

besseren Selektivität für die Konfiguration des Substrats führen. Anders gesagt würde sich eine feste Flüssigkeit zwischen p- und n-Salzen am Randbereich nicht so leicht bilden, wenn anstelle des Mix nur ein einzelnes Trennreagens eingesetzt würde (Abb. 1b). Das ist vielleicht der Grund für die hohen *ee*-Werte, die für die zuerst ausgefallenen gemischten Salze gemessen werden.

Weitere Informationen über die physikalischen Eigenschaften der Komponenten dieser komplexen Systeme und ihrer Gemische wären jetzt nötig. Dank dieser Entdeckung hat sich ein neues Forschungsfeld eröffnet, das Aspekte wie Phasengleichgewichte, Kristallisationskinetik und die Struktur und Dynamik fester und flüssiger Phasen einbeziehen sollte.

Das größte praktische Interesse dieses „Familien-Ansatzes“ liegt – ungeachtet der physikalisch-chemischen Erklärung – möglicherweise nicht darin, den Prozess zum Auffinden des besten Trennreagens zu beschleunigen, sondern eher im Potential, die Qualität der diastereomeren Salze zu verbessern. Dabei wird eine Selbstoptimierung der Kristallpackung ermöglicht, die aus der Gegenwart von mehreren leicht unterschiedlichen Bausteinen anstelle eines einzigen den Vorteil zieht. Bei DSM Andeno wurde die Methode bereits angewendet, um Racemate im 100-kg-Maßstab zu spalten.<sup>[10]</sup> Es besteht kein Zweifel, daß die „klassische Racematspaltung“ immer noch eine große Zukunft hat,

sowohl in der Grundlagen- als auch in der anwendungsorientierten Forschung.

**Stichwörter:** Chiralität • Diastereomere • Enantiomeren-trennung • Kristallisation

- [1] P. J. Harrington, E. Lodewijk, *Org. Process Res. Dev.* **1997**, *1*, 72.
- [2] J. Kamphuis, W. H. J. Boesten, B. Kaptein, H. F. M. Hermes, T. Sonke, Q. B. Broxterman, W. J. J. van den Tweel, H. E. Schoemaker in *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, New York, **1994**, S. 189.
- [3] J. Jacques, A. Collet, S. H. Wilen, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley, New York, **1981**; J. Jacques, A. Collet, *Reissue with corrections*, Krieger, Malabar, FL, USA, **1994**.
- [4] E. L. Eliel, S. H. Wilen, N. Mander, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, **1994**.
- [5] J. Costante, N. Ehlinger, M. Perrin, A. Collet, *Enantiomer* **1996**, *1*, 377.
- [6] A. Collet in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, D. N. Reinhoudt), Pergamon, Oxford, **1996**, S. 113–149.
- [7] T. Vries, H. Wynberg, E. van Echten, J. Koek, W. ten Hoeve, R. M. Kellogg, Q. B. Broxterman, A. Minnaard, B. Kaptein, S. van der Sluis, L. Hulshof, J. Kooistra, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391; *Angew. Chem Int. Ed.* **1998**, *37*, 2349.
- [8] Für eine Diskussion siehe: A. Collet, L. Ziminski, C. Garcia, F. Vigné-Maeder in *Supramolecular Stereochemistry* (Hrsg.: J. S. Siegel), Kluwer, Dordrecht, **1995**, S. 91–110 (NATO ASI Series).
- [9] A. Fredga, *Tetrahedron* **1960**, *8*, 126.
- [10] L. A. Hulshof, Q. B. Broxterman, T. R. Vries, H. Wijnberg, E. van Echten (DSM N.V.), EP-B 0 838 448 A1, **1997** [*Chem. Abstr.* **1998**, *129*, 4278].

