

Eine Methode zur Selektion katalytischer Aktivität, die Phagendisplay und Nachbarschaftseffekte nutzt**

Jean-Luc Jestin,* Peter Kristensen und Greg Winter*

Durch Design- und Selektionsstrategien wurde versucht, Proteine mit katalytischer Aktivität auszustatten.^[1] Unter den Selektionsstrategien hat das Phagendisplay^[2-4] die Selektion von Proteinen mit Bindungsaktivitäten erleichtert.^[5] Durch Fusion des Gens, das für ein Polypeptid kodiert, mit dem Gen eines Phagenhüllproteins wird eine Ansammlung verschiedenartiger Polypeptide der Oberfläche filamentöser Bakteriophagen ausgesetzt. Ein fester Träger wird mit Liganden beschichtet; die Bindung des Phagen an diese Liganden ermöglicht die Isolierung von Genen, die für Polypeptide mit der Fähigkeit zur Ligandenbindung kodieren. Es hat sich jedoch als schwieriger erwiesen, dies auf die Isolierung von Katalysatoren zu übertragen.

Analog zur Methode der Isolierung katalytischer Antikörper durch Immunisierung von Tieren mit Übergangszustandsanaloga^[6] verläuft eine erste Strategie: Sie beinhaltet die Selektion des Phagen durch Bindung des ausgesetzten Enzyms an Übergangszustandsanaloga und Screening des selektierten Phagen bezüglich katalytischer Aktivität.^[7] Eine zweite Strategie nutzt die Katalysemechanismen zur Bildung einer kovalenten Quervernetzung des Enzyms entweder mit einem markierten Enzyminhibitor, dessen Aktivität auf dem Reaktionsmechanismus beruht,^[8] mit einer bei der Katalyse entstandenen markierten und hochreaktiven Einheit^[9] oder mit einem markierten Zwischenprodukt.^[10] Die Selektion aus den angebotenen Enzymen erfolgt dann durch Isolieren des Phagen, der die Markierung trägt, z.B. mit einer Biotin-Markierung auf einer mit Streptavidin beschichteten Oberfläche.

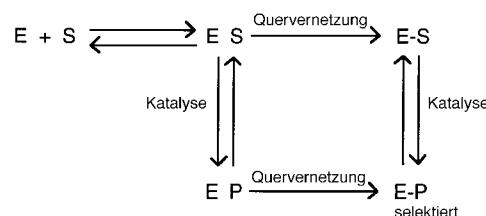
Beide Strategien haben ihre Grenzen: Detaillierte Kenntnisse des Reaktionsmechanismus sind nötig, und das Design sowie die Synthese des Substrat- oder Übergangszustandsanalogons können sehr schwierig sein. Darüber hinaus können derartige Strategien den Selektionsprozeß auf einen einzigen Teilbereich des Katalysekreislaufs richten, z.B. auf nur einen Übergangszustand, wogegen enzymatische Katalyse meist mehrere Übergangszustände einbezieht – oder etwa auf ein Zwischenprodukt, wogegen enzymatische Katalyse auch die Bildung und Freisetzung von Produkten einbezieht.^[11]

[*] Dr. J.-L. JESTIN, Dr. G. WINTER, Dr. P. KRISTENSEN
Centre for Protein Engineering and Laboratory of Molecular Biology
Medical Research Council
Hills Road, CB2 2QH Cambridge (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-402-140
E-mail: jjestin@pasteur.fr
gw@mrc-lmb.cam.ac.uk

[**] Wir danken I. LAVENIR für die SELDI-MS-Daten, H. GRIFFIN für das Anti-Klenow-scFv, P. HOLLIGER für pTTQ18-Taq, G. WILLIAMS für pSV-V_{NP}PoIIk sowie D. NERI, F. SAIT, M. FARROW und M. GAIT für ihren Rat. J.L.J. dankt P. NIELSEN für die Betreuung eines Forschungsaufenthalts und EMBO für ein Postdoktorandenstipendium (ALTF 624-1995). P.K. dankt dem Danish Natural Science Research Council für ein Postdoktorandenstipendium.

Eine kürzlich entwickelte dritte Strategie, veröffentlicht während der Niederschrift dieses Beitrags, könnte diese Einschränkungen überwinden.^[12] Sie beruht auf der Produktselektion und der Nutzung von Nachbarschaftseffekten. Dazu wurde ein markiertes Substrat in der Nähe des Enzyms an einen Phagen geknüpft. Dieser war dabei an einen festen Träger gebunden und wurde durch eine intramolekulare Spaltung freigesetzt, die durch das Enzym katalysiert wurde.^[12]

Unabhängig davon hatten wir eine ähnliche Strategie entwickelt, die hier auf eine Synthese angewendet wird (Schema 1). Sie umfaßt zwei chemisch unabhängige Reaktionen: Die katalytische Reaktion führt zu einem Produkt (in diesem Fall durch den Einbau einer Biotin-Markierung



