

Gewinnung von Peptidhormonen durch DNA-Rekombination**

Von Friedrich Wengenmayer*

Die Rekombination (Neukombination) von genetischem Material ermöglicht die gezielte Bildung neuer Bakterienstämme, die Proteine in großem Maße synthetisieren. Mit solchen Bakterien gelingt auch die Produktion bisher nicht zugänglicher Proteine. Diese können zum Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Arzneimitteln werden, welche neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Mehrere bakteriell erzeugte Proteine werden bereits klinisch geprüft, und die großtechnische Produktion hat für einige begonnen. Der Übergang vom Forschungslaboratorium zur industriellen Anwendung erfolgte schneller als vielfach erwartet worden war. An den Beispielen Insulin, Somatostatin und Wachstumshormon werden die Methoden, Probleme und Aussichten bei der Gewinnung von Peptidhormonen aus Bakterien nach DNA-Rekombination dargelegt. Dabei sollen vorwiegend die molekularbiologischen Aspekte diskutiert werden.

1. Einleitung

Seit mehreren Jahren stehen biochemische Methoden zur Verfügung, die eine Übertragung von Erbmaterial zwischen verschiedenen Organismen ermöglichen. Die *Grundlagen hierzu* wurden durch Experimente mit Bakterien erarbeitet. Nach den ersten erfolgreichen Versuchen zur Übertragung von Resistenz-Genen gegen Antibiotika^[1] hat sich die Molekularbiologie überaus stürmisch entwickelt, nicht zuletzt wegen der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, die durch DNA-Rekombination und DNA-Transfer eröffnet werden.

Durch stabilen Einbau geeigneter menschlicher Gene in Bakterien erhoffte man, Bakterienstämme zu erhalten, aus denen medizinisch verwertbare Proteine isoliert werden können. Die Vorteile liegen auf der Hand: Das einfach herzustellende Kulturmedium und die geringe Generationszeit der Bakterien lassen die Produktion von Proteinen zu, die sonst nur sehr schwer zugänglich sind.

Die Gewinnung von Peptidhormonen stand von Anfang an im Mittelpunkt des Interesses. Dies hatte mehrere Gründe:

- Viele Peptidhormone weisen eine ausgeprägte Spezies-Spezifität auf. Das bedeutet, daß die aus tierischen Organen isolierten Peptide nicht bei der Therapie des Menschen verwendet werden können, da sie eine unterschiedliche Struktur haben; häufig sprechen die Rezeptoren oder Zielzellen des Menschen auch bei nur geringen Unterschieden in der Sequenz des Peptids nicht auf tierische Hormone an. Die DNA-Rekombination bietet nun die Möglichkeit, das menschliche Hormon nach entsprechender Genübertragung aus Bakterien zu erhalten.
- Man war noch tief beeindruckt von den gewaltigen Anstrengungen der Arbeitsgruppen um Schally und Guille-

min zur Isolierung von Peptidhormonen aus dem Hypothalamus. Es sei daran erinnert, daß aus den Hypothalamen von 80000 Schafen^[2] oder 200000 Schweinen^[3] jeweils weniger als ein Milligramm des TRHs (THR = Thyrotropin-Releasing Hormone) isoliert werden konnte. Heute ist abzusehen, daß die Isolierung anderer, therapeutisch äußerst interessanter Peptide und Proteine kaum weniger schwierig sein wird, wenn es nicht gelingt, diese Substanzen nach DNA-Rekombination durch Bakterien zu erzeugen.

- Schließlich lagen jahrzehntelange gute Erfahrungen bei der Substitutionstherapie mit Insulin vor. Man konnte daher hoffen, bei entsprechenden Erkrankungen auch auf andere Peptidhormone mit Erfolg zurückgreifen zu können.

Als Ergebnis vielfältiger Bemühungen konnten bereits die ersten durch DNA-Rekombination zugänglich gemachten Peptidhormone erhalten werden. Bakteriell erzeugtes Humaninsulin wird schon kommerziell angeboten. Menschliches Wachstumshormon, Somatostatin und Thymosin $\alpha 1$ befinden sich in der klinischen Prüfung. Andere Peptidhormone wie Relaxin, Glucagon und GRF (Growth Hormone Releasing Factor) stehen kurz davor.

2. Gewinnung von Peptidhormonen

Bevor Einzelheiten der Hormongewinnung durch DNA-Rekombination erörtert werden, sei darauf hingewiesen, welche Wege der Gewinnung von Peptidhormonen zur Zeit beschritten werden können.

Die klassische Isolierung aus tierischen Organen ist die Methode der Wahl im Falle langer Polypeptidketten. Die Organe werden im allgemeinen bei der Schlachtung von Nutztieren erhalten. Beispielsweise wird das zur Behandlung von Diabetikern benötigte Insulin aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen und Rindern gewonnen, da diese Insuline dem Humaninsulin sehr ähnlich sind (vgl. Abschnitt 6.3).

Der jährliche Bedarf an Insulin beträgt in der Bundesrepublik Deutschland ca. 250 kg; hierfür müssen die Bauchspeicheldrüsen von 2.5 Millionen Tieren gesammelt und

* Dr. F. Wengenmayer
Pharma-Forschung Biochemie H 825
Hoechst Aktiengesellschaft
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80

** Nach einem Vortrag beim Symposium „Biotechnologie und Arzneimittelforschung“ der GDCh-Fachgruppe Medizinische Chemie am 28. September 1982 in Schliersee.

aufgearbeitet werden. Weltweit werden ca. 2000 kg Insulin aus rund 20 Millionen Bauchspeicheldrüsen tierischer Herkunft isoliert. Der Aufwand für Sammlung und Transport dieser Organe ist hoch, da die Organe möglichst schnell eingefroren werden müssen, um Abbau und Veränderungen des gewünschten Polypeptidhormons zu verhindern.

Zur Isolierung medizinisch verwertbarer Peptide und Proteine werden nicht nur tierische Organe, sondern in speziellen Fällen auch menschliche Organe herangezogen. Ein Beispiel ist die Therapie wachstumsgestörter Kinder; hier kann das Defizit an Wachstumshormon nicht durch tierische Hormone ausgeglichen werden, da diese eine andere Struktur haben. In England werden zur Behandlung von etwa 800 Kindern mehrere zehntausend menschliche Hypophysen gesammelt, aus denen sich das erforderliche Hormon isolieren lässt^[4].

Die Gewinnung von Polypeptidhormonen durch Isolierung aus Organen stößt auf natürliche Grenzen bei sehr geringen Konzentrationen des gewünschten Hormons oder bei Problemen der Spezies-Spezifität, da menschliche Organe selbstverständlich nur mit Einschränkungen zur Verfügung stehen.

Die chemische Synthese der Polypeptidhormone ist vor allem bei kleineren Molekülen eine Alternative zur Isolierung aus Organen. Polypeptide mit einer Länge bis zu etwa 20 Aminosäuren können heute in ausreichenden Mengen vollsynthetisch gewonnen werden. Beispiele für solche Peptide, die in der Medizin Anwendung finden, sind das Nonapeptid Oxytocin und das Decapeptid LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone).

In besonderen Fällen, wenn der jährliche Bedarf an Peptidhormon in der Größenordnung von 1 kg liegt, kann die industrielle Synthese bis zu einer Kettenlänge von etwa 30 Aminosäuren durchgeführt werden. Als Beispiel sei das gastrointestinale Hormon Sekretin mit 27 Aminosäuren genannt. Auch größere Proteine sind vollsynthetisch erhältlich – es sei nur an die Synthese des Insulins^[5] erinnert –, bei einer industriellen Herstellung wird allerdings der Aufwand für Synthese und Reinigung so hoch, daß dieses Verfahren mit der Isolierung aus Organen nicht konkurrieren kann.

Bei der bakteriellen Produktion eines Peptidhormons nach DNA-Rekombination wird die zu produzierende Menge im Idealfall lediglich durch die Größe des verwendeten Fermenters begrenzt, die Länge des gewünschten Proteins sollte keine grundsätzlichen Probleme aufwerfen. Eventuelle Einschränkungen werden in den folgenden Abschnitten dieses Aufsatzes diskutiert.

Einer der größten Vorteile der Peptidgewinnung durch DNA-Rekombination ist die Möglichkeit, auch bei längeren Proteinen die Aminosäuresequenzen zu erhalten, die im menschlichen Organismus auftreten. Durch Anwendung der DNA-Rekombination werden daher erstmalig medizinisch interessante Humanproteine in ausreichenden Mengen zugänglich. Beispiele hierfür sind Wachstumshormon, Insulin, Interferone und Lymphokine.

Die Produktion eines menschlichen Proteins durch Bakterien setzt zunächst die Entwicklung eines Bakterienstamms voraus, der den entsprechenden Genabschnitt stabil integriert hat. Häufig sind auch noch weitere Veränderun-

gen des Erbmaterials notwendig, um eine befriedigende Ausbeute des gewünschten Proteins zu gewährleisten.

3. Wege zur DNA

In menschlichen und tierischen Zellen befindet sich das Erbmateriale, die Desoxyribonucleinsäure (DNA), im Zellkern. Hier ist die Information für die Aminosäuresequenz aller im Organismus synthetisierten Proteine gespeichert. Auch enthält die DNA zahlreiche Abschnitte, die für komplexe Regel- und Kontrollvorgänge innerhalb der Zelle bestimmt sind.

Die DNA besteht aus zwei gegenläufigen 2-Desoxyribosephosphat-Ketten, die an jedem Ribose-Rest in 1'-Position mit einer der vier Basen Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) oder Guanin (G) verknüpft sind (Fig. 1). Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A und T sowie zwischen C und G werden die beiden Ketten zusammengehalten. Da sich durchgehend A und T sowie G und C gegenüberstehen, sind beide Ketten gegenläufig komplementär. Weitere Einzelheiten der Struktur und Reaktivität der DNA sollen hier nicht erwähnt werden.

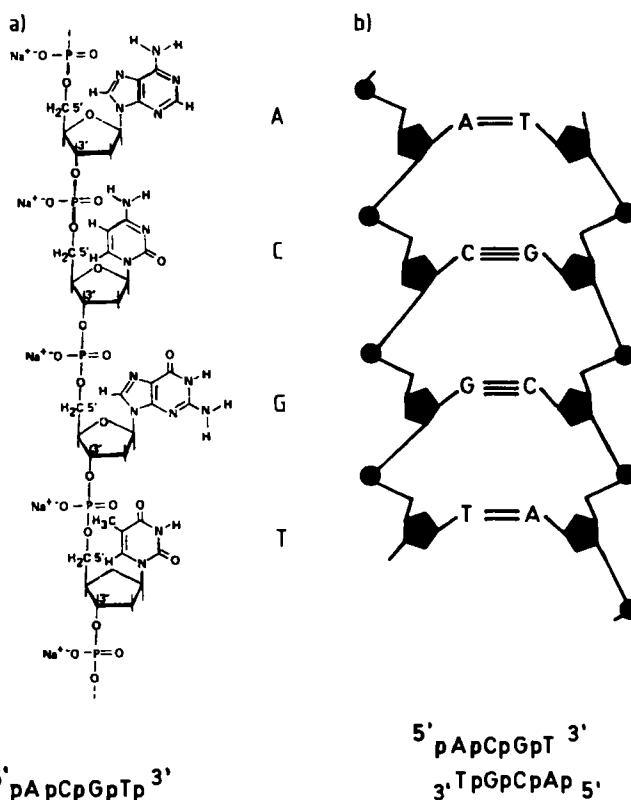


Fig. 1. Schematische Darstellung der Desoxyribonucleinsäure (DNA): a) einzelsträngige DNA, b) doppelsträngige DNA. Die beiden gegenläufigen, komplementären Strände werden durch die angedeuteten Wechselwirkungen zwischen den Basen zusammengehalten.

Auf einem DNA-Abschnitt, der die Information für die Sequenz eines Proteins trägt, wird durch drei aufeinanderfolgende Basen jeweils eine Aminosäure festgelegt. Bei vier möglichen Basen ergeben sich also 64 verschiedene Triplets (Tabelle 1). Drei dieser Triplets, nämlich TAA, TAG und TGA, bedeuten „Ende der Protein-Kette“, die übrigen codieren für Aminosäuren, wobei bis zu sechs verschiedene Triplets die gleiche Aminosäure ergeben können (Leucin, Serin und Arginin).

Tabelle 1. Codierung der Aminosäuren durch Basentriplets der mRNA. Der Buchstabe der ersten Base des Triplets steht in der linken Spalte, der Buchstabe der zweiten Base in der obersten Zeile, und die letzte Base wird durch den Buchstaben in der Spalte ganz rechts symbolisiert. Üblicherweise wird der genetische Code als RNA-Code dargestellt. Da die mRNA komplementär zu einem der beiden DNA-Strände gebildet wird, kann aufgrund der Gesetzmäßigkeiten bei der Basenpaarung auf die Sequenz der DNA-Stränge geschlossen werden. Bei den im Text angegebenen Beispielen handelt es sich stets um den DNA-Strang mit der gleichen Basensequenz wie die mRNA.

	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Stop Stop	Cys Cys Stop Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Glu Glu	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met/Start	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Ausschlaggebend für die schnelle Entwicklung und Anwendung der DNA-Rekombinationstechnik war die Entdeckung der Restriktionsenzyme^[6] und die Möglichkeit, einzelne DNA-Fragmente durch das Enzym DNA-Ligase wieder kovalent zu verbinden^[7].

Restriktionsenzyme erkennen charakteristische Basensequenzen der DNA. Die DNA wird durch diese Enzyme entweder innerhalb der Erkennungssequenzen oder in deren Nachbarschaft gespalten (Tabelle 2). Heute sind ca. 80 Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme aus sehr verschiedenen Bakterienstämmen bekannt^[8]. Um eine Spaltung der eigenen DNA durch Restriktionsenzyme zu vermeiden, werden die Erkennungssequenzen der DNA in den jeweiligen Organismen durch spezifische Methylasen verändert (Modifikation). Restriktionsenzyme bieten daher Schutz vor fremder, in den Organismus eingedrungener DNA, die vor einer möglichen Modifikation gespalten wird. Ob dies die einzige Funktion der Restriktionsenzyme in Bakterien ist, kann noch nicht endgültig beantwortet werden.

Durch die Wirkung der Restriktionsenzyme entstehen DNA-Abschnitte mit „stumpfen“ oder „überlappenden“

Tabelle 2. Erkennungssequenzen einiger Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen an den beiden DNA-Strängen sind durch Pfeile angedeutet. Stumpfe Enden entstehen durch die Enzyme Hae III und Xmn I; 3'-überlappende Enden werden durch Hha I gebildet, während die Enzyme Eco RI und Eco RII DNA-Fragmente mit 5'-überlappenden Enden liefern. N symbolisiert T, C, G oder A und N' die dazu komplementäre Base.

Erkennungssequenz	Restriktionsenzym
— ^{5'} G G C C ^{3'} — —,C C G G, ^{5'} — ↓	Hae III (aus <i>Haemophilus aegyptius</i>)
—G A A T T C — —C T T A A G — ↓	Eco RI (aus <i>E.coli</i>)
—N C C(?)G G N — —N'G G(?)C C N'— ↓	Eco RII (aus <i>E.coli</i>)
—G C G C — —C G C G — ↓	Hha I (aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>)
—G A A N N N N T C — —C T T N N'N'N A A G — ↓	Xmn I (aus <i>Xanthomonas manihotis</i>)

Enden, die durch das Enzym DNA-Ligase mit anderen, ähnlich gewonnenen DNA-Abschnitten verbunden werden können. Voraussetzung für die Reaktion ist, daß die zu verbindenden 5'-Enden der DNA-Fragmente phosphoryliert sind. Es können allerdings nur entweder beliebige „stumpfe“ Enden untereinander verbunden werden oder „überlappende“ Enden, wenn diese sich so zusammenfügen lassen, daß Basenpaarung zwischen den Ketten möglich ist (Fig. 2). Angemerkt sei, daß „überlappende“ Enden enzymatisch in „stumpfe“ Enden umgewandelt werden können (Fig. 2). Dies gelingt entweder durch „Auffüllen“ des kürzeren Endes mit Polymerase I oder durch Abbau des einzelsträngigen Bereichs mit spezifischen Nucleasen (S1-Nuclease, Mung-Bean-Nuclease). Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird als „in-vitro-Rekombination von Nucleinsäuren“ bezeichnet und wurde kürzlich in einem Übersichtsartikel diskutiert^[9].