## In-vitro-Evolution und Selektion von Proteinen: durch Ribosomen-Display zu größeren Bibliotheken\*\*

Ulrich Hoffmüller und Jens Schneider-Mergener\*

Ein sich seit Beginn der 90er Jahre stürmisch entwickelndes Forschungsgebiet ist die Herstellung und Nutzung von molekularen Bibliotheken (Übersicht siehe Lit. [1]). Das Schlagwort dabei ist: „kombinatorisch“, gepaart mit Chemie, Biochemie oder Biologie. Obwohl die angewendeten Methoden bisher kaum in Lehrbüchern zu finden sind, kennt doch beinahe jeder in der Chemie oder in den Biowissenschaften tätige Forscher inzwischen Begriffe wie Phagen-Display, Peptid- und Nucleinsäure-Bibliotheken oder kombinatorische Chemie. Die gemeinsame Strategie sowie das Ziel aller

chemischen und biologischen Ansätze ist immer 1) Generierung eines möglichst großen und vollständigen Pools von unterschiedlichen Molekülen (der „Bibliothek“) und 2) Durchmustern der Bibliothek nach Einzelsubstanzen mit gewünschten Eigenschaften, z. B. einem Ausgangsstoff (Leitstruktur) für ein Arzneimittel oder nach einem Antikörper zur diagnostische Zwecke. Bibliotheken werden zunehmend für Identifizierung von Interaktionspartnern bei der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Erkennung und bei immunologischen Regulationsprozessen eingesetzt. Diese Herangehensweise beschleunigt nicht nur die Bearbeitung vieler Probleme, sondern ermöglicht in vielen Fällen erst deren Lösung. Daher haben eine Vielzahl von Chemikern und Biologen in Industrie- und Universitätslabors begonnen, neuartige Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, Bibliotheken zu erzeugen und zu durchmustern. Der bekannteste Ansatz ist die Phagen-Display-Methode,<sup>[2,3]</sup> bei der Peptid- oder Protein-Bibliotheken auf Phagenoberflächen präsentiert werden. Die Selektion der gewünschten Phagen erfolgt in vitro, während die

[\*] Priv.-Doz. Dr. J. Schneider-Mergener, Dr. U. Hoffmüller  
Institut für Medizinische Immunologie  
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität  
Schumannstraße 20/21, D-10098 Berlin  
Fax: (+49) 30-2802-6460  
E-mail: jsm@charite.de

[\*\*] Wir danken A. Warsinke und M. Paschke für die kritische Durchsicht des Manuskripts. U.H. dankt der DFG für ein Stipendium (INK 16A1-1).

Vermehrung der Phagen in Bakterienzellen, d.h. in vivo stattfindet. Hier liegt ein entscheidendes Problem bei der Anwendung dieser biologisch generierten Repertoires. Die Größe der Bibliothek ist nämlich beschränkt durch die im ersten Schritt notwendige Einschleusung der Phagen-DNA, die das für eine Einzelkomponente der Bibliothek codierende Gen enthält, in die Bakterienzelle. Dieser Vorgang wird als Transfektion oder Transformation bezeichnet und ermöglicht Repertoiregrößen zwischen  $10^7$  und  $10^9$  unterschiedlicher Komponenten.<sup>[4]</sup> Außerdem übt die Umgebung in der Wirtszelle einen zusätzlichen Selektionsdruck aus, der gewünschten Varianten entgegenwirken kann.<sup>[5]</sup> Ein weiterer „Nachteil“ beim Phagen-Display sind zeitaufwendige Wechsel zwischen In-vivo- und In-vitro-Schritten.

