

Abb. 3.27 Das erste Gentechnikexperiment von Cohen und Boyer

3.11 Molekulare Scheren und Kleber: Restriktionsendonucleasen und DNA-Ligasen

In den 60er-Jahren hatten **Werner Arber** (geb. 1929) (Abb. 3.28) in Genf und der Amerikaner **Hamilton D. Smith** (geb. 1931, beide bekamen 1978 den Nobelpreis mit Daniel Nathans, 1928-1999) einen Schutzmechanismus der Bakterien gegen die tödliche Bedrohung durch Bakterienviren (**Bakteriophagen**) entdeckt. Bakteriophagen injizieren ihre DNA in die Bakterienzellen. Die Bakterien zerschneiden die fremde Virus-DNA mit Enzymen, so genannten **Restriktionsendonucleasen** (kurz: **Restrictasen**), und machen sie damit unschädlich. Die bakterieneigene DNA war dagegen durch zusätzliche Methyl-(CH₃-)Gruppen geschützt, welche die Restrictasen blockieren.

1970 fand man heraus, dass Restriktionsendonucleasen die DNA nicht beliebig, sondern nur an ganz bestimmten Basenpaaren exakt zerschneiden. **Herbert W. Boyer** (geb. 1936, Abb. 3.24) untersuchte an der Universität von Kalifornien in San Francisco die Restriktionsendonuclease *EcoRI* (benannt nach dem *Escherichia coli*-Stamm RY 13). Sie zerschneidet DNA nur dort, wo die Basenkombination „GAATTC“ auftritt und zwar zwi-

schen den Basen G und A. An dem gegenüberliegenden komplementären „Schwester“-DNA-Strang mit der Basenfolge „CTTAAG“ spaltet *EcoRI* ebenfalls zwischen den Basen A und G:



So entsteht kein „glatter Schnitt“, sondern es bilden sich zwei Bruchstücke mit überstehenden Enden:



Doch die zerschnittene DNA zerfällt bei niedriger Temperatur nicht in zwei Teile, ihre überstehenden Enden kleben lose aneinander. Janet Mertz aus Paul Bergs (Abb. 3.47) Labor an der Stanford Universität fand heraus, dass sich die A- und T- sowie C- und G-Basen, diese „**sticky ends**“ (**klebrige Enden**), elektrostatisch anziehen. Man kann sie sogar wieder durch ein Enzym, die ATP verbrauchende **DNA-Ligase**, zusammenfügen.

Voneinander unabhängig suchende Forscher hatten „Scheren“ und „Kleber“ für die DNA gefunden, nun mussten die Ergebnisse ihrer Anstrengungen vereint werden.

Heute sind über 1 200 Restriktionsendonucleasen bekannt, die drei verschiedene Klassen bilden. Nur einige von ihnen sind allerdings interessant für die Gentechnik. Es gibt übrigens auch Restriktionsendonucleasen mit glattem Schnitt und glatten Enden (*blunt ends*), z. B. *PvuII* aus *Proteus vulgaris* und *AluI* aus *Arthrobacter luteus*.

Verschiedene Enzym-Scheren erzeugen gleiche Enden: Die Restriktionsendonucleasen *BamHI* (Erkennungssequenz GGATCC) aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *BglII* (Erkennungssequenz AGATCT) aus *Bacillus globigii* lassen beide klebrige Enden mit der gleichen Sequenz GATC entstehen. Die Genfragmente, die von einem dieser Enzyme produziert wurden, lassen sich also mit denen des anderen verbinden.

3.12 Die ersten Gentechnikexperimente: Quakende Bakterien?

Anfang 1973, knapp ein Jahr, nachdem die Werkzeuge verfügbar waren, führten Stanley N. Cohen und seine Mitarbeiterin Annie C. Y. Chang von der Universität Stanford mit ihren Kollegen der benachbarten Universität von San Francisco, Herbert W. Boyer (Abb. 3.24) und Robert H. Helling, das erste Experiment der neuen **Gentechnologie** aus. Die Forscher wählten das nach den Initialen von Stanley Cohen benannte kleine nichttransferable **Plas-**



Abb. 3.28 Werner Arber (geb. 1929)



Abb. 3.29 Das Plasmid pSC101, von Stanley Cohen auch *plasmid necklace* (Plasmid-Halskette) genannt

mid pSC 101 (Abb. 3.29), das in hoher Zahl in der Zelle vorliegt. Es trägt ein Gen, das tc-Gen, das *E. coli* resistent gegen das Antibiotikum **Tetracyclin** macht. Das Plasmid pSC 101 wurde ausgewählt, weil es nur eine einzige Basenanordnung enthält, die von der Restriktionsendonuclease *EcoRI* zwischen G und A in der Sequenz -GAATTC- gespalten wird. Wenn es mehrere Schnittstellen gegeben hätte, würde das ringförmige Plasmid nicht einfach aufgeschnitten, sondern in viele Stücke geteilt werden.

Die Fähigkeit zur Antibiotikaresistenz durfte durch das Aufschneiden keinesfalls verloren gehen. Man wollte ja später herausfinden, in welche Bakterienzellen das fremde Gen erfolgreich eingeschleust worden war. *EcoRI* stammt – wie der Name sagt – aus *Escherichia coli*. Durch *EcoRI* wird die ringförmige Plasmid-DNA in fadenförmige lineare DNA mit klebrigen Enden verwandelt. Cohen und Boyer zerschnitten mit *EcoRI* auch ein anderes Plasmid aus *E. coli* (pSC 102), das ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum **Kanamycin (Ka-Gen)** enthält (Abb. 3.27). Auch dieses Plasmid hatte nur eine Schnittstelle und das Ka-Gen wurde von *EcoRI* nicht zerschnitten.

Die zwei zerschnittenen Plasmide besaßen die gleichen klebrigen Enden, da sie an der gleichen Stelle -G/AATTC- zerschnitten worden waren. Durch die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den Bruchstellen lagerten sich die zwei unterschiedlichen DNA-Bruchstücke lose zusammen. Die Wissenschaftler fügten nun den Kleber, **DNA-Ligase** (Abb. 3.33), dem Gemisch hinzu und verbanden damit die zwei Klebestellen. Es entstanden neue größere **rekombinante Plasmide**.

Im letzten Schritt, der **Transformation**, wurde diese **rekombinante DNA** in Bakterien überführt. Dazu wurde der Lösung mit den zu manipulierenden *E. coli*-Bakterien Calciumchlorid (CaCl_2) zugesetzt. Dieses Salz macht die Zellwände für DNA durchlässig (Abb. 3.30). Mit diesem künstlichen Vorgang, der in der Natur so nicht vorkommt, konnten die neuen Plasmide in die Bakterien eingeschleust werden (siehe auch Abb. 3.23). Am Schluss folgte der entscheidende Test: Die Bakterienlösung wurde auf Nährplatten ausgestrichen, die sowohl Tetracyclin als auch Kanamycin enthielten.

Die meisten Bakterien gingen – wie erwartet – ein. Nur wenige Bakterien überlebten. Sie mussten das künstlich geschaffene Plasmid mit der **Doppelresistenz** besitzen: Hier wurden Kanamycin und Tetracyclin desaktivierende Enzyme von den Bakterien gebildet. Die überlebenden Bakterien vermehrten sich und wuchsen zu Zellkolonien heran;

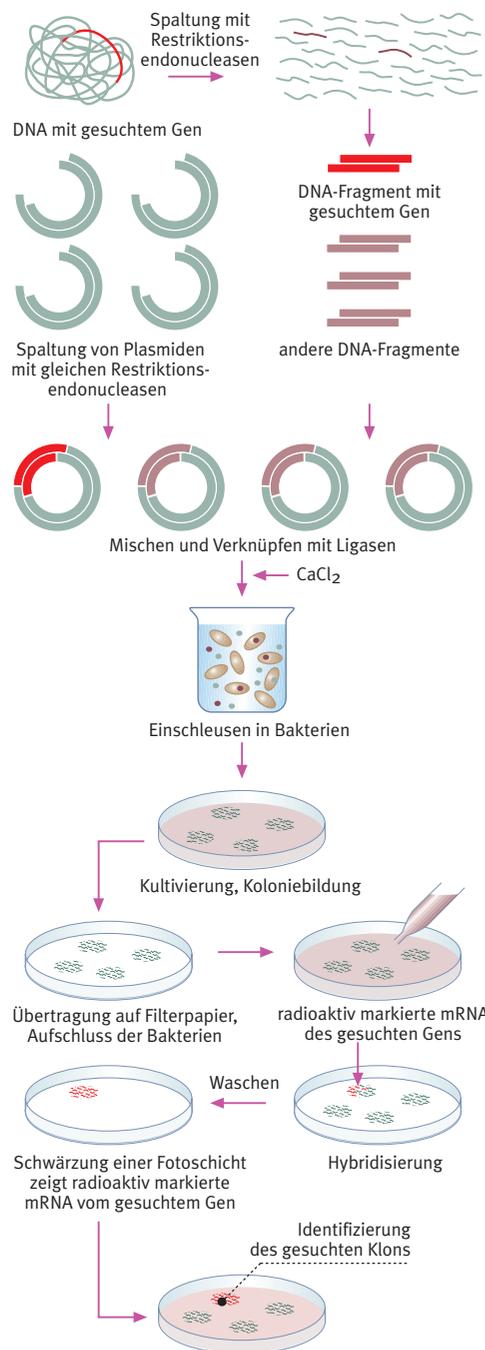


Abb. 3.30 Prinzip der Klonierung eines Gens aus Säugerzellen

etwa 100 Millionen identisch gebauter Nachkommen, die alle die neue rekombinante DNA trugen. Ein **Klon** war entstanden, eine Gruppe genetisch identischer Lebewesen.

Nach diesem Erfolg wagten sich Cohen und seine Mitarbeiter an das nächste Experiment. Sie rekombinierten DNA-Segmente von Plasmiden aus verschiedenen Bakterien, aus *E. coli* das Plasmid pSC 101 und ein Plasmid aus dem penicillinresistenten *Staphylococcus aureus*. Da das Plasmid von *St. aureus* vier Schnittstellen für *EcoRI* enthielt, wurde

Was kann man aus Genen herauslesen?

