

Zellfreie Proteinproduktion

Membranproteinsynthese: Zellfrei geht's schneller!

RITA SACHSE, ROBERT B. QUAST, ANDREI SONNABEND, MARLITT STECH, STEFAN KUBICK

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR ZELLTHERAPIE UND IMMUNOLOGIE (IZI), INSTITUTSTEIL BIOANALYTIK UND BIOPROZESSE (IZI-BB), POTSDAM-GOLM

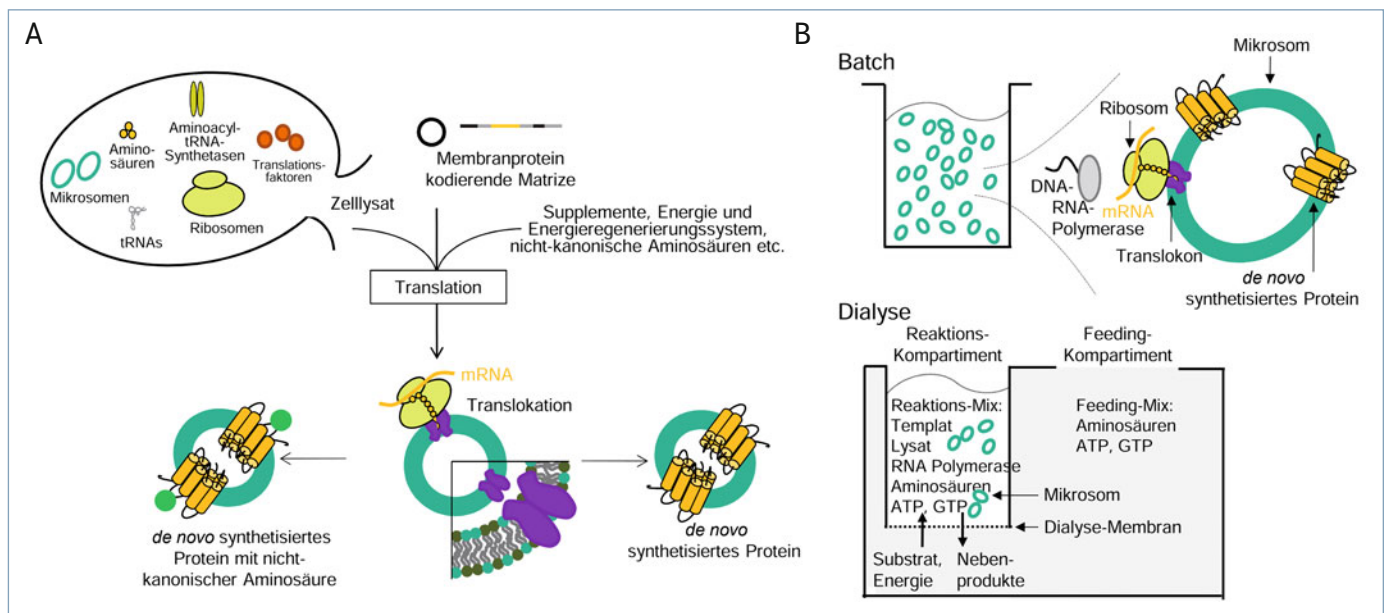
Difficult to express membrane proteins represent an increasing amount of therapeutic molecules. Considerable optimization is often required for downstream applications such as assay development and functional characterization. Cell-free systems emerged as powerful tools for the synthesis of structurally and functionally divergent membrane proteins. Vesicle-based eukaryotic cell-free systems enable co-translational protein translocation and posttranslational modifications. Hence, these systems provide a multitude of options for membrane protein studies.

