein Energietransfer der Nluc zum Fluorophor messbar sein sollte. Dieser Effekt wurde zuerst untersucht (Abb. 24). Das Verhältnis aus dem erhaltenen Fluoreszenzwert, gemessen bei 600 nm und dem detektierten Lumineszenzwert, ist dargestellt. Aufgrund des weiten Emissionsspektrums der Nluc, welches bis in den 600 nm Bereich hineinreicht, wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt, um den Anteil des erhaltenen BRET-Verhältnisses zu ermitteln, welches durch die Nluc-Emission in der gemessenen Wellenlänge verursacht wird. Die erste Kontrolle ergab sich aus der Synthese des Vollängenkonstruktes in Gegenwart einer vorbeladenen tRNA, welche eine nicht-fluoreszierende Aminosäure trug. In diesem Ansatz resultierte die gemessene Fluoreszenz bei 600 nm aus der Emission der Nluc, wodurch das ermittelte BRET-Verhältnis aus Fluoreszenz und Lumineszenz als Hintergrund bestimmt wurde. Als zweite Kontrolle wurde das Adora2a-Nluc in Gegenwart der BP-CUA synthetisiert. Mit dieser Kontrolle wurde die unspezifische Interaktion der Nluc mit freiem BP-CUA betrachtet. Im Vergleich zur ersten Kontrolle war kein Unterschied im BRET-Verhältnis zu ermitteln, sodass keine Anregung von nicht-gekoppeltem Farbstoff durch die Nluc erfolgte. Ein gleiches BRET-Verhältnis wurde durch die Synthese des Terminationsproduktes erhalten. In diesem Ansatz war weder eine spezifische Lumineszenz noch eine spezifische Fluoreszenz zu erwarten, sodass dieses Signal ebenfalls als Hintergrund betrachtet werden konnte. Ein ähnliches Signal wurde durch die Synthese des Suppressionsproduktes in Abwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffes erhalten. Erst durch die Zugabe von BP-CUA während der zellfreien Synthese, welches in dem fluoreszenzmarkierten Vollängenkonstrukt Adora2a-Nluc resultierte, erhöhte sich das BRET-Verhältnis im Vergleich zu den Kontrollen um den Faktor 2,4-2,8. Diese Erhöhung zeigte eine Anregung des BODIPY-TMR-Farbstoffes durch die Nluc, welche auf die räumliche Nähe zwischen beiden Interaktionspartnern zurückgeführt werden konnte.

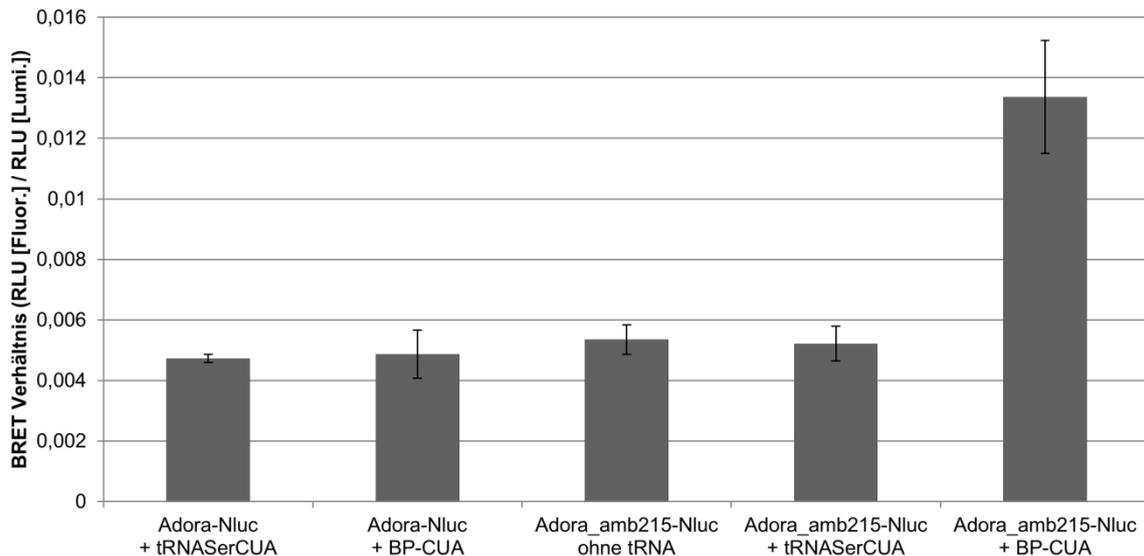


Abbildung 24. Bestimmung des BRET-Signals des Adora2a-Nluc im Ligand-ungebundenen Zustand. Die Synthese des Adora2a-Nluc- oder des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes wurde in Gegenwart von verschiedenen tRNAs durchgeführt. Im Anschluss wurde das Verhältnis des Fluoreszenzsignals resultierend durch die Anregung des BODIPY-TMRs oder durch das breite Emissionsspektrum der Nluc im Vergleich zur Lumineszenz der Nluc bestimmt.

Um einen spezifischen Einfluss des Liganden Adenosins auf die Struktur des Adora2a-Nluc zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen an Adenosin (0-5000 μM) eingesetzt und im Anschluss das BRET-Verhältnis bestimmt. Als Kontrolle wurde das Amber-Konstrukt in Gegenwart der tSerCUA translatiert und mit den gleichen Konzentrationen an Adenosin behandelt, um eine unspezifische Interaktion zwischen dem Adenosin und der Nluc ausschließen zu können. Der ermittelte BRET-Wert der Kontrolle wurde vom ermittelten BRET-Wert der Probe abgezogen. In Abb. 25 sind die erhaltenen BRET-Verhältnisse des fluoreszenzmarkierten Adora2a-Nluc in Gegenwart von verschiedenen Adenosin-Konzentrationen gezeigt. Die Zugabe von Adenosin resultierte in einer Erhöhung des BRET-Verhältnisses von 15 % im Vergleich zu der unbehandelten Probe. Das BRET-Verhältnis der unterschiedlich eingesetzten Adenosin-Konzentrationen war vergleichbar. Durch die Änderung des BRET-Signals ist der Schluss möglich, dass der Einsatz des Liganden Adenosin eine Konformationsänderung des zellfrei synthetisierten Adora2a-Nlucs hervorrief.

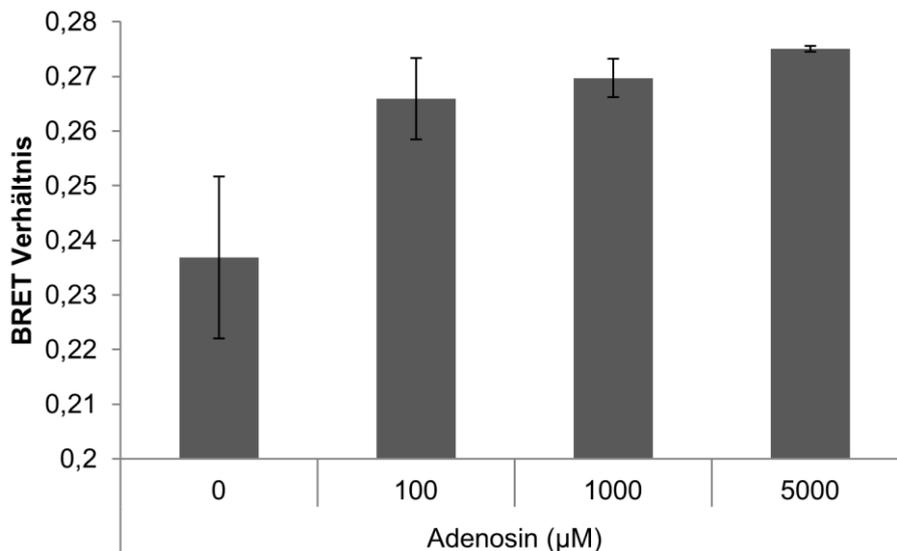


Abbildung 25. Bestimmung des BRET-Signals des Adora2a-Nluc im Ligand-gebundenen Zustand. Das fluoreszenzmarkierte Adora2a-Nluc Protein wurde nach der Synthese mit verschiedenen Adenosin-Konzentrationen inkubiert. Der Einfluss des Adenosins auf die Interaktion der Nluc mit dem gekoppelten BODIPY-TMR-Farbstoff wurde anhand des Verhältnisses des ermittelten Fluoreszenzsignals zum Lumineszenzsignal bestimmt. Modifiziert aus²⁵⁰.

Die Durchführung des BRET-Assays nach Einbau von pPa in Kombination mit der Kopplung von Sulfo-Cy5-Azid durch die CuAAC war aufgrund des toxischen Einflusses des Kupfers auf die Aktivität der Nluc nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Um das Repertoire an kupferfreien Klickreaktionen zu erweitern, befasst sich das nächste Kapitel des Ergebnisteils mit der Etablierung eines orthogonalen Systems auf Basis der Pyrrolysin-Synthetase aus *Methanosarcina mazei*.

3.4. Etablierung des PylRS-AF/tRNAPyICUA-Paares im zellfreien CHO-System

Das Pyrrolysin-basierte orthogonale Translationssystem wird sowohl für die Inkorporation von nkAs in *E. coli* als auch in Säugetierzellen verwendet. Aufgrund der großen Bindungstasche des aktiven Zentrums der *MmPylRS* wird das Pyrrolysin hauptsächlich durch unspezifische hydrophobe Interaktionen erkannt. Durch eine weitere Vergrößerung der Bindungstasche der *MmPylRS* können sogar Seitenketten bestehend aus Transcycloocten oder Cylcooctin erkannt werden. In der Summe wurden bis heute über 100 verschiedene nkAs durch das Pyrrolysin-basierte orthogonale Translationssystem in ausgewählte Proteine *in vivo* integriert, sodass sich dieses orthogonale System aufgrund der hohen Flexibilität besonders für eine Etablierung in zellfreien Systemen eignet²²⁴.

Die Herstellung der PylRS-AF erfolgte in verschiedenen zellfreien Proteinsynthesystemen auf Basis von *E. coli*-, Weizenkeim-, Insekten- und CHO-Zellen zur Identifikation des optimalen Translationssystems. Eine schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Identifikation des optimalen Translationssystems für die Herstellung der PylRS-AF ist in Abbildung 26 dargestellt.

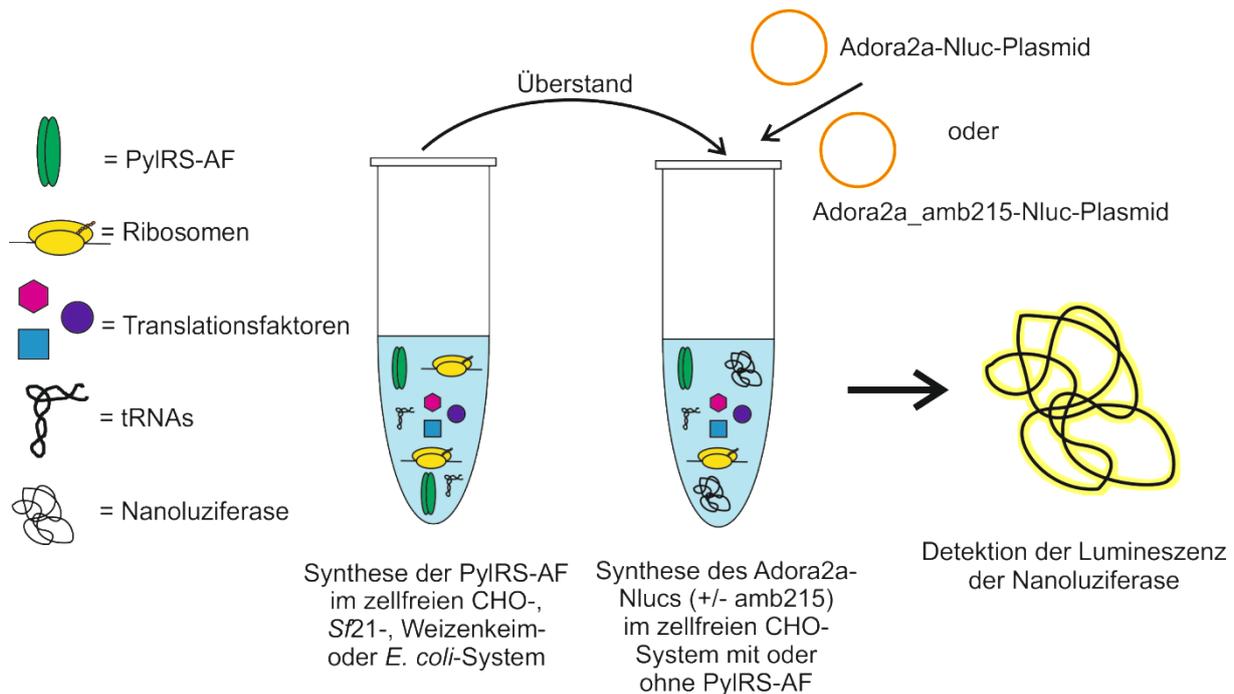


Abbildung 26. Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Identifikation des optimalen zellfreien Translationsystems für die Herstellung der PyIRS-AF. Die PyIRS-AF wurde in einem zellfreien CHO-, Sf21-, Weizenkeim- oder *E. coli*-System translatiert. Anschließend wurde der Überstand der Synthese mit einer äquimolaren oder einer maximalen Konzentration an PyIRS in eine zweite Reaktion in einem zellfreien CHO-System überführt. Die Aktivität der PyIRS-AF wurde anhand der Lumineszenz der Nanoluziferase bestimmt, welche nur bei einer erfolgreichen Adressierung des Amber-Stopcodons translatiert wird. Als Kontrolle diente die Synthese des Volllängenprotein Adora2a-Nluc.

Die PyIRS-AF konnte prinzipiell in jedem der gelisteten Systeme im Dialyse-Modus synthetisiert werden (Abb. 27A und B). Es wurden Ausbeuten im Translationsmix von 36,5 µg/ml (Sf21), 175 µg/ml (Weizenkeim), 221 µg/ml (CHO) und 2,3 mg/ml (*E. coli*) erzielt. Die höchsten Ausbeuten wurden im *E. coli*-System erreicht, während die Ausbeuten im CHO-System um den Faktor 10 bzw. im Weizenkeimsystem um den Faktor 13,4 und im Insektenystem um den Faktor 63 geringer waren (Abb. 27A). Abhängig von dem gewählten zellfreien System zeigte sich eine unterschiedliche Löslichkeit der Synthetase zwischen 25 % (CHO), 44 % (*E. coli*), 66 % (Insekt) und 80 % (Weizenkeim). Zu beachten ist hierbei, dass im zellfreien *E. coli*-System die anhand der TCA-Werte berechnete Löslichkeit durch die auftretende Nebenbande beeinflusst wurde. Die Kontrollen ohne eingesetztes DNA-Templat zeigten deutlich geringere Proteinausbeuten. In den Autoradiogrammen zeigte sich bei einer Synthese im CHO- und Sf21-System eine intensive Bande unterhalb von 62 kDa, welche ebenfalls im Autoradiogramm nach Synthese im *E. coli*-System und in schwächerer Form im Weizenkeimsystem detektierbar war. Während im Autoradiogramm der Synthese im CHO- und Insektenystem schwache Nebenbanden erkennbar waren, ist bei einer Synthese der PyIRS-AF im zellfreien *E. coli*-System eine sehr intensive Nebenbande auf einer Höhe von 49 kDa detektierbar. In den Negativkontrollen ohne DNA-Templat ist keine Proteinbande detektierbar. Betrachtet man den löslichen Anteil der Synthetase zeigt sich in der Autoradiographie ein vergleichbares Ergebnis zu den bestimmten Proteinmengen. Während eine intensive Bande der PyIRS-AF im Überstand bei einer Synthese im zellfreien Weizenkeim- und Insekten-System zu erkennen ist, ist diese Bande im CHO- und *E. coli*-System weniger intensiv. In diesen beiden Systemen befindet sich ein Großteil des Proteins in der pelletierten Fraktion (Abb. 27B).

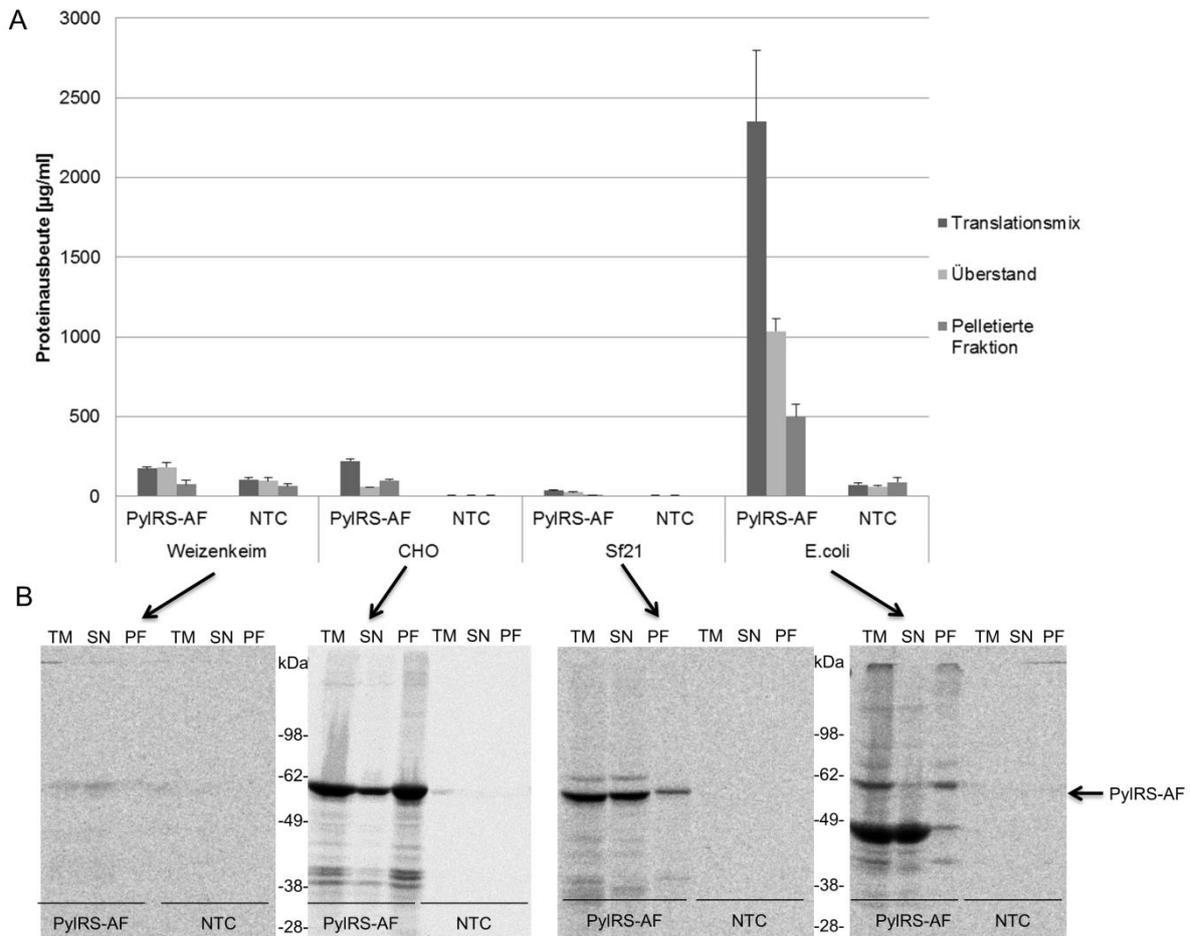


Abbildung 27. Synthese der PyIRS-AF im zellfreien Weizenkeim-, CHO-, Insekt- und *E. coli*-Translationssystem. A) Analyse der synthetisierten Proteinmenge der PyIRS-AF im jeweiligen System und in den Fraktionen Translationsmix, Überstand und pelletierte Fraktion. B) Zugehöriges Autoradiogramm der mit Aceton gefällten Proben. Es wurden jeweils 5 µl der Fraktionen gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die *de novo* synthetisierten Proteine wurden über den Einbau von ^{14}C -Leucin im Autoradiogramm detektiert.

Für die anschließende Funktionsanalyse wurden 0,08 µM der PyIRS-AF aus dem Überstand jedes Systems für eine Synthese vom Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes in CHO verwendet. Zusätzlich wurde eine, durch das Reaktionsvolumen limitierte, maximal mögliche Konzentration eingesetzt. (Abb. 28).

Die Analyse des Volllängenkonstruktes erfolgte über einen Lumineszenzassay (Abb. 28A) und über Autoradiographie (Abb. 28B). Im Lumineszenzassay konnte aktive Nluc in den Ansätzen mit verwendeter PyIRS-AF, synthetisiert im zellfreien Weizenkeim- (PyIRS_{WG}), CHO- (PyIRS_{CHO}) oder Sf21-System (PyIRS_{Sf21}) detektiert werden. Im Vergleich zum Volllängenkonstrukt Adora2a-Nluc wurden Lumineszenzwerte von 0,5 % (*E. coli*), 1,9 % (Weizenkeim), 10 % (Sf21) und 15,4 % (CHO) erreicht. Als Kontrolle wurde ein gleiches Volumen des Überstandes der NTC des jeweiligen Systems eingesetzt. In diesen Ansätzen wurde keine bzw. eine deutlich geringere Nluc-Aktivität gemessen. Im Autoradiogramm kann auf der Höhe des Volllängenproteins Adora2a-Nluc eine Bande detektiert werden, wenn die PyIRS-AF translatiert im Weizenkeim-, Sf21- oder CHO-zellfreien System zugegeben wurde. Bei einer Synthese der PyIRS-AF im *E. coli* zellfreien System (PyIRS_{*E. coli*}) konnte keine Volllängenbande detektiert werden. In allen Ansätzen wurde eine intensive Bande auf Höhe des Terminationsproduktes detektiert. Weiterhin resultierte die Zugabe der PyIRS_{CHO} und der PyIRS_{Sf21} aufgrund der höheren eingesetzten spezifischen Radioaktivität im Vergleich zu der

PyIRS_{E. coli}⁻ und der PyIRS_{WG}-Synthetase in einer zusätzlichen Bande unterhalb der 62 kDa Markierung. Die Kontrollen ohne PyIRS-AF zeigten keine Bande auf der Höhe des Adora2a-Nluc-Proteins. In diesen Ansätzen war ebenfalls das Terminationsprodukt zu erkennen.

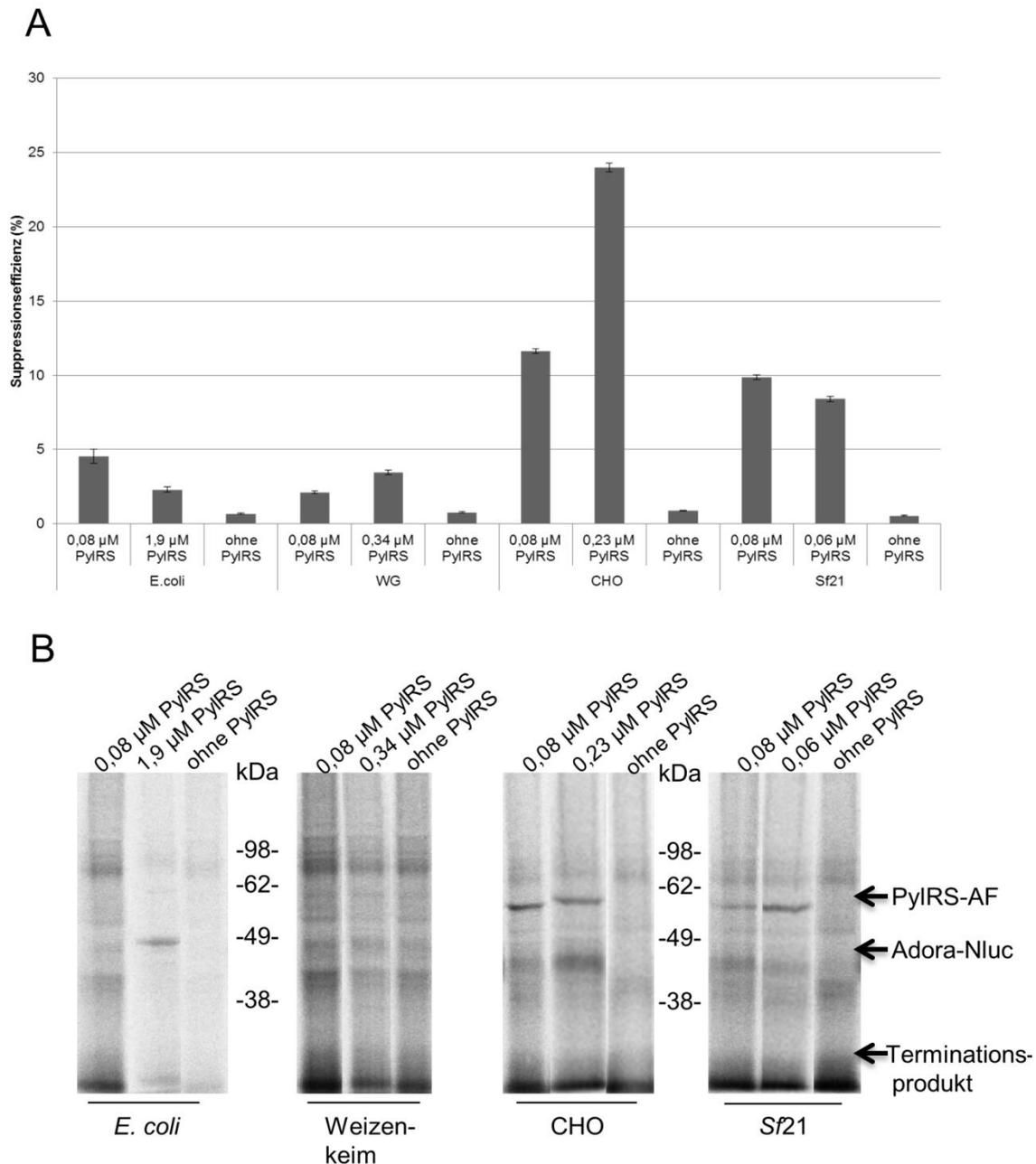


Abbildung 28. Analyse der Funktion der PyIRS-AF, translatiert in verschiedenen zellfreien Systemen. A) Bestimmung der Nluc-Aktivität des synthetisierten Vollängenkonstruktes auf Basis des Adora2a_amb215-Nluc-Plasmides durch einen Lumineszenzassay. Es wurden 5 µl des Translationsmixes eingesetzt. B) Zugehöriges Autoradiogramm der mit Aceton gefällten Proben. Es wurden jeweils 5 µl der Fraktionen gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die *de novo* synthetisierten Proteine wurden über den Einbau von ¹⁴C-Leucin im Autoradiogramm detektiert.

Um den negativen Effekt des *E. coli*-Überstandes auf die Synthese des Adora2a-Nluc-Konstruktes zu umgehen (Abb. S3, Anhang) sowie die sichtbaren Nebenbanden (Abb. 27B) zu entfernen, wurde die Synthetase analog zur eAzFRS isoliert (s. 2.2.11) und in einer optimierten Endkonzentration von 5 µM eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde ein Vergleich zur PyIRS_{CHO} gezogen. Die PyIRS_{CHO} wurde weiterhin unaufgereinigt in einer finalen

Konzentration von 0,3 μM eingesetzt, da die Aufreinigung zum Verlust von 80 % der Proteinmenge sowie zu einem inaktiven Enzym führte (Daten nicht gezeigt). Mit 0,3 μM wurde eine maximale Konzentration an $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ eingesetzt, die aufgrund der Volumenbeschränkung einer Reaktion möglich war. Der Einbau der nkAs SCO wurde mittels Autoradiographie (Abb. 29, linke Seite) nachgewiesen, sowie die Adressierung des Cyclooctins des SCOs mit einem Tetrazin-gekoppelten Cy5-Farbstoff (Abb. 29, rechte Seite).

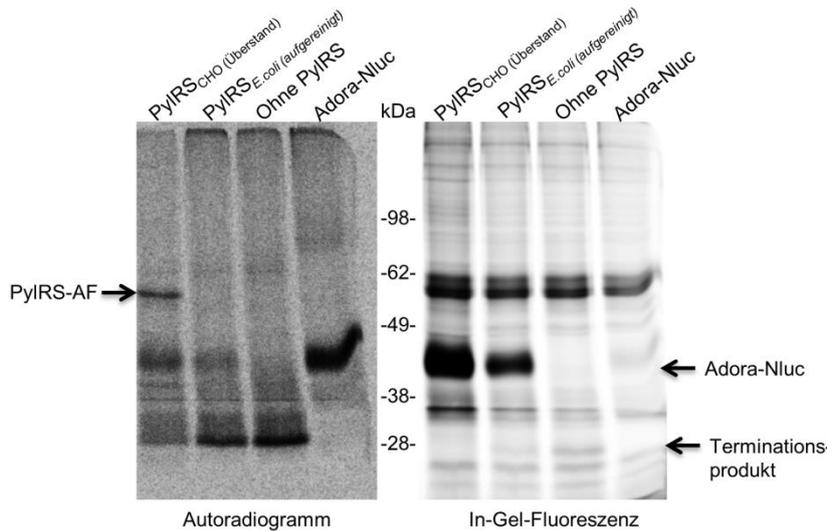


Abbildung 29. Vergleich von isolierter $\text{PyIRS}_{E. coli}$ mit $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ aus dem Überstand einer zellfreien Synthese. Die PyIRS-AF wurde in einer Konzentration von 5 μM ($\text{PyIRS}_{E. coli}$) bzw. 0,3 μM ($\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$) in der zellfreien Synthese des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes mit SCO eingesetzt. 5 μl des Translationsmixes wurden mit 5 μM Tetrazin-Cy5 inkubiert und nach einer Aceton-Fällung elektrophoretisch aufgetrennt. Die *de novo* synthetisierten Proteine wurden über den Einbau von ^{14}C -Leucin im Autoradiogramm detektiert. Zusätzlich wurde der gekoppelte Farbstoff bei 633 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei einer Emission von 670 nm aufgenommen.

