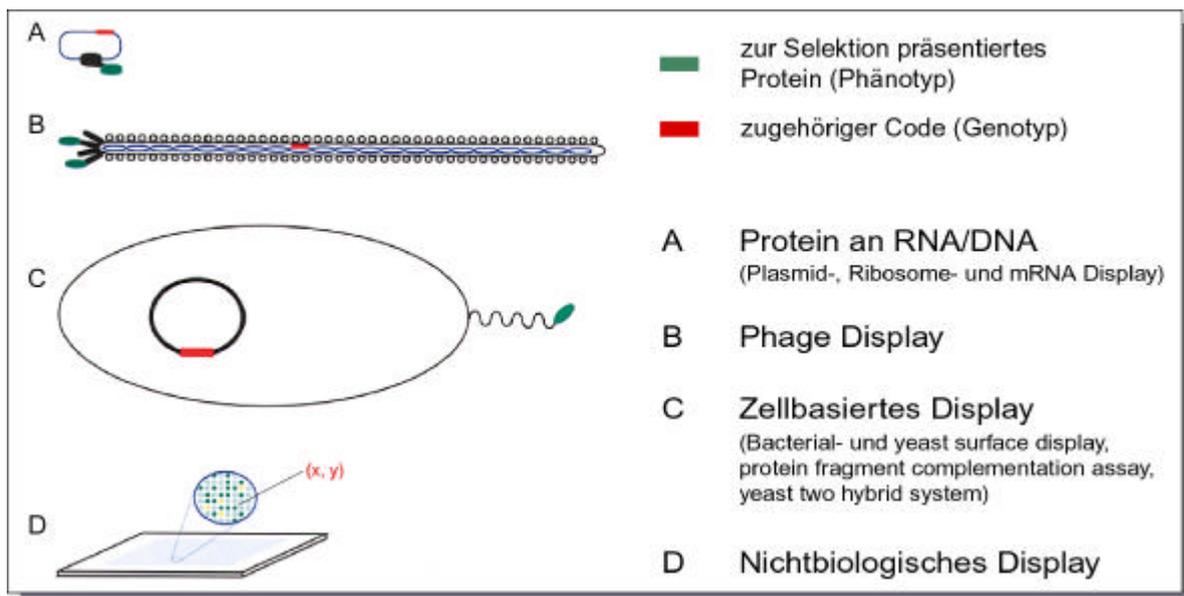


## Einleitung

Der in jüngster Zeit zu beobachtende Abschluß verschiedenster Genomprojekte und die damit verbundene schnell zunehmende Anzahl neuer Gene, wird in Zukunft die Erforschung der Genprodukte in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses treten lassen. Das Proteom, d.h. der komplette Satz aller vom Genom kodierten Proteine, determiniert den zellulären Phänotyp und die möglichen Antworten auf externe Signale. Mit anderen Worten handelt es sich bei den Proteinen um die Schlüsselfiguren in der Zelle und aus diesem Grund werden sie zukünftig eine entscheidende Rolle in der Diagnostik, Therapie und bei industriellen Applikationen spielen. Diese Aussichten brachten wachsendes Interesse der Wissenschaftler weltweit, als auch der pharmazeutischen Industrie an Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ausgewählten Molekülen mit sich und führten zu einer gesteigerten Nachfrage nach ausgeklügelten Methoden zur schnellen Identifikation, Charakterisierung und potentiellen Verbesserung der Interaktionspartner.

### 1.1 Selektion von Proteinen

Das Grundproblem bei der Selektion von Proteinen besteht darin, daß sie keine genetischen Moleküle sind und demzufolge durch kein bekanntes Enzym kopiert werden können. Die Lösung dieses Problems erscheint offensichtlich und besteht in der Kopplung des Genotyps, in Form von DNA oder RNA, mit dem Phänotyp, in Form des Proteins.



**Abb. 1 Beispiele für die vier grundsätzlichen 'Display' Systeme**

Es wurden die verschiedensten Ansätze, welche die Selektion von Proteinen zum Ziel haben, entwickelt, wobei die Kopplung von Genotyp und Phänotyp auf unterschiedlichste Weise erreicht wurde. Die vier wesentlichen Kopplungsprinzipien (Li, 2000) sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die Selektionssysteme ‘Plasmid Display’ (Gates *et al.*, 1996), ‘Phage Display’ (Smith, 1985; Winter *et al.*, 1994), ‘Bacterial Surface Display’ (Georgiou *et al.*, 1993; Daugherty *et al.*, 1999), ‘Yeast Surface Display’ (Kieke *et al.*, 1997; Boder und Wittrup, 1997), ‘Yeast Two Hybrid System’ (Fields and Song, 1989; Chien *et al.*, 1991) und ‘Protein Fragment Complementation Assay’ (Pelletier *et al.*, 1998) beinhalten alle einen notwendigen *in vivo* Schritt, welcher eine Reihe von Nachteilen mit sich bringt und im folgenden Kapitel diskutiert wird. Beim ‘Ribosome- und mRNA Display’ (Kapitel 1.3.2 und 1.3.3.1) handelt es sich um die ersten reinen *in vitro* Systeme zur Selektion von Proteinen. Sie wurden erst in jüngster Zeit durch Verwendung der zellfreien Proteinbiosynthese realisiert.

### 1.1.1 *In vivo* versus *in vitro* Selektion

Alle *in vivo* Methoden haben gemeinsam, daß die gewöhnlich von Plasmiden oder Phagen-Replikons kodierte Bibliothek entweder in Bakterien- oder Hefezellen transformiert werden muß. Diese Mikroorganismen exprimieren dann das Protein beim ‘Yeast Two Hybrid System’ oder ‘Protein Fragment Complementation Assay’ für die Selektion von intrazellulären Bindungspartnern. Alternativ dazu wird beim ‘Bacterial- und Yeast Surface Display’ das Protein auf der Oberfläche präsentiert. Schließlich kann beim ‘Phage Display’ die Bibliothek in Bakterien hineintransformiert werden, um Phagen zu produzieren, die dann das Protein auf ihrer Oberfläche tragen. Offensichtlich wird die Größe der Bibliothek von der Transformationsfrequenz bestimmt, wobei eine typische *E. coli* Bibliothek von etwa  $10^{10}$  das obere Limit darstellt. Auf Hefe basierende Bibliotheken sind sogar etwas kleiner, was auf die geringere Transformationseffizienz in Hefe zurückzuführen ist.

*In vivo* ist eine Präselektion aufgrund der vom Wirt vorgegebenen Bedingungen unvermeidbar. Wachstumsnachteile oder sogar Toxizität der exprimierten Proteine können zu einer Verringerung der Bibliothek führen. Schneller wachsende Mitglieder der Bibliothek können hingegen in der Kultur überrepräsentiert vorliegen, obwohl sie während der tatsächlichen Selektion nicht spezifisch angereichert wurden. Darüber hinaus können Faltung, Transport, Aggregation und proteolytischer Abbau vom Wissenschaftler in der *in vivo* Umgebung nicht kontrolliert werden. Nicht zu vergessen ist, daß es sich bei den Zellen um komplexe, genetische Einheiten handelt, die oft viele Wege finden dem vorgegebenen Selektionsdruck

zu entgehen bzw. ihn zu überleben. All diese Punkte beeinflussen die Größe der Bibliothek, so daß in der Praxis die obere Grenze bei  $10^8$  bis maximal  $10^9$  liegt.

