

2 Einführung in die Biochemie*

Von außen betrachtet gleicht unsere Erde annähernd einer Kugel, die auf ihrer Oberfläche in einer sehr dünnen Schicht Leben hervorbringt. Ermöglicht wird das Leben erst durch eine permanente Energieversorgung, die ursächlich von den Kernreaktionen der Sonne ausgeht. Der Erfolg einer bestimmten Lebensform in diesem Lebensraum Erde ist maßgeblich von der Fähigkeit der Organismen abhängig, die zur Verfügung stehende Energie bestmöglich zu nutzen. Im ersten Kapitel ist die Formenvielfalt der Lebewesen, die immer aus Zellen mit gleichen makromolekularen Bausteinen bestehen (DNA, RNA, Proteine, Membranen) und gleiche Informationsübertragungsmechanismen und Stoffwechselwege besitzen, angesprochen worden. Die Anzahl und Art der im Stoffwechsel umgesetzten Substanzen ist mannigfaltig und dennoch auf die gleichen Ausgangsverbindungen wie Glucose oder Aminosäuren zurückführbar.

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Bausteine und die Verknüpfungsregeln, z. B. zum Aufbau eines Proteinmoleküls aus den Aminosäuren, vorgestellt. Wie die dabei entstehenden Proteinstrukturen am Beispiel der biokatalytisch aktiven Enzyme zu selektiven Katalysatoreigenschaften führen, wird ebenfalls beschrieben.

Das Zusammenspiel verschiedener Enzyme in Stoffwechsel-Reaktionsketten, z. B. bei Reaktionen, die für die chemische Energiegewinnung der Zelle verantwortlich sind, zeigt, in welcher vielfältigen Ausmaß jede Zelle zu Stoffwechselvorgängen fähig ist. Diese Vielfalt möglicher Enzymreaktionen wird in der Zelle auf mehreren Ebenen geregelt und gesteuert, um das optimale Überleben unter verschiedensten Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Die wichtigsten dabei beobachteten Regelmechanismen werden im vorliegenden Kapitel angesprochen.

Die modernen Methoden der Gentechnik benutzen in der Natur entdeckte molekulare Werkzeuge (Restriktionsenzyme, Plasmide, Ligasen u. a. m.), mit denen wir heutzutage biochemische Mechanismen und Stoffwechselvorgänge im Detail untersuchen und gezielt verändern können. Dies eröffnet eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten von Biokatalysatoren in technischen Prozessen. Die Grundprinzipien der Gentechnologie (engl. *genetic engineering*) werden abschließend behandelt.

2.1 Bausteine der Zelle

2.1.1 Größenverhältnisse

Die Dimensionen, die beim Aufbau einer Zelle aus ihren Bausteinen relevant sind, zeigt Abbildung 2.1. Die wohl kleinste biologisch relevante Dimension ist die Länge von Atombindungen, z. B. die Länge einer einfachen C-C-Bindung von $1,54 \text{ \AA}$ ($\text{\AA} = \text{\AA ngström}$, Längeneinheit $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$). Moleküle, in denen mehrere Atome verknüpft sind, z. B. monomere Zuckermoleküle oder Aminosäuren, sind mehrere \AA ngström groß. Proteine oder Polysaccharide, polymere Strukturen aus diesen Bausteinen, sind eine Größenordnung größer, wie z. B. Hämoglobin, ein Protein, welches beim Menschen den Sauerstofftransport im Blut bewirkt. Die im vorigen Kapitel vorgestellten Ribosomen (Protein-/RNA-Aggregate) besitzen eine Größe von ca. 300 \AA (30 nm) und die Zellorganellen, z. B. Mitochondrien oder Membrankompartimente sind ca. $0,3\text{--}5 \text{ }\mu\text{m}$ groß. Letztere werden bereits im Lichtmikroskop gut erkannt. Die Größe von prokaryotischen Bakterienzellen liegt im Bereich von Mikrometern (ca. $1\text{--}3 \text{ }\mu\text{m}$); rote Blutkörperchen

* Autoren: Karl-Heinz Klempnauer, Lutz Fischer, Manfred Karl Otto

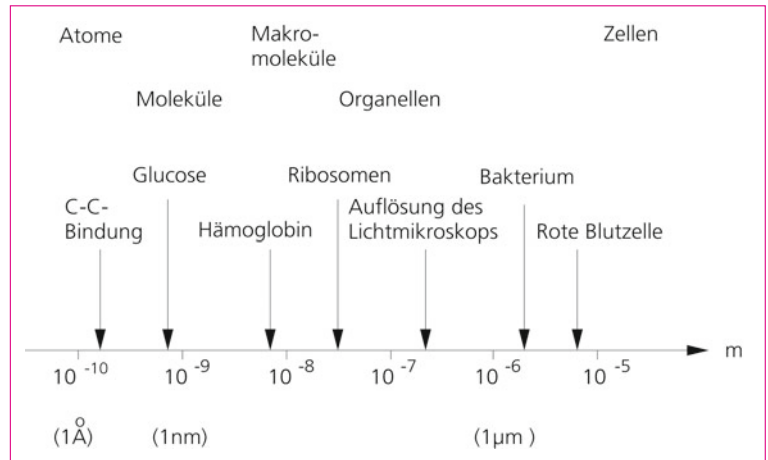


Abb. 2.1 Charakteristische Größen von Zellbausteinen und Zellen (nach Berg et al. 2007)

sind etwa $3\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$ und eukaryotische pflanzliche oder tierische Zellen ca. $5\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ groß. Aus diesen Dimensionsbetrachtungen lassen sich bereits Diffusionsstrecken der bei der Synthese von Zellstrukturen umgesetzten Substanzen und ungefähre Zeitkonstanten für diffusionskontrollierte Reaktionen abschätzen. Die quantitative Beschreibung erfolgt in späteren Kapiteln.

2.1.2 Die Bedeutung des Wassers

Eine Beschreibung der biochemischen Vorgänge in lebenden Zellen muss auch eine Betrachtung der besonderen Eigenschaften des Wassers einschließen. Organismen bestehen zum größten Teil aus Wasser (ca. 70 % im Falle des menschlichen Körpers und ebenso bei dem Bakterium *E. coli*); Wasser ist daher das häufigste Molekül in lebenden Systemen und spielt aus verschiedenen Gründen eine zentrale Rolle. Die dreidimensionale (räumliche) Struktur von Biomolekülen, und damit auch ihre Funktion, ergibt sich im Zusammenspiel mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften des sie umgebenden Wassers. Die herausragende Eigenschaft der Wassermoleküle ist ihr Dipolcharakter und damit einhergehend die Fähigkeit, **Wasserstoffbrückenbindungen** untereinander oder mit anderen Molekülen einzugehen (Abb. 2.2). Einzelne Wasserstoffbrückenbindungen sind relativ schwach (ca. 23 kJ/mol) und daher wenig stabil beispielsweise im