Im Gegensatz zum Ergebnis aus Abbildung 28, wo die $\text{PyIRS}_{E. coli}$ unaufgereinigt eingesetzt wurde, konnte eine deutliche Vollängenbande des Adora2a-Nluc beim Einsatz der isolierten $\text{PyIRS}_{E. coli}$ detektiert werden. Diese Bande ist trotz der 17-fach eingesetzten Konzentration an $\text{PyIRS}_{E. coli}$ weniger intensiv als beim Einsatz der $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$. Die Intensität des Terminationsproduktes nimmt mit steigender Bildung des Vollängenproteins ab und ist dementsprechend am schwächsten ausgeprägt bei Zugabe der $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ und am stärksten ohne zusätzliche PyIRS -Zugabe. Die Synthese des Vollängenproteins Adora2a-Nluc resultierte in einer starken Bande unterhalb des 49 kDa Markers. Die In-Gel-Fluoreszenz zeigt ein vergleichbares Ergebnis. Die Bande des fluoreszenzmarkierten Adora2a-Nluc bei der Synthese in Gegenwart von $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ war wesentlich intensiver im Vergleich zum Einsatz der $\text{PyIRS}_{E. coli}$. Bei der Synthese ohne PyIRS-AF bzw. des Vollängenproteins Adora2a-Nluc konnte keine Bande in der In-Gel-Fluoreszenz detektiert werden. Neben SCO konnte ebenfalls die nkAs TCO erfolgreich in das Modellprotein integriert werden. Es wurden jedoch geringere Einbaueffizienzen erreicht. Die nkAs AzL zeigte darüber hinaus die geringste Einbaueffizienz, die sich nicht von den Negativkontrollen unterschied (Daten nicht gezeigt).

Als Alternative zur exogenen Supplementierung der $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ kann die Synthese der Synthetase parallel zur Synthese des Zielproteins stattfinden. Im Folgenden wird die Effektivität einer Co-Expression von $\text{PyIRS}_{\text{CHO}}$ und Adora2a_amb215-Nluc analysiert (Abb. 30). Die Co-Expression wurde zuerst im Batch-basierten zellfreien CHO-System durchgeführt. Die Bestimmung des Vollängenkonstruktes erfolgte über die Messung der Lumineszenz der Nluc (Abb. 30A). Die zeitgleiche Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes und der PyIRS-AF-DNA resultierte in einem 12,1%igen Lumineszenzwert im

Vergleich zum Vollängenkonstrukt, welches sich aus der Synthese des Adora2a-Nluc-Konstruktes in Abwesenheit der PyIRS-AF zusammensetzte. Durch eine zeitversetzte Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes zur PyIRS-AF-DNA konnte eine Erhöhung der gemessenen Lumineszenz im Vergleich zur zeitgleichen Zugabe um den Faktor 1,6 nach 10 min bzw. um den Faktor 2,1 nach 20 min erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der zeitversetzten Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes resultierte nach 30 bzw. 40 min in einer vergleichbaren Nluc-Aktivität, wie sie bereits nach 20 min detektiert wurde. Im Vergleich zu der Synthese des Vollängenkonstruktes Adora2a-Nluc wurde ein maximales Lumineszenzsignal von 26,5 % nach 30 min erreicht. Bei den Ansätzen mit hinzugefügter Synthetase war im Autoradiogramm eine intensive Bande unterhalb der 62 kDa Markerbande zu erkennen (Abb. 30B). Die Intensität der Bande stieg, je später das Adora2a_amb215-Nluc-Plasmid zur zellfreien Synthese hinzugegeben wurde. Zusätzlich zeigte sich eine intensive Bande auf der Höhe der 49 kDa Bande. Die Intensität der Bande stieg bei einer späteren Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Templates und erreichte bei 20-30 min ihre maximale Intensität. Diese Bande zeigte sich ebenfalls bei der Synthese des Vollängenkonstruktes auf Basis des Adora2a-Nluc-Plasmides. Die Co-Expression des Adora2a_amb215-Nluc und PyIRS-AF-Konstruktes in der Dialyse führte ebenfalls zu einem detektierbaren Lumineszenzsignal (Abb. 30C). Im Vergleich zur zeitgleichen Zugabe der DNA-Template konnte eine um den Faktor 2,2 erhöhte Nluc-Aktivität ermittelt werden, wenn das Adora2a_amb215-Nluc-Plasmid 120 min später als das PyIRS-AF-Plasmid zur zellfreien Synthese supplementiert wurde. Im Vergleich zum Vollängenkonstrukt wurde ein maximales Lumineszenzsignal von 28,8 % erreicht, welches damit vergleichbar zur Co-Expression im Batch-System war. Im Autoradiogramm war zwischen der 49 und 62 kDa Markerbande eine intensive Produktbande zu erkennen (Abb. 30D). Diese Bande korrelierte mit dem erwarteten Molekulargewicht der PyIRS-AF von 53,6 kDa. Die Intensität der PyIRS-AF-Bande im Autoradiogramm erschien nach einer zeitversetzten Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Plasmides nach 120 min intensiver im Vergleich zu den anderen zeitversetzten Zugaben. Zusätzlich war unter der 49 kDa Markerbande eine zweite Bande zu erkennen, deren Intensität zwischen den verschiedenen zeitversetzten Zugaben der DNA-Template variierte. Während bei einer zeitgleichen DNA-Zugabe und einer zeitversetzten Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Plasmides von 30 min eine schwach intensive Bande zu erkennen war, erreichte diese Bande bei einer zeitversetzten Zugabe des Adora2a_amb215-Nluc-Plasmides von 120 min ihre maximale Intensität. Eine weitere Verzögerung der Zugabe des Amber-Plasmides resultierte ebenfalls in einer detektierbaren Bande, die eine schwächere Intensität als bei einer Zugabe des Amber-Konstruktes nach 120 min aufwies. Die detektierte Bande zeigte das gleiche Laufverhalten wie das Vollängenkonstrukt Adora2a-Nluc, sodass die Co-Expression sowohl im Batch- als auch Dialyseverfahren erfolgreich war.

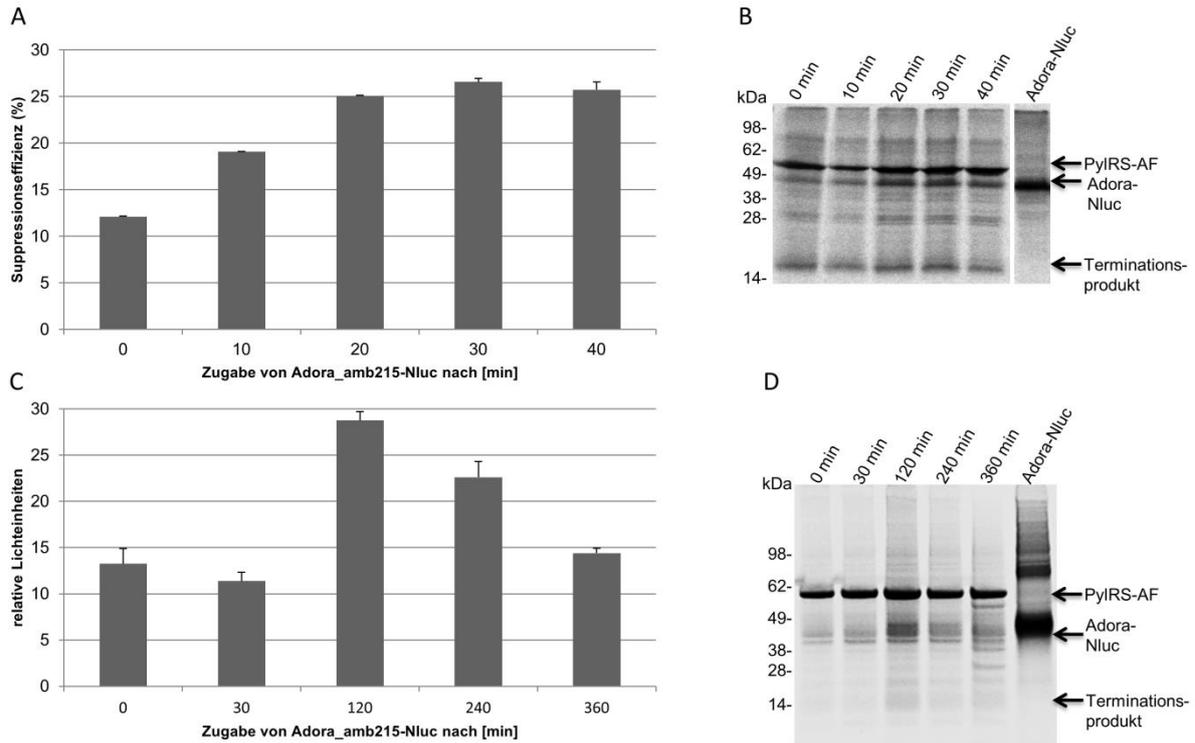


Abbildung 30. Co-Expression des Adora2a_amb215-Nluc-Konstruktes und des PyIRS-AF-Konstruktes im zellfreien CHO-System. A) Co-Expression im Batch System mit einer zeitversetzten Zugabe der DNA-Template. Das Adora2a_amb215-Nluc-Konstrukt wurde zeitgleich oder nach 10-40 min zu dem vorgelegten PyIRS-AF-Template supplementiert. Die Synthese des Vollständigensproteins Adora2a-Nluc wurde mittels Lumineszenzassay analysiert. B) Zugehöriges Autoradiogramm der Batch-basierten Co-Expression. 5 μ l des TMs wurden mit Aceton gefällt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die *de novo* synthetisierten Proteine wurden über den Einbau von 14 C-Leucin in einem Autoradiogramm detektiert. C) Co-Expression im Dialyse System mit einer zeitversetzten Zugabe der DNA-Template. Das Adora2a_amb215-Nluc-Konstrukt wurde zeitgleich oder nach 30-360 min zu dem vorgelegten PyIRS-AF-Template supplementiert. Die Synthese des Vollständigensproteins Adora2a-Nluc wurde mittels Lumineszenzassay analysiert. D) Zugehöriges Autoradiogramm der Dialyse-basierten Co-Expression. 5 μ l des TMs wurden mit Aceton gefällt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die *de novo* synthetisierten Proteine wurden über den Einbau von 14 C-Leucin in einem Autoradiogramm detektiert.

4. Diskussion

Seit den 1960ern werden zellfreie Proteinsynthesysteme auf der Basis von verschiedensten kultivierten Zelllinien etabliert. Diese beinhalten sowohl prokaryotische (*E. coli*) als auch eukaryotische (Pilz-, Pflanze-, Insekten- und Säugetier) zellfreie Translationssysteme¹¹². Abhängig vom Ursprung und den Eigenschaften des Zielproteins wie z. B. posttranslationale Modifikationen, Translokation oder Einbettung in eine Membran und den geplanten Anwendungen wird individuell evaluiert, welches der genannten Translationssysteme den Anforderungen des Zielproteins am ehesten entspricht. Aufgrund der Komplexität der Modellproteine in dieser Arbeit, welche sich durch mehrere Transmembrandomänen und/oder Glykosylierungen auszeichnen, wurden eukaryotische zellfreie Systeme auf der Basis von kultivierten Insekten- (*Sf21*) und Säugetier- (CHO) Zellen ausgewählt. Durch die endogen erhaltenen Membranstrukturen, gewonnen aus dem Endoplasmatischen Retikulum, ermöglichen diese Lysate eine Translokation der Modellproteine in das Lumen sogenannter Mikrosomen und somit Glykosylierungen sowie die Integration der ausgewählten Membranproteine in eine natürliche Membran. Zusätzlich konnte bereits für beide Systeme die erfolgreiche Synthese des Glykoproteins Erythropoetin und verschiedener G-Proteingekoppelter-Rezeptoren gezeigt werden^{10,16}. Während das ursprünglich entwickelte zellfreie *E. coli*-System zur Identifikation des ersten genetischen Codons (UUU für Phenylalanin) genutzt wurde¹¹¹, sind heutzutage durch die Sequenzierung der Genome von verschiedensten Spezies und der damit verbundenen Identifikation einer Vielzahl an Protein-kodierenden Genen, Hochdurchsatzverfahren (HTS) für Synthesen und Analysen von Proteinen gefragt²⁵³. Eine Voraussetzung für die Durchführung von HTS-Verfahren sind die Möglichkeit der Prozessvalidierung und eine hohe Reproduzierbarkeit^{254,255}. Besonders in Kombination mit komplexen Prozessen wie Transkriptions- und Translationsreaktionen ist ein Monitoring der einzelnen Abläufe essentiell, um mögliche unspezifische inhibitorische Effekte, die in einer falsch-negativen Aussage resultieren können, auszuschließen. Erste Ansätze zur Analyse der mRNA-Produktion während der Transkription in Echtzeit in zellfreien Systemen wurden mit Hilfe von Aptameren durchgeführt^{256–258}. Diese einzelsträngigen Nukleinsäuren zeichnen sich durch eine hochspezifische dreidimensionale Konformation aus, wodurch eine hochaffine Bindung an das Zielmolekül erreicht wird. Zusätzlich zu einer Funktion als Indikator könnten Aptamere als Inhibitoren z. B. für spezifische Kinasen oder Caspasen, die an einer Inhibierung der Translation involviert sind, eingesetzt werden, um die Proteinausbeute weiterhin zu steigern^{259,260}. Besonders für strukturelle Analysen von Proteinen durch z. B. Kristallographie oder Kernspinresonanz (NMR) werden Proteinmengen im mg-Bereich benötigt. Aufgrund des besseren Verständnisses von limitierenden Faktoren während der zellfreien Proteinsynthese wie z. B. phosphorylierte Translationsfaktoren oder inhibitorische Phosphate konnte die Proteinausbeute von anfänglichen Mikrogramm je Milliliter zu den heutigen Milligramm je Milliliter gesteigert werden¹⁵. Diese Proteinmengen werden derzeit vor allem im zellfreien *E. coli*- und Weizenkeim-, aber auch im zellfreien CHO-System erreicht, sodass sich diese Systeme besonders für strukturelle Analysen eignen²⁶¹. Eine weitere Anwendung von HTS besteht in der Identifizierung von Liganden und Inhibitoren von pharmazeutisch relevanten Proteinen. Besonders in Kombination mit GPCRs werden fluoreszenzbasierte Interaktionsstudien verwendet, die eine Fluoreszenzmarkierung des GPCRs an einer spezifischen Position voraussetzen²⁶². Eine spezifische Fluoreszenzmarkierung kann durch den Einsatz von modifizierten tRNA/tRNA-Aminoacyl-Synthetase-Paaren erfolgen, die durch Amber-Suppression den Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure ermöglichen, deren reaktive Gruppe an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden kann.

Die vorliegende Arbeit adressiert die vorher beschriebenen Thematiken im ersten Abschnitt mit der Analyse eines Aptamers, welches die Translation der Nanoluziferase inhibiert. Die Limitierungen und Anwendungen eines Aptamers in zellfreien Reaktionen zur Regulation und zum Monitoring des Translationsprozesses werden im Detail betrachtet. Nach der Analyse und Optimierung der Synthese von komplexen Membranproteinen (ET-B-Rezeptor und Adenosinrezeptor) im Sf21- und CHO-System werden im zweiten Abschnitt der Arbeit pharmazeutisch relevante Proteine modifiziert durch die Kopplung einer PEG-Gruppe (EPO) und fluoreszenzmarkiert für Interaktionsstudien (Adenosinrezeptor). Im letzten Abschnitt wird ein neues orthogonales System auf Basis der Pyrrolysin-Synthetase entwickelt, welches das Repertoire an konjugierbaren Farbstoffen erweitert.

4.1. Limitierungen und Anwendungen von Aptameren in zellfreien Systemen

Das in dieser Arbeit verwendete Aptamer bindet hochspezifisch an ATP²⁴². ATP kommt als universelle Energiequelle in lebenden Zellen vor und fungiert zusätzlich als Cofaktor u. a. für Kinasen und Ionen-Transporter. ATP ist sowohl in der DNA Replikation involviert, als auch für die Proteintranslation essentiell. Während der Proteinsynthese wird ATP für die Translationsinitiation, die Aminoacylierung und den korrekten Faltungsprozessen von Proteinen benötigt⁵⁴. Aufgrund der Entkopplung von Transkription und Translation sowie des offenen Charakters von zellfreien Systemen können definierte ATP-Konzentrationen der Translationsreaktion zugeführt werden, sodass das verwendete Aptamer genutzt werden kann, um eine Aussage über den ATP-Verbrauch während der Proteinsynthese zu treffen. Aktuell gibt es nur wenige Studien, in denen Aptamere mit zellfreien Proteinsynthesystemen kombiniert wurden. Die bekannteste Publikation beschreibt die Regulation der Transkription durch den Einsatz eines Thrombin-bindenden DNA-Aptamers, der *upstream* vom T7 Promoter in die DNA-Sequenz eingefügt wurde. Durch die Thrombin-Bindung verändert sich die Aptamerstruktur und die Transkription wird in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration inhibiert²⁶³. Um detaillierte Einblicke in den Transkriptions- und Translationsablauf zu erlangen, wurde 2015 von Nies und Mitarbeitern eine Studie mit einer Spinach-markierten mRNA, die in das Fluoreszenzprotein YFP translatiert wird, durchgeführt²⁶⁴. In Gegenwart von 3,5-Difluoro-4-hydroxybenzylidene-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI) formt das RNA-Aptamer einen fluoreszierenden Komplex (*Spinach*), dessen Intensität proportional zur Menge an synthetisierter mRNA ist. Anhand der Detektion des *Spinach*- und der Fluoreszenz des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) wurde eine theoretische mRNA Konzentration von 3,3 µM und eine YFP-Konzentration von 0,5 µM berechnet. Diese Ergebnisse indizieren, dass nur ein geringer Teil der produzierten mRNA in das Zielprotein translatiert wurde. Während die beschriebenen Versuche in prokaryotischen zellfreien Systemen durchgeführt wurden, ist 2018 eine Publikation erschienen, die ebenfalls die parallele Detektion der Transkription und Translation beschreibt, jedoch ein eukaryotisches zellfreies System verwendet²⁶⁵. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im zellfreien *E. coli*-System, die sich durch eine maximale mRNA-Konzentration nach 100 min, gefolgt von einer Abnahme der mRNA-Konzentration bis 500 min auszeichnet²⁶⁶, wurde für das auf HeLa-Zellen basierende zellfreie System eine hohe mRNA-Syntheserate in den ersten 10-15 min gezeigt, die bereits nach weiteren 15 min deutlich niedriger wurde²⁶⁵. Diese Ergebnisse scheinen auf einen zeitversetzten Ablauf der Transkription und Translation in dem gewählten eukaryotischen zellfreien System hinzudeuten. Anhand der beschriebenen Ergebnisse wird die Bedeutung eines besseren Verständnisses der Abläufe von Transkription und Translation in zellfreien Systemen deutlich, um die Synthese des Zielproteins gezielt an die gewünschte Applikation anpassen zu können. Aus diesem Grund wurde der Einsatz eines strukturverändernden Aptamers im zellfreien Sf21-

System etabliert. Zu Beginn wurde die Funktionalität des Aptamers überprüft, in dem die komplementäre Quencher-Sequenz nach Bindung des Aptamers an ATP freigesetzt wird, wodurch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Abb. 5). Nach Bindung der Quenchersequenz konnte in Gegenwart von 3 mM ATP eine Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals von 20 % erreicht werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer Studie aus dem Jahr 2005²⁶⁷. In dieser wurde gezeigt, dass das Lösen der komplementären Sequenz stark von der Konzentration des Targetmoleküls abhängig ist²⁶⁷. Bei unterschiedlichen Targetmolekülkonzentrationen (20-100 nM) wurden Dissoziationseffizienzen der Quenchersequenz zwischen 16 % und 52 % festgestellt. Zusätzlich ist das Lösen der komplementären Sequenz stark von der Länge des DNA-Stranges abhängig. Durch die Reduktion eines Nukleotides in der Aptamer-Sequenz wurde bei gleicher Targetmolekülkonzentration die Fluoreszenzwiederherstellung von 16 % auf 50 % erhöht²⁶⁷. Interessanterweise nimmt die Fluoreszenzwiederherstellung mit längeren Inkubationszeiten ab. Dies könnte auf einen Bleaching-Effekt des FAMs, eine Dissoziation oder einen Abbau des Aptamers zurückzuführen zu sein. Besonders die Anfälligkeit von Aptamern gegenüber Nukleasen, welche im Lysat einer ZFPS vorkommen können, könnte den Einsatz von Aptamern erschweren. Allgemeine Strategien zur Stabilisierung von Aptamern gegen Nukleasen finden sich in der Modifizierung der Ribose, der Base, sowie dem 3'-Ende-Capping mit einem invertierten Thymin²⁶⁸. Im Gegensatz zu der Supplementierung von ATP wurde keine Fluoreszenzwiederherstellung in Gegenwart von GTP detektiert (Abb. 5C). Die Spezifität von Anti-ATP-Aptamern zu artverwandten Analogons wie z. B. CTP, GTP oder UTP wurde bereits im Vorfeld gezeigt²⁶⁹. Im nächsten Schritt wurde eine optimale Konzentration des Anti-ATP-Aptamers (aAPT) von 20 µM bestimmt. Bei dieser Konzentration zeigt das Kontroll-Aptamer (cAPT) keine Reduzierung der Nluc-Synthese, während in Gegenwart von 20 µM aAPT die Synthese beinahe vollständig inhibiert wird (Abb. 6). Interessanterweise ist ebenfalls eine Inhibierung der Nluc-Synthese bei einer Erhöhung des cAPT ab einer Konzentration von 50 µM zu erkennen. Dieser Effekt kann auf die Interaktion des DNA-Aptamers mit freien Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) zurückzuführen sein. Mg^{2+} -Ionen sind im Aufbau und der Stabilisierung der Tertiärstruktur von Aptamern und Nukleinsäuren im Allgemeinen involviert^{270,271}. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Mg^{2+} den Ligand-freien Status sowie die Ligandbindung eines Aptamers beeinflussen kann^{272,273}. Für ein Tetracyclin-Aptamer wurde z. B. eine affine Bindung an seinen Liganden nur in Gegenwart von einer Magnesiumkonzentration von über 3 mM ermittelt²⁷⁴. Durch den Einsatz des jeweiligen Aptamers in einer Konzentration von 50 µM bzw. 100 µM aAPT oder cAPT könnte ebenfalls eine größere Menge an Mg^{2+} komplexiert werden, wodurch die Syntheserate im Allgemeinen sinken könnte. Die Interaktion zwischen Magnesiumionen und der ATP-abhängigen Proteinsynthese ist detailliert im nächsten Abschnitt beschrieben.

Während die meisten anti-ATP-Aptamere eine hohe Affinität zum Adenin aufweisen, liegt eine geringe Affinität zur Ribose oder zum Triphosphat vor. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen ATP, ADP und AMP erschwert²⁴². Aus diesem Grund wurden Aptamere selektiert, die eine Interaktion mit dem Triphosphat zeigen^{275,276}. Nichtsdestotrotz zeigen diese Aptamere wiederum eine reduzierte Affinität zu der jeweiligen Nukleinbase²⁷⁵. Die Interaktion des anti-ATP-Aptamers mit ADP ist möglicherweise ein kritischer Punkt in dem hier verwendeten zellfreien System, da die Energieregenerierung auf der Übertragung der Phosphat-Gruppe von Phospho-Kreatin auf ADP basiert. Durch eine mögliche Komplexierung des ADPs könnte die ATP-Regeneration reduziert sein, wodurch die Proteinsynthese in Gegenwart von höheren aAPT-Konzentrationen beeinträchtigt sein könnte. Die eingeschränkte ATP-Regeneration könnte ein Grund für die niedrige Wiederherstellung der Syntheserate von 17 % bei höheren

ATP-Konzentrationen in Gegenwart des aAPT sein (Abb. 7). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls gezeigt, dass trotz des hohen ATP-Verbrauchs für die Proteinsynthese von ca. 70 % des totalen ATPs in einer lebenden Zelle²⁷⁷, eine zu hohe ATP-Konzentration einen inhibitorischen Effekt auf essentielle zelluläre Prozesse wie der Proteintranslation hat²⁷⁸. Eine mögliche Begründung für diesen Effekt wurde in der Interaktion von ATP mit Magnesiumionen gefunden. Insbesondere Ribosomen und die gebundene negativ geladene ribosomale RNA werden durch die positiv geladenen Mg^{2+} stabilisiert^{279,280}. Für bakterielle Ribosomen wird angenommen, dass ein einzelnes Ribosom über 170 Mg^{2+} -Ionen binden kann, wodurch ca. 25 % des totalen Mg^{2+} einer Zelle allein an den Ribosomen gebunden vorliegt²⁸¹. Schätzungsweise liegen nur 5 % als freie Magnesiumionen vor. Gerade für Enzyme, die Magnesium mit einer geringen Affinität binden, aber dennoch als Cofaktor benötigen, wird eine zytoplasmatische Mg^{2+} -Konzentration von 1-5 mM benötigt^{278,282}. In dem hier verwendeten zellfreien System wird standardmäßig eine Mg^{2+} -Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Durch die Erhöhung der ATP-Konzentration auf über 2 mM könnte eine kritische Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen unterschritten worden sein, wodurch die beschriebenen Effekte wie die Destabilisierung der Ribosomen ausgelöst werden könnten und die Synthese im zellfreien System reduziert wird (Abb. 7). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, könnte die Synthese der Nluc in Gegenwart von höheren ATP-Konzentrationen durch eine höhere Magnesiumkonzentration ausgeglichen werden. Nichtsdestotrotz ist bei einer höheren ATP-Konzentration von 2-3 mM eine effizientere Synthese der Nluc in Gegenwart des aAPT zu erkennen, wodurch der Schluss gezogen werden kann, dass das aAPT funktionsfähig im zellfreien Sf21-System vorliegt. Durch dieses Ergebnis können Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren in Kombination mit der ZFPS betrachtet werden.

Eine naheliegende Anwendung wäre die Bestimmung von optimalen Ionen-Konzentrationen wie z. B. der von Mg^{2+} während der zellfreien Proteinsynthese, um optimale Bedingungen für Transkription und Translation visualisieren zu können, die sich zum Teil erheblich unterscheiden (Transkription: 10 mM $Mg(OAc)_2$, Translation: 2- 2,5 mM $Mg(OAc)_2$)¹⁴. Die Bindung von Aptameren an Ionen wurde anhand eines Chlorid (Cl^-)-bindenden Aptamers *in vivo* gezeigt. Mit Hilfe des so genannten Clensors konnte die Cl^- -Konzentrationen in Lysosomen aus *Caenorhabditis elegans* bestimmt werden²⁸³. Die Bindung eines Aptamers an Magnesium wird im Vergleich zur Bindung an Cl^- durch die Einflüsse des Mg^{2+} auf das Aptamer selbst erschwert. Eine weitere Möglichkeit, welche sich mit einem anwendungsorientierten Ansatz beschäftigt, besteht im Monitoring von Stressantworten im Lysat während der ZFPS. Ein prominentes Beispiel für die Reduzierung der Proteintranslation findet sich in der stressabhängigen Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 an Serin 51 (eIF2)²⁸⁴. Die Phosphorylierung des eIF2 kann unter anderem durch die ER-lokalisierte Protein-Kinase „RNA-ähnliche Endoplasmatische Reticulum Kinase“ (PERK) geschehen, welche durch ungefaltete Proteine im Lumen des ERs aktiviert wird²⁸⁵. Durch die Selektion eines Aptamers gegen das phosphorylierte Serin könnte in Echtzeit die Stressantwort im Lysat während einer Synthese visualisiert werden. Im Folgenden könnte durch einen gezielten Eingriff in den Translationsprozess z. B. durch die Inhibition der PERK der genannten Stressantwort entgegengewirkt werden. Für diesen Zweck könnte ein Aptamer generiert werden, welches ähnlich zum GSK2606414 (C38) direkt die ATP-Bindungsstelle der PERK blockiert und die Kinase somit inhibiert²⁸⁶. Ähnlich zur Inhibition von spezifischen Kinasen könnten Caspasen oder Proteasen blockiert werden. Caspasen können durch oxidativen Stress, eine hohe zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration oder durch Effekte von toxischen Proteinen während der Zellkultivierung aktiviert werden. Zusätzlich kann die Bindung von Fas oder $TNF\alpha$ an Apoptose-auslösende Rezeptoren Caspasen aktivieren²⁸⁷. Durch aktive

Caspasen können Translationsinitiationsfaktoren proteolytisch degradiert werden, wodurch die Proteinsynthese inhibiert wird^{288,289}. Ein positiver Einfluss des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK auf die Sf21-²⁹⁰ und Ac-DEVD-CMK auf die zellfreie CHO-Proteinsynthese¹⁶³ wurde bereits gezeigt. Im Vergleich zu den erwähnten Inhibitoren würde sich ein Aptamer durch eine geringere Toxizität auszeichnen²⁹¹. Außerdem würde sich ein wasserlösliches Aptamer durch eine bessere Biokompatibilität auszeichnen, da die meisten Inhibitoren in organischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid gelöst werden, wodurch die Proteintranslation beeinflusst werden kann²⁹².

