ANGEWANDTE CHEMIE

103. Jahrgang 1991
Heft 3
Seite 301–303

Sonderdruck

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim/Bergstr. 1991

Bei der Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht als solche mit ® gekennzeichnet sind.

Wie rational ist Zufalls-Screening? – Effiziente Methoden der Selektion von Peptid- und Oligonucleotid-Liganden

Von *Andreas Plückthun** und *Liming Ge*

Begriffe wie „Zufall" und „Screening" implizieren Unkenntnis über ein System und für viele eine wenig effiziente, unbeholfene und irrationale Untersuchungsmethode. Um so bemerkenswerter ist es, daß im vergangenen Jahr durch Zufalls-Mutagenese und Screening-Verfahren höchst elegant neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen wurden. Solche Verfahren können in manchen Fällen schneller zu Ergebnissen führen als das Nachprüfen vorgefaßter Theorien, und sie haben die Erforschung evolutionärer Prozesse auf molekularer Ebene vorangetrieben.

Chemikern ist die Methode des „Zufalls-Screenings" gut bekannt. Traditionell werden pharmakologische Leitsubstanzen entdeckt, indem in einem biologischen oder chemischen Screening-Verfahren neue Naturstoffe isoliert werden, deren Namen sich häufig kaum behalten lassen. Mit Hilfe der bisweilen sarkastisch als „methyl, ethyl, futile" bezeichneten Chemie, mit der die pharmakologische Wirksamkeit solcher Verbindungen verbessert werden soll, wird auf einem Zufallspfad zunächst die Bindungstasche des zu inhibierenden Enzyms oder Rezeptors abgetastet. Quantitative Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen können erst abgeleitet und genutzt werden, wenn eine Fülle empirischer Daten gesammelt worden ist. Der bemerkenswerte Fortschritt in vielen Gebieten der Theoretischen Chemie und des Molecular Modellings hat dabei die empirischen Methoden längst noch nicht entbehrlich gemacht.

Letztlich beschäftigt sich ein Großteil dieser Forschung mit der Bindung von Liganden an Proteine. Diese Liganden können kleine organische Moleküle, andere Proteine, Peptide, DNA oder RNA sein. Selbst wenn die Strukturen des Proteins *und* des Liganden bekannt sind, ist eine quantitative Vorhersage der Bindungswechselwirkungen in den meisten Fällen immer noch so gut wie unmöglich. Zudem ist in interessanten Fällen die Struktur des Rezeptorproteins meist unbekannt und kann nach wie vor nicht aus der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden. Flexible Liganden wie Peptide können darüber hinaus eine Vielzahl von Konformationen einnehmen, ohne daß man im allgemeinen sagen könnte, in welcher Konformation solche flexiblen Liganden gebunden werden.

Peptide, Proteine und Nucleinsäuren sind Verbindungen, für die eine Vielzahl von geringfügig modifizierten Derivaten sehr leicht hergestellt werden kann. „Schmutzige" Oligonucleotide können synthetisiert werden, indem an jeder gewünschten Position ein gewisser Prozentsatz einer bestimmten „falschen" Base eingebaut wird[1]; sie können aber auch mit völlig willkürlich gewählten Basen an vorher bestimmten Positionen dargestellt werden. Solche Oligonucleotid-Gemische können als Ligandmischungen dienen, aus denen dasjenige Oligonucleotid selektiert wird, das den stabilsten Komplex mit dem Rezeptor bildet; auch das umgekehrte Experiment kann durchgeführt werden, d.h. die Verwendung von DNA als Rezeptor. Die Oligonucleotid-Gemische können aber auch eingesetzt werden, um Teile eines Gens, das für das untersuchte Protein oder Peptid codiert, statistisch zu mutieren.