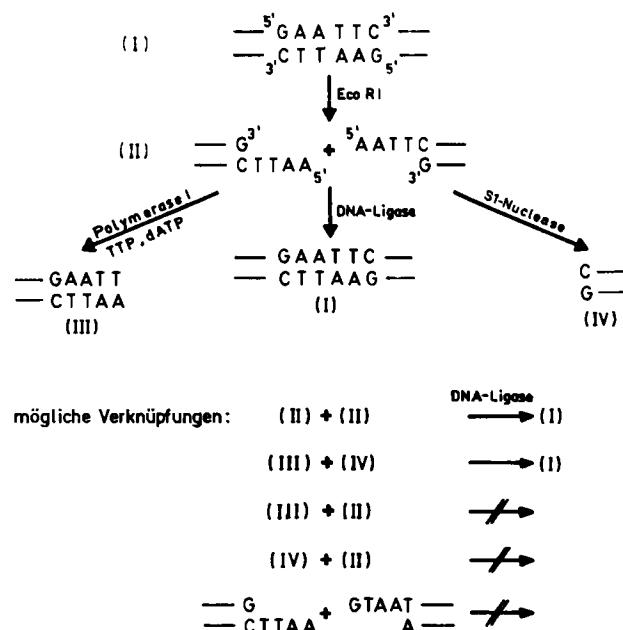


Fig. 2. Einige enzymatische Reaktionen, die in vitro an DNA durchgeführt werden können. Durch Spaltung mit Eco RI entstehen Fragmente mit 5'-überlappenden Enden, die sich durch S1-Nuclease oder Polymerase I in stumpfe Enden umwandeln lassen. Durch DNA-Ligase können „stumpfe“ Enden verbunden werden. „Überlappende“ Enden können nur verknüpft werden, wenn komplementäre Nucleotidsequenzen vorliegen.

Eine DNA, die ein menschliches Protein codiert, kann auf folgenden Wegen erhalten werden: Durch chemische Synthese, durch Isolierung des Genabschnittes oder durch enzymatische Synthese aus der mRNA.

3.1. Chemische Synthese der DNA

Voraussetzung für die Synthese einer DNA, die ein menschliches Protein codiert, ist, daß man die Aminosäuresequenz kennt. Aus der Reihenfolge der Aminosäuren kann die Sequenz der DNA-Bausteine abgeleitet werden. Da in den meisten Fällen mehrere Triplets für eine bestimmte Aminosäure codieren, ergeben sich hieraus zusätzliche Freiheitsgrade für den Synthesetekniker. Oft werden bei der Syntheseplanung die Triplets so gewählt, daß bestimmte gewünschte Restriktionsstellen entstehen.

Beispielsweise muß für die Peptidsequenz -Glu-Phe- eines der Triplets für Glutaminsäure (GAA, GAG) mit einem Codon für Phenylalanin (TTT, TTC) kombiniert werden. Bei richtiger Auswahl entsteht die Restriktionsstelle für das Enzym Eco RI: -GAA-TTC-. Eine solche Restriktionsstelle aus sechs Basenpaaren tritt statistisch alle $4^6 = 4096$ Basenpaare auf. Durch gezielte Einbeziehung solcher seltener Restriktionsstellen in die Syntheseplanung wird das Kombinieren oder Auswechseln ganzer DNA-Blöcke wesentlich erleichtert. Einzelne, größere DNA-Abschnitte können so getrennt fertiggestellt werden und lassen sich über die eingeplanten Restriktionsstellen problemlos in Plasmide einbauen und in Bakterien vermehren.

In verschiedenen Organismen werden die Codons für Aminosäuren mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit verwendet^[14]. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß in *Escherichia coli* das Triplet CTG für Leucin häufig verwendet wird, während es in Hefe bei den untersuchten Proteinen überhaupt keine Verwendung findet (hier ist eindeutig TTG das bevorzugte Triplet für Leucin). Ähnlich sind die Verhältnisse im Falle der anderen Aminosäuren.

Tabelle 3. Unterschiedliche Verwendung der Triplets (Codons) für die Aminosäuren Leucin, Prolin und Glutaminsäure in Hefe und in *E. coli*. Die Verhältnisse bei den nicht aufgeführten Aminosäuren sind ähnlich. Angegeben sind die Triplets der Boten-RNA (mRNA; Base U anstelle von Base T). Die Tabelle wurde einer Arbeit von Ikemura [10] entnommen.

	Hefe [%]	<i>E. coli</i> [%]
Leu	UUU	6
	UUG	89
	CUU	2
	CUC	0
	CUA	3
	CUG	0
Pro	CCU	13
	CCC	0
	CCA	87
	CCG	0
Glu	CAA	98
	CAG	2

Es erscheint plausibel, daß eine DNA mit zahlreichen in *E. coli* kaum verwendeten Codons zu keiner hohen Proteinausbeute in diesem Bakterium führen kann, da die gesamte Proteinsynthesemaschinerie auf die in *E. coli* vorliegenden Verhältnisse abgestimmt ist. Bei der Synthese der DNA sollten deshalb die Triplets so gewählt werden, daß sie dem Organismus, in dem letztlich die Proteinsynthese erfolgen soll, angepaßt sind.

Die Methoden zur DNA-Synthese haben in der letzten Zeit eine stürmische Entwicklung erfahren. Mit den aktuellen Methoden^[11] gelingt es heute, mehrere Oligonukleotide mit 20–30 Basenpaaren innerhalb von wenigen Wochen zu synthetisieren und zu reinigen. Schon werden Automaten von mehreren Herstellern angeboten, mit denen eine vorgegebene Sequenz im Dauerbetrieb synthetisiert werden kann. Beachtliche Syntheseerfolge sind Gene für menschliche Interferone mit einer Länge von über 500 Basenpaaren^[12] sowie die DNA-Abschnitte für die beiden Ketten des Insulins^[13].

Die außerordentliche Bedeutung der chemischen DNA-Synthese für die Gewinnung biologisch aktiver Substanzen

aus Mikroorganismen kann nicht genug betont werden. Insbesondere die Synthese kürzerer Oligonukleotide, die eine Restriktionsstelle aufweisen, wird stets unerlässlich sein. Durch Addition solcher „Linker“ können gewünschte Restriktionsstellen an die Enden einer DNA angefügt werden. Dadurch wird die Insertion dieser DNA in die entsprechende Restriktionsstelle eines Plasmids ermöglicht.

3.2. Isolierung des Genabschnittes

Grundsätzlich wäre es auch möglich, eine gewünschte DNA aus dem entsprechenden Genabschnitt zu erhalten. In menschlichen Zellen kommen ca. 150 000 verschiedene Gene und rund $5 \cdot 10^9$ Basenpaare vor^[15]. Daß die Isolierung eines bestimmten Gens trotz dieser Zahlen ein durchaus realistisches Unterfangen ist^[16], gibt einen Eindruck von der Leistungsfähigkeit molekularbiologischer Methoden.

Die Nucleotidsequenz zahlreicher Gene wurde bereits vollständig aufgeklärt^[17]. In den Genen höherer Zellen (d.h. Zellen mit einem Zellkern, eukaryontische Zellen) ist die Sequenzinformation für ein Protein häufig durch Abschnitte unterbrochen, die keine Bedeutung für die Aminosäuresequenz des Proteins haben. Die Funktion dieser Abschnitte (Introns) ist noch unklar. Sie werden während der Expression des Gens herausgeschnitten, und die codierenden Abschnitte (Exons) werden anschließend wieder verknüpft (Fig. 3). Dieser Vorgang wird als Spleißen (Splicing) bezeichnet^[18].

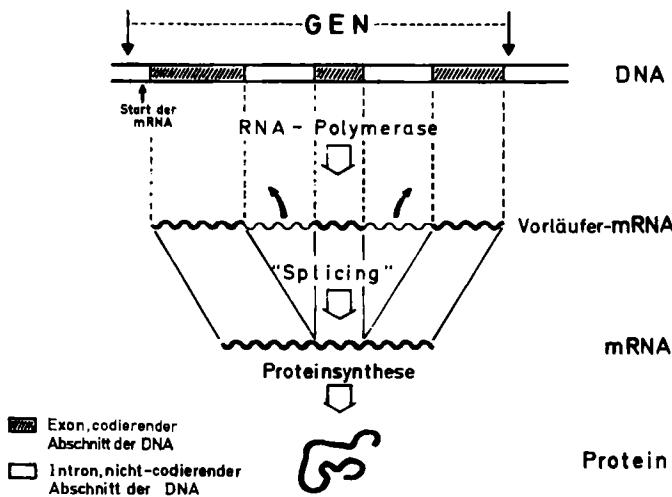


Fig. 3. Expression eines Gens mit zwei Introns. In den Genen höherer Zellen ist die Sequenzinformation für ein Protein häufig durch nicht-codierende Abschnitte unterbrochen. Bei der Expression des Gens erfolgt zunächst die Bildung einer „Vorläufer-mRNA“, die schnell durch Spleißen (Splicing) in die endgültige mRNA umgewandelt wird. Diese dient als Vorlage für die Proteinsynthese.

Bakterielle Gene sind einfacher aufgebaut, bisher sind nur in einem Archäabakterium Introns nachgewiesen worden^[12, 13]. In Bakterien können die Gene höherer Organismen deshalb nicht korrekt „prozessiert“ werden^[19]. Die Introns werden nicht erkannt und können aus der Vorläufer-mRNA nicht entfernt werden. Bei der Proteinsynthese findet je nach Nucleotidsequenz des Introns entweder ein

frühzeitiger Kettenabbruch statt oder die Bildung eines längeren „Nonsense-Proteins“. Da die Gene der meisten menschlichen Peptidhormone Introns aufweisen, sind sie nicht für die Produktion des Proteins nach Integration in Bakterien geeignet – andere Methoden zur Gewinnung der DNA müssen gewählt werden. Dies schließt aber nicht aus, daß in besonderen Fällen größere Intron-freie Abschnitte dieser Gene Verwendung finden und durch synthetische DNA ergänzt werden.

Eine erwähnenswerte Ausnahme sind die Gene für die Interferone aus menschlichen Leukocyten und Fibroblasten. Interferone werden in höheren Zellen als Reaktion gegen eine Virusinfektion gebildet. Darüber hinaus sollen Interferone einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem haben, was für die Behandlung einiger Krebskrankungen von Bedeutung sein könnte^[20]. Da Interferone bis vor kurzem nur in äußerst geringen Mengen aus menschlichen Zellkulturen isoliert werden konnten, und weil vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten dieser Proteine lockten, wurde ihre Produktion durch Bakterien nach DNA-Rekombination intensiv vorangetrieben. Mehreren Arbeitsgruppen gelang es, die Sequenz von verschiedenen Interferon-Genen aufzuklären^[21]. Dabei wurde festgestellt, daß die den Leukocyten-Interferonen zugehörigen Gene keine Introns enthalten und somit zur Produktion des Interferons in Bakterien verwendet werden können. Dies ermöglichte die rasche Gewinnung von durch Bakterien produzierten Interferonen, von denen einige bereits klinisch geprüft werden^[20]. Weiterhin konnten so Hybrid-Interferone mit interessanten Eigenschaften erhalten werden, die aus Teilen verschiedener Gene über gemeinsame Restriktionsstellen zusammengesetzt wurden^[22].

3.3. Enzymatische Synthese der DNA aus mRNA

Wie in Figur 3 skizziert, wird die Proteinbiosynthese mit der Bildung der mRNA (gegebenenfalls Vorläufer-mRNA) eingeleitet. Dabei dient einer der DNA-Stränge als Vorlage für das Enzym RNA-Polymerase, das komplementär zu diesem Strang die mRNA synthetisiert. Die mRNA besitzt folglich die gleiche Basensequenz wie der nicht abgelesene DNA-Strang, allerdings wird in der RNA die Base Thymin (T) durch Uridin (U) ersetzt.

Durch die Nucleotidsequenz sind auf der mRNA die Erkennungssignale für Bindung und Bildung des funktionsfähigen Ribosoms sowie für „Start“ und „Stop“ der Proteinsynthese festgelegt.

Die Transkription der DNA in mRNA ist kein einmaliger Vorgang. In einer auf die Produktion eines bestimmten Hormons spezialisierten Zelle wird der entsprechende DNA-Abschnitt sehr oft in die zugehörige mRNA „umgeschrieben“. Als Folge davon kann die Konzentration der mRNA ein Viertausendfaches der Konzentration des Gens betragen.

Aus einer isolierten mRNA-Präparation kann mit Hilfe von Enzymen *in vitro* wieder die DNA erhalten werden (Fig. 4)^[23–26]. Die Arbeiten zur Übertragung der DNA eines bestimmten Peptidhormons auf Bakterien beginnen daher häufig mit der Isolierung der mRNA aus den in Frage kommenden endokrinen Zellen. Bei der Isolierung wird die Tatsache ausgenutzt, daß eukaryontische mRNA

am 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz aufweist. Dies ermöglicht ihre Abtrennung aus einer präparativ gewonnenen RNA-Fraktion durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose^[27].

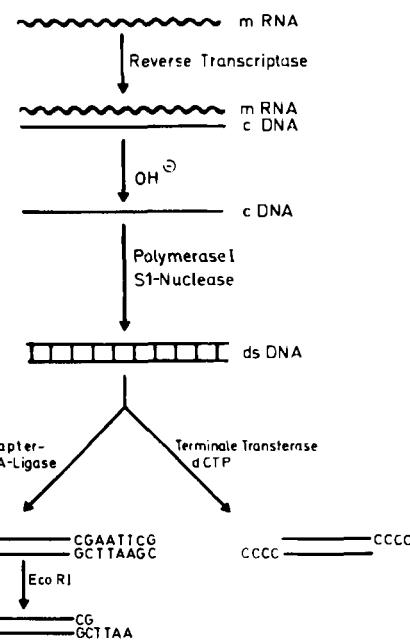
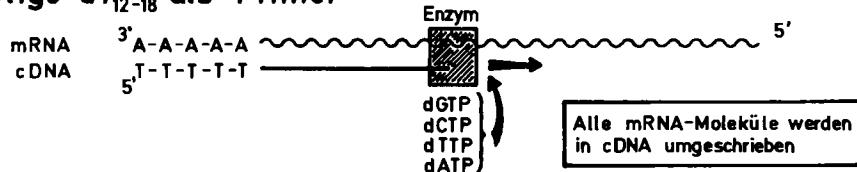


Fig. 4. *in-vitro*-Umwandlung von mRNA in DNA. Das Enzym Reverse Transcriptase schreibt mRNA in einsträngige DNA um, es entsteht die cDNA (Copy oder Complementary DNA). Anschließend wird die mRNA durch alkalische Hydrolyse zerstört. Mit dem Enzym Polymerase I wird der komplementäre DNA-Strang synthetisiert, durch S1-Nuclease werden stumpfe Enden gebildet. Zur Insertion in ein Plasmid werden sodann entweder unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide Restriktionsstellen angefügt, oder es werden enzymatisch Homopolymerne addiert.