»Gene sind nicht mit Blaupausen für Ingenieure zu vergleichen, eher mit Rezepten in einem Kochbuch. Sie sagen uns, was für Zutaten reinkommen, in welchen Mengen und welcher Reihenfolge – doch sie liefern uns keinen vollständigen und genauen Plan dessen, was dabei herauskommt.«

Ian Stewart, *Life's Other Secret*, New York 1998

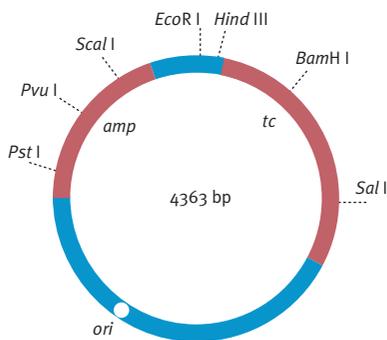
Box 3.2 Nützliche Vektoren, Transportmittel für Gene

Das Plasmid pBR322

Das bei Gentechnikern sehr beliebte Plasmid pBR322 aus *E. coli* wurde Ende der 70er-Jahre entwickelt. p bedeutet Plasmid, BR bezeichnet die beteiligten Wissenschaftler Bolivar und Rodriguez. Die Zahl 322 unterscheidet das Plasmid von anderen Plasmiden aus dem gleichen Labor wie pBR325, pBR327 usw.

pBR322 enthält Gene für die Antibiotikaresistenz-Enzyme gegen Tetracyclin und Ampicillin. Verschiedene Restriktionsendonucleasen können das Plasmid an spezifischen Schnittstellen aufschneiden. Anschließend lassen sich dort ebenso geschnittene DNA-Fragmente einfügen. Wenn *Eco* RI benutzt wird, wird keines der Antibiotikaresistenzgene zerschnitten, wohl aber, wenn z. B. mit *Bam* HI geschnitten wird. Dann ist das Tetracyclinresistenzgen zerschnitten, und es wird ein Fremdgen mitten in das *tc*-Gen eingebaut (Insertion).

Die Zellen sind dann resistent gegen Ampicillin, aber nicht gegen Tetracyclin und können so leicht selektiert werden.



Die genetische und physikalische Karte von pBR322 zeigt die Positionen der zwei Resistenzgene für Ampicillin (*amp*) und Tetracyclin (*tc*), den Startpunkt der Replikation (*ori*) und Schnittstellen wichtiger Restriktionsendonucleasen.

Zellen, die den Vektor nicht aufgenommen haben, sind gegen beide Antibiotika empfindlich. Zellen, die pBR322 ohne Insertion enthalten, sind gegen beide Antibiotika resistent.

Der λ-Phage

Der λ-Phage (Phage Lambda) liebt Abwechslung: Er kann seinen Wirt zerstören oder

vorübergehend ein Teil von ihm werden. Im ersten Fall werden bei der Lyse virale Proteine und DNA schnell erzeugt und zu Viruspartikeln verpackt, was zur Zerstörung der Wirtszelle führt (**lytischer Zyklus**). Im zweiten Fall, dem **lysogenen Zyklus**, fügt sich die Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle ein. Sie wird mit deren DNA eventuell über Generationen hinweg repliziert, ohne dem Wirt zu schaden.

Durch bestimmte Umweltänderungen kann die ruhende Virus-DNA plötzlich aktiviert werden. Sie wird aus dem Genom herausgeschnitten und initiiert den lytischen Zyklus. Der Phage λ hat 48 kb DNA, und große Teile sind für eine erfolgreiche Infektion nicht notwendig. Gene für den lysogenen Zyklus können also durch fremde DNA ersetzt werden, ideal für einen Vektor.

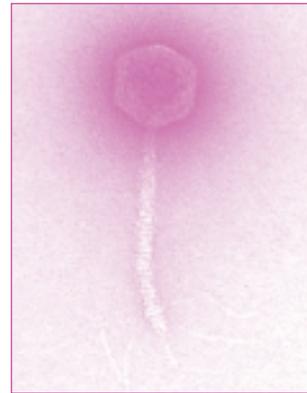
Für die Klonierung von DNA wurden gezielt **Phagen-Mutanten** entwickelt. Deren DNA kann nur an zwei Stellen (anstelle von fünf) durch *Eco*RI geschnitten werden. Dabei entstehen drei Schnittprodukte, von denen das mittlere entfernt wird.

An seine Stelle wird ein passendes langes DNA-Stück (etwa zehn kb) mit Ligasen eingefügt. Der Phage ist dadurch noch immer infektiös, kann aber nur den lytischen und nicht den lysogenen Zyklus durchlaufen (also nicht „schlafend abwarten“). Das sind alles sehr wünschenswerte Eigenschaften für einen Klonierungsvektor. Der Vorteil vom Phagen λ ist, dass die manipulierten Viren leichter als Plasmide in Bakterienzellen eindringen und größere DNA-Abschnitte einführen können.

Man hat auch spezielle **Cosmide** konstruiert. Sie sind Hybride aus λ-Phagen und Plasmiden. Der Name Cosmid leitet sich von DNA-Sequenzen ab, die als *cos* bezeichnet werden und von dem Bakteriophagen λ stammen.

Diese Abschnitte machen es möglich, dass in Cosmide größere Gene (bis zu 45 kb) eingebaut werden können. Solche Cosmide werden in Phagen verpackt, mit deren Hilfe sich letztlich die fremden Gene in Bakterien einschleusen lassen.

Enthalten die Cosmide das Gen für die Ampicillinresistenz, werden die Bakterien in die Lage versetzt, in einer Kulturlösung trotz Zugabe des Antibiotikums Ampicillin zu überleben und sich und die Fremd-DNA zu vermehren.

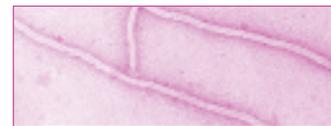


Der λ-Phage

Der M13-Phage

M13 ist ein filamentöser Phage. Er sieht völlig anders aus als der Phage λ. Es handelt sich um ein fadenförmiges Virus (900 nm lang, mit nur neun nm Durchmesser) mit einer ringförmigen einzelsträngigen DNA (auch +-Strang genannt) und einer Proteinhülle aus 2710 identischen Proteinuntereinheiten (siehe Kap. 5).

Das Virus dringt in *E. coli* interessanterweise über deren „Sexualorgan“ ein, den Sexpilus, der den Austausch von DNA zwischen Bakterien ermöglicht. M13 ist so attraktiv, weil man mit ihm die klonierte DNA in einzelsträngiger Form gewinnen kann. Einzelstränge von klonierten Genen braucht man besonders für die DNA-Sequenzierung und die *in vitro*-Mutagenese (Kap. 10).



Der Phage M13 ist ein filamentöses Virus, das heißt langgestreckt

M13 ist der Akteur bei der **Phagen-Display-Technik** (Kapitel 5). Die M13-DNA wird nicht (wie beim Phagen λ) in das Bakteriengenom integriert. Es kommt auch nicht zur Lyse der Zellen. Das Bakterium wächst und teilt sich, allerdings langsamer als nichtinfizierte Zellen. Die Tochterzellen setzen weiterhin M13 Phagen frei.

Pro Generation entstehen etwa tausend neue M13-Phagen. Da M13 den Wirt nicht tötet, kann man ihn in großen Mengen züchten und leicht ernten.

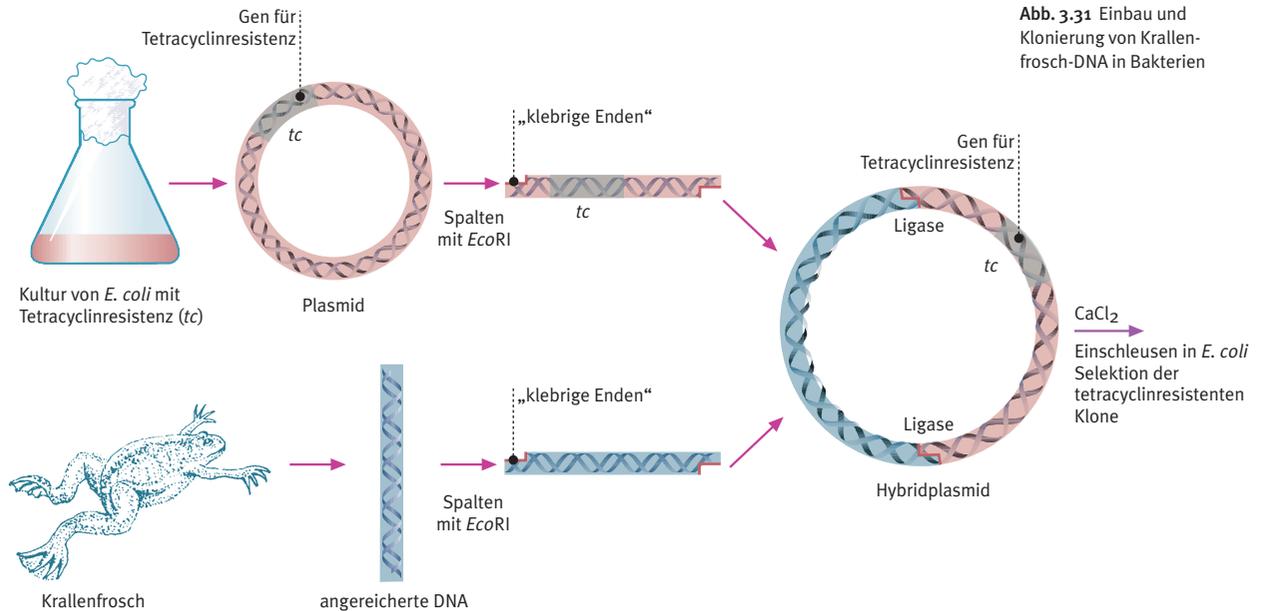


Abb. 3.31 Einbau und Klonierung von Krallenfrosch-DNA in Bakterien

es folglich in vier Teile zerstückelt. Nur ein DNA-Stückchen enthielt dabei das Resistenzgen gegen Penicillin. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten waren somit größer als im ersten Experiment. Die Stunde der Wahrheit kam dann mit der Ausplattierung der manipulierten Bakterien auf tetracyclin- und gleichzeitig auch penicillinhaltigen Nährboden.

Ein Jubelschrei aus Cohens Labor: Auch ein solches rekombinantes Plasmid funktionierte in den *E. coli*-Zellen. Damit wurde erstmals Erbmateriale unterschiedlicher Arten verpflanzt. Eine „Überwindung der Schranken, die normalerweise biologische Arten voneinander trennen“, wie Cohen etwas vorzeitig verkündet hatte, war allerdings nicht erreicht worden, weil – wie wir heute wissen – auch unterschiedliche Mikroorganismen und Viren Erbmateriale „natürlich“ austauschen können. Alle **Virusinfektionen** sind also Gentransfer!

Ermutigt durch diese Erfolge, sollten nun höhere Barrieren überwunden werden: die Artschranke zwischen Bakterien und Fröschen, genauer den **Afrikanischen Krallenfröschen** (*Xenopus laevis*) (Abb. 3.32).

Genomische DNA wurde aus Krallenfroschzellen isoliert und mit Restriktionsenzymen des Typs *EcoRI* zerschnitten. Gleichzeitig wurde das Bakterioplasmid pSC 101 ebenfalls mit *EcoRI* aufgeschnitten (Abb. 3.31).

Zusammengelagerte Frosch-DNA und Bakterien-DNA wurden mit Ligasen verklebt, in *E. coli*-Zellen eingeschleust und vermehrt. Die Zellen, die das

neue rekombinante Frosch-Bakterien-Plasmid enthielten, wurden aufgrund der Tetracyclinresistenz und – da die Frosch-DNA keine Resistenzgene gegen Antibiotika enthält – durch chemische Analyse der Nucleinsäuren identifiziert.