10.1007/s12268-014-0481-7
© Springer-Verlag 2014

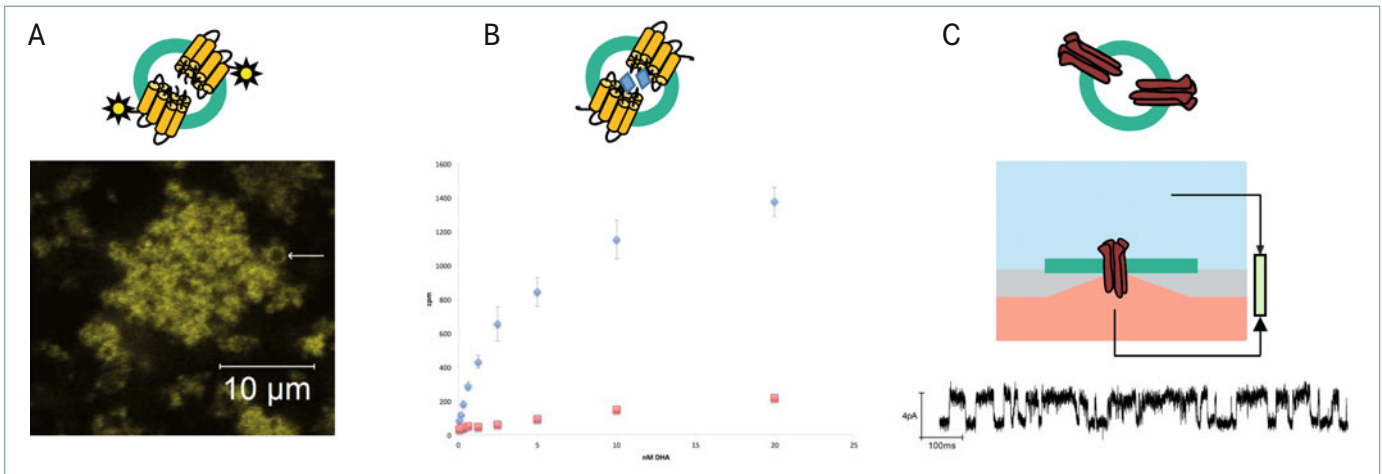
■ Etwa ein Drittel aller humanen Gene codieren für Membranproteine, und mehr als 50 Prozent aller beim Menschen pharmakologisch wirksamen Substanzen entfalten ihre Wirkung durch die Interaktion mit Mem-

branproteinen. Damit steht diese Proteinklasse gegenwärtig im Fokus einer Vielzahl von Forschungsaktivitäten, was wiederum einen ständig steigenden Bedarf an funktionell aktiven Membranproteinen zur Folge hat.

Konventionelle Methoden zur Herstellung von Membranproteinen beruhen auf der Überexpression der Proteine in Zellkulturen (*in vivo*). Der unumgängliche Eingriff in den Stoffwechsel lebender Zellen bei der Überexpression von Membranproteinen hat jedoch häufig einen negativen Einfluss auf den Wirt. Es kommt zu toxischen Effekten, fehlendem Transport in Zielmembranen sowie einem raschen proteolytischen Abbau. Dies sind einige der Gründe, warum bisher nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Membranproteinen funktionell und strukturell detailliert charakterisiert wurde. Eine Lösung dieses Problems ist der zellunabhängige (*in vitro*) Einsatz der biologischen Proteinsynthesemaschinerie zur Herstellung von Membranproteinen. Zellfreie Proteinsynthesysteme nutzen translationsaktive Zellextrakte (Lysate), um funktionell aktive Membranproteine unter individuell optimierten Bedingungen herzustellen und damit deren spezifische Eigenschaften für weitergehende analytische Verfahren zu erhalten.



▲ **Abb. 1:** Zellfreie Membranproteinsynthese in eukaryotischen Systemen. **A,** Das *de novo* synthetisierte Membranprotein wird während der Synthese in die endogenen Mikrosomen transloziert. **B,** Die zellfreie Synthese von Membranproteinen kann u. a. in Batch-Reaktionen (oben) oder Dialysesystemen (unten) durchgeführt werden. Dialysesysteme erbringen eine Ausbeute von ca. 50 Mikrogramm pro Milliliter im Vergleich zu etwa 10 Mikrogramm pro Milliliter in Batch-Reaktionen, abhängig vom Proteintyp und Lysat.