Bei der enzymatischen Synthese der DNA aus mRNA ist die Bildung der komplementären DNA (cDNA) von entscheidender Bedeutung (Fig. 4). Um die Synthese der cDNA beginnen zu können, benötigt das Enzym Reverse Transcriptase ein kurzes Oligonucleotid, das komplementär zu einer Sequenz des 3'-Endes der mRNA ist. An diesem Oligonucleotid beginnt die wachsende cDNA-Kette; es wird als „Primer“ bezeichnet und bildet das 5'-Ende der cDNA. Wegen der Poly-A-Sequenz am 3'-Ende der eukaryontischen mRNA kann im einfachsten Fall Oligo-dT_{12–18} als Primer verwendet werden, alle in der Präparation vorhandenen mRNA-Moleküle werden dann in cDNA umgeschrieben (Fig. 5). Unter selektiven Bedingungen kann aus einem komplizierten Gemisch zahlreicher mRNA-Moleküle eine spezifische cDNA erhalten werden. Hierzu wird ein synthetischer Primer mit einer Mindestlänge von etwa 12 Nucleotiden benötigt, der komplementär zu der entsprechenden mRNA-Sequenz sein muß (Fig. 5)^[28].

Die für die Synthese des Primers erforderliche Information über die Nucleotidsequenz der mRNA kann aus der Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende des Proteins abgeleitet werden. Im Idealfall tritt hier eine Sequenz von Aminosäuren auf, für die es nur eine Codierungsmöglichkeit gibt (Tryptophan und Methionin), so daß die Sequenz der Nucleotide der mRNA eindeutig vorauszusagen ist. In der Praxis werden Sequenzen von etwa 5 Aminosäuren ge-

a) Oligo-dT₁₂₋₁₈ als "Primer"



b) Verwendung eines spezifischen "Primers"

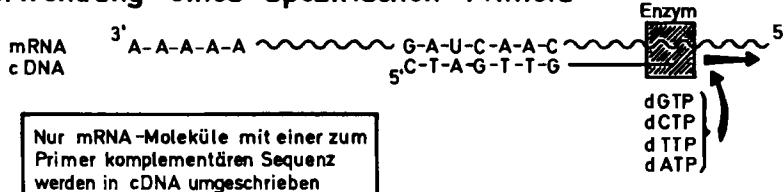


Fig. 5. Synthese von cDNA aus mRNA mit Reverser Transcriptase: a) Verwendung von Oligo-dT₁₂₋₁₈ als Primer; b) Verwendung eines synthetischen Oligonukleotids als Primer. Die Länge des Primers wurde abgekürzt, sie sollte mindestens zwölf Nucleotide betragen.

wählt, in denen die Multiplizität des genetischen Codes möglichst gering ist.

Bei der Überlegung, welche der in Abschnitt 3 diskutierten Methoden zur Gewinnung von DNA im konkreten Fall die geeignete ist, wird sicherlich die Länge der DNA von erheblicher Bedeutung sein. Bisher wurde bei einer DNA mit über 150 Nucleotiden meistens die Bildung von cDNA gewählt, in Anbetracht der raschen Entwicklung der Methoden der Nucleotidsynthese mag sich dies in Kürze ändern.

4. Plasmide

Die auf einem der drei erörterten Wege (Abschnitt 3) erhaltene DNA wird mit Hilfe von Plasmiden in Bakterien eingebaut. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien vorkommen können und die wesentlich kleiner als das Chromosom der Bakterien sind (Fig. 6). Plasmide tragen häufig Resistenz-Gene gegen Antibiotika und sind in vielen Fällen für die rasche Verbreitung von Antibiotica-Resistenzen verantwortlich. Die am häufigsten verwendeten Plasmide vermehren sich unabhängig vom übrigen Erbmaterial des Bakteriums, es können unter günstigen Bedingungen – z. B. bei Anwesenheit von Chloramphenicol im Medium – über 500 Kopien des Plasmids pro Bakterienzelle auftreten. Plasmide lassen sich experimentell einfach von der chromosomal DNA des Bakteriums abtrennen^[29]. Die Reingewinnung gelingt durch Zentrifugation in einem CsCl-Gradienten bei Anwesenheit eines intercalierenden Farbstoffs wie Ethidiumbromid; chromosomal DNA und Plasmid-DNA binden aufgrund ihrer Struktur unterschiedliche Mengen des Farbstoffs und weisen somit verschiedene Dichten auf^[26, 39].

Ausschlaggebend für die Verwendung der Plasmide als Vehikel zum Transport fremder DNA in Bakterien ist die Möglichkeit, isolierte und auch veränderte Plasmide unter experimentell einfachen Bedingungen wieder in Bakterien einzuschleusen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. In Anwesenheit von Calciumchlorid (ca. 50 mM) werden Zellwand und Zellmembran vieler Bakterien so verändert, daß fremde DNA eindringen kann.

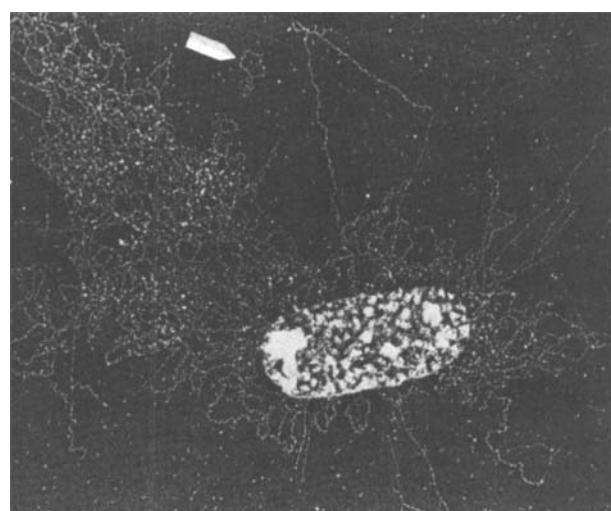


Fig. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahme [30] eines *E. coli*-Bakteriums, dessen Zellwand durchlässig gemacht worden war, so daß die DNA austreten konnte. Am oberen Rand des Bildes ist vom Pfeil ein Plasmid angedeutet, das sich ursprünglich im Bakterium befand. Das übrige „Fadenknäuel“ stellt das wesentlich größere Chromosom des Bakteriums dar.

Unter günstigen Bedingungen werden mit 1 µg Plasmid ca. 10⁶ Transformanten erhalten, die leicht durch die vom Plasmid verliehene Antibiotica-Resistenz erkannt und selektiert werden können. Dabei haben etwa 0,1% der Bakterien ein Plasmid aufgenommen, die hohe Zahl der Transformanten wird durch die große Anzahl der eingesetzten Bakterien (ca. 10⁹) erreicht. Demnach lässt eine Transformation mit 100 pg eines Plasmids mit 5000 Basenpaaren (ca. 3 · 10⁻¹⁷ mol!) immerhin 100 Transformanten erwarten.

Die Vermehrung der DNA wird als Klonierung bezeichnet, früher verstand man darunter die Vermehrung von Zellen unter Bildung identischer Tochterzellen. Aus der in Fig. 7 schematisch dargestellten Klonierung der DNA ergeben sich praktische Konsequenzen:

1. Ein nahezu beliebiges DNA-Fragment kann mit Hilfe von Plasmiden vermehrt und dann untersucht werden. Damit werden alle Vorgänge, die von einer Veränderung des Erbmaterials herrühren, erstmalig auf molekularer Ebene

erfaßbar. Auf medizinischem Gebiet sind dies beispielsweise Krebserkrankungen, Virusinfektionen, vermutlich mit dem „Altern“ zusammenhängende Erscheinungen und selbstverständlich vererbbare Erkrankungen. Erste Erkenntnisse über die Entstehung von Tumorerkrankungen wurden bereits veröffentlicht^[31]. Ob sich die aus der Untersuchung der DNA gewonnenen Ergebnisse schnell in neue Therapiemöglichkeiten ummünzen lassen, kann heute noch nicht beantwortet werden.

2. Durch Insertion eines für ein Protein codierenden DNA-Abschnittes in Bakterien kann eine günstige Produktionsquelle geschaffen werden.

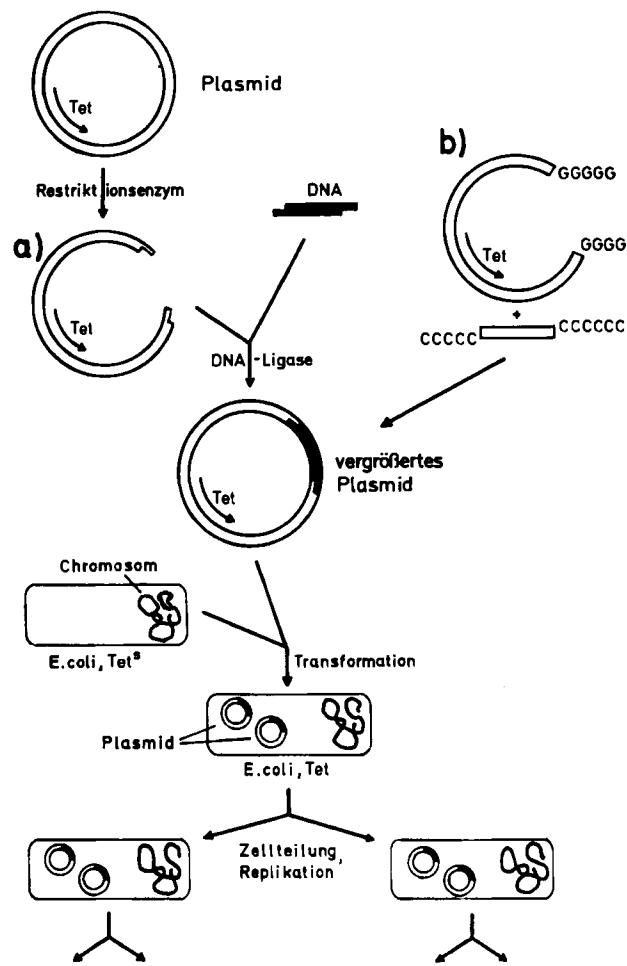


Fig. 7. Klonierung (Vermehrung) von DNA durch Insertion in ein Plasmid und anschließende Transformation in Bakterien. Das ringförmige Plasmid wird mit einem Restriktionsenzym, für das es auf dem Plasmid nur eine Erkennungsstelle gibt, linearisiert. - a) Fremde DNA mit passenden Enden wird enzymatisch eingesetzt und das vergrößerte Plasmid in Bakterien transformiert. - b) Alternativ kann die DNA auch durch Basenpaarungen zwischen komplementären Homopolymeren an den Enden der DNA und des Plasmids in dieses inseriert werden [40]. Das im Beispiel verwendete Plasmid trägt ein Resistenz-Gen für Tetracyclin (Tet), so daß die das Plasmid enthaltenden Bakterien, die vorher Tetracyclin-sensitiv (Tet^S) waren, durch Zusatz des Antibiotikums zum Medium selektioniert werden können.

Ausgehend von natürlich vorkommenden Plasmiden wurden zahlreiche spezielle Plasmide konstruiert (z.B. pUC^[32] und pUR 250^[33]). In Figur 8 ist das gegenwärtig wohl am häufigsten verwendete Plasmid pBR 322^[34] dargestellt. Die Plasmide enthalten einen mit „Origin“ (Or) bezeichneten Bereich, hier beginnt die Replikation des Plas-

mids, die in der Regel mit den bakteriellen Enzymen erfolgt. Weiterhin sind noch mehrere singuläre Restriktionsstellen sowie Resistenz-Gene gegen Antibiotika wünschenswert, weil hierdurch die Insertion fremder DNA und die Selektion der Bakterien mit den vergrößerten Plasmiden wesentlich erleichtert wird.

Nach in-vitro-Rekombination mit anschließender Vermehrung der DNA sind analytische Methoden zur Charakterisierung der klonierten DNA-Abschnitte notwendig. Eine grobe Charakterisierung gelingt durch Umsetzung mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Trennung der dabei erhaltenen Fragmente durch Elektrophorese^[41]. Solche Restriktionsmuster sind hilfreich für die nachfolgende Sequenzanalyse, die endgültige Gewißheit über die Zusammensetzung der DNA gibt. Die verfügbaren Methoden zur Sequenzanalyse, entweder nach Maxam und Gilbert^[35] oder nach Sanger^[36], sind mit etwas Übung zuverlässig und schnell durchzuführen. Bei der Sequenzaufklärung eines Proteins ist es sogar häufig günstiger, das entsprechende Strukturen zu isolieren und die Sequenz der Aminosäuren aus der Nucleotidsequenz der DNA abzuleiten. Insbesondere bei längeren Proteinen führt erst die Ergänzung der Aminosäuresequenzdaten durch die Analyse der DNA zur korrekten Sequenz des Proteins^[37,38].

5. Genexpression in *Escherichia coli*

Unter „Expression“ eines Strukturgens versteht man die Synthese der entsprechenden mRNA (Transkription) und die Bildung des Proteins (Translation). Zur Expression einer DNA in *E. coli* genügt es nicht, diese DNA mittels Plasmid stabil in das Bakterium einzubauen, zusätzliche Signalsequenzen müssen auf der DNA vorhanden sein^[42,43] (Fig. 9).

Der Abschnitt der DNA, der in Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase tritt und dieses Enzym zur Synthese der mRNA bindet, wird als Promotor bezeichnet. Mit Bezug auf die Menge der gebildeten mRNA spricht man von starken und schwachen Promotoren. Durch Vergleich zahlreicher Promotor-Sequenzen konnten weitgehende Übereinstimmungen in den Bereichen um die Nucleotide 10 und 35 vor dem Beginn der Transkription festgestellt werden^[44,45]. Es handelt sich hier offenbar um Signal-Sequenzen für den Start der Transkription. Die aus den verglichenen abgeleiteten Konsensus-Sequenzen sind in Fig. 9 wiedergegeben, sie wurden anhand der in den einzelnen Positionen am häufigsten auftretenden Nucleotide ermittelt^[45-47]. Änderungen in der Transkriptionshäufigkeit werden nach Veränderung einzelner Nucleotide des Promoters beobachtet, insbesondere nach Veränderungen in den „konstanten“ Bereichen. Neben der hier erörterten Promotorstruktur sind noch andere, kompliziertere Strukturen bekannt geworden, bei denen die Expression eines Gens durch mehrere Promotoren reguliert wird^[48].