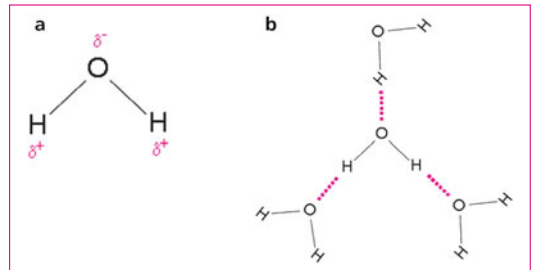


Abb. 2.2 (a) Struktur und Ladungsverteilung des Wassermoleküls. (b) Über Wasserstoffbrückenbindungen (punktierte Linien) interagierende Wassermoleküle

Vergleich zu einer kovalenten O–H-Bindung im Wassermolekül (ca. 470 kJ/mol). Dennoch reicht die darauf basierende Oberflächenspannung des Wassers aus, um beispielsweise ein Insekt wie den Wasserläufer (*Gerris lacustris*) zu tragen. Man kann sich Wasser als ein schnell fluktuierendes, dreidimensionales Netzwerk untereinander über Wasserstoffbrückenbindungen interagierender Moleküle vorstellen. Die Löslichkeit von Substanzen im Wasser hängt von ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit den Wassermolekülen ab. Moleküle mit polaren Gruppen oder ionischem Charakter sind sehr gut in Wasser löslich (diese Moleküle werden als **hydrophil** bezeichnet), im Gegensatz dazu sind apolare Substanzen wasserunlöslich und werden als **hydrophob** bezeichnet. Löslichkeitsunterschiede zwischen polaren und unpolaren Bereichen spielen eine fundamentale

Rolle bei der räumlichen Strukturierung und Stabilität von Biomolekülen wie z. B. Proteinen oder bei der Zusammenlagerung von Molekülen zu größeren Aggregaten (wie z. B. Lipidmembranen). Die Bildung dieser für die Funktionen lebender Systeme essenziellen Strukturen ist nur im Zusammenspiel mit dem Wasser erklärbar.

Von seinen Eigenschaften als Lösungsmittel abgesehen, spielen Wassermoleküle bzw. ihre Dissoziation in Wasserstoff-Ionen (H^+ , Protonen) und Hydroxid-Ionen (OH^-) als Reaktionsteilnehmer bei vielen biochemischen Reaktionen eine wichtige Rolle.

Das Ionenprodukt des Wassers ist die Grundlage der pH-Skala, die einen Bereich von pH 0 bis pH 14 für eine wässrige Lösung umfasst. Dabei beschreibt der Begriff pH (lat. *potentia hydrogenii*) definitionsgemäß den negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration ($-\log[H^+]$) einer wässrigen Lösung. Ein pH-Wert von 0 bzw. 14 besagt beispielsweise, dass die H^+ -Ionenkonzentration $10^0 = 1 \text{ mol l}^{-1}$ bzw. $10^{-14} \text{ mol l}^{-1}$ beträgt. Bei einem pH-Wert von 7,0 sind die H^+ -Ionen und die OH^- -Ionen in jeweils gleicher Konzentration von $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ vorhanden, die wässrige Lösung ist „neutral“. Eine Lösung mit $pH < 7,0$ ist sauer (H^+ -Ionenüberschuss), mit $pH > 7,0$ basisch (OH^- -Ionenüberschuss).

Schließlich stellt die oxidative Spaltung des Wassers zu O_2 und die Bindung des Wasserstoffs an Kohlendioxid bei der oxygenen Photosynthese von Pflanzen und Grünalgen ein Grundprinzip der Umwandlung der Energie der Sonnenstrahlung in chemisch nutzbare Energieformen wie Zucker (Kohlenhydrate) dar. Die Nutzung dieser chemisch gebundenen Energie in dem katabolen Stoffwechsel von aerob lebenden Zellen führt letztlich wieder zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Kapitel 2.2).

2.1.3 Vom Grundbaustein zur Zellstruktur

Die in den Zellen auftretenden molekularen Strukturen werden von verschiedenen Typen von Makromolekülen gebildet, die ihrerseits aus charakteristischen Bausteinen zusammengesetzt sind. Eine Auswahl der wichtigsten zellulären Makromoleküle und ihre molekularen Bausteine ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Die einzelnen Makromoleküle haben ganz unterschiedliche Aufgaben in der Zelle; entsprechend ist ihr molekularer Aufbau sehr unterschiedlich. Nucleinsäuren fungieren als Speicher genetischer Informationen und wurden bereits in Kapitel 1 genauer beschrieben. Die aus einzelnen Zuckermolekülen aufgebauten Polysaccharide dienen als Energiespeicher, wie das in Abbildung 2.3 schematisch dargestellte Glykogen, oder als Strukturelemente beispielsweise in pflanzlichen (Cellulose) oder bakteriellen (Murein = Peptidoglykan) Zellwänden. Wichtige Funktionen als kompakte Energiespeicher haben ebenfalls die in Abbildung 2.3 gezeigten, durch Verknüpfung von Glycerin mit drei Fettsäuren gebildeten Fette. Die einzelnen Fettsäurereste können unterschiedliche Länge haben und sich durch das Fehlen (gesättigte Fettsäuren) oder Vorhandensein (ungesättigte Fettsäuren) von Doppelbindungen unterscheiden. Im Gegensatz zu den Speicherfetten sind die nur zwei Fettsäureketten und eine hydrophile „Kopfgruppe“ tragenden Phospholipide Hauptbestandteile zellulärer Biomembranen. Aufgrund ihres amphipatischen Charakters bilden sie in wässriger Umgebung spontan sogenannte Lipiddoppelschichten (Abb. 2.3), die die Grundstrukturen von Biomembranen darstellen. Die anschließend genauer besprochenen Proteine schließlich bil-

Tabelle 2.1 Beispiele zellulärer Makromoleküle und deren Bausteine

Molekulare Komponente	Beispiel	Bausteine
Protein	Enzyme	Aminosäuren
Polysaccharid	Stärke	Zuckermonomere
Nucleinsäuren	mRNA	Zucker, Phosphat, Purin- und Pyrimidinbasen
Fette	Speicherfette	Glycerin, Fettsäuren
Membranen	Plasmamembranen	Lipide, Phosphat, Cholesterin, Proteine, Polysaccharide

den eine enorm wichtige Klasse von Makromolekülen, die Stoffwechselreaktionen katalysieren (Enzyme), maßgeblich den Stofftransport durch Biomembranen realisieren (Transportproteine), eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen wahrnehmen (Regulatorproteine) oder als Strukturelemente fungieren (Strukturproteine).

2.1.4 Aufbau der Proteine

Wie in Tabelle 2.1 gezeigt, sind Proteine aus **Aminosäure-Bausteinen** zusammengesetzt. Natürlich vorkommende Proteine enthalten in der Regel 20 verschiedene Aminosäuren (Abb. 2.4).