▲ **Abb. 2:** Charakterisierung zellfrei synthetisierter Membranproteine in endogenen Mikrosomen. **A,** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines mit eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fusionierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCRs) in Mikrosomen. **B,** Funktionsnachweis des β_2 -adrenergen Rezeptors mittels eines Dihydroalprenolol(DHA)-Radioligand-Bindungsassays (blau) im Vergleich zur Kontrolle (rot). **C,** Elektrophysiologische Charakterisierung des zellfrei synthetisierten tetrameren Kaliumionenkanals KcsA.

Ein bedeutender Vorteil zellfreier Systeme ist ihr „offenes“ Design. Hiermit ist es möglich, dem System Komponenten extern zuzuführen, um die Qualität und Quantität des Proteins zu beeinflussen. Einen weiteren essenziellen Vorteil bietet die Verwendung eukaryotischer Lysate [1, 2]. Insbesondere die mit diesen Lysaten bereitgestellten Membranstrukturen (Mikrosomen) sind ein wichtiges Charakteristikum. Sie stammen aus der Membran des zelleigenen endoplasmatischen Retikulums und besitzen Proteine, die sie zur Translokation befähigen. Somit ist auch in zellfreien eukaryotischen Systemen eine gerichtete Integration von Membranproteinen in eine biologische Membran möglich. Diese Integration ist für die Funktionalität von Membranproteinen essenziell, da hierbei u. a. die korrekte Proteinfaltung und die Ausbildung der nativen Konformation unterstützt werden. Auch posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise die Abspaltung des Signalpeptids, N-Glykosylierung sowie Lipidmodifikationen finden innerhalb der Mikrosomen statt [3–5]. Eine schematische Darstellung der Synthese von Membranproteinen in eukaryotischen zellfreien Systemen ist in **Abb. 1** gezeigt.

Zellfreie Produktion von GPCRs und Ionenkanälen

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Gruppe von Membranproteinen dar. Diese Klasse der heptahelikalen Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung von biologischen Signalen über die Plasmamembran in das Zellinnere und löst

damit eine Aktivierung der zytoplasmatischen Signaltransduktionswege aus. Aufgrund der herausragenden Rolle der GPCRs in diversen Signaltransduktionskaskaden sind sie ein Hauptziel der sich auf dem Markt oder in der Entwicklung befindlichen Pharmaka. Ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen von GPCRs durch Untersuchung der Struktur und Funktion dieser Proteine ist aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen von besonderem Interesse.

Das Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptors (β_2 AR) zeigt, dass eine effiziente und zeitsparende Synthese mit einer anschließenden funktionellen Charakterisierung von GPCRs in eukaryotischen zellfreien Systemen möglich ist (**Abb. 2**). Anhand von Radioligand-Bindungsstudien konnte z. B. im Anschluss an eine nur 90 Minuten dauernde zellfreie Synthese des β_2 AR die spezifische Bindung des Agonisten (Dihydroalprenolol, DHA) an den Rezeptor nachgewiesen werden (**Abb. 2B**).