Um eine hohe Proteinausbeute zu erhalten, wird nicht nur ein starker Promotor, sondern auch eine wirkungsvolle Maschinerie zur Synthese des Proteins benötigt. Die Proteinsynthese erfolgt an den Ribosomen, die mRNA dient dabei als Vorlage^[49]. Es müssen daher Abschnitte auf der mRNA vorhanden sein, die eine Bindung der Ribosomen

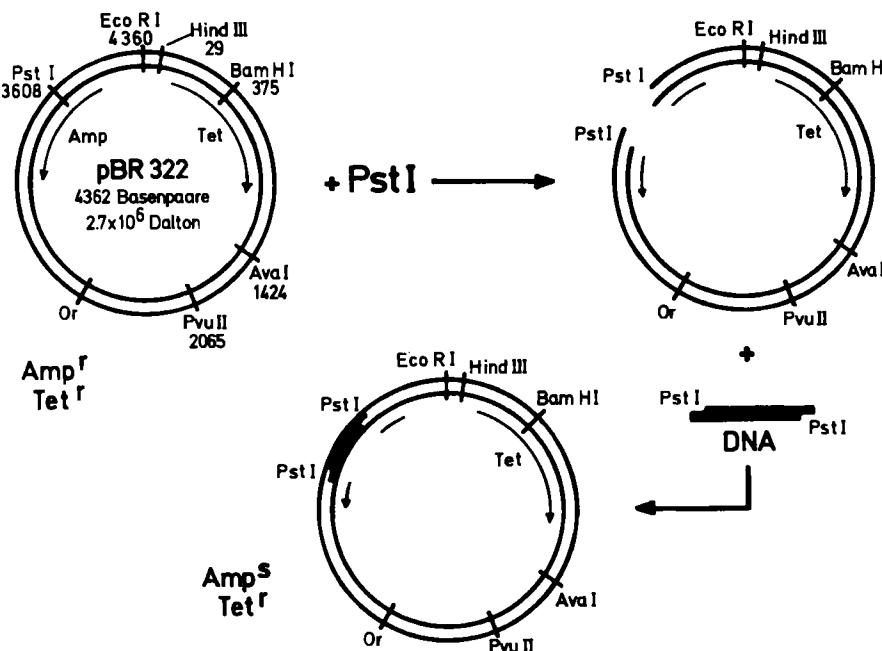


Fig. 8. Insertion einer DNA in die Restriktionsstelle von Pst I des Plasmids pBR 322. Angegeben sind die Koordinaten verschiedener singulärer Restriktionsstellen. Das Plasmid enthält die Resistenz-Gene für Ampicillin (Amp) und Tetracyclin (Tet). Orl symbolisiert den Beginn der Replikation. Durch Insertion einer DNA in die Pst I-Stelle wird das Resistenz-Gen für Ampicillin zerstört. Amp^r-Tet^r-Bakterien können durch Replika-Plattierung der gleichen Kolonien auf verschiedenen Agar-Platten mit Ampicillin und Tetracyclin erkannt werden.

bewirken. Von Shine und Dalgarno^[50] wurden solche Bereiche nach Sequenzanalysen des Ribosoms postuliert, die später bestätigt wurden^[51,52]. Die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) ist etwa 3–9 Nucleotide lang und befindet sich 3–11 Nucleotide vor dem Startsignal (AUG) für die

Proteinsynthese; sie ist komplementär zu dem 3'-Ende der 16S-RNA des Ribosoms:

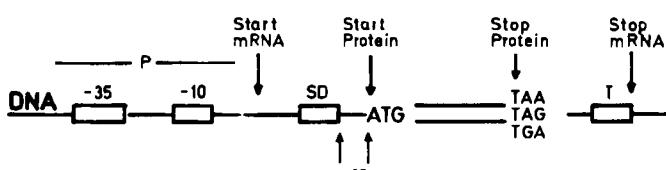
3'-HO-AUUCUCCACUA-

Als weitere Signal-Sequenzen sind die Triplets für Start und Stop der Proteinsynthese zu nennen. Als Startsignal wird das Triplet AUG verwendet, das zugleich für die Aminosäure Methionin codiert. Bei den meisten Proteinen wird das dadurch eingegebene Methionin durch spezifische Enzyme entfernt. Eines oder mehrere der Triplets UAA, UAG und UGA beenden die Proteinsynthese.

Die SD-Sequenz und die Signale für die Proteinsynthese erfüllen ihre Funktion erst auf der mRNA. Da die mRNA die Kopie eines der DNA-Stränge ist, sind diese Sequenzen auch auf der DNA codiert (hier ist allerdings die Base Uridin durch Thymidin ersetzt).

Die Synthese der mRNA schließlich wird durch Terminationsstrukturen der DNA beendet, die kurz vor dem letzten Nucleotid der mRNA auftreten^[53]. Der Vergleich mehrerer dieser Sequenzen lässt keine Konsensus-Bereiche erkennen^[45]. Als Gemeinsamkeit konnte festgestellt werden, daß hier komplementäre Sequenzen auftreten, die sich zu Haarnadelstrukturen falten können (Fig. 9). Die terminierende Wirkung wird wahrscheinlich durch die Struktur der mRNA selbst verursacht, weniger durch die Struktur der DNA^[45].

Bei der Genexpression eines eukaryontischen Proteins in Bakterien wird eine hohe Synthesegeschwindigkeit angestrebt, die möglichst auch noch regulierbar sein soll. Zweckmäßigerweise verwendet man deshalb Kontroll-Sequenzen, die auch in *E. coli* vorkommen und dort die hohen Konzentrationen bestimmter bakterieller Proteine verursachen.



Konsensus-Sequenzen:

-35 : -TGTGACA-TT-
-10 : -TGTATAATG-

Terminator des *E. coli*-Trp-Operons

DNA: —CCACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTACTT —

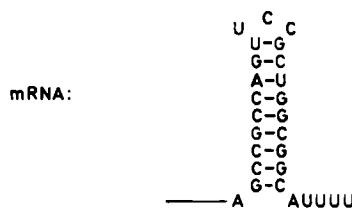


Fig. 9. Signalsequenzen für die Genexpression in Prokaryonten. Die Bereiche um 35 bzw. 10 Nucleotide vor dem Beginn der Transkription werden mit -35 bzw. -10 bezeichnet. P symbolisiert den Promotor, SD die Shine-Dalgarno-Sequenz und T den Terminator. Die angegebenen Sequenzen entsprechen dem DNA-Strang mit der gleichen Sequenz wie die der mRNA. Die Sequenz des angegebenen Terminators [43] ist exemplarisch für andere, die ebenfalls komplementäre Bereiche aufweisen.

Ein für die Regulation zuständiger Abschnitt der DNA wird mit den zugehörigen Strukturgenen gemeinsam als Operon bezeichnet. Folgende DNA-Abschnitte werden bei der Expression eukaryontischer DNA in *E. coli* häufig verwendet: das Lactose-Operon, das Tryptophan-Operon und Promotoren des Bakteriophagen λ .

5.1. Das Lactose-Operon

Die Enzyme β -Galactosidase, Permease und Transacetylase sind in *E. coli* am Abbau von Lactose beteiligt. Die Strukturgenen dieser Enzyme werden gemeinsam mit den an der Regulation der Expression beteiligten DNA-Abschnitten als Lac-Operon bezeichnet.

Die Enzyme des Lac-Operons werden vom Bakterium nur in größeren Mengen synthetisiert, wenn Lactose (oder ein anderer Induktor) im Nährmedium vorhanden ist. Die Untersuchungen der zugrundeliegenden Regulation gehen auf Arbeiten von Jacob und Monod^[54] zurück. In Figur 10 sind die Struktur und der Mechanismus der Regulation des Lac-Operons dargestellt.

(Induzierbarkeit), und die hohe Konzentration dieses Enzyms in *E. coli*, lassen die Verwendung der Kontrolleinheiten des Lac-Operons zur Produktion anderer Proteine als sehr verlockend erscheinen. Insbesondere kann auf Mutanten zurückgegriffen werden, die durch Basenveränderungen des Promotors günstige Eigenschaften für eine Expression haben^[55]. Der Regulationsabschnitt des Lac-Operons (Promotor, Operator und der DNA-Abschnitt, der die ersten sieben Aminosäuren der β -Galactosidase codiert) kann nach Abbau mit dem Restriktionsenzym Hae III auf einem Fragment mit 203 Basenpaaren isoliert werden^[56]. Mit synthetischen Linkern können geeignete Restriktionsstellen an die Enden des Fragments addiert werden. Man erhält so ein DNA-Stück, das nach Insertion in ein Plasmid die Expression eines nachfolgenden Strukturgens bewirkt^[56-59].

Auch die Eco RI-Restriktionsstelle bei Nucleotid 3016 des Strukturgens der β -Galactosidase^[37] bietet sich zur Insertion fremder DNA an. In diesem Fall entsteht allerdings ein Fusionsprotein mit 1005 Aminosäuren der β -Galactosidase vor dem gewünschten Protein^[58, 60-63] (Fig. 11). In bei-

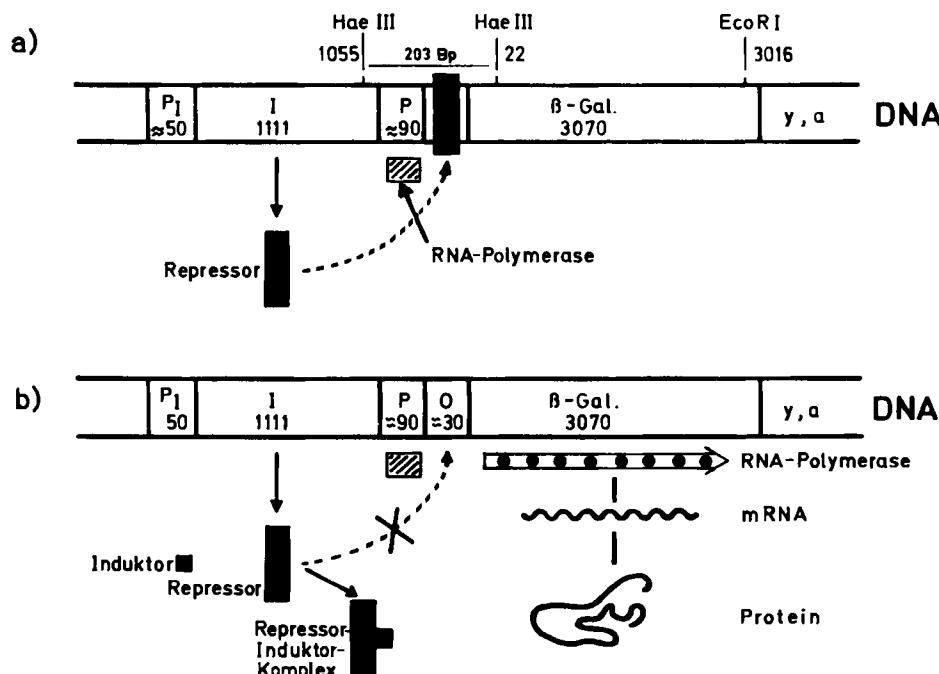


Fig. 10. Struktur und Regulation des Lac-Operons in *E. coli*. - a) Durch das Strukturgen I und den dazugehörigen Promotor P_1 wird die Bildung eines Repressor-Proteins hervorgerufen, das zwischen dem Strukturgen für β -Galactosidase und dem Promotor P an die DNA des Lac-Operons gebunden wird. Die Bindungsstelle des Repressors wird mit Operator (O) bezeichnet. Die RNA-Polymerase ist durch den DNA-Repressor-Komplex blockiert, es wird keine mRNA und damit auch keines der Proteine des Lac-Operons gebildet. y und a symbolisieren die beiden weiteren Strukturgenen des Lac-Operons. - b) In Anwesenheit des Induktors Lactose erfolgt eine Komplex-Bildung zwischen Induktor und Repressor. Dieser Komplex kann nicht an den Operator gebunden werden, und die RNA-Polymerase synthetisiert nun die mRNA; es erfolgt die Biosynthese der β -Galactosidase und der anderen im Lac-Operon codierten Proteine. Die Zahlen in den einzelnen DNA-Abschnitten geben deren Größe in Basenpaaren an.

Der Massenanteil der β -Galactosidase, eines Proteins mit einem Molekulargewicht um 500000 und vier Untereinheiten, kann unter optimalen Induktionsbedingungen und in geeigneten Bakterienstämmen bis zu 30% des in *E. coli* vorhandenen Proteins betragen. Die Möglichkeit, die Proteinsynthese der β -Galactosidase durch Zusätze zum Nährmedium zu einem beliebigen Zeitpunkt einzuschalten

den hier geschilderten Fällen müssen Reste der β -Galactosidase von dem gewünschten Protein entfernt werden, wofür enzymatische und chemische Methoden zur Verfügung stehen. Bei der Wahl der Spaltungsmethode ist die Aminosäurezusammensetzung des gewünschten Proteins und die Art der Spaltstelle von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise kann mit Trypsin C-terminal an den Amino-

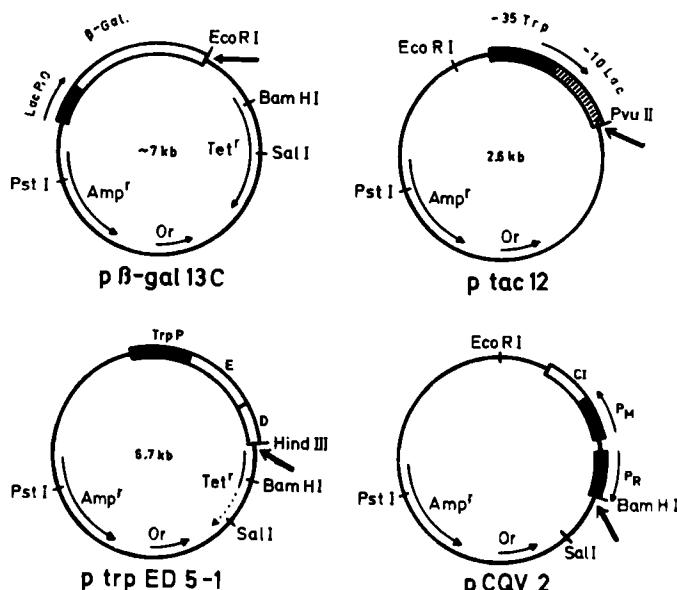


Fig. 11. Vier Plasmide zur Expression eukaryontischer Strukturgene. Die Insertionsstellen der DNA sind durch Pfeile angedeutet. - p β -gal 13 C [60]: Nach Insertion von DNA in die Eco RI-Restriktionsstelle wird unter der Kontrolle des Lac-Operons ein Fusionsprotein mit 1005 Aminosäuren der β -Galactosidase gebildet. - p tac 12 [65]: Die Expression eines in die Pvu II-Stelle inserierten Strukturgens erfolgt unter der Kontrolle eines gemischten Promotors mit der (-35)-Region aus dem Trp-Promotor und der (-10)-Region aus dem Lac-Promotor. - p trp ED 5-1 [66]: Unter der Kontrolle des Trp-Promotors erfolgt die Bildung des E-Proteins der Tryptophan-Biosynthese und die eines Fusionsproteins, welches aus 92 Aminosäuren des D-Proteins und dem zu exprimierenden Protein zusammengesetzt ist. - p CQV 2 [67]: Unter der Kontrolle des P_R -Promotors erfolgt die Transkription einer in die Bam HI-Stelle inserierten DNA. P_R wird durch einen thermolabilen Repressor CI reguliert.

säuren Lysin und Arginin gespalten werden, mit Chymotrypsin an aromatischen Aminosäuren und Leucin. Von den chemischen Methoden ist die Spaltung mit BrCN^[64] (Fig. 12) an Methionin zur Zeit die wichtigste.

Bei der Addition eines Strukturgens an einen bakteriellen Promotor oder bei der Bildung eines Fusionsproteins

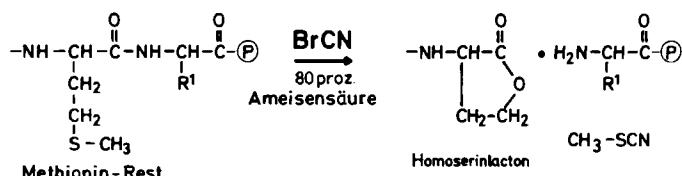


Fig. 12. Abspaltung eines Peptids aus einem Fusionsprotein mit BrCN.

ist auf die Einhaltung des Triplet-Rasters der Nucleotide zu achten, da eine Verschiebung zur Bildung von „Nonsense-Proteinen“ oder zum vorzeitigen Abbruch der Proteinkette führt.

5.2. Das Tryptophan-Operon

In Bakterien zweigt der Biosyntheseweg des Tryptophans bei der Chorisminsäure vom Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren ab (Fig. 13). Die folgenden Schritte bis zum Tryptophan werden durch Enzyme katalysiert, deren Strukturgene sequentiell auf der DNA codiert sind und die gemeinsam reguliert werden^[68] (Fig. 14).