4.2. Analyse des ET-B-Rezeptors im zellfreien Sf21-System

Ein weiterer Vorteil von zellfreien Systemen im Vergleich zu zellbasierten Expressionssystemen liegt in der Kombination eines direkten Einsatzes von PCR-Produkten mit einer schnellen Proteinsynthese^{152,293}. Durch die Nutzung einer *error prone PCR* können randomisierte Mutationen in ein DNA-Templat eingeführt werden, sodass die genotypische Veränderung mit einem Phänotyp des Proteins in Verbindung gebracht werden kann²⁹⁴. Zusätzlich kann die Synthese in Gegenwart von toxischen Substanzen wie Puromycin durchgeführt werden. Puromycin ist ein Antibiotikum, welches sich toxisch auf eukaryotische Zellen auswirkt. Durch die Nachbildung des 3'-Ende einer aminoacylierten tRNA kann Puromycin in die naszierende Proteinkette integriert werden. Eine mRNA, welche am 3'-Ende mit Puromycin fusioniert ist, wird nach der Translation ihrer Codons über das Puromycin-Molekül an die entstandene Polypeptidkette gekoppelt²⁹⁵. Das beschriebene Verfahren zur Kopplung der mRNA an die zugehörige Polypeptidkette wurde sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen zellfreien Systemen angewandt²⁹⁵⁻²⁹⁷. Als Beispiel wurde die Sequenz eines optimierten Antikörpers identifiziert, dessen Dissoziationskonstante von 1,1 nM auf 40 pM verringert werden konnte, sodass eine ca. 30-fach höhere Bindungsaffinität zum Zielmolekül Fluorescein erzielt wurde²⁹⁴. Ebenso wurde durch ein Mutagenese-Screening die Sequenz eines thermostabilen ET-B-Rezeptors identifiziert, welcher sich durch eine höhere Stabilität im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor auszeichnet²⁹⁸. Die prinzipielle Synthese des ET-B-Rezeptors mit einem fusionierten eYFP auf Basis eines PCR-Produktes in einem zellfreien Insekten-System wurde bereits gezeigt¹⁵⁰, weshalb dieses Konstrukt gewählt wurde, um das translozierte Protein detailliert zu analysieren²⁴⁸. Die Synthese im Batch-Verfahren zeigte eine maximale Proteinausbeute von 12 µg/ml nach 180 min, während bereits nach 120 min eine maximale eYFP-Fluoreszenz detektiert wurde (Abb. 8A und C). Im Autoradiogramm ist bereits nach 90 min eine intensive Produktbande zu erkennen (Abb. 8B). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit vorherigen Studien^{150,152}. Die Reduzierung der berechneten Proteinausbeute nach 240 min könnte auf einen Abbau des synthetisierten Proteins hindeuten. Dieser Effekt ließ sich in der Fluoreszenzaufnahme des eYFPs und im Autoradiogramm nicht bestätigen. Im Vergleich zu Plasmiden sind PCR-Produkte weniger stabil und besonders anfällig für einen Abbau durch Nukleasen²⁹⁹. Besonders in prokaryotischen zellfreien Systemen konnte durch die Inhibierung von Nukleasen eine höhere Ausbeute an Zielprotein regeneriert werden²⁹⁹. Die im Autoradiogramm sichtbaren Nebenbanden könnten auf eine Degradation des PCR-Produktes hinweisen, wodurch eine verfrühte Termination des Elongationsprozesses stattfinden könnte.

Zusätzlich könnte die Sequenz des verwendeten PCR-Produktes optimiert werden oder mit translationssteigernden Elementen kombiniert werden. Die Erkennung des AUG-Codons durch das Ribosom erfolgt anhand der Kozak-Sequenz ((gcc) gccA/GccAUGg), welche das Start-Codon umgibt³⁰⁰. Besonders Mutationen in der -3 Position sowie in den Nukleotiden 1-5

upstream des AUGs können die Translationsinitiation reduzieren³⁰¹. So führt zum Beispiel der Austausch der AUG-umliegenden Nukleotide zu Uracil zu einer kaum detektierbaren Translation³⁰². Die Start-Codon umliegende Sequenz des in der Arbeit eingesetzten PCR-Produktes (taaacaAUGc) unterscheidet sich von der beschriebenen Sequenz. Eine Veränderung des Cytosins an der +1 Position kann jedoch nicht durchgeführt werden, da die alternativen Codons der Aminosäure Glutamin an Position zwei im ET-B-Rezeptor ebenfalls mit einem Cytosin starten. Der Sequenzkontext *upstream* des Start-Codon könnte wiederum variiert werden. Zusätzlich zum Sequenzkontext spielt die Ausbildung von Sekundärstrukturen der mRNA eine entscheidende Rolle in der Translationsinitiation³⁰³ und der Stabilität des PCR-Produktes²⁹³. Durch die Optimierung des Sequenzkontextes können *Hairpins* im Bereich der +13-17 Position entstehen, wodurch die Translation gesteigert werden kann³⁰⁴. Eine weitere Stabilisierung des PCR-Produktes könnte durch die Einführung von nicht-kodierenden Sequenzen in der 5'-UTR wie zum Beispiel durch poly(G) erfolgen³⁰⁵. Jewett und Mitarbeiter führten die Ω -Sequenz des Tabakmosaikvirus *upstream* zur jeweiligen Gensequenz in das verwendete PCR-Produkt ein, wodurch Initiationsfaktoren wie der eIF4F rekrutiert werden und die Translation Cap-unabhängig initiiert wird³⁰⁶. Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Proteinsynthese durch die Integration eines poly(A)-Schwanz in die 3'-UTR erreicht³⁰⁶. Das eingesetzte PCR-Produkt besitzt sowohl in der 5'- als auch in der 3'-UTR spezifische Sequenzen zur Ausbildung von *Hairpins*, die für das verwendete zellfreie Sf21-System optimiert wurden.

Aufgrund der Zugehörigkeit zur Klasse der Membranproteine wurde für die Synthese des ET-B-Rezeptors ein Sf21-Lysat ausgewählt, welches endogene Membranstrukturen enthält und eine Integration in diese sogenannten Mikrosomen ermöglicht^{150,307}. Die Analyse der Integration erfolgte über die Untersuchung der Kollokalisierung des fusionierten eYFPs. Während lösliches eYFP nicht mit den mikrosomalen Membranen kollokalisieren sollte, würde ein Membranprotein-eYFP-Fusionskonstrukt in der mikrosomalen Membran lokalisiert sein²⁹⁰. In Abbildung 9 ist deutlich zu erkennen, dass eine Kollokalisierung des ET-B-eYFP-Rezeptors mit den Mikrosomen vorliegt. Ähnlich zu den Ergebnissen aus Abbildung 8B ist nach einer Syntheszeit von 120 min keine Erhöhung in der Fluoreszenzintensität des eYFPs zu erkennen (Abb. 9). Stattdessen zeigt sich eine quantitative Zunahme der Fluoreszenz in den Mikrosomen. Die quantitative Erhöhung der eYFP-Fluoreszenz könnte mit der Reifung des Chromophores von Fluoreszenzproteinen zusammenhängen³⁰⁸. Für eYFP wurde in einem zellfreien *E. coli*-System eine temperaturabhängige Reifung mit 82 min bei 20 °C und 27 min bei 37 °C ermittelt³⁰⁹. Ausgehend von diesen Kalkulationen würde die Reifung des eYFPs bei der durchgeführten zellfreien Synthese im Sf21-Lysat bei einer Temperatur von 27 °C bei 59 min liegen. Diese theoretische Berechnung stimmt mit den Beobachtungen der Synthese des ET-B-eYFP-Fusionsproteins überein (Abb. 8B. und Abb. 9). Während nach 30 min trotz einer ermittelten Proteinausbeute von 4 µg/ml und einer detektierbaren Bande im Autoradiogramm ein sehr geringes Fluoreszenzsignal auf dem IBIDI-Objektträger und kein Fluoreszenzsignal in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Daten nicht gezeigt) detektiert wurde, ist nach 60 min ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erkennen. Um eine passive Integration des ET-Bs in die mikrosomale Membran auszuschließen, könnte ein *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) Experiment durchgeführt werden. Bei diesem Experiment wird die Fluoreszenz einer ausgewählten Stelle in der Probe durch einen starken Laserimpuls gebleicht. Bei einer passiven Integration ist nach einem kurzen Zeitintervall von einigen Sekunden an der ausgewählten Stelle wieder eine Fluoreszenz durch die passive Einlagerung des ET-B-eYFP-Rezeptors sichtbar. Liegt eine kotranslationale Integration über das Translokon vor, wird an der gebleichten Position keine Fluoreszenz

detektiert. Die kotranslationale Integration des Typ-I-Membranprotein Heparin-binding EGF-like growth factor (Hb-EGF) in die Membran von Sf21-Mikrosomen wurde mit Hilfe eines FRAP-Experimentes gezeigt²⁹⁰. Zusätzlich wurde dieses Experiment mit dem Adenosin-Rezeptor A2a, gekoppelt an ein eYFP, durchgeführt und es wurde ebenfalls keine passive Integration detektiert (Daten nicht gezeigt). Eine erfolgreiche Translokation des N-Terminus in das Lumen der Mikrosomen kann zusätzlich durch die detektierte Glykosylierung vermutet werden. Um weiterhin auszuschließen, dass nur der N-Terminus des ET-B-Rezeptors in die mikrosomale Membran integriert wurde, wurde ein Proteinase K-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay werden Domänen, die sich außerhalb des Mikrosomens befinden, verdaut, während luminal Domänen geschützt vorliegen (Abb. 10A). Da die geschützten Bereiche Molekülmassen von 6-11 kDa mit einer Anzahl von 9-17 Leucinen aufzeigten, von denen aufgrund der statistischen Inkorporation des ¹⁴C-Leucin nur jedes dritte Leucin radioaktiv markiert ist, wurde für diesen Versuch ein zusätzliches DNA-Templat generiert. Durch dieses Templat sollte die Proteinausbeute, sowie die Translokation des ET-B-Rezeptors erhöht werden, um die Detektion der niedermolekularen ¹⁴C-markierten Fragmente zu verbessern. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde zirkuläre DNA eingesetzt, im Gegensatz zu dem bisher verwendeten PCR-Produkt. Zusätzlich wurde eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) *upstream* der Signalsequenz des ET-B-Gens eingefügt. Wie bereits im Abschnitt der Optimierung eines PCR-Produktes angedeutet, ist die bisher genutzte Cap-abhängige Translationsinitiation ein komplexer und hoch-regulierter Prozess, der die Proteinsynthese einschränken kann. Die Cap-abhängige Translationsinitiation kann in zwei Hauptprozesse unterteilt werden. Im ersten Schritt wird der 43S Präinitiationskomplex bestehend aus eIF2, GTP und der Met-tRNAi gebildet, welcher sich mit der 40S Untereinheit des Ribosoms und den Faktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5 zusammenlagert³¹⁰. In einem zweiten Schritt wird die mRNA zum Präinitiationskomplex geführt und durch eIF4E und des Poly(A)-binding Protein (PABP) gebunden. Im Anschluss an diesen Prozess folgt das Scannen nach dem AUG-Start-Codon und die Anlagerung der großen 60S-ribosomalen Untereinheit³¹¹. Bei einer Cap-unabhängigen Translationsinitiation interagiert die 5'-UTR einer IRES teilweise oder komplett faktorunabhängig mit den Ribosomen³¹². Die hier integrierte IRES-Site stammt aus dem Cricket Paralysis Virus und wurde bereits in eukaryotischen zellfreien Systemen angewandt^{15,157}. Die CrPV-IRES besitzt eine spezielle Sekundärstruktur, die eine direkte Interaktion mit den Ribosomen ermöglicht³¹³. Während zwei der drei Pseudoknot-RNA-Strukturen (PKII und PKIII) an die 40S Untereinheit des Ribosoms binden, interagieren die zwei Stemloops mit ribosomalen Proteinen, wodurch die Zusammenlagerung der beiden Untereinheiten zum 80S-Ribosom gefördert wird^{314,315}. Nachdem die drei Pseudoknot-RNA-Strukturen in die Peptidyl-Stelle des Ribosoms verschoben wurden, wird durch die ausgebildete Sekundärstruktur des PKI ein tRNA-Anticodon Stem loop imitiert, durch den die Codon-Anticodon-Interaktion ermöglicht wird³¹⁶. Mit diesem Schritt wird der Leserahmen für den Start der Translation in der Aminoacyl-Stelle des Ribosoms festgelegt³¹⁵. Dabei ist dieser Schritt unabhängig von der Präsenz eines AUG-Startcodons in der mRNA. Stattdessen wird die Translation bevorzugt durch ein Alanin- oder Glutamin-Codon gestartet, welches sich benachbart zum PKI befindet³¹⁷. Im Vergleich zu der Cap-abhängigen Translationsinitiation konnte durch den Einsatz der CrPV-IRES die Proteinausbeute des Modellproteins Luziferase um den Faktor 10 (Sf21-), 35 (CHO-) und 14 (K562-zellfreies System) gesteigert werden¹⁵⁷. Zusätzlich zur CrPV-IRES wurde das endogene humane Signalpeptid des ET-B-Rezeptors durch die Melittin-Signalsequenz (Mel) des Apitoxins aus der Honigbiene ausgetauscht¹⁵¹. Mel besitzt als zweites Codon ein AAA, ein Nukleotidkontext, der als besonders effektiv in der Translationsaktivität beschrieben wird³¹⁸. Zusätzlich wurde für diese Sequenz sowohl *in vivo*

Proteinproduktionssysteme als auch für zellfreie Systeme ein translokationssteigernder Effekt gezeigt^{152,307,319}. Durch die Kombination der IRES-Sequenz mit der Melittin-Signalsequenz konnte die Proteinausbeute des ET-B-Rezeptors von 12 µg/ml auf 20 µg/ml in der Suspension gesteigert werden mit einem Anteil von 60 % in der mikrosomalen Fraktion (Daten nicht gezeigt). Um ein mögliches Detektionslimit in der Autoradiographie zu umgehen, wurde das Protein zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY-TMR statistisch gelabelt, da mit einer In-Gel-Fluoreszenz eine höhere Sensitivität erreicht wird¹⁶. Die In-Gel-Fluoreszenz zeigt die erwarteten Banden der luminal geschützten Bereiche des ET-B-Rezeptors in einer Größenordnung von 6-11 kDa (Abb. 10B.). Dieses Bandenmuster deutet auf die Translokation des N-Terminus (11 kDa) hin sowie auf die Orientierung der extrazellulären Loops im Lumen der Mikrosomen (6-9 kDa). Trotz der erfolgreichen Integration des ET-B-Rezeptors in die Mikrosomen des Sf21-Lysates wurde nur ein ligandbindender Anteil des ET-B-Rezeptors von 0,5 % (53,7 pmol/mg) bestimmt²⁴⁸. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit ähnlichen Studien, in denen ein prozentualer Anteil an ligandbindenden ET-B-Rezeptor von 1 % bestimmt wurde⁸. Während in dieser Studie eine limitierende Integration und Translokation in die mikrosomalen Membranen als Grund genannt wird, zeigt eine Studie im *E. coli* zellfreien System aus dem vergangenen Jahr weitere Optimierungsparameter auf³²⁰. Einen besonderen Einfluss auf die korrekte Faltung von Membranproteinen im Allgemeinen hat die lipidische Zusammensetzung der Membran³²¹. Dieser Effekt wurde ebenfalls für den ET-B-Rezeptor identifiziert. Negativ geladene Kopfgruppen wie Phosphatidylglycerin und Phosphatidylserin scheinen einen positiven Effekt auf die Faltung des ET-B-Rezeptors zu haben. Ebenfalls verändern Länge und Flexibilität der Lipidkette die Aktivität des Rezeptors³²⁰. Die Identifizierung einer optimierten Lipidkomposition bestehend aus 18:1-trans/18:1-trans-1,2-dielaidoyl-sn-glycerin-3-phospho-(1'-racglycerin) ((DE)PG) führte zur einer aktiven Fraktion des ET-B-Rezeptors von 3-4 %. Die mikrosomalen Membranen des Sf21-Lysates unterscheiden sich vor allem in ihrer Kopfgruppe zu der optimierten Zusammensetzung. Während ca. 35-40 % der Lipidketten ebenfalls eine 18:1 Länge aufzeigen, besteht die Kopfgruppe zu 91 % aus Phosphatidylcholin und aus Phosphatidylethanolamin. Die bevorzugten negativen Kopfgruppen Phosphatidylglycerin und Phosphatidylserin sind zu einem Anteil von unter 2 % vertreten³²². Eine Umwandlung von Mikrosomen in Proteo-Liposomen durch „Elektroschwellung“ könnte genutzt werden, um (DE)PG-Lipide in die Membran zu integrieren und so die Aktivität des ET-B-Rezeptors zu steigern¹⁵⁰. Neben der Relevanz der Lipidkomposition wurde die Faltung des ET-B-Rezeptors analysiert. Während nach einer Syntheszeit von fünf Stunden ca. 50 % und nach zehn Stunden ca. 75 % der totalen Proteinmenge an ET-B-Rezeptor produziert wurde, zeigte dieser Rezeptor keinerlei Aktivität³²⁰. Erst nach einer verlängerten Inkubationszeit mit einer optimalen Dauer von 28 Stunden konnte Ligandbindung gemessen werden. Die zellfreie Synthese des ET-B-Rezeptors in dieser Arbeit wurde für drei Stunden inkubiert, sodass diese Zeitspanne wesentlich erhöht werden könnte. Alternativ könnte die zellfreie Synthese des ET-B-Rezeptors in einem Dialyseverfahren durchgeführt werden, welches neben einer längeren Inkubationszeit auch eine stetige Versorgung der Synthese mit frischen Aminosäuren und Energiekomponenten ermöglicht^{155,290}. So könnte nicht nur die Proteinausbeute des ET-B-Rezeptors gesteigert werden, sondern auch der prozentuale Anteil an ligandbindenden Rezeptor. Ein weiterer Parameter, welcher für die Funktionalität des ET-B-Rezeptors kritisch ist, besteht in der Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den extrazellulären Loops 1 und 2⁶². Durch den Austausch von DTT mit Glutathion, um die Ausbildung der Disulfidbrücke zu unterstützen, konnte die Anzahl an adressierten Ligandbindungsstellen beinahe verdoppelt werden³²⁰. Im Sf21-System konnte die Ausbildung von Disulfidbrücken am Beispiel von *single chain variable fragment* (scFv)- Antikörpern durch den Einsatz der Melittin-Signalsequenz in

Abwesenheit von Glutathion gezeigt werden¹⁵², sodass vermutet werden kann, dass die Disulfidbrücke des ET-B-Rezeptors korrekt ausgebildet wurde. Durch die Anpassung der genannten Parameter wurde in der Kombination eine aktive Fraktion des ET-B-Rezeptors von 6,5 % mit einer maximalen Ligandbindung von 1103 pmol/ml erreicht³²⁰. Würde eine ähnliche Steigerung der 53,7 pmol/mg im zellfreien Sf21-System erreicht werden²⁴⁸, wäre dieser Wert vergleichbar zu der Produktion von ET-B in Sf9-Zellen mit einer berichteten maximalen Bindung von 80 pmol je mg totales Membranprotein³²³. Aufgrund des offenen Charakters von zellfreien Systemen können Optimierungsprozesse durchgeführt werden, die in einem zellbasierten Expressionssystem erschwert oder teilweise nicht möglich sind. Dazu gehört zum Beispiel die Anpassung von Lipiden während der Synthese. Zusätzlich können Redoxbedingungen flexibler gewählt werden ohne auf die Erhaltung der lebenden Zelle achten zu müssen. Darüber hinaus können aufgrund des wesentlich geringeren Zeitaufwandes der zellfreien Proteinsynthese durch Mutagenese gewonnene DNA-Konstrukte hoch-parallelisiert translatiert und die erhaltenen Proteine später analysiert werden. In Kombination mit der Erhöhung der Proteinausbeute durch ein Dialyseverfahren^{155,290} könnte dieses System eine Grundlage für die Proteinproduktion von komplexen Proteinen für zum Beispiel strukturelle Analysen wie NMR, Cryo-Elektronenmikroskopie und Kristallographie bilden³²⁴.

4.3. Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren durch Amber-Suppression

Wie bereits im letzten Abschnitt angesprochen, besteht ein großes Interesse an der Strukturaufklärung von Proteinen. Der Einfluss der 3D-Struktur auf die Funktion von Proteinen ist vergleichbar mit der Anordnung von Kohlenstoff. Während Kohlenstoffatome, die lose miteinander verbundene Blätter ausbilden, im weichen Material Graphit resultieren, endet ein dicht gepackter Würfel in einem harten Diamanten. Die Struktur beeinflusst dementsprechend die Charakteristiken und Funktionen eines Materials und auch eines Proteins. Besonders bei Enzymen konnte anhand von konservierten Strukturen auf die katalytische Aktivität von unbekanntem Proteinen geschlossen werden, so dass die Struktur-basierten Vorhersagen zusätzlich zu den Sequenz-basierten Analysen nutzbar sind³²⁵. Zur Identifikation von speziellen Subdomänen von Proteinen ist besonders bei NMR und Cryo-EM, aber auch bei Kristallstrukturanalyse eine positionsspezifische Markierung bevorzugt. Zum Beispiel wurden Phenylalanin-Derivate mit Iod oder Brom konjugiert und in das Lysozym des T4-Phagen integriert³²⁶. Durch die ungewöhnliche Streuung des Iod-Atoms konnte die Struktur mit wesentlich weniger Datenpunkten gelöst werden³²⁶. Der Einsatz von isotopisch markierten oder Spin-markierten nKAs für NMR-Analysen ist ebenfalls möglich³²⁷. Im Bereich der Elektronenmikroskopie wurde der Einbau einer nKAs zur Kopplung eines leicht identifizierbaren globulären Proteins genutzt³²⁸. Die Grundlage für die erwähnten Beispiele liegt in einer ausreichenden Adressierung des Amber-Stopcodons durch den Einbau der nKAs. Aus diesem Grund wurde im ersten Abschnitt die Adressierbarkeit des Amber-Stopcodons im Modellprotein Adenosin-Rezeptor A2a analysiert. Die Position des Amber-Stopcodons wurde anhand von mehreren Kriterien ausgewählt. Es wurde ein Bereich im dritten extrazellulären Loop gewählt, welcher sich durch eine hohe Flexibilität und gute Zugänglichkeit auszeichnet¹⁹⁴, sodass die reaktive Gruppe der nicht-kanonischen Aminosäure für die Kopplung des Farbstoffes zugänglich sein sollte (Abb. 12). Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass die Integration eines Fluorophors in diesem Bereich zur Analyse einer ligandabhängigen Strukturveränderung genutzt werden kann¹⁹⁴. In einem prokaryotischen System kann die Einbau-effizienz einer nKAs durch die Inhibierung oder Entfernung des RF1s erhöht werden³²⁹. Eine Inhibierung kann zum Beispiel durch die Bindung eines Aptamers erfolgen³³⁰ oder direkt durch das Ausschalten des RF1-Gens³²⁹. Aufgrund der unterschiedlichen Adressierung von

RF1 (UAA und UAG) und RF2 (UAA und UGA)³³¹ wird die Proteintranslation trotz entferntem RF1 am Opal- und Ochre-Stopcodon terminiert. Lediglich das Amber-Stopcodon wird nicht mehr für eine Termination erkannt. In Eukaryoten ist dieser Ansatz nicht möglich, da alle drei Stopcodons durch den Faktor eRF1 in Kombination mit dem eRF3 erkannt werden²²³. Die Interaktion des eRF1 mit den Stopcodons im Ribosom erfolgt hauptsächlich über die N-terminale Domäne, während die Ausbildung des eRF1/eRF3-Komplexes hauptsächlich über die C-terminale Domäne erfolgt und in einer Translationstermination resultiert³³². Durch den Austausch der Glutaminsäure zu Asparaginsäure an Position 55 in der N-terminalen Domäne des eRF1s konnte die Erkennung des Amber-Stopcodon *in vitro* auf 21 % reduziert werden, während das Opal- und Ochre-Stopcodon weiterhin zu 78 bzw. 72 % erkannt werden³³³. In Gegenwart dieses modifizierten eRF1 konnte die Einbaueffizienz von Nε-[(tert-butoxy)carbonyl]-L-Lysin durch das Pyrrolysin-tRNA-Synthetase/tRNA-Paar in einer HEK293-Zelllinie von 62 % auf 85 % erhöht werden³³⁴, sodass dieser Ansatz ebenfalls in einem zellfreien System angewandt werden könnte. Für diesen Zweck könnte durch genverändernde Methoden wie zum Beispiel CRISPRCas9⁵⁰ das Gen des eRF1s in der kultivierten Zelllinie so modifiziert werden, dass die genannte Mutation in der Aminosäuresequenz translatiert wird und ein eRF1-verändertes Lysat entsteht. Für solch eine Anwendung müsste überprüft werden, inwieweit sich der veränderte eRF1 auf die lebende Zelle auswirkt. Die Einbaueffizienz einer nkAs am Amber-Stopcodon ist darüber hinaus vom Sequenzkontext der umliegenden Codons abhängig. Dabei unterscheidet sich der Sequenzkontext zwischen den einzelnen Spezies. Während in *E. coli* eine hohe Einbaueffizienz bei einem Adenin an der +4 Position (Nukleotid direkt nach dem Amber-Stopcodon) identifiziert wurde^{335,336}, ist dieser Effekt in einer humanen 293-Zelllinie nicht bestätigt worden³³⁷. Die höchste Einbaurrate in der humanen Zelllinie wurde bei einem Cytosin (C>G>U=A) an der +4 Position erreicht³³⁷. Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Konstrukt das Amber-Stopcodon ebenfalls *upstream* eines Cytosins an der +4 Position gewählt. Interessanterweise wird in Studien über den Sequenzkontext in Bezug auf die Translationstermination diskutiert. Hier zeigen Ergebnisse, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-4} die Chance besteht, dass das Stopcodon überlesen wird³³⁸. Für den humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A) ist zum Beispiel bekannt, dass durch *Readthrough* eine Isoform produziert werden kann, welche die angiogenen Eigenschaften des VEGF-As umkehrt³³⁹. Durch eine mögliche Konkurrenz zwischen dem eRF1 und dem Überschuss von nahverwandten tRNAs in der A-Stelle des Ribosoms, welche zu zwei von den drei Positionen des Stopcodons komplementär sind, können fälschlicherweise diese tRNA verwendet werden. Als Resultat wird eine inkorrekte Aminosäure in die Polypeptidkette eingefügt und die Translation wird bis zum nächsten Stopcodon weitergeführt³⁴⁰. Um diesen so genannten *Readthrough* zu vermeiden, wird zum Teil sogar ein vier-basiges Stoppsignal angenommen, welches ein Adenin oder Guanin direkt nach dem Stopcodon involviert³⁴¹. Bei humanen Stopcodons folgt zum Beispiel zu 67 % ein A oder G, bei Hasen liegt dieser Anteil sogar bei 73 %³⁴¹. Folgt ein Cytosin nach dem Stopcodon wurde ein *Readthrough* in einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat zwischen 2-5 % ermittelt³⁴². Insofern scheint eine hohe Suppressionseffizienz ebenfalls mit einem erhöhten *Readthrough* verbunden zu sein. Um eine Aussage über die beschriebenen Effekte der Einbaueffizienz und des *Readthrough* treffen zu können, wurde ein Konstrukt erstellt, in dem das Amber-Stopcodon vor dem Reporterprotein Nanoluziferase positioniert wurde, wodurch ein Auslesen des jeweiligen Effektes ermöglicht wird. Der Einsatz von verschiedenen Kombinationen aus vorbeladenen und enzymatisch aminoacylierten Suppressions-tRNAs und nicht-kanonischer Aminosäure resultierte in vergleichbaren Ergebnissen. Wird die Synthese in Abwesenheit einer der orthogonalen Komponenten durchgeführt, wurde anhand der Nluc-Lumineszenz ein

Anteil an Vollängenprotein zwischen 0,25 % und 4 % ermittelt (Abb. 14 und 15A). Dieser Anteil stimmt mit dem erwähnten Bereich von 2-5 % überein. Auffällig ist hierbei der erhöhte *Readthrough* in Abwesenheit der nkAs, der bis zu einem Faktor 10 höher ist im Vergleich zur Abwesenheit der Synthetase oder der tRNA. Dies könnte dadurch begründet werden, dass die Synthetase zwar eine höhere Affinität zur nkAs besitzt, aber dennoch strukturähnliche Aminosäuren wie Tyrosin oder Phenylalanin akzeptieren könnte. Gerade bei Synthetasen, die keine *proof-reading*-Funktion besitzen, wie es bei der Tyrosin-Synthetase der Fall ist, wird eine miss-Acylierung nicht behoben¹⁸. Durch den Einsatz einer 20-fach höheren Konzentration an nkAs im Vergleich zu den endogenen strukturähnlichen Substraten wird das Verhältnis weiterhin zu Gunsten eines Einbaus der nkAs verschoben.