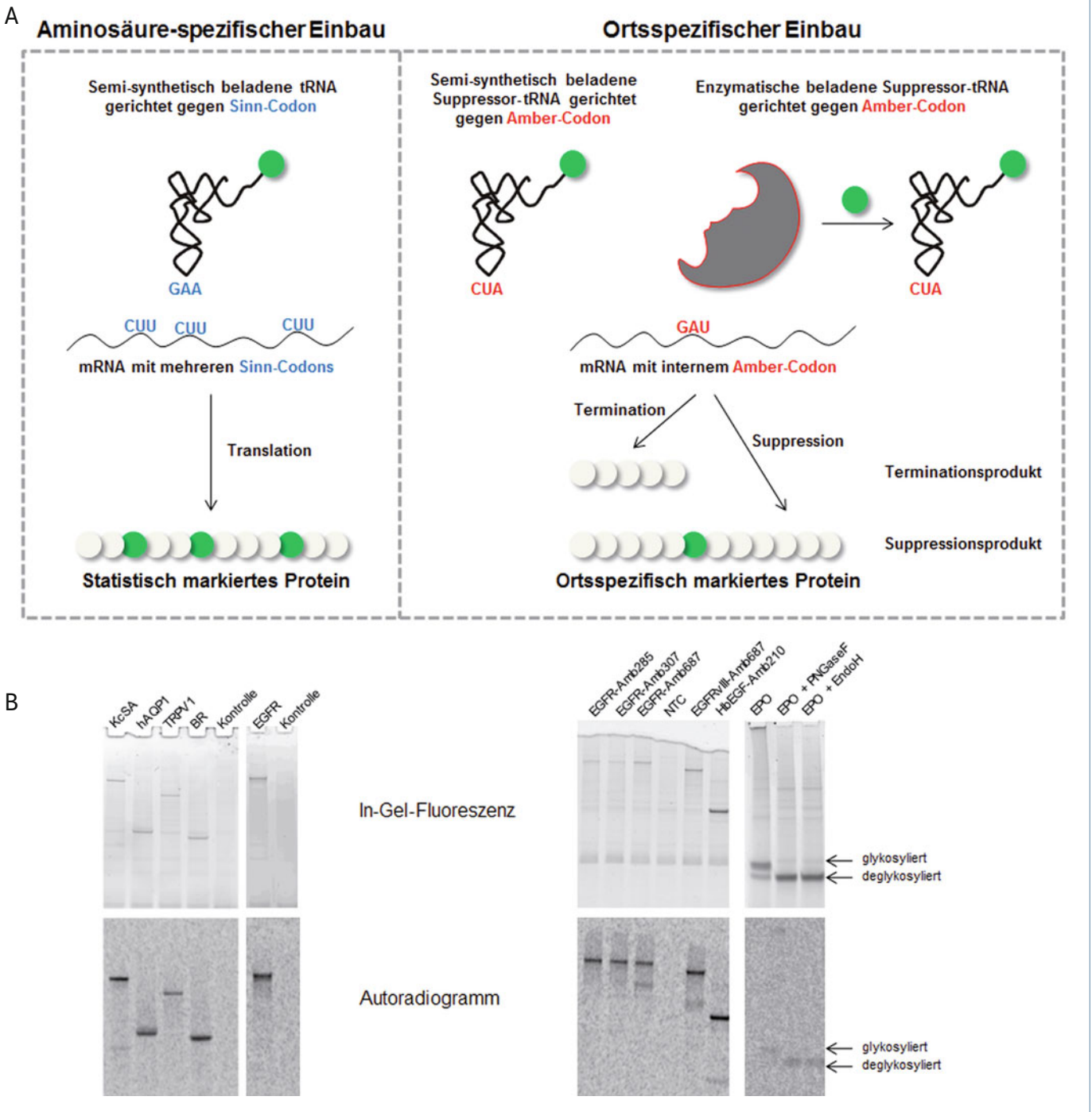
Zusätzlich können GPCR-enthaltende Mikrosomen zu großen Vesikeln (*giant unilamellar vesicles*, GUV) umgebaut werden und bilden damit ein System für mikroskopische Einzelmolekülanalysen zur Charakterisierung der Zielproteine [4, 6].

