

Dr. Christian Schwarz

Medikamente aus der Zelle

Biotechnologische Alternative zur chemischen Synthese

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2013 mit einem 2. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2012 an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingereichten Dissertation »The Haemolysin A Type 1 Secretion System of Escherichia coli - Characterization and Biotechnological Application« von Dr. Christian Schwarz.

Medikamente aus der Zelle

Biotechnologische Alternative zur chemischen Synthese

Wettbewerbsbeitrag zur Teilnahme am Deutschen Studienpreis 2013

Dr. Christian Schwarz

Jahrelang haben Scharen von Molekularbiologen daran getüftelt, wie unzählige Kombinationen der vier Buchstaben A, T, C, G, – stellvertretend für Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin – das menschliche Erbgut bilden. Die Entschlüsselung des Genoms war eines der größten internationalen Forschungsprojekte überhaupt. Doch nach dem Abschluss des sogenannten *Humane Genome Project* im Jahr 2003 machte sich Ernüchterung breit. 20 000 bis 25 000 Gene besitzt der Mensch, jedes einzelne codiert von vielen Hunderten bis Tausenden Buchstaben. Komplett ausgeschrieben würde ein Text aus allen Gen-Buchstaben etwa 3000 Bücher füllen, jedes davon 1000 Seiten dick, die mit jeweils 1000 Zeichen beschrieben sind.

Das erhoffte Verständnis über die Vorgänge in unserem Körper konnte aus den Daten allerdings nicht abgeleitet werden. Denn einen Sinn erfährt dieser Text erst, wenn er in Proteine übersetzt wird, eben jenen Ketten aus Aminosäuren, deren Bauanleitung im Genom gespeichert ist. Während DNA lediglich wie eine Festplatte Informationen speichert, leisten Proteine die Arbeit im Organismus, ähnlich einem Prozessor im Computer. Als Hormone steuern sie Körperfunktionen, als Enzyme helfen sie dabei, Essen zu verdauen, oder als Antikörper töten sie Krankheitserreger. Strukturproteine bestimmen die Beschaffenheit von Gewebe, und im Blut transportieren Proteine Sauerstoff und andere lebenswichtige Substanzen. Kurz: Wenn das Genom der Bauplan des Lebens ist, dann sind Proteine dessen Bausteine.

Wirksame Helfer in der Medizin

Tausende von Medizinern, Chemikern, Biologen und anderen Naturwissenschaftlern forschen an diesen Bausteinen und vergrößern sukzessive das Verständnis des Lebens. Ihr Erfolg ist unbestritten. Zahlreiche

Medikamente wurden bereits entwickelt, die beim Kampf gegen Krankheiten wie Krebs, AIDS oder Diabetes helfen.

Lange Zeit waren die eingesetzten Wirkstoffe typischerweise chemische Moleküle, die auch heute noch bei der Medikation von Krankheiten überwiegen. Doch beim Blick auf die Beipackzettel wird deutlich, dass neben einem positiven Effekt oft zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen. Daher findet in vielen Bereichen ein Paradigmenwechsel statt: weg von chemischen hin zu biologischen Molekülen als Wirkstoffe.

Statt des Chemiebaukastens bedient man sich also der Bausteine der Natur. Diese biologischen Moleküle zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Aktivität aus, und da sie der Natur entstammen, sind sie häufig verträglicher und rufen keine oder weniger Nebenwirkungen hervor. Eine wichtige Klasse biologischer Moleküle sind Proteine, die als Medikamente bereits gegen viele Krankheiten verabreicht werden: zum Beispiel sogenannte Zytokine gegen Hepatitis oder Antikörper gegen einige Krebsarten. Obwohl die Herstellung von Proteinen mit großen Kosten verbunden sein kann, ist sie generell etabliert, und vielseitige Produktionsstrategien sind verfügbar. Die meisten basieren auf biotechnologischen Verfahren, bei denen Mikroorganismen das gewünschte Protein produzieren.