Diese Probleme wurden dadurch umgangen, daß man statt intakter Zellen die isolierte Proteinsynthesemaschinerie der Zelle (Ribosomen) für die Herstellung von Peptid- und Protein-Bibliotheken verwendete. Das gelang zunächst für die Suche nach Peptiden mit gewünschten Eigenschaften mit der Methode des Polysomen-Displays.<sup>[6,7]</sup> Ein Polysom ist ein Komplex aus einer mRNA und mehreren Ribosomen. Einen Durchbruch erzielten schließlich Hanes und Plückthun,<sup>[8]</sup> die ein allgemein anwendbares System zur In-vitro-Selektion und Evolution von Proteinen ausgearbeitet haben, das sie als Ribosomen-Display bezeichneten. Selektions- und Evolutions-Systeme basieren auf folgender Vorgehensweise: 1) Generierung molekularer Diversität, 2) Selektion von Molekülen mit gewünschter Eigenschaft, 3) Vervielfältigung der selektierten Moleküle und 4) Wiederholung der Schritte 2 und 3 oder der Analyse der ausgewählten Moleküle. Werden während der Vervielfältigung Mutationen zugelassen, dann hat das System Evolutionscharakter. Der Einsatz von Nucleinsäuren ermöglicht eine problemlose und sehr effektive Vervielfältigung der benötigten Information. Es ist in Schritt 2 möglich, die Information aus der Nucleinsäure (Genotyp) in ein Protein umzuschreiben, nach dessen Eigenschaften (Phänotyp) nun selektiert werden kann. Damit die Information (Genotyp) nach der Selektion vervielfältigt werden kann, müssen Genotyp und Phänotyp miteinander verknüpft und gemeinsam selektiert werden. Für diese Verknüpfung beinhalten Systeme wie das Phagen-Display aufwendige alternierende In-vitro- und In-vivo-Schritte. Die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp funktioniert beim Ribosomen-Display ohne Hilfe von Zellen. In vitro werden entsprechend der Codierung durch eine mRNA Proteine synthetisiert. Anschließend bleibt jeweils ein mRNA-Molekül zusammen mit dem translatierten Protein am Ribosom haften. Dieser Komplex kann nun nach dem Phänotyp des Proteins selektiert werden.

Die Methode funktioniert nach dem folgenden Prinzip (Abb. 1): Eine für die gewünschten Proteine codierende DNA-Bibliothek wird erstellt. Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR; Übersicht siehe Lit. [9]) werden einige regulatorische Elemente, die weiter unten erläutert werden, an die DNA angeknüpft. Durch In-vitro-Transkription wird die DNA in eine mRNA umgeschrieben, die in einem prokaryontischen In-vitro-System translatiert wird.<sup>[10]</sup> Es entsteht der ribosomale Komplex aus mRNA, Ribosom und translatiertem Protein. Die Stabilität des Komplexes und die