Bei den *in vitro* Selektionssystemen ist keine Transformation notwendig und damit können Protein- und Peptidbibliotheken mit bis zu  $10^{14}$  Mitgliedern (Lamla und Erdmann, 2001) bearbeitet werden. Eine Vergrößerung der Bibliothek verbessert nicht nur die Chance auf eine erfolgreiche Selektion, sondern erhöht auch die Vielfalt der selektierten Moleküle. Lancet *et al.* (1993) machten eine Abschätzung hinsichtlich des Verhältnisses von der Bibliotheksgröße zur höchsten selektierbaren Affinität eines Mitgliedes der Bibliothek. Die Vorhersage war, daß mit einer Vergrößerung der Bibliothek von  $10^8$  auf  $10^{12}$  Sequenzen eine 300-fache Affinitätszunahme des besten selektierten Binders einhergeht. Mit der Möglichkeit sehr große Bibliotheken mittels *in vitro* Selektionstechnologien zu bearbeiten, erhöht sich also auch die Wahrscheinlichkeit eine Reihe verschiedener hochaffiner Binder zu selektieren. Tatsächlich konnten bereits unter Verwendung des 'Ribosome Display' Antikörper mit so niedrigen Dissoziationskonstanten wie 80 pM aus Proteinbibliotheken selektiert werden (Hanes *et al.* 1998; Hanes *et al.*, 2000).

Die *in vitro* Systeme lassen sich leicht mit den *in vitro* Mutagenese-Techniken 'DNA Shuffling' (Stemmer, 1994), Mutagene PCR (Cadwell und Joyce, 1992) und 'Staggered Extension Process' (Zhao *et al.*, 1998) kombinieren. Aber auch schon die Verwendung einer DNA Polymerase ohne Korrekturmechanismus führt während der Selektion zu einer Diversifikation der Ausgangsbibliothek, was auf die bei der PCR entstehenden Mutationen zurückzuführen ist. Dadurch wird schließlich ein wesentlich größerer Sequenzraum abgedeckt, als es mit der ursprünglichen Bibliothek möglich gewesen wäre. Im Prinzip wird die Qualität des 'Pools' iterativ verbessert, da nur die aus der ersten Selektionsrunde hervorgehenden Proteine zur weiteren Diversifikation herangezogen werden. Während aller folgenden Selektionszyklen müssen dann die mutierten Proteine mit ihren Vorläufern konkurrieren. Es ist also durchaus gerechtfertigt, gerade bei Verwendung der angeführten Mutagenese-Techniken während der Selektion, von einer *in vitro* Evolution zu sprechen. Soll im Gegensatz dazu die Vielfältigkeit der Bibliothek bei einer *in vivo* Selektionsstrategie erhöht werden, so kann dies entweder durch Gebrauch eines 'Mutationsstammes' geschehen (Low *et al.*, 1996) oder es muß wiederholt zwischen der Selektionsprozedur *in vivo* und dem Mutageneseschritt *in vitro* gewechselt werden. Der Nachteil bei Arbeiten mit einem 'Mutationsstamm' ist darin zu sehen, daß dabei auch ungewollte Mutationen in dem Plasmid und dem Wirtsgenom entstehen können. Bei der Einführung von *in vitro* Mutageneseschritten handelt es sich hingegen um eine sehr

arbeitsaufwendige Prozedur, da nach jeder Diversifikation die neu kreierte Bibliothek abermals ligiert und transformiert werden muß.

‘Ribosome Display’ hat somit zwei Hauptvorteile gegenüber den *in vivo* Selektionssystemen: einerseits können sehr große Bibliotheken bearbeitet werden, da kein Transformationsschritt erforderlich ist und andererseits ist es einfach, die Bibliothek während der Selektion zu verändern. Ferner ermöglicht das Arbeiten *in vitro* eine gute Kontrolle des Selektions-experimentes auf jeder Stufe.

## 1.2 Zellfreie Translation: Der Schlüssel zur *in vitro* Selektion von Proteinen

Seit den 60er Jahren ist bekannt, daß mRNA- und DNA-abhängige Proteinbiosynthese auch außerhalb der lebenden Zelle möglich ist (Nirenberg und Matthaei, 1961; Chapeville *et al.*, 1962; De Vries und Zubay, 1967; Gold und Schweiger, 1969). Die *in vitro* Proteinsynthese wurde hauptsächlich zur Aufklärung ihres Mechanismus genutzt, vielleicht der faszinierenste Prozeß in der lebenden Zelle, die Kopplung der in Polynukleotiden gespeicherten Information mit der Herstellung funktionaler Proteine. Die zellfreien Systeme basieren auf Zellextrakten, die mit Aminosäuren, Energiekomponenten und einer Nukleinsäure-Matrize versetzt werden (Zubay, 1973; Herrlich und Schweiger, 1974). Wird als Nukleinsäure DNA verwendet, ist die Anwesenheit einer DNA-abhängigen RNA Polymerase erforderlich. In jüngster Zeit ist ein erneutes Interesse an der *in vitro* Translation festzustellen. Dies ist vor allem auf die gesteigerten Proteinausbeuten und die damit verbundenen Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie zurückzuführen (Jermutus *et al.*, 1998). Die Bandbreite neuer Anwendungen beinhaltet die direkte Translation von PCR-Produkten (Kain *et al.*, 1991; Lesley *et al.*, 1991), die neben der *in vitro* Selektion von Proteinen auch die schnelle Durchmusterung von Mutanten und von cDNA-Bibliotheken ermöglicht (Henkel und Baeuerle, 1993; Burks *et al.*, 1997), die Einführung unnatürlicher Aminosäuren (Kurzchalia *et al.*, 1988; Noren *et al.*, 1989; Bain *et al.*, 1992) und grundsätzliche Untersuchungen, wie beispielsweise die Zusammenlagerung von Proteinkomplexen (Huppa und Ploegh, 1997). Nicht zu vergessen ist die Synthese von Proteinen, deren Herstellung in lebenden Zellen nicht oder nur sehr schwer möglich ist. Hierzu gehören Membranproteine, toxische Proteine und solche Proteine, die in der lebenden Zelle stark reguliert werden oder instabil sind (Stiege und Erdmann, 1995).

Die effizientesten Systeme zur zellfreien Proteinsynthese basieren alle auf groben Zellysaten, welche aus *Escherichia coli*, Retikolucyten von Kaninchen oder Weizenkeimen gewonnen werden. Bei Verwendung dieser Systeme in sogenannten ‘Batch-Reaktionen’ beträgt die

Gesamtsynthese an Protein 0,1 bis 400  $\mu\text{g/ml}$  (Kim *et al.*, 1996; Patnaik und Swartz, 1998; Kim und Swartz, 2000). Die Ausbeuten lassen sich durch Verwendung von Dialysesystemen deutlich steigern. Bei solchen Systemen ist die Reaktionsmischung durch eine Dialysmembran von einem Puffer getrennt, der Energiekomponenten und Aminosäuren enthält. Durch Diffusion wird das Gleichgewicht zwischen dem Reaktionsansatz und dem Puffer aufrechterhalten, d.h. die aufgrund der Proteinsynthese auftretenden Konzentrationsunterschiede werden kontinuierlich ausgeglichen. Auf diese Weise werden der Reaktion nicht nur Aminosäuren und Energiekomponenten zugeführt, sondern gleichzeitig niedermolekulare Nebenprodukte (ADP, GDP und  $\text{P}_i$ ) entzogen. Dadurch kann die Proteinsynthese über einen Zeitraum von 14 bis zu 60 h aufrechterhalten werden, was die Syntheseleistung auf 1 bis 6  $\text{mg/ml}$  Protein steigert (Kim und Choi, 1996a; Kigawa *et al.*, 1999; Madin *et al.*, 2000).