Der auf einem entfernten DNA-Abschnitt codierte Repressor (Rep) wird nur nach Komplexbildung mit L-Tryptophan (Trp) an den Operator gebunden^[69]. In Abwesenheit von Tryptophan im Nährmedium kann die RNA-Polymerase daher in Wechselwirkung mit dem Promotor treten, die Transkription der fünf Strukturgene findet statt. Überlagert wird diese Regulation noch durch einen mit Attenuierung (Attenuation) bezeichneten Effekt: Die RNA-Polymerase beginnt zunächst mit der Transkription eines Abschnittes, der für ein Leader-Peptid von 14 Aminosäuren codiert. Dieses Peptid enthält zwei Tryptophan-Reste. Durch die Geschwindigkeit der Proteinsynthese, die auch von der Tryptophan-Konzentration im Medium abhängt, wird die Sekundärstruktur der mRNA bestimmt. Bei schneller Wanderung der Ribosomen (Tryptophan im Medium) bildet die mRNA im Bereich des Attenuators Termination.

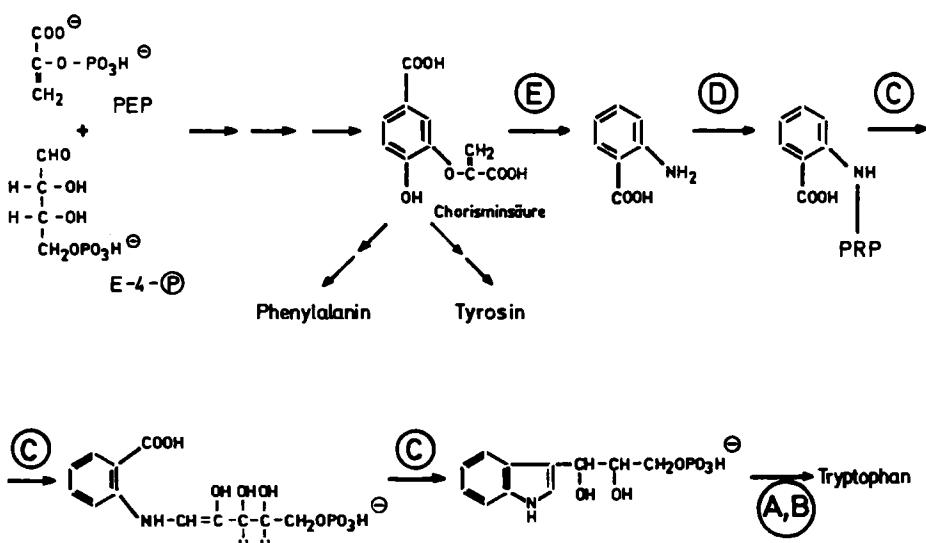


Fig. 13. Biosyntheseweg des Tryptophans. Die Buchstaben auf den Reaktionspfeilen symbolisieren folgende Enzyme: Ⓛ, Ⓜ Antranilate-Synthetase, Untereinheiten I und II; Ⓝ Phosphoribosylanthranilat-Isomerase/Indolylglycerophosphat-Synthetase; Ⓞ, Ⓟ Tryptophan-Synthetase, Untereinheiten α und β . PEP = Phosphoenolpyruvat; E-4-P = Erythrose-4-phosphat, PRP = Phosphoribosylphosphat.

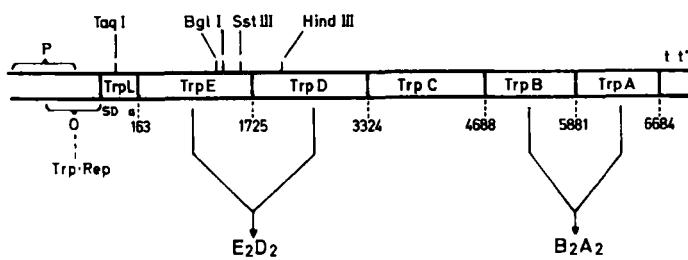


Fig. 14. Struktur des Trp-Operons in *E. coli*. Die Strukturgene E bis A werden gemeinsam reguliert (vgl. Text). Die Zahlen geben, ausgehend von der Startstelle der Transkription, die Anzahl der Basenpaare wieder. In Trp L, E und D sind einige seltene Restriktionsstellen angegeben. P = Promotor; O = Operator; L = Leader-Peptid; a = Attenuator; SD = Shine-Dalgarno-Sequenz; t, t' = Terminationssequenzen.

nationsstrukturen – die Transkription wird beendet. Bei geringen Konzentrationen von Tryptophan im Medium kommt es durch die langsame Wanderung der Ribosomen zur Bildung alternativer Strukturen der mRNA – die RNA-Polymerase setzt die Transkription der fünf nachfolgenden Strukturgene fort^[70,71]. Am Ende des Trp-Operons wird die Transkription durch zwei Terminationssequenzen beendet.

Das Trp-Operon ist daher durch Abwesenheit von Tryptophan induzierbar, es werden hohe Konzentrationen der Proteine E und D erreicht.

Mehrere Restriktionsstellen des Trp-Operons, die nach Insertion in ein Plasmid zur Ankopplung fremder DNA verwendet werden können, sind in Figur 14 angegeben. Eine Taq I-Stelle befindet sich zwischen der SD-Sequenz und dem Start-Codon des Leader-Peptids. Somit gelingt es, die Regulationseinheiten des Trp-Operons zu isolieren und von dem Effekt der Attenuierung zu separieren, der ja erst nach der Synthese des Leader-Peptids wirksam wird. Darüber hinaus kann bei geeigneter Konstruktion auf die Bildung eines Fusionsproteins verzichtet werden, da sich das Start-Triplett des zu exprimierenden Proteins verwenden lässt^[72].

Für die Bildung von Fusionsproteinen kommen vor allem die Proteine E und D in Betracht, da sie die ersten Proteine in der Synthesekette sind. So wurde beispielsweise das gesamte Trp-Operon bis zur Hind III-Stelle des D-Proteins in ein Plasmid eingebracht^[66] (Fig. 11). Die konservierte Hind III-Stelle wurde zur Insertion der DNA des menschlichen Wachstumshormons verwendet, das dann unter der Kontrolle des Trp-Operons exprimiert wurde^[73]. Auch das E-Protein wurde zur Bildung von Fusionsproteinen herangezogen^[74]. Der Regulationsabschnitt des Trp-Operons mit dem DNA-Abschnitt für die ersten sieben Aminosäuren des E-Proteins wurde in die Hind III-Stelle von pBR 322 eingesetzt. Es wurde ein Satz von Plasmiden konstruiert, der die Insertion fremder DNA in allen drei möglichen Rastern gestattet^[75]. Damit gelang die Expression von Influenza-Antigenen unter der Kontrolle des Trp-Promotors^[76].

Auch die Versuche zur Bildung gemischter Promotoren mit Teilen des Lac- und des Trp-Promotors waren erfolgreich^[65,77] (Fig. 11). Die damit erzielten Ausbeuten übertreffen zum Teil die mit den reinen Promotoren erhaltenen Ausbeuten.

5.3. Die Promotoren des Bakteriophagen λ

Die Infektion von *E. coli* durch den Bakteriophagen λ kann entweder zur Vermehrung des Phagen und zur Lyse der Bakterien oder zur Integration der DNA des Phagen in das Chromosom des Bakteriums führen. Diese beiden Möglichkeiten führen zum lytischen oder zum lysogenen Zustand (Fig. 15).

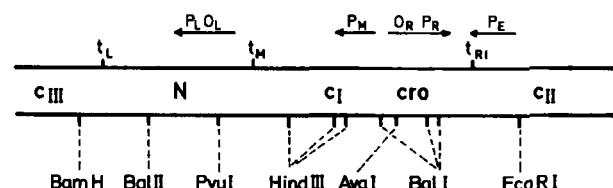


Fig. 15. Vereinfachte Darstellung der Genkarte des Bakteriophagen λ im Bereich zwischen 35000 und 40000 Basenpaaren [78]. Im lytischen Zustand beginnt die Transkription an P_R und P_L , es werden die Proteine N und cro gebildet. Die Transkription endet an t_L und nur teilweise an t_{RI} . Durch die Wirkung von N kann die Transkription über die Terminationsstrukturen t_H und t_L hinaus fortgesetzt werden. cro ist an der Regulation von P_R und P_L beteiligt. Im lysogenen Zustand wird lediglich c_I unter der Kontrolle von P_M exprimiert. Dabei wird ein Repressor für die mehrfach vorhandenen Bindungsstellen in den Operatoren O_R und O_L gebildet, wodurch der lytische Zustand verhindert wird.

Die frühen Promotoren der Bakteriophagen haben die Aufgabe, die in den Bakterien vorhandene RNA-Polymerase zur Expression der eigenen Gene zu verwenden und die bakterielle Protein-Synthese dadurch abzuschwächen. Sie sind wahrscheinlich besonders geeignet, die Synthese bestimmter Genprodukte in großen Mengen zu bewirken.

Die O_L, P_L -Regeleinheit wurde bereits mehrfach in Plasmide eingebaut und zur erhöhten Produktion bestimmter Proteine verwendet^[79]. Eine Induktion des Promotors gelingt in Bakterienstämmen, bei denen die Bildung eines thermolabilen c_I -Repressors chromosomal codiert ist^[80]. Bei Temperaturen um 30°C ist der Repressor aktiv, die Bakterien vermehren sich ohne Bildung des durch P_L regulierten Genproduktes. Durch Temperaturerhöhung auf 43°C wird der c_I -Repressor inaktiviert und damit der Promotor P_L freigegeben, es erfolgt die Synthese des nachfolgenden Strukturgens.

Auch der P_R -Promotor wurde zur Konstruktion eines Expressionsplasmids verwendet^[67], hier wurde zusätzlich noch das Strukturge für den thermolabilen Repressor in das gleiche Plasmid eingebaut (Fig. 11).

6. Beispiele für durch DNA-Rekombination erhaltenes Peptidhormone

6.1. Somatostatin

Das erste nach DNA-Rekombination in Bakterienextrakten nachgewiesene Peptidhormon war Somatostatin^[58]. Es ist ein aus 14 Aminosäuren zusammengesetztes Polypeptid (Fig. 16), das in verschiedenen Organen wie Pankreas, Hypothalamus und Magen vorkommt.

Somatostatin hemmt die Sekretion anderer Hormone, z.B. von Wachstumshormon, Insulin, Glucagon und

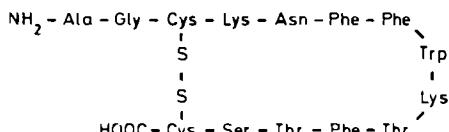


Fig. 16. Aminosäuresequenz des menschlichen Peptidhormons Somatostatin.

Gastrin. Es wurde als Modell für die Peptidgewinnung durch DNA-Rekombination ausgewählt, da die Aminosäuresequenz bekannt war, empfindliche radioimmunologische Bestimmungsmethoden vorlagen und es eine geeignete Größe für die Synthese der DNA hat.

Von der bekannten Aminosäuresequenz ausgehend wurde die entsprechende DNA synthetisiert^[58]. Dabei wurden nur die Nucleotidtriplets verwendet, die auch in *E. coli* für die einzelnen Aminosäuren am häufigsten benutzt werden.

Zur Gewinnung des Somatostatins wurden zwei Expressionsplasmide konstruiert (Fig. 17, A und B). Das erste Plasmid enthält die Promotor-Sequenz, den Operator und die ersten 27 Nucleotide (9 Aminosäuren) des Lac-Operons, gefolgt von einem ATG-Triplett und der DNA-Sequenz von Somatostatin. Die Anwesenheit des Promotors und des Operators bedeuten, daß die Proteinsynthese des Somatostatins regulierbar ist und nur in Anwesenheit eines Induktors (z. B. Lactose) erfolgt. Im Anschluß an die Somatostatin-DNA wurden zwei Stop-Triplets (symbolisiert durch STP) für die Proteinsynthese eingebaut. Unter Induktionsbedingungen sollte ein Peptid gebildet werden, das folgende Struktur aufweist:

Met-(9 AS der β -Galactosidase)-Met-Somatostatin

Das Methionin vor dem Somatostatin wurde eingeführt, um durch BrCN-Spaltung das freie Somatostatin zu erhalten.

Das zweite Expressionsplasmid ist ähnlich aufgebaut, hier befinden sich allerdings 3015 Basenpaare (1005 Aminosäuren) der β -Galactosidase vor der DNA des Somatostatins. Auch hier wurde das Triplet ATG, das für Methionin codiert, vor der DNA-Sequenz von Somatostatin eingebaut, um die Abspaltung des freien Somatostatins aus dem Hybrid-Protein zu ermöglichen.

Im Falle des ersten Plasmids konnte kein Somatostatin im Bakterienextrakt nachgewiesen werden, im zweiten Falle gelang der Nachweis des Somatostatins nach Spaltung des großen Hybridproteins mit BrCN. In beiden Fällen wurden die gleichen Regulationseinheiten verwendet. Es ist anzunehmen, daß Transkription und Translation mit gleicher Häufigkeit stattfanden. Der Grund für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse ist wahrscheinlich in der raschen proteolytischen Zersetzung des kurzen Peptids zu suchen.

Proteine aus anderen Organismen werden häufig von den bakteriellen Systemen als „fremd“ erkannt und sehr schnell zerstört, obwohl sie nach Genübertragung in Bakterien synthetisiert wurden. Die Verhinderung des Abbaus eines in Bakterien gebildeten Peptidhormons ist eines der großen, noch nicht gelösten Probleme bei der Gewinnung kurzer Peptidhormone nach DNA-Rekombination.

Bei dem zweiten erwähnten Expressionsplasmid schützt der große β -Galactosidase-Rest das gebildete Somatostatin vor einem proteolytischen Abbau. Der hier beschriebene Weg, das Somatostatin aus dem Hybridprotein mit BrCN abzuspalten, kann natürlich nur bei Peptidhormonen benutzt werden, die kein Methionin enthalten, da sonst weitere Spaltungen erfolgen.

Inzwischen konnten erste klinische Prüfungen mit Somatostatin aus *E. coli* durchgeführt werden. Man erhoffte sich eine Anwendungsmöglichkeit des nun in größeren Mengen zugänglichen Somatostatins bei bestimmten diabetischen Erkrankungen. Diese Hoffnungen haben sich nach bisher bekannt gewordenen Daten allerdings nicht erfüllt.

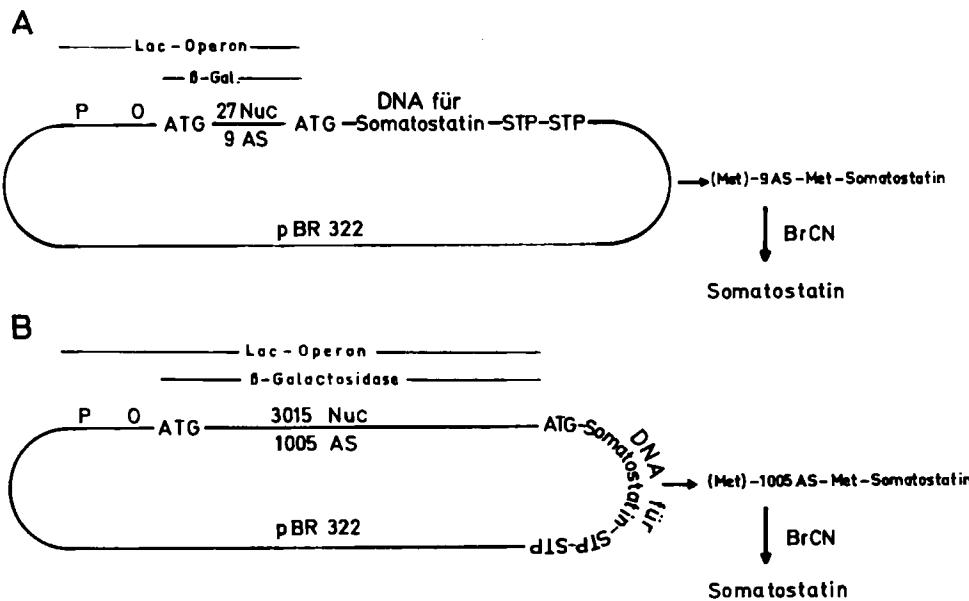


Fig. 17. Expressionsplasmide für die bakterielle Synthese von Somatostatin [58]. In beiden Plasmiden wird das Lac-Operon zur Expression verwendet, die Plasmide unterscheiden sich bezüglich der Insertionsstelle für den Einbau der DNA für Somatostatin in die DNA des Lac-Operons. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Neuere molekularbiologische Untersuchungen der Biosynthese von Somatostatin haben ergeben, daß dieses zunächst als ein größeres, inaktives Protein aus 116 Aminosäuren gebildet wird^[97, 98]. Die Sequenz des aktiven Somatostatins befindet sich am C-terminalen Ende dieses Prä-Somatostatins^[1]; über den Mechanismus der Abspaltung des aktiven Teils ist noch nichts bekannt.

