

## Protein-Selektion

# Phagen-Display auf neuen Wegen

BEATE BRAUN UND MATTHIAS PASCHKE

AG PROTEINSTRUKTURFORSCHUNG, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN, BERLIN

„Life will find a way“, bemerkte der Chaos-Theoretiker Ian Malcolm in Michael Crichtons Roman *Jurassic Park*<sup>[1]</sup>. Dieses Zitat könnte auch das Credo eines Forschers sein, der sich mit Methoden zur Selektion von Proteinen aus Nukleinsäure-kodierten Bibliotheken beschäftigt.

■ Protein-Selektionsmethoden, die den natürlichen Evolutionsprozess im Reagenzglas nachahmen, wurden in den letzten Jahren zu leistungsstarken Werkzeugen entwickelt, um Proteine mit gewünschten biologischen und physikochemischen Eigenschaften aus natürlichen oder synthetischen Bibliotheken zu gewinnen. Anders als bei einer rationalen Herangehensweise werden für diese evolutiven Methoden keinerlei Informationen über die zu optimierenden oder zu selektierenden Proteine benötigt.

Die Anwendungen für solche Selektionssysteme lassen sich in drei große Gebiete einteilen:

- Optimierung von Proteineigenschaften (z. B. Stabilität, Faltungseffizienz);
- Aufspüren von natürlichen Interaktionspartnern (z. B. zur Identifikation von Wirkungsmechanismen und Signaltransduktionswegen);
- Selektion von Antikörpern oder alternativen Bindungsproteinen für diagnostische und therapeutische Anwendungen.

Unabhängig von der Art der Anwendung basieren alle Selektionsmethoden auf einem gemeinsamen Prinzip, das Genotyp-Phänotyp-Kopplung genannt wird. Darunter versteht man die physikalische Verknüpfung einer replikationsfähigen Nukleinsäure (Genotyp) mit einer durch diese Nukleinsäure-kodierten Eigenschaft (Phänotyp). Eine zentrale Voraussetzung für Protein-Selektionsmethoden ist die Präsentation des Phänotyps, also des Proteins, in seiner funktionellen, nativ gefalteten Form.

### Konventionelles Phagen-Display

Ein Weg, derartige Genotyp-Phänotyp-Komplexe herzustellen, besteht darin, Proteine

auf der Oberfläche von replikationsfähigen Partikeln zu präsentieren (z. B. Phagen, Zellen oder Viren), die das Gen des jeweils präsentierten Proteins in ihrem Inneren beherbergen.

Die erste Umsetzung dieses Konzepts gelang George Smith vor mehr als zwanzig Jahren<sup>[2]</sup>. Smith entwickelte eine Methode zur Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche eines filamentösen Bakteriophagen – einem *E. coli*-infizierenden Virus. Filamentöse Bakteriophagen werden kontinuierlich von infizierten *E. coli*-Zellen produziert und ins Medium abgegeben, ohne diese zu zerstören.