Eine weitere Klasse biologischer Moleküle mit zunehmender Relevanz sind Peptide. Eins der bekanntesten Peptide ist Insulin, ein körpereigenes Hormon, das den Blutzuckerspiegel reguliert und bei Patienten mit *Diabetes mellitus* als Medikament gespritzt wird. Andere Peptide wirken gegen Übergewicht (Exenatide), gegen Knochenschwund im Alter (Calcitonin), als Neurotransmitter im Nervensystem (humaner Corticotropin Releasing Factor, hCRF), als Konservierungsmittel (Nisin, auf Lebensmitteln gekennzeichnet als Zusatzstoff E234) oder als Blutverdünner (Bivalirudin). Außerdem gibt es inzwischen ein Peptid (Fuzeon[®]), das als vielversprechendes Medikament gegen HIV gilt.

Zusammengenommen sind Peptide eine Molekülklasse, der ein großes Potenzial und eine steigende Relevanz als Wirkstoff in Medikamenten zugesprochen wird. Dies wird durch überdurchschnittlich steigende Absatzzahlen im zweistelligen Prozentbereich in den vergangenen Jahren und einen Markt von weltweit mehr als elf Milliarden US-Dollar belegt.

Teure Synthese verhindert flächendeckenden Einsatz

Allerdings galt für Peptide bislang das Dogma, dass sie sich – anders als Proteine – nicht oder nur sehr schlecht durch biotechnologische Verfahren herstellen lassen. Mehr als 90 Prozent aller Peptide werden deshalb zurzeit chemisch synthetisiert. Dabei werden einzelne Aminosäuren in einem iterativen Prozess

Schritt für Schritt miteinander verbunden. Für die Entwicklung des Verfahrens erhielt Robert Bruce Merrifield 1984 den Nobelpreis für Chemie. Bis heute bieten sein Verfahren und davon abgeleitete Varianten die einzige Möglichkeit zur Produktion der meisten Peptide.

Der Erfolg der chemischen Synthese von Peptiden muss allerdings im wahrsten Sinne des Wortes erkaufte werden, denn diese Methode ist sehr teuer. So kostet ein Milligramm Peptid je nach Komplexität mehrere Hundert bis Tausend Euro. Verursacht werden die Kosten maßgeblich durch die benötigten Chemikalien – neben den zu verbindenden Aminosäuren diverse chemische Schutzgruppen, Basen, Säuren und organische Lösungsmittel – und durch die anschließende Aufreinigung der Syntheseprodukte.

Tatsächlich limitieren die hohen Kosten der chemischen Synthese häufig den Einsatz von Peptiden als Medikament. Die Therapie mit Fuzeon[®] beispielsweise kostet mehr als 2 200 Euro pro Monat und ist für viele Menschen unbezahlbar – gerade in den Ländern Afrikas und Asiens, die besonders von AIDS betroffen sind. Hinzu kommt: Merrifields Synthese und daraus abgeleitete Verfahren lassen sich nur schwer für große Produktionsmengen verwenden. Außerdem belasten sie die Umwelt. Um eine Tonne Fuzeon[®] herzustellen, würden 45 Tonnen Chemikalien als Rohstoffe benötigt.

Unerreicht – die Effizienz der Natur

Um die Kosten und die ökologische Belastung zu senken, werden alternative Produktionsmethoden für Peptide dringend benötigt. Obwohl zurzeit noch in der Anwendung limitiert, bietet die Biotechnologie prinzipiell die benötigten Werkzeuge. Dabei werden Wirtszellen, zum Beispiel das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), genetisch so modifiziert, dass sie während ihres Wachstums das gewünschte Peptid synthetisieren. Sobald es sich in ausreichender Konzentration gebildet hat, wird es den Zellen entnommen und anschließend von unerwünschten Verunreinigungen getrennt.

So weit die Theorie. Damit das Verfahren in der Praxis funktioniert, müssen zwei Grundbedingungen erfüllt sein: Erstens müssen die Wirtszellen das gewünschte Peptid produzieren, und zweitens muss das Peptid anschließend aus diesen Zellen isolierbar sein. Und während diese beiden Voraussetzungen bei der biotechnologischen Produktion von Proteinen häufig erfüllt werden, scheitert die Wissenschaft bislang bei der Herstellung von Peptiden.