Die fluoreszenzmarkierte Aminosäure Lysin, chemisch aminoacyliert an eine tRNA (BP-CUA), wurde zu 20 % in das Modelprotein Adora2a_amb215-Nluc integriert (Abb. 13). Diese Suppressionseffizienz ist vergleichbar zum Einbau von AzF, (22 %) unterscheidet sich zum Einbau von pPa (81 %) jedoch stark, sodass sowohl ein Einfluss der nkAs als auch der Suppressions-tRNA vermutet werden kann. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Ausrichtung der nkAs. Durch den Austausch der Hydroxy-Gruppe des Tyrosins zu einer Alkin- bzw. Azid-Gruppe wird die Struktur der Aminosäure nicht stark verändert. Durch die Kopplung eines BODIPY-TMRs jedoch schon, da dieses Molekül aufgrund der unflexiblen Ringstruktur räumlich ausgedehnt ist und nur knapp die Exit-Stelle des Ribosoms passieren kann. Während der Exit-Tunnel einen Durchmesser von 10-20 Å besitzt³⁴³, hat unkonjugiertes BODIPY bereits eine Größe von 10,1 x 10,1 x 17,1 Å³⁴⁴. Diese Problematik besteht in der Verwendung eines orthogonalen Systems nicht, da der Einbau der nkAs entkoppelt von der Fusionierung des Farbstoffes vorliegt. Unkonjugiertes Phenylalanin ist zwar ähnlich lang wie BODIPY (9,7 Å), dafür aber lediglich 4,7 Å breit³⁴⁵. Trotz einer ähnlichen Struktur wurden unterschiedliche Suppressionseffizienzen für pPa und AzF identifiziert. Während einige Klasse-I-tRNA-Synthetasen wie im Fall der Isoleucin-RS, der Valin-RS oder der Leucin-RS *proof-reading* Mechanismen besitzen, wodurch eine falsch ligierte Aminosäure von der tRNA entfernt wird, ist dieser Prozess wie oben erwähnt bei der *EcTyrRS* nicht bekannt¹⁸. Eine bereits an die Suppressions-tRNA aminoacylierte nkAs sollte dementsprechend nicht von der eAzFRS wieder entfernt werden. Zusätzlich wurde die erfolgreiche Integration von AzF in ein Zielprotein sowohl *in vivo*^{346,347} als auch *in vitro* mehrfach gezeigt^{16,17}. In den genannten Studien wurden Suppressionseffizienzen von 50 bis 80 % für ein Amber-Stopcodon und 25 % für die Adressierung eines zweiten Amber-Stopcodons erreicht. Ebenso liegt in der vorliegenden Arbeit ein erfolgreicher Einbau von AzF in das Protein Erythropoetin vor, sodass die geringe Einbaueffizienz nicht auf die Funktionalität des orthogonalen Systems zurückgeführt werden kann (Abb. 22A). Eine Möglichkeit könnte die Reduktion der Azidgruppe durch im CHO-Lysat enthaltene Komponenten zu einer Aminogruppe sein^{347,348}. Eventuell wird die Änderung in der para-Position des Phenylalanins durch die Tyrosin-Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht akzeptiert und die nkAs somit nicht für eine Aminoacylierung der Suppression-tRNA verwendet. Eine Studie über den Einbau von unterschiedlichen ortho-modifizierten Phenylalanin-Derivaten durch die *Methanocaldococcus jannaschii* Tyrosin-Synthetase zeigt ebenfalls eine unterschiedliche Adressierung des Amber-Stopcodons. Wird zum Beispiel ein Chlor oder Brom durch ein Iod ersetzt, sinkt die Einbaurrate auf ca. 50 %. Ebenfalls wurde ein um 33 % geringerer Einbau identifiziert durch eine O-Methyl-Gruppe in der ortho-Position. Generell scheint die Einbaueffizienz mit einem größeren Substituenten abzunehmen²²⁴. Dieses Problem kann umgangen werden, in dem die Substratspezifität der Synthetase angepasst wird. Die hier eingesetzte Variante (p-AzidoPheRS-6)¹⁸ besitzt vier Mutationen, von denen die Y37T-Mutation zur Destabilisierung der Bindung zum endogenen Tyrosin

verantwortlich ist, die Mutationen D182S und F183A die Substratspezifität koordinieren und der D265R-Austausch die Aminoacylierung der Suppression-tRNA verbessert¹⁹. Zusätzlich wirkt sich die Aminosäure an Position 186 auf die Größe der Bindungstasche aus, sodass diese Position ebenfalls variiert werden könnte³⁴⁹. Takimoto tauschte zum Beispiel das Leucin zu einem Alanin aus um eine Vergrößerung der Bindungstasche für die Inkorporation von p-Benzoylphenylalanin und AzF zu erreichen¹⁹. Eine aktuellere Studie, die den Einbau eines 7-Hydroxycoumarin-Tyrosins durch die *E. coli* Tyrosin-Synthetase untersucht, prognostiziert durch den strukturellen Vergleich von verschiedenen modifizierten Tyrosin-tRNA-Synthetasen weitere Aminosäurereste, die für die Substratkoordination (L71) verantwortlich sind, sowie die katalytische Domäne formen (L56, T76, S120, A121)³⁵⁰. In der erwähnten Studie wird beschrieben, dass der Phenolring des Coumarins hauptsächlich durch die Interaktion mit den Aminosäuren L71 und T76 erkannt wird. Aufgrund der spezifischen Interaktionen von einzelnen Aminosäureresten im katalytischen Zentrum der eAzFRS müsste für jede nkAs ein Screening zur Identifizierung der spezialisierten Synthetase durchgeführt werden³⁵¹.

Durch die Variation der Konzentrationen von eAzFRS oder Suppression-tRNA konnte die Einbaueffizienz der nkAs teilweise um 20 % gesteigert werden (Abb. 14 und 15). Sowohl für den Einbau von AzF als auch von pPa wurde eine hohe Einbaueffizienz durch den Einsatz von 3 μ M Synthetase, 3 μ M tRNA und 2 mM nkAs ermittelt. Eine explizite Tendenz im Hinblick auf eine optimale Kombination aus tRNA und eAzFRS ist jedoch nicht erkennbar. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aminoacylierung der tRNA durch die eAzFRS im Allgemeinen ein robuster Prozess ist, welcher Konzentrationsveränderungen toleriert. Lediglich eine zu geringe Suppressions-tRNA -Konzentration scheint die Einbaueffizienz negativ zu beeinflussen. Sowohl für den Einbau von AzF als auch pPa wurde die niedrigste Einbaurrate in Gegenwart von 1 μ M (14 %) bzw. 2 μ M (63 %) tRNA ermittelt. Die Suppressions-tRNA wird im Vorfeld zum Einsatz in einer zellfreien Synthese separat transkribiert und gefaltet. Durch diesen separierten Schritt werden keine Modifikationen an die Nukleotide der tRNA angefügt. Auch wenn eukaryotische tRNAs stärker modifiziert vorliegen als prokaryotische, sind Modifikationen wie das Pseudouridin (Ψ) oder das 1-Methyl-Adenosin auch in prokaryotischen tRNAs vertreten³⁵². Einfache Modifikationen wie Methylierungen an der Ribose sind besonders in der tRNA-Kern-Region präsent. In dieser Region interagieren der D- und T-Arm miteinander, um die dreidimensionale Struktur aufrecht zu erhalten. Komplexere, enzymbasierte Modifikationen treten hauptsächlich im Anticodon-Loop als Voraussetzung für eine effiziente Translation auf³⁵². Auch wenn die erfolgreiche Aminoacylierung der unmodifizierten tRNA auf eine korrekte Faltung hindeuten, könnte die Stabilität der tRNA durch zusätzliche Modifikationen erhöht werden³⁵². Durch die Anwesenheit von 1 mM oder mehr Magnesium-Ionen kann die korrekte Faltung der tRNA ebenfalls gefördert werden³⁵³. In den hier verwendeten zellfreien Systemen wurden Magnesium-Endkonzentrationen von 2,5 mM (*Sf21*) bzw. 3,9 mM (CHO) eingesetzt, sodass die tRNA-Konformation während der Synthese erhalten bleiben sollte. Der Zusatz von Magnesium während der tRNA-Faltung zeigte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.4. Klickreaktionen und ihre Anwendung

Aufgrund der hohen Einbaueffizienz des pPas wurde diese nkAs ausgewählt, um über eine Klick-Reaktion einen Farbstoff zu koppeln. Im ersten Schritt wurde die kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) analysiert (Abb. 16). Der Einsatz der CuAAC als bioorthogonale Reaktion wurde bereits zu Beginn des Jahrtausends beschrieben³⁵⁴. Trotz der vielversprechenden Einsatzmöglichkeiten der CuAAC sind Limitationen für zellbasierte Assays

aufgrund der Toxizität des eingesetzten Kupfers gegeben. Kupfer-Ionen können durch Aminosäurereste chelatiert werden und dadurch die Struktur und Funktionalität des Proteins beeinträchtigen. Zusätzlich kann die Entstehung von reaktiven Sauerstoffformen induziert werden^{251,355}, so dass Kupfer-Ionen im mikromolaren Bereich Zellschäden oder sogar den Zelltod hervorrufen können²⁵¹. Durch den Einsatz eines dreifach konjugierten Stickstoffes mit modifizierten Triazol-Ringen können Cu(I)-Ionen stabilisiert und der negative Einfluss reduziert werden³⁵⁶. Zu diesen Strukturen gehört das hier eingesetzte THPTA, welches im Gegensatz zu anfänglich entwickelten Strukturen eine hohe Wasserlöslichkeit besitzt³⁵⁷. Darüber hinaus wurde die Aminosäure L-Histidin als Stabilisator eingesetzt, da für L-His ebenfalls ein positiver Effekt auf die CuAAC beschrieben wurde und der Cu(I)-L-Histidin-Komplex im Vergleich zu den Triazol-Strukturen wie THPTA die niedrigste Toxizität auf lebende Zellen aufzeigt²⁵¹. Die Cycloaddition von zwei verschiedenen Alkin-Derivaten an Azidocoumarin zur Ausbildung des fluoreszierenden Tetrazin-Moleküls zeigte die höchste Umsetzungsrate in Gegenwart von THPTA (Abb. 16). Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Beobachtung aus dem Jahr 2014³⁵⁸. In diesem Paper wurde für L-Histidin die oben beschriebene Verträglichkeit mit lebenden Zellen dargestellt, jedoch zeigte sich *in vitro* eine wesentlich geringere Umsetzungsgeschwindigkeit der CuAAC in Gegenwart von L-Histidin im Vergleich zu den verwendeten Triazolverbindungen. Weiterhin wurden wasserlösliche THPTA ähnliche Verbindungen vorgestellt, welche sich durch verbesserte Charakteristiken wie einer höheren Umsetzungsrate der CuAAC *in vitro* und einer niedrigeren Toxizität auf lebenden Zellen auszeichnen³⁵⁸. Interessanterweise wurden starke Unterschiede der Triazolverbindungen in ihrer katalytischen und stabilisierenden Funktion *in vitro* und *in vivo* bestimmt, sodass ein Vergleich der vorgestellten Verbindungen mit dem hier verwendeten THPTA durchgeführt werden sollte. Ein weiterer Einfluss zeigt sich in der Art des Alkin-Derivates. Die Kombination aus AF647-Alkin und THPTA resultierte in einem niedrigeren Fluoreszenzsignal (Faktor 1/14) im Vergleich zu der Kombination aus pPa und THPTA. Dies könnte auf die Zugänglichkeit des Alkins zurückzuführen zu sein, da AlexaFluor im Vergleich zur Aminosäure Phenylalanin größer und komplexer ist, wodurch eine sterische Hinderung mit der Ringstruktur des Coumarins auftreten könnte. Durch die höhere Umsetzungsrate von THPTA wurde dieser Ligand für die folgende Kopplung mit Hilfe der CuAAC von ausgewählten Farbstoffen verwendet. Der ausgewählte Silikon-Rhodamin-Azid (SiR-Azid)-Farbstoff ist hoch fluorogen, nicht-toxisch und besitzt eine Emissions- und Anregungswellenlänge im weiten Rotbereich³⁵⁹, wodurch der Farbstoff nicht mit der Eigenfluoreszenz der Mikrosomen interferiert. Zusätzlich zeichnen sich SiR-Derivate durch einen besonderen Mechanismus aus. Diese Farbstoffe existieren in einem Gleichgewicht zwischen einem nicht-fluoreszierendem Spirolacton (Aus-Status) und einem fluoreszierenden Zwitterion (An-Status). Der Aus-Status wird durch Aggregation und eine unspezifische Bindung des SiRs an hydrophobe Oberflächen gefördert. Im Gegensatz dazu wird der An-Status durch die Interaktion mit polaren Proteinoberflächen erreicht³⁵⁹. Aufgrund des beschriebenen Mechanismus wurde SiR ausgewählt, um eine Färbung der mikrosomalen Membran durch eine unspezifische Bindung des Farbstoffes zu umgehen. Zu Beginn wurde die Kopplung des Farbstoffes an das Zielprotein optimiert. Um die beschriebene Toxizität von Kupfer möglichst gering zu halten, wurde die optimale Kupferkonzentration bestimmt, welche für eine Proteinmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff geeignet ist (Abb. 17A und B). Eine Fluoreszenzbande wurde ab dem Einsatz von 100 μM Kupfer identifiziert, mit einer höchsten Intensität bei einem Einsatz von 200 μM CuSO_4 . In verschiedensten Publikationen wird ebenfalls 100–200 μM CuSO_4 für die Durchführung der CuAAC eingesetzt^{358,360,361}. Ab einem Einsatz von 100 μM CuSO_4 ist im Autoradiogramm bereits ein negativer Effekt des Kupfers zu sehen, da die Intensität der

Proteinbande des Adora2a abnimmt. Diese Größenordnung stimmt mit dem ermittelten mikromolaren Bereich überein²⁵¹. Eine minimal intensive Fluoreszenzbande wurde bereits ab einer SiR-Konzentration von 3 μM detektiert (Abb. 18). Durch die Erhöhung der Konzentration an SiR auf 20 μM konnte ebenfalls die Fluoreszenzintensität der Produktbande gesteigert werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Einsatz eines Tetrazin-SiR-Derivates, welches bei einem Einsatz von 20 μM in einer erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung des Zielproteins GFP in lebenden Zellen resultierte³⁵⁹. Zusätzlich zeigt sich bei einer geringen Inkubationszeit des SiRs von unter 10 min eine Produktbande in der In-Gel-Fluoreszenz, welche sich im Vergleich zu einer Inkubationszeit von zwei Stunden durch weniger Nebenbanden auszeichnet. Im Gegensatz zur Staudinger Ligation, welche mit einer Umsetzungsgeschwindigkeit von $3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ langsam abläuft, werden die Edukte in der CuAAC mit einer Umsetzungsgeschwindigkeit von 10-200 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wesentlich schneller zum Produkt umgewandelt³⁶². Für die erfolgreiche Markierung von Azid-Glykanen auf der Oberfläche von lebenden Zellen mit einem Alkin-konjugierten Farbstoff wurden Inkubationszeiten von 5-10 min bei 4 °C angewendet³⁶³. Die Fluoreszenzbande nach einer Inkubationszeit von 0 min ist auf die Weiterführung der CuAAC während des Fällungsprozesses in Gegenwart von Aceton zurückzuführen³⁶⁴, sodass durch den Fällungsprozess eine minimale Inkubationszeit von 45 min zu Stande kommt. Trotz der intensiven Produktbande in der In-Gel-Fluoreszenz konnte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie kein Unterschied zwischen den unspezifisch markierten Mikrosomen und der Kopplung des SiRs an den in der Membran lokalisierten Adora2a detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der detektierten Fluoreszenz des SiRs scheint eine unspezifische Interaktion mit polaren Oberflächen von Proteinen möglich zu sein, die eine Konformationsänderung des Farbstoffes und somit den fluoreszierenden Status auslösen. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Markierung des Adora2a mit DyLight488- bzw. 650-Phosphin erhalten, da diese Farbstoffe eine hohe unspezifische Färbung der mikrosomalen Membran aufzeigten (Abb. 19). Interessanterweise gibt es verschiedenste Paper, in denen DyLight-Phosphin zur positionsspezifischen Markierung von Antikörpern über eingebrachte Azid-Zucker verwendet wurde^{365,366}. Der gereinigte und markierte Antikörper wurde anschließend in eine Maus injiziert, um die Bindung des Antikörpers an Tumoren zu visualisieren. Im Gegensatz zu DyLight-Phosphin werden für die Visualisierung von Biomolekülen wie Peptiden, Proteinen und Oligonukleotiden in lebenden Zellen vor allem Alexa Fluor- und Cyanin-, aber auch Fluorescein (FAM)-Derivate verwendet^{367,368}. Dies könnte auf die etablierte Kopplung von funktionalisierten Gruppen an die genannten Farbstoffe wie geladene Ammoniumionen, Carboxylate, Phosphonate und Sulfonate zur Erhöhung der Hydrophilie der Farbstoffe zurückzuführen sein, um Markierungsreaktionen in biokompatiblen Milieus durchführen zu können³⁶⁹. Anhand eines Carbonsäure-konjugierten BODIPYs als Ausgangskomponente konnte durch die Kopplung der erwähnten funktionalisierten Gruppen an die Carbonsäure die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes drastisch erhöht werden, während die Fluoreszenzeigenschaften erhalten werden konnten³⁶⁹. Die hier ausgewählten Farbstoffe Cy5 und 6-FAM besitzen ebenfalls funktionalisierte Gruppen (zwei Sulfit-Gruppen beim Cy5, zwei Hydroxy-Gruppen beim 6-FAM), um die Hydrophobizität zu senken. Neben der Wasserlöslichkeit stellt die Interaktion des Farbstoffes mit der Lipiddoppelschicht, welche möglichst gering sein sollte, um ein niedriges Hintergrundsignal zu erhalten, ein entscheidendes Auswahlkriterium dar. Der Vergleich von 32 verschiedenen Farbstoffen aus einer Studie im Jahr 2014 zeigt eine höchste Interaktion von BODIPY (Faktor 90) mit der synthetischen Lipiddoppelschicht, während für Sulfo-Cy5 und Carboxyfluorescein (FAM) ein geringer Membran-Interaktions-Faktor (0,3 für Sulfo-Cy5 und 0,03 für FAM) bestimmt

wurde³⁷⁰. In dieser Studie wurde eine Lipiddoppelschicht bestehend aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin im Verhältnis von 9:1 verwendet, welche wie im Abschnitt 4.2 beschrieben ähnlich zu der Zusammensetzung der mikrosomalen Membran ist. Im Vergleich zum hydrophoben DyLight-Phosphin konnte eine reduzierte unspezifische Markierung der mikrosomalen Membran durch die Farbstoffe Cy5 und 6-FAM detektiert werden (Abb. 20 und 21). Durch diese Beobachtung wird das Ergebnis eines geringeren Membran-Interaktions-Faktors für diese beiden Farbstoffe unterstützt. Zusätzlich konnte ein klarer Unterschied zwischen der nicht-markierten Probe und dem markierten Adora2a bestimmt werden (Abb. 20 und 21), sodass sich diese beiden Farbstoffe für die Markierung eines Zielproteins integriert in mikrosomalen Membranen in einem eukaryotischen System eignen.

Im Folgenden wurden die etablierten Markierungsreaktionen auf zwei pharmazeutisch relevante Proteine angewandt, um am Beispiel des EPOs eine Proteinmodifikation durchzuführen und am Beispiel des Adora2as eine strukturelle Veränderung nach Ligandbindung zu zeigen.

Zu Beginn wurde, wie für den Adora2a durchgeführt, die Adressierbarkeit des Amber-Stopcodons mit AzF und pPa analysiert (Abb. 22A und B). Da kein C-terminales Reporterprotein vorlag, konnte die Einbaueffizienz nur anhand des Autoradiogramms abgeschätzt werden. Zusätzlich wird die Abschätzung der Einbaueffizienz durch die Glykosylierung des Terminationsproduktes erschwert, da sich das Amber-Stopcodon *downstream* zu den drei Codons befindet, welche für die N-Glykosylierungen tragende Asparagine codieren. Dies fällt besonders im Vergleich der In-Gel-Fluoreszenz zum Autoradiogramm beim Einbau von AzF auf. Während in der In-Gel-Fluoreszenz vier definierte Banden (markiertes nicht-glykosyliertes Vollängenprodukt und drei markierte unterschiedlich glykosylierte Vollängenprodukte) zu erkennen sind, erscheinen die Banden im Autoradiogramm undefiniert und sind schwerer voneinander zu differenzieren. Bei einem erfolgreichen Einbau der nkAs resultiert der durchgeführte PNGase F Verdau in zwei Produkten: dem unglykosylierten Terminationsprodukt und dem unglykosylierten Vollängenprodukt. Diese beiden Banden zeigen beim Einbau von AzF eine vergleichbare Intensität, sodass die Einbaueffizienz von AzF vermutlich im Bereich von 50 % liegt. Wird die Synthese in Abwesenheit der nkAs durchgeführt, ist nach dem PNGase F-Verdau lediglich das unglykosylierte Terminationsprodukt zu erkennen. Wird pPa für die Amber-Suppression eingesetzt, zeigt die In-Gel-Fluoreszenz ein vergleichbares Ergebnis. Im Autoradiogramm sind jedoch definierte Banden zu erkennen und die unglykosylierte Terminationsbande ist weniger intensiv als bei dem Einbau von AzF, sodass die Einbaueffizienz von pPa höher erscheint und bei ca. 80 % liegt. Damit zeigt sich im Vergleich zum Modellprotein Adora2a eine doppelt so hohe Einbaueffizienz für AzF und eine vergleichbare Einbaueffizienz für pPa. Es wird also deutlich, dass die Einbaueffizienz neben den bereits in Abschnitt 4.3 beschriebenen Effekten vom Protein abhängig sein kann. Wie in der Einleitung beschrieben kann sich das Glykosylierungsmuster von EPO stark in der Zusammensetzung unterscheiden, wodurch ebenfalls die Bioaktivität und die Halbwertszeit von EPO beeinflusst werden kann³⁷¹. Anhand der durchgeführten Analysen in dieser Arbeit wurden heterogene Glykosylierungsmuster des zellfrei synthetisierten EPOs aufgrund einer unterschiedlichen Adressierung der N-Glykosylierungsstellen detektiert. Eine zusätzliche detaillierte massenspektrometrische Analyse der Glykosylierungsmuster zeigte eine unterschiedlich auftretende Glykanzusammensetzung bestehend aus zwei N-Acetylglycosaminen und fünf bis acht Mannoseresten (HexNac₂(Man)₅₋₈) auf²⁵². Aufgrund der weniger ausgeprägten Komplexität der Glykosylierung liegt im Vergleich zu in Säugetierzelllinien produzierten EPO eine niedrigere Heterogenität im Glykosylierungsmuster vor³⁷². Ein Nachteil des reduzierten und veränderten

Glykosylierungsmusters kann zum einen die Beeinflussung von Proteineigenschaften sein und zum anderen eine erhöhte Immunogenität. Dieser Effekt ist zum Beispiel für die in Insektenzellen vorkommende α 1,3-verknüpfte Fucose bekannt³⁷³. Aus diesem Grund wird versucht eine homogene Glykosylierung an das Protein durch enzymatische oder synthetische Methoden zu koppeln oder die Glykosylierungen durch Polymere, wie es in der vorliegenden Arbeit getan wurde, zu ersetzen. In diesem Zusammenhang haben sich PEG-Gruppen als biokompatibles Polymer erwiesen, pharmakokinetische Eigenschaften wie Löslichkeit, Stabilität, Halbwertszeit und Anfälligkeit für einen proteolytischen Abbau positiv zu beeinflussen³⁷⁴. Diese Aussage trifft ebenfalls auf die PEGylierung von EPO zu²⁰⁴. Die Einführung einer kurzen PEG-Kette (1,5- 4 kDa) an jeweils einer N-Glykosylierungsstelle des ansonsten unglykosylierten EPOs resultierte in einer drastischen Zunahme der Löslichkeit, Stabilität und Aktivität. Besonders durch die Kopplung von längeren PEG-Ketten (4 kDa) konnte eine vergleichbare, zum Teil sogar höhere biologische Aktivität im Vergleich zum CHO produzierten EPO erreicht werden²⁰⁴. Aufgrund der hohen Einbaueffizienz des pPas wurde diese nkAs im Weiteren zur Kopplung eines Azid-modifizierten PEGs genutzt (Abb. 22B). Da die Ausbildung von N-Glykosylierungen keinen Einfluss auf die globale und lokale Struktur des Proteins hat³⁷⁵, sollte eine gleiche Kopplungseffizienz des PEGs an die unterschiedlich stark glykosylierten EPO-Varianten angenommen werden können. Trotz dessen wurde nur eine zusätzliche definierte Bande auf der Höhe von 49 kDa detektiert, welche dem dreifach glykosylierten und PEGylierten EPO zugeordnet werden kann. Die Bereiche zwischen 14 und 38 kDa zeigten im Vergleich zum nicht-PEGylierten EPO keinen Unterschied, sodass scheinbar eine stärkere PEGylierung des dreifach-glykosylierten EPOs vorlag. Eine Erklärung könnte die erhöhte Stabilität des EPOs durch die Glykosylierungen sein, welche den möglichen Einfluss der CuAAC kompensiert. Dabei könnten zwei Effekte der CuAAC die Stabilität des EPOs reduzieren. Zum einen wird durch die Anwesenheit von 5 mM NaAsc eine reduzierende Umgebung geschaffen, wodurch die Disulfidbrücken des EPOs gelöst werden könnten und die Stabilität des EPOs reduziert wird³⁷⁶. Zum anderen könnte das eingesetzte Kupfersulfat nicht vollständig durch das NaAsc reduziert werden und somit seinen oxidierenden Charakter beibehalten³⁷⁷. So resultiert die Oxidierung von Tryptophanen in EPO in einem Funktionalitätsverlust aufgrund von einer instabilen Struktur³⁷⁸. Dieser Effekt wurde besonders bei einem nicht-glykosylierten EPO festgestellt, während auch hier die Glykosylierungen einen stabilisierenden Effekt zeigten. Es kann angenommen werden, dass der beschriebene stabilisierende Effekt ebenfalls durch länger-kettige PEGs erhöht werden kann, da in der erwähnten Studie die gekoppelten PEGs lediglich einen Anteil von 7-17 % des gesamten Molekulargewichtes von EPO besitzen, während die natürliche Glykosylierung zirka einen Anteil von 40 % des Gesamtmolekulargewichtes ausmacht. Um diese Aussage zu unterstützen kann das zellfrei hergestellte PEGylierte EPO isoliert werden und der positive Effekt mittels einer wachstumsabhängigen Zelllinie untersucht werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde bereits gezeigt, dass der Einbau der nkAs pPa und AzF keine Veränderung in der biologischen Aktivität von EPO hervorrief²⁵². Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von EPO mit definierten Glykosylierungen kann durch die Verwendung einer glyko-optimierten *E. coli*-Zelllinie realisiert werden. Im entstandenen Lysat konnten N-Glykosylierungen durch die Integration von Oligosaccharyltransferasen und Lipid-verlinkte Oligosaccharide ermöglicht werden³⁷⁹.

