Zellfreie Proteinsynthese

Zellfreie Proteinexpression für Forschung und Produktion

CAROLINE END¹, CHRISTIAN WALCZUCH¹, MATTHIAS BUNTRU²

¹PROMEGA GMBH, MANNHEIM

²FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND ANGEWANDTE ÖKOLOGIE (IME), AACHEN

Cell-free protein synthesis (CFPS) is an important tool for molecular biology and can be used in applied and basic research. Especially as a high throughput technology for functional genomics and proteomics, CFPS systems offer a significant advantage compared to living cells. Toxic, membrane or viral proteins can be readily expressed *in vitro*. However, a low synthesis performance currently limits the use for bioproduction purposes. To overcome this limitation, new systems are being developed.

DOI: 10.1007/s12268-014-0411-8
© Springer-Verlag 2014

Zellfreie Proteinsynthesen – Anwendung und Vision

■ Seit der bahnbrechenden Arbeit von Nirenberg und Matthaei im Jahr 1961 [1], in der Zellextrakte zur *in vitro*-Translation von

Proteinen genutzt wurden, ist die zellfreie Proteinsynthese (CFPS) für Molekularbiologen in vielen Anwendungsbereichen zu einem bedeutenden Werkzeug geworden (Tab. 1). Wirft man einen Blick auf moderne genomische Fragestellungen, hat die CFPS insbe-

sondere im Hochdurchsatzbereich der funktionellen Genomik oder Proteomik gegenüber zellbasierten Systemen einen enormen Vorteil. Besonders effizient ist ihr Einsatz bei der Herstellung von Proteinarrays [2] oder bei der gerichteten *in vitro*-Evolution von Proteinen mithilfe von Display-Technologien [3, 4]. Geht es um die Expression zelltoxischer Proteine, schwer löslicher Membranproteine oder viraler Proteine, stellt die CFPS-Methode eine geeignete Alternative zu zellbasierten Methoden dar. Nicht zuletzt ist eine *in vitro*-Proteinexpression die schnellste Möglichkeit, um aus einem Gen ein Protein zu erhalten. Ausgehend von RNA, einem PCR- oder Plasmidtemplate können *in vitro*-Proteinsynthesen und funktionale Assays in wenigen Stunden durchgeführt werden – unabhängig von ihren Wirtszellen. Für Bioproduktionszwecke ist ihr Einsatz aufgrund der zu geringen Proteinsyntheseleistung aktuell noch limitiert. Jedoch arbeiten weltweit verschiedene Forschergruppen an der Aufhebung dieser Limitierung mit der Vision, zelluläre Systeme durch zellfreie Systeme sinnvoll zu ergänzen bzw. abzulösen.

Funktionsweise und Wahl eines geeigneten zellfreien Systems

Theoretisch lassen sich aus jeder Art von Zellen rohe Extrakte für die zellfreie Proteinexpression gewinnen. Am häufigsten werden jedoch Systeme auf Basis von *Escherichia coli* [5], Weizenkeimen [6], Kaninchenretikulozyten [3] und Insektenzellen [7] verwendet. Die Extrakte enthalten alle notwendigen Bestandteile des Proteinsyntheseapparats wie Ribosomen, Enzyme und Chaperone und auch biologisch aktive Organellen und Membranteile. Nach Zugabe von Aminosäuren, einer Energiequelle, Salzen und anderen Kofaktoren kann theoretisch jedes Protein, codiert durch ein DNA- oder RNA-Template, synthetisiert werden. Die Rohextrakte werden in der Regel entweder weiter zu reinen Translationssystemen aufgearbeitet, die ausgehend von mRNA zur Proteinsynthese befähigt sind,

▲ **Abb. 1:** Funktionsprinzip zellfreier Expressionssysteme. Als Startmaterial wird zur Herstellung von Proteinen in den Translationssystemen RNA (ungekoppelte Expression) bzw. in Transkriptions-/Translationssystemen DNA (gekoppelte Expression) eingesetzt.

Tab. 1: Anwendungsbereiche und Vorteile der zellfreien Expressionssysteme.