Unabhängig vom verwendeten System sind oft erhebliche Unterschiede bei den Translationsausbeuten verschiedener Proteine festzustellen und bis heute wurde kein zellfreies Translationssystem entwickelt, das eine starke Expression und quantitative Faltung jeder beliebigen Proteinsequenz erlaubt. Hinsichtlich der Gesamtausbeute gilt es mindestens drei Probleme zu lösen. Erstens, Sekundärstrukturen der mRNA können die Initiation der Translation inhibieren oder elongierende Ribosomen aufhalten (Kozak, 1989; Yu *et al.*, 1994). Dies wird besonders wichtig, wenn RNA Haarnadelschleifen durch die relativ hohen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen, welche in einem typischen S30 *E. coli* Translationssystem vorliegen, zusätzlich stabilisiert werden. Diese Limitation kann durch stille Mutationen auf Ebene der Primärsequenz beseitigt werden. Zweitens, RNasen und Proteasen können die Proteinausbeute verringern, indem sie die mRNA oder das synthetisierte Protein abbauen. Dieses Problem wird zumeist durch Zugabe von RNase- und Protease-Inhibitoren und durch Kopplung von Transkription und Translation, so daß ständig neue mRNA nachgeliefert wird, gelöst. Ein drittes und allgemeineres Problem ist die Zusammensetzung der dem System zugegebenen tRNAs. Da der genetische Code degeneriert ist, beinhaltet der 'Pool' tRNAs mit unterschiedlichen Anticodons für die gleiche Aminosäure. Die Konzentration dieser verschiedenen tRNAs variiert und das Ergebnis sind sogenannte seltene Codons auf Ebene der mRNA, welche im allgemeinen die Proteinausbeuten verringern. Das Stoppen der Ribosomen an seltenen Codons kann entweder den tmRNA vermittelten proteolytischen Abbau des synthetisierten Proteins (Roche und Sauer, 1999) oder die vorzeitige Termination der Translation mit sich bringen (Komar *et al.*, 1999). Der einzige Weg dieses Problem zu lösen, besteht in der Verwendung eines 'tRNA-Pools', bei dem die tRNAs für jeweils eine Aminosäure in unterschiedlichen molaren Verhältnissen vorliegen (De Pasquale und Kanduc, 1998).

Viele Anwendungen der zellfreien Translation sind auf die richtige Faltung der *in vitro* exprimierten Polypeptide in ihre dreidimensionale Struktur angewiesen, und dies ist eine Grundvoraussetzung für alle Protein-Selektionssysteme, die auf der *in vitro* Translation basieren. Ein entscheidender Vorteil der zellfreien Translation ist, daß es sich um ein offenes System handelt und somit wenigstens im Prinzip jede Komponente der Reaktion ganz bewußt zugefügt oder weggelassen werden kann. Selbst in optimierten Systemen sind die Ausbeuten für alle globulären Proteine nicht annähernd identisch. Die Translationsbedingungen müssen also hinsichtlich der Ausbeute und der korrekten Faltung für das jeweilige Protein von Fall zu Fall optimiert werden.

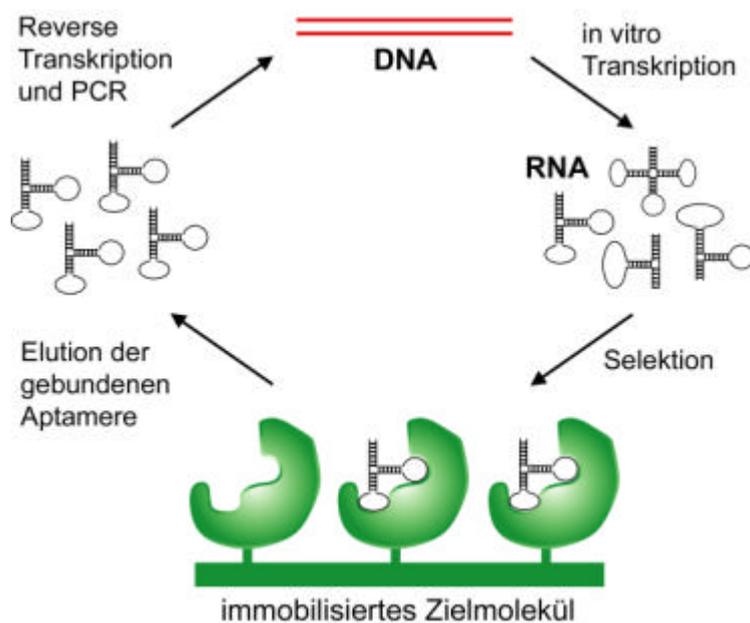
### 1.3 *In vitro* Selektionsstrategien

Obwohl die Selektion von Peptiden und Proteinen im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, ist es trotzdem sinnvoll den Ansatz zur Selektion von Nukleinsäuren kurz zu erläutern, da diese Methode die Basis für die *in vitro* Selektion von funktionalen Proteinen begründet.

#### 1.3.1 SELEX

Tuerk und Gold führten 1990 eine Technologie ein, die sie ‘Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment’ (SELEX) nannten. Mit der SELEX-Methode ist es möglich RNA-Liganden aus einem ‘Pool’ randomisierter Oligonukleotide während mehrerer Runden exponentiell anzureichern. Viele Proteinmotive und –funktionen können von gefalteten RNA-Strukturen nachgeahmt werden (Roberts und Ja, 1999). Gegenwärtig wird diese Methode vielfach zur Selektion von Nukleinsäure-Liganden (Aptameren) eingesetzt, die an zahlreiche Zielmoleküle mit potentiellen Anwendungsmöglichkeiten in der Diagnostik und Biotechnologie binden (Osborne *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurden mittels SELEX nukleinsäurebasierte Katalysatoren (Ribozyme) für eine Reihe von Reaktionen isoliert (Gold *et al.*, 1995). Bei der SELEX werden etwa 6-20 Runden, bestehend aus *in vitro* Transkription einer randomisierten Nukleinsäurebibliothek, Affinitätsselektion und RT-PCR, durchgeführt, wobei es zur exponentiellen Amplifikation der selektierten Moleküle kommt. Das der SELEX zugrundeliegende Prinzip ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach mehreren Selektionsrunden können die Binder kloniert, sequenziert und nachfolgend weiter charakterisiert werden. Nicht zu vergessen ist, daß bei der SELEX Genotyp und Phänotyp gleichzeitig vom selben RNA-Molekül repräsentiert werden. Seine Funktion erhält das RNA-Molekül aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur, welche wiederum durch seine Nukleotidsequenz festgelegt wird.

Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, daß RNA-Moleküle als Liganden einige entscheidende Nachteile haben und im Verlauf der Evolution fast vollständig von Peptiden und Proteinen ersetzt wurden. RNA ist ein Polyanion und somit basiert die Bindung selektierter Aptamere häufig auf positive Ladungen am Zielmolekül (Hermann und Patel, 2000), wodurch die Anzahl blockierbarer Epitope eines Proteins eingeschränkt wird. Weiterhin ist RNA extrem anfällig gegenüber dem Abbau durch RNasen, die allgegenwärtig sind. Für jeglichen weiteren Einsatz von Aptameren, muß die RNA zuerst stabilisiert werden. Dies kann durch Einführung stabiler Nukleotidanaloga, wie Phosphorthioate oder durch Substitution der 2'-OH durch eine 2'-NH<sub>2</sub> Gruppe geschehen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von sogenannten Spiegelmeren (= spiegelbildliche Aptamere, aus L-Riboseeinheiten aufgebaut), da sie von den stereospezifischen Nukleasen nicht erkannt werden. Zur Erzeugung von Spiegelmeren wird zunächst ein Aptamer gegen das Spiegelbild des Zielmoleküls selektiert (Klußmann *et al.*, 1996). Danach wird ein Aptamer gleicher Sequenz aber bestehend aus spiegelbildlichen Bausteinen (L-Nukleotiden) synthetisiert. Dieses Spiegelmer ist nun in der Lage das ungespiegelte Zielmolekül spezifisch zu erkennen.