Pionierarbeiten wurden auf diesem Gebiet von *J. R. Knowles* et al. an Triosephosphat-Isomerase geleistet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das in Hinblick auf die Reaktionskinetik den Endpunkt seiner Evolution erreicht hat[2], denn die Geschwindigkeit der von ihr katalysierten Reaktion wird nur durch die Substratdiffusion begrenzt. Das bedeutet, daß die Zelle, die dieses Enzym produziert, die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch Modifikation des Enzyms weiter erhöhen kann, da sich der Substratumsatz nicht steigern läßt. Der Austausch nur einer einzigen Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms setzt die Reaktionsgeschwindigkeit so stark herab, daß die Reaktion nicht mehr diffusionskontrolliert verläuft. Die Zelle kann dadurch angeregt werden, das Enzym erneut zu verbessern. *Knowles* et al. benutzten „schmutzige" Oligonucleotide, um Triosephosphat-Isomerase-Gene mit Zufalls-Mutationen zu erzeugen, die sie dann in einen E.-coli-Stamm ohne eigene Triosephosphat-Isomerase einbauten. In Gegenwart geeigneter Substrate kann die Zelle wachsen, jedoch nur, wenn eine intakte Isomerase vorhanden ist. Je geringer die Konzentration an Enzym in der Zelle ist, desto schneller muß die Geschwindigkeit der Enzymreaktion sein, um das Wachstum der Zelle aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise wurden Enzyme gefunden, deren Aktivität deutlich besser ist als die der Ausgangsmutante, wobei sich die Aminosäuresequenzen allerdings von der des Wildtyp-Enzyms unterscheiden[3]. Diese Arbeiten zeigen, daß es verschiedene Wege zum Entwerfen eines effizienten Katalysators gibt. Es ist recht unwahrscheinlich, daß man bei dem gegenwärtig geringen Verständnis von Proteinstrukturen diese neuen, effizienten Enzymvarianten auf einem anderen Weg gefunden hätte.

Die Eleganz des Verfahrens beruht auf der positiven in-vivo-Selektion; diese bedingt aber auch seine Grenzen: es ist beschränkt auf Enzyme, die einen chemischen Umsatz bewirken, und es muß ein geeigneter Metabolismus in der Wirtzelle vorhanden sein. Deshalb müssen für allgemeinere Zwecke, beispielsweise um einen optimalen Liganden oder Rezeptor zu finden, Verfahren *außerhalb* einer Zelle eingesetzt werden. Im Falle der Triosephosphat-Isomerase wollte man herausfinden, welche aktiven Zentren die höchste katalytische Wirksamkeit haben. Die folgenden Beispiele beschäftigen sich mit der Frage, welcher Ligand optimal in die Bindungstasche eines gegebenen Proteins paßt.

Drei Gruppen[4–6] haben eine recht effiziente Strategie entwickelt, um zu bestimmen, welches Peptid am besten in eine gegebene Protein-Bindungstasche paßt. Bei dieser „Protein-Strategie" (Abb. 1) werden die Peptide allerdings nicht als solche verwendet, sondern gebunden an ein Oberflächenprotein des Bacteriophagen M13. Das Experiment sieht grob so aus, daß man zuerst eine Sammlung von Phagen, eine „Epitop-Bibliothek", erzeugt, dann die Phagen, die an das Protein binden, selektiert, und diese schließlich in *E. coli* vermehrt. Dieses Beispiel zeigt zwei wichtige Bestandteile eines jeden Screeningsystems, das zur Untersuchung der Bin-

[*] Priv.-Doz. Dr. A. Plückthun, Dr. L. Ge
Genzentrum der Universität München
c/o Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz, W-8033 Martinsried

dung eines Liganden an einen Rezeptor genutzt werden soll. Es muß immer ein Selektionsschritt, der den wirksamen Rezeptor oder Liganden vom unwirksamen trennt, und ein Vermehrungsschritt vorhanden sein. Da in einem Screening sehr viele verschiedene Moleküle untersucht werden sollen, wird nur eine geringe Anzahl jeder einzelnen Molekülsorte existieren, so daß ein Vermehrungsschritt für die nachfolgende Selektion notwendig ist. Die Manipulationen müssen zudem einfach genug sein, um eine Anreicherung in mehreren Cyclen zu ermöglichen.