Paradox – klein, aber sehr viel schwieriger herzustellen

Das scheint auf den ersten Blick unerwartet. Schließlich bestehen Peptide aus den gleichen Untereinheiten wie Proteine, den Aminosäuren. Der einzige Unterschied zwischen beiden Stoffklassen ist deren Grö-

ße: Proteine bestehen aus mehr als 100 bis mehreren Tausend verknüpften Aminosäuren, während Peptide per Definition aus 100 oder weniger dieser Bausteine aufgebaut sind.

Warum ist es also ungleich schwieriger, kleine Peptide biochemisch herzustellen, als große, komplexe Proteine? Die Antwort auf diese Frage ist in der Wirtszelle zu finden. Wegen der größeren Anzahl der Aminosäuren falten sich Proteine in eine spezifische dreidimensionale Struktur (Abb. 1). Diese Struktur charakterisiert jedes Protein und bestimmt dessen Funktion. Gleichzeitig ist sie ein Schutz, und gefaltete Proteine werden nicht durch die Recycling-Systeme lebender Zellen zerstört. Recycling-Systeme bestehen aus Proteasen, einer Gruppe von Enzymen, die speziell ungefaltete Proteine erkennen und diese wieder in einzelne Aminosäuren spalten (proteolytische Degradation). Mit diesem Mechanismus schützen sich lebende Zellen vor ungefalteten, funktionslosen Proteinen – ein Phänomen, das während der Synthese von Proteinen ungewollt häufig auftritt –, die häufig schädlich für sie sind.

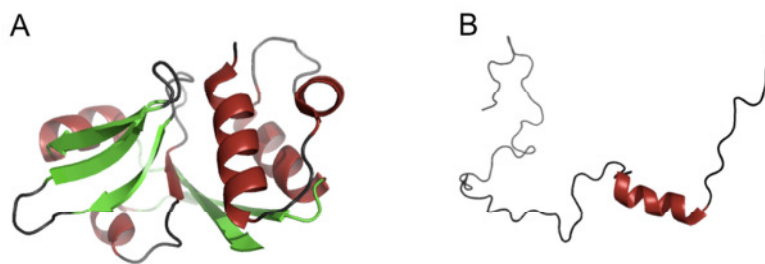


Abbildung 1: Vergleich der strukturellen Eigenschaften von Proteinen und Peptiden. A: Proteine sind biologische Moleküle, die aus mehr als 100 miteinander verknüpften Aminosäuren bestehen. Die spezifische Abfolge der Aminosäuren (Primärsequenz) bedingt die Ausbildung bestimmter Strukturelemente (Sekundärstruktur). Hervorzuheben sind hierbei vor allem Helices (rot) und Faltschichten (grün). Die dreidimensionale Anordnung der Sekundärstruktur wird Tertiärstruktur oder Faltung eines Proteins genannt und charakterisiert jedes Protein. Gezeigt ist eine Proteinstruktur, die im Rahmen meiner Promotion aufgeklärt wurde. Das Protein ist ein Teil eines Transportsystems aus Bakterien (PDB code 3ZUA), das unten stehend ausführlich erläutert wird. B: Peptide sind kleiner als Proteine (max. 100 Aminosäuren) und bilden deswegen wenige Sekundärstrukturen und häufig keine Tertiärstruktur aus. Wegen der fehlenden Faltung werden Peptide in Zellen von dem Recycling-System erkannt und proteolytisch degradiert. Peptide sind deswegen in biologischen Systemen instabil und können derzeit mit Hilfe von Mikroorganismen (also biotechnologisch) selten hergestellt werden. Gezeigt ist ein Peptid bestehend aus 84 Aminosäuren (PDB code 2FFT). Die Bilder wurden mit der Software PyMol (www.pymol.org) angefertigt.

Da Peptide permanent ungefaltet sind (Abb. 1), werden sie mit Hilfe der Recycling-Systeme in der Wirtszelle fälschlicherweise als Schädlinge erkannt und nach der Synthese postwendend wieder zerlegt. Peptide sind also in Mikroorganismen instabil. Sie können zwar teilweise synthetisiert, aber nicht intakt aus dem Produktionswirt isoliert werden.

Deshalb galt bislang das generelle Dogma: Peptide können nicht biotechnologisch hergestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Promotion ist es gelungen, dieses Dogma zu durchbrechen und eine universelle, biotechnologische Produktionsstrategie für Peptide zu entwickeln.