6.2. Menschliches Wachstumshormon

Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) wird im Hypophysenvorderlappen synthetisiert, es besteht aus 191 Aminosäuren. Die Hormone der Hypophyse spielen eine wesentliche Rolle beim Wachstum und der Entwicklung des Kindes. Der Mangel an einem oder mehreren dieser Hormone kann durch eine Substitutionstherapie überwunden werden. Wachstumshormon-defiziente Kinder werden in der Regel während einer Zeitspanne von 10 Jahren mit dem aus menschlichen Hypophysen extrahierten Hormon behandelt^[81, 82]. Von Tanner^[83] wird der Anteil der Kinder, die wegen ihres Zwergwuchses für eine Therapie mit GH in Frage kommen, auf 1 : 7000 geschätzt. Bei etwa 40% der Kinder mit unterdurchschnittlichem Wachstum werden normale Konzentrationen an GH gemessen (immunologisch), dieses hat aber nicht die volle biologische Aktivität^[84, 85]. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Hormon mit nur geringfügigen Veränderungen in der Proteinkette, die jedoch die biologische Aktivität entscheidend beeinflussen.

Neben der Behandlung des hypophysären Zwergwuchses wird die Anwendung von Wachstumshormon bei folgenden Indikationen diskutiert: Verbrennungen, Geschwüre des Magens und des Darms, Frakturen und Osteoporose (Mangel an Knochengewebe)^[84].

Tierische Wachstumshormone weisen eine unterschiedliche Aminosäuresequenz auf, menschliche Hypophysen (aus Leichen) sind bisher die einzige Quelle des Hormons, die naturgemäß den Bedarf nicht decken kann. Es lag daher nahe, die Gewinnung des menschlichen Hormons aus genetisch veränderten Bakterien zu versuchen.

Die Verwendung molekularbiologischer Methoden führte zur Entdeckung einer ganzen Genfamilie des menschlichen Wachstumshormons sowie zu zahlreichen Erkenntnissen über Struktur, Expression und Evolution dieser Gene^[86].

Das Gen enthält vier Introns, wobei sich die Grenzen des Introns B an zwei alternativen Stellen befinden^[87]. Das unterschiedliche „Processing“ der Vorläufer-mRNA führt zu zwei Proteinen mit 191 und 176 Aminosäuren. Tatsächlich werden etwa 15% der biologischen Aktivität des Wachstumshormons einem Protein zugeordnet, das die Aminosäuresequenz des alternativ gebildeten Proteins aufweist^[88].

Die mRNA des Wachstumshormons codiert für ein Prä-Hormon, das 26 zusätzliche Aminosäuren am N-terminalen Ende aufweist. Solche Prä- oder Signal-Sequenzen sind

charakteristisch für Proteine, die aus der Zelle ausgeschleust werden, sie werden wahrscheinlich während dieses Vorganges abgespalten^[89]. Durch Kombination eines aus der mRNA gewonnenen DNA-Abschnittes (550 Basenpaare) mit einer synthetischen DNA für die 24 N-terminalen Aminosäuren wurde ein Strukturgen für menschliches GH erhalten. Die Expression dieses Strukturgens gelang in *E. coli*, das verwendete Expressionsplasmid enthielt zwei hintereinandergeschaltete Lac-Promotoren^[90]. Die zunächst angegebene Ausbeute von 2.4 mg/L dürfte in der Zwischenzeit erheblich gesteigert worden sein. Bei der Konstruktion des Expressionsplasmids wurde das Strukturgen für das Wachstumshormon direkt an die SD-Sequenz des Lac-Operons gekoppelt. Es wird kein Fusionsprotein gebildet. Um die Proteinsynthese zu beginnen, wird das durch den synthetischen DNA-Abschnitt eingebrachte Triplet ATG benötigt. Zusätzlich zu den 191 Aminosäuren des natürlichen Wachstumshormons enthält daher das aus Bakterien isolierte Protein ein N-terminales Methionin.

Eine BrCN-Spaltung zur Abtrennung des Methionins ist hier nicht möglich, da Wachstumshormon noch zwei weitere Methionin-Reste enthält, die zur Fragmentierung des Proteins führen würden. Bisher konnte kein praktikables Verfahren für die Abspaltung des N-terminalen Methionins entwickelt werden. Erste Vergleiche der Wirkung bei Ratten zwischen natürlichem und bakteriellem Wachstumshormon ergaben trotz des zusätzlichen Methionins keine Unterschiede^[91]. Die erste für Humanversuche hergestellte Charge rief aber bei den Probanden unangehme Nebenwirkungen hervor, die höchstwahrscheinlich durch bakterielle Toxine verursacht wurden^[4]. Durch zusätzliche Reinigungsschritte kann dieses Problem überwunden werden.

Die Ergebnisse weiterer klinischer Versuche müssen abgewartet werden, um die Anwendungsmöglichkeiten des bakteriell hergestellten Wachstumshormons beurteilen zu können.

6.3. Insulin

Insulin wird in den β-Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet, es ist wesentlich an der Regulation des Glucose-Spiegels im Blut beteiligt. Ein großer Teil der Diabetiker, dies sind etwa 1.5% der Bevölkerung, ist auf tägliche Insulinspritzen angewiesen. Aus naheliegenden Gründen können menschliche Organe nicht in ausreichenden Mengen zur Extraktion des Hormons verwendet werden. Man weicht daher auf tierische Bauchspeicheldrüsen aus, die Insulin mit sehr ähnlichen Aminosäuresequenzen enthalten. Das Rinderinsulin unterscheidet sich in zwei Aminosäuren der A-Kette und einer Aminosäure der B-Kette von Humaninsulin, beim Schweineinsulin ist lediglich die letzte Aminosäure der B-Kette ausgetauscht (Thr gegen Ala).

Unter bestimmten Inkubationsbedingungen kann in Gegenwart des Enzyms Trypsin das C-terminale Alanin der B-Kette gegen Threonin ausgetauscht und somit Schweineinsulin in menschliches Insulin umgewandelt werden^[92]. Dieser Weg wird im technischen Maßstab von mehreren Herstellern seit kurzem beschritten, für das so gewonnene Peptidhormon hat sich die Bezeichnung „Semisynthetisches Humaninsulin“ eingebürgert.

[*] Unter einem Prä-Hormon soll hier ein inaktives Vorläufermolekül verstanden werden, das durch Abspaltung eines N-terminalen Polypeptids in das aktive Hormon umgewandelt wird. Ein Prohormon soll dagegen in Analogie zum Proinsulin ein Vorläufermolekül sein, das durch Abspaltung eines internen Polypeptids in das aktive Hormon überführt wird. Naturgemäß sind hier mindestens zwei Spaltstellen notwendig.

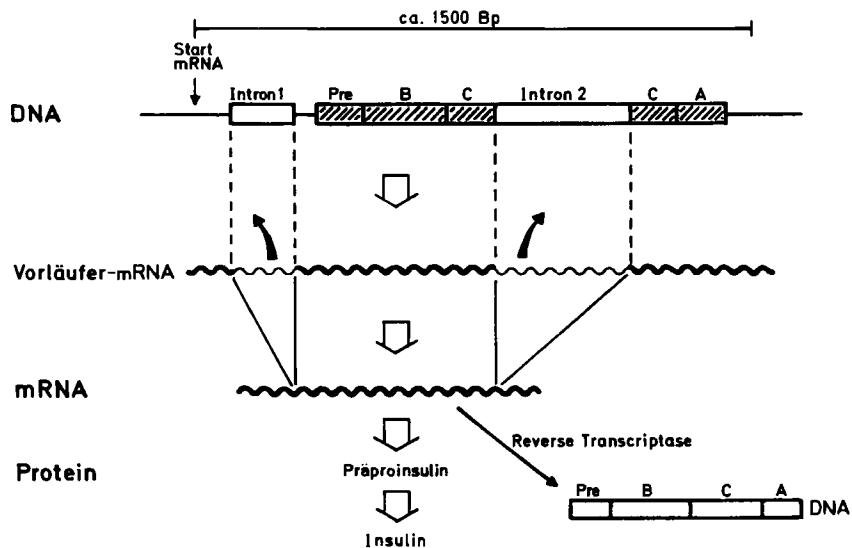


Fig. 19. Struktur des menschlichen Insulin-Gens [18]. Aus der Vorläufer-mRNA werden zwei Introns herausgeschnitten (das erste liegt vor der codierenden Region der Pre-Kette, das zweite innerhalb der Region der C-Kette). Die mRNA kann mit Hilfe von Reverser Transkriptase und anderer Enzyme (vgl. Abschnitt 3.3) in vitro wieder in DNA umgewandelt werden; in diesem Fall wird ein Strukturgen ohne Introns erhalten, da durch das „Processing“ der Vorläufer-mRNA diese bereits in vivo entfernt wurden.

Wie viele andere Hormone wird auch Insulin in der Zelle zunächst als ein längeres Prä-Hormon synthetisiert (Fig. 18)^[93]. Das Präproinsulin enthält ein zusätzliches Peptid mit 24 Aminosäuren am N-terminalen Ende, welches während des Transports zum endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird. Wahrscheinlich weist dieses Peptid eine Signal-Sequenz für den Transportmechanismus auf^[89]. Die Umwandlung des somit gebildeten Proinsulins in Insulin beginnt im Golgi-Apparat und wird während der Bildung der Insulin-Granula in den β-Zellen fortgesetzt.

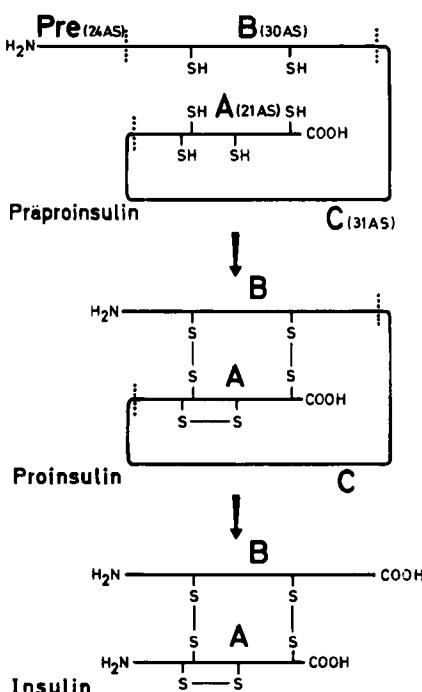


Fig. 18. Biosynthese von Insulin aus Präproinsulin. Die Kettenabschnitte Pre, B, C und A sind mit der jeweiligen Anzahl der Aminosäuren angegeben. Das C-Peptid besteht aus 31 Aminosäuren. Bei der Abspaltung aus dem Proinsulin werden noch zwei Dipeptide freigesetzt, so daß die A- und die B-Kette des menschlichen Proinsulins durch ein Peptid mit 35 Aminosäuren verbunden sind. Möglicherweise werden die Disulfidbrücken bereits beim Präproinsulin gebildet.

Die Prognosen für einen zunehmenden Bedarf an Insulin (die Anzahl der erkannten Diabetiker steigt weltweit um etwa 3% jährlich) und die Möglichkeit, Humaninsulin zu gewinnen, führten nahezu zwangsläufig zu dem Versuch, Insulin nach DNA-Rekombination aus Bakterien zu erhalten. Nicht zuletzt angeregt durch die wirtschaftliche Bedeutung des Insulins, beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Gewinnung der DNA des Hormons und der Strukturaufklärung des Gens^[94] (Fig. 19).

Ausgehend von der mRNA wurde zunächst die cDNA des Ratteninsulins^[95] und wenig später die des Humaninsulins kloniert^[93, 96].

Aktives Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten (A und B), die nur über Disulfidbrücken verknüpft sind. Bei der Biosynthese ermöglicht die räumliche Struktur des Proinsulins die Bildung der korrekten Disulfidbrücken. Die an der Umwandlung zum Insulin beteiligten Enzyme konnten bisher nicht isoliert werden^[99]. Da es nicht möglich ist, die Bildung von Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Polypeptidketten auf der DNA zu codieren, sind bei der Produktion des Insulins durch Bakterien zusätzliche Schritte erforderlich.

Die bakterielle Gewinnung des Insulins gelingt auf zwei alternativen Wegen (Fig. 20 und 21). Bei dem in Figur 20 skizzierten Verfahren wird zunächst Proinsulin erhalten, das anschließend in Insulin umgewandelt werden muß. Bei der zweiten Möglichkeit der Insulingewinnung werden die A- und die B-Polypeptidkette getrennt erhalten und anschließend zum aktiven Insulin oxidiert. Da sich bei dieser Oxidation nicht nur die korrekten Disulfidbrücken bilden, sondern auch alle möglichen inter- und intra-molekularen Kombinationen auftreten können, ist bei diesem Schritt mit erheblichen Verlusten zu rechnen.

Die Bildung von Proinsulin durch Bakterien wurde bereits mehrfach beschrieben^[101], auch die Oxidation der getrennten Ketten wurde erfolgreich durchgeführt^[102].

Bei der Therapie mit hochgereinigten Insulinen werden sehr selten immunologische Reaktionen gegen diese Präparate beobachtet. Für die Anwendung von Humaninsulin

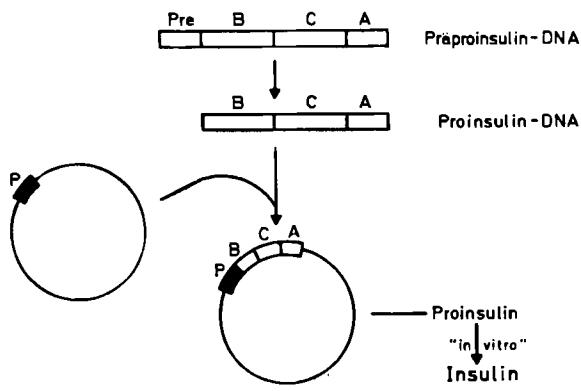


Fig. 20. Gewinnung von Humaninsulin aus Bakterien durch Umwandlung von Proinsulin. Durch Umschreibung der mRNA wird die DNA des Präproinsulins erhalten. Nach Abtrennung des Pre-Abschnittes wird die DNA in ein Expressionsplasmid eingebracht. Das durch Bakterien produzierte Proinsulin kann enzymatisch [100] in aktives Insulin umgewandelt werden.

