

## Press release

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT

Dipl.-Phys. Annette Maurer

03/23/2011

<http://idw-online.de/en/news414700>

Research results, Transfer of Science or Research  
Biology, Medicine, Nutrition / healthcare / nursing  
transregional, national



## Zellfreie Proteinsynthese

Die Genomforschung hat in den vergangenen Jahren zur Identifizierung einer Vielzahl von Genen aus unterschiedlichen Spezies geführt. Dem überwiegenden Teil dieser Gen-Sequenzen kann jedoch derzeit keine definierte Funktion zugeordnet werden, da die kodierten Proteine nur unzureichend oder überhaupt nicht mit den üblichen zellbasierten Expressionsmethoden darstellbar sind. Essentielle Voraussetzung für eine eindeutige Zuordnung und Validierung der Funktion ist die Verfügbarkeit korrekt synthetisierter und prozessierter Proteine. Hieraus ergibt sich ein steigender Bedarf an effizienten Proteinsynthesystemen, die in der Lage sind, Proteine unterschiedlichster struktureller und funktioneller Klassen gleichermaßen in hoher Qualität und Quantität zu generieren. In diesem Kontext kommt die Methode der zellfreien Proteinsynthese derzeit immer häufiger zur Anwendung, da sie es erlaubt, die notwendigen Arbeitsschritte von der DNA zum Protein enorm zu beschleunigen. Darüber hinaus können zellfrei hergestellte Proteine gezielt mit neuartigen Eigenschaften versehen werden, die für weitergehende technologische Anwendungen von entscheidender Bedeutung sind.

### Anfänge der Technologieentwicklung

In den 60er Jahren konnten Marshall Nirenberg und Heinrich Matthaei erstmals mit Hilfe von prokaryotischen Enzymextrakten verschiedene essentielle Faktoren der Proteinsynthese charakterisieren. Das berühmte "Poly-U-Experiment" zeigte unter anderem den Einfluss einer "Matrizen-RNA" bei der Proteinsynthese – ein Meilenstein für die anschließende Entdeckung der Basentriplets als codierende Einheit für Aminosäuren. Ende der 80er Jahre konnte das Leistungsvermögen der Zellsysate insbesondere durch die Arbeiten von Alexander Spirin deutlich verbessert werden, wodurch erstmals Synthesen größerer Proteinmengen in zellfreien Systemen möglich wurden. Das von Spirin patentierte „Continuous-Exchange Cell-Free“-Verfahren (CECF-Verfahren) basiert auf einem kleinen Bioreaktor mit einer Synthesekammer und einem angeschlossenen Vorratsbehälter, der die Reaktion kontinuierlich über eine Dialysemembran mit frischen Verbrauchssubstanzen wie ATP und GTP als Energieträgern und allen notwendigen Aminosäuren als Bausteine für die Proteinsynthese versorgt. Zugleich werden dabei der Synthesekammer niedermolekulare Inhibitoren entzogen, die bei zunehmender Konzentration stören würden. In der Reaktionskammer verbleiben die kodierenden Nukleinsäuren und die ribosomale Maschinerie zur Proteinsynthese sowie die sich anreichernden neu synthetisierten Proteine. Im Ergebnis ermöglichte diese Technologie erstmals eine kontinuierliche zellfreie Synthese von Proteinen über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden, wodurch die Proteinausbeute gegenüber anderen Systemen deutlich verbessert wurde.

### Aktuelle in vitro Translationssysteme

Die intensive Forschung auf dem Gebiet der zellfreien Proteinsynthese hat im Zuge der Systementwicklung dazu geführt, dass zunächst die Limitierungen der pro- und eukaryotischen In-vitro-Translationssysteme ermittelt und die grundlegenden Parameter optimiert wurden. Zur Zeit intensiv bearbeitete Forschungsfelder sind insbesondere die Weiterentwicklung translationsaktiver Zellsysate zu hochproduktiven Systemen, die Generierung und Optimierung spezieller DNA- und RNA- Matrizen für die verschiedenen zellfreien Systeme und die Verbesserung der

Reaktionsführung in neu zu entwickelnden Reaktorsystemen.