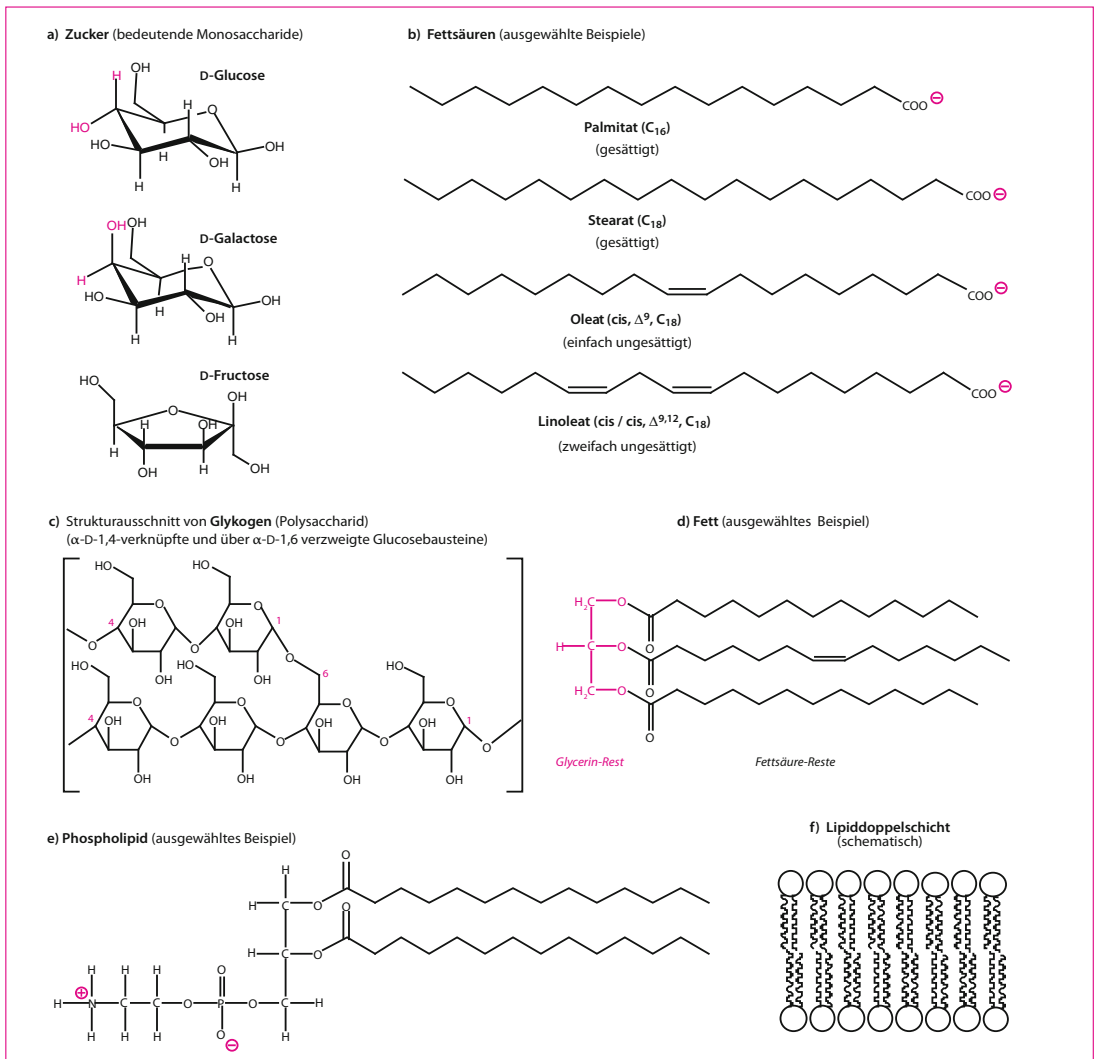
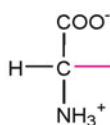
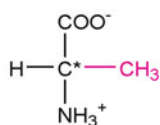


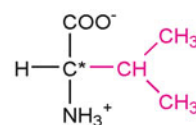
Abb. 2.3 Kohlenhydrate und Lipide. (a) Beispiele von monomeren Zuckern sowie (b) von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. (c) Ausschnitt aus der Struktur des Glykogens, einem in tierischen Zellen vorkommenden Polymer der Glucose. (d) Struktur eines durch Veresterung von drei Fettsäuremolekülen mit Glycerin gebildeten Neutralfettes. (e) Struktur eines Phospholipids. Der Phosphatrest mit dem damit veresterten Alkohol bildet die hydrophile „Kopfgruppe“ des Phospholipids, die beiden Fettsäurereste stellen den hydrophoben Teil des Moleküls dar. (f) Zusammenlagerung von Phospholipiden zu einer Membran (Lipiddoppelschicht). Die hydrophilen Kopfgruppen weisen nach außen (zum wässrigen Medium), die hydrophoben Fettsäurereste bilden das Innere der Membran

a) unpolare Seitenketten

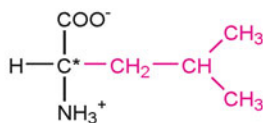
Glycin (Gly, G)



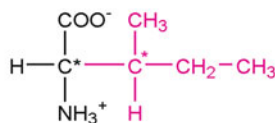
Alanin (Ala, A)



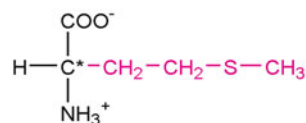
Valin (Val, V)



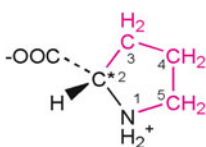
Leucin (Leu, L)



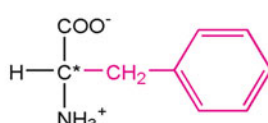
Isoleucin (Ile, I)



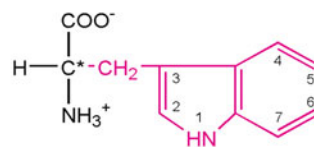
Methionin (Met, M)



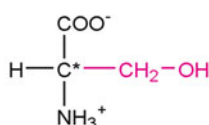
Prolin (Pro, P)



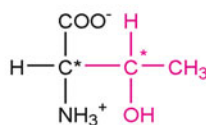
Phenylalanin (Phe, F)



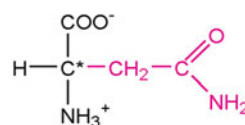
Tryptophan (Trp, W)

b) ungeladene polare Seitenketten

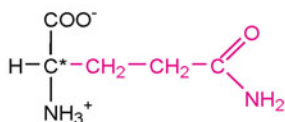
Serin (Ser, S)



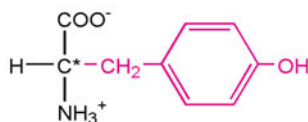
Threonin (Thr, T)



