

Ausdrucksstark

Bakterielle Oberflächenpräsentation zur Identifikation von Wirkstoffen für die Pharma- und Kosmetikindustrie

Prof. Dr. Joachim Jose,
Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster



Biologische Moleküle an Oberflächen zu koppeln und in dieser Form für Messverfahren, zur Analytik oder in Produktionsprozessen einzusetzen, ist ein innovativer Ansatz, der in industriellen Anwendungen zunehmend Bedeutung gewinnt. In gängigen Verfahren werden Oberflächen und biologische Moleküle getrennt voneinander produziert und dann in aufwändigen technischen Verfahren kombiniert. Eine besonders pfiffige Lösung besteht jedoch darin, Zellen zur Produktion der Biomoleküle einzusetzen, welche die Moleküle mithilfe natürlicher Mechanismen eigenständig an ihre Oberfläche transportieren und dort verankern. So können diese Zelloberflächen oder je nachdem, um welche Anwendung es sich handelt, auch die kompletten Zellen für Messverfahren oder Herstellungsprozesse eingesetzt werden. Die Autodisplaytechnologie bietet hierfür ein Verfahren zur einfachen und effektiven Darstellung von Proteinen, z. B. Biokatalysatoren (Enzymen), Antikörpern oder Signalrezeptoren an der Zelloberfläche des Laborarbeitstieres *Escherichia coli* (*E. coli*).

Das Autodisplaysystem beruht auf dem natürlichen Sekretionsmechanismus der Autotransporterproteine [1]. Dabei wird ein Passagierprotein oder -peptid an die Zelloberfläche eines Gram-negativen Bakteriums transportiert, wenn es auf korrekte Art und Weise in ein Vorläufermolekül eingebaut worden ist [2]. Es genügt hierbei, die kodierende Sequenz für den Passagier korrekt

mithilfe von gentechnischen Standardmethoden in das Gen für den Vorläufer einzusetzen, um den Transport an die Oberfläche zu gewährleisten. An der Oberfläche erfolgt die Verankerung des Moleküls über eine für den Transport benötigte porinähnliche Struktur, die Teil des Vorläufers ist und aufgrund ihrer Struktur die Bezeichnung β -Barrel trägt (Abb. 1). Die Verwendung des *E. coli*-Autotranspor-