Die Synthese von komplexen Membranproteinen unter Verwendung von Mikrosomen-haltigen eukaryotischen Zellysaten bietet eine einfache und effiziente Verfahrensweise zur Herstellung von funktionellen GPCRs, aber auch multimere Ionenkanäle können in diesen Systemen dargestellt werden. So konnte beispielsweise der Kaliumkanal KcsA zellfrei synthetisiert und an-

schließend durch Vesikelfusion in planaren Bilayern mittels elektrophysiologischer Messungen funktionell charakterisiert werden (**Abb. 2C**, [7]).

Eukaryotische Lysate in Dialysesystemen

Die zellfreie Synthese von Membranproteinen kann in verschiedenen Reaktionsformaten durchgeführt werden. Hierbei erfreuen sich besonders sogenannte „Eintopf“- oder Batch-Reaktionen großer Beliebtheit. Batch-basierte Systeme eignen sich zur anwenderfreundlichen, einfachen und schnellen Synthese eines Zielproteins. Sie sind zwar durch kurze Reaktionszeiten gekennzeichnet, führen jedoch häufig auch zu relativ geringen Gesamtausbeuten. Eine Möglichkeit, die Laufzeit einer zellfreien Proteinsynthesereaktion zu verlängern, um somit höhere Proteinausbeuten zu erzielen, bietet die Verwendung von „Dialysesystemen“. In der Regel bestehen solche Systeme aus zwei Kammern, die über eine Dialysemembran miteinander verbunden sind. Über die Membran gelangen die Aminosäuren und energiereiche Substanzen (z. B. ATP, GTP) durch Diffusion in das Reaktionskompartiment, den eigentlichen Ort der Proteinsynthese. Gleichzeitig wird die Konzentration von inhibierenden Substanzen reduziert, da diese aus der Reaktionskammer heraus in die zweite Kammer diffundieren können. Anhand strukturell verschiedener Modellproteine, darunter mehrere pharmakologisch relevante Membranproteine, konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteinsynthesen bis über 24 Stunden



▲ Abb. 3: Methoden zum Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren in zellfreien Systemen. **A**, Schematische Darstellung des Einbaus von nicht-kanonischen Aminosäuren in zellfrei synthetisierte Proteine. Man unterscheidet entsprechend der verwendeten tRNAs zwischen Aminosäure-spezifischem Einbau (links), der zu einer statistischen Verteilung der nicht-kanonischen Aminosäure im Zielprotein führt, und ortsspezifischem Einbau (rechts) an einer definierten Position. Geeignete tRNAs können entweder semi-synthetisch beladen und direkt zur zellfreien Proteinsynthesereaktion zugegeben werden oder durch Verwendung einer orthogonalen Synthetase enzymatisch aminoacyliert werden. **B**, Aminosäure-spezifisch (links) bzw. ortsspezifisch modifizierte Proteine (rechts), hergestellt in zellfreien Systemen. Der Aminosäure-spezifische Einbau erfolgte durch Verwendung einer semi-synthetisch beladenen tRNA_{GAA} mit Bodipy-TMR-Lysin. Im Gegensatz dazu wurde p-Azido-L-Phenylalanin ortsspezifisch mittels eines orthogonalen tRNA_{CUA}/Synthetase-Paares in zellfrei synthetisierte Proteine eingebaut. Die Suppressionsprodukte wurden anschließend durch Staudinger-Ligation mit DyLight650-Phosphin modifiziert. Gezeigt werden jeweils die Fluoreszenz der Zielproteine (oben) und vergleichend dazu deren radioaktive Markierung mit ¹⁴C-Leucin (unten) nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionen.

mit bis zu fünffach gesteigerten Proteinausbeuten betrieben werden können [8]. Die von uns etablierten eukaryotischen Translationssysteme bieten demnach den besonderen Vorteil, dass sie komplexe Proteine sowie Proteine mit posttranslationalen Modifikationen für pharmakologische Analysen in grö-

ßeren Mengen zeitsparend verfügbar machen.