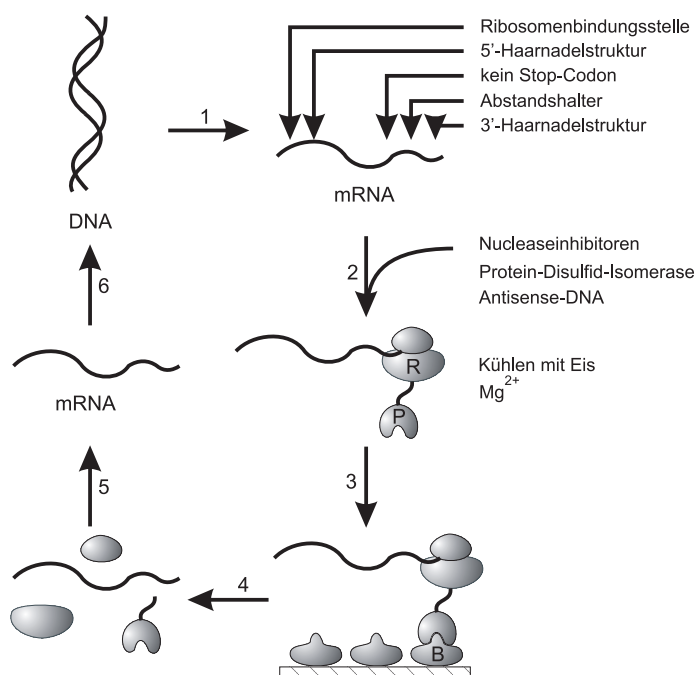


Abb. 1. Prinzip des Ribosomen-Displays. Schritt 1: Eine DNA-Bibliothek wird mit der PCR vervielfältigt, wobei gleichzeitig die gezeigten Strukturelemente eingefügt werden, und in mRNA transkribiert. Schritt 2: Die mRNA wird in einem In-vitro-System in ein Protein translatiert. Durch den Zusatz von Protein-Disulfid-Isomerase, Nucleaseinhibitoren und Antisense-DNA wird die Effizienz der Proteinfaltung gesteigert sowie die mRNA und das Protein vor Abbau geschützt. Schritt 3: Der Komplex aus Ribosom (R), mRNA und Protein (P), der die gewünschte Bindungseigenschaft aufweist, wird durch Kühlen und Zusatz von  $Mg^{2+}$  stabilisiert und bezüglich der Affinität zum immobilisierten Bindungspartner (B) selektiert. Komplexe, die nicht gebunden haben, werden durch Waschen entfernt. Schritt 4: Elution der gebundenen Ribosomenkomplexe. Schritt 5: Isolierung der mRNA. Schritt 6: Reverse Transkription der mRNA in DNA und Vervielfältigung über PCR. Die DNA wird dann für einen weiteren Anreicherungszyklus eingesetzt, oder sie kann nach einer Klonierung durch Sequenzieren analysiert werden. Üblicherweise werden fünf Zyklen dieses Prozesses durchgeführt.

korrekte Faltung des Proteins wurden durch verschiedene Zusätze optimiert. Die Komplexe werden aufgrund der Bindungseigenschaften selektiert, die das translatierte Protein aufweisen soll. Beim Eluieren dissoziiert der Komplex, und die mRNA wird freigesetzt. Diese wird isoliert, durch reverse Transkription in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Die dabei entstehende DNA kann für den nächsten Selektionszyklus eingesetzt oder durch Klonieren und Sequenzieren analysiert werden.

Die Ribosomen-Display-Methode wurde mit einem Einzelketten-Antikörper-Fv-Fragment (single chain antibody, scFv) als Modell entwickelt und optimiert und durch eine Vielzahl von Ergänzungen zu einem allgemein anwendbaren System ausgebaut (Abb. 1). Diese Verbesserungen schützen die mRNA vor enzymatischem Abbau durch Nucleasen, stabilisieren den Ribosomenkomplex und ermöglichen die korrekte Faltung des präsentierten Proteins, wodurch die Gesamteffizienz der Methode deutlich gesteigert wurde. Als Maß für die Effizienz wurde die Ausbeute an eluierter mRNA herangezogen, die nach der Selektion bezüglich der Affinität zum

Bindungspartner des Antikörpers, in diesem Fall einem als Antigen wirkenden Peptid, isoliert wurde. Der Aufbau der mRNA hatte hierauf einen starken Einfluß. Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende wurde jeweils eine Haarnadelschleife (hairpin loop) eingefügt, die die mRNA vor Exonucleasen schützt. Die Haarnadelstruktur am 3'-Ende soll außerdem die Termination der Translation bewirken, da die mRNA kein Stop-Codon hat. Wenn ein Stop-Codon die Translation beendet, würde es die Dissoziation des Ribosomenkomplexes einleiten, und dieser würde nicht mehr für die Affinitätsselektion zur Verfügung stehen. Zwischen der codierenden Sequenz für den Antikörper und der 3'-Haarnadelstruktur wurde ein Abstandshalter (Spacer) eingefügt. Er sorgt dafür, daß die eigentliche Polypeptidkette am Translationsende bereits vollständig aus dem Ribosom ausgetreten ist und sich ungehindert falten kann. Durch die Zugabe von Nucleaseinhibitoren und Protein-Disulfid-Isomerase, die die Bildung der richtigen Disulfid-Verbrückung des scFv katalysiert, wurde die Effizienz weiter gesteigert. Eine weitere, äußerst bemerkenswerte Verbesserung beruht auf der Inhibierung eines Proteinabbauges: Es wurde über ein System zur Peptidmarkierung berichtet, mit dem Proteine, die von einer mRNA ohne Stop-Codon codiert werden, mit einem Peptid als Abbausignal markiert werden, das von einer speziellen RNA<sup>[11]</sup> codiert wird. Tatsächlich konnte durch Blockieren dieser RNA mit der entsprechenden komplementären DNA (Antisense-DNA) die Ausbeute weiter erhöht werden.