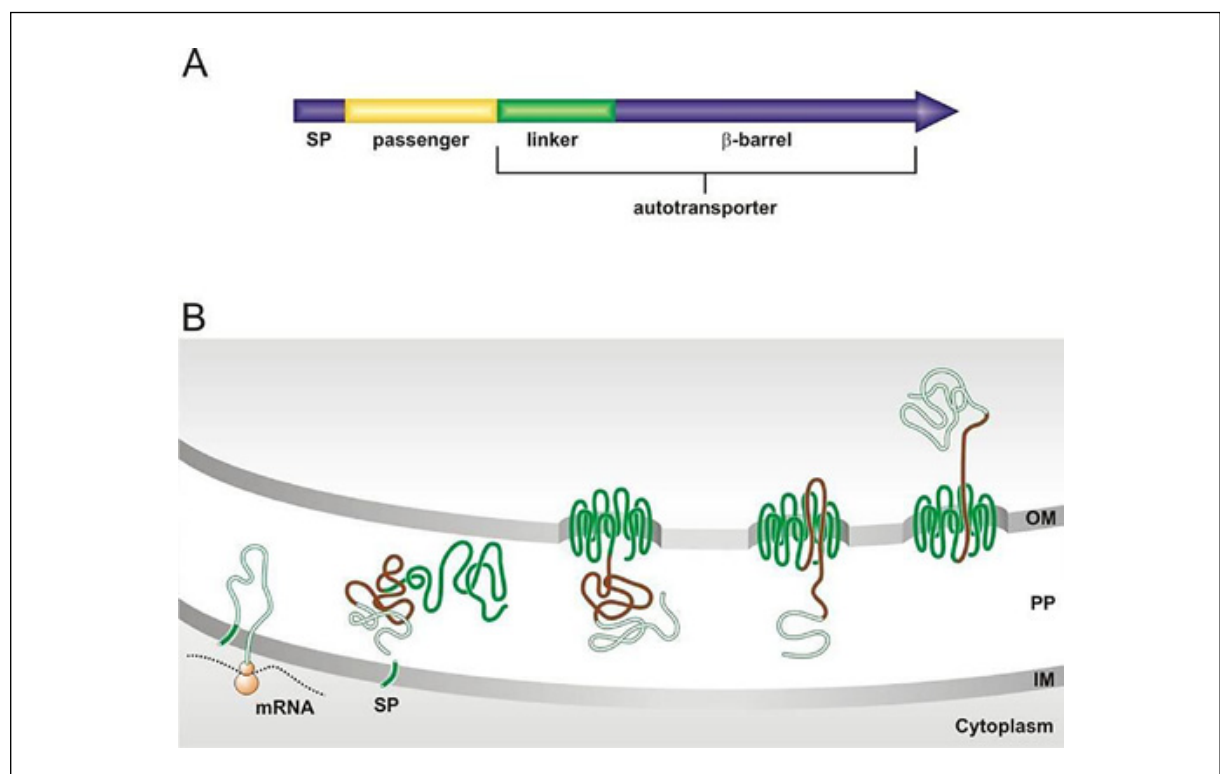


Abb. 1 Sekretionsmechanismus der Autotransporter Proteine (B), die im Cytoplasma als Vorläufer synthetisiert werden (A) und die man sich im Autodisplay zu Nutze macht

ters hat sich inzwischen anhand einer Vielzahl von Beispielpoteinen bewährt. Es konnte eine Reihe ganz unterschiedlicher Enzyme – darunter Hydrolasen, Dehydrogenasen, Esterasen und Elektronen übertragende Proteine in aktiver Form – an der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden. Aber auch Antikörperfragmente, Inhibitoren, Rezeptoren und Peptidbibliotheken lassen sich funktionell einfach und effizient auf diesem Wege darstellen [3,4].

***E. coli*-Surface-Display**

Vorteile funktioneller Oberflächenexpression

Die Expression eines Proteins oder eines Peptides an der Oberfläche einer lebenden Zelle, das so genannte Surface-Display, bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der intrazellulären Expression. Das Molekül ist an der Zelloberfläche für Bindungs- oder Aktivitätsstudien direkt zugänglich. Eine Membranbarriere muss nicht überwunden werden und es ist auch kein Zellaufschluss notwendig. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass immobilisierte Proteine oder Peptide in biotechnischen Anwendungen wesentlich stabiler als freie gereinigte Moleküle sind. Im Falle des Surface-Displays liegt das Molekül durch Verknüpfung mit der Zellhülle quasi biologisch immobilisiert vor. Ein dritter wesentlicher Vorteil ergibt sich, wenn man Zellen mit oberflächenexprimierten Proteinen oder Peptiden zur Herstellung von Molekülbibliotheken einsetzt. Sortiert man eine Zelle, die das Molekül mit der gewünschten Eigenschaft an der Oberfläche trägt, mithilfe eines geeigneten Selektionsverfahrens aus, sortiert man gleichzeitig das interne Label für das oberflächenexprimierte Molekül, die dafür kodierende DNA-Sequenz, mit aus. Damit kann dann einfach und schnell die Primärstruktur des oberflächenexprimierten Moleküls mit der gewünschten Eigenschaft ermittelt werden. Es genügt in diesem Fall, eine einzige Zelle über das oberflächenexprimierte Molekül auszusortieren. Diese vermehrt sich selbstständig zu präparativen Mengen, alle weiteren Schritte ergeben sich daraus und beruhen auf Standardlabormethoden. Dies ist auch ein entscheidender Vorteil des Surface-Displays gegenüber dem für ähnliche Anwendungen eingesetzten Phage-Display.