Der Trick mit dem Transporter

Üblicherweise werden die Wirtszellen nach einer gewissen Zeit, in der sie das gewünschte Produkt synthetisieren, zerstört. Aus der »Zellsuppe«, in der eine Vielzahl von zelleigenen, ungewollten Proteinen gelöst ist, wird das gewünschte Protein beziehungsweise Peptid – so es noch nicht von Proteasen zerlegt ist – anschließend isoliert. Um das gewünschte Peptid vor Proteasen zu schützen, bedient sich die neue Produktionsstrategie eines Tricks: Die Wirtszelle bleibt intakt. Um dennoch an das Peptid zu gelangen, wird ein spezielles Transportsystem in der Zellhülle des Bakteriums *E. coli* genutzt, das die Peptide aus der Zelle transportiert.

Das verwendete Transportsystem heißt Typ 1 Sekretionssystem (T1SS) und besteht aus drei verschiedenen Proteinen namens Haemolysin B (HlyB), Haemolysin D (HlyD) und TolC (Abb. 2). Diese schleusen im Normalfall ein viertes Protein, das Transportsubstrat Haemolysin A (HlyA), nach außen. *In natura* kommt dieses System ausschließlich in pathogenen Stämmen von *E. coli* vor und dient der Nährstoffgewinnung. HlyA ist ein Toxin, das eine Pore in der Zellmembran der Wirtszellen bildet und diese dadurch zerstört. Die frei werdenden Nährstoffe nutzt das Bakterium zum Wachstum.

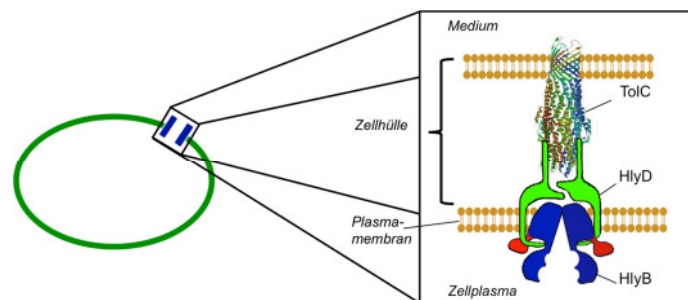


Abbildung 2: Lokalisation des T1SS in der Zellhülle von *E. coli*. Links: In der Zellhülle von *E. coli* (grün) befindet sich der Transportkomplex (blau). Rechts: Schematische Vergrößerung des Transportkomplexes in der Zellhülle. Dieser überbrückt sowohl die Plasmamembran als auch die Zellhülle und ermöglicht den Transport von Substraten aus der Zelle in das umgebende Medium. Braun: Membranen aus Fetten, die die Zelle nach außen hin abschließen, HlyB: Haemolysin B, HlyD: Haemolysin D, TolC: Eigenname.

Während dieser Promotion wurde das HlyA T1SS genauer charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass HlyA in einem ungefalteten Zustand – untypisch für Proteine, eher peptidgleich – aus den Zellen transportiert wird. Anschaulich betrachtet, passt schlichtweg nur ungefaltetes HlyA durch den Transportkomplex. Wie anschließend gezeigt wurde, gilt diese Limitierung für alle zu transportierenden Proteine. Nur ungefaltet können sie vom T1SS transportiert werden. Eine Tatsache, die eine biotechnologische Anwendung für die Produktion von gefalteten Proteinen stark einschränkt – für Peptide, die sich grundsätzlich nicht falten, hingegen große Chancen eröffnet.

Denn um dem Recycling-System der Zelle zu entgehen, muss auch das ungefaltete HlyA vor dem Transport geschützt werden. Der zugrunde liegende Schutzmechanismus konnte während dieser Promotion aufgeklärt werden. Ein Fragment von HlyB (Abb. 2B, rot hervorgehoben, und eben jenes in Abb. 1A gezeigte Protein) schirmt ungefaltetes HlyA vor dem Transport ab und schützt es vor proteolytischer Degradation.