Neben der Modifikation von Proteinen zur Verbesserung ihrer biochemischen Eigenschaften können durch die positionsspezifische Einbringung von Fluoreszenzfarbstoffen, inter- oder intramolekulare Proteininteraktionen analysiert werden. Dies wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Modellprotein Adora2a-Nluc durchgeführt. Aufgrund des negativen

Einflusses der CuAAC auf die Nluc-Aktivität und des geringen Einbaus des AzF wurde für die Fluoreszenzmarkierung die mit einem Lysin-BODIPY-TMR vorbeladene tRNA eingesetzt. Da für BODIPY (BP) ein hoher Membraninteraktionsfaktor bestimmt wurde³⁷⁰, wurde zuerst eine mögliche unspezifische Interaktion zwischen der Nluc und dem mit der Membran interagierenden Farbstoff, welcher sich in räumlicher Nähe zur Nluc befinden könnte, bestimmt (Abb. 23). Die Kombination aus dem Vollängenprotein mit C-terminaler Nluc und dem BP-CUA, welches weder statistisch noch positionsspezifisch an Adora2a-Nluc gekoppelt werden sollte, resultierte in einem 33%igen Signal im Vergleich zu der Kombination aus Adora2a_amb-Nluc und BP-CUA. Dieses Ergebnis deutet auf eine geringe unspezifische Interaktion zwischen dem nicht gekoppelten Farbstoff und der Nluc hin (Abb. 24). Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde ein BRET-Assay etabliert, um die ligandabhängige, strukturelle Änderung des Adora2a zu analysieren. Im Vergleich zu einem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), der zwischen zwei Fluorophoren stattfindet, zeichnet sich der BRET-Assay zwischen Luziferase und Fluorophor durch einige Vorteile aus. Durch die unterschiedliche Aktivierung des Donors (Oxidation des Substrates Furimazin) im Vergleich zum Akzeptor (Anregung durch Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm) entsteht keine zeitgleiche Anregung beider Interaktionspartner. Zusätzlich besteht im Vergleich zu einem FRET ein geringerer Photobleaching-Effekt, da der Donor nicht über Licht angeregt wird. Ebenfalls unterscheiden sich BRET- und FRET-Assays in ihrer Sensitivität. Die Effizienz des Energietransfers reduziert sich mit der sechsten Potenz des Abstandes beider Interaktionspartner. Durch die höhere Energie der Emission der Nluc im Vergleich zur Emission eines Fluorophors können bei einem BRET-Assay Strukturänderungen im Bereich von 3,8-11,3 nm³⁸⁰ detektiert werden, während bei einem FRET-Assay Abstände zwischen 2,4 und 7,2 nm³⁸⁰ zu einer Signalveränderung führen. Für den Klasse A GPCR β_2 -adrenergischer Rezeptor wurde z. B. eine Distanz zwischen dem dritten intrazellulären Loop und dem C-Terminus mit 89 Aminosäuren von 6,2 nm (62 Å) bestimmt³⁸¹, sodass ein BRET-basierter Assay ein besseres detektierbares Signal gibt. Der C-Terminus des Adora2as ist mit 120 Aminosäuren im Vergleich zu anderen Klasse A GPCRs besonders ausgeprägt. Aufgrund der nicht bekannten Struktur des C-Terminus (Deletion ab Aminosäure 318)¹⁹¹ und einer möglichen Entfernung zum dritten intrazellulären Loop von mehr als 11 nm, wurde für die Durchführung des BRET-Assays eine verkürzte Variante mit 49 Aminosäuren des C-Terminus verwendet (Deletion ab Aminosäure 341)¹⁹⁴. Um einen genaueren Einblick in die strukturellen Veränderungen des Adora2as nach der Bindung des Adenosins zu erhalten, wird dieser Ablauf im Folgenden beschrieben. Das Xanthin des Adenosins interagiert mit dem Adora2a über Van-der-Waals-Kräfte zu den Aminosäuren Methionin 177 in TM5, sowie Methionin 270 und Isoleucin 274 in TM7. Zusätzlich entsteht eine π - π -Wechselwirkung mit dem Phenylalanin 168 im extrazellulären Bereich 2 und eine Wasserstoffbrücke zu Asparagin 253 in TM6. Die Ribose des Adenosins interagiert über Van-der-Waals-Kräfte mit Aminosäuren in TM3 (Valin 84, Leucin 85, Threonin 88) und TM6 (Tryptophan 246 und Leucin 249). Die Wasserstoffbrückenbindungen zu Serin 277 und Histidin 278 sowie in den extrazellulären Bereichen 2 (Glutaminsäure 169) und 3 (Histidin 264) stabilisieren die Bindung des Adenosins und schließen die Bindungstasche³⁸². Durch den Agonisten werden Konformationsänderungen hauptsächlich in der Ligand-Bindungstasche sowie in der intrazellulären Seite des Rezeptors ausgelöst. Um die Bindung des Adenosins zu ermöglichen, ist eine Rotation der TM3 um seine Achse um zwei Å nötig, um eine sterische Hinderung des Agonisten mit V84 und L85 zu vermeiden. Zusätzlich dreht sich TM5 um vier Å in Richtung des Rezeptorkerns³⁸³. Durch die strukturellen Änderungen in der intrazellulären Domäne wird die Kopplung des G-Proteins vorbereitet⁶². Dabei rotieren die cytoplasmatischen Enden von TM5 und TM6 seitlich nach außen um sieben bzw. fünf Å, sowie von TM7 um vier Å nach

innen^{193,383}. Durch die Rotation der TM6 wird die für inaktive Rezeptoren bekannte „*ionic lock*“ zwischen Arginin 102 und Glutaminsäure 228 gelöst und der Rezeptor kann in eine aktive Konformation wechseln. Durch die Veränderung der Position der Interaktionspartner im dritten extrazellulären Bereich und im C-Terminus zueinander und der Sensitivität des Energietransfers, welcher umgekehrt proportional zu der sechsten Potenz der Entfernung ist, können die beschriebenen strukturellen Bewegungen detektiert werden³⁸⁴. In Abbildung 25 ist eine Erhöhung des BRET-Signals um 10 % in Gegenwart von 100 μM Adenosin zu erkennen. Durch den Einsatz von höheren Adenosinkonzentrationen tritt keine weitere Veränderung auf. Dieses Ergebnis deutet auf eine strukturelle Veränderung des Adora2as hin, sowie auf eine Sättigung der Bindungstaschen des Adora2as bei unter 100 μM Adenosin. Im Gegensatz zum erhaltenen Ergebnis konnte in der Literatur eine Abnahme des BRET-Signals nach Adenosin-Zugabe gezeigt werden, da eine Zunahme der Distanz zwischen dem dritten extrazellulären Bereich und dem C-Terminus nach Ligandbindung angenommen wird¹⁹⁴. Im zitierten Paper ist eine Reduzierung des FRET-Signals um 8 % in Gegenwart von Adenosin ermittelt worden. Der Anstieg des BRET-Signals in dieser Arbeit könnte auf eine veränderte Ausrichtung des C-Terminus aufgrund der fusionierten Nluc zurückzuführen zu sein. Auch wenn die Nluc im Vergleich zu Fluoreszenzproteinen wie YFP und GFP ein geringeres Molekulargewicht aufzeigt, ist eine strukturelle Veränderung des Zielproteins durch die Fusionierung von Reporterproteinen beschrieben³⁸⁵. In dieser Studie wurden YFP und CFP in zufällig ausgewählten Positionen in einen Kaliumkanal integriert und anschließend wurde die Funktionalität des Kanals überprüft. Von den erstellten 55 Konstrukten wurde ein Drittel korrekt in die Plasmamembran integriert und diese zeigten eine zum Wildtyp ähnliche, spannungsabhängige Aktivität. Eine weitere Möglichkeit für das erhaltene BRET-Signal könnte in der Formation von Homodimeren begründet sein. Für den Adora2a ist bekannt, dass zirka 90 % des funktionalen Proteins an der Zelloberfläche als Homodimere vorliegen³⁸⁶. Zusätzlich erfolgt die Dimerbildung unabhängig von der Anwesenheit des kompletten C-Terminus des Rezeptors³⁸⁶. Eine Studie aus dem Jahr 2014, welche sich mit der Vorhersage von möglichen Strukturen der Dimere des Adora2a beschäftigt, errechnet zusätzlich eine Agonist-gebundene Struktur, in welcher sich der extrazelluläre Bereich von Rezeptormolekül A in räumlicher Nähe zum C-Terminus vom Rezeptormolekül B befindet³⁸⁷. Ein Indiz, welcher gegen die Theorie der Dimerbildung spricht, findet sich in der Tatsache, dass die Dimerbildung von der Bindung eines Agonisten nicht beeinflusst wird, sodass in Gegenwart von Adenosin keine Änderung im BRET-Signal zu sehen sein sollte³⁸⁶. Um endgültig ausschließen zu können, dass das erhaltene BRET-Signal aus einer Dimerbildung erfolgt, müsste der Adora2a mit jeweils einer Markierung (Fluoreszenzmarkierung oder C-terminale Nluc) synthetisiert und miteinander vermischt werden. Ergäbe dieses Experiment kein detektierbares BRET-Signal, kann von einer intramolekularen Interaktion zwischen den Markierungen ausgegangen werden. Das hier durchgeführte BRET-Verfahren ist besonders für den Adora2a hoch interessant, da dieser Rezeptor neben Homodimeren ebenfalls Heterodimere ausbildet und aufgrund des langen C-Terminus mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert. Zu diesen Proteinen gehört zum Beispiel der Dopamin-Rezeptor D2, welcher über ein Arginin-reiches Epitop im N-Terminus eine Bindung zu der Phosphatgruppe des Serins 374 im C-Terminus des Adora2a aufbaut³⁸⁸. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls mittels eines FRET-Assays erhalten. Die Relevanz der Interaktion des Dopamin-Rezeptors mit dem Adora2a wird in der Behandlung von Parkinson deutlich. Durch die Identifikation eines selektiven Adora2a Antagonisten konnte die Wirkung von Dopamin-Rezeptor Antagonisten verstärkt werden, wodurch eine Reduktion der Parkinson-Symptome erreicht werden konnte³⁸⁹. Istradefyllin, ein Analogon des Koffeins, befindet sich aktuell in Phase-III-Studien und ist zum Beispiel in Japan seit 2013 zugelassen.

Neben der bekannten Interaktion mit dem Dopamin-Rezeptor ist der Effekt der Bindung von α -Actinin an den C-Terminus des Adora2a nicht gänzlich geklärt. Neuere Studien zeigen in diesem Zusammenhang einen alternativen Mechanismus zur Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors³⁹⁰. Durch die Bindung des Agonisten wird normalerweise die aktive Konformation des Rezeptors stabilisiert, welche von GPCR-Kinasen erkannt wird und in der Phosphorylierung von gruppierten Serin- und Threonin-Resten resultiert. Der N-Terminus von β -Arrestin 1 und 2 enthält einen Phosphat-Sensor, wodurch eine Bindung des Arrestins an den phosphorylierten Bereich erfolgt. Durch die Bindung wird der C-Terminus des Arrestins exponiert, wodurch Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose rekrutiert werden³⁹¹. Dieser Vorgang scheint beim Adora2a darüber hinaus durch das gebundene α -Actinin und durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst zu werden. Bei einer geringen Kalziumkonzentration könnte der Adora2a über die Bindung des α -Actinins an den C-Terminus an das Aktin-Cytoskelett gekoppelt sein. Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration könnte die Bindung des α -Actinin durch Calmodulin abgelöst werden, wodurch der Rezeptor vom Aktin-Cytoskelett entkoppelt wird. Durch diesen Vorgang könnte die Agonist-induzierte Internalisierung verhindert werden³⁹⁰. Die genaue Interaktion ist jedoch nicht bekannt, da die Internalisierung *in vivo* meistens nur begrenzt visualisiert werden kann¹⁸⁶. Für diesen Zweck könnte ebenfalls ein FRET oder BRET-Assay etabliert werden, der die Interaktion der beteiligten Partner darstellt. So könnte über eine nkAs eine Fluoreszenzmarkierung in den C-Terminus des Adora2a integriert werden, der bei räumlicher Nähe einen zweiten Fluorophor, z. B. im α -Actinin, anregt oder durch eine Luziferase, z. B. fusioniert an das Calmodulin, angeregt wird. Aufgrund der Kalziumkonzentration-abhängigen Konkurrenz des α -Actinins und des Calmodulins sollte je nach Bindungspartner ein definiertes Signal detektiert werden können.

4.5. Etablierung des *PyIRS-AF/tRNAPylCUA*-Paares im zellfreien CHO-System

Die größte Limitierung des *EcTyrRS/EctRNA*-Paares besteht in den möglichen Kopplungsreaktionen zu den eingebauten Alkin- bzw. Azid-Phenylalanin-Derivaten. Die Reaktion des Azides mit einer Phosphingruppe weist langsame Reaktionskinetiken auf und ist anfällig für eine Oxidierung³⁹². Im Gegensatz dazu zeichnet sich die Reaktion des Alkins mit einem Azid durch eine 10^7 -fach höhere Reaktionsgeschwindigkeit aus. Aufgrund des eingesetzten Kupfers als Katalysator kann diese Reaktion einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Zielproteins ausüben²²⁷. Dies wurde ebenfalls bei der Fluoreszenzmarkierung des Adora2a-Nluc-Konstruktes beobachtet. Während eine minimale Kupferkonzentration von 50 μ M benötigt wurde, um eine Fluoreszenzbande des Adora2a-Nluc detektieren zu können, wurde die Nluc-Aktivität bei dieser Kupferkonzentration bereits um 50 % reduziert (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde ein alternatives Markierungssystem auf Basis der Pyrrolysin-Synthetase etabliert, da für diese Synthetase bereits gezeigt werden konnte, dass mehr als 100 verschiedene nkAs als Substrate genutzt werden können²²⁴. Zu diesen Substraten gehören zyklische Alkin-Verbindungen wie Cyclooctin-Lysin (SCO) oder Transcycloocten-Lysin (TCO), welche in einer kupferfreien Klickreaktion mit Aziden oder Tetrazine reagieren können³⁹³. Diese hohe Substratazeptanz ist auf die Interaktion der *MmPylRS* mit ihrem endogenen Substrat, dem Pyrrolysin zurückzuführen. Die Erkennung des Pyrrolysin erfolgt über eine stark hydrophobe Bindungstasche im Enzym, welche im Vergleich zu anderen Synthetasen sehr stark ausgedehnt ist, da ebenfalls die lange Seitenkette des Pyrrolysin in das aktive Zentrum der Synthetase integriert wird²²⁵. Die Seitenkette des Pyrrolysin bildet weiterhin zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Asparagin 346 und zum Tyrosin 384 aus. Besonders das Tyrosin an Position 384 ist von Interesse, da diese

Aminosäure in Abwesenheit von Pyrrolysin in einem unstrukturierten Bereich vorliegt, welcher sich in Gegenwart des Pyrrolysin zu einer Art Deckel umstrukturiert²²⁵. Da das Tyrosin 384 nicht für die katalytische Aktivität der Synthetase essentiell ist, konnte durch den Austausch dieser Aminosäure zu Phenylalanin eine erhöhte Aminoacylierungseffizienz erreicht werden³⁹⁴. Ein ähnlicher Effekt ist für das Tyrosin an Position 306 beschrieben, welches ebenfalls in der Erkennung der Seitenkette des Pyrrolysin involviert ist³⁹⁴. Durch den Austausch von Alanin bzw. Phenylalanin an den beiden erwähnten Aminosäuren, konnte eine Pyrrolysin-Synthetase generiert werden, welche eine hohe katalytische Aktivität ausweist, größere Seitenketten am Lysin akzeptiert und deshalb für die Etablierung eines orthogonalen Systems im zellfreien CHO-System ausgewählt wurde²⁰. Im Allgemeinen lässt sich die Pyrrolysin-Synthetase in eine N-terminale (NTD) und eine C-terminale Domäne (CTD) unterteilen, welche über einen variablen Linker miteinander verbunden sind. Während die CTD die Aminoacylierung der tRNAPylCUA katalysiert, wirkt die NTD unterstützend in der tRNA-Bindung. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die CTD unabhängig von der NTD eine Aminoacylierung ermöglicht. Im lebenden Organismus ist dies jedoch nicht möglich³⁹⁵. Zusätzlich ist bekannt, dass die NTD leicht aggregiert, wodurch das gesamte Enzym als unlösliches Aggregat vorliegen kann³⁹⁶. Dies spiegelt sich ebenfalls in der zellfreien Synthese der PylRS-AF im zellfreien CHO- und *E. coli*- System wieder (Abb. 27). In diesen Systemen liegt der lösliche Anteil unter 30 %. Zusätzlich ist besonders im *E. coli*-System eine Bande unterhalb der 49 kDa Markerbande zu erkennen. Bei dieser Bande könnte es sich um die CTD handeln, welche ein geschätztes Molekulargewicht von ca. 40 kDa haben sollte. Für manche Bakterien und Archaeen ist zum Beispiel bekannt, dass die Expression der PylRS-Untereinheiten durch zwei verschiedene Gene erfolgt, wodurch die Untereinheiten separiert vorliegen^{395,397}. Zusätzlich scheinen im Linker zwischen der NTD und CTD verschiedene Terminationspunkte vorzuliegen, wodurch ebenfalls eine Spaltung des Enzyms in beide Untereinheiten erfolgen kann³⁹⁸. Durch die erwähnte Aggregation der *MmPylRS* wurde die Kristallstruktur der NTD erst im vergangenen Jahr gelöst³⁹⁸. Die Kristallstruktur zeigt, dass die NTD in eine kompakte Proteinkugel faltet und durch ein Zink-Ion stabilisiert wird, eine Struktur, die einzigartig unter den Synthetasen ist. Außerdem bildet die NTD intensive Kontakte zur Wölbung des T-Loops und dem variablen Loop der tRNA aus. Da die tRNAPylCUA im Vergleich zu anderen tRNAs einen minimierten variablen Loop besitzt, ist diese Interaktion nicht mit anderen endogenen tRNAs möglich, wodurch die Spezifität zu tRNAPylCUA gewährleistet wird³⁹⁸. Aufgrund des offenen Charakters eines zellfreien Systems könnte die Synthese der PylRS-AF in Gegenwart der tRNAPylCUA durchgeführt werden, um eine Stabilisierung der NTD zu erreichen, die aufgrund der optimierten Bindung zur tRNAPylCUA in einem aktivierten und löslicheren Enzym resultieren könnte. Eine direkte Zugabe von Zink-Ionen während der zellfreien Herstellung der PylRS-AF könnte in einem Einbruch der Synthese resultieren, da die Zink-Ionen von, im Lysat vorhandenen, EGTA komplexiert werden könnten. Dies hätte den Effekt, dass ein Teil der ursprünglich komplexierten Kalzium-Ionen frei werden, wodurch eine Aktivierung der *S7 Micrococcal* Nuklease resultieren könnte und in einem Verdau der PylRS-AF mRNA enden würde. Als Alternative wäre eine Inkubation mit Zink nach der zellfreien Synthese der PylRS-AF denkbar. Dies könnte besonders für eine Synthese der PylRS-AF im zellfreien CHO-System interessant sein. Die PylRS_{CHO} zeigt die höchste Aktivität, aber leider auch den höchsten Anteil an aggregierter Synthetase (Abb. 27 und 28). Durch die Erhöhung der Löslichkeit könnte eine höhere Konzentration als die eingesetzten 0,23 µM aktiver Synthetase erzielt werden, wodurch die Einbaueffizienz gesteigert werden könnte. Im Zusammenhang mit der Stabilitätserhöhung der NTD könnten in diesem Bereich ebenfalls Mutationen eingeführt werden. Eine aktuelle Publikation zeigt, dass

die Einführung von drei Mutationen (R19H/H29R/T122S) in die NTD der *MmPylRS* eine erhöhte Bindung der tRNAPylCUA bewirkt³⁹⁹. Da die Bindung der tRNA durch die NTD unabhängig von der Aminoacylierung durch die CTD erfolgt, könnten diese Mutationen in sämtliche PylRS-Varianten eingeführt werden, so auch in der in dieser Arbeit verwendeten PylRS-AF. Alternativ könnte eine kürzlich entdeckte PylRS aus *Methanomethylophilus alvus* verwendet werden. Das Besondere an dieser Synthetase ist die fehlende NTD, während die katalytische Domäne homolog zur *MmPylRS* ist, so dass die bekannten Mutation auf die neu entdeckte Synthetase übertragen werden können⁴⁰⁰. Die Übertragbarkeit des Einbaus von großen Aminosäuren, wie SCO und TCO muss jedoch für diese Synthetasevariante gezeigt werden. Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Suppressionseffizienz sind bereits in Abschnitt 4.3 ausführlich beschrieben worden, weshalb in diesem Abschnitt nur auf besondere Mechanismen des tRNAPylCUA/PylRS-AF-Paares eingegangen wird. Die Sekundärstruktur der tRNAPylCUA unterscheidet sich stark im Vergleich zu kanonischen tRNAs. Eine ähnliche Struktur ist nur von der mitochondrialen tRNASerUGA bekannt⁴⁰¹. Da sich die mitochondriale Translationsmaschinerie von der zytosolischen unterscheidet⁴⁰², kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Art von tRNA nicht vollständig kompatibel zu der zytosolischen Translationsmaschinerie ist. Zusätzlich könnte eine erhöhte Instabilität der tRNA im Zytosol auftreten⁴⁰³. Darüber hinaus zeigt ein Vergleich zwischen der bakteriellen aminoacyl-tRNAPhe und der Aminoacyl-tRNAPyl aus Archaeen, dass der bakterielle Elongationsfaktor Tu eine 25fach höhere Affinität zur endogenen tRNA besitzt⁴⁰⁴. Aus diesem Grund wurde eine optimierte, an die humane Translationsmaschinerie angepasste, tRNAPylCUA erstellt. Besonders durch den Austausch von Watson-Crick-Paarungen zwischen Adenin und Uracil zu konservierten Cytosin-Guanin-Paarungen an den Positionen 11:24 und 19:56, sowie an Position 15, konnte ein positiver Einfluss auf die Einbaueffizienz der nkAs beobachtet werden. Durch die Implementation der Guanin-Cytosin-Paarung (19:56) zwischen dem D- und T-Loop der tRNA wird wahrscheinlich eine erhöhte Stabilität der tRNA hervorgerufen. Zusätzlich scheint sich eine Veränderung in der Paarung des Akzeptor-Stamms und des T-Arm (C7:G66) auf die Interaktion mit den humanen Elongationsfaktoren auszuwirken. Da diese Interaktion darüber hinaus von der aminoacylierten Aminosäure abhängig ist, muss die C7:G66-Paarung individuell an die nkAs angepasst werden^{403,405}.

Die in dieser Arbeit erhaltene Suppressionseffizienz von 24 % ist vergleichbar mit den Suppressionseffizienzen aus einer Studie aus dem vergangenen Jahr³⁴⁷. In dieser Studie wurde die Einbaueffizienz von verschiedenen nkAs durch die *MmPylRS* *in vivo* analysiert. Je nach eingesetzter nkAs variierten die Einbaueffizienzen zwischen 4 und 22,5 %. Die maximale Einbaueffizienz von 22,5 % wurde durch den Einsatz eines Bicyclo[6.1.0]-nonyn-Lysins (BCN) erreicht. Bei diesem Lysin-Derivat handelt es sich ebenfalls um eine Acht-Ring-Struktur, die ähnlich zu dem hier verwendeten SCO ist. Der Einsatz der *MmPylRS* in zellfreien Systemen ist bisher nur in *E. coli*-basierten Reaktionen beschrieben. Cui et al. versuchten ebenfalls komplexe nkAs wie SCO, BCN und TCO mit Hilfe von verschiedenen PylRS-Varianten in ihr Zielprotein zu integrieren, konnten eine Suppressionseffizienz von 5 % jedoch nicht überschreiten⁴⁰⁶. Um das Problem der Herstellung und besonders der Isolierung der relativ instabilen und unlöslichen PylRS zu umgehen, integrierten Chemla et al. bereits 2015 die genetische Information für die tRNA und die Synthese in verschiedene *E. coli*-Stämme. Die hergestellten Lysate enthielten daraufhin die funktionelle *Methanocaldococcus jannaschii* PylRS und die zugehörige tRNA⁴⁰⁷. Durch das zusätzliche Entfernen des RF1, sowie durch den Austausch sämtlicher endogen vorkommender Amber-Stopcodons wurde eine beinahe 100%ige Suppressionseffizienz erreicht. Weiterhin kann die problematische Herstellung der PylRS durch eine Co-Expression des Zielproteins und der PylRS umgangen werden. Dies

wurde erstmalig in diesem Jahr in einem zellfreien *E. coli*-System im Dialysemodus gezeigt⁴⁰⁸. In dieser Studie konnten zehn verschiedene nkAs, darunter ebenfalls komplexe Acht-Ring-Lysin-Derivate mit Hilfe der PylRS-AF in ein Fettsäure-bindendes Protein integriert werden. Das angesprochene System enthielt ebenfalls ein RF1-abgereichertes Lysat. Die erfolgreiche Co-Expression von aktiver PylRS-AF mit dem SCO-modifizierten Adora2a-Nluc in einem eukaryotischen zellfreien System wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt (Abb. 30). Im Gegensatz zu Gerrits et al wurde ein zeitversetzter Zusatz der Plasmide für die Co-Expression der PylRS-AF und des Adora2a-Nluc gewählt. Eine optimale Synthese des Vollängenproteins wurde durch eine spätere Zugabe des Adora2a-Nluc-Plasmides nach 30 min (Batch-System) bzw. 120 min (Dialyse-System) beobachtet. In Gerrits et al. wurden beide Plasmide zeitgleich eingesetzt und das PylRS-Plasmid lag in einer geringeren Konzentration (3 nM) als der jeweilige Reportervektor (5 nM) vor. Dies könnte auf ein unterschiedliches Translationsverhalten zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen zurückzuführen sein. Während in Eukaryoten die Elongationsgeschwindigkeit während der Translation bei drei bis acht Aminosäuren pro Sekunde liegt, ist diese mit 10 bis 20 Aminosäuren pro Sekunde in *E. coli* wesentlich höher⁹⁶. Zusätzlich wird im CHO-Dialysesystem in der Reaktionskammer eine erhöhte Magnesiumkonzentration supplementiert, wodurch die Transkriptionsreaktion bevorzugt abläuft^{14,163}. Die Translation wird erst nach der Diffusion der Magnesium-Ionen in die Versorgungskammer bevorzugt. Das bedeutet, dass die Syntheserate der PylRS-AF im *E. coli*-basierten zellfreien System früher einen steigenden Verlauf annimmt, als im eukaryotischen zellfreien System und somit im CHO-System eine längere Anfangszeit benötigt wird, um die aktive PylRS-AF zu synthetisieren. Nichtsdestotrotz zeigt die PylRS_{CHO} im zellfreien CHO-System eine höhere Aktivität als die isolierte PylRS_{*E. coli*} (Abb. 29). Dies wird besonders deutlich in der Fluoreszenzmarkierung mit Tetrazin-Cy5. Da die Reaktion zwischen dem Tetrazin und dem Cyclooctin zum einen kupferfrei und zum anderen mit einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit abläuft, ist die *Strain-Promoted* Alkyne-Azide Cycloaddition (SPAAC) heutzutage ein der bevorzugtesten Klickreaktion für bioorthogonale Markierungen *in vivo*⁴⁰⁹, welche in der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung des tRNAPylCUA/PylRS-AF-Paares nun auch in einem eukaryotischen zellfreien System angewandt werden kann. Zusätzlich wird durch die direkte Zugabe des Überstandes einer vorgehenden Synthese der PylRS-AF sowie durch die Co-Expression eine aufwendige Isolation des Enzyms mit einem möglichen Aktivitätsverlust umgangen, sodass das hier vorgestellte System ebenfalls für ungeübte Anwender geeignet ist. Durch die Flexibilität der PylRS können weiterhin nicht nur Einzel-Markierungen, sondern auch Mehrfach-Markierungen in das Zielprotein integriert werden. Durch die einzigartige Interaktion der *Mm*PylRS mit ihrer kognitiven tRNA, in welcher das tRNA-Anticodon nicht involviert ist⁴¹⁰, kann das Anticodon so verändert werden, dass ein zweites Stopcodon adressiert werden kann (Wan Russell Liu 2010). Durch den parallelen Einsatz der hier dargestellten orthogonalen *Ec*TyrRS/*Ect*RNA- und tRNAPylCUA/PylRS-AF-Paare, könnten zwei nkAs mit unterschiedlichen Reaktivitäten sowohl am Amber-Stopcodon als auch am Ochre- oder Opal-Stopcodon simultan in einem Protein integriert werden. Durch die positionsspezifische duale Fluoreszenzmarkierung wird der Grundstein für die Entwicklung von neuen Systemen für die Durchführung von Interaktionsstudien zum Beispiel mit Hilfe des beschriebenen BRET-Assays gelegt. Dies ist besonders Interessant in Bezug auf das anfangs erwähnte Hochdurchsatzverfahren. Ähnlich zu dem in der Arbeit konstruierten, fluoreszenzmarkierten Adora2a-Nluc könnten weitere Biosensoren auf Basis von therapeutisch relevanten Proteinen erstellt werden, mit denen neue Interaktionspartner und Wirkstoffe hochparallelisiert identifiziert werden könnten. Wie in der Arbeit aufgezeigt, sind besonders zellfreie

Proteinsynthesysteme für die Erstellung solcher Biosensoren prädestiniert, da aufgrund des offenen Charakters eine gezielte Modifikation des zu untersuchenden Proteins in wenigen Stunden erreicht werden kann.

5. Fazit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Etablierung von Fluoreszenzmarkierungen und Modifizierungen von komplexen Proteinen in zellfreien Sf21- und CHO-Systemen. Als offenes System können während der Translation exogene Komponenten integriert, sowie Syntheseparameter individuell auf jedes Protein angepasst werden. Durch die Implementation von fluoreszenzmarkierten Aptamern in zellfreien Systemen können die grundlegenden Prozesse der Transkription und Translation visualisiert werden, wodurch an das Protein optimal adaptierte Reaktionsbedingungen geschaffen werden könnten. Zusätzlich kann dieses Prinzip genutzt werden, um kontrollierbare Parameter während der zellfreien Proteinsynthese zu generieren, wodurch eine standardisierbare Proteinproduktion im Hochdurchsatzverfahren etabliert werden könnte. Die prinzipielle Funktionalität eines ATP-bindenden Aptamers im zellfreien Sf21-System wurde in dieser Arbeit gezeigt. Die spezifische Bindung des Aptamers an ATP konnte trotz der Anwesenheit von verschiedensten Komponenten im zellfreien System wie Translationsfaktoren, tRNAs, Synthetasen, Ribosomen oder lipidische Bestandteile detektiert werden.

Neben der Visualisierung von spezifischen Parametern können Fluoreszenz-basierte Analysen alternativ zum Einsatz von radioaktivmarkierten Aminosäuren, Liganden oder allgemein Interaktionspartnern genutzt werden. In diesem Zusammenhang konnte der Endothelin-B-Rezeptor mit Hilfe einer vorgeladenen tRNA, welche chemisch an eine fluoreszenzmarkierte Aminosäure gekoppelt ist, statistisch modifiziert werden. Der Vergleich aus Autoradiographie und In-Gel-Fluoreszenz zeigt deutlich eine höhere Sensitivität bei der fluoreszenzmarkierten Probe.

Aufgrund der höheren Sensitivität eignen sich fluoreszenzmarkierte Proben besonders für die Durchführung von Interaktionsstudien. Für diesen Zweck wird im Gegensatz zu der bisher statistisch eingeführten Markierung eine positionsspezifische benötigt. Durch die Nutzung der Amber-Stopcodon-Suppressions-Technologie konnte dieses Vorhaben realisiert werden. In die Gensequenz des Adenosin-Rezeptors A2a wurde an der codierenden Position für Prolin 215 ein Amber-Stopcodon eingeführt, welches in Gegenwart eines orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paares zur Weiterführung der Polypeptidkette mit einer nicht-kanonischen Aminosäure führt. Durch den Einbau von reaktiven Phenylalanin-Derivaten konnte der Adenosin-Rezeptor A2a spezifisch an einer ausgewählten Position fluoreszenzmarkiert werden. Dieser Erfolg kann zukünftig die Grundlage für den Ausbau von Fluoreszenz-basierten Assays genutzt werden, wie es bereits exemplarisch in der vorliegenden Arbeit durch den ligandabhängigen Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer der C-terminalen Nluc zur positionsspezifischen Markierung im Adenosin-Rezeptor A2a dargestellt wurde. Die Kombination eines kleinen Probenvolumens mit einer sensitiven Detektion eignet sich für ein Screening von potenziellen pharmazeutisch relevanten Liganden im Hochdurchsatzverfahren. Hinzu kommt in zellfreien System die Entkopplung von intrazellulären Signaltransduktionswegen, wodurch eine spezifische Analyse von Interaktionen, wie zum Beispiel einer Ligandbindung ohne äußere Einflüsse wie Internalisierung oder *feedback*-Regulation ermöglicht wird.