### Prokaryotische Systeme

Das auf Lysaten aus E.coli basierende System liefert in einfachen Batch-basierten Verfahren Proteinausbeuten von bis zu 1 mg/ml und wurde vor allem dahingehend verbessert, dass ein hoher Proteinanteil in löslicher und funktioneller Form vorliegt. Im Gegensatz zur klassischen Expression von Proteinen in Zellen und Bakterien erlauben die offenen, zellfreien Systeme die Einstellung des Ionenmilieus, der Reaktionstemperatur und die Zugabe von milden Detergenzien sowie Faltungshelfern (Chaperonen) bereits während der Proteinsynthese. Sogenannte „Problemproteine“ die bislang nur schwer exprimierbar waren oder zytotoxische Effekte aufweisen und die Wirtszelle abtöten, werden nunmehr durch den Einsatz einer multifaktoriellen Matrix mit einer Protein-spezifischen Supplementierung der Translationsreaktion in automatisierten, hochparallelen zellfreien Systemen dargestellt. Insbesondere die von Laborrobotern beschickten Dialysesysteme ermöglichen die Synthese eines breiten Spektrums funktionell aktiver Proteine. Neben der Verhinderung von Fehlfaltung oder Aggregatbildung („inclusion bodies“) wird das System durch das Einstellen eines definierten Redoxpotentials und die Zugabe von Disulfidisomerase an die Bildung von disulfidverbrückten Proteinen adaptiert. Dies ermöglicht die Herstellung funktioneller Antikörperfragmente, sogenannter Einzelstrang-Antikörper (scFvs). Die kostenintensive Bereitstellung eines speziellen Zellkulturlabors mit aufwendig realisierten Sterilbedingungen für die Hybridomatechnologie ist durch diese Technologie ebenso obsolet, wie die wiederholte Immunisierung von Versuchstieren. Funktionelle Antikörperfragmente für die medizinische Diagnostik werden in zellfreien Systemen selektiert und in ökonomischen Verfahren produziert. Im Labormaßstab werden komplexe und modifizierte Proteine in speziellen Bioreaktoren synthetisiert. Hierbei entfallen die bei Zellbiologen sonst allgegenwärtigen Sorgen um Zellvitalität, Kontaminationen und Gefahrstufen, da im Rahmen der zellfreien Proteinsynthese keinerlei gentechnisch modifizierte Organismen entstehen.

### Eukaryotische Systeme

Die Expression funktionell aktiver eukaryotischer Proteine erfordert nicht nur das koordinierte Zusammenwirken des Proteinexpressionsapparates, sondern auch die Integrität aller ko- und posttranslational modifizierend einwirkender Komponenten. Sollen humane Gene in modifizierter und zugleich aktiver Form hergestellt werden, so geschieht dies am besten in einem System, welches der nativen Umgebung dieser Proteine bereits zum Zeitpunkt der Synthese weitestgehend entspricht. Aus diesem Grund werden kultivierte Säugerzellen, im Besonderen humane Zelllinien, in großem Umfang dazu genutzt, pharmakologisch relevante Proteine in humanidentischer Weise herzustellen. Neben umfangreichen posttranslationalen Modifikationen wie N- und O-Glykosylierungen sind auch kovalente Modifikationen wie Palmitoylierungen, Myristylierungen und Phosphorylierungen von Bedeutung. Kultivierte eukaryotische Zelllinien verfügen zumeist über die notwendige subzelluläre Strukturierung und die darin befindlichen enzymatischen Aktivitäten zur Durchführung dieser Proteinmodifikationen. Sie stellen damit ein ideales Ausgangssubstrat zur Herstellung eukaryotischer In-vitro-Translationssysteme dar. Dabei werden die generellen Vorteile der zellfreien Proteinsynthese, wie etwa die Möglichkeit zytotoxische und markierte Proteine zu synthetisieren, mit einer schnellen und einfach zu handhabenden Darstellungsmöglichkeit funktionell aktiver eukaryotischer Proteine kombiniert. Aufgrund des angewandten Verfahrens zur Homogenisation eukaryotischer Zellen werden intrazelluläre, vesikuläre Strukturen in funktionell aktiver Form im Lysat erhalten. Diese mikrosomalen Elemente werden für die kotranslationale Translokation und Immobilisierung zellfrei synthetisierter Membranproteine an Chip-Oberflächen eingesetzt. Die funktionelle Integrität dieser subzellulären Komponenten kann anhand der Signalpeptid-Abspaltung sowie der Glykosylierung zellfrei synthetisierter Proteine gezeigt werden. Dieses enorme Potential eukaryotischer In-vitro-Translationssysteme wird auch zur Herstellung von Antikörperfragmenten genutzt, wobei die Anreicherung definierter, fluoreszenzmarkierter Antikörperfragmente in Proteoliposomen stattfindet.

Die Möglichkeiten der zellfreien Proteinsynthese werden durch eukaryotische In-vitro-Translationssysteme erheblich erweitert, da posttranslationale Modifikationen die physikalisch chemischen Eigenschaften von Proteinen beeinflussen und häufig von essentieller Bedeutung für deren Funktionalität sind. Entscheidende Vorteile der zellfreien Proteinsynthese, wie etwa die Hochdurchsatz-Synthese daueraktiver oder zytotoxischer Membranproteine, können

jetzt mit Biochip-basierten, impedimetrischen und elektrophysiologischen Funktionsanalysen kombiniert werden.