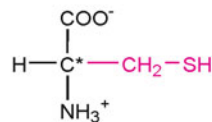
Asparagin (Asn, N)



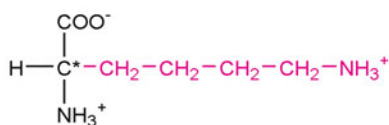
Glutamin (Gln, Q)



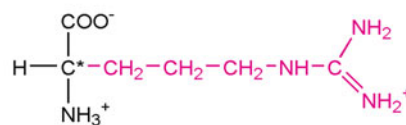
Tyrosin (Tyr, Y)



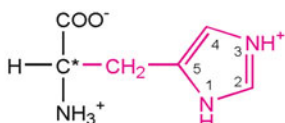
Cystein (Cys, C)

c) geladene polare Seitenketten

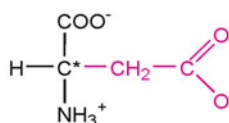
Lysin (Lys, K)



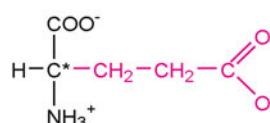
Arginin (Arg, R)



Histidin (His, H)



Asparaginsäure (Asp, D)



Glutaminsäure (Glu, E)

Abb. 2.4 Aminosäuren, die bei der Biosynthese von Proteinen am Ribosom kondensiert werden. (a) Unpolare (hydrophobe), (b) ungeladene, polare (hydrophile) und (c) geladene, polare (saure, basische) Aminosäuren. Es ist jeweils der Name und der international übliche Drei- bzw. Einbuchstaben-Code angegeben

Mit Ausnahme von Glycin sind alle Aminosäuren optisch aktiv (chiral), wobei die in Proteine eingebauten Aminosäuren ausschließlich die L-Konfiguration besitzen. Die gemeinsamen Strukturelemente sind die namensgebende Amino- und Carbonsäure-Funktion am C_α -Atom (Abb. 2.4). Die in Rot markierten Reste der Aminosäuren sind chemisch verschieden. Es gibt unpolare (hydrophobe), ungeladene polare (hydrophile) und geladene polare (saure, basische) Seitenketten. Prolin stellt eine Besonderheit dar, da es die Aminofunktion in einer Ringstruktur als Iminogruppe (sekundäres Amin) enthält und – eingefügt in eine Peptidkette – die strukturelle Flexibilität der Peptidkette und damit die von Proteinen einschränkt. Neben den beschriebenen 20 Standardamino-säuren können Proteine weitere „ungewöhnliche“ Aminosäuren enthalten, die durch eine nachträgliche (posttranslationale) enzymatische Modifikation der Polypeptidkette entstehen. Solch ungewöhnliche Aminosäuren in Proteinen sind beispielsweise das 4-Hydroxyprolin (in Pflanzenzellwänden oder im Collagen des Bindegewebes) oder 5-Hydroxylysin (im Collagen).

Die kettenförmige Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt in Form sogenannter **Peptidbindungen**, bei der die Carbonsäuregruppe (Carboxylgruppe) der einen Aminosäure mit der Aminogruppe der anderen Aminosäure formal unter Wasserabspaltung reagiert (Abb. 2.5a). Die Peptidbindungen sind aufgrund des Resonanzeffekts (Doppelbindungscharakter, in Abb. 2.5a nicht dargestellt) starr und planar und können sich nicht frei drehen, was für die spätere räumliche Anordnung der Polypeptidketten bedeutsam ist.

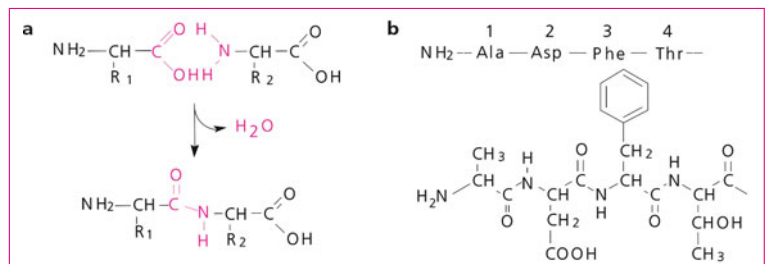
In Abbildung 2.5b ist exemplarisch der N-terminale Bereich der Aminosäuresequenz – die Abfolge der einzelnen Aminosäuren in einer Polypeptidkette – eines fiktiven Proteins dargestellt. Die Zählung und Darstellung beginnt per Konven-

tion jeweils bei der Aminosäure mit freier Amino-gruppe (Peptidsequenz; Aminoende wird links, Carboxylende rechts geschrieben). Das entspricht ebenfalls der Syntheserichtung eines Proteins am Ribosom. Die untereinander kovalent verknüpfte Aminosäuresequenz wird als **Primärstruktur** des Proteins bezeichnet. Die dreidimensionale Anordnung (Konformation) der drehbaren Bindungen der C-Atome in einer Aminosäuresequenz führt zu Bereichen mit **Sekundärstrukturen**. Dies sind üblicherweise helikale Bereiche, sogenannte α -Helices, oder β -Faltblattstrukturen innerhalb einer Proteinkette, die durch β -Schleifen (engl. *beta-turns*) oder zufällige Knäuel (engl. *random coils*) verbunden sind. Die übergeordnete und vollständige Anordnung der aufgezählten Sekundärstrukturen einer kovalent gebundenen Polypeptidkette zu einem dreidimensionalen Makromolekül wird als **Tertiärstruktur** bezeichnet und stellt den möglichen „Endzustand“ eines Proteins dar (monomeres Protein, das aus nur einer Polypeptidkette besteht).

Da die spontane „korrekte“ Faltung eines Proteins – und nur die ist biologisch aktiv – thermodynamisch höchst anspruchsvoll ist, gibt es für viele Proteine „Helferproteine“ (Chaperone), die bei ihrer Entstehung am Ribosom die korrekte Faltung unterstützen.

Besteht ein Protein aus zwei oder mehreren völlig gefalteten Polypeptidketten, so wird die korrekte dreidimensionale Anordnung der einzelnen Polypeptidketten zu biologisch aktiven dimeren oder multimeren Aggregaten als **Quartärstruktur** eines Proteins bezeichnet (multimeres Protein, das aus mehreren einzelnen Polypeptidketten besteht). Ein tetrameres Protein wie beispielsweise das menschliche Hämoglobin besitzt dementsprechend eine Quartärstruktur und ist aus vier Untereinheiten (vier Polypeptidketten) zusammengesetzt, von denen jeweils

Abb. 2.5 (a) Verknüpfung von Aminosäuren über eine Peptidbindung; (b) Sequenzausschnitt eines Proteins



zwei identisch sind (zwei α -Ketten und zwei β -Ketten). Das intakte Hämoglobin stellt somit einen $\alpha_2\beta_2$ -Proteinkomplex dar.