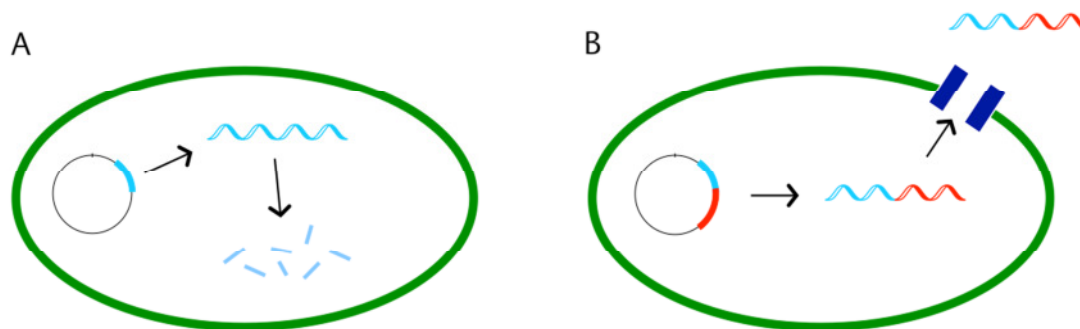


Abbildung 3: Der Trick mit dem Transporter. Wie Peptide ihrer Zerstörung entgehen. A: Das Gen für ein Peptid (hellblau) wird in ein Plasmid (Kreis) inseriert. Die Synthesemaschinerie der Bakterien produziert das Peptid. Weil Peptide ungefaltet sind, werden sie postwendend von dem Recycling-System der Zelle zerlegt. B: Zusätzlich zu dem Peptid codiert das Plasmid ein Transportsignal (rot), das mit dem Peptid fusioniert wird. Das Fusionskonstrukt wird synthetisiert, währenddessen von dem Transportkomplex (dunkelblau) geschützt und anschließend von diesem aus der Zelle transportiert.

Damit erfüllt das HlyA T1SS zwei wichtige Voraussetzungen für die biotechnologische Synthese von Peptiden: Es beschützt ungefaltete Aminosäure-Polymere innerhalb der Zellen vor dem Recycling-System und katalysiert anschließend deren Transport aus den Zellen, sodass sie isoliert werden können. Als Produktionsstrategie wurde nun folgender Plan gefasst: Ein beliebiges Peptid wird an HlyA gekoppelt (fusioniert) und von *E. coli*-Stämmen produziert. Zeitgleich sollen die Zellen den Transportkomplex herstellen, der das Fusionspeptid zunächst beschützt und anschließend aus den Zellen transportiert (Abb. 3).

Der Natur ein Schnippchen schlagen

Die Verwendung pathogener Bakterien, die das HlyA T1SS besitzen, erhöht nicht nur das Risiko für den Experimentator, es vergrößert zudem den experimentellen Aufwand und erhöht die Produktionskosten für Peptide. Außerdem transportieren pathogene *E. coli*-Stämme (un)glücklicherweise nur Spuren von HlyA. Während diese Mengen ausreichen, um *in natura* die gewünschte Wirkung zu erzielen und Nährstoffe für das Wachstum bereitzustellen, sind sie nicht ausreichend für eine potenzielle industrielle Nutzung des Systems. Die Überführung des Transportsystems in einen nicht pathogenen, potenten Produktionswirt war somit der erste notwendige Arbeitsschritt.

Die molekularbiologischen Methoden, um das Erbgut von Bakterien entsprechend zu manipulieren, sind gut etabliert. So ist es ohne größere Probleme möglich, Plasmide mit der genetischen Information für den Transportkomplex zu generieren. Ein Plasmid ist eine zirkuläre DNA, die alle essenziellen Informatio-

nen für das Ablesen eines Gens (Expression) beinhaltet und in vielfachen Kopien in einer Zelle vorkommt. Genauso konnte die Information für HlyA mit der eines beliebigen Peptids verbunden und in ein Plasmid inseriert werden. Ein entsprechend manipuliertes *E. coli*-Bakterium synthetisiert anschließend also weder HlyA noch das Ziel-Peptid alleine, sondern ein Fusionskonstrukt, bestehend aus HlyA und dem Peptid (Abb. 4), und das in großen Mengen.



Abbildung 4: Schema der Fusionspeptide. Ein Peptid (hellblau) wird mit dem Transportsignal (rot) fusioniert. Die genetischen Informationen für das Fusionskonstrukt befinden sich auf einem geeigneten Plasmid (Abb. 3).