Am 27. Juli 1973 stand fest: Frosch-DNA wird von Bakterien „akzeptiert“!

Das neue Plasmid vermehrte sich 1 000-fachen bei den 1 000 Zellteilungen mit. Von ihm wurden somit identische Kopien hergestellt: Das rekombinante Frosch-Bakterien-Plasmid wurde kloniert.

Eine neue Art war das noch nicht, denn nur weniger als ein tausendstel der Bakterien-DNA stammt vom Frosch. Zwar quakten die manipulierten Bakterien nicht nach Froschart, wie die Forscher scherzten, aber etwas viel Wichtigeres war von den ersten Gentechnikern geleistet worden: Sie hatten eine universelle Gentechnik-Methode entwickelt, mit der erstmals das bis dahin völlig unzugängliche Erbmateriale höherer Lebewesen in großer Menge hergestellt und untersucht werden konnte: das **Klonieren von DNA** war nun technisch möglich geworden (Abb. 3.30).

3.13 Wie Gene gewonnen werden

Leider war das Experiment mit der „zerhackten“ Frosch-DNA nicht so einfach auf die Produktion von Proteinen höherer Lebewesen zu übertragen. Der Grund dafür waren die in die DNA-Kette eingefügten Introns mit ihrer nicht Protein codierenden „Nonsense“-Information. Es hätte nicht viel Sinn, die DNA höherer eukaryotischer Lebewesen durch Restriktionsendonucleasen zu spalten und in



Abb. 3.32 Afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) – ein neues Labortier wie zuvor Maus und Ratte, anspruchslos und langlebig. Sein wissenschaftlicher Name („seltsamer Fuß“) kommt von den schwarzen Krallen. In Kalifornien wurden diese fresslustigen, über zehn Zentimeter großen eingebürgerten Amphibien zur Landplage.

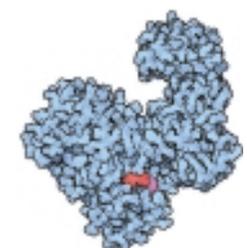


Abb. 3.33 DNA Ligase, der „Kleber“ für geschnittene DNA, ist ein ATP-abhängiges Enzym (siehe Kap. 2). Ligase ist ein für die Gentechnik unverzichtbares Werkzeug. Der Cofaktor ATP (rot) und ein Lysin-Rest (magenta) sind essenziell.

Abb. 3.34 Synthese von Ratten-Proinsulin durch Bakterien

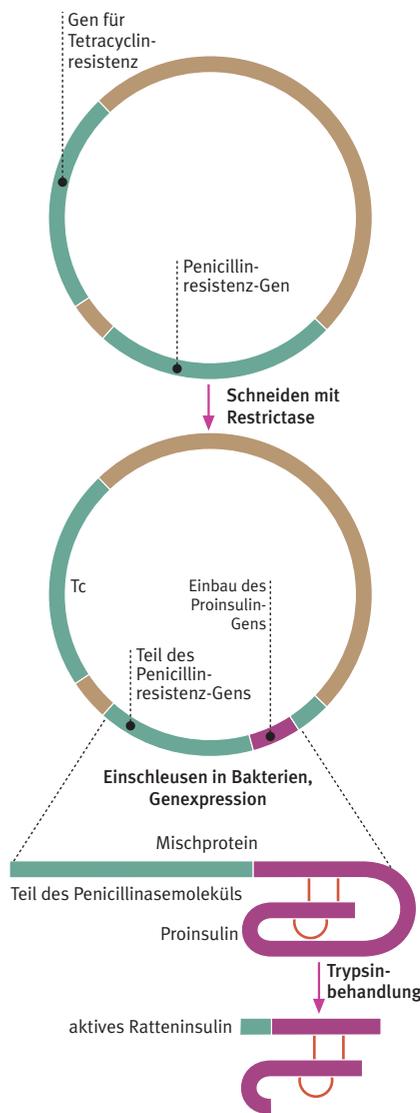
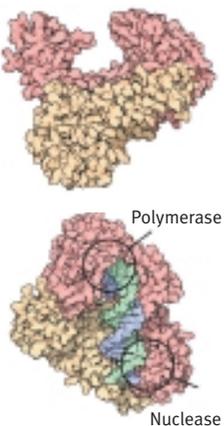


Abb. 3.35 Unten: Reverse Transkriptase. Ihre klauenartige Struktur. Darunter: Zwei Aktivitäten sind in einem Molekül der reversen Transkriptase vereint: Mit der Polymerase entsteht ein RNA-DNA-Hybridmolekül, mit der Nuclease-Aktivität wird die am Ende überflüssige RNA abgebaut. Der DNA-Einzelstrang wird dann zum Doppelstrang ergänzt.



Plasmid-DNA einzubauen. Zwar könnten Tausende von Fremd-DNA-Stücken kloniert werden, aber ein funktionierendes Fremdprotein würde kaum produziert. Im besten Fall wäre das Endprodukt ein Protein, das zwar alle seine Aminosäuren aus den Exons enthält, dazwischen aber völlig irrelevante „Extra-Aminosäuren“ aus den Introns.

Der Ausweg für die Gentechniker lag darin, nicht die intronbelastete DNA höherer Lebewesen zu verwenden, sondern die reife (*mature*) mRNA zu gewinnen, auf der die verschlüsselten Baupläne der Proteine von Introns befreit sind. Nun lässt sich aber die einzelsträngige mRNA nicht mit der doppelsträngigen Plasmid-DNA zusammenbauen. Glücklicherweise fand man (wie bereits in Abschnitt 3.3 erwähnt) ein Enzym in Retroviren, die **reverse Transkriptase** (Revertase). Sie kann die einzel-

strängige RNA in doppelsträngige DNA zurückschreiben (Abb. 3.35). Die Erbsubstanz der Retroviren besteht nämlich nicht aus DNA, sondern aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül. Befallen diese Viren DNA enthaltende Wirtszellen (siehe Kapitel 5), übersetzen sie mit der mitgebrachten Revertase ihre einzelsträngige Viren-RNA in doppelsträngige DNA und integrieren diese dann in die WirtsdNA (Abb. 3.23).

Die Gentechniker nutzen nun reverse Transkriptase, um an dem mRNA-Einzelstrang einen DNA-Strang zu synthetisieren. Diese DNA, die durch Kopieren einer RNA entstanden ist, wird als **copy-DNA (cDNA)** bezeichnet.

Ist die Abfolge der Aminosäuren (Sequenz) eines Proteins bekannt und lässt sich die entsprechende mRNA dennoch nicht aus Zellen isolieren, kann das zugehörige Gen aber auch auf chemischem Weg synthetisiert werden. So lässt sich eine DNA herstellen, die eigentlich in der Natur nicht vorkommt. Heute gibt es schon **DNA-Syntheseautomaten** (Box 3.5). Bei ihnen wird ein Start-Nucleotid an feste Trägermaterialien (wie Silicagel oder Glasperlen) gebunden und nachfolgend hängt man Nucleotide in der gewünschten Reihenfolge an. 1988 konnte man so täglich 30 Basen lange DNA-Fragmente synthetisieren: Dazu war noch 1979 ein halbes Jahr Teamarbeit nötig. Heute kann man in wenigen Stunden komplette „Gene nach Maß“ synthetisieren.

3.14 Humaninsulin aus Bakterien?

Im Juli 1980 erhielten 17 Freiwillige Insulininjektionen im Londoner Guy's Hospital. Sie machten Schlagzeilen in den Zeitungen. Was war daran so sensationell? Jeden Tag wurden Millionen Diabetiker in aller Welt mit dem Hormon Insulin behandelt (siehe Box 3.3). Das Insulin wurde aus der Bauchspeicheldrüse von Rindern und Schweinen gewonnen. Das substituierte Insulin soll den Blutzuckerspiegel der Diabetiker regulieren und die schwerwiegenden Folgen des **Diabetes** bekämpfen – eine Krankheit, die in den Industrieländern auf Platz drei der Todesursachen steht (siehe Box 3.4).

Der Typ-I-Diabetes wird durch Autoimmunzerstörung der Insulin bildenden Zellen des Pankreas verursacht und setzt vor dem 20. Lebensjahr ein. Der Typ-II-Diabetes tritt dagegen ab mittlerem Lebensalter auf (90 % der Diabetiker), vor allem bei Übergewichtigen (Kap. 10). Die oben erwähnten 17 Freiwilligen waren die ersten Menschen in der Medizingeschichte, die mit einem Säugetierhormon behandelt wurden, das nicht aus Säugetieror-

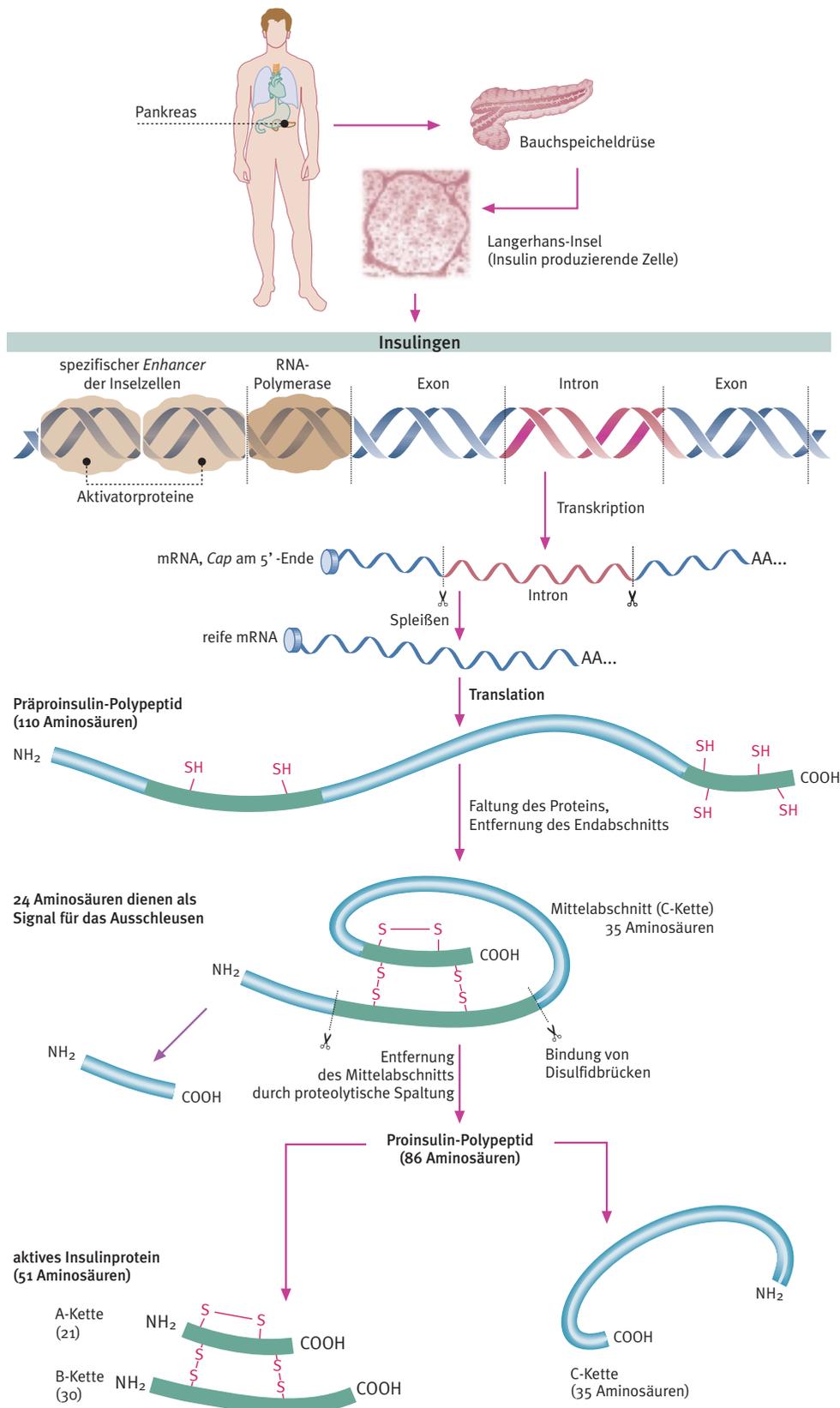


Abb. 3.36 Insulinsynthese in den Inselzellen des Pankreas:

Gezeigt ist ein typisches Insulingen einer Säugetierzelle mit Introns, codierenden Sequenzen (Exons) und den Regulationssequenzen, die für die Transkription gebraucht werden. Kurz vor dem Anfang des Insulogens (in der flankierenden Region am 5'-Ende) liegen mehrere Sequenzelemente, die für die Insulinproduktion entscheidend sind. Verschiedene Regulationsproteine binden sich an diese Sequenzen und aktivieren sie. In Zellen, die kein Insulin herstellen, werden diese DNA-Abschnitte durch andere Proteine blockiert.

Die RNA-Polymerase startet direkt nach diesen Sequenzen ihre Transkriptionsarbeit. Die Enden der transkribierten mRNA werden bei Eukaryoten mit einer 5'-Cap („Kappe“) und einem 3'-Poly(A)-Schwanz modifiziert. Die Kappe soll vor Enzymabbau (Phosphatasen und Nucleasen) schützen und die Translation verstärken. Der Poly(A)-Schwanz ist nicht in der DNA codiert und stabilisiert offenbar die mRNA.

Auch nach der Translation am Ribosom kann die Geschwindigkeit der Insulinsynthese noch gesteuert werden; das Präproinsulin (128 Aminosäuren) ist länger als das aktive Hormon. Besondere Enzyme spalten am Aminoende ein kurzes Stück (24 Aminosäuren) ab, das als Signalsequenz für die Membranpassage am endoplasmatischen Reticulum dient. Anschließend wird aus dem so entstandenen Proinsulin der mittlere Teil der Peptidkette (C-Peptid) entfernt. Die beiden kurzen A- und B-Ketten bilden das fertige Insulin. Sie werden durch Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen zusammengehalten.

Die Menge an aktivem Protein wird häufig erst nach seiner Synthese durch Rückkopplung im Körper reguliert.

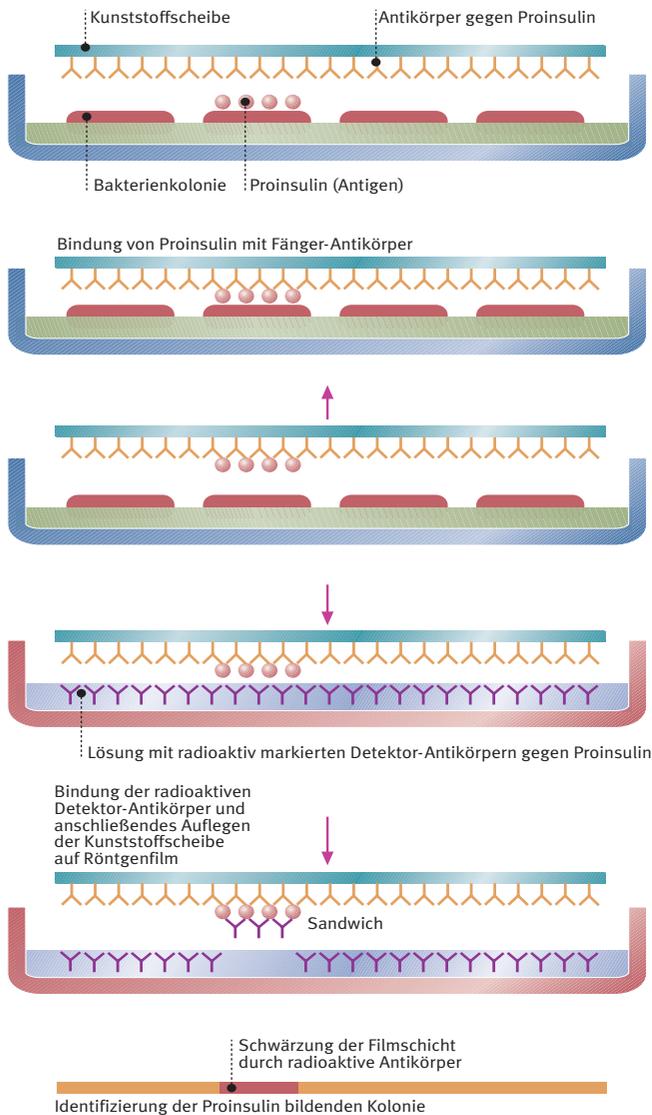


Abb. 3.37 Wie Proinsulin bildende Bakterienkolonien mithilfe von Antikörpern im Radioimmunoassay gefunden werden



Abb. 3.38 Rosalyn Yalow (geb. 1921) entwickelte den Radioimmunoassay (RIA), Nobelpreis 1977

ganen, sondern aus Bakterien stammte. Damit wurde die erste, mithilfe der Gentechnologie hergestellte Substanz am Menschen getestet. Zwei Jahre später erfolgte die offizielle Genehmigung für die medizinische Anwendung gentechnisch produzierten Insulins.

Der Bedarf an Insulin ist unglaublich hoch. Ein Diabetiker brauchte zur Deckung seines Jahresbedarfs die Bauchspeicheldrüsen von etwa 50 Schweinen. Die deutsche Firma Hoechst verarbeitete täglich elf Tonnen Schweinebauchspeicheldrüsen, die von mehr als 100 000 Schlachttieren stammten.

Ab 2005 wird in Deutschland kein tierisches Insulin mehr vertrieben.

3.15 Wie Insulin im Menschen synthetisiert wird: vom Präproinsulin über Proinsulin zum aktiven Insulin

Insulin ist ein kleines Hormon, das aus zwei Proteinketten besteht, von denen die eine 21 (A-Kette) und die andere 30 Aminosäuren (B-Kette) lang ist. Von 1945 an hatte **Fred Sanger** (Box 3.4) in zehn Jahre langer zäher Arbeit im Keller des Biochemischen Instituts in Cambridge (England) die Primärstruktur des Insulins erforscht.

Das Vorhaben der Insulinanalyse wurde seinerzeit als tollkühn angesehen. Kristallisiertes Rinderinsulin aus 120 Rindern diente Sanger als Rohstoff. Fred Sanger bekam den Nobelpreis 1957, nur drei Jahre nachdem er die Sequenz aller 51 Aminosäurebausteine in den zwei Insulinketten entschlüsselt hatte.

Beide Ketten werden zunächst als Bestandteile einer längeren Kette von 110 Aminosäuren in den B-Zellen (β -Zellen) der Langerhans'schen Inseln im Pankreas synthetisiert. Diese Langform ist das **Präproinsulin** (Abb. 3.36). Wie für andere Peptidhormone wird dieses Vorstufenprotein ins endoplasmatische Reticulum sezerniert. Seine ersten 24 Aminosäuren dienen als Signal für die Zellmembran zum Ausschleusen des Insulins aus der Zelle. Beim Durchgang durch die Membran werden diese 24 Aminosäuren durch Enzyme (Peptidasen) abgetrennt und verbleiben in der Zelle. Die restlichen 86 Aminosäuren bezeichnet man als **Proinsulin**: B-Kette, C-Peptid plus A-Kette.

Anfangs- und Endstück dieses Moleküls (B und A) treten miteinander in Wechselwirkung und werden so durch zwei **Disulfidbrückenbindungen** (-S-S-) miteinander verknüpft. Danach wird der zentrale Teil des Proinsulins (C-Kette oder C-Peptid, mit 35 Aminosäuren) durch membranständige Enzyme (Proteasen) im Golgi-Apparat der Zelle abgetrennt.

Die Bedeutung der C-Kette besteht darin, die A- und B-Ketten korrekt zueinander auszurichten. Ohne diese korrekte räumliche Faltung ist das **Insulin** nicht voll aktiv.

Aktives Insulin und C-Peptid werden in Vesikeln aufbewahrt und nach Stimulus zusammen entlassen. Der „Tagesverbrauch“ von Insulin beträgt beim Menschen etwa 1,8 mg.

Box 3.3 Biotech-Historie: Insulinherstellung



Frederick Banting und Charles Best

1921 gelang den Kanadiern **Frederick G. Banting** (1891-1941, bei Flugzeugabsturz umgekommen) und **Charles H. Best** (1899-1978) in Toronto die Isolierung des Insulins aus tierischen Bauchspeicheldrüsen. Ihre Arbeit wurde als so epochal angesehen, dass Banting dafür nur zwei Jahre später, zusammen mit J. J. R. Macleod, den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielt.

Bereits 1922 wurde das Hormon an einem Patienten mit Erfolg klinisch erprobt. Die US-Firma Eli Lilly & Co. (Indianapolis) bekam zunächst eine Exklusivlizenz für ein Jahr und produzierte „Iletin“ im Großmaßstab.

Das war der Startschuss für den heute noch zu den größten Insulinproduzenten der Welt gehörenden Konzern. Nach diesem Jahr wandte sich das Komitee der Universität Toronto an verschiedene Interessenten. In Deutschland war das der Arzt **Oscar Minkowski**.

Minkowski fragte 1923 seinerseits bei den Farbwerken Hoechst an. Bei Hoechst hatte man schon zuvor aus Schlachthöfen in Frankfurt und Karlsruhe Drüsenmaterial gesammelt und versucht, Insulin zu gewinnen. Anfang November 1923 kam dann das selbstentwickelte „Altinulin“ mit Genehmi-

gung aus Kanada auf den Markt. Fortan war Hoechst führend in der Insulinforschung und bestimmt heute unter dem neuen Namen Sanofi-Aventis mit Eli Lilly, Novo Nordisk und Berlin Chemie den Markt in Deutschland.

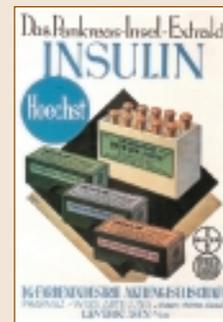


Oscar Minkowski (1858-1931) fand 1889 an der Medizinischen Klinik in Straßburg, dass Hunde Diabetes entwickeln, wenn ihnen das Pankreas entfernt wird. Er überzeugte Hoechst 1923 zur Insulinproduktion.