Durch Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen oder Untersuchungen löslicher Proteine mittels NMR-Spektroskopie sind inzwischen von vielen Proteinen die relativen Raumkoordinaten sämtlicher Atome und damit ihre Tertiär- (bei monomeren Proteinen) bzw. Quartärstruktur (bei multimeren Proteinen) bestimmt worden.

Die spezifische dreidimensionale Proteinstruktur wird durch eine Reihe von Wechselwirkungen herbeigeführt und stabilisiert. Einen bedeutenden Beitrag leistet hierbei der sogenannte „**hydrophobe Effekt**“. Bei der Assoziation hydrophober Aminosäureseitengruppen im Protein werden die polaren Wassermoleküle aus der Grenzschicht verdrängt. Als Konsequenz sind bei gelösten Proteinen die hydrophoben Seitenketten meist nach innen zueinander ausgerichtet, die hydrophilen Seitenketten dagegen nach außen zum umgebenden Wasser hin. Im Inneren der Proteinstruktur sind nur wenige Wassermoleküle vorhanden. Des Weiteren spielen unterschiedliche Typen elektrostatischer Interaktionen eine Rolle. Die nur über sehr kurze Distanzen wirkenden **Van-der-Waals-Wechselwirkungen** sind zwar sehr schwach, sie spielen jedoch im dicht gepackten Inneren von

Proteinen oder bei der Interaktion eines Proteins mit einem Liganden (Abschnitt 2.1.5) nach dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip (z. B. Antikörper – Antigen) eine wichtige Rolle. **Wasserstoffbrückenbindungen** verknüpfen benachbarte Aminosäuren über die freien Elektronenpaare von Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Atomen und einem Wasserstoffatom. Für den Sauerstoff ergeben sich beispielsweise die Wasserstoffbrückenbindungsmöglichkeiten von $R=O \cdots H-N-R$ oder $R=O \cdots H-O-R$ -Ketten. Eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung führt zu einer im Vergleich zur kovalenten Verknüpfung geringfügigen Stabilisierung. Da aber enorm zahlreiche solcher Bindungen in einem Proteinmolekül auftreten, kann die Stabilisierung beträchtlich sein (vgl. Aufbau der DNA, Kapitel 1). So gibt es repetitive Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den starren Peptidbindungen des Proteinrückgrats, die zu stabilen geordneten Strukturen, den α -Helices und β -Faltblattstrukturen, führen (s. o.). Ferner treten **ionische Bindungen** zwischen entgegengesetzt geladenen Aminosäureresten (Salzbrücken) oder zwischen Metall-Ionen (anorganische Cofaktoren, s. u.) und negativ geladenen Aminosäureresten (Asp, Glu) in Proteinen auf und bestimmen die Struktur mit. Neben hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen spielen bei

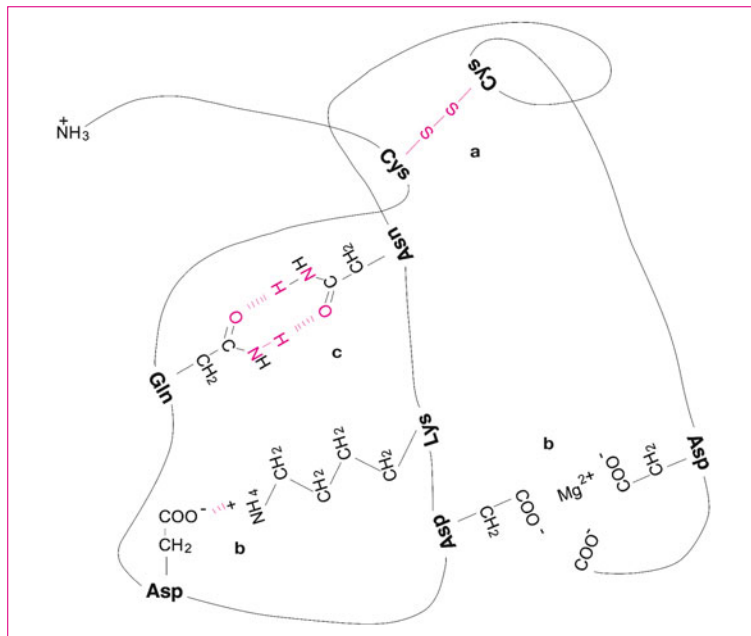


Abb. 2.6 Beispiele von Wechselwirkungskräften innerhalb einer Proteinkette. (a) Disulfidbrücken; (b) ionische Wechselwirkungen; (c) Wasserstoffbrücken

diversen Proteinen außerdem spezielle chemische Quervernetzungen eine bedeutende Rolle. Dies sind **Disulfidbrücken**, also kovalente Schwefel-Schwefel-Verknüpfungen zwischen zwei Cysteinresten (zwei oxidierte Cysteinreste = dimeres Cystin) der Proteinsequenz. Zusätzlich können auch noch **Metallchelatkomplexe** durch Histidin- und Cysteinreste mit Metall-Ionen stabile, für die Struktur des Proteins essenzielle Quervernetzungen bilden. Abbildung 2.6 zeigt schematisch einige der erwähnten Interaktionen.

2.1.5 Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und -funktion

Jedes Protein ist ein dynamisches Makromolekül und besitzt eine ihm eigene dreidimensionale Struktur (Konformation, s. o.), die für seine Funktion maßgeblich ist. Proteine sind bewegliche Moleküle. Die Funktionsweise eines Proteins basiert fast ausschließlich auf Wechselwirkungen (Interaktionen) mit bestimmten anderen Molekülen, den **Liganden**, die einen gezielten Einfluss auf die dreidimensionale Struktur und damit auf die Proteinfunktion ausüben. Liganden sind beliebige Moleküle – es können auch andere Proteine sein –, die **reversibel** an das Protein binden. Entscheidend für die Interaktion von einem Liganden und einem Protein ist ihre strukturelle Komplementarität. Liganden verursachen eine Konformationsänderung am Protein, die **induced fit** (engl.) oder induzierte Anpassung genannt wird. Im Folgenden werden zwei Beispiele von Liganden-Protein-Wechselwirkungen besprochen, die intensiv erforscht und verstanden sind und an denen sich viele Aspekte der Funktionsweise von Proteinen zeigen lassen. Die biokatalytisch aktiven Enzyme sind ein Spezialfall der Proteinfunktion, technologisch äußerst bedeutend und werden anschließend ab Abschnitt 2.1.6 näher behandelt.

Myoglobin und Hämoglobin sind Proteine, die den Sauerstoff im Gewebe höherer Tiere transportieren. Myoglobin kommt besonders reichlich in den Muskeln von tauchenden Säugetieren (Robben, Walen) und sogar in einigen einzelligen Organismen vor. Es ist ein monomeres Protein aus einer Polypeptidkette (153 Aminosäuren) und besitzt einen Cofaktor (s. u.), eine Hämgruppe (Porphyrinringsystem) mit einem Fe^{2+} -Atom im Zentrum.