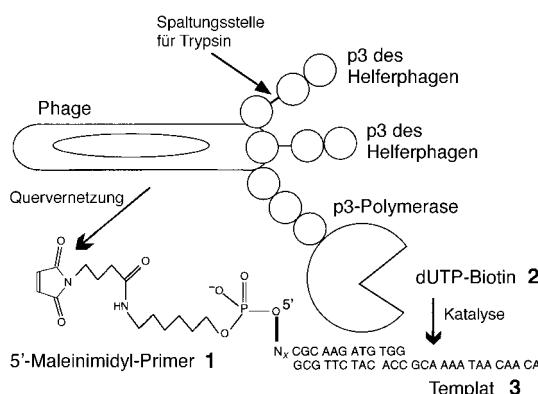
Schema 1. Unsere Strategie für die Selektion katalytisch aktiver Enzyme (Näheres siehe Text). E = Enzym, S = Substrat, P = Produkt.

erfaßt), und in einer Quervernetzungsreaktion werden das Substrat und das Produkt an den Phagen gebunden. Bei der Selektion des Phagen mit Streptavidin-beschichteten Harzkugelchen werden also Phagen ermittelt, die kovalent an markiertes Produkt gebunden sind. Diese Reaktionen finden mit höherer Wahrscheinlichkeit am gleichen Phagen statt, da Reaktionen der Polymerase in *cis*-Stellung gegenüber denen in *trans*-Stellung wegen der räumlichen Nähe bevorzugt sein dürften.

Die Stellen für die Quervernetzung können innerhalb des Enzyms^[13] oder des Phagen^[12] erarbeitet werden oder auch, wie hier, auf einer stochastischen Basis. Der Gebrauch einer Reihe verschiedener Stellen für die Quervernetzung könnte weniger sterische Einschränkungen für die katalytische Reaktion mit sich bringen. Auch gäbe es mehrere Möglichkeiten, quervernetzte Substrate anzuknüpfen. Wir verwenden hier Maleinimide in einer chemischen Quervernetzung; sie reagieren mit Thiolen und, in alkalischen Lösungen, mit Aminogruppen^[14] und können daher mit einer großen Zahl von Stellen des Phagen und des Enzyms reagieren. Ein kovalent gebundenes Produkt aus dem Haupthüllprotein (p8) und *N*-Biotinoyl-*N'*-(6-maleinimidylhexanoyl)hydrazid wurde durch SELDI-MS^[*] nachgewiesen. Wir nehmen an, daß eine der beiden Aminogruppen beteiligt ist, also entweder die vom N-terminalen Ala-1 oder die von der Seitenkette des Lys-8 (Daten in den Tabellen nicht aufgeführt).^[15]

[*] Abkürzungen: SELDI = surface-enhanced laser desorption and ionisation; MALDI = matrix-assisted laser desorption and ionisation; PBS = wäßrige Lösung von 0.1M NaCl und 25 mM Na₂HPO₄ bei pH 7.5, wenn nicht anders angegeben; TEN = wäßrige Lösung von 0.3M Tris-HCl, 33 mM EDTA und 1.3M NaCl bei pH 9.0; dNTP = Desoxynucleotid-Triphosphat; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan; EDTA = Ethylenediamintetraessigsäure; scFv = Antikörper-Fragment mit variabler Einzelkette; ELISA = heterogener Enzym-Immunassay.

Wir prüften unsere Strategie mit DNA-Polymerasen im Hinblick auf deren bedeutende Rolle bei der molekularen Evolution. Dazu führten wir eine Maleinimidylgruppe am 5'-Ende eines DNA-Primers ein (Schema 2). Das Produkt wurde



Schema 2. Selektion katalytisch aktiver DNA-Polymerasen durch Phagendisplay und Nachbarschaftskupplung. Wenn die Polymerase aktiv ist, wird der 5'-Maleinimidyl-derivatisierte Primer **1** mit biotinylierter dUTP **2** und dNTPs in einer vom Templat **3** abhängigen Weise verlängert. Die Maleinimidylgruppe kann mit der Phagenhülle reagieren und kann dabei ermöglichen, daß katalytisch aktive Phagen-Polymerasen an Streptavidin-beschichtete Kugelchen gebunden werden. $N_{13} = TAA CAC GAC AA G$; $N_{50} = T_{50}$.

am 3'-Ende durch biotinylierte dUTP markiert, die katalytisch durch die Polymerase eingeführt wurde. Wir klonierten die Klenow- und Stoffel-Fragmente der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* und *Thermus aquaticus* für den Display durch Bindung an das pIII-Hüllprotein des filamentösen Bakteriophagen (siehe *Experimentelles*). Beiden Fragmenten fehlt die 5' → 3'-Exonuclease-Domäne; dem Stoffel-Fragment fehlt auch die 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität.^[16]

Wir entschlossen uns zum „monovalenten“ Display,^[4] bei dem das Fusionsprotein in ein Phagemid (pHEN1) kloniert wird.^[17] Das Phagemid wird durch Helferphagen verpackt, und damit wird das Fusionsprotein aus der Zelle geschleust. Die Polymerase-Fragmente wurden nach dem Ausschleusen mit dem Hilfsphagen auf dem Phagen präsentiert, was sich durch Bindung an Mikrotiterplatten-Vertiefungen nachweisen ließ, die mit Antipolymerase-Antikörpern beschichtet waren (Nachweis mit ELISA). Die Phagen wurden auch im Western-Blot mit anti-p3- und Antipolymerase-Antikörpern untersucht. Dies bestätigte die Anwesenheit des Fusionsproteins, wies aber auch auf Verunreinigungen mit freier Polymerase hin. Diese röhren vermutlich von Ausscheidungen des Wirtsbakteriums her durch unvollständige Unterdrückung des Amber-Stop-Kodons oder durch Spaltung von der Oberfläche des Phagen. Durch eine weitere Ultrazentrifugation oder durch Gelpermeationschromatographie wurde diese Verunreinigung entfernt. Die gereinigten Phagen wurden mit einem Primer/Templat-Extension-Assay mit radioaktiv markiertem $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP auf DNA-Polymerase-Aktivität untersucht (siehe *Experimentelles*) und erwiesen sich dabei als aktiv (Daten in den Tabellen nicht aufgeführt).