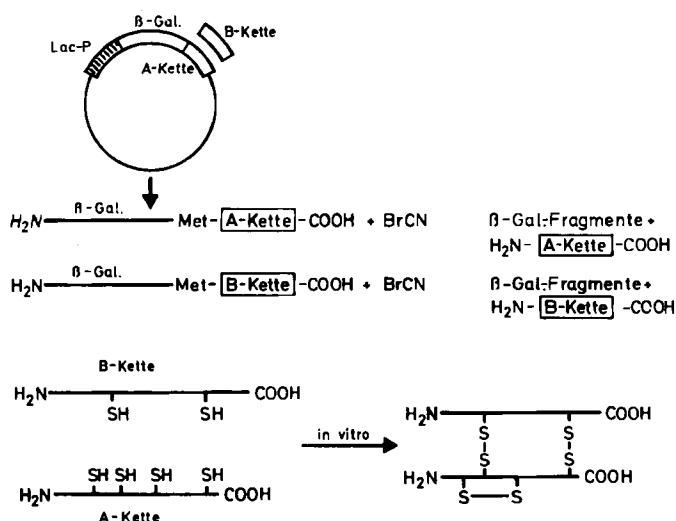


Fig. 21. Gewinnung von Humaninsulin aus Bakterien durch Oxidation der getrennten Ketten. Die durch chemische Synthese erhaltenen DNA-Abschnitte für die A- und B-Kette des Insulins [13] werden in ein Expressionsplasmid eingebracht; die beiden Ketten werden getrennt isoliert [60]. Die Bildung der Disulfidbrücken zwischen den beiden Ketten erfolgt in einem zusätzlichen Schritt.

wurde erwartet, daß diese Reaktionen völlig ausbleiben. Diese Hoffnungen haben sich nicht ganz erfüllt. Bisher ergaben sich nur geringste Unterschiede in der Immunogenität hochgereinigter Human- und Schweine-Insulinpräparate^[103].

6.4. Andere Polypeptidhormone

Die Struktur des Relaxins ist der des Insulins sehr ähnlich, auch hier sind zwei Polypeptidketten über Disulfidbrücken verknüpft. Bei der Biosynthese wird gleichfalls zunächst ein Präprorelaxin gebildet, das erst nach Abspaltung des Pre-Abschnittes und Herausschneiden einer C-Kette in die aktive Form umgewandelt wird. Sowohl in der Länge der Ketten als auch in der Anordnung der Disulfidbrücken sind weitere erstaunliche Ähnlichkeiten mit Insulin festzustellen.

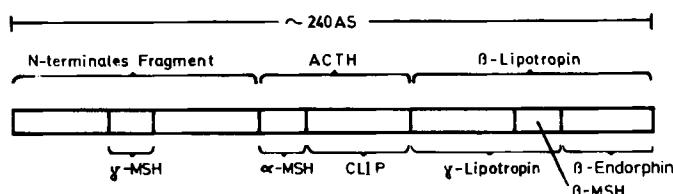
Relaxin wird während der Schwangerschaft in Placenta und Uterus gebildet und kurz vor der Geburt in den Blutstrom freigesetzt. Es erleichtert den Geburtsvorgang durch

Auflockerung des Bindegewebes. Auch in diesem Fall wurde die Nucleotidsequenz des Gens aufgeklärt und durch die biologische Aktivität des nach der Gen-Sequenz synthetisierten Proteins bestätigt^[104]. Ähnlich wie beim Insulin beschrieben (Abschnitt 6.3), wurden von einer anderen Arbeitsgruppe die DNA-Abschnitte für die A- und B-Kette des Relaxins synthetisiert und als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert^[105].

Neben den erwähnten Beispielen wurde auch die DNA zahlreicher anderer Peptidhormone aus den verschiedensten Organismen kloniert und die Sequenz aufgeklärt; in vielen Fällen wurden auch die entsprechenden Gene charakterisiert. Eine Auswahl aus den zahlreichen Veröffentlichungen der letzten Zeit: Thyrotropin^[106], HPL (Human Placental Lactogen)^[107], Epidermis-Wachstumsfaktor^[108], die gemeinsame α-Untereinheit der Hormone HCG, LH, FSH und TSH (Human Chorionic Gonadotropin, Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone bzw. Thyroid-Stimulating Hormone)^[109], Parathormon^[110], Glucagon^[111] und Gastrin^[112].

Die Expression von Thymosin α_1 (in der Desacetyl-Form) gelang als Fusionsprotein nach chemischer Synthese des Gens^[113].

Die Anwendung der geschilderten Klonierungsmethoden ermöglicht nicht nur die Struktur- und Sequenzaufklärung einzelner Gene, auch neue Regulationsprinzipien wurden entdeckt und untersucht. Pro-Opiomelanocortin (POMC) ist ein Protein (Molekulargewicht ca. 29 000), aus dem je nach Spaltung verschiedene Peptidhormone freigesetzt werden können (Fig. 22). Es wird in unterschiedlichen Geweben gebildet: Hypophyse, Hypothalamus, Placenta und Lunge. Interessant ist die Beobachtung, daß POMC in verschiedenen Zellen unterschiedlich gespalten wird. Im Vorderlappen der Hypophyse erfolgt vorwiegend die Bildung von ACTH und β -Lipotropin, im Zwischenbecken der Hypophyse (bei Mäusen) werden diese Moleküle sehr schnell zu MSH, CLIP, β -Endorphin und γ -Lipotropin umgewandelt. In diesem Fall gelang ebenfalls die Sequenzaufklärung des Gens, die molekularen Grundlagen für die unterschiedliche Spaltung werden studiert^[114].



ACTH = Adrenocorticotropes Hormon
MSH = Melanophoren-stimulierendes Hormon
CLIP = Corticotropin-like Intermediate Lobe Peptide

Fig. 22. Struktur des Pro-Opiomelanocortin-Vorläuferproteins.

Ein weiteres Beispiel für die Bildung verschiedener Genprodukte aus dem gleichen Gen in Abhängigkeit von der Zellart bietet das Calcitonin-Gen. Das an der Regulation des Calcium-Spiegels wesentlich beteiligte Hormon weist im Gen mehrere Introns auf. Vom gleichen Gen werden in der Schilddrüse und im Hypothalamus unterschiedliche mRNA-Moleküle gebildet^[115]. Die codierenden Abschnitte werden in der Schilddrüse und im Hypothalamus infolge unterschiedlichen „Processings“ der Vorläufer-mRNA un-

terschiedlich kombiniert. In der Schilddrüse wird Calcitonin gebildet, während für den Hypothalamus ein Peptid vorhergesagt wird, dessen Funktion noch unbekannt ist^[115].

7. Ausblick

Die Vorteile der bakteriellen Hormongewinnung im Vergleich mit der klassischen Herstellung aus Organen wurden bereits mehrfach erwähnt:

- Möglichkeit zur Herstellung des Peptidhormons mit der im Menschen gefundenen Sequenz;
- Unabhängigkeit von tierischen oder menschlichen Organen;
- nahezu keine Mengenbegrenzung bei der Herstellung;
- leichte Variationsmöglichkeiten durch gezielte Veränderungen der DNA und damit Erschließung neuer Eigenschaften der Peptidhormone.

Wie verhält es sich mit der Ausbeute eines bakteriell erzeugten Hormons, ist sie mit der Isolierung aus Organen vergleichbar?

Der Anteil des gewünschten Proteins in einem gentechnologisch veränderten Bakterienstamm kann auf etwa 10% des gesamten Proteins geschätzt werden, so daß als obere Grenze etwa 500 mg Peptidhormon pro Liter Bakterienkultur anzunehmen sind. Dieser Wert läßt sich meines Wissens nicht kontinuierlich beibehalten, als sehr gut gelten heute Ausbeuten um 100 mg/L. Pankreas enthält beispielsweise etwa 100 mg Insulin pro 1 kg Gewebe. Bei einem Vergleich dieser Insulingruppen muß aber noch berücksichtigt werden, daß aus den vorher dargelegten Gründen bei dem bakteriellen Protein zusätzliche Reaktionen notwendig sind, um aktives Insulin zu erhalten. Da andererseits 1 L Bakterienextrakt kostengünstiger gewonnen werden kann als 1 kg Pankreas, sollten vom wirtschaftlichen Standpunkt aus die Herstellungsverfahren für Insulin etwa ebenbürtig sein. Bei diesem oberflächlichen Vergleich bleibt jedoch der unterschiedliche Aufwand für die Reinigung des Insulins aus Pankreas und aus Bakterienextrakt unberücksichtigt. Bei den meisten anderen Peptidhormonen wird der Vergleich zugunsten der DNA-Rekombination ausfallen, da diese Hormone in weitaus geringeren Konzentrationen in den jeweiligen Organen vorkommen.

Neben den in Figur 23 aufgeführten Faktoren wird die Ausbeute des aus Bakterien zu gewinnenden Peptidhormons noch wesentlich durch die intrazelluläre Lokalisierung des Hormons beeinflußt. Durch Signal-Sequenzen kann erreicht werden, daß die gebildeten Proteine in den periplasmatischen Raum ausgeschleust werden, wo sie wesentlich stabiler als im Plasma des Bakteriums sind^[116]. Durch Aggregation im Bakterium können Proteine wahrscheinlich ebenfalls vor proteolytischer Zersetzung geschützt werden^[117].

Über die an dem Abbau der Proteine beteiligten Enzyme ist bisher wenig bekannt. Kürzlich wurden acht (lösliche) proteolytische Enzymaktivitäten in *E. coli* beschrieben^[118], ob alle oder nur einige davon den Abbau einleiten und durchführen, ist unbekannt. Die erwähnten Faktoren machen eine Voraussage über die für ein bestimmtes Peptidhormon zu erzielende Ausbeute unmöglich.

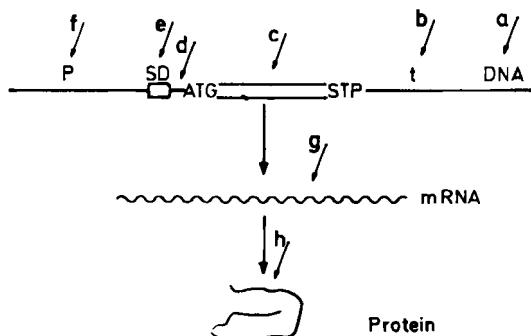


Fig. 23. Schematische Zusammenstellung verschiedener Faktoren, durch die eine wesentliche Beeinflussung der Ausbeute eines bakteriell erzeugten Peptidhormons möglich ist. a: DNA-Stabilität des Plasmids, Anzahl der Plasmide im Bakterium; b: Stärke und Struktur des Terminators; c: Art der verwendeten Triplets (Codons) für die einzelnen Aminosäuren; d: Abstand des Start-Signals für die Proteinsynthese von der Shine-Dalgarno-Sequenz; e: Art der Shine-Dalgarno-Sequenz; f: Art und Stärke des Promotors und der Sequenzen in der Nachbarschaft, Induzierbarkeit; g: Stabilität der mRNA; h: Stabilität des eventuell gebildeten Pro-Hormons oder Hormons in Bakterien.

Die Molekularbiologie eröffnet die Möglichkeit, bisher kaum zugängliche Peptidhormone in größeren Mengen herzustellen. Anhand der Beispiele Somatostatin, Wachstumshormon und Insulin wurde in diesem Fortschrittsbericht versucht, einige der damit verbundenen Probleme zu verdeutlichen. Die meisten der Schwierigkeiten werden sicherlich in Kürze überwunden werden, mehrere erfolgversprechende Lösungen sind dafür denkbar: die Verwendung Protease-freier Bakterienstämme zur Produktion des Peptidhormons; Isolierung eines Enzyms, das selektiv N-terminales Methionin abspaltet; Konstruktion von Fusionspeptiden, die hohe Ausbeute gewährleisten. Bis zum Ende dieses Jahrzehnts könnte der Anteil der gentechnologisch erzeugten Hormone mindestens 50% der gesamten gewonnenen Menge betragen.

Neben *E. coli* werden bald weitere Organismen zur Produktion von Proteinen benutzt werden, insbesondere sind hier *Bacillus subtilis* und Hefe zu erwähnen.

B. subtilis ermöglicht die gezielte Ausschleusung von Proteinen in das Kulturmedium. Bisher waren die meisten der in *B. subtilis* verwendeten Plasmide nicht stabil, es fanden Rekombinationen mit der chromosomal DNA sowie Deletionen im Plasmid statt. In der letzten Zeit sind hier allerdings wichtige Erfolge zu verzeichnen: Proteine wie α-Amylase^[119], Hepatitis-B-Antigen^[120] und sogar Proinsulin^[121] konnten aus *B. subtilis* gewonnen werden.

Hefen lassen wegen ihres eukaryontischen Charakters erwarten, daß posttranskriptionale Modifikationen ebenso verlaufen wie in höheren Zellen. Dies ist für die Gewinnung von Proteinen von Bedeutung, die nach ihrer Synthese modifiziert werden müssen (z. B. Glycosylierung, Abspaltung eines Signal-Peptids), um biologisch aktiv zu sein.

Aufgrund der ermittelten DNA-Sequenzen wurde die Existenz zahlreicher Peptide und Proteine vorhergesagt, deren physiologische Bedeutung noch völlig unbekannt ist^[114, 115, 122]. Dieser Aspekt der DNA-Rekombination – die Entdeckung neuer Proteine und die Aufklärung ihrer Funktion – kann bereits in Kürze eine ebenso große Bedeutung für die Medizin erlangen wie die Produktion bekannter Substanzen.

Mein besonderer Dank gilt Anique Fourmont, Petra Schmidt und Bernhard von Niessen für ihre Hilfe bei der Fertigung des Manuskriptes.

Eingegangen am 4. August 1983 [A 474]