Der Teufel steckt im Detail

Was sich als Idee so einfach anhört, erwies sich in der Praxis als problematisch. Zwar konnten Plasmide generiert werden, das realisierte Transportsystem war jedoch äußerst ineffektiv, und lediglich einige Hundert Mikrogramm (1 Mikrogramm = 1 millionstel Gramm) von HlyA wurden pro Liter Zellkultur transportiert. Mit Fusionskonstrukten nahmen die Effizienzen noch weiter ab. Hierbei muss beachtet werden, dass der Anteil des zu produzierenden Peptids am Fusionskonstrukt relativ gering ist, denn das Sekretionssignal besteht aus mehr als 200 Aminosäuren. Würde ein Peptid aus 50 Aminosäuren bestehen, das gesamte Fusionskonstrukt also aus 250 Aminosäuren, und würde ein Milligramm des Fusionskonstrukts transportiert, machte das Peptid lediglich 20 Prozent und somit 200 Mikrogramm aus.

Insgesamt war also das plasmidcodierte Transportsystem in nicht pathogenen Bakterien ebenfalls ineffektiv und dessen Anwendbarkeit sehr limitiert. Nach den erzielten Ergebnissen war jedoch schnell klar, an welcher Schraube gedreht werden musste, um die Ausbeuten zu erhöhen. Denn obwohl geringe Mengen von HlyA transportiert wurden, konnte trotz sehr empfindlichen Messmethoden kein Transportkomplex nachgewiesen werden. Offensichtlich lag dieser nur in nicht nachweisbaren Spuren in *E. coli* vor.

Ein bekanntes Problem

Dass der Transportkomplex nur in geringen Mengen von *E. coli* produziert wird, war bekannt. Die Literatur bot mehrere Erklärungsversuche, woran dieser Defekt liegen könnte, die von selbstinhibierenden Strukturen der Gene *hlyB* und *hlyD* bis hin zu einer instabilen mRNA (einem essenziellen Intermediat auf dem Weg vom Gen zum Protein) reichten. Das zeigte: Auch andere kämpften bereits mit diesem Problem und traten auf der Stelle. Nur leider brachte diese Erkenntnis das Projekt »Etablierung eines biotechnologischen Systems für die Herstellung von Peptiden« nicht voran.

Die neue Strategie folgte deshalb dem Motto »Viel hilft viel« und hatte die Konstruktion vieler, leicht abgeänderter Plasmide zum Ergebnis. Sie unterschieden sich in der »copy number« (Anzahl eines Plasmids pro Zelle), in der Organisation und Regulation der Genexpression und der spezifischen Gene für *hlyB* und *hlyD*. Mehr als 40 Plasmide wurden generiert und in verschiedenen *E. coli*-Stämmen analysiert. Eine Fleißarbeit, die sich lohnte. Denn erstmalig gelang es, *E. coli* mit größeren und nachweisbaren Mengen des Transportkomplexes, 1 bis 2 Milligramm der beteiligten Proteine in einem Liter Bakterienkultur, auszustatten.

Ein Meilenstein! Die bestehenden Probleme schienen gelöst und die biotechnologische Produktion von Peptiden möglich. Doch leider blieb auch hier das erhoffte Ergebnis aus. Im Kulturüberstand konnten noch immer nur geringe Spuren der Fusionspeptide nachgewiesen werden.

Wie konnte das sein? Es musste doch gelingen, dass 1 bis 2 Milligramm des Transportkomplexes ein Vielfaches der Fusionspeptide transportieren; immerhin handelt es sich bei dem Transportkomplex um einen Biokatalysator. Und das Fusionspeptid wurde in ausreichenden Mengen in den Zellen hergestellt. Da der Transportprozess jedoch nur ungenügend funktionierte, schien das Zusammenspiel beider Komponenten – Transporter und Transportsubstrat – in irgendeiner Art und Weise gestört zu sein.