Wie sich aber aus den Western-Brots andeutete, war das Polymerase-p3-Fusionsprotein verglichen mit dem p3-Protein nur zum geringen Teil in den Phagen eingebaut (Daten in den

Tabellen nicht aufgeführt). Dies schien an einer intensiven Aufnahme von p3 durch den Hilfsphagen zu liegen, wie sich bei unserer Verwendung eines Hilfsphagen (KM13) zeigte: Darin kann das p3-Protein des Hilfsphagen, nicht aber das des Fusionsproteins, mit Trypsin gespalten werden, so daß es keine Infektion mehr auslösen kann.^[18] Daher sind nach der Proteolyse nur noch diejenigen Phagen infektiös, die das Fusionsprotein eingebaut hatten. Aus dem Titerverlust nach der Proteolyse errechneten wir, daß nur etwa jeder tausendste Phage das Fusionsprotein eingebaut hatte. Wir vermuteten, daß der Selektionsprozeß, der auf der Anknüpfung durch die Polymerase in *cis*-Stellung beruht, gestört ist durch den hohen Anteil an Phagen, denen die Polymerase fehlt, die aber für eine *trans*-Verknüpfung verfügbar wären. Daher behandelten wir selektierte Phagen mit Trypsin, um die Infektiosität der Phagen zu zerstören, denen die Polymerase fehlt.

Wir inkubierten den Phagen, der das Stoffel-Fragment präsentiert, mit dem Primer **13** (Tabelle 1), der eine Maleinimidyl-Gruppe in 5'-Stellung und ein 3'-biotinyliertes Nucleo-

Tabelle 1. Sequenzen der Desoxyoligonucleotide.^[a]

3: AAA TAC AAC AAT AAA ACG CCA CAT CTT GCG
4: TGG TCC CGG CGC AAG ATG TGG CGT
5: CGC AAG ATG TGG CGT
6: GTG GAC GCC ACA TCT TGC G
7: TTC AGA TAC <u>CCA TGG</u> CCC AGG TGA TTT CTT ATG ACA ACT
8: GAG TCA TTC <u>TGC GGC CGC</u> CTC CTT GGC GGA GAG CCA GTC C
9: TTC AGA TAC <u>CCA TGG</u> CCC AGG TGA TTT CTT ATG ACA ACT ACG TC
10: GAG TCA TTC <u>TGC GGC CGC</u> GTG CGC CTG ATC CCA GTT TTC GCC
11: CTC TCC CAG GAG <u>CTA GCC ATC</u> C
12: ACA CCC CCT <u>CCA TGA CCT CCT TGG</u> CCA GCC GGG CCA CGG CCT CCG CCC CCT CTT TTG GGG CCT CGA GGA CCA GTG CGG CGT GGA CCT GAA GGA GCA TCC
13: TTT CGC AAG ATG TGG CGT
14: GTG CCA GAC CTA GAG GCC
15: CTA TGC GGC CCC ATT CA
16: ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CC
17: AAT AGG TGT ATC ACC GTA CTC AGG.

[a] Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Das fettgedruckte Kodon TGT im Primer **7** kodiert für ein Cystein am N-Terminus des Stoffel-p3-Fusionsproteins. Das Desoxyoligonucleotid **4** enthält eine 5'-Biotinylgruppe, **13** eine 5'-Maleinimidylgruppe und eine 3'-Biotinylgruppe.

tid enthält. Nach der Inkubation konnte der Phagen mit Streptavidin-beschichteten Harzkugelchen isoliert werden, mit einer Ausbeute von 1–5% infektiöser Phagen. Ein Primer kann also chemisch mit dem Phagen verknüpft werden, vermutlich über das p8-Protein, wie am Beispiel des *N*-Biotinyl-*N'*-(6-maleinimidylhexanoyl)hydrazids gezeigt. Danach inkubierten wir Phagen mit dem Primer **1b**, der eine 5'-Maleinimidylgruppe enthält, in Gegenwart von BiotindUTP **2** und dem Templat **3**. Das Isolieren des Phagen war abhängig vom Vorhandensein von **1b**, **2** und **3** (Tabelle 2).

Die vom Enzym markierten Primer können also an den Phagen geknüpft werden. Die Zugabe von Trypsin verringert deutlich die Infektiosität der Phagen vor und auch nach dem Isolieren. Dies läßt vermuten, daß vielen dieser Phagen dennoch die Phagenpolymerase fehlt. Die Wirkung von

Tabelle 2. Selektion katalytisch aktiver Stoffel-Phagen-Partikel.