Viele andere Firmen versuchten ihr Glück, scheiterten aber zumeist am Rohstoffproblem: Das Einsammeln des Materials aus vielen kleinen deutschen Schlachthäusern war mühsam – man denke dagegen an die riesigen von Upton Sinclair beschriebenen Schlachthöfe von Chicago! Bauchspeicheldrüsen mussten importiert werden.

1936 gelang es dann der Firma Hoechst als erster, die gesamte Produktion auf das kristallisierte Hormon umzustellen. Die daraus hergestellten Lösungen waren besser von begleitendem Fremdprotein gereinigt und somit verträglicher. Auch an löslichen Depot-Insulinen wurde gearbeitet. 1938 kam das „Depot-Insulin Hoechst“ mit dem Stabilisator Surfen auf den Markt. Sogar während des Krieges blieb die Versorgung durch ein neues Verfahren zur Drüsenkonservierung gesichert. In den ersten Jahren nach 1945 erreichte die Produktion jedoch

einen Tiefstand. Hoechst blieb allerdings Hauptlieferant und brachte 1953 das langwirkende „Long-Insulin“ auf den Markt. Dann gelang nach 10-jähriger Arbeit **Frederick Sanger** die Bestimmung der Insulinstruktur (siehe Box 3.4).



oben: Insulinproduktion bei Hoechst
links: Werbung für Insulin von Hoechst

1963-1965 wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen die Insulin-Totalsynthese ausgeführt, und 1969 benutzte Dorothy Crowfoot-Hodgkin die Röntgenstrukturanalyse zur Aufklärung der Raumstruktur.

3.16 Der gentechnische Start mit Ratten-Proinsulin

Um Insulin gentechnisch mithilfe von Bakterienzellen zu produzieren, gingen **Walter Gilbert** (Abb. 3.39) und **Lydia Villa-Komaroff** von der Harvard-Universität 1977 von einem Tumor der β -Zellen einer Rattenbauchspeicheldrüse aus, also von tierischen Krebszellen. Als sie mit den Untersuchungen begannen, waren Experimente mit menschlichen Genen noch nicht erlaubt.

Die mRNA der Krebszellen schrieben die Forscher mit reverser Transkriptase in cDNA um, schnitten diese dann mit Restriktionsendonucleasen, um

klebrige Enden zu bekommen, und setzten die DNA-Stücke in bakterielle Plasmide ein, die Penicillin- und gleichzeitig Tetracyclinresistenz-Gene enthielten (Abb. 3.34). Die mit der fremden DNA beladenen Plasmide wurden dann in Bakterienzellen eingeschleust. Aus jeder dieser Zellen wurde ein Klon gezüchtet. Man plattierte sie auf Agar-Nährböden aus, die Penicillin und Tetracyclin enthielten.

Würde einer dieser oben erwähnten Klone tatsächlich Ratten-Proinsulin produzieren? Um das zu prüfen, beluden Gilbert und seine Mitarbeiter Kunststoffplatten mit Antikörpern gegen Proinsulin. Gegen Proinsulin lassen sich in Mäusen Antikörper erzeugen, wenn man diesen das Protein injiziert.



Abb. 3.39 Walter Gilbert (geb. 1932), Nobelpreis für Chemie 1980

GRÜNE BIOTECHNOLOGIE

- 7.1 Mikroben sind essbar! 172
- 7.2 Algen und Cyanobakterien 172
- 7.3 *Single cell*-Protein: Hoffnung auf billige Eiweißquellen 174
- 7.4 Mycoprotein ist als pflanzliches Eiweiß beim Verbraucher erfolgreich 175
- 7.5 „Grüne“ Biotechnologie *ante portas!* 178
- 7.6 Felder im Reagenzglas: *in vitro*-Pflanzenzucht 178
- 7.7 Meristemkultur 179
- 7.8 Haploidenkulturen: Staubbeutel und Fruchtknoten 180
- 7.9 Kallus- und Suspensionskulturen 181
- 7.10 Pflanzenzellen im Bioreaktor produzieren Wirkstoffe 183
- 7.11 Welche Pflanzenwirkstoffe werden dem Shikonin folgen? 184
- 7.12 *Agrobacterium* – ein Schädling als Gentechniker 185
- 7.13 Biolistischer Gentransfer: DNA-Schuss aus dem Revolver 185
- 7.14 Transgene Pflanzen: Herbizidresistenz 188
- 7.15 Biologische Insektentöter 189
- 7.16 Blaue Nelken und Anti-Matsch-Tomaten 193
- 7.17 Gefahr durch Gen-Food? 194
- 7.18 Soll man Gen-Food kennzeichnen? 195
- 7.19 *Gene-Pharming* 195
- 7.20 Transgene Pflanzen – eine hitzige Debatte 198
- 7.21 Tropische Palmen in Deutschland? 198
- 7.22 Bakterien in Schneekanonen sichern den Skiurlaub 200

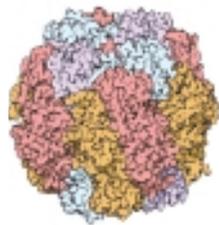




Abb. 7.1 Azteken beim Abfischen von *Spirulina*



Abb. 7.2 Braunalge Kelp (*Macrocystis*)



Abb. 7.3 *Spirulina*-Farm in Indien



Abb. 7.4 *Spirulina*-Tabletten

7.1 Mikroben sind essbar!

Für die Produktion von einem Kilogramm tierischem Protein werden fünf bis zehn Kilogramm Pflanzeiweiß benötigt. Hierbei geht Eiweiß massiv verloren, zusätzlich zu den riesigen Verlusten durch Schädlinge, Ernte, Transport und Lagerung. Mikroorganismen könnten wirksam helfen: Sie produzieren nicht nur Medikamente, Wein und Käse – Mikroben selbst sind essbar! Sie enthalten wertvolle Proteine, Fette, Zucker und Vitamine.

Schon 1521 beschrieb der Spanier Bernal Diaz del Castillo nach der Eroberung Mexikos, dass die Azteken merkwürdige kleine käseähnliche Kuchen aßen. Diese Kuchen bestanden aus in mexikanischen Seen wachsenden mikroskopisch kleinen Algen, von den Azteken *Techuilatl* genannt. Es handelte sich dabei um *Spirulina*. *Spirulina* ist keine „echte“ Alge, vielmehr ein Cyanobakterium, eine „Blaubakterie“.

Im Kaiserreich Montezumas sollen Diener, die den Herrscher täglich mit frischem Fisch versorgen mussten, was nur im Dauerlauf über sehr große Entfernungen möglich war, als Kraftnahrung *Spirulina* verwendet haben. Noch zu Cortez' Zeiten wurde es auf den Märkten der Einheimischen gehandelt und als Beigabe zu Brot und Körnerspeisen gegessen. *Spirulina* schöpften die Fischer mit feinmaschigen Netzen aus Salzseen ab (Abb. 7.1), die damals noch nicht trocken gelegt waren. Heute gibt es *Spirulina* wohl nur noch im Texcoco See in Mexiko. Die anderen Seen, mitsamt den schwimmenden Gärten der Azteken, sind heute unfruchtbare Wüste.

Tausende Kilometer entfernt verzehren die Eingeborenen am Tschadsee in Afrika (Nigeria) ebenfalls seit Urzeiten *Spirulina*. Auf lokalen Märkten am Tschadsee gibt es dünne, harte, blau-grüne Algenkuchen zu kaufen. Das Volk der Kanembu nennt dieses Produkt *Dihé*. *Dihé* ist wichtiger Bestandteil in 70% aller Gerichte. Es wird als Beimischung zu Soßen aus Tomaten, Chillis und diversen Gewürzen verarbeitet, die zusammen mit dem Grundnahrungsmittel Hirse gegessen werden. Die *Spirulina*-Kuchen stellt man durch Sontrocknung her. Zuvor werden die schwimmenden Algen aus geschützten Bereichen des Sees aus dem Wasser geschöpft. Dann lässt man sie abtropfen und breitet sie im warmen Sand aus, wo sie rasch trocknen.

In westlichen Ländern und Japan isst man *Spirulina* aus Algenfarmen als Cholesterin senkende, blutreinigende Diät (Abb. 7.4). 100 Gramm *Spirulina* sollen rund 70 Gramm Protein, 20 Gramm Zucker, zwei Gramm Fasern und nur zwei Gramm Fett ent-

halten, aber wichtige Vitamine (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, E) und Mineralstoffe.

7.2 Algen und Cyanobakterien

Algen sind – mit Ausnahme der prokaryotischen *Spirulina* – photosynthetische Eukaryoten (Box 7.1). **Makroalgen** sind ökonomisch bedeutsamer als **Mikroalgen**: Grüne (Chlorophyta), Rote (Rhodophyta) und Braune Makroalgen (Fucophyta oder Phaeophyta) werden gegenwärtig genutzt.

Braunalgen, wie den bei Tauchern beliebten dschungelartig wachsenden kalifornischen Kelp (*Macrocystis*) (Abb. 7.2), erntet man seit 1900. Aus ihm wurde seit 1921 in San Diego das gelatineartige Alginat produziert. Hier gibt es Riesentangwälder. Heute wird **Alginat** als Eindicker und Stabilisator in Nahrungsmitteln und Eiscreme, in der Textilindustrie und als Verkapselung für Medikamente (und für Enzyme und Hefen, Kap. 2) genutzt.

Andere Algenprodukte sind das Gel bildende **Agar** (früher Agar-Agar genannt, wichtig für die Kultivierung von Mikroben und die Gelelektrophorese, siehe Kap. 10) und **Carrageenan**.

Die geschmacksverstärkende Aminosäure **L-Glutamat** wurde zuerst in Algen in Japan gefunden (Kap. 4). Andere Braunalgen wie *Undaria* (jap. *wakame*) und *Laminaria* (jap. *konbu*) wachsen an den Küsten Japans und Chinas und werden für Salate, Suppen, Nudeln oder mit Fleisch genutzt (Abb. 7.5 und 7.6). Der jährliche Marktwert beider Algen liegt bei 600 Millionen US-Dollar. 20 000 Tonnen *Wakame* werden jährlich geerntet.

Die **Rotalge** *Porphyra* (jap. *nori*) wird in Japan seit dem Mittelalter kultiviert. Heute wird sie in riesigen Mengen an Bambusbüschelein oder horizontalen Netzen in Meeresfarmen gezogen und später luftgetrocknet.

Die wichtigsten **Mikroalgen** stammen aus zwei verschiedenen Klassen: Die schon erwähnten prokaryotischen Blaubakterien und die eukaryotischen Grünalgen.