Abgesehen von der einfachen Handhabung hebt sich das Autodisplaysystem in drei weiteren Punkten von allen anderen Surface-Displaysystemen ab. Zum Ersten liegt die Anzahl der an der Oberfläche präsentierten Moleküle in der Größenordnung von 100.000 und darüber.



Joachim Jose, geb. 1961, studierte Biologie an der Universität Saarbrücken, wo er promovierte. Die Habilitation erfolgte am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität des Saarlandes. Von 2004 bis 2011 war Professor für Bioanalytik (C3) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, wo er seit 2008 das Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie leitete. 2011 folgte er dem Ruf auf einen Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie an die Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Die wissenschaftlichen Arbeiten von Joachim Jose wurden mehrfach ausgezeichnet, u.a. mit dem Innovationspreis in Medizinischer Chemie (2008), der gemeinsam von GDCH und DPhG verliehen wird, dem SaarLB Wissenschaftspreis 2003 oder der Aufnahme in die „Académie nationale de Pharmacy“ in Paris 2009.

Trotz dieser immensen Expression kommt es nicht zu spontanen Zelllysen oder Viabilitätsverlusten wie bei anderen Systemen. Die Zellen bleiben stabil und überstehen ohne Weiteres Ganzzellscreeningverfahren wie die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting/FACS), wobei sortierte Einzelzellen zu klonalen Populationen heranwachsen und analytischen sowie präparativen Zwecken zugeführt werden können. Zum Zweiten können sich zwei oder mehrere als Monomere exprimierte Untereinheiten, die Affinität zueinander haben, an der Zelloberfläche spontan zu funktionellen Dimeren oder Multimeren zusammenlagern. Diese so genannte passagiergetriebene Oligo- oder Multimerisierung ist bisher für kein anderes System beschrieben worden und hängt mit der freien Beweglichkeit der als Membrananker dienenden β -Barrel-Struktur in der äußeren Membran von *E. coli* zusammen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, wichtige eukaryontische Proteine, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind wie z.B. Antikörper oder Rezeptoren, der funktionellen Oberflächenexpression in *E. coli* zugänglich zu machen. Außerdem hat man die Option, Kombinatorik an der Zelloberfläche von *E. coli* zu betreiben, beispielsweise beim Einsatz des Autodisplaysystems in der gerichteten Evolution. Schließlich können anorganische prosthetische Gruppen in Apoproteine, die an der Zelloberfläche exprimiert sind, nachträglich eingebaut werden, ohne dass die Zellen geschädigt werden.

Autodisplay als Screening-Tool

Durch Autodisplay können peptidische Wirkstoffbibliotheken an der Oberfläche von *E. coli* exprimiert und dann, bedingt durch die direkte Zugänglichkeit, mit einfachen Mitteln auf „Hits“ hin durchsucht werden können. Das Prinzip besteht darin, dass Peptide oder Proteine an der Oberfläche der *E. coli*-Zellen dargestellt werden können und dabei jede einzelne *E. coli*-Zelle eine andere Peptid- oder Proteinvariante an der Oberfläche trägt. Durch Einsatz der Durchflusszytometrie (FACS) können diese Bibliotheken dann schnell durchmustert und „Hits“ können aussortiert werden [5].