$\varphi_i^{[a]}$ [tu]	φ_f [tu]	Ausb. ^[b] [%]	Bedingungen ^[c]
8.4×10^5	2.0×10^4	2.4	
3.6×10^5	1.0×10^2	0.028	– Primer 1b
4.4×10^5	3.0×10^2	0.068	– biotinyliertes dUTP 2
4.8×10^5	3.0×10^2	0.062	– Templat 3
4.4×10^9	4.0×10^6	0.091	– Trypsin
1.5×10^9	5.5×10^5	0.037	– Trypsin, – Primer 1b

[a] φ_i und φ_f stehen für die Zahl der Transformationseinheiten (tu; transformation units) vor und nach der Selektion. [b] Ausbeute = φ_f/φ_i . [c] Mit Primer **1b**, biotinyliertem dUTP **2**, Templat **3** und Trypsin.

Trypsin liegt darin, durch Eliminierung dieser Phagen die Ausbeute gemäß der Definition in Tabelle 2 entscheidend zu verbessern.

Anschließend nutzten wir den Selektionsprozeß, um aktive von denaturierter Polymerase zu unterscheiden (Tabelle 3). Wir vermischten Klenow-Phagen- und Stoffel-Phagenpartikel, erwärmen auf 60 °C, um die Denaturierung des Klenow-Fragments zu begünstigen, und nahmen dann eine Reihe von

Tabelle 3. Selektion von Stoffel-Phagen aus Klenow-Phagen.

Phagenpartikel ^[a] (Stoffel/Klenow)	Anreicherung in Stoffel	Bedingungen
(27/5) _i (21/10) _f	0.39	pH 7.5, 25 °C
(3/56) _i (23/30) _f	14	pH 7.5, 60 °C/25 °C ^[b]
(18/17) _i (110/4) _f	26	pH 8.5, 60 °C/25 °C ^[b]
(18/17) _i (22/6) _f	3	pH 8.5, 60 °C/25 °C ^[b] ; Taq 1U

[a] Das Verhältnis (Stoffel/Klenow) gibt die relativen Anteile an Stoffel- und Klenow-Phagen in der Mischung vor (i) und nach der Selektion (f) an.

[b] Die Phagenpartikel wurden 3 min bei 60 °C behandelt, dann 3 min bei 60 °C polymerisiert und quervernetzt und schließlich 1 h bei 25 °C gehalten.

Selektionsversuchen vor. Ohne Erwärmen reicherten wir zweifach zugunsten des Klenow-Phagen an, mit Erwärmen 14fach zugunsten des Stoffel-Phagen. Die Anreicherung des Stoffel-Phagen wurde bei höherem pH-Wert noch auf ein 26faches verbessert. Wie erwartet führte die Zugabe von freier Polymerase zu einer geringeren Anreicherung (nur dreifach).

Wir setzten den Selektionsprozeß auch dazu ein, um zwischen Phagen zu unterscheiden, die an DNA bindende Stoffel-Fragmente präsentieren und unterschiedliche Katalyseaktivität aufweisen (Tabelle 4). Zwei hochkonservative Carboxylatreste befinden sich am aktiven Zentrum der DNA-Polymerase der Familie I wie die Klenow- und Stoffel-Fragmente.^[19] Einer von diesen (D882 im Klenow- sowie D785 im Stoffel-Fragment) bindet ein Metall-Ion und ist direkt an der Katalyse homologer Polymerasen beteiligt.^[20] Eine Mutation dieses Restes in der Klenow-Polymerase führt zu einem deutlichen Verlust an katalytischer Aktivität (k_{cat}).^[21] Wir stellten die homologen Mutanten des Stoffel-Fragments her (D785A, D786A). Wie erwartet war der mutierte Stoffel-Phage weit weniger aktiv als die Wildform in einem Primer-Extension-Assay. Wurde der mutierte Stoffel-Phage mit der Wildform gemischt, erhielten wir eine 35fache Anreicherung der Wildform nach dem Prozeß der

Tabelle 4. Selektion der Stoffel-Phagen verschiedener katalytischer Aktivitäten.

Phagenpartikel ^[a] (WT/M)	Anreicherung	kat. Bedingungen
(4/44) _i (35/10) _f	35	1b 5 μM, 60 °C/25 °C ^[b]
(4/44) _i (30/15) _f	20	1b 0.5 μM, 60 °C/25 °C ^[b]
(4/44) _i (16/32) _f	5	1b 50 nM, 60 °C/25 °C ^[b]
(5/43) _i (27/21) _f	11	1b 0.5 μM, 25 °C
(5/43) _i (40/8) _f	43	1b 0.5 μM, 35 °C
(5/43) _i (34/14) _f	21	1b 0.5 μM, 45 °C
(5/41) _i (45/3) _f	123	1a 5 μM, 35 °C
(24/23) _i (20/22) _f	1	13 1.3 μM, 60 °C/25 °C ^[b]
(38/10) _i (9/33) _f	0.071	keine Katalyse, nur Bindung an DNA ^[c]

[a] Anteile an Wildtyp-Stoffel (WT) und mutiertem Stoffel (M) wie in Tabelle 3. [b] Polymerisation und Quervernetzung 3 min bei 60 °C und 1 h bei 25 °C. [c] Siehe *Experimentelles*.

katalytischen Selektion (Tabelle 4). Unter leicht veränderten Bedingungen ($T=35$ statt 25 °C, Primer **1a** statt **1b**) erhöhte sich die Anreicherung des Stoffel-Fragments gegenüber der weniger aktiven Mutante auf das 123fache.