**Abb. 2 Prinzip der SELEX.** Ein 'DNA-Pool' wird in vitro transkribiert und die erhaltene RNA wird direkt einer Affinitätsselektion mit dem immobilisierten Zielmolekül unterzogen. RNA-Moleküle die binden (sog. Aptamere) werden anschließend eluiert. Durch RT-PCR wird der mit Bindern angereicherte DNA-Pool wieder erhalten und kann für eine weitere SELEX-Runde verwendet werden.

Der anfängliche und immer noch bestehende Reiz der SELEX ist die schnelle Generierung von hochaffinen Bindern mit Hilfe von sehr großen Bibliotheken ( $10^{15}$  bis  $10^{16}$  Sequenzen), da die RNA Transkripte direkt die Liganden bilden.

### 1.3.2 'Ribosome Display'

Bereits in ihrer Originalarbeit zur SELEX spekulierten Tuerk und Gold (1990), daß ein ähnlicher Ansatz zur Selektion von Proteinen herangezogen werden könnte. Dabei bezogen

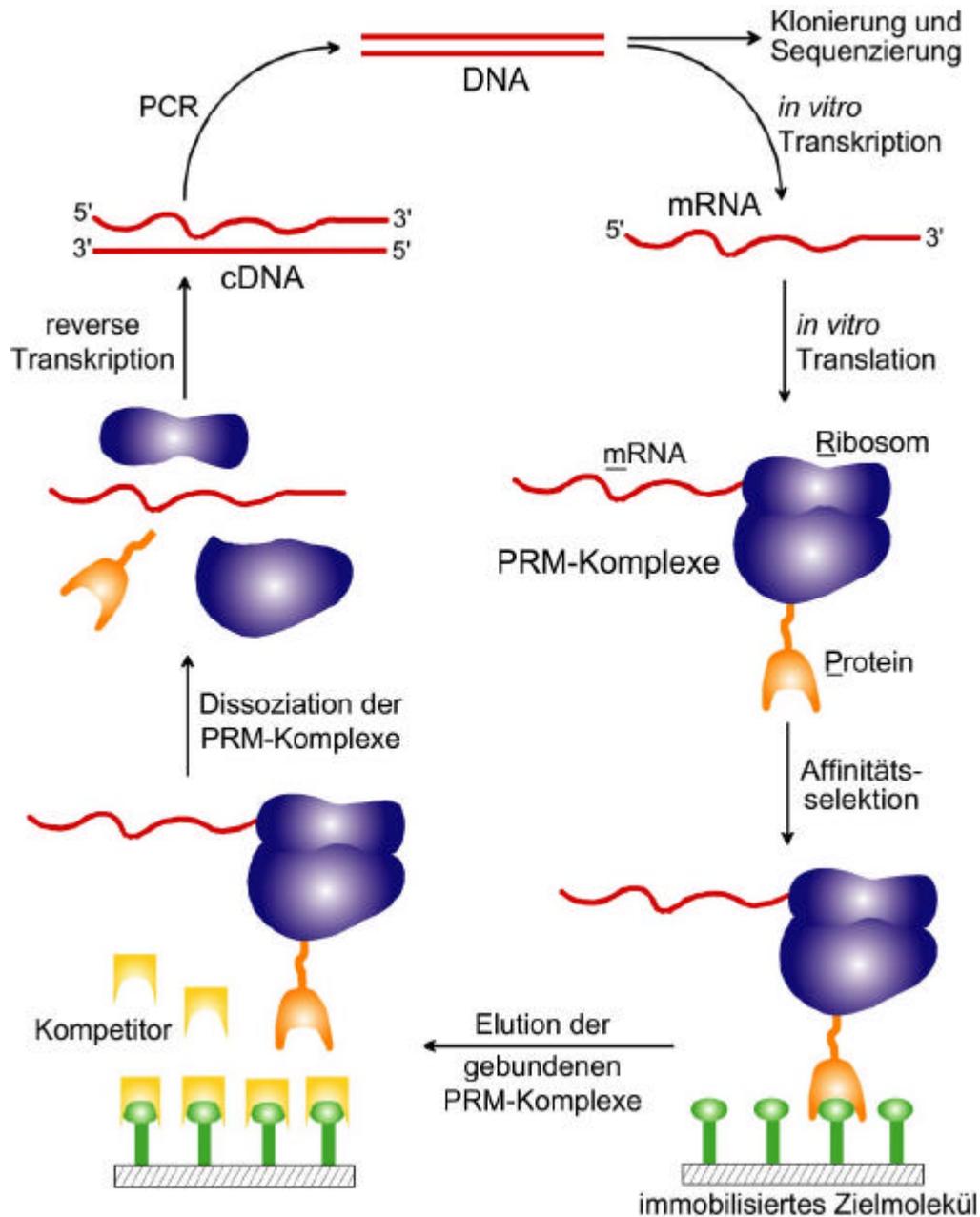
sie sich auf Experimente, die die Isolation besonderer mRNAs aus einem 'Pool' unterschiedlicher Varianten durch Immunopräzipitation der wachsenden Polypeptide im Komplex mit dem Ribosom und der mRNA beschrieben (Korman *et al.*, 1982; Kraus und Rosenberg, 1982).

Das erste System zur *in vitro* Selektion von Peptiden wurde von Mattheakis und Mitarbeitern (1994) vorgestellt. Mit Hilfe ihres 'Polysome Display' Ansatzes und unter Verwendung eines *E. coli* S30 *in vitro* Translationssystems gelang ihnen erstmals die Selektion kurzer Peptide aus einer Bibliothek. Das Konzept des 'Polysome Display' zur Selektion von Peptiden (Mattheakis *et al.* 1996; Gersuk, *et al.* 1997) wurde von Hanes und Plückthun (1997) aufgegriffen und diente als Grundlage zur Entwicklung des 'Ribosome Displays'. Diese Methode ermöglicht die *in vitro* Selektion funktionaler Proteine, wobei die Translation ebenfalls auf einem zellfreien *E. coli* S30 Translationssystem basiert. Noch im selben Jahr wurde ein weiterer 'Ribosome Display' Ansatz publiziert, welcher sich durch Verwendung eines eukaryontischen Translationssystems und Durchführung der RT-PCR mit den an Magnetpartikeln gebundenen ribosomalen Komplexen vom vorherigen Ansatz unterscheidet (He und Taussig, 1997). Der Name der Methode wurde in Analogie zum 'Phage Display' gewählt. Beim 'Phage Display' werden die Mitglieder einer Proteinbibliothek auf der Oberfläche von Phagen präsentiert und dementsprechend wird diese Aufgabe beim 'Ribosome Display' von Ribosomen übernommen.