Ko-translatinaler Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren

Natürliche Systeme beschränken sich bei der Auswahl von Grundbausteinen zur Synthese

von Proteinen auf die 22 proteinogenen oder auch kanonischen Aminosäuren. Sowohl für analytische Zwecke als auch für die Generierung von Proteinen mit gänzlich neuen, artifizialen Eigenschaften haben Wissenschaftler jedoch Wege gefunden, dieses natürliche Repertoire zu erweitern. Nicht-kanonische

Aminosäuren, die sich von den kanonischen Aminosäuren ableiten, können in chemischen Laboren hergestellt und mittels verschiedener synthetischer, aber auch enzymatischer Methoden gerichtet in Proteine eingebracht werden. Die Verwendung von solchen nicht-kanonischen Aminosäuren im Kontext der zellfreien Proteinsynthese bietet dabei den großen Vorteil, dass in zellfreien Systemen keine Plasmamembran mehr vorhanden ist. Dadurch können gewünschte nicht-kanonische Aminosäuren sowie weitere für deren Einbindung in die Proteinsynthese notwendige Komponenten der Synthesereaktion direkt in definierten Konzentrationen zugegeben werden, um modifizierte Proteine zu erhalten [5, 9]. Eine zentrale Rolle spielen dabei die tRNAs, die durch Wechselwirkung ihres Anticodons mit entsprechend komplementären Codons in der mRNA den genetischen Code ablesen. Verwendet man tRNAs, die gegen eines der 61 Aminosäure-codierenden Sinn-Codons gerichtet sind, konkurrieren diese mit endogenen tRNAs, die das gleiche Anticodon besitzen. Daraus resultiert ein heterogenes Produkt, in dem die nicht-kanonische Aminosäure statistisch an mehreren Positionen in das Zielprotein eingebaut wird. Im Gegensatz dazu ermöglichen Suppressor-tRNAs einen zielgerichteten Einbau, indem sie eines der Stoppcodons umfunktionieren. Am weitesten verbreitet ist dabei die Verwendung des Amber-Stoppcodons, TAG, welches durch Mutagenese an der gewünschten Position in ein zu exprimierendes Gen eingebracht werden kann. Auch hier kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Suppressor-tRNA und den Terminationsfaktoren, die für die Termination der Proteinsynthese verantwortlich sind. Das Resultat ist ein Gemisch aus Voll-längenprotein mit eingebauter nicht-kanonischer Aminosäure, dem Suppressionsprodukt, und dem durch Termination am internen Stoppcodon verkürzten Terminationsprodukt (**Abb. 3**). Um einen effizienten Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren in zellfreien Systemen zu erreichen, ist ein ausreichender Pool an beladenen tRNAs während der Synthesereaktion unumgänglich. Aufgrund des „offenen“ Designs der zellfreien Systeme können beladene tRNAs direkt zur Reaktion zugegeben werden. Ein wesentlicher Nachteil ist dabei jedoch deren kontinuierlicher Verbrauch, was die Mengen an

gewünschtem modifiziertem Proteinprodukt begrenzt. Alternativ wurden orthogonale tRNA/Synthetase-Paare entwickelt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie in einem gegebenen System nicht mit endogenen tRNAs bzw. Synthetasen interagieren. Auf diese Weise ermöglichen sie eine konstante Aufrechterhaltung des beladenen Suppressor-tRNA-Pools mittels kontinuierlicher enzymatischer Wiederbeladung. Durch die freie Zugänglichkeit zellfreier Systeme lassen sich die Synthesebedingungen gezielt manipulieren, um optimale Einbauraten zu erreichen. Die Automatisierbarkeit ermöglicht es darüber hinaus, schnell ein Mutantenscreening durchzuführen, um geeignete Positionen für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure zu finden und gekoppelt an funktionelle Analysen Proteine mit optimierten Eigenschaften zu identifizieren.