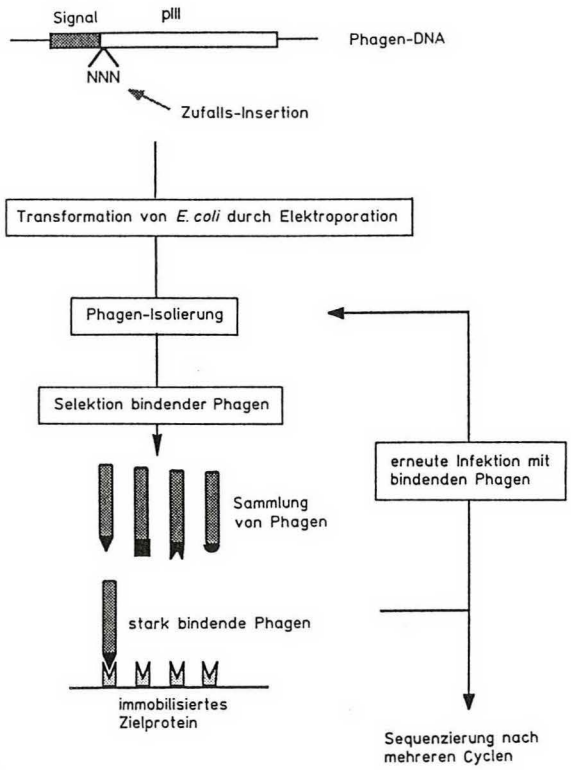

Abb. 1. Die Protein-Strategie des Zufalls-Screenings.

Scott und *Smith*[4] schleusten die Testepitope in das pIII-Protein des Bakteriophagen M13 ein; dies hinderte den Phagen nicht daran, Zellen zu infizieren. Da der Phage auch ein Tetracyclinresistenz-Gen enthielt, genügte eine einzige Infektion zur Vermehrung der Phagen-DNA. Die infizierten Bakterien wurden als Kolonien auf Tetracyclin-haltigem Medium selektiert. Da auch nicht funktionsfähige Mutanten mit verschobenem Leserahmen vermehrt werden können, konnte man die Fähigkeit zur Infektion ausnutzen, um Epitopinsertionen zu finden, die den Leserahmen wiederherstellten. Die Autoren testeten das System mit zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch sind für ein bekanntes Hexapeptid, ein Epitop aus Hämerythrin. Die Antikörper wurden mit Biotin markiert und mit den Phagen vermischt. Die Antikörper und Antikörper-Phagen-Komplexe wurden dann auf einer mit Streptavidin – dieses bildet sehr feste Komplexe mit Biotin – beschichteten Oberfläche adsorbiert. Nicht adsorbierte Phagen wurden abgewaschen, während gebundene mit Säure eluiert und nach Infektion in der Zelle vermehrt wurden. Nach mehreren Amplifikationsschritten wurde eine DNA-Sequenzierung für eine Reihe von Phagen durchgeführt, die die Epitope im Gen für das Protein pIII enthalten. Es ist beruhigend, daß Sequenzen gefunden wurden, die dem bekannten Epitop sehr ähnlich sind. *Cwirla* et al.[5] berichten über ein sehr ähnliches Verfahren.

Devlin et al.[6] verwendeten ebenfalls das pIII-Protein des Bakteriophagen M13: sie erzeugten zufällige Variationen von 15 Aminosäure langen Peptiden, die in pIII eingebaut wurden. Es sollten in diesen Experimenten Mutanten gefunden werden, die direkt an Streptavidin binden. Interessanterweise haben alle Peptide, die Streptavidin binden, eine konservierte („Consensus-")Sequenz. Das zeigt, daß mit diesem Verfahren Peptidliganden auch für solche Proteine gefunden werden können, bei denen keine Affinität für Peptide bekannt ist. Nun müssen Bindungskonstanten genau quantifiziert werden, um abschätzen zu können, welche minimalen Affinitäten noch detektierbar sind.

Ein ähnliches Konzept wurde angewendet, um DNA-Sequenzen zu finden, die an ein DNA-Bindungsprotein unbekannter Spezifität binden. In diesem Fall könnten die „schmutzigen" Oligonucleotide direkt oder in einem Plasmid integriert genutzt werden („Oligonucleotid-Strategie", Abb. 2). Im allgemeinsten Fall wird die Mischung der Liganden mit dem betreffenden Protein inkubiert. Die gebundenen Moleküle werden dann entweder physikalisch durch Festphasenadsorption des Proteins abgetrennt oder funktionell angereichert, z. B. indem sie als Primer dienen. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)[7] wird dann benutzt, um in vitro die Sequenzen, die an das Protein gebunden sind, zu vermehren. Die Möglichkeit dieser exponentiellen Amplifikation in vitro unterscheidet DNA und RNA von allen anderen Liganden.