### 1.3.2.1 Prinzip des 'Ribosome Displays'

Das dem 'Ribosome Display' zugrundeliegende Prinzip ist in Abbildung 3 dargestellt. Ausgehend von einer DNA-Bibliothek, die eine Peptid- bzw. Proteinbibliothek kodiert, wird zuerst *in vitro* transkribiert. Die erhaltene mRNA wird aufgereinigt und während einer *in vitro* Translation in Protein übersetzt. Entscheidend ist nun, daß die verwendeten mRNAs kein Stop-Codon besitzen, da so die Termination ausbleibt, was die Entstehung von Protein-Ribosom-mRNA-Komplexen (PRM-Komplexe) zur Folge hat. Diese ternären Komplexe enthalten ein funktional gefaltetes Protein, das aus dem Ribosomentunnel hervortritt und über seinen C-Terminus noch mit der tRNA verbunden ist (Hanes und Plückthun, 1997). Damit sich das Protein richtig falten kann, muß ein unstrukturiertes Peptid auf das eigentliche Protein folgen und den Ribosomentunnel überbrücken. Bei diesem Peptid handelt es sich um einen sogenannten 'Spacer', dessen kodierender Bereich direkt auf die Genregion folgt, die das Protein kodiert. Bei Verwendung des *E. coli* Systems können die PRM-Komplexe durch eine hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentration (50 mM), sowie Absenkung der Temperatur auf 0-4°C sehr effizient stabilisiert und dann einer Affinitätsselektion unterzogen werden. Man geht davon

aus, daß hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen durch Bindung an die rRNA das Ribosom „komprimieren“, was es für die Peptidyl-tRNA schwierig macht zu dissoziieren oder hydrolysiert zu werden.



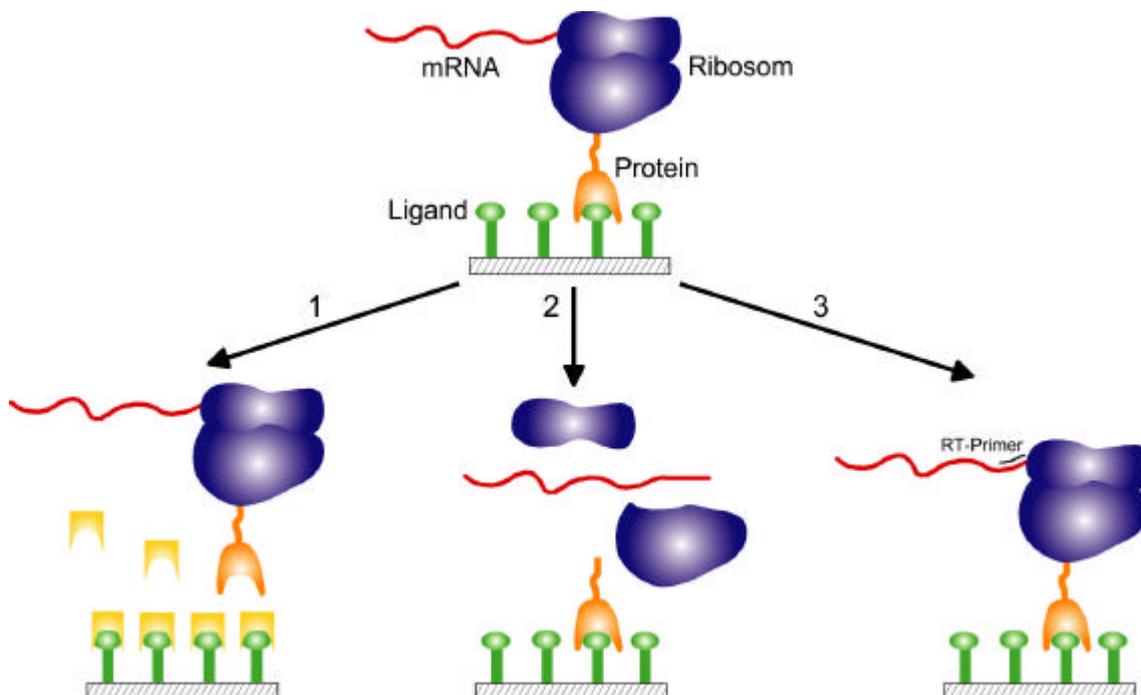
**Abb. 3 Prinzip des 'Ribosome Display'.** Eine DNA kodierte Proteinbibliothek wird *in vitro* transkribiert und translatiert. Da die mRNA kein Stopcodon besitzt entstehen Protein-Ribosom-mRNA-Komplexe (PRM-Komplexe), die direkt einer Affinitätsselektion mit dem immobilisierten Zielmolekül unterzogen werden können. Die in gebundenen PRM-Komplexen befindliche mRNA wird isoliert oder direkt durch Dissoziation der gebundenen Komplexe eluiert und aufgereinigt. Die mRNA wird revers transkribiert und die cDNA durch PCR amplifiziert, wobei der T7 Promotor eingefügt wird. Der 'DNA-Pool' kann für die nächste Selektionsrunde verwendet und ein Teil durch Klonierung und Sequenzierung analysiert werden.

Die niedrige Temperatur verlangsamt wahrscheinlich die Hydrolyse der Peptidyl-tRNA Esterbindung und vielleicht auch thermische Bewegungen, die die Dissoziation der Peptidyl-

tRNA erleichtern würden. So behandelte PRM-Komplexe sind bis zu mehreren Tagen stabil (Jermutus *et al.* 2000).

Für die Affinitätsselektion der ribosomalen Komplexe kann das Zielmolekül entweder auf einer Oberfläche immobilisiert sein (Sephrose oder Agarose, Mikrotiterplatten, Magnetpartikel) oder es liegt biotinyliert vor und wird nach Bindung an das im PRM-Komplex befindliche Protein mit Streptavidin beschichteten Magnetpartikeln eingefangen. Der Vorteil einer Bindung zwischen dem Zielmolekül und dem Protein in Lösung besteht in der gut definierten Ligandenkonzentration und zudem ist der Ligand größtenteils in seiner nativen Konformation. Dadurch ist die Anzahl unspezifisch gebundener PRM-Komplexe gewöhnlich niedriger (Plückthun *et al.*, 2000). Darüber hinaus kann eine unspezifische Bindung der ternären Komplexe während der Affinitätsselektion durch Verwendung von Heparin verringert werden (Hanes *et al.*, 1998).

Nach der Affinitätsselektion werden unspezifisch gebundene PRM-Komplexe durch intensives Waschen mit 0-4°C kaltem, magnesiumhaltigem Puffer entfernt. Anschließend kann die genetische Information auf unterschiedliche Weise wiedergewonnen werden (Abb. 4).