Zu den früher als Blualgen bezeichneten prokaryotischen **Blaubakterien** (Cyanobakterien) gehören die wirtschaftlich wichtigen Arten der Gattung *Spirulina*. Der in Asien bei den Reisbauern kultivierte Wasserfarn *Azolla* beherbergt die symbiotische Blaubakterie *Anabaena azollae* (Abb. 7.9), auch Schnurfaden genannt, die den Farn mit Stickstoff versorgt.

Die *Spirulina*-Zellwand besteht wie die der Bakterien aus Mucoproteiden und ist daher durch menschliche Verdauungsenzyme leicht aufzu-

Box 7.1 Photosynthese

Fast alle freie Enthalpie, die von biologischen Systemen verbraucht wird, stammt von der Energie der Sonne. Das sind riesige Mengen: etwa $4 \cdot 10^{17}$ kJoule oder 10^{10} Tonnen pro Jahr in Zucker umgewandelter Kohlenstoff. Die Sonnenenergie wird durch die Photosynthese in chemische Energie umgewandelt. Wasser und Kohlendioxid vereinigen sich in einem hochkomplexen Prozess zu Kohlenhydraten (zunächst Glucose, dann Saccharose und Stärke) und molekularem Sauerstoff.

In den Chloroplasten der grünen Pflanzen erzeugen Pigmentmoleküle (Chlorophylle) in der Thylakoidmembran aus eingefangener Lichtenergie Elektronen hoher Energie. Sie werden in der Lichtreaktion zur Erzeugung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ und ATP (Kap. 1) verwendet.

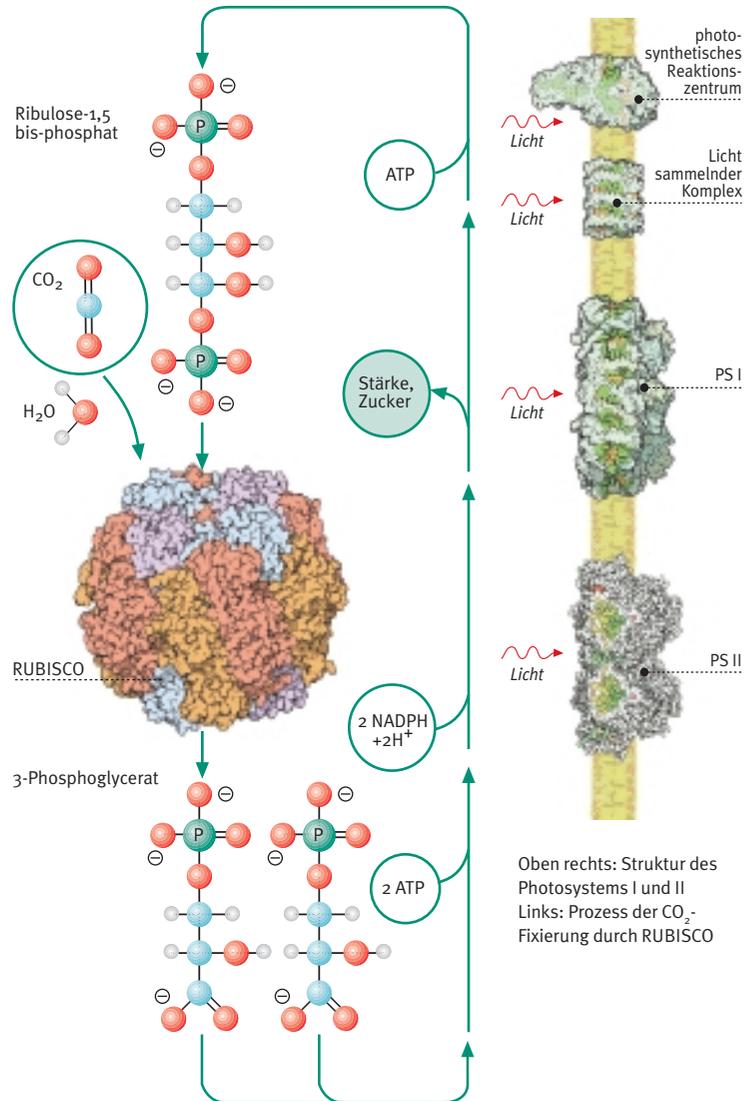
Die Photosynthese der grünen Pflanzen wird durch zwei miteinander verbundene Photosysteme ausgeführt. Sehr stark vereinfacht stellt man sich das so vor:

Im Photosystem II führt die Lichtanregung von P680 (einem Paar von Chlorophyll-Molekülen) zu einem Elektronentransfer über mehrere pigmentierte Moleküle auf Plastochinon A und dann auf Plastochinon B. Diese energiereichen Elektronen werden durch Entzug von Elektronen niedriger Energie aus Wassermolekülen wieder ersetzt: Das Sauerstoff entwickelnde Zentrum entnimmt Wasser ein Elektron, transferiert es zu einer Tyrosingruppe und diese bringt es zurück zum Chlorophyll, das dadurch ein weiteres Photon aufnehmen kann.

Für jeweils vier übertragene Elektronen wird ein Molekül Sauerstoff erzeugt. Vom Plastochinon laufen die Elektronen über einen Cytochrom-bf-Komplex zum Plastocyanin und von dort zum Photosystem I.

Das hier gezeigte Photosystem I ist ein trimere Komplex, der in der Membran „schwimmt“. Jeder der drei Untereinheiten hat hunderte Cofaktoren (grün Chlorophyll, orange Carotinoide). Die Farben haben eine Bedeutung: Chlorophyll absorbiert blaues und rotes Licht – deshalb sehen wir Pflanzen in wunderbarem Grün.

Das Photosystem I besitzt Elektronentransferketten als Zentrum der drei Untereinheiten. Jede ist von einem dichten Ring aus Chlorophyll- und Carotinoid-Molekülen umgeben, die als „Antennen“ fungieren.



Diese Antennen absorbieren Licht und transferieren Energie an ihre Nachbarn. Dann wird alles in die drei Reaktionszentren kanalisiert, die Elektronen (eine reduzierende Kraft) generieren.

Summa summarum führt die Lichtreaktion in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten erstens zu einer reduzierenden Kraft (zur Erzeugung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$), zweitens zur Bildung eines Protonen- (H^+) Gradienten (ein Gefälle zwischen den beiden Seiten der Thylakoidmembran, damit wird ATP erzeugt) und drittens zur Produktion von Sauerstoff.

Eine weitere Stufe ist die CO_2 -Fixierung: Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (kurz RUBISCO) ist eine

Lyase (Kap. 2) und bildet die Brücke zwischen Leben und Leblosem.

Es verbindet das anorganische CO_2 mit Ribulose-1,5-bisphosphat, einer kurzen Zuckerkette mit fünf Kohlenstoffatomen. RUBISCO bildet daraus zwei 3-Phosphoglycerate (mit je drei Kohlenstoffatomen). Die meisten Phosphoglycerat-Moleküle werden recycelt, um noch mehr Ribulose-bisphosphat zu bilden, aber jedes sechste Molekül wird zur Bildung von Saccharose oder Stärke (als Speicherstoff) verwendet.

16% der Eiweiße der Chloroplasten sind RUBISCO und bei der gewaltigen Menge an Pflanzen ist RUBISCO offenbar das häufigste Protein auf der Erde!



Abb. 7.5 Getrocknete Makroalgen dienen in China und Japan als preiswerte Grundlage für Suppen.



Abb. 7.6 In Japan gehören Makroalgen seit jeher zum festen Bestand der Ernährung.

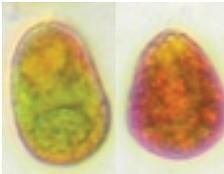


Abb. 7.7 Die Alge *Dunaliella* wird in Farmen kultiviert (oben: in Westaustralien); unten: Carotinoide reichern sich in der rechts gezeigten Zelle an.

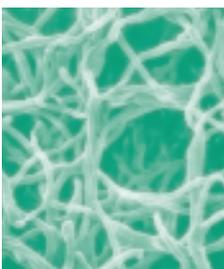


Abb. 7.8 *Fusarium graminearum*, der Erzeuger von Quorn

schließen, ein Vorteil bei ihrer Verwendung für Diätzwecke. *Spirulina* ist ein fädiger, schraubig gewundener Organismus, der aus 150 bis 300 Einzelzellen bestehen kann und dann eine Länge von bis zu einem halben Millimeter erreicht. Zu den Blaubakterien gehört auch der Zittertang oder Schleimling *Nostoc* (Abb. 7.9).

Zu den eukaryotischen **Grünalgen** (Chlorophyceae) zählen die Arten aus den Gattungen *Chlorella*, der Vierling *Scenedesmus*, die begeißelten *Dunaliella* und *Chlamydomonas* (Abb. 7.9) und die aus bis zu 20 000 Zellen bestehende Algenkolonie *Volvox*. *Volvox* ist hoch organisiert, mit differenzierten Zellen. Sie sind wichtige Algen im Abwasser und Plankton der Seen und Meere.

Die Zellen von *Chlorella* und *Scenedesmus* sind durch eine feste Cellulosewand mit Sporopollenin-Einlagerungen (der Substanz der Wände von Pollenkörnern höherer Pflanzen) umhüllt. Die damit imprägnierten Zellwände sind chemisch besonders schwer angreifbar. Deshalb müssen die etwa zehn Mikrometer großen Zellen vor der Weiterverwendung zu Ernährungszwecken aufgebrochen werden.

Algen wie *Chlorella* werden heute mit Kosten von rund zehn Euro je Kilogramm gezüchtet und vor allem als Diätahrung zum etwa zehnfach höheren Preis verkauft. Der Rohproteinanteil dieser Algen beträgt etwa 50% der Gesamtmasse (im Vergleich dazu bei Sojabohnen 35%), und sie weisen einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und Vitaminen auf.

Dunaliella-Arten, einzellige, bewegliche Flagellaten, besitzen hingegen keine feste Zellwand. Ihre auffälligste Eigenschaft ist eine außergewöhnliche Salztoleranz. Diese halophilen Algen treten daher massenhaft in eintrocknenden Lagunen von Meerwassersalinen auf. Wegen ihres enormen Gehalts an β -Carotin färben sie die Salzlauge tiefrot (Abb. 7.7). Zum Ausgleich des externen osmotischen Wertes reichern sie in beträchtlichem Maße Glycerin an, das wie das Carotin industriell gewonnen wird.

Algen verdoppeln ihre Masse in nur sechs Stunden. Gräser brauchen dafür zwei Wochen, Kücken vier Wochen, Ferkel sechs Wochen und Kälber zwei Monate.

In vielen Ländern wird deshalb an **Algenfarmen** gearbeitet. Man braucht dazu große, flache Wasserbecken, in denen die Algen genügend Sonnenlicht bekommen (Abb. 7.3 und 7.7). Mit dessen Hilfe bilden sie aus Kohlendioxid, Wasser und Nährsalzen

Zucker und aus den Zuckern dann Eiweiß. Licht und Luft sind kostenlos, und nur wenige billige Nährsalze werden benötigt, um die Algen üppig wachsen zu lassen. Je Hektar Fläche ergibt *Spirulina* etwa zehnmal mehr Biomasse als Weizen und hat einen viel höheren Eiweißgehalt als dieser. Bei der Ernte werden die Algen herausgesiebt, an der Luft getrocknet und dann, nachdem sie mit Geschmacksstoffen versetzt wurden, verkauft.