Anwendungsbereiche	Vorteile
Funktionelle Genomik/Proteomik	
Funktionelle Analyse von Genmutationen/Deletionen: Identifizierung relevanter Aminosäuren, mit Bedeutung für Proteininteraktionen oder enzymatische Aktivitäten [3]	Zeitsparende Methode zur Herstellung verschiedener Mutanten, <i>bait</i> - und/oder <i>prey</i> -Proteinen in parallelen Ansätzen; keine Optimierung der Transfektionsbedingungen; keine Zellkultivierung und Zellaufschluss
Identifizierung und Analyse von Proteininteraktionen: <i>Pull-down</i> , Immunopräzipitation, Proteinarray; Protein domain mapping: Identifizierung relevanter Proteindomänen	
Herstellung funktioneller Proteinarrays: Anwendung der Proteinarrays als Werkzeug zur Analyse von Proteininteraktionen, aber auch mit Potenzial für diagnostische Zwecke, z. B. bei Autoimmunerkrankungen [2]	Parallele Expression von mehreren 1.000 Proteinen auf einem Array
Proteinevolution/Enzyme Engineering	
Direkte Evolution von Proteinen im Reagenzglas durch Anwendung von Ribosomen-Display, mRNA-Display oder <i>in vitro</i> -Kompartimentierung. Grundlage dieser Methoden ist, dass das zellfrei exprimierte Protein mit seiner codierten Nukleotidsequenz verbunden bleibt. Fehler-behaftete PCRs generieren einen großen Pool codierender Sequenzen. Nach zellfreier Expression kann auf Variationen eines Proteins mit einer bestimmten Eigenschaft, z. B. Interaktion mit einem anderen Protein, selektiert werden [3, 4]	Einfache Prozessierung komplexer DNA/RNA-Bibliotheken; effizientere Phänotyp/Genotyp-Kopplung; Hochdurchsatzmethode
Herstellung von zytotoxischen Proteinen/Membranproteinen/viralen Proteinen	
Zytotoxische Proteine, schwer lösliche Proteine (z. B. <i>inclusion bodies</i> in <i>E. coli</i>), Proteine mit hoher Sensitivität für zelluläre Proteasen, virale Proteine und Membranproteine [9]	
Screening-Tool	
Screening chemischer Substanzbibliotheken, z. B. nach Translationsinhibitoren; Medikamenten-screening [10]	
Analyse der translationalen Regulationsmechanismen	
Charakterisierung der translationalen Regulation (z. B. UTRs, RNA-capping, IRES) [11]. RNA-Virus-Charakterisierung [12]	

oder zu Systemen, die eine gekoppelte Transkription und Translation ausgehend von DNA ermöglichen (**Abb. 1**).

CFPS-Systeme sind kommerziell erhältlich (z. B. Promega, TNT-Systeme), können aber auch im Labor mit mehr oder minder großem Aufwand selbst hergestellt werden. Die gängigen eukaryotischen und prokaryotischen Systeme enthalten unterschiedliche zelluläre Komponenten und Kofaktoren, welche die Expression, Faltung und Modifikation des Zielproteins auf unterschiedliche Weise fördern. Daher hängt die Wahl des optimalen Systems von der Herkunft, den biochemischen Eigenschaften des Zielproteins und natürlich der Fragestellung ab. Während sich prokaryotische Extrakte durch eine höhere Prozessivität auszeichnen (**Tab. 2**), ermöglichen eukaryotische Extrakte eine effizientere Produktion komplexer Proteine und posttranslationale Modifikationen.

Alternatives CFPS-System auf Basis von Tabakzellen

Eine breitere Anwendung der zellfreien Proteinsynthese setzt die Verbesserung von Lysa-

ten und die Entwicklung neuer Extrakte voraus, da gegenwärtig alle verfügbaren CFPS-Systeme Limitationen aufweisen [5]. Im Rahmen des Leitprojektes „Zellfreie Bioproduktion“ wurde daher am Fraunhofer IME in Aachen ein Lysat auf der Basis von Tabakzellen (Bright Yellow 2, BY-2) entwickelt. Die Herstellungsdauer des BY-2-Lysats (BYL) ist mit etwa fünf Stunden deutlich kürzer als die eines Weizenkeimextrakts (**Abb. 2**, [6]).

Zur Überprüfung der Leistung des BY-2-Lysats wurden verschiedene Proteine, wie z. B. die Firefly-Luciferase (aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*), sowohl gekoppelt als auch ungekoppelt, exprimiert (**Abb. 3**). Bezüglich der Ausbeute bei gekoppelter Expression im Batch-Verfahren übertraf das BYL alle kommerziellen eukaryotischen Systeme um mindestens das Doppelte (**Tab. 2**). Zudem enthält das BYL Mikrosomen, also Membranvesikel, die sich vom endoplasmatischen Reti-

culum ableiten und die für die Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung benötigten Enzyme wie Disulfidisomerasen und Glykosyltransferasen enthalten (**Abb. 3B**). Gerade diese Modifikationen sind bei vielen Proteinen entscheidend für eine korrekte Faltung und Funktion. Daher wurden die entwickelten BY-2-Lysate auch zur Expression des industriell relevanten Enzyms Glukoseoxidase (GOx) getestet (**Abb. 3C**). Dieses Protein besteht aus zwei identischen Polypeptiden mit jeweils 80 Kilodalton. Die beiden Untereinheiten sind über Disulfidbrücken verbunden, welche für die enzymatische Funktionalität essenziell sind [8]. Des Weiteren enthält das Protein acht N-Glykosylierungsstel-

Tab. 2: Ausbeuten verschiedener CFPS-Systeme.