Die bevorzugte Selektion der Polymerase des Stoffel-Wildtyps scheint eher den katalytischen als den Bindungsschritt widerzuspiegeln, denn die Konzentration des DNA-Primer/Templates (9 μM) liegt weit über seiner Dissoziationskonstante von der Taq-DNA-Polymerase (1.5 nM).^[22] Das mutierte Stoffel-Fragment hat offenbar eine noch bessere Bindungsaffinität als das Wildtyp-Stoffel-Fragment. So erhielten wir nach Mischen des mutierten mit dem Wildtyp-Stoffel-Phagen bei Bindungsselektion an Duplex-DNA eine 14fache Anreicherung für die Mutante. Dagegen verlief die Selektion unter katalytischen Bedingungen zugunsten des Wildtyps.

Für Enzyme, die synthetische Reaktionen katalysieren, gibt es unseren Ergebnissen zufolge einen Selektionsprozeß, der auf der Nachbarschaft durch chemische Quervernetzung und katalytischen Markierungen am gleichen Phagenpartikel beruht. Die Stellen für die Katalyse und die Vernetzung müssen nicht benachbart sein; im Primer **1a** können sie um bis zu 5.1 nm voneinander entfernt sein. Wir lassen hier beide Reaktionen zusammen ablaufen. Die Abfolge der einzelnen Reaktionen (zuerst Markierung und dann Vernetzung oder umgekehrt; Schema 1) hängt von den relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Vernetzung und der Markierung ab. Daher sind Faktoren wie die Konzentration des markierten Substrats, die Bindungsaffinität des Enzyms an das markierte Substrat und die chemische Reaktivität der vernetzenden Einheit maßgeblich. Generell sollte es möglich sein, die Reaktionsreihenfolge zu beeinflussen, z.B. durch Zugabe des reaktiven Substrates vor der Markierung. Es sollte möglich sein, den Selektionsdruck entsprechend den kinetischen Parametern anzupassen.

Die Strategie der Nachbarschaftskupplung ist höchstwahrscheinlich allgemeingültig, was sich bereits bei einer Spaltung^[12] und, wie hier bei einer synthetischen Reaktion, belegen ließ. Es ist sehr aufschlußreich, die wichtigsten technischen Prinzipien zu vergleichen, die in diesem Ansatz und im kürzlich veröffentlichten^[12] eingesetzt werden. Beide nutzen Hilfsphagen, die innerhalb des p3-Proteins eingebaut sind, aber für gänzlich verschiedene Zwecke. Wir führten eine

Spaltungsstelle für die Protease ein, um den Selektionsprozeß auf jene Phagen zu richten, die Polymerase präsentieren. Pedersen et al. hingegen führten eine Stelle ein, an der spezifisch das Substrat für die Nuclease gebunden wird. Wir nutzten eine zufällige Quervernetzung der Maleinimidylgruppe (vermutlich an die Lysin-Seitenketten des Haupthüllproteins p8), wogegen Pedersen et al. die Bildung von Disulfidbrücken mit einem eingebauten Cystein des p3-Proteins vom Hilfsphagen nutzten. Diese verschiedenen Aspekte könnten möglicherweise vorteilhaft kombiniert werden. Das Prinzip könnte in der Tat auch mit anderen Display-[23] oder Kompartimentierungsstrategien genutzt werden.[24] Dies könnte deren Einsatz zur Evolution von Enzymen *in vitro* erleichtern.

Experimentelles

Die Desoxyoligonucleotide (Tabelle 1) wurden durch Festphasensynthese in einem DNA-Synthesizer (394, Applied Biosystems) hergestellt mit Ausnahme von **4**, das von Eurogentec bezogen wurde. Die 5'-Biotinylgruppe wurde mit 1-(Dimethoxytriphenylmethyl)oxy-3-O-(N-biotinyl-3-aminopropyl)-triethylenglycolylglyceryl-2-O-(2-cyanethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit eingeführt, die 3'-Biotinylgruppe mit 1-(Dimethoxytriphenylmethyl)oxy-3-O-(N-biotinyl-3-aminopropyl)-triethylenglycolylglyceryl-2-O-succinoyl-modifiziertem Controlled-Pore-Glas. Die 5'-Aminohexyl-Modifizierung wurde mit 6-((4-Methoxytriphenylmethyl)amino)hexyl-(2-cyanethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (Glen Research) eingeführt.

Das eine 6-((4-Methoxytriphenylmethyl)amino)hexylgruppe enthaltende Desoxyoligonucleotid wurde vor der Abspaltung der Schutzgruppe an einer C18-Umkehrphasen-HPLC-Säule gereinigt (Waters). Das lyophilierte Produkt wurde in 0.1 mL einer NaHCO₃-Lösung bei pH 8.5 gelöst und zu einer Suspension von Succinimidyl-4-(N-Maleinimidyl)butyrat (Prochem, Rockford, IL) in DMF (35 mL) gegeben. Nach 2 h bei 25°C wurde das eine Maleinimidylgruppe enthaltende Desoxyoligonucleotid an einer C18-Umkehrphasen-HPLC-Säule gereinigt, lyophilisiert und durch MALDI-TOF-MS (Voyager DE, Perseptive Biosystems) charakterisiert; *m/z*: ber. (gef.): **1a**: 9000.9 (9000.4), **3**: 9146.0 (9138.2), **4**: 7994.4 (7985.7), **13**: 6460.5 (6458.9).