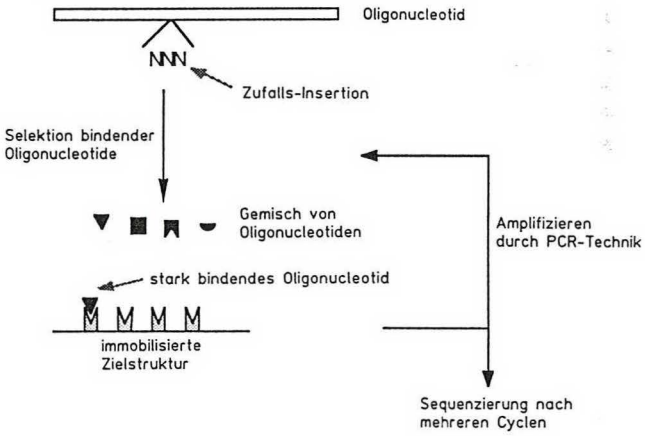

Abb. 2. Die Oligonucleotid-Strategie des Zufalls-Screenings.

Thiesen und *Bach*[8] nutzten diese Methode, um die DNA-Bindungsspezifität des menschlichen Transkriptionsfaktors SP1 zu bestimmen. Die Consensus-Sequenz der Bindungsstelle war bereits in vorangegangenen Arbeiten bestimmt worden, so daß die Methode überprüft werden konnte. Die Oligonucleotide wurden so gewählt, daß sie definierte Regionen von jeweils 22 Nucleotiden an beiden Enden aufweisen, die als Hybridisierungsstellen für PCR-Primer dienen. Die zentralen Bereiche der doppelsträngigen Oligonucleotide bestanden aus zwölf statistisch zusammengesetzten Nucleotiden. Das SP1-Protein wurde mit dieser Mischung inkubiert, und die DNA-Protein-Komplexe wurden dann an einen Nitrocellulosefilter gebunden. Nicht gebundene DNA wurde

abgewaschen, gebundene DNA eluiert und dann mit der PCR-Methode vermehrt. Eine weitere Anreicherung der Bindungssequenzen wurde durch die „Band-shift-Elektrophorese" erreicht; die Wanderung der selektierten Oligonucleotide im Polyacrylamidgel wird durch gebundene Proteine verlangsamt. Nach Klonierung und Sequenzierung der so angereicherten Oligonucleotide zeigte sich, daß ihre Sequenzen den bekannten Consensus-Sequenzen des Transkriptionsfaktors SP1 sehr ähneln.

Um zu bestimmen, welche Sequenzen für die Bindung von DNA-Polymerase aus dem Bacteriophagen T4 an die 5'-untranslatierten Sequenzen der eigenen mRNA entscheidend sind, entwickelten *Tuerk* und *Gold*[9] eine Methode der in-vitro-Selektion und -Vermehrung; sie sprechen von „systematischer Evolution durch exponentielle Anreicherung" (SELEX). Die Bindung von T4-DNA-Polymerase an ein 36 Nucleotide (nt) langes Fragment ihrer eigenen mRNA (die eine 5-bp-Helix mit einer 8-nt-Schleife enthält) verhindert, daß die Translation eingeleitet wird, wodurch eine autogene Regulation des Gens erreicht wird. Die Sequenzen der acht entscheidenden Nucleotide des Bacteriophagen T4 und des entfernt verwandten Bacteriophagen RB69 sind gleich. Die Autoren untersuchten die Frage, ob auch andere Sequenzen als die in T4 und RB69 gefundenen funktionale Wechselwirkungen hervorrufen können. *Tuerk* und *Gold* variierten statistisch die Sequenz dieser acht Basen in DNA-Matrizensträngen. Nach Transkription dieser Matrizenstränge in vitro mischten sie den Überschuß an transkribierter RNA mit T4-DNA-Polymerase. Die RNA-Stränge, die von der an einen Nitrocellulosefilter gebundenen Polymerase festgehalten wurden, dienten als Matrizenstränge für die Reverse Transkriptase, und die resultierende cDNA wurde mit der PCR-Technik vermehrt. Diese DNA-Matrizenstränge wurden in vitro transkribiert und die so erhaltene RNA wurde erneut einer kompetitiven Bindungsselektion unterworfen. Nach der vierten Selektions-/Amplifikationsrunde überwogen in der RNA zwei Sequenzen mit gleicher Bindungsaffinität zur Polymerase. Eine davon war die Wildtypsequenz, während die andere sich in vier Basen vom Wildtyp unterschied. Die Existenz einer zweiten Sequenz mit gleicher Bindungsaffinität wie der Wildtyp legt nahe, daß die Wildtypsequenz neben der Fähigkeit zur Bindung an Polymerase noch weitere für den Phagen vorteilhafte Eigenschaften hat.