Die reversible Bindung des Sauerstoffs (Ligand, L) an das Myoglobin (Protein, P) erfolgt über die Hämgruppe, die in einer inneren „Proteintasche“ aus α -Helices im Inneren des Proteins liegt. Die biologische Aufgabe des Myoglobins besteht nun in der Bindung des O_2 in sauerstoffreicher Umgebung und Abgabe des O_2 in sauerstoffarmer Umgebung. Es wird durch die einfache Gleichgewichtsbeziehung $\text{P} + \text{L} \rightleftharpoons \text{PL}$ ausgedrückt. Diese Reaktion ist durch eine charakteristische Gleichgewichtskonstante $K_d = [\text{P}][\text{L}]/[\text{PL}]$ beschrieben, die die Einheit einer molaren Konzentration ($\text{M} = \text{mol l}^{-1}$) trägt und die genau die Konzentration des Liganden angibt, bei der 50 % des Liganden am Protein binden. Oder anders ausgedrückt: K_d ist die Konzentration eines Liganden, bei der die Hälfte aller verfügbaren Ligandenbindungsstellen am Protein besetzt sind. Je kleiner also K_d , umso höher ist die Affinität des Liganden zum Protein. Durch die spezielle dreidimensionale Struktur von Myoglobin ist K_d von O_2 so niedrig, dass erst bei geringen O_2 -Konzentrationen in der Umgebung die O_2 -Moleküle abgegeben werden und dadurch das Gewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird.

Mit dem Hämoglobin, das für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich ist und in den roten Blutzellen (Erythrocyten) vorkommt, verhält es sich ähnlich. Allerdings handelt es sich um ein tetrameres Protein aus vier Untereinheiten (zwei α - und zwei β -Untereinheiten; quartäre Struktur), besitzt also vier Hämgruppen. Das Besondere ist jetzt, dass sich die Untereinheiten in ihrer Bindung zum O_2 gegenseitig beeinflussen. Hat eine Untereinheit ein O_2 -Molekül gebunden, so ändert sich seine Konformation, und dies beeinflusst direkt die Konformation der benachbarten Untereinheiten, die dann weitere O_2 -Moleküle leichter aufnehmen können und somit eine höhere Affinität zu O_2 besitzen (K_d wird kleiner). Beim Hämoglobin ist die Dissoziationskonstante (K_d) für Sauerstoff der einzelnen Untereinheit also abhängig davon, ob die anderen Untereinheiten bereits O_2 gebunden haben oder nicht. Die Beeinflussung einer Ligandenbindung auf die Bindung anderer Liganden an einer anderen Stelle eines Proteins wird **Allosterie** genannt. Im Fall von Hämoglobin ist dieser allosterische Effekt unter den Untereinheiten positiv koopera-

tiv, d. h. weitere Bindungen der Liganden werden erleichtert. Die Ursache für den allosterischen Effekt liegt also in den durch eine Ligandenbindung verursachten Konformationsänderungen bei einem multimeren Protein. Allosterische Effekte spielen bei einigen Enzymen im Stoffwechsel eine besondere Rolle, da im Fall der Enzyme nicht nur die Bindungseigenschaften von Liganden, sondern auch die Katalysegeschwindigkeit (Reaktionsgeschwindigkeit) positiv oder negativ beeinflusst werden kann (Kapitel 3).

Sehr niedrige Dissoziationskonstanten (K_d) zwischen Proteinen und ihren Liganden sind für Antikörper (Y-förmige Immunglobuline der Wirbeltiere) und ihre Antigene bekannt. Die Werte für K_d liegen zwischen 10^{-8} und $10^{-12} \text{ mol l}^{-1}$. Die biologische Funktion der Antikörper besteht gerade in der spezifischen, „festen“ Bindung von für den Körper fremden Molekülen, den Antigenen. Hier ist das bereits erwähnte Schlüssel(Antigen)-Schloss(Antikörper)-Prinzip gut zutreffend, man sollte dabei nur bedenken, dass die Antikörper (Schloss) die Antigene (Schlüssel) aktiv binden, um sie für den Organismus unschädlich zu machen.

Eine der stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der Biochemie ist für das Protein Avidin (Bestandteil im Eiweiß) mit dem Coenzym Biotin (Ligand) mit $K_d = 10^{-15} \text{ mol l}^{-1}$ beschrieben. Biotin ist ein für enzymatische Carboxylierungen essenzielles Coenzym, und das Avidin im Eiklar scheint als eine Art molekularer Abwehrmechanismus gegen bakterielles Wachstum zu wirken.

Eine andere, in der Zelle vorkommende Möglichkeit der reversiblen Strukturveränderung von Proteinen ist die **kovalente Modifikation** von bestimmten Aminosäureseitenketten, beispielsweise die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Diese reversible Reaktion wird von speziellen Enzymen, den Proteinkinasen, durchgeführt. Durch die Phosphorylierung (d. h. Einfügen zusätzlicher negativ geladener Gruppen) an den Aminosäureresten werden zusätzliche elektrostatische Interaktionen ermöglicht, die einen gezielten Einfluss auf die Struktur und die Eigenschaften der Proteinfunktionen ausüben. Die Reversibilität der Modifikation wird durch weitere Enzyme (Phosphatasen) erreicht, die die Phosphatreste wieder entfernen. Neben Phosphorylierungen existieren noch andere Modifikationen (z. B. Acetylierungen, Me-

thylierungen), die jeweils durch spezifische Enzyme eingeführt bzw. wieder entfernt werden.

Manchmal werden Proteinstrukturen auch durch hydrolytische Abspaltung (Proteolyse) einer oder mehrerer Polypeptidstücke gezielt **irreversibel** verändert, damit das dann erzeugte verkürzte Protein sich umfaltet und überhaupt erst biologisch aktiv wird. So werden beispielsweise die proteolytischen Verdauungsenzyme Pepsin und Chymotrypsin als inaktive Vorstufen (Zymogene) Pepsinogen und Chymotrypsinogen in den sekretorischen Zellen des Magens bzw. des Pankreas gebildet. Nach Transport dieser **Zymogene** an ihren Wirkort (Magen, Dünndarm), der unter anderem einen niedrigeren pH-Wert aufweist, erfolgt die enzymatische bzw. autokatalytische Abspaltung definierter Aminosäuresequenzen. Es ordnen sich wesentliche Bereiche der Proteinstruktur um, und die Proteine werden biologisch aktiv. Durch diese Art „Regulationsprinzip“ wird ein Selbstverdau der Gewebe, die die proteolytischen Enzyme herstellen, vermieden.

Es gibt aufgrund der oben dargestellten Aspekte einen unbestrittenen, klaren Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und -funktion. Wird allgemein die natürliche dreidimensionale Struktur von Proteinen zerstört, beispielsweise durch Erhitzen, stärkere Änderungen des pH-Wertes oder die Anwesenheit von chemisch reaktiven Agenzien, gehen die biologischen Funktionen dauerhaft verloren, und man spricht von **Denaturierung**.