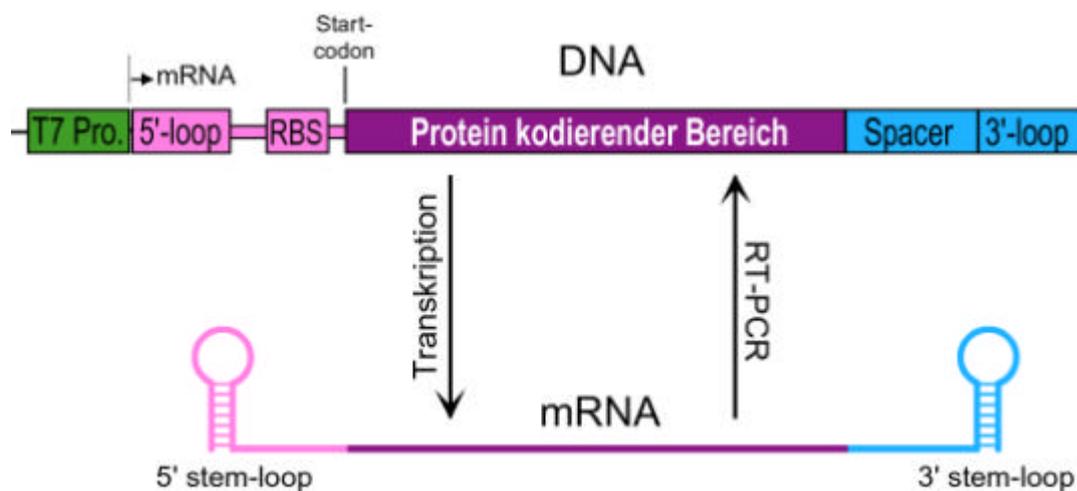
**Abb. 4 Strategien zur Wiedergewinnung der genetischen Information.** (1) Elution der PRM-Komplexe mit einem spezifischen Kompetitor, gefolgt von einer Zerstörung der Komplexe durch Phenol oder (2) der Dissoziation durch EDTA. (3) Direkte RT-PCR mit den gebundenen PRM-Komplexen.

Die Entfernung der  $Mg^{2+}$ -Ionen mit einem Überschuss von EDTA führt zur Dissoziation aller gebundenen Komplexe, was die direkte Isolation der mRNA ermöglicht. Alternativ dazu können die gebundenen PRM-Komplexe durch einen spezifischen Kompetitor oder freien

Liganden eluiert und die mRNA anschließend durch Zerstörung der Komplexe mit Phenol oder durch Dissoziation mit EDTA isoliert werden. Dies hat den Vorteil, daß nur mRNAs aus den Komplexen isoliert werden, die über ein funktionales und spezifisch bindendes Protein verfügen. Allerdings könnte dieser Ansatz bei sehr starken Bindern Probleme bereiten. Die isolierte mRNA wird durch eine reverse Transkription und anschließende PCR amplifiziert und steht nun für eine weitere Selektionsrunde zur Verfügung. Erfolgt die Selektion mit Magnetpartikel, kann die RT-PCR direkt mit den gewaschenen Partikeln durchgeführt werden (He und Taussig, 1997).

### 1.3.2.2 Das 'Ribosome Display' Konstrukt

Die Merkmale des 'Ribosome Display' Konstruktes sind in Abbildung 5 zusammengefaßt. Auf Ebene der DNA benötigt das Konstrukt einen T7 Promotor für effiziente *in vitro* Transkription. Auf Ebene der mRNA enthält das Konstrukt eine regulatorische Sequenz für effiziente Translation. Dabei handelt es sich entweder um eine prokaryontische Ribosomenbindungsstelle (Shine und Dalgarno, 1975), wenn ein *E. coli* System benutzt wird oder eine Kozak Konsensus-Sequenz (Kozak, 1984), bei Verwendung eines eukaryontischen Translationssystems.



**Abb. 5 Konstrukt für das 'Ribosome Display' im *E. coli* System.** Auf DNA-Ebene folgt auf den T7 Promotor die Ribosomenbindungsstelle (RBS, oder Shine-Dalgarno Sequenz) und die für das Protein kodierende Sequenz. Ein 'Spacer' folgt im Leserahmen direkt auf den Bereich des Proteins ohne ein Stopcodon. Die sich durch Transkription ergebende mRNA weist 'stem-loop' Strukturen an beiden, dem 5'- und dem 3'-Ende auf. Um ausgehend von der mRNA das vollständige DNA-Konstrukt zu erhalten, muß der T7 Promotor während der PCR eingeführt werden.

Auf diese Sequenz folgt der offene Leserahmen, der das zu „präsentierende“ Protein kodiert und im direkten Anschluß eine 'Spacersequenz', die einen Abstandshalter kodiert. Dabei handelt es sich um ein mindestens 30-40 Aminosäuren umfassendes Peptid, das sich am C-Terminus des Proteins befindet und zwei Aufgaben erfüllt. Erstens verbindet es das syntheti-

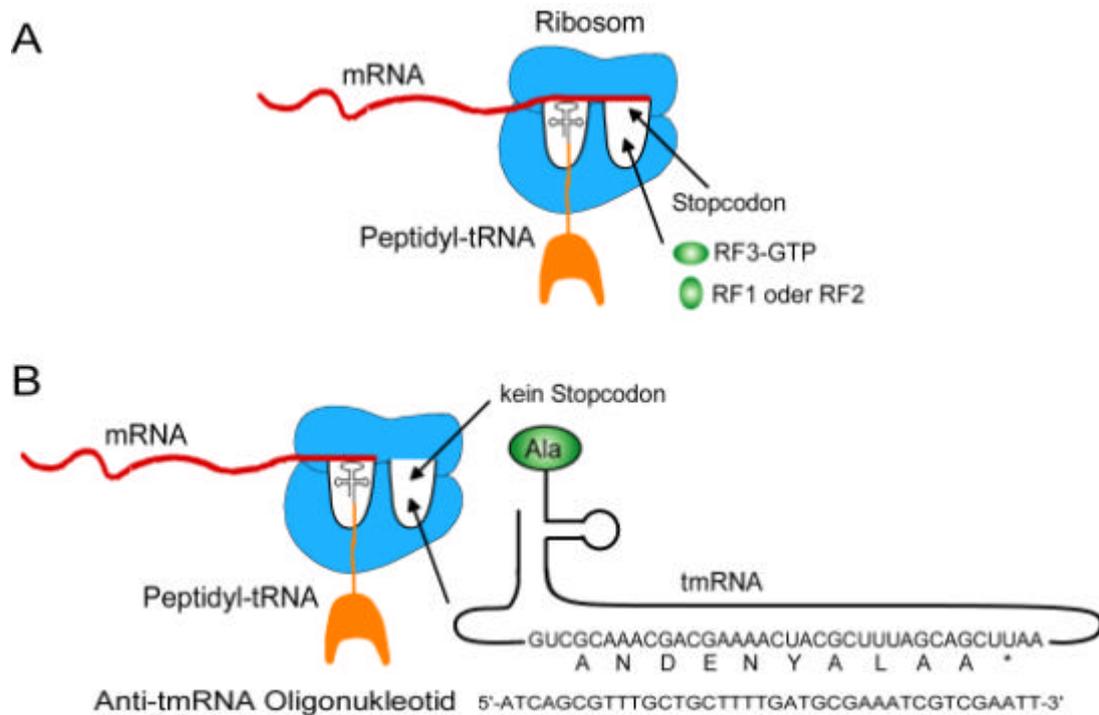
sierte Protein mit dem Ribosom. Zweitens hält es den strukturierten Teil des Proteins außerhalb des Ribosoms und ermöglicht so dessen Faltung und Interaktion mit dem Liganden. Der Ribosomentunnel bedeckt etwa 25 bis 30 C-terminale Aminosäuren der wachsenden Polypeptidkette während der Proteinsynthese und kann somit die Faltung des Proteins verhindern (Malkin und Rich, 1967; Smith *et al.*, 1978; Makeyev *et al.*, 1996).