Zellfreie Systeme basierend auf	Proteinausbeute
<i>Escherichia coli</i> -Extrakt	100–1.000 µg/ml
Weizenkeimextrakt	10–100 µg/ml
Insektenzelleextrakt	20–100 µg/ml
Kaninchen-Retikulozytenlysat	1–10 µg/ml
Tabakzellen (BY-2)	200 µg/ml

◀ **Abb. 2:** Herstellung des Weizenkeimextrakts und des Tabak-BY-2-Lysats (BYL). Beim Weizenkeimextrakt werden aus Weizenkörnern durch Mahlen und Sieben Embryopartikel isoliert. Anschließend werden die Embryopartikel mit möglichst wenig anhaftendem Endosperm selektiert, da dieses reich an Nukleasen und Proteasen ist. Durch intensives Waschen werden die verbliebenen Endosperm-spuren entfernt. Aus den gewaschenen Embryopartikeln wird dann das Extrakt gewonnen. Zur Herstellung des BYLs werden die BY-2-Zellen filtriert und anschließend die Zellwand mithilfe lytischer Enzyme verdaut. Nach Entfernen der Nuklease- und Protease-reichen Vakuolen werden die Zellen zum BYL lysiert.

Literatur

- [1] Nirenberg MW, Matthaei JH (1961) Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* 47:1588–1602
- [2] Wright C, Sibani S, Trudgian D et al. (2012) Detection of multiple autoantibodies in patients with ankylosing spondylitis using nucleic acid programmable protein arrays. *Mol Cell Proteomics* 11:M9.00384
- [3] Arduengo M, Schenborn E, Hurst R (2007) The role of cell-free rabbit reticulocyte lysate expression systems in functional proteomics. In: Kudlicki WA, Katzen F, Bennett RP (Hrsg) *Cell Free Protein Expression*. Landes Bioscience, Austin, TX. 1–18
- [4] Fujimori S, Hirai N, Ohashi H et al. (2012) Next-generation sequencing coupled with a cell-free display technology for high-throughput production of reliable interactome data. *Sci Rep* 2:691
- [5] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE et al. (2012) Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv* 30:1185–1194
- [6] Takai K, Sawasaki T, Endo Y (2010) Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc* 5:227–238
- [7] Stech M, Brödel AK, Quast RB et al. (2013) Cell-Free Systems: Functional Modules for Synthetic and Chemical Biology. *Adv. Biochem/Biotechnol* 137:67–102
- [8] O'Malley JJ, Weaver JL (1972) Subunit structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 11:3527–3532
- [9] Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics* 8:3933–3946
- [10] Pratt SD, David CA, Black-Schaefer C et al. (2004) A strategy for discovery of novel broad-spectrum antibacterials using a high-throughput *Streptococcus pneumoniae* transcription/translation screen. *J Biomol Screen* 9:3–11
- [11] Paek KY, Park SM, Hong KY et al. (2012) Cap-dependent translation without base-by-base scanning of a messenger ribonucleic acid. *Nucleic Acids Res* 40:7541–7551
- [12] Soto-Rifo R, Limousin T, Rubilar PS et al. (2012) Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res* 40:2653–2667

▲ **Abb. 3:** Expression verschiedener Proteine im BY-2-Lysat (BYL). **A**, Ergebnis der ungekoppelten Expression der Luciferase aus *Photinus pyralis* (FFLuc) in BYL und Weizenkeimextrakt (WGE), in welcher 1 µl der Reaktion mit 50 µl Luciferase-Assay-Puffer (Promega) gemischt wurden: (1) 100 µg/ml FFLuc-Standard, (2) FFLuc in BYL, (3) FFLuc in WGE. **B**, Expression von eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) mit Signalpeptid für das endoplasmatische Reticulum bzw. die Mikrosomen im gekoppelten BYL-System. Die fluoreszierenden Vesikel zeigen die Translokation des eYFPs in das Lumen der Mikrosomen. **C**, Ergebnis der Expression der Glukoseoxidase (GOx) aus *Aspergillus niger* im gekoppelten BYL-System. Kolorimetrischer Nachweis der GOx-Aktivität über ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) und HRP (*horseradish peroxidase*): (1) 1.000 mU/ml GOx-Standard, (2) GOx in BYL, (3) Negativkontrolle in BYL. **D**, Immunoblot His-markierter GOx im gekoppelten BYL-System mit (1) und ohne (2) Glykosidasebehandlung. Der Massenunterschied nach Verdau der Glykane an der GOx dient als Nachweis der Glykosylierung.

len. In den anschließenden Tests zeigte sich, dass das Enzym sowohl voll funktionsfähig als auch glykosyliert war (**Abb. 3C, D**).

Das Lysat weist zahlreiche Vorteile gegenüber den bisher verfügbaren Systemen auf und erfüllt Anforderungen, wie eine schnelle und einfache Herstellung, hohe Proteinsyntheseraten sowie die Unterstützung post-

translationaler Modifikationen. Damit ist ein wesentlicher Meilenstein bei der Entwicklung neuer Systeme erreicht, der es in Zukunft erlauben wird, dem Anwender eine Bandbreite von speziell adaptierten Lysaten für seine jeweilige Fragestellung zur Verfügung zu stellen. ■

Caroline End, Christian Walczuch und Matthias Buntru (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Christian Walczuch
Promega GmbH
Schildkrötstraße 15
D-68199 Mannheim
Tel.: 0621-8501-183
Fax: 0621-8501-26183
christian.walczuch@promega.com