Ein ähnlicher Ansatz wurde von *Ellington* und *Szostak*[10] verfolgt, um solche RNA-Moleküle aus einem statistisch zusammengesetzten Pool anzureichern, die an Farbstoffe binden, die mit dem Redox-Cofaktor Nicotinamid-adenindinucleotid (NAD) verwandt sind. Bei einem Pool von ursprünglich 10^{13} unterschiedlichen Sequenzen fand man nach sechs Selektionsschritten 10^2 bis 10^3 Sequenzen, die an den als Affinitätsliganden für die Säulenchromatographie verwendeten Farbstoff binden. Dies zeigt, daß es viele Möglichkeiten für die Bindung zwischen Liganden und RNA gibt. Damit werden Spekulationen über eine weitergehende Rolle von Katalysatoren auf RNA-Basis für das präbiotische Leben genährt.

Eine andere in-vitro-Methode, die ebenfalls in *Szostaks* Labor[11], aber auch unabhängig von *Robertson* und *Joyce*[12] entwickelt wurde, wurde benutzt, um Varianten des selbstspleißenden Tetrahymena-Introns mit Ligaseaktivität zu selektieren. Die Methode wurde so ausgelegt, daß lediglich die aktiven Intronvarianten vermehrt werden konnten. Das „Ribozym" ligierte sich selbst mit einem RNA-Oligonucleotid, das komplementär zu der internen Führungssequenz war. Sowohl die ligierten (langen) als auch die nicht ligierten (kurzen) Ribozymmoleküle wurden in cDNA überführt, wobei ein Primer für die Reverse Transkriptase benutzt wurde, der komplementär zu ihren 3'-Enden war. Ein zweiter Primer hybridisierte ausschließlich mit der hinzugefügten Sequenz, die aus der Ligation zwischen Ribozym und Oligonucleotid hervorging. Mit diesen beiden Primern konnte die PCR durchgeführt werden, um die Moleküle selektiv zu vermehren, die die RNA-katalysierte Ligierungsreaktion eingegangen waren. Neue RNA-Stränge konnten von den DNA-Matrizensträngen transkribiert und der Cyclus konnte wiederholt werden. In diesen Experimenten wurden an mehreren Positionen Zufallsvariationen herbeigeführt. Man fand jedoch heraus, daß der Wildtyp die größte Aktivität aufweist.

Diese Beispiele machen deutlich, wie rasch sich die Methoden des „Zufalls-Screening" weiterentwickeln. Die molekularen Grundlagen und die Techniken dieser Methode seien noch einmal zusammengefaßt: a) die schnelle automatische Synthese von Oligonucleotiden (und in beschränktem Maß auch von Peptiden) ermöglicht die Produktion einer großen Zahl von Varianten in einem einzigen Schritt; b) die Oligonucleotide mit statistischer Basenzusammensetzung dienen entweder selbst als Liganden oder Rezeptoren, oder sie codieren für Peptidliganden oder Proteinrezeptoren; c) die gewünschten Moleküle können, ausgehend fast von einzelnen Molekülen, entweder in vivo durch Transfektion oder Transformation von Bakterien mit dieser DNA oder in vitro durch Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden. Es bleibt abzuwarten, ob analoge Verfahren für die Untersuchung anderer Liganden als DNA und RNA sowie Peptiden und Proteinen entwickelt werden können. Die vorgestellten Verfahren werden aber eine immer größere Rolle bei der Erforschung molekularer Wechselwirkungen von biochemischer Bedeutung spielen. Für manche Probleme mag das Zufalls-Screening den rationalsten Weg zur Lösung bieten.

[1] S. A. Goff, S. R. Short-Russell, J. F. Dice, *DNA 6* (1987) 381–388.
[2] W. J. Albery, J. R. Knowles, *Angew. Chem. 89* (1977) 295–304; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 160* (1977) 285–298.
[3] J. D. Hermes, S. C. Blacklow, J. R. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87* (1990) 696–700.
[4] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science 249* (1990) 386–390.
[5] S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87* (1990) 6378–6382.
[6] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, *Science 249* (1990) 404–406.
[7] N. Arnheim, C. H. Levenson, *Chem. Eng. News 68* (1990) Nr. 40, S. 36–47.
[8] H. J. Thiesen, C. Bach, *Nucl. Acid. Res. 18* (1990) 3203–3209.
[9] C. Tuerk, L. Gold, *Science 249* (1990) 505–510.
[10] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature 346* (1990) 818–822.
[11] R. Green, A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature 347* (1990) 467–468.
[12] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature 344* (1990) 467–468.