Weiterhin verfügt das 'Ribosome Display' Konstrukt über Sekundärstrukturelemente an beiden Enden der mRNA. Es handelt sich dabei um sogenannte 'stem-loops', also Bereiche der mRNA deren Basen nach Ausbildung einer Haarnadelschleife miteinander wechselwirken und somit Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Es ist bekannt dass 'stem-loops' die mRNA *in vivo* ebenso wie *in vitro* gegen RNasen schützen. Die Anwesenheit dieser Strukturen ist besonders wichtig bei Verwendung eines *E. coli* Translationssystems, da diese Lysate hohe RNase Aktivitäten aufweisen. Die 'stem-loop' Strukturen schützen die mRNA besonders vor dem Abbau durch die Exonukleasen PNPase und RNaseII, die ausgehend vom 3'-Ende der mRNA agieren (Hajnsdorf *et al.*, 1996) und gegen RNaseE, die das 5'-Ende erkennt (Bouvet und Belasco, 1992).

Der kodierende Bereich endet mit der unstrukturierten Proteinsequenz, d.h. es tritt kein Stopcodon auf. Im prokaryontischen System würde die Anwesenheit eines Stopcodons zur Bindung der Freisetzungsfaktoren (Grentzmann *et al.*, 1995; Tuite und Stansfield, 1994) und des Ribosomenrecyclingfaktors (Janosi *et al.*, 1994) an die PRM-Komplexe führen. Dies würde dann in der Freisetzung des Proteins durch Hydrolyse der Peptidyl-tRNA resultieren (Tate und Brown, 1992) und damit verbunden die ribosomalen Komplexe dissoziieren (Abb. 6A). Ein ähnlicher Mechanismus existiert in eukaryontischen Systemen (Frolova *et al.*, 1994; Zhouravleva *et al.*, 1995).

Eine weitere wichtige Voraussetzung für effizientes 'Ribosome Display' im *E. coli* System ist die Eliminierung der tmRNA, auch bekannt als 10Sa RNA oder SsrA RNA (Ray und Apirion, 1979). Die tmRNA ist eine stabile bakterielle RNA mit einer tRNA-ähnlichen Struktur (Komine *et al.*, 1994). Wenn eine verkürzte mRNA ohne Stopcodon in *E. coli* translatiert wird, stoppt das Ribosom am Ende der mRNA. Die tmRNA bindet nun an der ribosomalen A-Stelle und verhält sich wie eine tRNA, indem sie ein Alanin auf das verkürzte Protein überträgt. Danach fungiert sie als mRNA und ein 'Peptid-tag' mit der in Abbildung 6B angegebenen Sequenz wird dem verkürzten Protein angefügt. Die tmRNA kodiert ein Stopcodon und demzufolge kommt es zur Freisetzung des Proteins. Proteasen, die das C-terminal angehängte Peptid spezifisch erkennen, bauen das Protein anschließend ab (Keiler *et al.*, 1996; Roche und Sauer, 1999). *In vitro* lässt sich die Funktion der tmRNA durch Zugabe des

in Abbildung 6B dargestellten ‘Antisense’ Oligonukleotids (AS-Oligo), das mit dem kodierenden Bereich der tmRNA hybridisieren kann, teilweise unterbinden (Hanes und Plückthun, 1997).



**Abb. 6 Rolle des Stopcodons und der tmRNA bei der E. coli Translation.** (A) Wenn das Ribosom auf ein Stopcodon trifft, bindet ein Komplex aus zwei Freisetzungsfaktoren, RF-1 und RF-3 oder RF-2 und RF-3, anstelle einer tRNA. Die Bindung der Freisetzungsfaktoren führt zur Hydrolyse der Peptidyl-tRNA und Freisetzung des Proteins. (B) Wenn eine verkürzte mRNA ohne Stopcodon in E. coli translatiert wird, bindet die tmRNA an der ribosomalen tRNA Akzeptorstelle. Dies führt erst zu einer carboxyterminalen Veränderung des verkürzten Polypeptids, indem ein von der tmRNA kodiertes Peptid angefügt wird und dann zur Freisetzung vom Ribosom. Das freigesetzte Protein mit dieser C-terminalen Markierung wird schließlich von einer spezifischen Protease abgebaut.

### 1.3.3 Weitere Systeme zur *in vitro* Selektion von Proteinen

#### 1.3.3.1 ‘mRNA Display’

Ein weiterer Ansatz zur Kopplung von Genotyp und Phänotyp, bei dem ein Peptid kovalent mit seiner kodierenden mRNA verknüpft wird, wurde von Roberts und Szostak (1997) und unabhängig von Nemoto *et al.* (1997) entwickelt. Bei dieser Technologie, die anfänglich ‘RNA-peptide fusions’ (Roberts und Szostak, 1997) bzw. ‘mRNA-protein fusions’ (Roberts, 1999; Liu *et al.*, 2000) oder ‘in vitro virus’ (Nemoto *et al.*, 1997) genannt wurde, wird eine *in vitro* transkribierte mRNA an ihrem 3‘-Ende mit einem DNA-Linker ligiert, an den ein Puromycin gekoppelt ist. Das RNA-DNA Konstrukt mit dem am 3‘-Ende befindlichen Puromycin wird nach Aufreinigung *in vitro* translatiert. Das Ribosom stoppt an der RNA-

DNA Verknüpfung und ermöglicht dem Puromycin den Eintritt in die A-Stelle des Ribosoms. Puromycin enthält eine  $\alpha$ -Aminogruppe, welche wie die der Aminoacyl-tRNA eine Peptidbindung mit der Carboxylgruppe der wachsenden Peptidkette bildet. Die Reaktion wird von der Peptidyltransferase katalysiert. Das Produkt ist ein Peptid mit einem kovalent gebundenen Puromycinrest an seinem Carboxylende (Monro und Marcker, 1967). Bei dem so erhaltene Komplex handelt es sich um eine kovalente Verknüpfung von Peptid und kodierender mRNA mittels DNA und Puromycin. Diese Komplexe können zur Affinitätsselektion verwendet und nach der Elution durch RT-PCR amplifiziert werden. Die Ligation zur Erzeugung der mRNA-Puromycin Konjugate ist sehr zeitaufwendig und führt zu Verlusten. Aus diesem Grund wurde von den Mitarbeitern der Firma Phyllos (Lexington, MA, USA) eine weitere Strategie zur Erzeugung dieser Konjugate entwickelt. Es handelt sich dabei um eine lichtinduzierte 'crosslinking' Reaktion mittels Psoralen (Kurz *et al.*, 2000). In Analogie zur Bezeichnung der anderen Selektionssysteme ist in jüngster Zeit der Begriff 'mRNA Display' anstelle von 'mRNA-protein fusions' verwendet worden (Wilson *et al.*, 2001; Keefe und Szostak, 2001).

### 1.3.3.2 „Wasser in Öl Emulsionen“

Eine weitere Möglichkeit für die *in vitro* Selektion von Proteinen besteht in der Separation der Bibliothek auf einzelne Reaktionsräume, so daß pro Reaktionsraum nicht mehr als ein DNA-Molekül vorliegt. Die Kompartimente müssen zusätzlich alle Komponenten für eine *in vitro* Transkriptions-, Translationsreaktion enthalten. Bei solchen Systemen handelt es sich, im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen, um keine physische, sondern um eine räumliche Kopplung von Geno- und Phänotyp. Die benötigten Kompartimente lassen sich durch Wasser-Öl Emulsionen erzeugen, wobei die Reaktionen in den Wassertröpfchen ablaufen. Solche Ansätze konnten bereits erfolgreich als Modellsysteme etabliert werden (Tawfik und Griffith, 1998; Doi und Yanagawa, 1999).