Aus diesem Grund wählt man bei der technologischen Aufreinigung und Isolierung von Proteinen nach Möglichkeit Bedingungen, die ihre Struktur und damit ihre biologische Aktivität erhalten. Dazu gehört allgemein das Arbeiten bei niedrigen Temperaturen ($+4^\circ\text{C}$ bis $+10^\circ\text{C}$) und das Einstellen eines pH-Wertes in der Proteinlösung in der Nähe des pH-Optimums des Proteins (pH-Wert, an dem die maximale biologische Aktivität vorliegt).

2.1.5.1 pH-Abhängigkeit der Proteinfunktion

Der pH-Wert einer wässrigen Flüssigkeit bestimmt die Ladungseigenschaften der sauren bzw. basischen Seitenketten der Proteine. Dieses hat einen direkten Einfluss auf die Struktur und damit die Funktion eines Proteins. Abbildung 2.7a zeigt die Ladungsänderung einiger Aminosäureseitenketten

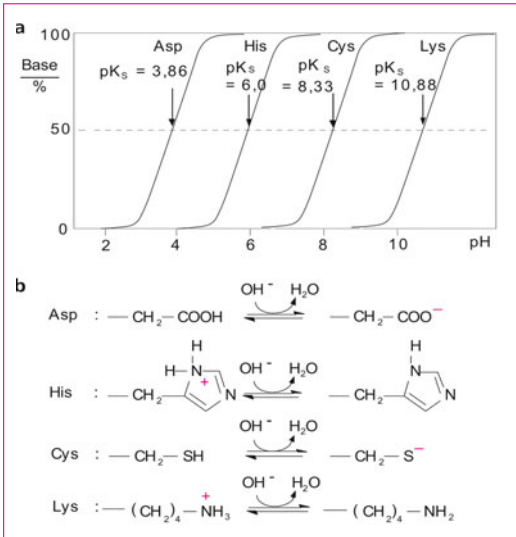


Abb. 2.7 (a) Abhängigkeit der Ladung von bestimmten Aminosäureseitenketten vom pH-Wert des Milieus und (b) dabei stattfindende Reaktionen der Seitenketten. Die basischen Formen stehen auf der rechten Seite

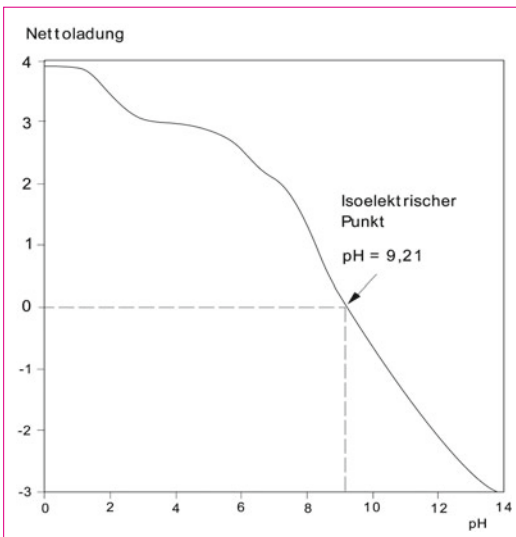


Abb. 2.8 Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert des Milieus. Der isoelektrische Punkt (IP) dieses Proteins liegt bei pH 9,21

in Abhängigkeit vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Bei einem niedrigen, sauren pH-Wert sind die freien Carbonsäure- und Aminogruppen protoniert, d. h. neutral bzw. positiv geladen (z. B.

R-COOH und R-NH₃⁺). Mit steigendem pH-Wert werden von den Carbon- und Aminosäuregruppen H⁺-Ionen abgespalten, dabei nimmt der Anteil der basischen Formen, d. h. die Anzahl negativ bzw. neutral geladener Aminosäureseitenketten, zu (z. B. R-COO⁻ und R-NH₂). Die Teilreaktionen, die bei steigendem pH-Wert stattfinden, sind in Abbildung 2.7b angegeben. Ist der pH-Wert gleich dem angegebenen pK_s-Wert der dargestellten Aminosäureseitenketten, so liegen gleich viel protonierte und deprotonierte Moleküle vor.

Diese pH-abhängige Änderung der Ladung von Seitenketten in einem Protein und die damit einhergehende Änderung der Proteinstruktur ist der Grund für die pH-Abhängigkeit der Proteinaktivität. Deshalb ist eine optimale Proteinaktivität oftmals nur in einem relativ engen pH-Bereich gegeben.

Je nach Gesamtanzahl an ionisierbaren Aminosäureseitenketten in einem Protein und in Abhängigkeit des pH-Wertes der umgebenden Lösung ergibt sich die Gesamtnettoladung eines Proteins. Der pH-Wert, bei dem ein Proteinmolekül gleich viel negative und positive Ladungen trägt, insgesamt also keine Nettoladung trägt, wird als **isoelektrischer Punkt** (IP) bezeichnet (Nettoladung = 0). Bei diesem charakteristischen pH-Wert für ein Protein findet folglich keine Wanderung in einem elektrischen Feld einer Gelelektrophorese, einer häufig verwendeten analytischen Methode zur Proteincharakterisierung, statt. Ist die Sequenz eines Proteins bekannt, so kann der isoelektrische Punkt aus den Daten der einzelnen Aminosäureseitenketten berechnet werden. Abbildung 2.8 zeigt die Berechnung der Nettoladung eines basischen Proteins mit einem isoelektrischen Punkt von pI = 9,21. In der Regel ist die Löslichkeit eines Proteins an seinem isoelektrischen Punkt am geringsten. Diese Eigenschaft kann bei der Aufreinigung von Proteinen durch eine fraktionierte Fällung genutzt werden.