Damit konnten beispielsweise an der Zelloberfläche exprimierte Peptidbibliotheken über die spezifische Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Target-Enzym gescreent werden. Dabei wurde die Affinität eines potenziellen Inhibitors zu seinem Target – zur Selektion – genutzt. Das Targetmolekül war zu diesem Zweck mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Zellen, die Peptide

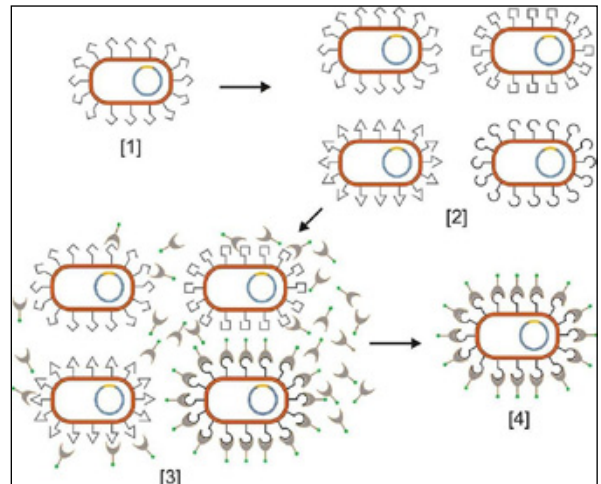


Abb. 2 Evolutionäre Wirkstoffentwicklung mit Autodisplay. [1] Funktionelle Oberflächenexpression eines „Biologicals“ oder „small protein drugs“. [2] Zufallsvariation und Erstellung einer Bibliothek von *E. coli* Zellen, die alle eine unterschiedliche Variante tragen. [3] Screening über Bindung des markierten Targets. [4] Identifizierung der Struktur über die co-selektionierte dazugehörige DANN

mit einer Affinität zu dem markierten Target an der Oberfläche trugen, konnten anschließend über die so vermittelte Fluoreszenz im FACS aussortiert werden (Abb. 2). Mit dieser Strategie ist es gelungen, neue Wirkstoffe gegen chronisch entzündliche Erkrankungen und neue Biokatalysatoren zu entwickeln. Eine ähnliche Strategie wurde erfolgreich bei der evolutionären Entwicklung von Antikörperfragmenten angewandt. Dabei konnten auch kombinatorische Bibliotheken entwickelt und gescreent werden. Prinzipiell steht damit eine Technologie zur systematischen Entwicklung von Biologicals oder Small Protein Drugs zur Verfügung. Dabei kann es sich um Rezeptor-Agonisten oder Rezeptor-Antagonisten, Antikörper abgeleitete Bindeproteine oder strukturell davon vollkommen unabhängige Bindeproteine handeln.

Andererseits kann die Autodisplaytechnologie auch zur Oberflächenexpression eines pharmazeutisch relevanten Targetproteins genutzt werden, welches dann zur Durchmusterung einer Bibliothek von small molecules oder Naturstoffen eingesetzt werden kann [6].

■ joachim.jose@uni-muenster.de

Literatur

- [1] Jose, J., Jähnig, F. & Meyer, T.F. (1995) *Mol Microbiol* 18, 380–382.
- [2] Jose, J. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 607–614.
- [3] Jose, J. & Meyer, T.F. (2007) *Microbiol Mol Biol R* 71, 600–619.
- [4] Jose J, Maas RM, Teese MG (2012) *J Biotechnol*, 161:92–103.
- [5] Jose J, Betscheider D, Zangen D (2005) *Anal Biochem*, 346:258–267.
- [6] Kaeßler A, Olgen S, Jose J (2011) *Europ J Pharm Sci*, 42: 138–147.



Autodisplay Biotech GmbH

Das 2008 von Prof. Dr. Joachim Jose gemeinsam mit Dr. Ruth Maas und Dr. Gunter Festel gegründete Spin-off aus der Pharmazie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, beschäftigt sich mit der Autodisplaytechnologie, welche die kostengünstige Entwicklung und Herstellung von Biokatalysatoren, Pharmaproteinen und Wirkstoffen für Arzneimittel ermöglicht. Die derzeit besonders im Fokus

stehende Anwendung ist die Entwicklung von Bibliotheken, die einfach und schnell zur Identifikation von Wirkstoffen für die Pharma- und Kosmetikindustrie erstellt oder gescreent werden können.

■ gunter.festel@autodisplay-biotech.com