Durch die beschriebenen Strukturveränderungen der mRNA und die Zusätze während der Translation wurde die Gesamtausbeute von 0.001 % auf 0.2 % erhöht. Anschließend wurde in einem Versuch überprüft, wie gut ein Protein mit gewünschter Funktion aus einer Mischung von zwei Proteinen angereichert werden kann. Dazu wurden zwei mRNA-Konstrukte hergestellt, die bezüglich der oben beschriebenen Eigenschaften identisch waren. Das eine codiert einen Anti-Hämagglutinin-scFv,<sup>[12]</sup> das andere einen Anti- $\beta$ -Lactam-scFv.<sup>[13]</sup> Diese wurden im Verhältnis 1:10<sup>8</sup> gemischt und in fünf Zyklen (Abb. 1) bezüglich der Bindung an immobilisiertes Hämagglutinin-Peptid selektiert. 90 % der Ribosomenkomplexe enthielten am Ende dieser Selektion das Anti-Hämagglutinin-Antikörperfragment. Pro Zyklus wurde demnach das gewünschte Protein etwa 100fach angereichert. Nach der fünften Runde wurden 20 Klone sequenziert, von denen 18 das Zielprotein codierten. In Tabelle 1 sind die Klone nach ihrer relativen Bindungsstärke sortiert, und die gefundenen Mutationen sind aufgeführt. Zwei Klone entsprachen der Wildtypsequenz, die restlichen wiesen ein bis vier Aminosäureaustausche auf und demonstrieren damit die Bandbreite möglicher Mutationen, die die ursprüngliche Funktion erhalten oder diese sogar verbessern.

Diese Experimente von Hanes und Plückthun haben gezeigt, daß das Ribosomen-Display sich als reines In-vitro-System für die phänotypische Selektion nach Ligandenbindung eignet. Auch die korrekte Faltung und die Bildung von Disulfidbrücken wurde ermöglicht, was für einen Großteil der Proteine essentiell ist. Damit ist das Ribosomen-Display das erste komplett in vitro stattfindende Evolutions- und Selektionssystem für nativ gefaltete Proteine. Die Transformation von Zellen mit DNA ist nicht notwendig, und der Synthese

Tabelle 1. Mutationen in den selektierten Anti-Hämagglutinin-, single-chain-Antikörpern.<sup>[a]</sup>

Klon Nr.	V <sub>L</sub>	Mutationen V <sub>H</sub>	Linker	Bindungsstärke
12	K45R	P41R		102
10		S30P		101
6				100
2				96
7		G16D		89
3	Y49H			86
9	E55G, E105G	A23V	S5P	86
1	T20A		G12E	80
18	N(27d)D	D10G, T50N		76
4	V13A, K28R	V12A		72
13	V58I	Y79C		65
16	L83R	I51V, K75E, A113V		63
14	K30E	D61G	S5P	43
17	F71S			18
8	E17G, K18E, K30E			14
5	L11P		G13D	9
11	S(27e)F, N90E	V48I		9
15	G64D, S77A	G15S		6