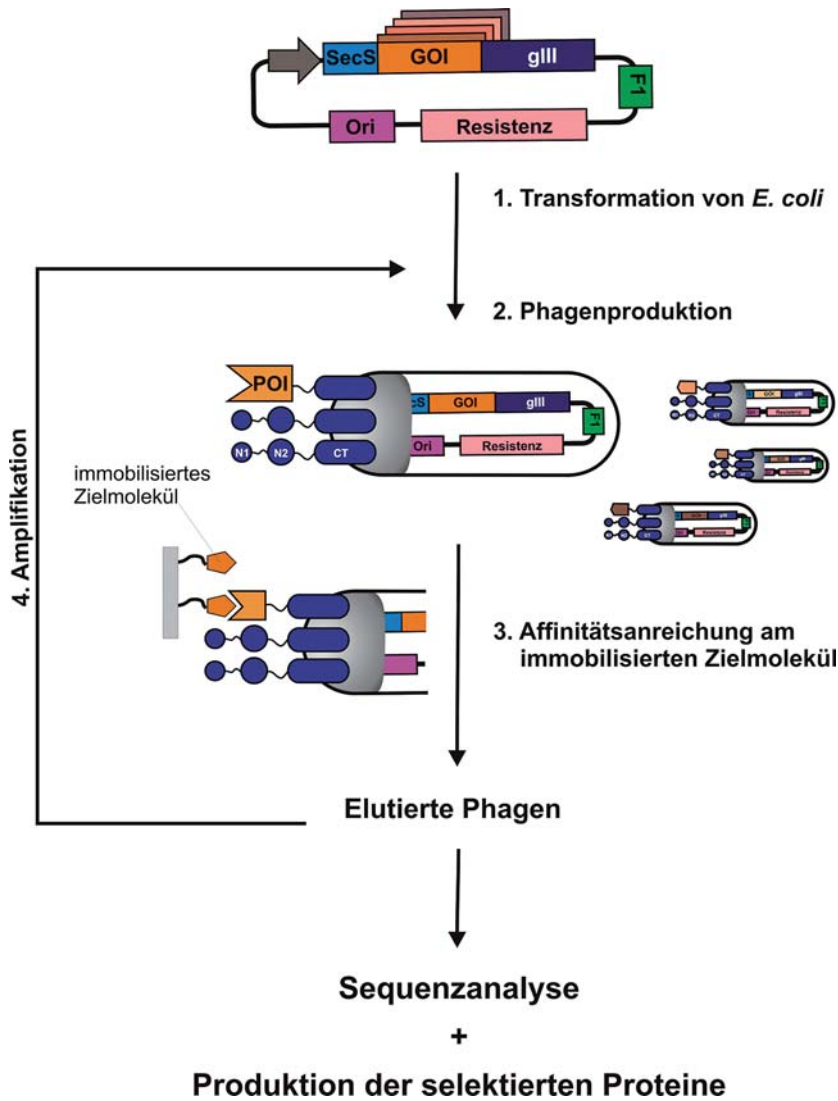
Die meisten konventionellen Phagen-Display-Systeme basieren auf der Erzeugung von Fusionsproteinen der zu präsentierenden Proteine mit dem Phagenhüllprotein pIII des Bakteriophagen. Die pIII-Fusionsproteine, kodiert auf einem Phagen-Display-Vektor, werden in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend über den Sec-Proteintranslokationsweg ins Periplasma der Zellen transportiert. Während der Assemblierung der Phagen an der inneren Zellmembran werden die pIII-Fusionsproteine in die Proteinhülle des entstehenden Phagenpartikels eingebaut. Die genetische Information, der Phagen-Display-Vektor, wird dabei in Form eines Einzelstrang-DNA-Moleküls im Inneren des Phagen verpackt. Die Genotyp-Phänotyp-Kopplung erfolgt also, bevor die Phagen in das Medium entlassen werden. Dadurch sind Phagen, die vom selben bakteriellen Klon produziert wurden, identisch. Phagen-Display-Bibliotheken mit bis zu  $10^{10}$  individuellen Klonen können so durch parallele Klonierung von Genbibliotheken in einem einzigen Ansatz erzeugt werden (Übersicht zu Phagen-Display siehe<sup>[3]</sup>).

Die meisten Anwendungen für Phagen-Display-Bibliotheken zielen auf die Selektion von

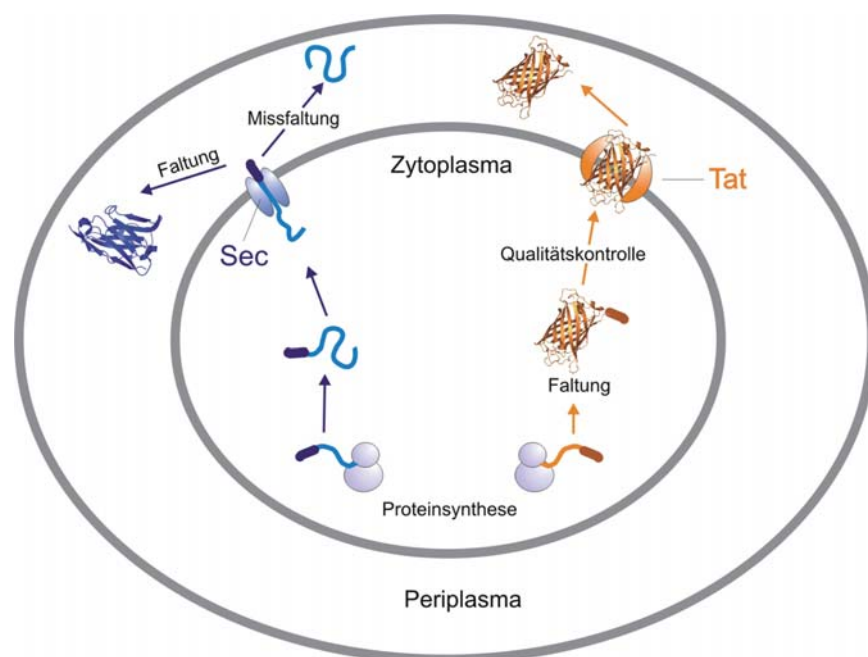
Proteinen, die ein vorgegebenes Zielmolekül binden. In einem als „Panning“ bezeichneten Prozess wird das immobilisierte Zielmolekül mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Phagen, die ein Protein präsentieren, das das Zielmolekül bindet, werden an dieses gebunden. Nicht bindende Phagen hingegen werden in einem nachfolgenden Waschschrift entfernt. Im letzten Schritt werden die gebundenen Phagen abgelöst. Diese eluierten Phagen werden anschließend durch die Infektion von *E. coli*-Zellen vermehrt. Die amplifizierte Phagenpopulation kann dann einer weiteren „Panning“-Runde unterzogen werden. In einem typischen Selektionsprozess (**Abb. 1**) werden drei aufeinander folgende Zyklen von „Panning“ und Phagen-Amplifikation durchgeführt, bevor einzelne selektierte Klone analysiert werden.