Also doch die Gene

In der Natur befinden sich die Informationen des HlyA-Transportsystems auf dem Genom pathogener *E. coli*-Stämme. Dort liegen sie als Operon organisiert vor. Ein Operon ist eine Struktur, die mehrere Gene bündelt, die alle an einem oder wenigen verwandten Prozessen beteiligt sind. Dies erleichtert die Regulation und das Zusammenspiel der beteiligten Gene. Verändern sich beispielsweise die Umweltbedingungen eines Bakteriums – muss anstelle von Glucose etwa der alternative Zucker Lactose als Energiequelle genutzt werden –, reicht es aus, das Lactose-Operon anzuschalten, und schon werden alle benötigten Enzyme synthetisiert. Das Operon des HlyA T1SS besteht aus den vier Genen *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD* (Abb. 5), und bis auf *hlyC* wurden bereits alle Gene angesprochen. Vor *hlyA* befindet sich also das Gen *hlyC*.



Abbildung 5: HlyA-Operon aus pathogenen *E. coli*. Die vier Gene *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD* bilden das HlyA-Operon. HlyA codiert für das transportierte Substrat HlyA, die Genprodukte von *hlyB* und *hlyD* bilden den Transportkomplex. Die dritte Komponente des Transportkomplexes, TolC, befindet sich nicht auf dem HlyA-Operon, sondern auf einem anderen Bereich des Genoms. Das Gen *hlyC* befindet sich vor *hlyA*, und das Genprodukt HlyC ist für die Umwandlung der nicht toxischen Form von HlyA in die toxische Variante verantwortlich. Für den Transportprozess ist das Protein HlyC irrelevant. Das restliche Genom des Bakteriums wird durch die Punkte angedeutet.

Dieses Gen ist für die Herstellung des Proteins Haemolysin C (HlyC) verantwortlich, das wiederum dafür sorgt, eine harmlose Variante von HlyA vor dem Transport in die toxische Variante zu überführen. Diese durch HlyC katalysierte Modifizierung von HlyA ist für den Transportprozess irrelevant, und sowohl modifiziertes, toxisches HlyA als auch nicht modifiziertes, nicht toxisches HlyA werden gleichermaßen transportiert. Insofern wurde *hlyC* bei der Etablierung des Transportsystems in nicht pathogenen Stämmen von *E. coli* bislang nicht weiter beachtet.

Der neue Lösungsansatz bestand nun darin, die Natur zu imitieren und die operonische Struktur auf den verwendeten Plasmiden nachzubilden. Dazu wurde *hlyC* vor das Gen für das Fusionspeptid inseriert. Dabei ist wichtig zu unterscheiden: *hlyC* befindet sich schlichtweg vor dem Gen für das Fusionspeptid, und es wird kein Fusionsprotein mit HlyC gebildet (Abb. 6).



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Lösungsansatzes zur Imitation des HlyA-Operons. Obwohl nicht für den Transportprozess wichtig, wird das Gen von HlyC vor die genetische Information des Fusionspeptids platziert.

Mit den Plasmiden wurden Transportanalysen durchgeführt – und tatsächlich: Die transportierte Menge des Fusionspeptids im Kulturüberstand konnte signifikant erhöht werden, und zwischen 50 und 100 Milligramm der Substrate pro Liter Zellkultur wurden aus den Zellen transportiert.

Etabliert und patentiert

Weitere Analysen zeigten, dass nicht das Protein HlyC die Transporteffizienzen erhöhte; vielmehr ist es ein Teilstück des Gens *hlyC*. Dazu wurde *hlyC* sukzessive von vorne (dem 5' Ende) verkürzt. Das Protein HlyC wurde nicht mehr gebildet, da das Start-Codon – ein kurzer DNA-Abschnitt, der für den Beginn der Synthese von HlyA essenziell ist – entfernt wurde. Die Transporteffizienz nahm dennoch weiter zu, und mit verkürzten Varianten von *hlyC* wird inzwischen bis zu 1 Gramm Transportsubstrat aus den Bakterien transportiert. Insgesamt konnten die Transporteffizienzen mehr als 1000-fach verbessert werden, und der Transport vieler Fusionsproteine gelang überhaupt erstmalig.