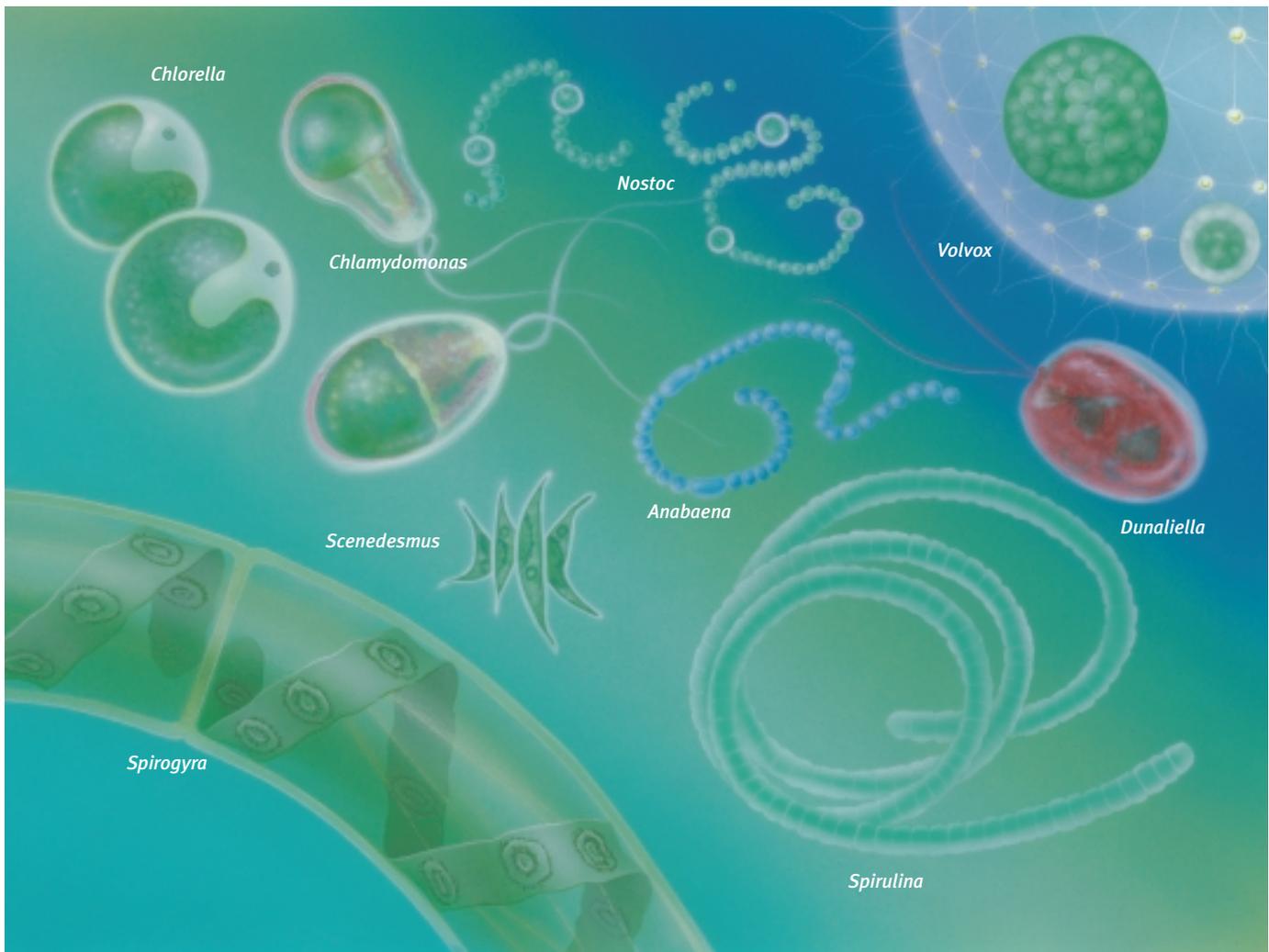
Warum gibt es dann noch keine riesigen Algenfarmen in den Hungergebieten? Hier fehlt selbst die einfachste Technik dazu; in vielen Gebieten ist zudem das Wasser knapp und teuer. Der entscheidende Faktor: Unter günstigen Produktionsbedingungen kostet Algenprotein zehn US-Dollar pro Kilogramm und Sojaweiß nur 20 Cent pro Kilogramm. Fachleute sind dennoch überzeugt, dass die Algen eine große Zukunft haben werden.

Noch schneller als Algen wachsen Bakterien, Hefen und Pilze. Bakterien verdoppeln ihre Masse im Zeitraum von 20 Minuten bis zwei Stunden, und sie können zu 70% aus Eiweiß bestehen. Im Durchschnitt können Hefen je Masseinheit 100 000-mal schneller Protein bilden als eine Kuh. Dabei gibt eine Kuh nur ein Elftel der aufgenommenen Nährstoffe aus der Pflanzennahrung in Form von Fleisch an uns weiter. Zehn Elftel gehen also beim Rind für die menschliche Ernährung verloren. Das ist bei den Bakterien, Hefen und Pilzen anders: Hier wird fast die gesamte Nährstoffmenge in für Menschen und Tiere verwertbare Eiweiße, Zucker und Fette umgewandelt. Es lag nahe, das zu nutzen.

7.3 Single cell-Protein: Hoffnung auf billige Eiweißquellen

Die moderne Geschichte der Eiweißproduktion durch Mikroben begann im kaiserlichen Deutschland während des Ersten Weltkriegs mit der Zucht von **Hefen**. Wegen der Lebensmittelknappheit züchtete man Bäckerhefe im Großmaßstab und „streckte“ damit hauptsächlich Wurst und Suppen. Hefen haben den großen Vorteil, dass sie sich von billigen, sonst nicht verwertbaren zuckerhaltigen Lösungen ernähren und den Zucker direkt in wertvolles Protein umwandeln. Im 900 Tage belagerten Leningrad bewahrten Hefen Tausende von Menschen im Zweiten Weltkrieg vor dem Hungertod. Kurz nach dem Krieg stillten in Deutschland „Hefeflocken“ den Hunger vieler Menschen.

Erst in den 60er-Jahren begann man in Europa erneut, Anlagen zur Eiweißproduktion durch Mikroben zu errichten (Box 7.2). Der Proteinbedarf der Menschheit stieg. Man rechnete mit Hun-



gersnöten in der Zukunft und hatte inzwischen entdeckt, dass sich Mikroorganismen nicht nur von zuckerhaltigen Nährlösungen, sondern auch von kohlenwasserstoffhaltigen Bestandteilen des Erdöls, Alkanen (Paraffinen), und von Methanol ernähren können. Die wachsartigen Alkane sind für Menschen und Tiere nicht verwertbar, nur Mikroben können sie in wertvolles Eiweiß umwandeln.

Im Osten Europas konzentrierte man sich in der Hoffnung auf permanent billiges Erdöl auf Alkanhefen (*Candida*), im Westen, vor allem die britische ICI, auf Methanol verwertende Hefen und Bakterien (siehe Box 7.2 und Abb. 7.10). Die beiden so hoffnungsvollen Riesenprojekte endeten letztlich ohne Erfolg.

Die Alkanhefen wurden nur begrenzt als Futtermittel freigegeben, denn man befürchtete Krebs erregende Rückstände. Beide Projekte in Ost und West scheiterten letztlich ökonomisch an den zwei Erdölkrisen. Im Westen scheiterte das Methanol-Fut-

termittel noch zusätzlich an EU-Subventionen. Denn diese Subventionen machten Magermilchpulver als Futtermittelzusatz unerreichbar preiswert.

Die Biotechnologen sammelten jedoch unschätzbare Erfahrungen beim Bau und Betrieb von riesigen Bioreaktoren.

7.4 Mycoprotein ist als pflanzliches Eiweiß beim Verbraucher erfolgreich

Ein sehr erfolgreiches Produkt ist dagegen das **Mycoprotein** (griech. *mykes*, Pilz) von Rank Hovis McDougall (RHM) und heute Marlowe Foods, eine Tochter der ICI. RHM, der viertgrößte Nahrungsmittelproduzent Westeuropas, fand seine Mikrobe in den 60er-Jahren und wendete insgesamt über 30 Millionen Pfund Sterling für den Pilz auf, der in passable Imitationen von Fisch, Geflügel und Fleisch verwandelt werden kann (Abb. 7.13).

Abb. 7.9 Algen und Cyanobakterien



Abb. 7.10 Das Bakterium *Methylophilus methylotrophus* produziert hochwertiges Protein aus Methanol.

Box 7.2 Biotech-Historie: Einzellerprotein

In der Sowjetunion startete man in den 60er-Jahren unter Nikita Chruschtschow, beflügelt einerseits von Weltraumerfolgen und andererseits geplagt von ständigen Missernten, ein aufwändiges Programm zur Suche nach den besten Alkanenfressern. Die Idee war, aus billigem Erdöl wertvolles Eiweiß gewinnen.

Man suchte auch parallel nach Möglichkeiten, die Cellulose sibirischer Wälder zu Zucker abzubauen und diesen dann zu „verhefen“ und Eiweiß zu gewinnen. Schon 1963 begannen erste Versuchsanlagen zu arbeiten. Auf vorgereinigten Erdölproben wuchsen Hefestämme der Gattung *Candida*, die „mit Heißhunger“ Alkane verzehrten. Bei Beginn der Hefeproduktion aus den Alkanen des Erdöls gab es Bedenken von Ärzten und Tierärzten, die meinten, wegen der schweren Verdaulichkeit von Alkanen für Menschen und Tiere könnte das Alkanhefeeiweiß für höhere Lebewesen problematisch oder sogar Krebs erregend sein. Langjährige russische Experimente zeigten zwar, dass das Hefeeiweiß wohl unbedenklich in die Nahrungskette für den Menschen aufgenommen werden kann. Im Westen stieß das (wahrscheinlich zu Recht) jedoch auf große Skepsis. Das erste große Werk für Alkanhefe begann in der Sowjetunion 1973 mit der Produktion von 70 000 Tonnen Hefe im Jahr. Die Anlage im Petrochemischen Kombinat Schwedt, in der damaligen DDR, dem Endpunkt der sowjetischen Erdölleitung *Drushba* (Freundschaft), begann Anfang 1986 ihren ständigen Betrieb. Sie lieferte jährlich mit Tauchstrahlreaktoren 40 000 Tonnen des Futterhefepräparates Ferosin®. Die Bioreaktoren waren zweifellos eine Meisterleistung der ostdeutschen Ingenieure und Biotechnologen. Nach der deutschen Wiedervereinigung wurde der Ferosin®-Prozess gestoppt.