Eine weitere Anwendung, für die positionsspezifische Modifizierung von Proteinen mittels Amber-Suppression besteht in der Generation von erwünschten Charakteristika. So können neben der Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes, posttranslationale Modifikationen, hydrophobe, polare oder sogar Spin-markierte Komponenten für eine Strukturaufklärung an das Zielprotein fusioniert werden. Die erfolgreiche Kopplung eines vergleichsweise großen

Polymers wie das Polyethylenglykol zur Erhöhung der Stabilität des Hormons Erythropoetin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Zu guter Letzt konnte erstmalig gezeigt werden, dass die modifizierte Pyrrolysin-Synthetase aus *Methanosarcina mazei* für die Etablierung eines orthogonalen Systems in zellfreien Sf21- und CHO-Systemen geeignet ist. Mit Hilfe des orthogonalen Systems konnten komplexe Lysin-Cyclooctin-Derivate in den Adenosin-Rezeptor A2a an einer ausgewählten Position integriert werden. Durch die eingebauten Cyclooctine werden Reaktionen mit hohen Umsetzungskinetiken und einer hohen Biokompatibilität erschlossen. Zusätzlich ist für dieses orthogonale System bekannt, dass mehr als 100 verschiedene nicht-kanonische Aminosäuren in ein Zielprotein eingebaut werden können, wodurch sich das Pyrrolysin-basierte System durch eine sehr hohe Flexibilität auszeichnet und die nicht-kanonische Aminosäure abhängig von der nachgeschalteten Anwendung ausgewählt werden kann.

Zusammenfassend werden durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zur Regulation des Translationsprozesses, sowie der Fluoreszenzmarkierung und Modifizierung von schwer-herstellbaren Proteinen mit verschiedenen orthogonalen Systemen die Potenziale von eukaryotischen zellfreien Systemen erweitert. Die erzielten Ergebnisse können besonders für kontrollierte, reproduzierbare Synthesen von komplexen Proteinen im kleinen und großen Maßstab sowie für Fluoreszenz-basierte Hochdurchsatz-Screenings von therapeutischen Liganden angewandt werden.

6. Referenzen

1. Grisshammer, R. & Tateu, C. G. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Quarterly Reviews of Biophysics* **28**, 315–422; 10.1017/S0033583500003504 (1995).
2. Midgett, C. R. & Madden, D. R. Breaking the bottleneck: Eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies. *Electron Crystallography of Membrane Proteins* **160**, 265–274; 10.1016/j.jsb.2007.07.001 (2007).
3. Bill, R. M. *et al.* Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology* **29**, 335 EP - (2011).
4. Briand, L. *et al.* A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* **6**, 33037 EP - (2016).
5. Vander Heiden, M. G. *et al.* Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 5899–5912; 10.1128/MCB.21.17.5899-5912.2001 (2001).
6. Moriya, H. & Cohen-Fix, O. Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular Biology of the Cell* **26**, 3932–3939; 10.1091/mbc.E15-07-0512 (2015).
7. Katzen, F., Chang, G. & Kudlicki, W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology* **23**, 150–156; 10.1016/j.tibtech.2005.01.003 (2005).
8. Merk, H. *et al.* Biosynthesis of membrane dependent proteins in insect cell lysates: Identification of limiting parameters for folding and processing. *Biological chemistry* **0**; 10.1515/hsz-2015-0105 (2015).
9. Brödel, A. K., Sonnabend, A. & Kubick, S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 25–36; 10.1002/bit.25013 (2013).
10. Sonnabend, A. *et al.* Production of G protein-coupled receptors in an insect-based cell-free system. *Biotechnology and Bioengineering* **114**, 2328–2338; 10.1002/bit.26346 (2017).
11. Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. Cell-Free Protein Synthesis: Applications Come of Age. *Biotechnology advances* **30**, 1185–1194; 10.1016/j.biotechadv.2011.09.016 (2011).
12. Hong, S. H., Kwon, Y.-C. & Jewett, M. C. Non-standard amino acid incorporation into proteins using *Escherichia coli* cell-free protein synthesis. *Frontiers in Chemistry* **2**, 34; 10.3389/fchem.2014.00034 (2014).
13. Tarui, H. *et al.* Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**, 446–453; 10.1007/s002530000534 (2001).
14. Kubick, S. *et al.* in *Cell-Free Protein Expression*, edited by J. R. Swartz (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2003), pp. 209–217.
15. Thoring, L. Dissertation. Technische Universität (2017).
16. Quast, R. B., Clausnitzer, I., Merk, H., Kubick, S. & Gerrits, M. Synthesis and site-directed fluorescence labeling of azido proteins using eukaryotic cell-free orthogonal translation systems. *Analytical Biochemistry* **451**, 4–9; 10.1016/j.ab.2014.01.013 (2014).
17. Quast, R. B. *et al.* Cell-free synthesis of functional human epidermal growth factor receptor: Investigation of ligand-independent dimerization in Sf21 microsomal membranes using non-canonical amino acids. *Scientific Reports* **6**, 34048 EP - (2016).
18. Chin, J. W. *et al.* An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science* **301**, 964; 10.1126/science.1084772 (2003).
19. Takimoto, J. K., Adams, K. L., Xiang, Z. & Wang, L. Improving orthogonal tRNA-synthetase recognition for efficient unnatural amino acid incorporation and application in mammalian cells. *Mol. BioSyst.* **5**, 931–934; 10.1039/B904228H (2009).

20. Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Schultz, C. & Lemke, E. A. Genetically Encoded Copper-Free Click Chemistry. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* **50**, 3878–3881; 10.1002/anie.201008178 (2011).
21. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology* **32**, 992 EP - (2014).
22. Sanchez, S. & Demain, A. Special issue on the production of recombinant proteins. *Biotechnology advances* **30**, 1100–1101; 10.1016/j.biotechadv.2011.12.004 (2012).
23. Jozala, A. F. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**, 51–63; 10.1016/j.bjm.2016.10.007 (2016).
24. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 3240–3244 (1973).
25. Zhang, Y.-H. P., Sun, J. & Ma, Y. Biomanufacturing: history and perspective. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **44**, 773–784; 10.1007/s10295-016-1863-2 (2017).
26. Huang, M., Wang, G., Qin, J., Petranovic, D. & Nielsen, J. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E11025–E11032; 10.1073/pnas.1809921115 (2018).
27. Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E. & Villaverde, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* **8**, 17; 10.1186/1475-2859-8-17 (2009).
28. Overton, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today* **19**, 590–601; 10.1016/j.drudis.2013.11.008 (2014).
29. Yin, J., Li, G., Ren, X. & Herrler, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* **127**, 335–347; 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012 (2007).
30. Itakura, K. *et al.* Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**, 1056; 10.1126/science.412251 (1977).
31. Johnson, I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* **219**, 632; 10.1126/science.6337396 (1983).
32. Sahdev, S., Khattar, S. K. & Saini, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry* **307**, 249–264; 10.1007/s11010-007-9603-6 (2008).
33. Walsh, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today* **15**, 773–780; 10.1016/j.drudis.2010.06.009 (2010).
34. Carrió, M. M. & Villaverde, A. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Bacteriology* **187**, 3599–3601; 10.1128/JB.187.10.3599-3601.2005 (2005).
35. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* **14**, 41; 10.1186/s12934-015-0222-8 (2015).
36. Jurado, P., Lorenzo, V. de & Fernández, L. A. Thioredoxin Fusions Increase Folding of Single Chain Fv Antibodies in the Cytoplasm of *Escherichia coli*: Evidence that Chaperone Activity is the Prime Effect of Thioredoxin. *Journal of Molecular Biology* **357**, 49–61; 10.1016/j.jmb.2005.12.058 (2006).
37. Winter, J., Klappa, P., Freedman, R. B., Lilie, H. & Rudolph, R. Catalytic Activity and Chaperone Function of Human Protein-disulfide Isomerase Are Required for the Efficient Refolding of Proinsulin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 310–317; 10.1074/jbc.M107832200 (2002).
38. Mamat, U. *et al.* Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* **14**, 57; 10.1186/s12934-015-0241-5 (2015).

39. Dullah, E. C. & Ongkudon, C. M. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**, 251–261; 10.3109/07388551.2016.1141393 (2017).
40. Nielsen, K. H. in *Methods in Enzymology : Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A*, edited by J. Lorsch (Academic Press 2014), pp. 133–147.
41. Cregg, J. M. *et al.* in *Methods in Enzymology : Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, edited by R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Academic Press 2009), pp. 169–189.
42. Gnügge, R. & Rudolf, F. Saccharomyces cerevisiae Shuttle vectors. *Yeast* **34**, 205–221; 10.1002/yea.3228 (2017).
43. Wildt, S. & Gerngross, T. U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 119 EP - (2005).
44. Parsaie Nasab, F., Aebi, M., Bernhard, G. & Frey, A. D. A Combined System for Engineering Glycosylation Efficiency and Glycan Structure in Saccharomyces cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 997–1007; 10.1128/AEM.02817-12 (2012).
45. Tang, H. *et al.* N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in Saccharomyces cerevisiae. *Scientific Reports* **6**, 25654; 10.1038/srep25654 (2016).
46. Khan, K. H. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **3**, 257–263; 10.5681/apb.2013.042 (2013).
47. Kim, J. Y., Kim, Y.-G. & Lee, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**, 917–930; 10.1007/s00253-011-3758-5 (2012).
48. Lai, T., Yang, Y. & Ng, K. S. *Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production* (2013).
49. Huang, Y.-M. *et al.* Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Progress* **26**, 1400–1410; 10.1002/btpr.436 (2010).
50. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096; 10.1126/science.1258096 (2014).
51. Grav, L. M. *et al.* One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnology Journal* **10**, 1446–1456; 10.1002/biot.201500027 (2015).
52. Yamane-Ohnuki, N. *et al.* Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 614–622; 10.1002/bit.20151 (2004).
53. Yin, B. *et al.* Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 2343–2351; 10.1002/bit.25650 (2015).
54. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al.* ed. 3. *Protein Structure and Function. Section 3.4, Membrane Proteins.* (New York:, 2000).
55. Almén, M. S., Nordström, K. J. V., Fredriksson, R. & Schiöth, H. B. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biology* **7**, 50; 10.1186/1741-7007-7-50 (2009).
56. Yin, H. & Flynn, A. D. Drugging Membrane Protein Interactions. *Annual review of biomedical engineering* **18**, 51–76; 10.1146/annurev-bioeng-092115-025322 (2016).
57. Furness, S. G. B. & Sexton, P. M. Coding GPCR-G protein specificity. *Cell Research* **27**, 1193 EP - (2017).
58. Zhang, D., Zhao, Q. & Wu, B. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells* **38**, 836–842; 10.14348/molcells.2015.0263 (2015).

59. Rovati, G. E., Capra, V. & Neubig, R. R. The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol Pharmacol* **71**, 959; 10.1124/mol.106.029470 (2007).
60. Olivella, M., Caltabiano, G. & Cordero, A. The role of Cysteine 6.47 in class A GPCRs. *BMC Structural Biology* **13**, 3; 10.1186/1472-6807-13-3 (2013).
61. Fritze, O. *et al.* Role of the conserved NPxxY(x)(5,6)F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2290–2295; 10.1073/pnas.0435715100 (2002).
62. Venkatakrisnan, A. J. *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185 EP - (2013).
63. Hauser, A. S. *et al.* Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* **172**, 41-54.e19; 10.1016/j.cell.2017.11.033 (2017).
64. Graaf, C. de *et al.* Extending the Structural View of Class B GPCRs. *Trends in Biochemical Sciences* **42**, 946–960; 10.1016/j.tibs.2017.10.003 (2017).
65. Møller, T. C., Moreno-Delgado, D., Pin, J.-P. & Kniazeff, J. Class C G protein-coupled receptors: reviving old couples with new partners. *Biophysics Reports* **3**, 57–63; 10.1007/s41048-017-0036-9 (2017).
66. Lin, H.-H. *et al.* in *Advances in Immunology : G Protein-Coupled Receptors in Immune Response and Regulation*, edited by A. K. Shukla (Academic Press 2017), pp. 163–201.
67. Hamann, J. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G Protein-Coupled Receptors. *Pharmacological Reviews* **67**, 338–367; 10.1124/pr.114.009647 (2015).
68. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256; 10.1124/mol.63.6.1256 (2003).
69. Umbhauer, M. *et al.* The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *The EMBO journal* **19**, 4944–4954; 10.1093/emboj/19.18.4944 (2000).
70. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 339 EP - (2008).
71. Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology* **25**, 4–12; 10.1038/s41594-017-0011-7 (2018).
72. Jensen, A. D. *et al.* Agonist-induced Conformational Changes at the Cytoplasmic Side of Transmembrane Segment 6 in the β 2 Adrenergic Receptor Mapped by Site-selective Fluorescent Labeling. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 9279–9290; 10.1074/jbc.M004871200 (2001).
73. Ghanouni, P., Steenhuis, J. J., Farrens, D. L. & Kobilka, B. K. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the β (2) adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5997–6002; 10.1073/pnas.101126198 (2001).
74. Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. & Khorana, H. G. Requirement of Rigid-Body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin. *Science* **274**, 768; 10.1126/science.274.5288.768 (1996).
75. Yao, X. *et al.* Coupling ligand structure to specific conformational switches in the β 2-adrenoceptor. *Nature Chemical Biology* **2**, 417 EP - (2006).
76. Wang, X., Kim, S.-H., Ablonczy, Z., Crouch, R. K. & Knapp, D. R. Probing Rhodopsin-Transducin Interactions by Surface Modification and Mass Spectrometry. *Biochemistry* **43**, 11153–11162; 10.1021/bi049642f (2004).
77. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 60 EP - (2008).

78. Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 942–947 (2009).
79. Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P. & Costa, T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends in Pharmacological Sciences* **14**, 303–307; 10.1016/0165-6147(93)90048-O (1993).
80. Kenakin, T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends in Pharmacological Sciences* **24**, 346–354; 10.1016/S0165-6147(03)00167-6 (2003).
81. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2519; 10.3390/ijms18122519 (2017).
82. Tang, X.-l., Wang, Y., Li, D.-l., Luo, J. & Liu, M.-y. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacologica Sinica* **33**, 363–371; 10.1038/aps.2011.210 (2011).
83. Wang, J. *et al.* High-throughput screening of antagonists for the orphan G-protein coupled receptor GPR139. *Acta Pharmacologica Sinica* **36**, 874–878; 10.1038/aps.2015.12 (2015).
84. Caffrey, M. & Cherezov, V. Crystallizing Membrane Proteins Using Lipidic Mesophases. *Nature protocols* **4**, 706–731; 10.1038/nprot.2009.31 (2009).
85. Liu, W. *et al.* Serial Femtosecond Crystallography of G Protein-Coupled Receptors. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 1521–1524; 10.1126/science.1244142 (2013).
86. Pándy-Szekeres, G. *et al.* GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Research* **46**, D440–D446; 10.1093/nar/gkx1109 (2017).
87. Ngo, T., Coleman, J. L. J. & Smith, N. J. in *G Protein-Coupled Receptor Screening Assays: Methods and Protocols*, edited by D. M. F. Prazeres & S. A. M. Martins (Springer New York, New York, NY, 2015), pp. 91–106.
88. Hanlon, C. D. & Andrew, D. J. Outside-in signaling – a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *J. Cell Sci.* **128**, 3533; 10.1242/jcs.175158 (2015).
89. Inglese, J. *et al.* High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nature Chemical Biology* **3**, 466 EP - (2007).
90. Reeves, P. J., Kim, J.-M. & Khorana, H. G. Structure and function in rhodopsin: A tetracycline-inducible system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13413–13418; 10.1073/pnas.212519199 (2002).
91. Koener, B. & Hermans, E. in *Receptor Signal Transduction Protocols: Third Edition*, edited by G. B. Willars & R. J. Challiss (Humana Press, Totowa, NJ, 2011), pp. 3–20.
92. Serebryany, E., Zhu, G. A. & Yan, E. C. Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors. *Membrane protein structure and function* **1818**, 225–233; 10.1016/j.bbamem.2011.07.047 (2012).
93. Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & Gier, J.-W. de. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology* **24**, 364–371; 10.1016/j.tibtech.2006.06.008 (2006).
94. Banères, J.-L., Popot, J.-L. & Mouillac, B. New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends in Biotechnology* **29**, 314–322; 10.1016/j.tibtech.2011.03.002 (2011).
95. Kiefer, H. In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Overexpression of Integral Membrane Proteins* **1610**, 57–62; 10.1016/S0005-2736(02)00717-4 (2003).
96. Siller, E., DeZwaan, D. C., Anderson, J. F., Freeman, B. C. & Barral, J. M. Slowing Bacterial Translation Speed Enhances Eukaryotic Protein Folding Efficiency. *Journal of Molecular Biology* **396**, 1310–1318; 10.1016/j.jmb.2009.12.042 (2010).
97. Nagamori, S., Smirnova, I. N. & Kaback, H. R. Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **165**, 53–62; 10.1083/jcb.200402067 (2004).

98. Kota, J. & Ljungdahl, P. O. Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *The Journal of Cell Biology* **168**, 79–88; 10.1083/jcb.200408106 (2004).
99. Kapust, R. B. & Waugh, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **8**, 1668–1674; 10.1110/ps.8.8.1668 (1999).
100. Su, P.-C., Si, W., Baker, D. L. & Berger, B. W. High-yield membrane protein expression from E. coli using an engineered outer membrane protein F fusion. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **22**, 434–443; 10.1002/pro.2224 (2013).
101. Zamani, M., Nezafat, N. & Ghasemi, Y. Evaluation of Recombinant Human Growth Hormone Secretion in E. coli using the L-asparaginase II Signal Peptide. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* **8**, 182–187 (2016).
102. BEDOUELLE, H. & DUPLAY, P. Production in Escherichia coli and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. *European Journal of Biochemistry* **171**, 541–549; 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13823.x (1988).
103. Tate, C. G. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes* **504**, 94–98; 10.1016/S0014-5793(01)02711-9 (2001).
104. Massotte, D. G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus–insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Overexpression of Integral Membrane Proteins* **1610**, 77–89; 10.1016/S0005-2736(02)00720-4 (2003).
105. Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 2156; 10.1128/MCB.3.12.2156 (1983).
106. Saarenpää, T., Jaakola, V.-P. & Goldman, A. in *Methods in Enzymology : Membrane Proteins—Production and Functional Characterization*, edited by A. K. Shukla (Academic Press 2015), pp. 185–218.
107. Liljeström, P. & Garoff, H. A New Generation of Animal Cell Expression Vectors Based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology* **9**, 1356 EP - (1991).
108. Hassaine, G. *et al.* Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expression and Purification* **45**, 343–351; 10.1016/j.pep.2005.06.007 (2006).
109. Andr ell, J. & Tate, C. G. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Molecular Membrane Biology* **30**, 52–63; 10.3109/09687688.2012.703703 (2012).
110. Eifler, N. *et al.* Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *3rd International Conference on Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes* **159**, 179–193; 10.1016/j.jsb.2007.01.014 (2007).
111. Nirenberg, M. W. & Matthaei, J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 1588–1602; 10.1073/pnas.47.10.1588 (1961).
112. Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C. & Kubick, S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *ChemBioChem* **16**, 2420–2431; 10.1002/cbic.201500340 (2015).
113. Zubay, G. In Vitro Synthesis of Protein in Microbial Systems. *Annu. Rev. Genet.* **7**, 267–287; 10.1146/annurev.ge.07.120173.001411 (1973).
114. Craig, D., Howell, M. T., Gibbs, C. L., Hunt, T. & Jackson, R. J. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Research* **20**, 4987–4995 (1992).

115. Orth, J. H. *et al.* Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *Toxicon* **57**, 199–207; 10.1016/j.toxicon.2010.11.011 (2011).
116. Kim, D.-M. & Swartz, J. Kim, D.M. & Swartz, J.R. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 180-188. *Biotechnology and Bioengineering* **66**; 10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:33.O.CO;2-S (1999).
117. Spirin, A. S., Baranov, V. I., La Ryabova, Ovodov, S. Y. & Alakhov, Y. B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **242**, 1162; 10.1126/science.3055301 (1988).
118. Spirin, A. S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends in Biotechnology* **22**, 538–545; 10.1016/j.tibtech.2004.08.012 (2004).
119. Ryabova, L. A., Vinokurov, L. M., Shekhovtsova, E. A., Alakhov, Y. B. & Spirin, A. S. Acetyl Phosphate as an Energy Source for Bacterial Cell-Free Translation Systems. *Analytical Biochemistry* **226**, 184–186; 10.1006/abio.1995.1208 (1995).
120. Jewett, M. C., Miller, M. L., Chen, Y. & Swartz, J. R. Continued Protein Synthesis at Low [ATP] and [GTP] Enables Cell Adaptation during Energy Limitation. *Journal of Bacteriology* **191**, 1083–1091; 10.1128/JB.00852-08 (2008).
121. Kim, D.-M. & Swartz, J. R. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 309–316; 10.1002/bit.1121 (2001).
122. Shimizu, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology* **19**, 751 EP - (2001).
123. Lajoie, M. J. *et al.* Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 357–360; 10.1126/science.1241459 (2013).
124. Martin, R. W. *et al.* Cell-free protein synthesis from genomically recoded bacteria enables multisite incorporation of noncanonical amino acids. *Nature Communications* **9**, 1203; 10.1038/s41467-018-03469-5 (2018).
125. Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L. & Davis, B. G. A “Tag-and-Modify” Approach to Site-Selective Protein Modification. *Acc. Chem. Res.* **44**, 730–741; 10.1021/ar200056q (2011).
126. Braun, P. & LaBaer, J. High throughput protein production for functional proteomics. *Trends in Biotechnology* **21**, 383–388; 10.1016/S0167-7799(03)00189-6 (2003).
127. Junge, F. *et al.* Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *Advances in Cell-free Protein Expression* **28**, 262–271; 10.1016/j.nbt.2010.07.002 (2011).
128. Geller, B. L. & Wickner, W. M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 13281–13285 (1985).
129. Klammt, C. *et al.* Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *Journal of Structural Biology* **158**, 482–493; 10.1016/j.jsb.2007.01.006 (2007).
130. Berrier, C. *et al.* Cell-Free Synthesis of a Functional Ion Channel in the Absence of a Membrane and in the Presence of Detergent. *Biochemistry* **43**, 12585–12591; 10.1021/bi049049y (2004).
131. Henrich, E., Hein, C., Dötsch, V. & Bernhard, F. Membrane protein production in *Escherichia coli* cell-free lysates. *FEBS Letters* **589**, 1713–1722; 10.1016/j.febslet.2015.04.045 (2015).
132. Zawada, J. F. *et al.* Microscale to Manufacturing Scale-up of Cell-Free Cytokine Production—A New Approach for Shortening Protein Production Development Timelines. *Biotechnology and Bioengineering* **108**, 1570–1578; 10.1002/bit.23103 (2011).
133. Chong, S. Overview of Cell-Free Protein Synthesis: Historic Landmarks, Commercial Systems, and Expanding Applications. *Current Protocols in Molecular Biology* **108**, 16.30.1-16.30.11; 10.1002/0471142727.mb1630s108 (2014).

134. Rothblatt, J. A. & Meyer, D. I. Secretion in yeast: Reconstitution of the translocation and glycosylation of α -factor and invertase in a homologous cell-free system. *Cell* **44**, 619–628; 10.1016/0092-8674(86)90271-0 (1986).
135. Sissons, C. H. Yeast protein synthesis. Preparation and analysis of a highly active cell-free system. *Biochem J* **144**, 131; 10.1042/bj1440131 (1974).
136. Iizuka, N., Najita, L., Franzusoff, A. & Sarnow, P. Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7322; 10.1128/MCB.14.11.7322 (1994).
137. Choudhury, A., Hodgman, C. E., Anderson, M. J. & Jewett, M. C. Evaluating fermentation effects on cell growth and crude extract metabolic activity for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biochemical Engineering Journal* **91**, 140–148; 10.1016/j.bej.2014.07.014 (2014).
138. Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 2643–2654; 10.1002/bit.24942 (2013).
139. Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. Characterizing IGR IRES-mediated translation initiation for use in yeast cell-free protein synthesis. *New Biotechnology* **31**, 499–505; 10.1016/j.nbt.2014.07.001 (2014).
140. Schoborg, J. A., Hodgman, C. E., Anderson, M. J. & Jewett, M. C. Substrate replenishment and byproduct removal improve yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnology Journal* **9**, 630–640; 10.1002/biot.201300383 (2013).
141. Roberts, B. E. & Paterson, B. M. Efficient Translation of Tobacco Mosaic Virus RNA and Rabbit Globin 9S RNA in a Cell-Free System from Commercial Wheat Germ. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 2330; 10.1073/pnas.70.8.2330 (1973).
142. HUNTER, A. R., FARRELL, P. J., JACKSON, R. J. & HUNT, T. The Role of Polyamines in Cell-Free Protein Synthesis in the Wheat-Germ System. *European Journal of Biochemistry* **75**, 149–157; 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11512.x (1977).
143. Tse, T. P. & Taylor, J. M. Translation of albumin messenger RNA in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 1272–1278 (1977).
144. Harbers, M. Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Letters* **588**, 2762–2773; 10.1016/j.febslet.2014.05.061 (2014).
145. Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. & Endo, Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 559; 10.1073/pnas.97.2.559 (2000).
146. Shields, D. & Blobel, G. Cell-free synthesis of fish preproinsulin, and processing by heterologous mammalian microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 2059; 10.1073/pnas.74.5.2059 (1977).
147. Komoda, K., Naito, S. & Ishikawa, M. Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 1863; 10.1073/pnas.0307131101 (2004).
148. Buntru, M., Vogel, S., Spiegel, H. & Schillberg, S. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based in vitro translation system. *BMC Biotechnology* **14**, 37; 10.1186/1472-6750-14-37 (2014).
149. Buntru, M., Vogel, S., Stoff, K., Spiegel, H. & Schillberg, S. A versatile coupled cell-free transcription–translation system based on tobacco BY-2 cell lysates. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 867–878; 10.1002/bit.25502 (2014).
150. Fenz, S. F., Sachse, R., Schmidt, T. & Kubick, S. Cell-free synthesis of membrane proteins: Tailored cell models out of microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**, 1382–1388; 10.1016/j.bbamem.2013.12.009 (2014).

151. Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberié, F. & Vernet, T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* **98**, 177–183; 10.1016/0378-1119(91)90171-7 (1991).
152. Stech, M. *et al.* Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *Journal of Biotechnology* **164**, 220–231; 10.1016/j.jbiotec.2012.08.020 (2013).
153. Zampatis, D. E. *et al.* The protease-activated receptor 1 possesses a functional and cleavable signal peptide which is necessary for receptor expression. *FEBS Letters* **586**, 2351–2359; 10.1016/j.febslet.2012.05.042 (2012).
154. Shaklee, P. M. *et al.* Protein Incorporation in Giant Lipid Vesicles under Physiological Conditions. *ChemBioChem* **11**, 175–179; 10.1002/cbic.200900669 (2010).
155. Quast, R. B., Sonnabend, A., Stech, M., Wüstenhagen, D. A. & Kubick, S. High-yield cell-free synthesis of human EGFR by IRES-mediated protein translation in a continuous exchange cell-free reaction format. *Scientific Reports* **6**, 30399 EP - (2016).
156. Merk, H., Gless, C., Maertens, B., Gerrits, M. & Stiege, W. Cell-free synthesis of functional and endotoxin-free antibody Fab fragments by translocation into microsomes. *BioTechniques* **53**, 153–160; 10.2144/0000113904 (2012).
157. Brödel, A. K. *et al.* IRES-Mediated Translation of Membrane Proteins and Glycoproteins in Eukaryotic Cell-Free Systems. *PLoS ONE* **8**, e82234; 10.1371/journal.pone.0082234 (2013).
158. Schweet, R., Lamfrom, H. & Allen, E. THE SYNTHESIS OF HEMOGLOBIN IN A CELL-FREE SYSTEM. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**, 1029; 10.1073/pnas.44.10.1029 (1958).
159. PELHAM, H. R. B. & JACKSON, R. J. An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates. *European Journal of Biochemistry* **67**, 247–256; 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10656.x (1976).
160. Anastasina, M., Terenin, I., Butcher, S. J. & Kainov, D. E. A technique to increase protein yield in a rabbit reticulocyte lysate translation system. *Biotechniques* **56**, 36–39; 10.2144/000114125 (2014).
161. Garrey, J. L., Lee, Y.-Y., Au, H. H. T., Bushell, M. & Jan, E. Host and Viral Translational Mechanisms during Cricket Paralysis Virus Infection. *J. Virol.* **84**, 1124; 10.1128/JVI.02006-09 (2010).
162. Deniz, N., Lenarcic, E. M., Landry, D. M. & Thompson, S. R. Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA* **15**, 932–946; 10.1261/rna.1315109 (2009).
163. Thoring, L., Dondapati, S. K., Stech, M., Wüstenhagen, D. A. & Kubick, S. High-yield production of “difficult-to-express” proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Scientific Reports* **7**, 11710; 10.1038/s41598-017-12188-8 (2017).
164. Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S. & Imataka, H. A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* **62**, 190–198; 10.1016/j.pep.2008.09.002 (2008).
165. Kobayashi, T., Machida, K. & Imataka, H. in *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*, edited by K. Alexandrov & W. A. Johnston (Humana Press, Totowa, NJ, 2014), pp. 149–156.
166. Widder, E. A. Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity. *Science* **328**, 704; 10.1126/science.1174269 (2010).
167. Thorne, N., Inglese, J. & Auld, D. S. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chemistry & biology* **17**, 646–657; 10.1016/j.chembiol.2010.05.012 (2010).