Fazit

Zellfreie Proteinsynthesysteme stellen eine zukunftsweisende Technologieplattform dar, die es ermöglicht, die Vielzahl identifizierter Gensequenzen effizient in Proteine umzuschreiben und diesen Proteinen definierte Funktionen zuzuordnen. Insbesondere Membranproteine, die mit herkömmlichen Methoden in lebenden Zellen nur schwer oder gar nicht synthetisierbar sind, können in zellfreien Systemen innerhalb kürzester Zeit produziert und im unmittelbaren Anschluss funktionell charakterisiert werden.

Neben den hier beschriebenen Vorteilen bei der Synthese von Membranproteinen bieten sich die zellfreien Systeme aufgrund ihrer hervorragenden Adaptierbarkeit an die individuellen „Erfordernisse“ des Zielproteins auch für die Herstellung von funktionellen Antikörperfragmenten [10, 11] oder Toxinen [12, 13] an. Ihre bereits erfolgreich gezeigte Synthese in zellfreien Systemen verdeutlicht noch einmal das Potenzial dieser Plattformtechnologie: Entscheidende Beiträge zum Vorschreiten von Forschung und Anwendung auf dem Gebiet der schwer herstellbaren Proteine sind jetzt in greifbare Nähe gerückt. ■

Literatur

[1] Sachse R, Dondapati SK, Fenz SF et al. (2014) Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett* 588:2774–2781

- [2] Stech M, Brödel AK, Quast RB et al. (2013) Cell-free systems: functional modules for synthetic and chemical biology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 137:67–102
- [3] Kubick S, Gerrits M, Merk H et al. (2009) *In vitro* synthesis of posttranslationally modified membrane proteins. In: DeLucas L (Hrsg) *Membrane Protein Crystallization*. Current Topics in Membranes, Academic Press, Elsevier, San Diego
- [4] Shaklee PM, Semrau S, Malkus M et al. (2010) Protein incorporation in giant lipid vesicles under physiological conditions. *Chembiochem* 11:175–179
- [5] Sachse R, Wüstenhagen D, Šamálíková M et al. (2013) Synthesis of membrane proteins in eukaryotic cell-free systems. *Eng Life Sci* 13:39–48
- [6] Fenz SF, Sachse R, Schmidt T et al. (2014) Cell-free synthesis of membrane proteins: tailored cell models out of microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1838:1382–1388
- [7] Dondapati SK, Kreir M, Quast RB et al. (2014) Membrane assembly of the functional KcsA potassium channel in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *Biosens Bioelectron* 59:174–183
- [8] Stech M, Quast RB, Sachse R et al. (2014) A continuous-exchange cell-free protein synthesis system based on extracts from cultured insect cells. *PLoS One* 9:e96635
- [9] Quast RB, Claussnitzer I, Merk H et al. (2014) Synthesis and site-directed fluorescence labeling of azido proteins using eukaryotic cell-free orthogonal translation systems. *Anal Biochem* 451:4–9
- [10] Stech M, Merk H, Schenk JA et al. (2012) Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *J Biotechnol* 164:220–231
- [11] Stech M, Hust M, Schulze C et al. (2014) Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering and modification of scFv antibody fragments. *Eng Life Sci*, doi: 10.1002/elsc.201400036
- [12] Orth JH, Schorch B, Boundy S et al. (2011) Cell-free synthesis and characterization of a novel cytotoxic pierisin-like protein from the cabbage butterfly *Pieris rapae*. *Toxicol* 57:199–207
- [13] Bechlars S, Wüstenhagen DA, Dragert K et al. (2013) Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Toxicol* 76:132–142



Rita Sachse, Robert B. Quast, Andrei Sonnabend, Marlitt Stech und Stefan Kubick (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Stefan Kubick
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI)
Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB)
Am Mühlenberg 13
D-14476 Potsdam
Tel.: 0331-58187-306
Fax: 0331-58187-199
stefan.kubick@izi-bb.fraunhofer.de