### Tat-abhängiges Phagen-Display

Proteine können mithilfe des konventionellen Phagen-Displays nur dann auf der Phagenoberfläche präsentiert werden, wenn sie über den Sec-Transportweg ins Periplasma gelangen. Sec-inkompatible Proteine sind daher im konventionellen Phagen-Display unsichtbar und entziehen sich dem Selektionsprozess. Der Sec-abhängige Proteintransport ist nur für ein eingeschränktes Repertoire von Proteinen geeignet und im Wesentlichen durch vier Sec-spezifische Einschränkungen begrenzt: (i) Durch die kleine Pore des Sec-Translokons können nur entfaltete Proteine transportiert werden. Proteine, die bereits im Zytoplasma eine stabile Faltung einnehmen, sind daher Sec-inkompatibel. (ii) Im Periplasma fehlen Cofaktoren sowie ATP-abhängige Chaperone, die für die Faltung vieler Proteine notwendig sind. Dies kann dazu führen, dass ein Protein zwar Sec-abhängig transportiert wird, aber im Periplasma keine funktionelle Form annimmt. (iii) „Stop Transfer“-Regionen in der linearen Sequenz eines Proteins können den vollständigen Transport behindern. (iv) Das oxidierende Milieu im Periplasma kann während der Faltung von Cystein-enthaltenden



▲ **Abb. 1:** Der Phagen-Display-Zyklus. SecS: Sec-abhängige Signalsequenz; GOI: Gene der zu präsentierenden Proteine; gIII: Gen des pIII; F1: Intergenische Region; Resistenz: Selektionsmarker; Ori: Replikationsursprung; POI: präsentiertes Protein; N1-N2-CT: Domänen des pIII.



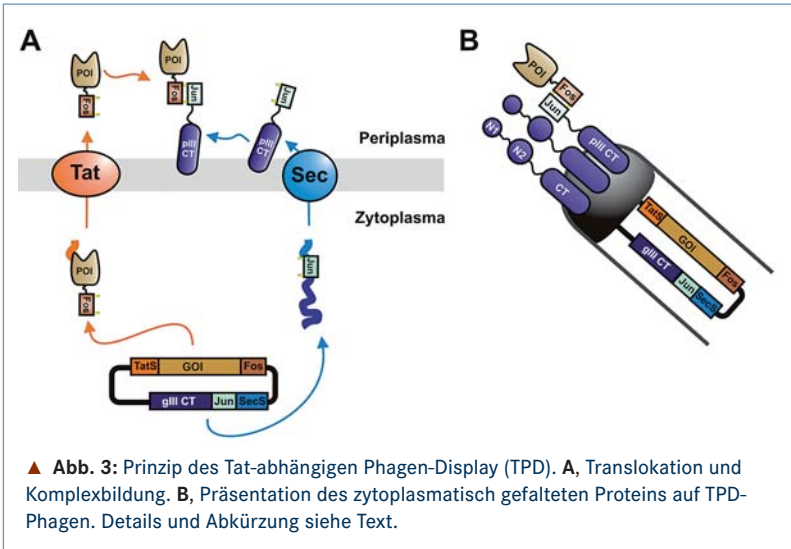
▲ **Abb. 2:** Vergleich zwischen Sec- und Tat-abhängigem Proteintransport.

den Proteinen zur Ausbildung von nicht-nativen Disulfidbrücken und somit zur Missfaltung führen.

Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde ein Phagen-Display-System entwickelt, das einen alternativen Proteintransportweg verwendet, der als Twin-Arginine-Translokase-Weg (kurz: Tat-Weg) bezeichnet wird<sup>[4]</sup>. Im Gegensatz zum Sec-abhängigen Transport, vermag das Tat-Translokon zytoplasmatisch gefaltete Proteine in ihrem nativen Zustand ins Periplasma zu exportieren (**Abb. 2**). Die einzige Voraussetzung für einen erfolgreichen Tat-abhängigen Transport ist die native Faltung des zu transportierenden Proteins im Zytoplasma<sup>[6]</sup> (Übersicht zum Tat-Transport siehe<sup>[5]</sup>). Ein Phagen-Display-System, bei dem das zu präsentierende Protein via Tat-Weg ins Periplasma gelangt, umgeht also nicht nur die Limitierungen des Sec-Transports, sondern fügt zusätzlich eine Qualitätskontrolle ein, die gewährleistet, dass nur nativ gefaltete Proteine auf dem Phagen präsentiert werden.

Beim TPD (Tat-mediated Phage Display) wird das zu präsentierende Protein (POI) via Tat-Transport ins Periplasma exportiert. Die zur Verankerung dieses Proteins auf dem Phagen nötige C-terminale Domäne des pIII (pIII-CT) wird unabhängig über den Sec-Weg sekretiert (**Abb. 3A**). Dazu wurde ein Phagen-Display-Vektor konstruiert, auf dem das zu präsentierende Protein und pIII-CT codiert sind. Das pIII-CT trägt zusätzlich zu einer N-terminalen Sec-abhängigen Signalsequenz (SecS) die Sequenz einer modifizierten Leucin-Zipper-Domäne (Jun). Das zu präsentierende Protein ist mit einer N-terminalen Tat-abhängigen Signalsequenz (TatS) und einer zweiten C-terminalen Leucin-Zipper-Domäne (Fos) versehen. Nach der unabhängigen Translokation ins Periplasma assemblieren die beiden Fusionsproteine aufgrund der Affinität von Jun und Fos zueinander. Zusätzlich eingebrachte Cysteine an jedem Ende der Leucin-Zipper verbinden das zu präsentierende Protein mit pIII-CT kovalent durch die Ausbildung von Disulfidbrücken im oxidierenden Periplasma. Diese kovalenten Komplexe können dann – wie im konventionellen Phagen-Display – in entstehende Phagenpartikel eingebaut werden (**Abb. 3B**). Das Konzept, Proteine mittels Cystein-modifizierter Leucin-Zipper an das pIII zu koppeln, stammt von Crameri und Suter<sup>[7]</sup>.

In einem Modellsystem konnten wir ein Sec-inkompatibles Protein (eine Variante des GFP) mithilfe des TPD-System präsentieren



und sehr effizient selektieren, während das konventionelle Phagen-Display versagte<sup>[4]</sup>. In bisher unveröffentlichten Experimenten gelang es, durch TPD-Selektions- und stabilitätsoptimierte GFP-Varianten zu gewinnen und alternative Bindungsproteine aus synthetischen Bibliotheken zu selektieren<sup>[9]</sup>. Weiterhin konnte ein Fragment der humanen Proteasom-Untereinheit  $\alpha 6$  durch die Selektion einer TDP-basierten cDNA-Bibliothek mit einem anti- $\alpha 6$ -Antikörper<sup>[8]</sup> in vier Selektionsrunden vollständig angereichert werden.

Es bleibt abzuwarten, in welchem Umfang das TPD-System das Repertoire an Proteinen, die mittels Phagen-Display optimiert und selektiert werden können, erweitern wird. Insbesondere bei der Selektion von cDNA-Bibliotheken, die hauptsächlich zytoplasmatisch faltende Proteine codieren, könnte das Tat-basierte Phagen-Display Anwendungsfelder eröffnen, die dem konventionellen Phagen-Display verborgen bleiben. ■

## Literatur

- [1] Crichton, M. Jurassic Park. Alfred A. Knopf, New York (1990).
- [2] Smith, G. P. (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315–1317.
- [3] Paschke, M. (2006): Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 2–11.
- [4] Paschke, M., and Hohne, W. (2005): A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. *Gene* 350: 79–88.
- [5] Sargent, F., Berks, B. C., Palmer, T. (2006): Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 198–207.
- [6] DeLisa, M. P., Tullman, D., Georgiou, G. (2003): Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6115–6120.
- [7] Cramer, R., Suter, M. (1993): Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 137: 69–75.
- [8] Dahlmann, B., Kopp, F., Kristensen, P., Hendil, K. B. (1999): Identical subunit topographies of human and yeast 20S proteasomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 363: 296–300.
- [9] Publikation in Vorbereitung.



### Korrespondenzadresse:

Matthias Paschke  
Dr. Beate Braun  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Institut für Biochemie, AG  
Proteinstrukturforschung  
Monbijoustr. 2a  
D-10117 Berlin  
matthias.paschke@charite.de  
www.afforis.de