Alkanhefe-Bioreaktor (42 m hoch) in Schwedt zu DDR-Zeiten

Aber auch im Westen scheiterten *single cell* Protein-Projekte: British Petroleum (BP)

beteiligte sich 1971 auf Sardinien an der Herstellung von Toprina®, einem Erzeugnis aus Hefe, die auf Resten von Rohöl wuchs, durch die italienische Firma ANIC. Als Schuldige für das Scheitern des Projekts wurden ausgemacht: Die Erdölkrise, die Soja-Lobby, die Sojapreise reduzierte, die Diskussion über die Unbedenklichkeit von Toprina® (hoher Gehalt an Nucleinsäuren, ruft Gicht hervor) und Umweltbedenken.



Das riesige ICI-Werk bei Billingham, natürliche Bioreaktoren im Vordergrund

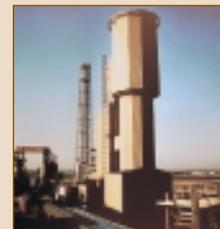
Parallel wurde im Westen Europas an der Verwertung von Methanol geforscht. Auf einem Rugbyplatz in der britischen Grafschaft Durham wurden die Biotechnologen der britischen Imperial Chemical Industries (ICI) fündig. Sie entdeckten das Bakterium *Methylophilus methylotrophus* (Abb. 7.10).

Etwa 10 000 Mikroorganismen waren 13 Jahre lang gesucht und getestet worden auf der Suche nach einem Mikroorganismus, der schnell auf petrochemischen Rohstoffen wächst und ein Eiweißkonzentrat für Haustiere liefert: Pruteen® war das Resultat. Zuerst hatte sich ICI auf Methan als Kohlenstoffquelle konzentriert, weil die Firma Zugang zum reichlichen Nordseeegas hatte. Das schien ein eleganter Weg zu sein vom einfachsten organischen Molekül zum komplizierten Protein. Nicht nur die Explosionsgefahr des Methans, sondern auch seine geringe Löslichkeit und das Problem, es im Medium gleichmäßig zu verteilen, sprachen aber gegen Methan. Methanol, oxidiertes (also Sauerstoff enthaltendes) Methan, kann dagegen den Sauerstoffbedarf der Mikroben leichter stillen, ist unbegrenzt wasserlöslich und führt nicht zu einer so hohen Wärmeentwicklung im Bioreaktor.

Die ICI-Forscher entschieden sich auch deshalb für den *Methylophilus*-Stamm (lat. Methanol liebend), weil er stabil und frei von toxischen Nebeneffekten war. Die Entscheidung, eine Reinkultur der Bakterien in einem kontinuierlichen Prozess zu züchten, hatte allerdings eine Konsequenz: Der Prozess musste unter den außergewöhnlichen

Bedingungen der Sterilität geführt werden! Im Gegensatz dazu lief der Alkanhefeprozess unsteril, das heißt, der Hefestamm verdrängt selbst alle Konkurrenten – so wie das bei den meisten biotechnologischen Prozessen zur Nahrungsmittelproduktion der Fall ist.

Die britische Firma John Brown Engineers and Constructors baute das gigantische Werk von ICI bei Billingham für den größten Steril-Bioprozess der Welt. Die Biofabrik bedeckte eine Fläche von acht Hektar. Der Bioreaktor, ihr Kernstück, war 60 Meter hoch (mit acht Blasensäulen-Fermentern) und enthielt 150 000 Liter absolut keimfreier Nährlösung, in der die Methanobakterien leben. Er wurde durch ein ausgeklügeltes System von 20 000 Ventilen und Filtern drei bis vier Monate lang ununterbrochen frei von fremden Mikroben gehalten. *Methylophilus* lebt bei 35 °C nur von Methanol, Ammoniak und Luftsauerstoff. Ständig wurden dem Bioreaktor Mikroben entnommen, mit heißem Wasserdampf abgetötet, zu größeren Klumpen zusammengeballt und getrocknet. Sie ergaben das körnige, karamefarbige Produkt Pruteen®. Alles schien in bester Ordnung.



Einer der ICI-Bioreaktoren

Als das Werk 1976 startete, wurde die Firma jedoch mit den steigenden Energiepreisen und einer hervorragenden Sojaernte konfrontiert; Einzellerprotein konnte so nicht ökonomisch produziert werden. *Methylophilus* wurde deshalb sowohl gentechnisch als auch mit Methoden der klassischen Genetik verbessert: Das Gen für das Enzym Glutamat-Dehydrogenase (für eine effektive Stickstoffverwertung aus Ammoniak) wurde erfolgreich eingeschleust. Die Eiweißausbeute konnte so um fünf bis sieben Prozent verbessert werden. Das ICI-Werk funktionierte, die Nachfrage blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück. Die bis 1982 investierten 100 Millionen Pfund Sterling betrachtet ICI dennoch als „Eintrittskarte zur Biotechnologie“.

Wichtige Erfahrungen flossen aber in die großtechnische Realisierung der Pilzeiweiß-*Quorn*-Produktion (siehe Haupttext) ein.

Forscher von RHM hatten mehr als 3 000 Bodenproben aus der ganzen Welt gesammelt. Wie so oft lag der Haupttreffer aber ganz in der Nähe: In der Nachbarschaft des Ortes Marlowe in Buckinghamshire, England, wurde *Fusarium graminearum* (heute: *Fusarium venenatum*, Abb. 7.8) gefunden. Zuvor war sein Name nur Pflanzenpathologen geläufig gewesen: Der Pilz verursacht Wurzelfäule bei Weizen.

RHM produzierte damals 15% des britischen Speisepilzangebotes. Wegen schlechter Erfahrungen mit psychologischen Vorurteilen der Konsumenten gegen Bakterieneiweiß betonte RHM von Anfang an: *Fusarium* sei ein Pilz wie unsere Speisepilze und Trüffel, die wir essen, ohne zweimal nachzudenken.

Abgesehen davon, dass *Fusarium* fast geruch- und geschmacklos ist (Abb. 7.11), ideal für Fleischimitate, enthält er auf Trockengewicht gerechnet etwa 50% Protein, eine Zusammensetzung wie die von gegrilltem Beefsteak. Der Pilz hat aber einen niedrigeren Fettgehalt als Beefsteak, nur 13%, noch dazu pflanzliches Fett, kein Cholesterin (dafür Ergosterin) und einen Fasergehalt von 25% – das alles zählt zunehmend bei Gesundheitsbewussten (Abb. 7.12).

Ein Hauptvorteil bei der Gewinnung von Pilz gegenüber Bakterienzellen ist, dass sie typischerweise viel größere Dimensionen besitzen, also aus dem Fermentationsmedium leicht abtrennbar sind. Andererseits wachsen aber Pilze viel langsamer als Bakterien mit einer Verdopplungszeit von vier bis sechs Stunden im Vergleich zu 20 Minuten bei Bakterien.

Auch das kann sich in einen Vorteil verwandeln: Langsameres Wachstum bedeutet auch, dass im Endprodukt weniger Nucleinsäuren enthalten sind. Nucleinsäuren, während eines längeren Zeitraums in hohen Konzentrationen durch Säugetiere und den Menschen aufgenommen, führen zu Gicht.

Während einige Bakterien 25% Nucleinsäuren und Hefen bis zu 15% enthalten, gelang es RHM bei der neuen Nahrung Mycoprotein, den Gehalt auf weniger als die für den Menschen akzeptable Grenze von 1% zu senken. Der Pilz hat auch eine Aminosäurezusammensetzung, die von der UN-Welternährungsorganisation (FAO) als „ideal“ empfohlen wird.

Die vielleicht außergewöhnlichste Eigenschaft des Pilzes ist der Weg, wie er in ein komplettes Imitat-Spektrum von Nahrungsmitteln, von Suppen und Biskuit bis zu überzeugenden Nachahmungen von Geflügel, Schinken und Kalbfleisch, verwandelt werden kann (Abb. 7.11 bis 7.13).

Der Schlüssel zu dieser Anpassungsfähigkeit: Die Länge der Fasern kann kontrolliert werden; je länger der Pilz im Bioreaktor wachsen „darf“, umso länger sind auch die Fasern, und desto gröber ist die Textur des Produktes. Das Medium besteht aus Glucosesirup als Kohlenstoffquelle mit Ammoniak als Stickstoffquelle. Der Sirup kann aus allen verfügbaren Stärkeprodukten (Kartoffeln, Weizen, Maniok) gewonnen werden, und der Prozess ist sehr viel effizienter als die Umwandlung von Stärke in Protein durch Haustiere.

Zur Pilzproduktion taten sich ICI und RHM zusammen. 1985 wurde das Mycoprotein in Großbritannien vom MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) freigegeben. Das erste Produkt war ein *Savory Pie*. In den 90er-Jahren wurde Marlowe Foods in Marlowe gegründet. Inzwischen ist das Pilzeiweiß in England als *Quorn* auf dem Markt.

Wurden vor 1993 noch Umsätze von weniger als drei Millionen US-Dollar pro Jahr erzielt, lagen sie 2001 dank mächtiger Werbung bei 150 Millionen. Interessant sind die Zielgruppen: Frauen von 25 bis 65 in den USA und von 25 bis 45 in Großbritannien. Die ältere Generation ist eben konservativ, obwohl die Firma gezielt ungenau nicht von Mikroben, sondern von „pflanzlichem Eiweiß“ spricht.



Abb. 7.11 Mycoprotein vor der Verarbeitung. Links „Rind“, rechts „Huhn“



Abb. 7.12 Erstes Probeessen von „veredeltem“ Mycoprotein



Abb. 7.13 Quorn-Produkte aus *Fusarium*: Fleischbällchen und Würstchen ohne Fleisch

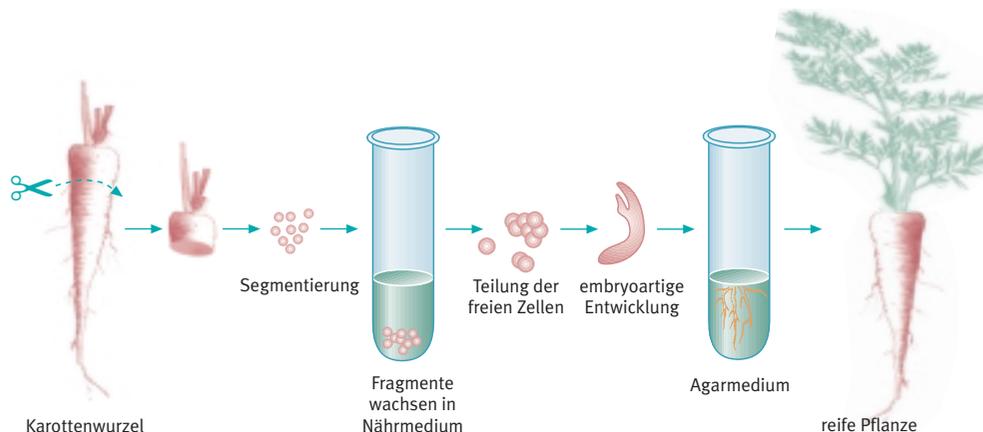


Abb. 7.14 Links: Wie Pflanzen *in vitro* vermehrt werden können