Endlich: Das Transportsystem funktioniert! Welche Rolle das Teilstück von *hlyC* genau spielt, wird derzeit in weiteren Experimenten untersucht. Bis dato bleibt festzuhalten: Das entwickelte HlyA T1SS stellt das erste, universelle Verfahren für die biotechnologische Produktion von Peptiden dar. Es konnten bereits diverse Peptide aus den Wirtszellen transportiert werden, darunter solche mit höchster medizinischer und wirtschaftlicher Relevanz wie Fuzeon[®], Calcitonin, Exenatide, Nisin oder hCRF. Zusätzlich gelingt mit dem HlyA T1SS der Transport von Proteinen, die derzeit nicht oder nur sehr aufwendig und somit kosten-

intensiv produziert werden können. Der tatsächliche Nutzen konnte im Rahmen mehrerer akademischer Kooperationen demonstriert werden.

Die Effektivität und Effizienz resultieren aus den beiden maßgeblichen Meilensteinen: der verbesserten Synthese des HlyA-Transportkomplexes in *E. coli* sowie der Insertion eines Teilstückes von *hlyC* vor das Gen des Fusionspeptids. Das beschriebene System wurde am 21.10.2011 beim europäischen Patentamt als Patentanmeldung eingereicht. Die Anmeldung ist ab dem 22.04.2013 unter dem Namen »*Agents and Methods for the Expression and Secretion of Peptides and Proteins*« öffentlich einsehbar (EP11186225.6).

Zukunftsmusik

Während das HlyA T1SS erfolgreich in Forschung und Entwicklung angewendet werden kann, muss das Produktionssystem im nächsten Schritt auf Herz und Nieren für eine industrielle Anwendung geprüft werden. Ist die Produktion von Peptiden verglichen mit chemischen Verfahren günstiger? Weisen die Peptide die gewünschte biologische Aktivität auf? Entspricht die Qualität der Peptide den erforderlichen Standards? Lassen sich verbesserte biotechnologische Produktionsstrategien ableiten?

Bislang lautet die Antwort auf alle Fragen »Ja«, allerdings nur anhand ausgewählter Beispiele. Zum Beispiel zeigen erste Versuche mit dem Peptid hRCF, dass die Materialkosten für die Herstellung 1 Milligramms bei circa 35 Euro liegen. Kommerzielle Anbieter vertreiben hRCF für 804 Euro, und das für ein halbes Milligramm. Obwohl noch keine Skaleneffekte, Personalkosten etc. berücksichtigt wurden, scheinen allein unsere Materialkosten bereits konkurrenzfähig.

Darüber hinaus gelang, motiviert von der erfolgreichen Produktion mit dem HlyA T1SS, bereits die Etablierung einer zweiten, völlig differenten Produktionsstrategie für Peptide. Auch dieses zweite Verfahren befindet sich derzeit in der Patentierungsphase, allerdings in einem sehr viel früheren Stadium als das HlyA-Transportsystem, weshalb noch keine Details genannt werden können. Nur so viel: Es ist eine Weiterentwicklung, die noch einmal höhere Ausbeuten und eine erhöhte Produktqualität gegenüber der Herstellung mit dem HlyA T1SS bietet (Tab. 1).

Tabelle 1: Vergleich zwischen chemischer Peptidsynthese und den entwickelten, biotechnologischen Produktionsmethoden. Produktionsverfahren für relativ kleine Peptide (bis 30 Aminosäuren) und relativ große Peptide (bis 100 Aminosäuren) werden bezüglich der aufgeführten Punkte miteinander verglichen.

Verfahren	Peptide bis 30 Aminosäuren			Peptide bis 100 Aminosäuren		
	Kosten	Ausbeute	Umwelt- verträglichkeit	Kosten	Ausbeute	Umwelt- verträglichkeit
Chemische Synthese	☐	☐	☐	☐	☐	☐
HlyA T1SS	☐	☐	☐	☐	☐	☐
2. Produktionsstrategie	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Unabhängig vom Ausgang des Patentierungsverfahrens wird auch diese zweite Technologie eines Tages veröffentlicht werden. Denn in Zeiten des rasanten Bevölkerungswachstums, alternder Gesellschaften, steigender Kosten im Gesundheitssystem sowie anhaltender medizinischer Versorgungslücken in Schwellen- und Entwicklungsländern müssen Alternativen zu chemischen Verfahren entwickelt werden, die effektiver, effizienter und sicher funktionieren. Dann haben sie eine Chance, sich zu etablieren, die Umwelt zu entlasten und Patienten mit verträglichen Medikamenten aus der Zelle zu versorgen.