168. Tannous, B. A., Kim, D.-E., Fernandez, J. L., Weissleder, R. & Breakefield, X. O. Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and in Vivo. *Molecular Therapy* **11**, 435–443; 10.1016/j.ymthe.2004.10.016 (2005).
169. Markova, S. V., Golz, S., Frank, L. A., Kalthof, B. & Vysotski, E. S. Cloning and Expression of cDNA for a Luciferase from the Marine Copepod *Metridia longa*: A NOVEL SECRETED BIOLUMINESCENT REPORTER ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3212–3217; 10.1074/jbc.M309639200 (2004).
170. Andreu, N. *et al.* Optimisation of Bioluminescent Reporters for Use with Mycobacteria. *PLoS ONE* **5**, e10777; 10.1371/journal.pone.0010777 (2010).
171. Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F. H. & Haneda, Y. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. *Biochemistry* **17**, 994–998; 10.1021/bi00599a008 (1978).
172. Hall, M. P. *et al.* Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology* **7**, 1848–1857; 10.1021/cb3002478 (2012).
173. Wang, X.-C. *et al.* Effects of removal of the N-terminal amino acid residues on the activity and conformation of firefly luciferase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 983–991; 10.1016/S1357-2725(02)00019-5 (2002).
174. Sala-Newby, G. B. & Campbell, A. K. Stepwise removal of the C-terminal 12 amino acids of firefly luciferase results in graded loss of activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1206**, 155–160; 10.1016/0167-4838(94)90084-1 (1994).
175. Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Endothelin@25 – new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12. *British Journal of Pharmacology* **171**, 5555–5572; 10.1111/bph.12874 (2014).
176. P. Harland, S., Kuc, R., Pickard, J. & P. Davenport, A. Expression of EndothelinA Receptors in Human Gliomas and Meningiomas, with High Affinity for the Selective Antagonist PD 156707. *Neurosurgery* **43**; 10.1097/00006123-199810000-00097 (1998).
177. Kedzierski, R. M. & Yanagisawa, M. Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 851–876; 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.851 (2001).
178. KOHAN, D. E., ROSSI, N. F., INSCHO, E. W. & POLLOCK, D. M. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin. *Physiological reviews* **91**, 1–77; 10.1152/physrev.00060.2009 (2011).
179. Gulati, A. Endothelin Receptors, Mitochondria and Neurogenesis in Cerebral Ischemia. *Current Neuropharmacology* **14**, 619–626; 10.2174/1570159X14666160119094959 (2015).
180. Lättig, J., Oksche, A., Beyermann, M., Rosenthal, W. & Krause, G. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J. Peptide Sci.* **15**, 479–491; 10.1002/psc.1146 (2009).
181. Wheatley, M. & Hawtin, SR. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Human Reproduction Update* **5**, 356–364; 10.1093/humupd/5.4.356 (1999).
182. Doi, T. *et al.* Characterization of Human Endothelin B Receptor and Mutant Receptors Expressed in Insect Cells. *European Journal of Biochemistry* **248**, 139–148; 10.1111/j.1432-1033.1997.00139.x (2004).
183. Haendler, B., Hechler, U., Becker, A. & Schleuning, W. D. Expression of Human Endothelin Receptor ETB by *Escherichia coli* Transformants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **191**, 633–638; 10.1006/bbrc.1993.1264 (1993).
184. Klammt, C. *et al.* Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *The FEBS Journal* **274**, 3257–3269; 10.1111/j.1742-4658.2007.05854.x (2007).

185. Okamoto, Y. *et al.* Palmitoylation of Human EndothelinB. ITS CRITICAL ROLE IN G PROTEIN COUPLING AND A DIFFERENTIAL REQUIREMENT FOR THE CYTOPLASMIC TAIL BY G PROTEIN SUBTYPES. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 21589–21596; 10.1074/jbc.272.34.21589 (1997).
186. Fredholm, B. B., Iljerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. & Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev* **63**, 1; 10.1124/pr.110.003285 (2011).
187. Fredholm, B. B., Irenius, E., Kull, B. & Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; CHO, Chinese hamster ovary; NBMPR, nitrobenzylthioinosine; and NECA, 5'-N-ethyl carboxamido adenosine. *Biochemical Pharmacology* **61**, 443–448; 10.1016/S0006-2952(00)00570-0 (2001).
188. Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P. & Ramkumar, V. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 2024–2052; 10.3390/ijms15022024 (2014).
189. Hernán, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F. & Gestal-Otero, J. J. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. **52**, 276–284; 10.1002/ana.10277 (2002).
190. Rebola, N., Rodrigues, R. J., Oliveira, C. R. & Cunha, R. A. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochemistry International* **47**, 317–325; 10.1016/j.neuint.2005.05.009 (2005).
191. Jaakola, V.-P. *et al.* The 2.6 Å Crystal Structure of a Human A(2A) Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 1211–1217; 10.1126/science.1164772 (2008).
192. Franco, R. & Navarro, G. Adenosine A(2A) Receptor Antagonists in Neurodegenerative Diseases: Huge Potential and Huge Challenges. *Frontiers in Psychiatry* **9**, 68; 10.3389/fpsy.2018.00068 (2018).
193. Xu, F. *et al.* Structure of an agonist-bound human A(2A) adenosine receptor. *Science (New York, N.Y.)* **332**, 322–327; 10.1126/science.1202793 (2011).
194. Hoffmann, C. *et al.* A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nature Methods* **2**, 171 EP - (2005).
195. Oster, W. *et al.* Erythropoietin for the treatment of anemia of malignancy associated with neoplastic bone marrow infiltration. *JCO* **8**, 956–962; 10.1200/JCO.1990.8.6.956 (1990).
196. Pinevich, A. J. & Petersen, J. Erythropoietin therapy in patients with chronic renal failure. *Western Journal of Medicine* **157**, 154–157 (1992).
197. Kittur, F. S. *et al.* Cytoprotective Effect of Recombinant Human Erythropoietin Produced in Transgenic Tobacco Plants. *PLoS ONE* **8**, e76468; 10.1371/journal.pone.0076468 (2013).
198. Lee-Huang, S. Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 2708–2712 (1984).
199. Quelle, F. W., Caslake, L. F., Burkert, R. E. & Wojchowski, D. M. High-level expression and purification of a recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector. *Blood* **74**, 652 (1989).
200. Elliott, S., Giffin, J., Suggs, S., Lau, E. P. & Banks, A. R. Secretion of glycosylated human erythropoietin from yeast directed by the α -factor leader region. *Gene* **79**, 167–180; 10.1016/0378-1119(89)90102-9 (1989).
201. Jez, J. *et al.* Expression of functionally active sialylated human erythropoietin in plants. *Biotechnology Journal* **8**, 371–382; 10.1002/biot.201200363 (2013).
202. Lalonde, M.-E. & Durocher, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology* **251**, 128–140; 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028 (2017).

203. Skibeli, V., Nissen-Lie, G. & Torjesen, P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* **98**, 3626; 10.1182/blood.V98.13.3626 (2001).
204. Hoffmann, E. *et al.* Stabilization of bacterially expressed erythropoietin by single site-specific introduction of short branched PEG chains at naturally occurring glycosylation sites. *Mol. BioSyst.* **12**, 1750–1755; 10.1039/C5MB00857C (2016).
205. Banks, D. D. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *J Mol Biol* **412**, 536–550; 10.1016/j.jmb.2011.07.061 (2011).
206. Park, J. H. *et al.* Enhancement of recombinant human EPO production and glycosylation in serum-free suspension culture of CHO cells through expression and supplementation of 30Kc19. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**, 671–683; 10.1007/s00253-012-4203-0 (2012).
207. Yang, Q. *et al.* Glycan Remodeling of Human Erythropoietin (EPO) Through Combined Mammalian Cell Engineering and Chemoenzymatic Transglycosylation. *ACS Chemical Biology* **12**, 1665–1673; 10.1021/acscchembio.7b00282 (2018).
208. Wang, P. *et al.* Erythropoietin Derived by Chemical Synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 1357–1360; 10.1126/science.1245095 (2013).
209. Lu, J. & Holmgren, A. Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 723–727; 10.1074/jbc.R800045200 (2009).
210. Longstaff, D. G., Blight, S. K., Zhang, L., Green-Church, K. B. & Krzycki, J. A. In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine. *Molecular Microbiology* **63**, 229–241; 10.1111/j.1365-2958.2006.05500.x (2006).
211. Schimmel, P., Giegé, R., Moras, D. & Yokoyama, S. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8763–8768 (1993).
212. CRICK, F. H. C., BARNETT, L., BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R. J. General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* **192**, 1227 EP - (1961).
213. Thomas J. Magliery. Unnatural Protein Engineering: Producing Proteins with Unnatural Amino Acids. *Medicinal Chemistry Reviews - Online (Discontinued)* **2**, 303–323; 10.2174/1567203054637542 (2005).
214. Kisselev, L. L. in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, edited by W. E. Cohn & K. Moldave (Academic Press 1985), pp. 237–266.
215. Jakubowski, H. & Goldman, E. Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis. *MICROBIOL. REV.* **56**, 412 (1992).
216. Cusack, S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 881–889; 10.1016/S0959-440X(97)80161-3 (1997).
217. Perona, J. J. & Hadd, A. Structural Diversity and Protein Engineering of the Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry* **51**, 8705–8729; 10.1021/bi301180x (2012).
218. Hecht, S. M., Alford, B. L., Kuroda, Y. & Kitano, S. "Chemical aminoacylation" of tRNA's. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 4517–4520 (1978).
219. Naoe, H. *et al.* The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Activator Cdh1 Modulates Rho GTPase by Targeting p190 RhoGAP for Degradation. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 3994–4005; 10.1128/MCB.01358-09 (2010).
220. Ezure, T. *et al.* A Cell-Free Translocation System Using Extracts of Cultured Insect Cells to Yield Functional Membrane Proteins. *PLoS ONE* **9**, e112874; 10.1371/journal.pone.0112874 (2014).
221. Taira, H., Hohsaka, T. & Sisido, M. In vitro selection of tRNAs for efficient four-base decoding to incorporate non-natural amino acids into proteins in an Escherichia coli cell-free translation system. *Nucleic Acids Research* **34**, e44-e44; 10.1093/nar/gkl087 (2006).

222. Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P. G. Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*. *Science* **292**, 498; 10.1126/science.1060077 (2001).
223. Konecki, D. S., Aune, K. C., Tate, W. & Caskey, C. T. Characterization of reticulocyte release factor. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 4514–4520 (1977).
224. Wan, W., Tharp, J. M. & Liu, W. R. Pyrrolysyl-tRNA Synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool. *Biochimica et biophysica acta* **1844**, 1059–1070; 10.1016/j.bbapap.2014.03.002 (2014).
225. Kavran, J. M. *et al.* Structure of pyrrolysyl-tRNA synthetase, an archaeal enzyme for genetic code innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11268–11273; 10.1073/pnas.0704769104 (2007).
226. Nozawa, K. *et al.* Pyrrolysyl-tRNA synthetase:tRNA(Pyl) structure reveals the molecular basis of orthogonality. *Nature* **457**, 1163–1167; 10.1038/nature07611 (2008).
227. Li, L. & Zhang, Z. Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Molecules (Basel, Switzerland)* **21**, 1393; 10.3390/molecules21101393 (2016).
228. Staudinger, H. & Meyer, J. Ueber neue organische Phosphorverbindungen II. Phosphazine. *HCA* **2**, 619–635; 10.1002/hlca.19190020163 (1919).
229. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **287**, 2007; 10.1126/science.287.5460.2007 (2000).
230. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L. & Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2**, 1939–1941; 10.1021/ol0060174 (2000).
231. Huisgen, R. 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angewandte Chemie* **75**, 604–637; 10.1002/ange.19630751304 (1963).
232. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 2596–2599; 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4 (2002).
233. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064; 10.1021/jo011148j (2002).
234. Philipson, K. D., Gallivan, J. P., Brandt, G. S., Dougherty, D. A. & Lester, H. A. Incorporation of caged cysteine and caged tyrosine into a transmembrane segment of the nicotinic ACh receptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **281**, C195-C206; 10.1152/ajpcell.2001.281.1.C195 (2001).
235. Zou, K., Cheley, S., Givens, R. S. & Bayley, H. Catalytic Subunit of Protein Kinase A Caged at the Activating Phosphothreonine. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8220–8229; 10.1021/ja020405e (2002).
236. Grunbeck, A., Huber, T., Sachdev, P. & Sakmar, T. P. Mapping the Ligand-binding Site on a GPCR Using Genetically-encoded Photocrosslinkers. *Biochemistry* **50**, 3411–3413; 10.1021/bi200214r (2011).
237. Klippenstein, V. *et al.* Optocontrol of glutamate receptor activity by single side-chain photoisomerization. *eLife* **6**, e25808; 10.7554/eLife.25808 (2017).
238. Neumann, H. *et al.* A Method for Genetically Installing Site-Specific Acetylation in Recombinant Histones Defines the Effects of H3 K56 Acetylation. *Molecular Cell* **36**, 153–163; 10.1016/j.molcel.2009.07.027 (2009).
239. Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C. & Grangeasse, C. Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* **40**, 41–56; 10.1093/femsre/fuv041 (2016).
240. Gan, Q., Lehman, B. P., Bobik, T. A. & Fan, C. Expanding the genetic code of Salmonella with non-canonical amino acids. *Scientific Reports* **6**, 39920 EP - (2016).

241. Liu, H., Wang, L., Brock, A., Wong, C.-H. & Schultz, P. G. A Method for the Generation of Glycoprotein Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1702–1703; 10.1021/ja029433n (2003).
242. Nutiu, R. & Li, Y. Structure-Switching Signaling Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4771–4778; 10.1021/ja028962o (2003).
243. Merk, H., Meschkat, D. & Stiege, W. in *Cell-Free Protein Expression*, edited by J. R. Swartz (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2003), pp. 15–23.
244. Thoring, L. *et al.* Cell-Free Systems Based on CHO Cell Lysates: Optimization Strategies, Synthesis of "Difficult-to-Express" Proteins and Future Perspectives. *PLoS ONE* **11**, e0163670-e0163670; 10.1371/journal.pone.0163670 (2016).
245. Rajendran, M., Dane, E., Conley, J. & Tantama, M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *The Biological bulletin* **231**, 73–84; 10.1086/689592 (2016).
246. Nguyen, V.-T., Kwon, Y. S. & Gu, M. B. Aptamer-based environmental biosensors for small molecule contaminants. *Energy biotechnology • Environmental biotechnology* **45**, 15–23; 10.1016/j.copbio.2016.11.020 (2017).
247. Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 829 EP - (2017).
248. Zemella, A. *et al.* Qualifying a eukaryotic cell-free system for fluorescence based GPCR analyses. *Scientific Reports* **7**, 3740; 10.1038/s41598-017-03955-8 (2017).
249. Lagassé, H. A. D. *et al.* Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* **6**, 113; 10.12688/f1000research.9970.1 (2017).
250. Zemella, A., Richter, T., Thoring, L. & Kubick, S. in *G Protein-Coupled Receptor Signaling: Methods and Protocols*, edited by M. Tiberi (Springer New York, New York, NY, 2019), pp. 57–77.
251. Kennedy, D. C. *et al.* Cellular Consequences of Copper Complexes Used To Catalyze Bioorthogonal Click Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17993–18001; 10.1021/ja2083027 (2011).
252. Zemella, A. *et al.* Cell-free protein synthesis as a novel tool for directed glycoengineering of active erythropoietin. *Scientific Reports* **8**, 8514; 10.1038/s41598-018-26936-x (2018).
253. Lee, K.-H. & Kim, D.-M. Recent advances in development of cell-free protein synthesis systems for fast and efficient production of recombinant proteins. *femsle* **365**; 10.1093/femsle/fny174 (2018).
254. Coma, I. *et al.* Process Validation and Screen Reproducibility in High-Throughput Screening. *J Biomol Screen* **14**, 66–76; 10.1177/1087057108326664 (2008).
255. Dahlin, J. L. *et al.* A Cell-Free Fluorometric High-Throughput Screen for Inhibitors of Rtt109-Catalyzed Histone Acetylation. *PLOS ONE* **8**, e78877; 10.1371/journal.pone.0078877 (2013).
256. Svensen, N. & Jaffrey, S. R. Fluorescent RNA Aptamers as a Tool to Study RNA-Modifying Enzymes. *Cell chemical biology* **23**, 415–425; 10.1016/j.chembiol.2015.11.018 (2016).
257. Pothoulakis, G., Ceroni, F., Reeve, B. & Ellis, T. The Spinach RNA Aptamer as a Characterization Tool for Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* **3**, 182–187; 10.1021/sb400089c (2014).
258. Rogers, T. A., Andrews, G. E., Jaeger, L. & Grabow, W. W. Fluorescent Monitoring of RNA Assembly and Processing Using the Split-Spinach Aptamer. *ACS Synth. Biol.* **4**, 162–166; 10.1021/sb5000725 (2015).
259. Yang, C. *et al.* RNA Aptamers Targeting the Cell Death Inhibitor CED-9 Induce Cell Killing in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 9137–9144; 10.1074/jbc.M511742200 (2006).
260. D. M. Dupont, L. M. Andersen & K. A. Botkjaer and P. A. Andreasen. Nucleic Acid Aptamers Against Proteases. *Current Medicinal Chemistry* **18**, 4139–4151; 10.2174/092986711797189556 (2011).

261. Hoffmann, B., Löhr, F., Laguerre, A., Bernhard, F. & Dötsch, V. Protein labeling strategies for liquid-state NMR spectroscopy using cell-free synthesis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **105**, 1–22; 10.1016/j.pnmrs.2017.11.004 (2018).
262. Stoddart, L. A., White, C. W., Nguyen, K., Hill, S. J. & Pflieger, K. D. G. Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. *British Journal of Pharmacology* **173**, 3028–3037; 10.1111/bph.13316 (2016).
263. Iyer, S. & Doktycz, M. J. Thrombin-mediated transcriptional regulation using DNA aptamers in DNA-based cell-free protein synthesis. *ACS synthetic biology* **3**, 340–346; 10.1021/sb4000756 (2014).
264. van Nies, P. *et al.* Unbiased Tracking of the Progression of mRNA and Protein Synthesis in Bulk and in Liposome-Confined Reactions. *ChemBioChem* **14**, 1963–1966; 10.1002/cbic.201300449 (2013).
265. Majumder, S., Wang, S., Emery, N. J. & Liu, A. P. Simultaneous monitoring of transcription and translation in mammalian cell-free expression in bulk and in cell-sized droplets. *synbio* **3**; 10.1093/synbio/ysy005 (2018).
266. Siegal-Gaskins, D., Tuza, Z. A., Kim, J., Noireaux, V. & Murray, R. M. Gene Circuit Performance Characterization and Resource Usage in a Cell-Free “Breadboard”. *ACS Synth. Biol.* **3**, 416–425; 10.1021/sb400203p (2014).
267. Nutiu, R. & Li, Y. A DNA–Protein Nanoengine for “On-Demand” Release and Precise Delivery of Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 5464–5467; 10.1002/anie.200501214 (2005).
268. Ni, S. *et al.* Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1683; 10.3390/ijms18081683 (2017).
269. Zeng, X., Zhang, X., Yang, W., Jia, H. & Li, Y. Fluorescence detection of adenosine triphosphate through an aptamer–molecular beacon multiple probe. *Analytical Biochemistry* **424**, 8–11; 10.1016/j.ab.2012.01.021 (2012).
270. Sosnick, T. R. & Pan, T. RNA folding: models and perspectives. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 309–316; 10.1016/S0959-440X(03)00066-6 (2003).
271. Soto, A. M., Misra, V. & Draper, D. E. Tertiary Structure of an RNA Pseudoknot Is Stabilized by “Diffuse” Mg²⁺ Ions. *Biochemistry* **46**, 2973–2983; 10.1021/bi0616753 (2007).
272. Choudhary, P. K. & Sigel, R. K. O. Mg(2+)-induced conformational changes in the btuB riboswitch from *E. coli*. *RNA (New York, N.Y.)* **20**, 36–45; 10.1261/rna.039909.113 (2014).
273. Buck, J., Noeske, J., Wöhnert, J. & Schwalbe, H. Dissecting the influence of Mg²⁺ on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Research* **38**, 4143–4153; 10.1093/nar/gkq138 (2010).
274. Reuss, A. J., Vogel, M., Weigand, J. E., Suess, B. & Wachtveitl, J. Tetracycline determines the conformation of its aptamer at physiological magnesium concentrations. *Biophysical journal* **107**, 2962–2971; 10.1016/j.bpj.2014.11.001 (2014).
275. Sazani, P. L., Larralde, R. & Szostak, J. W. A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 8370–8371; 10.1021/ja049171k (2004).
276. Yu, P., He, X., Zhang, L. & Mao, L. Dual Recognition Unit Strategy Improves the Specificity of the Adenosine Triphosphate (ATP) Aptamer Biosensor for Cerebral ATP Assay. *Anal. Chem.* **87**, 1373–1380; 10.1021/ac504249k (2015).
277. Stouthamer, A. H. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek* **39**, 545–565; 10.1007/BF02578899 (1973).
278. Pontes, M. H., Sevostyanova, A. & Groisman, E. A. When Too Much ATP Is Bad for Protein Synthesis. *Journal of Molecular Biology* **427**, 2586–2594; 10.1016/j.jmb.2015.06.021 (2015).

279. Klein, D. J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *RNA (New York, N.Y.)* **10**, 1366–1379; 10.1261/rna.7390804 (2004).
280. Abeyvirigunawardena, S. C. & Woodson, S. A. Differential effects of ribosomal proteins and Mg²⁺ ions on a conformational switch during 30S ribosome 5'-domain assembly. *RNA (New York, N.Y.)* **21**, 1859–1865; 10.1261/rna.051292.115 (2015).
281. Schuwirth, B. S. *et al.* Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science* **310**, 827; 10.1126/science.1117230 (2005).
282. Romani, A. M. P. Cellular magnesium homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics* **512**, 1–23; 10.1016/j.abb.2011.05.010 (2011).
283. Chakraborty, K., Leung, K. & Krishnan, Y. High luminal chloride in the lysosome is critical for lysosome function. *eLife* **6**, e28862; 10.7554/eLife.28862 (2017).
284. Zeenko, V. V. *et al.* An efficient in vitro translation system from mammalian cells lacking the translational inhibition caused by eIF2 phosphorylation. *RNA (New York, N.Y.)* **14**, 593–602; 10.1261/rna.825008 (2008).
285. Liu, Z., Lv, Y., Zhao, N., Guan, G. & Wang, J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell death & disease* **6**, e1822-e1822; 10.1038/cddis.2015.183 (2015).
286. Axten, J. M. *et al.* Discovery of 7-Methyl-5-(1-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a Potent and Selective First-in-Class Inhibitor of Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). *J. Med. Chem.* **55**, 7193–7207; 10.1021/jm300713s (2012).
287. Parrish, A. B., Freel, C. D. & Kornbluth, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a008672; 10.1101/cshperspect.a008672.
288. Jeffrey, I. W., Bushell, M., Tilleray, V. J., Morley, S. & Clemens, M. J. Inhibition of Protein Synthesis in Apoptosis. *Cancer Res* **62**, 2272 (2002).
289. Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M. & Morley, S. J. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death And Differentiation* **7**, 603 EP - (2000).
290. Stech, M. *et al.* A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLoS ONE* **9**, e96635-e96635; 10.1371/journal.pone.0096635 (2014).
291. Bouchard, P. R., Hutabarat, R. M. & Thompson, K. M. Discovery and Development of Therapeutic Aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 237–257; 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105547 (2010).
292. Reisner, A. H. & Bucholtz, C. The in vivo effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) on protein synthesis and the polyribosome profile in paramecium. *J. Cell. Physiol.* **90**, 169–177; 10.1002/jcp.1040900204 (1977).
293. Ahn, J.-H. *et al.* Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1346–1352; 10.1016/j.bbrc.2005.10.094 (2005).
294. Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J. & Plückthun, A. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 75–80; 10.1073/pnas.011311398 (2001).
295. Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y. & Yanagawa, H. In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Letters* **414**, 405–408; 10.1016/S0014-5793(97)01026-0 (1997).

296. Tabuchi, I. Next-generation protein-handling method: puromycin analogue technology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 1–5; 10.1016/S0006-291X(03)00686-7 (2003).
297. He, M., Stoevesandt, O. & Taussig, M. J. In situ synthesis of protein arrays. *Analytical biotechnology* **19**, 4–9; 10.1016/j.copbio.2007.11.009 (2008).
298. Okuta, A., Tani, K., Nishimura, S., Fujiyoshi, Y. & Doi, T. Thermostabilization of the Human Endothelin Type B Receptor. *Journal of Molecular Biology* **428**, 2265–2274; 10.1016/j.jmb.2016.03.024 (2016).
299. Schinn, S.-M., Broadbent, A., Bradley, W. T. & Bundy, B. C. Protein synthesis directly from PCR: progress and applications of cell-free protein synthesis with linear DNA. *New Biotechnology* **33**, 480–487; 10.1016/j.nbt.2016.04.002 (2016).
300. Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* **196**, 947–950; 10.1016/0022-2836(87)90418-9 (1987).
301. Shabalina, S. A. & Spiridonov, N. A. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biology* **5**, 105; 10.1186/gb-2004-5-4-105 (2004).
302. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–292; 10.1016/0092-8674(86)90762-2 (1986).
303. Kozak, M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8301–8305 (1990).
304. Kochetov, A. V. *et al.* AUG_hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. *BMC bioinformatics* **8**, 318; 10.1186/1471-2105-8-318 (2007).
305. Fernández, I. S., Bai, X.-C., Murshudov, G., Scheres, S. H. W. & Ramakrishnan, V. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **157**, 823–831; 10.1016/j.cell.2014.04.015 (2014).
306. Gan, R. & Jewett, M. C. A combined cell-free transcription-translation system from *Saccharomyces cerevisiae* for rapid and robust protein synthesis. *Biotechnology Journal* **9**, 641–651; 10.1002/biot.201300545 (2014).
307. Kubick, S., Gerrits, M., Merk, H., Stiege, W. & Erdmann, V. A. in *Current Topics in Membranes : Current Topics in Membranes, Volume 63* (Academic Press 2009), pp. 25–49.
308. Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12501–12504 (1994).
309. Macdonald, P. J., Chen, Y. & Mueller, J. D. Chromophore maturation and fluorescence fluctuation spectroscopy of fluorescent proteins in a cell-free expression system. *Analytical Biochemistry* **421**, 291–298; 10.1016/j.ab.2011.10.040 (2012).
310. Schmidt, C., Beilsten-Edmands, V. & Robinson, C. V. Insights into Eukaryotic Translation Initiation from Mass Spectrometry of Macromolecular Protein Assemblies. *Study of biomolecules and biological systems: Proteins* **428**, 344–356; 10.1016/j.jmb.2015.10.011 (2016).
311. Aitken, C. E. & Lorsch, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 568 EP - (2012).
312. Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. & Sarnow, P. Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome. *Cell* **102**, 511–520; 10.1016/S0092-8674(00)00055-6 (2000).
313. Hellen, C. U. & Sarnow, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & Development* **15**, 1593–1612; 10.1101/gad.891101 (2001).

314. Muhs, M. *et al.* Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES. *Molecular Cell* **57**, 422–432; 10.1016/j.molcel.2014.12.016 (2015).
315. Thompson, S. R. So you want to know if your message has an IRES? *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **3**, 697–705; 10.1002/wrna.1129 (2012).
316. Costantino, D. A., Pfingsten, J. S., Rambo, R. P. & Kieft, J. S. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 57–64; 10.1038/nsmb1351 (2008).
317. Sasaki, J. & Nakashima, N. Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *Journal of virology* **73**, 1219–1226 (1999).
318. Ahn, J.-H., Hwang, M.-Y., Lee, K.-H., Choi, C.-Y. & Kim, D.-M. Use of signal sequences as an in situ removable sequence element to stimulate protein synthesis in cell-free extracts. *Nucleic Acids Research* **35**, e21-e21; 10.1093/nar/gkl917 (2007).
319. Soejima, Y. *et al.* Comparison of signal peptides for efficient protein secretion in the baculovirus-silkworm system. *Central European Journal of Biology* **8**, 1–7; 10.2478/s11535-012-0112-6 (2013).
320. Rues, R.-B., Dong, F., Dötsch, V. & Bernhard, F. Systematic optimization of cell-free synthesized human endothelin B receptor folding. *Recombinant Membrane Protein Methods* **147**, 73–83; 10.1016/j.ymeth.2018.01.012 (2018).
321. Yao, Z. & Kobilka, B. Using synthetic lipids to stabilize purified β 2 adrenoceptor in detergent micelles. *Analytical Biochemistry* **343**, 344–346; 10.1016/j.ab.2005.05.002 (2005).
322. Sachse, R. Dissertation. Universität Potsdam (2014).
323. Shihoya, W. *et al.* Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. *Nature* **537**, 363 EP - (2016).
324. Novikova, I. V. *et al.* Protein structural biology using cell-free platform from wheat germ. *Advanced structural and chemical imaging* **4**, 13; 10.1186/s40679-018-0062-9 (2018).
325. Hvidsten, T. R. *et al.* A Comprehensive Analysis of the Structure-Function Relationship in Proteins Based on Local Structure Similarity. *PLOS ONE* **4**, e6266; 10.1371/journal.pone.0006266 (2009).
326. Xie, J. *et al.* The site-specific incorporation of p-iodo-L-phenylalanine into proteins for structure determination. *Nature Biotechnology* **22**, 1297 EP - (2004).
327. Jones, D. H. *et al.* Site-specific labeling of proteins with NMR-active unnatural amino acids. *Journal of Biomolecular NMR* **46**, 89; 10.1007/s10858-009-9365-4 (2009).
328. Dambacher, C. M. & Lander, G. C. Site-specific labeling of proteins for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **192**, 151–158; 10.1016/j.jsb.2015.09.010 (2015).
329. Wang, L. Engineering the Genetic Code in Cells and Animals: Biological Considerations and Impacts. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2767–2775; 10.1021/acs.accounts.7b00376 (2017).
330. Lee, K. B., Kim, H.-C., Kim, D.-M., Kang, T. J. & Suga, H. Comparative evaluation of two cell-free protein synthesis systems derived from *Escherichia coli* for genetic code reprogramming. *Journal of Biotechnology* **164**, 330–335; 10.1016/j.jbiotec.2013.01.011 (2013).
331. Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T. & Nirenberg, M. Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61**, 768–774 (1968).
332. Cheng, Z. *et al.* Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes & Development* **23**, 1106–1118; 10.1101/gad.1770109 (2009).
333. Kolosov, P. *et al.* Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. *Nucleic Acids Research* **33**, 6418–6425; 10.1093/nar/gki927 (2005).