## 1.4 Streptavidin

Das Protein Avidin wurde erstmals im Eiweiß während der Entdeckung und Isolierung des Vitamin B Biotin Ende 1920 bemerkt. Die genaue Funktion von Avidin ist, im Gegensatz zu seiner extrem starken Bindung von Biotin, bis heute nicht geklärt. Mitte der 60er Jahre wurde ein sehr ähnliches Protein aus einem Bakterium isoliert, das der Gattung *Streptomyces* zugehörig war und aus diesem Grund *Streptomyces avidinii* genannt wurde. Das Protein erhielt den Namen Streptavidin. Bei Avidin und Streptavidin handelt es sich um Tetramere,

die aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind. In der Tabelle 1 sind die wesentlichen Daten zu Avidin und Streptavidin zusammengefaßt (Green, 1990; Bayer und Wilchek, 1990).

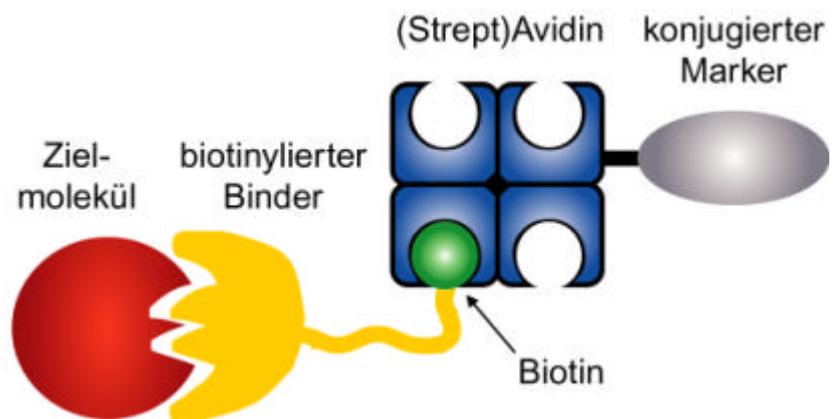
**Tabelle 1: Eigenschaften von Avidinen**

Eigenschaften	Avidin	Streptavidin	
	aus dem Eiweiß	unprozessiert	prozessiert
Aminosäurereste	128	159	125-127
Größe der Untereinheiten aufgrund der Sequenz	15,6 kDa	16,473 kDa	13,4 kDa
SDS-Gel	16,4 kDa	19,0 kDa	14,5 kDa
Untereinheiten	4	4	4
$K_d$ Biotin (pH 7, 25 °C)	$0,6 \times 10^{-15}$ M	-	$4 \times 10^{-14}$ M

Die Prozessierung des Streptavidin findet am N- und C-Terminus statt und ergibt das sogenannte ‘core’ Streptavidin aus 125-127 Resten (Bayer *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1989). Dieser ‘core’ verfügt über die vier Tryptophanreste, die an der Biotinbindung beteiligt sind (Freitag *et al.*, 1999) und weist zudem eine höhere Wasserlöslichkeit als der unprozessierte Vorläufer auf. Bei kommerziell erhältlichem Streptavidin bzw. Streptavidinkonjugaten handelt es sich um das ‘core’ Streptavidin.

Der (Strept)Avidin-Biotin Komplex repräsentiert die höchste in der Natur bekannte Affinität zwischen einem Protein und einem Liganden. Diese Eigenschaft begründete das Fundament für die Avidin-Biotin Technologie, die später auf Streptavidin erweitert wurde (Abb. 7).

**Abb. 7 (Strept-) Avidin-Biotin Technologie.** Ein biologisch aktives Zielmolekül wird von einem biotinylierten Binder erkannt. Anschließend kann der Binder aufgrund des Biotins von einem (Strept-)Avidin-Konjugat erkannt werden. Auf diese Weise läßt sich das Zielmolekül indirekt durch den Marker nachweisen.



Die auf dieser Technologie basierten Anwendungen sind so vielfältig, daß ihnen eine Ausgabe in *Methods in Enzymology* (Vol. 184 „Avidin-Biotin Technology“) gewidmet wurde. Die daraus resultierende Anzahl kommerziell erhältlicher (Strept)Avidin-Konjugate ist unüberschaubar und sicherlich auch ein Grund für die uneingeschränkt breite Anwendung dieser Technologie, die vor über 40 Jahren in den Biowissenschaften eingeführt wurde.

### 1.4.1 Streptavidinbindende Peptide

Eine Reihe unterschiedlicher Ansätze, die alle zum Ziel hatten streptavidinbindende Peptide zu selektieren, wurden beschrieben. Ein erster ‘Phage Display’ Ansatz mit  $2 \times 10^7$  verschiedenen 15-mer Peptiden und Streptavidin beschichteten Kunststoffplatten erfolgte 1990 (Devlin *et al.*, 1990). Es folgte ein Ansatz mit synthetischen Pentapeptiden (Bibliothek  $\leq 19^5$ ), wobei je eine Peptidsorte auf ein „Festphasenkügelchen“ begrenzt war und einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin (Lam *et al.*, 1991). Ein weiterer ‘Phage Display’ Ansatz mit etwa  $10^8$  verschiedenen 38-mer Peptiden und Streptavidin beschichteten Magnetpartikeln wurde von Kay *et al.* (1993) publiziert. Die Ergebnisse der ersten Selektionen, die alle das Tripeptid HPQ (His-Pro-Gln) als Zentralmotiv aufwiesen, dienten als Grundlage für einen ‘Filter-sandwich assay’, bei dem 9-mer Peptide mit dem HPQ-Motiv im Zentrum verwendet wurden. Auf diese Weise konnte das neun Aminosäuren umfassende Streptavidin Bindungspeptid Strep-tag I selektiert werden (Schmidt und Skerra, 1993). Darauf aufbauend ließ sich durch Untersuchung von Peptid-Spots das Affinitätspeptid, das aus acht Aminosäuren besteht und den Namen Strep-tag II erhielt, generieren (Schmidt *et al.*, 1996). Der erste und bisher einzige Ansatz zur *in vitro* Selektion von streptavidinbindenden Peptiden gelang Wilson *et al.* (2001). Ausgehend von etwa  $7 \times 10^{12}$  verschiedenen 88-mer Peptiden konnte ein 38-mer Peptid mittels ‘mRNA Display’ selektiert werden, das von allen bisher selektierten Peptiden die höchste Affinität gegenüber Streptavidin aufweist und SBP-tag (‘Streptavidin- Binding Peptide’) genannt wurde (Keefe *et al.*, 2001a).

Durchweg alle selektierten Streptavidin Bindungspeptide besitzen ein HPQ-Motiv und lassen sich durch Biotin vom Streptavidin verdrängen. Die naheliegende Vermutung, daß diese Peptide in der Biotin Bindungstasche des Streptavidin binden, konnte mittels Röntgenstrukturanalys für die Peptide Strep-tag I und II gezeigt werden (Schmidt *et al.*, 1996). In der Tabelle 2 sind die häufigsten bzw. besten Peptide zusammengefaßt.

**Tabelle 2: Streptavidinbindende Peptide**

Peptid	Sequenz	K <sub>d</sub>
D	ISFENTWLW HPQ FSS (Devlin <i>et al.</i> , 1990)	-
SA.9-2	ARMAGLTE HPQ DIIDHHPGWVHDSKISPRNQDTYHSS (Kay <i>et al.</i> , 1993)	-
Sterp-tag I	WAR HPQ FGG (Schmidt und Skerra, 1993)	10-37 µM
Strep-tag II	WS HPQ FEK (Schmidt <i>et al.</i> , 1996)	13-72 µM
SBP-tag	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEH HPQ GQREP (Keefe, 2001a)	2,5 nM

Die Peptide D und SA.9-2 repräsentieren jeweils die häufigste Sequenz bei diesen Selektionen.