Das kovalent gebundene Produkt aus dem Haupthüllprotein (p8) des Phagen (*m/z* 5235.7) und *N*-Biotinoyl-*N'*-(6-Maleinimidylhexanoyl)hydrazid wurde durch SELDI-MS nachgewiesen; *m/z*: ber. (gef.): 5687.2 (5689.5).

Die für das Stoffel-Fragment kodierende DNA wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert mit dem Templat pTTQ18-Taq und den Primern **7** und **8**; es wurde als NcoI-NotI-Fragment in das Phagemid pHEN1^[17] kloniert und ergab das pHEN1-Stoffel-Fragment. In ähnlicher Weise wurde das pHEN1-Klenow-Fragment aus dem PCR-amplifizierten Klenow-Fragment hergestellt. Als Templat diente pSV-V_{Npγ}PolyI, als Primer **9** und **10**. Die pHEN1-Stoffel-Mutante wurde erhalten aus pHEN1-Stoffel, dessen NheI-XcmI-Fragment durch das PCR-Produkt ersetzt wurde, als Primer dienten **11** und **12**. Zu beachten ist, daß im Stoffel-Fragment der freie Cysteinrest nahe dem C-Terminus des Klenow-Fragments fehlt. Am N-Terminus des Stoffel-Fragments wurde ein freies Cystein eingeführt. Diese Reste befinden sich am anderen Ende des aktiven Zentrums der Polymerase.

Die Phagenpartikel wurden wie bereits beschrieben hergestellt,^[3] außer daß der Hilfsphage KM13 statt VCSM13 verwendet wurde.^[18] Die Phagenpartikel wurden durch Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten und anschließende Dialyse gereinigt.^[2, 25] Gelpermeationschromatographie mit einer Säule (Econo-Pac, Biorad), die mit Sephadryl (S300, Pharmacia-Biotech) gepackt war, wurde zur Reinigung der Phagen-Polymerasen (5×10^{12} tu, 10^{13} tu mL⁻¹) und zur Entfernung von Verunreinigungen durch freie Polymerase eingesetzt.

Beim ELISA wurde für die Beschichtung ein Anti-Klenow-scFv verwendet, der aus einem Phagen-Antikörper-Repertoire oder einem Anti-Taq-Antikörper (Taqstart, Clontech) isoliert wurde. Für den Nachweis gemäß einer Standardvorschrift wurde eine Anti-M13-Meerrettich-Peroxidase (Pharmacia Biotech) verwendet.^[3]

Um die katalytische Aktivität der Phagen-Polymerasen zu prüfen, verwendeten wir einen Primer-Extension-Assay. Die Inkubation von 7×10^8 Phagen-Polymerasen (ca. 7×10^{11} infektiöse Phagenpartikel) erfolgte 10 min bei 25°C (Klenow-Phage) und 51°C (Stoffel-Phage) in einer wässrigen Lösung (10 μL) des Primers **5** (15 bzw. 150 μM), der auf dem Templat **6** aufgebracht war; ferner waren enthalten: 250 μM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 33 nM α^{32} P-dCTP, 3.10⁶ Ci mol⁻¹ in einer Pufferlösung aus 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT bei pH 7.5 (Klenow-Phage) bzw. 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl bei pH 9 (Stoffel-Phage). Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung (0.1 M, 5 μL) abgebrochen. Markierte Oligonukleotide wurden an einem Polyacrylamidgel (21%) unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen.

In einem typischen Versuch zur Selektion katalytischer Aktivität wurden Phagen-Polymerasen (10^{10} infektiöse Partikel, die ca. 10^7 infektiösen Partikeln nach der pIII-Spaltung mit Trypsin in 17 μL entsprechen) in PBS mit 5'-Maleinimidyl gemischt, das den Primer **1** (9 μM), das Templat **3** (50 μM), 90 μM dATP, je 0.9 μM dGTP und dCTP, 0.9 μM biotinyliertes Desoxynucleotid-Triphosphat **2** (Boehringer Mannheim) sowie 9 mM MgCl₂ enthielt, und 1 h bei 35°C und pH 8 umgesetzt. Ein Aliquot der Phagenmischung (8 μL) wurde dann zu Streptavidin-beschichteten, superparamagnetischen Harzkügelchen (Dynabeads M-180, Dynal, 200 μL) in einem TEN-Puffer (190 μL) gegeben. Die Mischung der Phagen und der Perlen wurde 30 min bei Raumtemperatur gemischt. Die Perlen wurden danach siebenmal während 35 min mit TEN-Puffer (200 μL) gewaschen. Die an die Kügelchen gebundene Mischung selektierter Phagen wurde schließlich in PBS-Puffer (100 μL) resuspendiert. Die selektierte Phagenmischung (100 μL) und ein Aliquot (5 μL) der ursprünglichen Phagenmischung wurden nach Zugabe eines Zehntels des Volumens von Trypsin aus Rinderpankreas (10 g l⁻¹, Sigma) 5 min bei 37°C inkubiert. Zu jeder Mischung wurde 1 mL einer Lösung von *E. coli* TG1 in 2xTY mit einer Dichte von ca. 8×10^8 Zellen mL⁻¹ gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf Platten aufgetragen, die mit Ampicillin beschichtet waren, und 16 h bei 37°C dem Wachstum überlassen.