334. Schmied, W. H., Elsässer, S. J., Uttamapinant, C. & Chin, J. W. Efficient multisite unnatural amino acid incorporation in mammalian cells via optimized pyrrolysyl tRNA synthetase/tRNA expression and engineered eRF1. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 15577–15583; 10.1021/ja5069728 (2014).
335. Pott, M., Schmidt, M. J. & Summerer, D. Evolved Sequence Contexts for Highly Efficient Amber Suppression with Noncanonical Amino Acids. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2815–2822; 10.1021/cb5006273 (2014).
336. Mottagui-Tabar, S., Björnsson, A. & Isaksson, L. A. The second to last amino acid in the nascent peptide as a codon context determinant. *The EMBO journal* **13**, 249–257 (1994).
337. Phillips-Jones, M. K., Watson, F. J. & Martin, R. The 3' Codon Context Effect on UAG Suppressor tRNA is Different in Escherichia coli and Human Cells. *Journal of Molecular Biology* **233**, 1–6; 10.1006/jmbi.1993.1479 (1993).
338. Cassan, M. & Rousset, J. P. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC molecular biology* **2**, 3; 10.1186/1471-2199-2-3 (2001).
339. Eswarappa, S. M. *et al.* Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell* **157**, 1605–1618; 10.1016/j.cell.2014.04.033 (2014).
340. Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z. & Zietkiewicz, E. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes--The impact of RNA sequence. *RNA biology* **12**, 950–958; 10.1080/15476286.2015.1068497 (2015).
341. Brown, C. M., Stockwell, P. A., Trotman, C. N. & Tate, W. P. Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **18**, 6339–6345 (1990).
342. Li, G. & Rice, C. M. The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *Journal of virology* **67**, 5062–5067 (1993).
343. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* **289**, 920; 10.1126/science.289.5481.920 (2000).
344. Tram, K., Yan, H., Jenkins, H. A., Vassiliev, S. & Bruce, D. The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY). *Dyes and Pigments* **82**, 392–395; 10.1016/j.dyepig.2009.03.001 (2009).
345. Ching, C. B., Hidajat, K. & Uddin, M. S. Evaluation of Equilibrium and Kinetic Parameters of Smaller Molecular Size Amino Acids on KX Zeolite Crystals via Liquid Chromatographic Techniques. *Separation Science and Technology* **24**, 581–597; 10.1080/01496398908049793 (1989).
346. Shao, N., Singh, N. S., Slade, S. E., Jones, A. M. E. & Balasubramanian, M. K. Site Specific Genetic Incorporation of Azidophenylalanine in *Schizosaccharomyces pombe*. *Scientific Reports* **5**, 17196 EP - (2015).
347. Heil, C. S., Rittner, A., Goebel, B., Beyer, D. & Grininger, M. Site-Specific Labelling of Multidomain Proteins by Amber Codon Suppression. *Scientific Reports* **8**, 14864; 10.1038/s41598-018-33115-5 (2018).
348. Lang, K. & Chin, J. W. Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chem. Rev.* **114**, 4764–4806; 10.1021/cr400355w (2014).
349. Kobayashi, T. *et al.* Structural basis of nonnatural amino acid recognition by an engineered aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1366–1371; 10.1073/pnas.0407039102 (2005).
350. Steinberg, X. *et al.* A Rationally Designed Aminoacyl-tRNA Synthetase for Genetically Encoded Fluorescent Amino Acids. *bioRxiv*, 65227; 10.1101/065227 (2017).

351. Santoro, S. W., Wang, L., Herberich, B., King, D. S. & Schultz, P. G. An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. *Nature Biotechnology* **20**, 1044 EP - (2002).
352. Lorenz, C., Lünse, C. E. & Mörl, M. tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules* **7**, 35; 10.3390/biom7020035 (2017).
353. Serebrov, V., Clarke, R. J., Gross, H. J. & Kisselev, L. Mg²⁺-Induced tRNA Folding. *Biochemistry* **40**, 6688–6698; 10.1021/bi002241p (2001).
354. Link, A. J. & Tirrell, D. A. Cell Surface Labeling of Escherichia coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164–11165; 10.1021/ja036765z (2003).
355. Soares, E. V., Hebbelink, K. & Soares, H. M. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can. J. Microbiol.* **49**, 336–343; 10.1139/w03-044 (2003).
356. Wang, Q. *et al.* Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3192–3193; 10.1021/ja021381e (2003).
357. Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C. & Finn, M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 9879–9883; 10.1002/anie.200905087 (2009).
358. Yang, M. *et al.* Biocompatible click chemistry enabled compartment-specific pH measurement inside *E. coli*. *Nature Communications* **5**, 4981 EP - (2014).
359. Lukinavičius, G. *et al.* A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nature Chemistry* **5**, 132 EP - (2013).
360. Li, S. *et al.* Copper-catalyzed click reaction on/in live cells. *Chem. Sci.* **8**, 2107–2114; 10.1039/C6SC02297A (2017).
361. Besanceney-Webler, C. *et al.* Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* **50**, 8051–8056; 10.1002/anie.201101817 (2011).
362. McKay, C. S. & Finn, M. G. Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chemistry & biology* **21**, 1075–1101; 10.1016/j.chembiol.2014.09.002 (2014).
363. Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M. & Finn, M. G. Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry. *Bioconjugate chemistry* **21**, 1912–1916; 10.1021/bc100272z (2010).
364. Berg, R. & Straub, B. F. Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Beilstein journal of organic chemistry* **9**, 2715–2750; 10.3762/bjoc.9.308 (2013).
365. Rochefort, M. M., Girgis, M. D., Ankeny, J. S. & Tomlinson, J. S. Metabolic exploitation of the sialic acid biosynthetic pathway to generate site-specifically labeled antibodies. *glycob* **24**, 62–69; 10.1093/glycob/cwt090 (2013).
366. Freise, A. C. & Wu, A. M. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Molecular immunology* **67**, 142–152; 10.1016/j.molimm.2015.04.001 (2015).
367. Walker-Daniels, J. Live Cell Imaging Methods Review. *Materials and Methods* **2**; 10.13070/mm.en.2.124 (2012).
368. Levitus, M. & Ranjit, S. Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments. *Quarterly Reviews of Biophysics* **44**, 123–151; 10.1017/S0033583510000247 (2011).
369. Romieu, A. *et al.* The first comparative study of the ability of different hydrophilic groups to water-solubilise fluorescent BODIPY dyes. *New J. Chem.* **37**, 1016–1027; 10.1039/C3NJ41093E (2013).
370. Hughes, L. D., Rawle, R. J. & Boxer, S. G. Choose Your Label Wisely: Water-Soluble Fluorophores Often Interact with Lipid Bilayers. *PLOS ONE* **9**, e87649; 10.1371/journal.pone.0087649 (2014).

371. Egrie, J. C., Grant, J. R., Gillies, D. K., Aoki, K. H. & Strickland, T. W. S7.7 The role of carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. *Glycoconjugate Journal* **10**, 263; 10.1007/BF01209934 (1993).
372. Gong, B., Burnina, I., Stadheim, T. A. & Li, H. Glycosylation characterization of recombinant human erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **48**, 1308–1317; 10.1002/jms.3291 (2013).
373. Khan, A. H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S. & Rahimpour, A. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World J Microbiol Biotechnol* **33**, 4; 10.1007/s11274-016-2172-7 (2017).
374. Pasut, G. & Veronese, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. *Drug Delivery Research in Europe* **161**, 461–472; 10.1016/j.jconrel.2011.10.037 (2012).
375. Lee, H. S., Qi, Y. & Im, W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Scientific Reports* **5**, 8926 EP - (2015).
376. Boissel, J. P., Lee, W. R., Presnell, S. R., Cohen, F. E. & Bunn, H. F. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15983–15993 (1993).
377. Hein, J. E. & Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1302–1315; 10.1039/B904091A (2010).
378. Uchida, E. *et al.* Effect of Active Oxygen Radicals on Protein and Carbohydrate Moieties of Recombinant Human Erythropoietin. *Free Radical Research* **27**, 311–323; 10.3109/10715769709065769 (1997).
379. Jaroentomeechai, T. *et al.* Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery. *Nature Communications* **9**, 2686; 10.1038/s41467-018-05110-x (2018).
380. Dacres, H., Wang, J., Dumancic, M. M. & Trowell, S. C. Experimental Determination of the Förster Distance for Two Commonly Used Bioluminescent Resonance Energy Transfer Pairs. *Anal. Chem.* **82**, 432–435; 10.1021/ac9022956 (2010).
381. Granier, S. *et al.* Structure and Conformational Changes in the C-terminal Domain of the β 2-Adrenoceptor: INSIGHTS FROM FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDIES. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13895–13905; 10.1074/jbc.M611904200 (2007).
382. Carpenter, B. & Lebon, G. Human Adenosine A_{2A} Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Frontiers in pharmacology* **8**, 898; 10.3389/fphar.2017.00898 (2017).
383. Lebon, G. *et al.* Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521–525; 10.1038/nature10136 (2011).
384. Piston, D. W. & Kremers, G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 407–414; 10.1016/j.tibs.2007.08.003 (2007).
385. Giraldez, T., Hughes, T. E. & Sigworth, F. J. Generation of functional fluorescent BK channels by random insertion of GFP variants. *The Journal of general physiology* **126**, 429–438; 10.1085/jgp.200509368 (2005).
386. Canals, M. *et al.* Homodimerization of adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Neurochemistry* **88**, 726–734; 10.1046/j.1471-4159.2003.02200.x (2004).
387. Fanelli, F. & Felling, A. Dimerization and ligand binding affect the structure network of A_{2A} adenosine receptor. *Adenosine Receptors* **1808**, 1256–1266; 10.1016/j.bbamem.2010.08.006 (2011).
388. Canals, M. *et al.* Adenosine A_{2A}-Dopamine D₂ Receptor-Receptor Heteromerization: QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ASSESSMENT BY FLUORESCENCE AND BIOLUMINESCENCE

- ENERGY TRANSFER. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46741–46749; 10.1074/jbc.M306451200 (2003).
389. Hauser, R. A., Hubble, J. P. & Truong, D. D. Randomized trial of the adenosine A_{2A} receptor antagonist istradefylline in advanced PD. *Neurology* **61**, 297; 10.1212/01.WNL.0000081227.84197.0B (2003).
390. Piirainen, H., Taura, J., Kursula, P., Ciruela, F. & Jaakola, V.-P. Calcium modulates calmodulin/ α -actinin 1 interaction with and agonist-dependent internalization of the adenosine A_{2A} receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1864**, 674–686; 10.1016/j.bbamcr.2017.01.013 (2017).
391. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* **110**, 465–502; 10.1016/j.pharmthera.2005.09.008 (2006).
392. Mamat, C., Gott, M. & Steinbach, J. Recent progress using the Staudinger ligation for radiolabeling applications. *J Label Compd Radiopharm* **61**, 165–178; 10.1002/jlcr.3562 (2018).
393. Nikić, I. *et al.* Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2245–2249; 10.1002/anie.201309847 (2014).
394. Yanagisawa, T. *et al.* Multistep Engineering of Pyrrolysyl-tRNA Synthetase to Genetically Encode Ne-(o-Azidobenzoyloxycarbonyl) lysine for Site-Specific Protein Modification. *Chemistry & biology* **15**, 1187–1197; 10.1016/j.chembiol.2008.10.004 (2008).
395. Herring, S. *et al.* The amino-terminal domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase is dispensable in vitro but required for in vivo activity. *FEBS Letters* **581**, 3197–3203; 10.1016/j.febslet.2007.06.004 (2007).
396. Jiang, R. & Krzycki, J. A. PylSn and the homologous N-terminal domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase bind the tRNA that is essential for the genetic encoding of pyrrolysine. *The Journal of biological chemistry* **287**, 32738–32746; 10.1074/jbc.M112.396754 (2012).
397. Gaston, M. A., Jiang, R. & Krzycki, J. A. Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine. *Current opinion in microbiology* **14**, 342–349; 10.1016/j.mib.2011.04.001 (2011).
398. Suzuki, T. *et al.* Crystal structures reveal an elusive functional domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase. *Nature Chemical Biology* **13**, 1261–1266; 10.1038/nchembio.2497 (2017).
399. Sharma, V. *et al.* Evolving the N-Terminal Domain of Pyrrolysyl-tRNA Synthetase for Improved Incorporation of Noncanonical Amino Acids. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **19**, 26–30; 10.1002/cbic.201700268 (2018).
400. Beránek, V., Willis, J. C. W. & Chin, J. W. An Evolved Methanomethylophilus alvus Pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA Pair Is Highly Active and Orthogonal in Mammalian Cells. *Biochemistry* **58**, 387–390; 10.1021/acs.biochem.8b00808 (2019).
401. Watanabe, Y. *et al.* Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA(SerUGA): chemical modification and computer modeling. *Nucleic Acids Research* **22**, 5378–5384 (1994).
402. Christian, B. E. & Spremulli, L. L. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1819**, 1035–1054; 10.1016/j.bbagr.2011.11.009 (2012).
403. Lorenz, C. *et al.* Designer tRNAs for efficient incorporation of non-canonical amino acids by the pyrrolysine system in mammalian cells. *nar* **46**, 1–10; 10.1093/nar/gkx1156 (2017).
404. Wang, J., Kwiatkowski, M. & Forster, A. C. Kinetics of tRNA^{Pyl}-mediated amber suppression in Escherichia coli translation reveals unexpected limiting steps and competing reactions. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1552–1559; 10.1002/bit.25917 (2016).
405. Fan, C., Xiong, H., Reynolds, N. M. & Söll, D. Rationally evolving tRNA^{Pyl} for efficient incorporation of noncanonical amino acids. *Nucleic Acids Research* **43**, e156–e156; 10.1093/nar/gkv800 (2015).

406. Wu, Y., Cui, Z., Mureev, S. & Alexandrov, K. Oligonucleotide-mediated tRNA sequestration enables one-pot sense codon reassignment in vitro. *nar* **46**, 6387–6400; 10.1093/nar/gky365 (2018).
407. Chemla, Y., Ozer, E., Schlesinger, O., Noireaux, V. & Alfonta, L. Genetically expanded cell-free protein synthesis using endogenous pyrrolysyl orthogonal translation system. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1663–1672; 10.1002/bit.25587 (2015).
408. Gerrits, M., Budisa, N. & Merk, H. Site-Specific Chemoselective Pyrrolysine Analogues Incorporation Using the Cell-Free Protein Synthesis System. *ACS Synth. Biol.* **8**, 381–390; 10.1021/acssynbio.8b00421 (2019).
409. Meyer, J.-P., Adumeau, P., Lewis, J. S. & Zeglis, B. M. Click Chemistry and Radiochemistry: The First 10 Years. *Bioconjugate chemistry* **27**, 2791–2807; 10.1021/acs.bioconjchem.6b00561 (2016).
410. Ambrogelly, A. *et al.* Pyrrolysine is not hardwired for cotranslational insertion at UAG codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3141–3146; 10.1073/pnas.0611634104 (2006).

7. Anhang

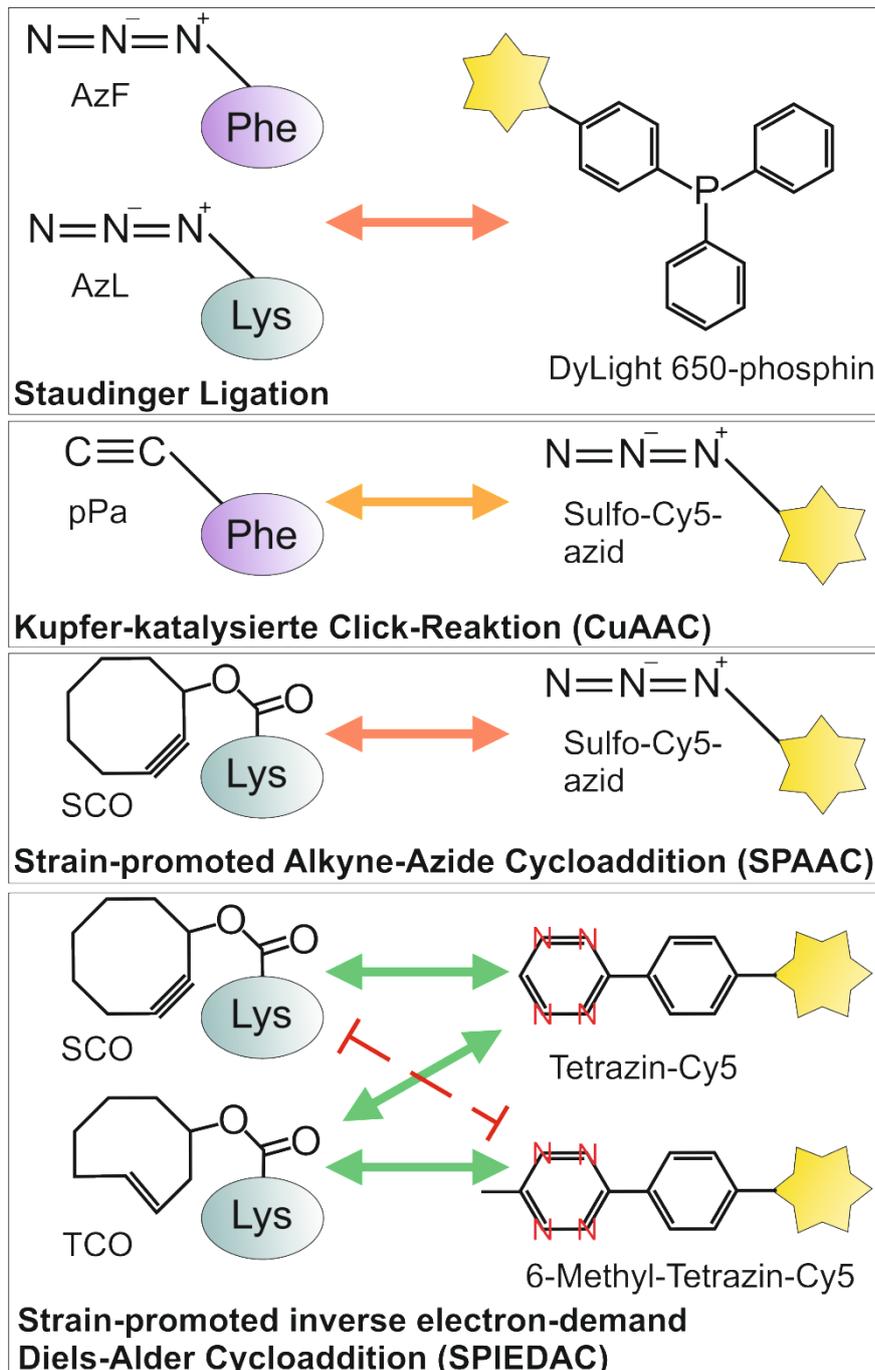


Abbildung S1. Schematische Darstellung der eingesetzten nkAs mit den jeweiligen Reaktionspartnern und Reaktionen. Es wurden fünf verschiedene nkAs (AzF, AzL, pPa, SCO und TCO) auf Basis von Phenylalanin (Phe) und Lysin (Lys) in die jeweiligen Zielproteine eingebaut und durch vier verschiedene Reaktionen modifiziert. Die Farbe der Pfeile indiziert die Reaktionskinetik der Click-Reaktion (orange: langsame Umsetzungsgeschwindigkeit, gelb: schnelle Umsetzungsgeschwindigkeit, grün: sehr schnelle Umsetzungsgeschwindigkeit, gestrichelte rote Linie: Edukte reagieren nicht mit einander).

Mikroskopie	In-Gel Fluoreszenz	Farbstoff	Reaktive Gruppe	Klickreaktion
Eigenfluoreszenz	grün	Sulfo-Cy3-Azid	Azid	CuAAC
	grün	Sulfo-Cy5-Azid		
	rot	Tetramethylrhodamine (TAMRA) Azid, 5-isomer		
Eigenfluoreszenz	grün	ATTO 532-Azid	Alkin	CuAAC
	grün	6-FAM-Azid		
	rot	520-Bodipy Alkin		
	grün	651-Blue Oxazin Alkin		
	rot	Alexa Fluor 555 Alkin		
	grün	Alexa Fluor 647 Alkin		
	rot	DY-490-Alkin		
	rot	DY-530-Alkin		
	grün	DY-649-Alkin	DIBO	SPAAC
	rot	Click-IT Alexa Fluor 488 DIBO Alkin		
	rot	Click-IT Alexa Fluor 594 DIBO Alkin	DBCO	SPAAC
	rot	DBCO-PEG4-5/6-Carboxyrhodamine 110		
	rot	DBCO-Sulfo-Cy3		
	rot	DBCO-Sulfo-Cy5	Phosphin	Staudinger-Ligation
	grün	DY-632-phosphin		
	grün	DyLight 650-phosphin		
	grün	DyLight 488-phosphin		

Abbildung S2. Analyse von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen auf ihre Eignung für mikroskopische Untersuchungen und In-Gel Fluoreszenz. Die integrierten nkAs pPa oder AzF in den Adora2a wurden im Anschluss an die Synthese mit verschiedenen reaktiven Fluoreszenzfarbstoffen mit variierenden Reaktivitäten gekoppelt. grün = Bande des markierten Adora2a in der In-Gel Fluoreszenz sichtbar bzw. Mikroskopie zeigte einen Unterschied zu den unspezifisch markierten Mikrosomen, rot = keine Bande des des markierten Adora2a in der In-Gel Fluoreszenz sichtbar bzw. Mikroskopie zeigte keinen Unterschied zu den unspezifisch markierten Mikrosomen.

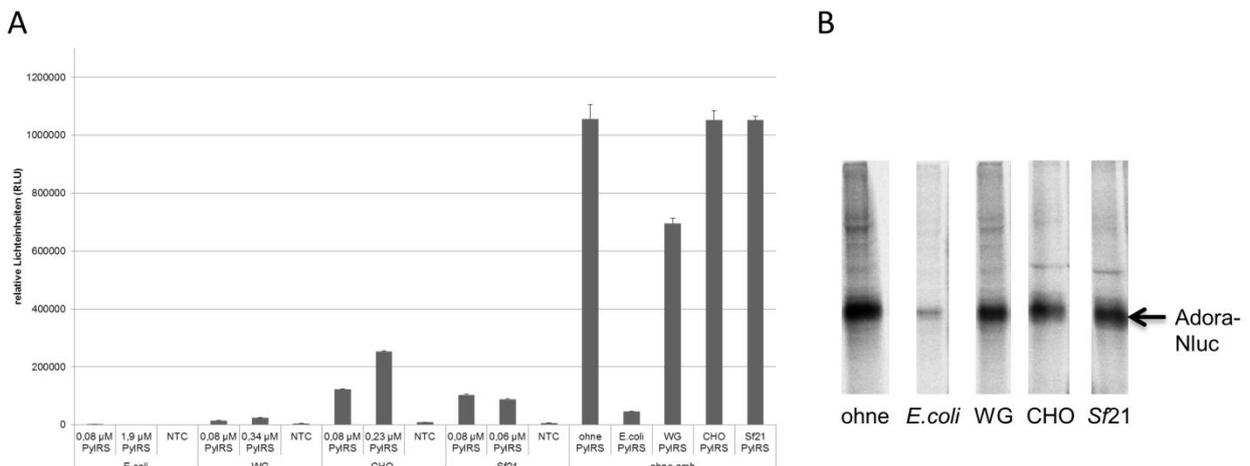


Abbildung S3. Einfluss des Überstandes der Synthese der PyIRS aus verschiedenen zellfreien Systemen auf den Adora2a-Nluc. Es wurde das maximal mögliche Volumen des Überstandes der synthetisierten PyIRS aus den verschiedenen Systemen *E. coli*, Weizenkeim, CHO und Insekt zu einer Synthese des Adora2a-Nluc gegeben und der Einfluss mittels Lumineszenzmessung (A) und Autoradiographie (B) detektiert.

8. Lebenslauf

Die Seite 139 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

9. Publikationen, Vorträge, Posterpräsentationen und Preise

Publikationen, peer-reviewed

Dondapati SK, Lübberding H, Zemella A, Thoring L, Wüstenhagen DA, Kubick S; *Functional Reconstitution of Membrane Proteins Derived From Eukaryotic Cell-Free Systems*. *Frontiers in Pharmacology* Aug 2019

Thoring L, Zemella A, Wüstenhagen DA, Kubick S; *Accelerating the Production of Druggable Targets: Eukaryotic Cell-free Systems come into Focus*. *Methods and Protocols* Apr 2019

Zemella A, Richter T, Thoring L, Kubick S; *A Combined Cell-Free Protein Synthesis and Fluorescence-based Approach to Investigate GPCR Binding Properties*. *Methods in Molecular Biology* Apr 2019

Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Samalikova, Ehren P, Wüstenhagen DA, Kubick S; *Cell-free protein synthesis as a novel tool for directed glycoengineering of active erythropoietin*. *Scientific Reports* Jun 2018

Zemella A, Grossmann S, Sachse R, Sonnabend A, Schaefer M, Kubick S; *Qualifying a eukaryotic cell-free system for fluorescence based GPCR analyses*. *Scientific Reports* Jun 2017

Sonnabend A, Spahn V, Stech M, Zemella A, Stein C, Kubick S; *Production of G protein-coupled receptors in an insect-based cell-free system*. *Biotechnology and Bioengineering* Oct 2017

Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S; *Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems*. *ChemBioChem* Nov 2015

Vorträge

Site-specific modification of G protein-coupled receptors in eukaryotic cell-free systems, “1. Berlin Interdisciplinary Symposium for Young GPCR Researchers” (April 2018)

Site-specific functionalization of “difficult-to-express-proteins” by using cell-free systems, Tagung „New and Emerging Technologies“ (Sep 2017)

Zellfreie Systeme für Kupfer-katalysierte und kupfer-freie Markierung von Proteinen, ScienceDay des Fraunhofer-Instituts für Zelltherapie und Immunologie (Jun 2016)

Membrane Protein Engineering in Eukaryotic Cell-free Systems: Functional Characterization of G protein-coupled receptors, PhD Symposia on complex enzymes for biosensor applications (Nov 2015)

Reconstitution of tyrosine kinase signaling in cell-free systems: Synthetic membrane protein dimerization and lipid modification, 2nd PhD Student Meeting in DFG Priority Program 1623 (Mai 2015)

Posterpräsentationen

Development of novel orthogonal systems for the modification of proteins in cell-free systems, GlycoBioTec Berlin (Jan 2019)

Characterization of the Adenosine 2 α Receptor in a Eukaryotic Cell-free System, Early Career Scientist Forum on GPCR Signal Transduction (Jul 2018)

Production and Functional Analyses of G Protein-Coupled Receptors in Eukaryotic Cell-Free Systems, 1. Berlin Interdisciplinary Symposium for Young GPCR Researchers (April 2018)

The potential of cell-free protein synthesis for glycoengineering of active human erythropoietin, New and Emerging Technologies (Sep 2017)

Cell-free protein synthesis as novel technology for the site-directed modification of “difficult-to-express” proteins, International Symposium on Bioorganic Chemistry Konstanz (Sep 2017)

Site-specific functionalization of “difficult-to-express-proteins” by using cell-free systems, PEGS Bosten (Mai 2017)

Cell-free systems for synthesis, modification and analysis of glycoproteins, GlycoBioTec Berlin (Jan 2017)

Cell-Free synthesis meets protein engineering: Current prospects in labeling of difficult-to-express-proteins, Chemical Biology Heidelberg (Aug 2016)

Analysis of fluorescent labeled membrane proteins using a eukaryotic cell-free orthogonal system, Seeing is Believing Heidelberg (Okt 2015)

Membrane protein engineering using non-canonical amino acids in eukaryotic cell-free systems, Translational Control Heidelberg (Sep 2015)

Cell-free synthesis of G-protein coupled receptors based on eukaryotic cell extracts, Signal Transduction Society Weimar (Nov 2014)

Preise

Fluorescence based Characterization of the Adenosine A2 α Receptor in a Eukaryotic Cell-free System (Zemella A, Richter T, Thoring L, Kubick S), Posterpreis auf der Konferenz „New and Emerging Technologies” (Sep 2017)