## Protein-Design

Einer der grundlegenden Vorteile der zellfreien Proteinsynthese ist die Möglichkeit, lineare DNA-Template direkt in das offene System zu dosieren und die kodierte Gen-Information ohne zeitaufwendige Klonierungsschritte in Proteine umzuschreiben. Dies geschieht in gekoppelten Transkriptions-/Translationssystemen. Die mittels des Expressions-PCR-Verfahrens hergestellten Matrizen enthalten alle Elemente, die für eine effiziente Proteinsynthese sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen zellfreien Systemen erforderlich sind und werden wahlweise mit Sequenzen, die für verschiedene N- oder C-terminale Affinitätstags kodieren, ausgestattet. Auch das Anfügen N-terminaler Signalsequenzen, die für die Zielsteuerung von Membranproteinen und sekretierten Proteinen in Proteoliposomen notwendig sind, kann mit dieser Methode realisiert werden. Die Expressions-PCR stellt somit ein wichtiges Werkzeug für das gezielte Design von Proteinen dar, denn mit dieser Methode können Mutationen eingebracht werden und die synthetisierten Proteine können in einem evolutiven Prozess in ihren funktionellen Eigenschaften modifiziert und den technologischen Anforderungen angepasst werden.

## Protein-Markierung

Die Inkorporation von modifizierten und artifiziellen Aminosäuren, die mit Hilfe präacylierter tRNAs kotranslational während der Proteinsynthese in die wachsenden Proteinketten eingeführt werden, wird in pro- und eukaryotischen zellfreien Proteinsynthesystemen durchgeführt. Definierte Proteinkonjugate, insbesondere Membran- und Glykoproteinkonjugate mit biotinylierten oder fluoreszierenden Gruppen werden auf diese Weise zellfrei synthetisiert. Kotranslationale, ortsspezifische Proteinmarkierungen stellen eine schonende Methode dar, wodurch die funktionelle Charakterisierung der hergestellten Proteine erheblich vereinfacht wird. Die Detektierbarkeit einer eingebauten biotinylierten oder fluoreszierenden Aminosäure erlaubt eine Lokalisation der entsprechend markierten Membranproteine innerhalb von lipidischen Membranstrukturen ebenso, wie die effiziente Detektion einer Ligandenwechselwirkung. In Verbindung mit der Expressions-PCR ist eine schnelle Synthese verschiedenster markierter Proteine im Hinblick auf Screening-Applikationen möglich. Zusätzlich werden mit dieser Methode Proteine in Form von molekularen Schaltern hergestellt, die auf ein äußeres Signal hin ihre Fluoreszenzemission ändern.

## Perspektiven

Die Tendenz einer zunehmenden Miniaturisierung und Parallelisierung zeichnet sich im Bereich der zellfreien Proteinsynthese in besonderem Maße ab. Mit dem Einsatz rechnergesteuerter Pumpsysteme und den dazu neu zu entwickelnden mikrofluidischen Komponenten sollte in naher Zukunft in Mikro-Reaktorsystemen die kontinuierliche Synthese und Analytik pharmakologisch und technologisch relevanter Proteine in bislang noch nicht erreichten parallelisierten, subzellulären Maßstäben möglich werden.

Die steuerbare und somit ressourcenschonende zellfreie Proteinsynthese wird auch eine interessante Alternative zu den derzeit eingesetzten energieintensiven klassischen Fermentationsprozessen darstellen. Um im industriellen Produktionsmaßstab zukünftig großvolumige Reaktoren zur zellfreien Synthese von Proteinen umzusetzen, muss die Prozessregelung und Steuerung dieser Systeme detailliert untersucht und adaptiert werden.

Mit der bereits jetzt gegebenen Möglichkeit genkodierende Sequenzen vollsynthetisch herzustellen, sowie den zunehmenden Erkenntnissen aus den derzeit intensiv bearbeiteten Proteinstruktur-Projekten sollte in Kombination mit der zellfreien Proteinsynthese zukünftig ein rationales Design und eine unmittelbar folgende automatisierte Synthese von technologisch relevanten Proteinen möglich sein. Die Vielfalt der neu synthetisierbaren Proteine wird dabei nicht mehr durch die Limitierungen kultivierter oder synthetischer Zellen eingeschränkt sein.

Ansprechpartner:  
Dr. Stefan Kubick

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT  
Abteilung Zelluläre Biotechnologie & Biochips  
Arbeitsgruppe Zellfreie Proteinsynthese  
Telefon: 0331/58187-306  
E-Mail: stefan.kubick@ibmt.fraunhofer.de

URL for press release: <http://www.ibmt.fraunhofer.de>