Bei der Selektion von Phagen-Polymerasen durch Bindung an DNA wurden folgende Bedingungen gewählt: Streptavidin-beschichtete Kügelchen (200 μL) wurden 30 min bei Raumtemperatur mit dem 5'-Biotinyl-desoxyoligonucleotid **4** (0.3 nmol) und dem Templat **3** (0.3 nmol) in einem TEN-Puffer (100 μL) gemischt. Die Kügelchen wurden dreimal mit einer PBS-Lösung gewaschen, die mit Triethylamin auf pH 8.5 eingestellt war, danach wurde eine Mischung der Stoffel-Phagen und der Stoffel-Mutante-Phagen (10^{10} infektiöse Phagenpartikel) in einer PBS-Lösung bei pH 8.5 zugegeben. Die erhaltene Suspension wurde 25 min bei Raumtemperatur gemischt. Die Kügelchen wurden dann viermal mit einer PBS-Lösung bei pH 8.5 gewaschen, und Trypsin wurde wie bereits beschrieben zugegeben.

Das Verhältnis zwischen Stoffel-Phagen- und Stoffel-Mutante-Phagen-Partikeln vor und nach der Selektion wurde durch einen PCR-Nachweis wie folgt bestimmt: Zellen aus Einzelkolonien wurden zu 19 μL einer Polymerisationsmischung (pH 8.8) gegeben, die 0.25 mM dNTP, 0.5 μM der Primer **14** und **15**, 1 U Taq-Polymerase, 0.05 U Pfu-Polymerase, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1 g l⁻¹ Albumin aus Rinderserum, 10 mM KCl und 10 mM (NH₄)₂SO₄ enthielt. Die Amplifikation wurde mit folgender Temperatur-Zeit-Sequenz durchgeführt (°C/min): (94/10) (94/1; 61/1; 72/2)₃₀ (65/10). Dann wurde das Restriktionsenzym *Alu*I (4U, New England Biolabs) zu den PCR-Produkten (9 μL) gegeben und mit einem Puffer (9 μL, pH 7.9) gemischt, der 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 1 mM Dithiothreitol enthielt. Die Lösung wurde 3 h bei 37°C inkubiert. Die erhaltene DNA-Mischung wurde zur Elektrophorese auf ein Agarosegel (2%) aufgebracht. Die daraus erhaltenen DNA-Bandmuster waren charakteristisch für Polymerasen: Das Stoffel-Fragment enthält eine Sequenz GAC GAG CTG, die für die Aminosäuren 785–787 kodiert, während das mutante Stoffel-Fragment eine Sequenz GCC GCA CTG enthält, der die Restriktionsstelle AGCT *Alu*I fehlt. Das Zahlenverhältnis zwischen Stoffel-Phagen- und Klenow-Phagen-Partikeln wurde nach derselben Vorschrift bestimmt, außer daß die Amplifikation mit den Primern **16** und **17** und die Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Pvu*II (9U, New England Biolabs) vor der Analyse auf einem Agarosegel (1%) durchgeführt wurde.

Eingegangen am 15. September 1998 [Z12418]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1124–1127

Stichwörter: Enzymkatalyse · In-vitro-Selektion · Molekulare Evolution · Phagendisplay · Polymerasen