- [1] S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 3240.
- [2] R. G. Guillemin, E. Sakiz, D. N. Ward, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118 (1965) 1132.
- [3] A. V. Schally, A. Arimura, C. Y. Bowers, A. J. Kastin, S. Sawano, T. W. Redding, *Recent Prog. Horm. Res.* 24 (1968) 497.
- [4] P. Newmark, *Nature (London)* 294 (1981) 200.
- [5] J. Maienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda, H. Zahn, *Z. Naturforsch. B* 18 (1963) 1120; P. G. Katsoyannis, A. Tometsko, C. Zalut, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 166.
- [6] W. Arber, *Angew. Chem.* 90 (1978) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 73.
- [7] L. Ferretti, V. Sgaramella, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 85, 3695.
- [8] R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 135.
- [9] J. E. Davies, H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 95 (1983) 26; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 13.
- [10] J. Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158 (1982) 573.
- [11] H. G. Gassen, A. Lang: *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments: A Laboratory Manual*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [12] M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, P. A. Meacock, W. Schuch, D. B. Scanlon, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nature (London)* 292 (1981) 756; S. Tanaka, T. Oshima, K. Ohsaye, T. Ono, A. Mizono, A. Ueno, H. Nakazato, M. Tsujimoto, N. Higashi, T. Noguchi, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1707.
- [13] R. Crea, A. Kraszewski, T. Hirose, K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5765.
- [14] M. Grouy, C. Gautier, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 7055; H. Grosjean, W. Fiers, *Gene* 18 (1982) 209; W. Konigsberg, G. N. Godson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 687.
- [15] A. L. Lehninger: *Biochemistry*, Worth, New York 1975.
- [16] R. Knippers: *Molekulare Generik*, Thieme, Stuttgart 1981.
- [17] EMBL - Nucleotide Sequence Data Library, Postfach 102209, D-6900 Heidelberg 1.
- [18] F. H. C. Crick, *Science* 204 (1979) 264.
- [19] O. Mercereau-Puijalon, P. Kourilsky, *Nature (London)* 279 (1979) 647.
- [20] K. Munk, H. Kirchner: *Interferon - Properties, Mode of Action, Production, Clinical Application*, Karger, Basel 1982; *Antiviral Research*, Abstr. 1, Nr. 2, Elsevier, Amsterdam 1983.
- [21] S. Nagata, H. Taira, A. Hall, L. Johnsrud, M. Streuli, J. Ecsödi, W. Boll, K. Cantell, C. Weissmann, *Nature (London)* 284 (1980) 316; T. Taniguchi, L. Guarente, T. M. Roberts, D. Kimelman, J. Douhan III, M. Ptashne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5230; R. Deryck, E. Remaut, E. Saman, P. Stanssens, E. DeClercq, J. Content, W. Fiers, *Nature (London)* 287 (1980) 193; D. V. Goeddel, D. W. Leung, T. J. Dull, M. Gross, R. M. Lawn, R. McCandless, P. H. Seeburg, A. Ullrich, E. Yelverton, P. W. Gray, *ibid.* 290 (1981) 20.
- [22] P. K. Weck, S. Apperson, N. Stebbing, P. W. Gray, D. W. Leung, H. M. Shepard, D. V. Goeddel, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 6153.
- [23] A. Efstratiadis, F. C. Kafatos, A. M. Maxam, T. Maniatis, *Cell* 7 (1976) 279.
- [24] M. P. Wickens, G. N. Buell, R. T. Schimke, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 2483; G. N. Buell, M. P. Wickens, F. Payvar, R. T. Schimke, *ibid.* 253 (1978) 2471.
- [25] H. Okayama, P. Berg, *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 161; H. Land, M. Grez, H. Hauser, W. Lindenmaier, G. Schütz, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 2251.
- [26] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1982.
- [27] H. Aviv, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1408.
- [28] B. E. Noyes, M. Mevarech, R. Stein, K. L. Agarwal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1770; K. L. Agarwal, J. Brunstedt, B. E. Noyes, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1023.
- [29] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 1513; D. S. Holmes, M. Quigley, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 193.
- [30] C. Grobstein in: *Recombinant DNA*, Scientific American Inc., New York 1978, S. 131.
- [31] P. W. J. Rigby, *Nature (London)* 297 (1982) 451; J. M. Bishop, *Cell* 32 (1983) 1018.
- [32] J. Vieira, J. Messing, *Gene* 19 (1982) 259; J. Messing, J. Vieira, *ibid.* 19 (1982) 269.
- [33] U. Rüther, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 5765.
- [34] F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, S. Falkow, *Gene* 2 (1977) 95.
- [35] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 65 (1980) 499; W. Gilbert, *Angew. Chem.* 93 (1981) 1037.
- [36] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* 94 (1975) 441; F. Sanger, *Angew. Chem.* 93 (1981) 937; A. J. Smith, *Methods Enzymol.* 65 (1980) 560.
- [37] A. Kalnins, K. Otto, U. Rüther, B. Müller-Hill, *EMBO J.* 2 (1983) 593; A. V. Fowler, I. Zabin, *ibid.* 2 (1983) 597.
- [38] P. J. Farabaugh, *Nature (London)* 274 (1978) 765; K. Beyreuther, *ibid.* 274 (1978) 767.
- [39] R. Radloff, W. Bauer, J. Vinograd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (1967) 1514.
- [40] A. M. Michelson, S. H. Orkin, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14773.
- [41] H. O. Smith, M. L. Birnstiel, *Nucleic Acids Res.* 3 (1976) 2387.
- [42] H. Kössel, *Biol. Unserer Zeit* 12 (1982) 39.
- [43] A. M. Wu, T. Platt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5442.
- [44] D. Pribnow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 784.
- [45] M. Rosenberg, D. Court, *Annu. Rev. Genet.* 13 (1979) 319.
- [46] H. Schaller, C. Gray, K. Herrmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 737.
- [47] W. Sibenlist, R. B. Simpson, W. Gilbert, *Cell* 20 (1980) 269.
- [48] M. H. Irani, L. Orosz, S. Adhya, *Cell* 32 (1983) 783.
- [49] H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 15; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 23.
- [50] J. Shine, L. Dalgaard, *Nature (London)* 254 (1975) 34.
- [51] J. A. Steitz, D. A. Steege, *J. Mol. Biol.* 114 (1977) 545.
- [52] G. F. E. Scherer, M. D. Walkinshaw, S. Arnott, D. J. Morré, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 3895.
- [53] W. M. Holmes, T. Platt, M. Rosenberg, *Cell* 32 (1983) 1029.
- [54] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 318.
- [55] A. E. Silverstone, R. R. Arditti, B. Magasanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66 (1970) 773.
- [56] K. Backmann, M. Ptashne, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 4174.
- [57] O. Mercereau-Puijalon, A. Royal, B. Cami, A. Garapin, A. Krust, F. Gannon, P. Kourilsky, *Nature (London)* 275 (1978) 505.
- [58] K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer, *Science* 198 (1977) 1056.
- [59] F. Fuller, *Gene* 19 (1982) 43.
- [60] D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 106.
- [61] J. Shine, I. Fettes, N. C. Y. Lan, J. L. Roberts, J. D. Baxter, *Nature (London)* 283 (1980) 456.
- [62] P. Charnay, M. Gervais, A. Louise, F. Galibert, P. Tiollais, *Nature (London)* 286 (1980) 893.
- [63] A. R. Davis, D. P. Nayak, M. Ueda, A. L. Hiti, D. Dowbenko, D. G. Kleid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5376.
- [64] E. Gross, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 1510.
- [65] E. Amann, J. Brosius, M. Ptashne, *Nucleic Acids Res.*, im Druck.
- [66] R. A. Hallewell, J. S. Emstige, *Gene* 9 (1980) 27.
- [67] C. Queen, *J. Mol. Appl. Genet.* 2 (1983) 1.
- [68] C. Yanofsky, T. Platt, I. P. Crawford, B. P. Nichols, G. E. Christie, H. Horowitz, M. van Cleemput, A. M. Wu, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 6647.
- [69] I. P. Crawford, G. V. Stauffer, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 163.
- [70] T. Platt, *Cell* 24 (1981) 10.
- [71] C. Yanofsky, *Nature (London)* 289 (1981) 751; I. Stroynowski, C. Yanofsky, *ibid.* 290 (1981) 34.
- [72] J. C. Edman, R. A. Hallewell, P. Valenzuela, H. M. Goodman, W. J. Rutter, *Nature (London)* 291 (1981) 503.
- [73] J. A. Martial, R. A. Hallewell, J. D. Baxter, H. M. Goodman, *Science* 205 (1979) 602.
- [74] D. G. Kleid, D. Yansura, B. Small, D. Dowbenko, D. M. Moore, M. J. Grubman, P. D. McKercher, D. O. Morgan, B. H. Robertson, H. L. Bachrach, *Science* 214 (1981) 1125.
- [75] W. Tacon, N. Carey, S. Emstige, *Mol. Gen. Genet.* 177 (1980) 427.
- [76] J. S. Emstige, W. C. A. Tacon, G. H. Catlin, B. Jenkins, A. G. Porter, N. H. Carey, *Nature (London)* 283 (1980) 171.
- [77] H. A. de Boer, L. J. Comstock, M. Vasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 21.
- [78] S. E. Luria, J. E. Darnell Jr., D. Baltimore, A. Campbell: *General Virology*, 3rd Ed., Wiley, New York 1978, S. 211.
- [79] H. Shimatake, M. Rosenberg, *Nature (London)* 292 (1981) 128; R. R. Reed, *Cell* 25 (1981) 713; C. M. Joyce, N. D. F. Grindley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1834.
- [80] H. U. Bernard, D. R. Helinski, *Methods Enzymol.* 68 (1979) 482.
- [81] A. Skottner, A. Forsman, K. Fhöhlenhag, A. Helleberg, E. Löfberg, L. Fryklund, B. Vangbo, B. Skoog in J. L. Gueriguian: *Insulins, Growth Hormones and Recombinant DNA Technology*, Raven Press, New York 1981, S. 109.
- [82] S. D. Frasier, T. Aceto Jr., A. B. Hayles, V. G. Mikity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 (1977) 22.
- [83] J. M. Tanner in J. L. Gueriguian: *Insulins, Growth Hormones and Recombinant DNA Technology*, Raven Press, New York 1981, S. 133.
- [84] D. Rudman in J. L. Gueriguian: *Insulins, Growth Hormones and Recombinant DNA Technology*, Raven Press, New York 1981, S. 161.

- [85] D. Rudman, M. H. Kutner, R. D. Blackston, R. A. Cushman, R. P. Bain, J. H. Patterson, *New Engl. J. Med.* 305 (1981) 163.
- [86] D. D. Moore, M. A. Conkling, H. M. Goodman, *Cell* 29 (1982) 285; D. D. Moore, M. D. Walker, D. J. Diamond, M. A. Conkling, H. M. Goodman, *Recent Prog. Horm. Res.* 38 (1982) 197.
- [87] F. M. De Noto, D. D. Moore, H. M. Goodman, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 3719.
- [88] V. J. Lewis, I. F. Bonewald, L. J. Lewis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 (1980) 511.
- [89] G. Blobel, B. Dobberstein, *J. Cell Biol.* 67 (1975) 835.
- [90] D. V. Goeddel, H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Mizzari, R. Crea, P. H. Seburg, *Nature (London)* 281 (1979) 544.
- [91] K. C. Olson, J. Fenno, N. Lin, R. N. Harkins, C. Snider, W. H. Kohr, M. J. Ross, D. Fodge, G. Prender, N. Stebbing, *Nature (London)* 293 (1981) 408.
- [92] R. Obermeier, R. Geiger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357 (1976) 759.
- [93] G. I. Bell, W. F. Swain, R. L. Pictet, B. Cordell, H. M. Goodman, W. J. Rutter, *Nature (London)* 282 (1979) 525.
- [94] G. I. Bell, R. L. Pictet, W. J. Rutter, B. Cordell, E. Tischer, H. M. Goodman, *Nature (London)* 284 (1980) 26.
- [95] A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. L. Pictet, E. Tischer, W. J. Rutter, H. M. Goodman, *Science* 196 (1977) 1313.
- [96] I. Sures, D. V. Goeddel, A. Gray, *Science* 208 (1980) 59.
- [97] T. G. Warren, D. Shields, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3729.
- [98] L.-P. Shen, R. L. Pictet, W. J. Rutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4575.
- [99] K. Docherty, R. J. Carroll, D. F. Steiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4613.
- [100] W. Kemmler, J. D. Peterson, D. F. Steiner, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 6786.
- [101] L. Villa-Komaroff, A. Efstratiadis, S. Broome, P. Lomedico, R. Tizard, S. P. Naber, W. L. Chick, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3727; K. Talmadge, J. Kaufman, W. Gilbert, *ibid.* 77 (1980) 3988; S. J. Chan, J. Weiss, M. Konrad, T. White, C. Bahl, S.-D. Yu, D. Marks, D. F. Steiner, *ibid.* 78 (1981) 5401; S. P. Naber, L. Villa-Komaroff, S. Broome, A. Rossini, V. Lauris, W. L. Chick, *Gene* 21 (1983) 95.
- [102] R. E. Chance, E. P. Kroeff, J. A. Hoffmann in J. L. Gueriguian: *Insulins, Growth Hormones and Recombinant DNA Technology*, Raven Press, New York 1981, S. 71.
- [103] G. E. Sonnenberg, M. Berger, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 108 (1983) 927.
- [104] P. Hudson, J. Haley, M. John, M. Cronk, R. Crawford, J. Haralambidis, G. Tregear, J. Shine, H. Niall, *Nature (London)* 301 (1983) 628.
- [105] H. Richards, A. Stewart, J. Warwick, S. Roberts, L. Bell, J. Smith, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 103 (1983) 252.
- [106] N. C. Vamvakopoulos, J. J. Monahan, I. A. Kourides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3149.
- [107] H. A. Barrera-Saldana, P. H. Seburg, G. F. Saunders, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3787.
- [108] A. Gray, T. J. Dull, A. Ullrich, *Nature (London)* 303 (1983) 722.
- [109] J. C. Fiddes, H. M. Goodman, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1981) 3.
- [110] G. N. Hendy, H. M. Kronenberg, J. T. Potts, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7365.
- [111] G. I. Bell, R. F. Santerre, G. T. Mullenbach, *Nature (London)* 302 (1983) 716.
- [112] E. Boel, J. Vuust, F. Norris, K. Norris, A. Wind, J. F. Rehfeld, K. A. Marcker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2866.
- [113] R. Wetzel, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel, P. Jhrani, J. Shapiro, R. Crea, T. L. K. Low, J. E. McClure, G. B. Thurman, A. L. Goldstein, *Biochemistry* 19 (1980) 6096.
- [114] N. G. Seidah, M. Chretien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4236; A. C. Y. Chang, M. Cochet, S. N. Cohen, *ibid.* 77 (1980) 4890; M. Cochet, A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, *Nature (London)* 297 (1982) 335.
- [115] S. G. Amara, V. Jonas, M. G. Rosenfeld, E. S. Ong, R. M. Evans, *Nature (London)* 298 (1982) 240.
- [116] K. Talmadge, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1830.
- [117] Y.-S. E. Cheng, D. Y. Kwoh, T. J. Kwoh, B. C. Soltvedt, D. Zipser, *Gene* 14 (1981) 121.
- [118] K. H. S. Swamy, A. L. Goldberg, *Nature (London)* 292 (1981) 652.
- [119] I. Palva, *Gene* 19 (1982) 81.
- [120] K. Hardy, S. Stahl, H. Kupper, *Nature (London)* 293 (1981) 481.
- [121] K. Mosbach, S. Birnbaum, K. Hardy, J. E. Davies, L. Bulow, *Nature (London)* 302 (1983) 543.
- [122] P. Newmark, *Nature (London)* 303 (1983) 655.
- [123] B. P. Kaine, R. Gupta, C. R. Woese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3309.

ZUSCHRIFTEN

Autoren, die einen Beitrag in der Rubrik „Zuschriften“ veröffentlichen wollen, werden gebeten, sich bei der Abfassung ihres Manuskriptes an die Richtlinien zu halten, die am Anfang eines jeden Heftes nach dem Inhaltsverzeichnis wiedergegeben sind.

1-Methoxy-3-phenyl-2-phosphaazulen – die erste Synthese von 2-Phosphaazulenen

Von Gottfried Märkl*, Ernst Seidl und Irene Trötsch

Vor kurzem beschrieben wir die Synthese von **1**, des ersten 1-Phosphaazulens, deren erste Stufe eine McCormack-Cycloaddition von Benzylchlorphosphoran an Vinylcycloheptatrien ist^[1b].

[*] Prof. Dr. G. Märkl, E. Seidl, I. Trötsch
Institut für Organische Chemie der Universität
Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg

Vom 1-Chlor-2-phenyl-2-trimethylsilyl-phosphaethen **2**^[1a] oder dem hieraus durch Eliminierung von Chlortrimethylsilan entstehenden 2-Phenyl-1-phosphaethin **3** – dessen Dienophilreaktivität wir kürzlich durch [4+2]-Cycloaddition mit α -Pyronen und Cyclopentadienonen zu λ^3 -Phosphorinen demonstrierten^[2] – nimmt die hier mitgeteilte Synthese des ersten 2-Phosphaazulens ihren Ausgang.

Nach Daub et al.^[3] reagiert das elektronenreiche 8-Methoxy-heptafulven **4** mit reaktiven Alkenen und Alkinen, z. B. 1,1-Dicyanethenen, Nitroethenen oder Acetylendicarbonsäurediethylester, regioselektiv zu 3,8a-Dihydroazulen-enen, die bei geeigneter Substitution mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ) unter Dehydrierung oder mit sauren Katalysatoren unter Eliminierung von Methanol in Azulene umgewandelt werden können.

Wir fanden nun, daß sich **2** (oder **3**, siehe Lit.^[2]) mit **4** in siedendem Xylool in Gegenwart von KF/[18]Krone-6 in 2 h in einer regioselektiven [8+2]-Cycloaddition zum 1-