[a] Für alle untersuchten Antikörper-Klone sind die relativen Bindungsstärken (für Klon Nr. 6 = 100 %) und die gefundenen Mutationen in den drei Bereichen des Antikörpers (V<sub>L</sub> = variable Region der leichten Kette; V<sub>H</sub> = variable Region der schweren Kette; Linker zwischen diesen beiden Bereichen) angegeben. Die Mutationen sind nach Kabat et al.<sup>[18]</sup> numeriert. Aufgrund der variablen Länge der Bindungsregionen (CDRs, complementarity determining regions) sind einige Positionen zusätzlich mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

und dem Screening von großen Protein-Bibliotheken ( $\gg 10^9$  Einzelkomponenten) steht nichts mehr im Wege. He und Taussig<sup>[14]</sup> gelang kürzlich mit einem analogen eukaryontischen Transkriptions-/Translationssystem die reverse Transkription ohne vorherige Reinigung der mRNA direkt am Ribosomenkomplex. Dadurch verkürzte sich die Zeit für einen Zyklus des Ribosomen-Displays auf 8 h. Des weiteren können neuartige Methoden wie „sexual PCR“<sup>[15]</sup> „error-prone PCR“<sup>[16]</sup> oder PCR mit Primern aus Trinucleotiden<sup>[17]</sup> die Diversität beim Ribosomen-Display zusätzlich steigern. Auf der anderen Seite kann die Fehlerhäufigkeit im Ribosomen-Display auch durch den Einsatz von Polymerasen mit Fehlerkorrektur-Aktivität (proofreading activity) herabgesetzt werden, wenn die Methode lediglich zum Durchmustern von Bibliotheken eingesetzt werden soll.

Das Ribosomen-Display birgt ein großes Potential, um die Grundlagenforschung auf den Gebieten der Struktur, Faltung und Evolution von Proteinen voranzutreiben. Daneben beschleunigt die Methode wesentlich die Suche nach neuen Leitstrukturen mit interessanten Eigenschaften sowie die Optimierung bereits bekannter therapeutisch relevanter Proteine. Es können zudem Hinweise auf den genauen Wirkungsort auf der Proteinoberfläche gewonnen werden, was das Design von Proteinmimetika als neuer therapeutischer Verbindungsklasse<sup>[3]</sup> erleichtern sollte.

**Stichwörter:** In-vitro-Selektion • Kombinatorische Chemie • Nucleinsäuren • Proteine • Ribosomen-Display

[1] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, Heft 1; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, Heft 1.

[2] G. P. Smith, J. K. Scott, *Methods Enzymol.* **1993**, *217*, 228.

- [3] U. Reineke, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 769.
- [4] W. J. Dower, S. E. Cwirla in *Guide to Electroporation and Electrofusion* (Hrsg.: D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers), Academic Press, San Diego, **1992**, S. 291 – 301.
- [5] W. P. Yang, K. Green, S. Pinz-Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton, C. F. Barbas, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 392.
- [6] H. Kawasaki, *PCT Int. Appl.* **1991**, WO 91/05058.
- [7] L. C. Mattheakis, R. R. Bhatt, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9022.
- [8] J. Hanes, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4937.
- [9] H. A. Erlich, D. Gelfand, J. J. Sninsky, *Science* **1991**, *252*, 1643.
- [10] I. D. Pokrovskaya, V. V. Gurevich, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 420.
- [11] K. C. Keiler, P. R. Waller, R. T. Sauer, *Science* **1996**, *271*, 990.
- [12] U. Schulze-Gahmen, J. M. Rini, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1098.
- [13] A. Krebber, S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard, A. Plückthun, *J. Immunol. Methods* **1997**, *201*, 35.
- [14] M. He, M. J. Taussig, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 5132.
- [15] P. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389.
- [16] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1994**, *3*, 136.
- [17] B. Virnekäs, L. Ge, A. Plückthun, K. C. Schneider, G. Wellnhofer, S. E. Moroney, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5600.
- [18] E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesmann, C. Foeller in *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Hrsg.: U.S. Department of Health and Human Services), Vol. 1, 5. Aufl., **1991**, S. 151, 464.