- [1] a) A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 707–724; b) E. Quemeneur, M. Moutiez, J. B. Charbonnier, A. Menez, *Nature* **1998**, *391*, 301–304.
- [2] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [3] J. McCafferty, A. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature* **1990**, *348*, 552–554.
- [4] S. Bass, R. Greene, J. A. Wells, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 309–314.
- [5] a) G. Winter, *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 92–94; b) P. A. Nygren, M. Uhlen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 463–469.
- [6] R. A. Lerner, P. G. Schulz, *Science* **1995**, *269*, 1835–1842.
- [7] a) L. O. Hansson, M. Widersten, B. Mannervik, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11252–11260; b) I. Fujii, S. Fukuyama, Y. Iwabuchi, R. Tanimura, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 463–467.
- [8] P. Soumillion, L. Jespers, M. Bouchet, J. Marchand-Brynaert, G. Winter, J. Fastrez, *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 415–422.
- [9] K. D. Janda, L. C. Lo, C. H. L. Lo, M. M. Sim, R. Wang, C. H. Wong, R. A. Lerner, *Science* **1997**, *275*, 945–948.
- [10] C. Gao, C. H. Lin, C. H. L. Lo, S. Mao, P. Wirsching, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11777–11782.
- [11] a) F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *Nature* **1996**, *383*, 60–63; b) M. Baca, T. S. Scanlan, R. C. Stephenson, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10063–10068.
- [12] H. Pedersen, S. Hölder, D. P. Sutherlin, U. Schwitter, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10523–10528.
- [13] D. Neri, D. Tawfik, S. Demartis, F. Viti, A. Huber, G. P. Winter, Medical Research Council, *Isolation of enzymes*, WO-A PCT/GB97/01153 [Chem. Abstr. **1997**, *128*, 1458].
- [14] S. S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Boston, London, **1991**, S. 34–35.
- [15] D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, M. Helmer-Citterich, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 260–286.
- [16] a) A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA replication*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1992**; b) K. R. Tindall, T. A. Kunkel, *Biochemistry* **1988**, *27*, 6008–6013; c) F. C. Lawyer, S. Stoffel, R. K. Saiki, K. Myambo, R. Drummond, D. H. Gelfand, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6427–6437.
- [17] H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson, G. Winter, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4133–4137.
- [18] P. Kristensen, G. Winter, *Folding Design* **1998**, *3*, 321–328.
- [19] M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos, *Protein Eng.* **1990**, *5*, 461–467.
- [20] a) S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *391*, 251–258; b) J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *391*, 304–307.
- [21] A. H. Polesky, M. E. Dahlberg, S. J. Benkovic, N. D. F. Grindley, C. M. Joyce, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8417–8428.
- [22] F. B. Perler, S. Kumar, H. M. Kong, *Adv. Protein Chem.* **1996**, *48*, 377–435.
- [23] J. Hanes, L. Jermytus, S. Weber-Bornhauser, H. R. Bosshard, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14130–14135.
- [24] D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652–656.
- [25] W. O. Salivar, H. Tzagoloff, D. Pratt, *Virology* **1964**, *24*, 359–371.

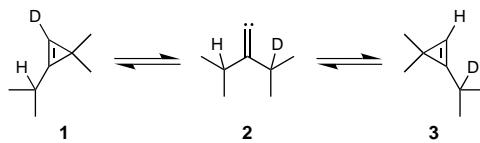
Alkyl-Wanderungstendenzen bei der Vinyliden-Acetylen-Umlagerung und Isotopeneffekt in der Vinylidenbildung aus einem deuterierten Cyclopropan**

Wilhelm Graf von der Schulenburg, Henning Hopf* und Robin Walsh*

In memoriam Wolfgang Roth

Untersuchungen von Vinylidenen und deren Umlagerungen sind schwierig, weil einfache Quellen zur Bildung dieser hochreaktiven Verbindungen nicht existieren. Zwar ist bekannt, daß Vinylidene bei der Hochtemperaturumlagerung von Acetylenen eine Rolle spielen,^[1, 2] jedoch machen die dazu erforderlichen hohen Temperaturen (ca. 600 °C) Acetylene zu einer ungeeigneten Quelle. Wir und andere^[3–8] haben kürzlich die Beteiligung von Vinyliden als entscheidendem Intermediat in der thermischen Isomerisierung von Cyclopropen zu Acetylen unter milden Bedingungen nachgewiesen. Ein Schlüsselexperiment stammt dabei von Jones und Mitarbeitern,^[5] die einen Hinweis auf die Vinylidencarben-Hypothese in einem eleganten Deuterium-Äquilibrierungs-experiment lieferten.

Ihr Versuch lieferte einen direkten Beweis für die schon früher vorgeschlagene Reversibilität der Cyclopropenringöffnung,^[4] die Produktausbeute war jedoch sehr niedrig (0.5 % **3** bei 90 % Umsatz von **1**). Einen ähnlichen Hinweis haben auch



wir in einer kinetischen Studie über eine nicht entartete Cyclopropen-Cyclopropen-Isomerisierung^[8] erhalten, die gegenseitige Umwandlung von 1,3-Dimethylcyclopropen **4** zu 1-Ethylcyclopropen **6** über 1-Ethyl-1-methylvinyliden **5** (Schema 1). Die kinetische Modellierung der analytischen Ergebnisse dieser Studie^[8] ermöglichte uns zum ersten Mal eine quantitative Aussage über die relative Neigung des Vinylidens **5** zur Bildung von stabilen Produkten durch C-H-Insertion (Bildung der Cyclopropene **4** und **6**) und durch Alkylwanderung (Bildung von 2-Pentin **7**) zu treffen. Jedoch

[*] Prof. Dr. H. Hopf, Dipl.-Chem. W. Graf von der Schulenburg
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität
Hagenring 30, D-3810 Braunschweig
Fax: (+49) 531-3915388
E-mail: h.hopf@tu-bs.de

Prof. R. Walsh
Department of Chemistry, University of Reading
Whiteknights, P.O. Box 224, Reading RG6 6AD (Großbritannien)
Fax: (+44) 118-9316331
E-mail: r.walsh@reading.ac.uk

[**] Thermische Isomerisierungen, 29. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn Prof. L. Ernst, Frau P. Holba-Schulz (Braunschweig) und Herrn Dr. P. Heath (Reading) für die Langzeitaufnahmen von ¹³C-NMR-Spektren der pyrolysierten Proben von (2-¹³C)-**4** und (2-¹³C)-**8**. – 28. Mitteilung: U. Nüchter, G. Zimmermann, V. Francke, H. Hopf, *Liebigs Ann.* **1997**, 1505–1515.