2.1.5.2 Temperaturabhängigkeit der Proteinfunktion

Neben der eben angesprochenen pH-Abhängigkeit ist die Proteinstruktur und damit die Funktion des Proteins temperaturabhängig. Dies lässt sich am eindrucksvollsten bei den für die Katalyse verantwortlichen Proteinen, den Enzymen, zeigen

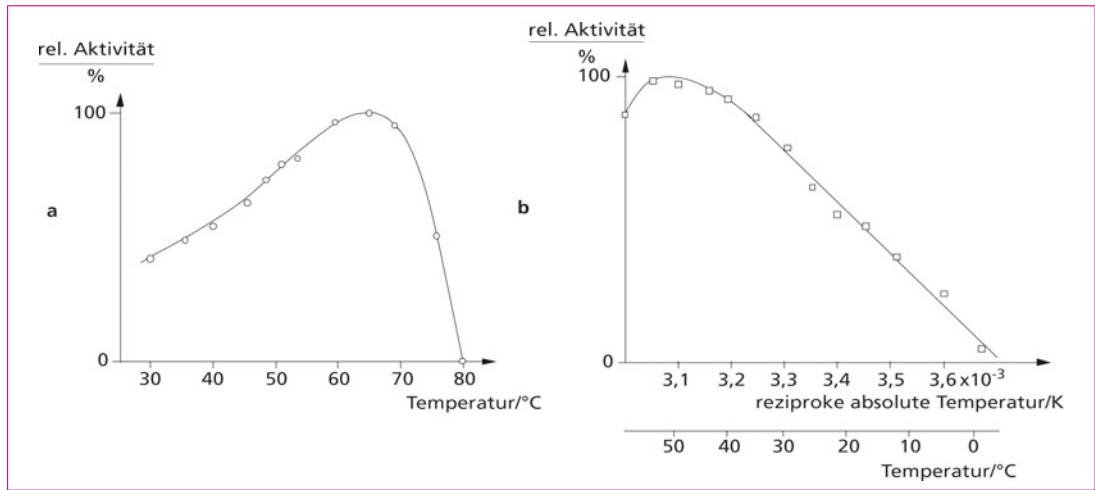


Abb. 2.9 (a) Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität eines Enzyms; (b) Darstellung der Temperaturabhängigkeit von β -Galactosidase (alternativer Name Lactase) nach Arrhenius (nach Hartmeier 1986)

(Abb. 2.9). Mit zunehmender Temperatur nimmt die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit zunächst, wie erwartet, zu. Mit steigender Temperatur tritt jedoch ebenfalls eine verstärkte Rotations- und Schwingungsanregung der Molekülketten im Protein auf, die die geordnete Proteinstruktur beeinflusst und ab einem gewissen Punkt zerstört. Wie bereits erwähnt, spricht man im Fall der Zerstörung der Struktur von einer Denaturierung des Proteins, die einen irreversiblen Verlust der biologischen Aktivität zur Folge hat.

Die **aktivierende Wirkung** der Temperatur auf die enzymkatalysierte Reaktion lässt sich analog zu den durch chemische Katalysatoren katalysierten Reaktionen in einer Darstellung nach Arrhenius analysieren (Abb. 2.9b). Die Aktivität der Enzyme, logarithmisch über der reziproken absoluten Temperatur aufgetragen, ergibt bei niedrigen Temperaturen eine Gerade, aus deren Steigung die Aktivierungsenergie für die Reaktion berechnet werden kann. Diese liegt bei den meisten technisch eingesetzten hydrolytischen Enzymen im Bereich von 10 bis 100 kJ/mol. Aus der Steigung der durch den abfallenden Kurvenzweig bei hohen Temperaturen gelegten Geraden lässt sich entsprechend eine „Inaktivierungsenergie“ des Proteins berechnen, die typischerweise bei 200 bis 400 kJ/mol liegt.

Am Scheitelpunkt der Kurve, dem Temperaturoptimum, findet oftmals bereits eine merkliche

Inaktivierung des Enzyms statt, d. h. die für ein enzymatisches Verfahren optimale Temperatur ist meist niedriger und richtet sich nach der Temperaturstabilität des Proteins und der erforderlichen Einsatzdauer. Die Stabilität von Enzymen kann entscheidend durch eine Immobilisierung an einen Träger erhöht werden, da die Proteinstruktur stabilisiert wird. Abbildung 2.10 zeigt beispielhaft die Inaktivierungskinetik eines auf einem Träger immobilisierten Enzyms bei 40 °C bzw. 50 °C. Der Stoffumsatz im Reaktor ist durch die Fläche unter der Kurve gegeben. Bei kurzer Dauer der Reaktion (< 10 h) ist die höhere Temperatur günstiger, bei längerer Versuchsdauer sind 40 °C günstiger. Mithilfe des bei verschiedenen Temperaturen gewonnenen Inaktivierungskoeffizienten kann der optimale Umsatz und damit die für den Prozess optimale Temperatur abgeschätzt werden.

Die **irreversible Denaturierung** der Proteine von Zellen bei hohen Temperaturen führt zu deren Abtötung und wird bei der Hitzesterilisation von Kulturmedien verwendet. Dabei ist zu beachten, welche Organismen in einem bestimmten Medium zu erwarten sind. Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, können thermotolerante Bakterien bzw. Archaeen aus heißen Tiefseequellen noch bei Temperaturen bis 115 °C leben, sie besitzen somit sehr thermostabile Proteine. Ferner sind die Sporen einiger Bakterien ebenfalls hitzeresistent und werden erst bei über 120 °C völlig abgetötet.

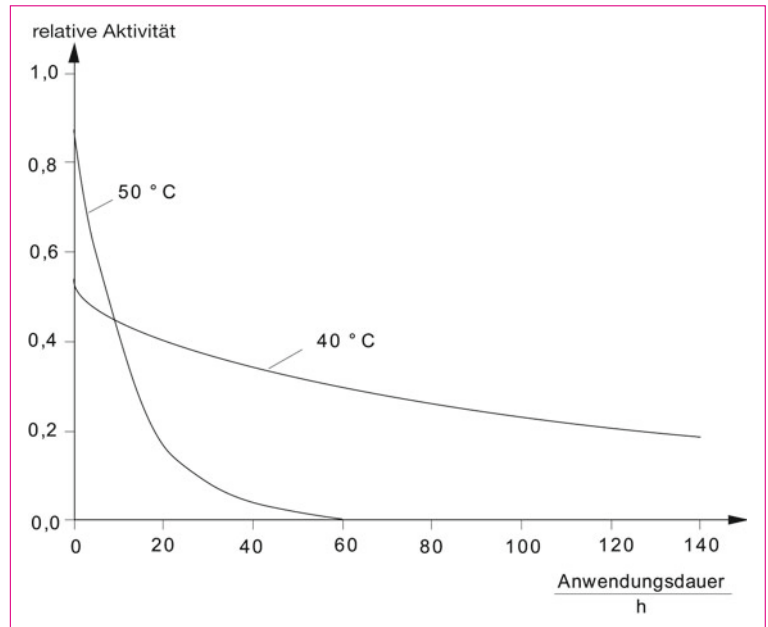


Abb. 2.10 Aktivitätsverlauf einer immobilisierten Glucoamylase über die Anwendungsdauer (nach Hartmeier 1986)

2.1.6 Proteine als Biokatalysatoren (Enzyme)

Die meisten in der lebenden Zelle vorkommenden Proteine fungieren als makromolekulare Biokatalysatoren und sind von essenzieller Bedeutung für alle Stoffwechselvorgänge. Katalytisch aktive Proteine werden, wie bereits zuvor mehrfach erwähnt, als **Enzyme** bezeichnet und sind an fast allen chemischen Reaktionen in den Zellen beteiligt (**intrazelluläre Enzyme**). Dies bedeutet, dass Tausende von enzymkatalysierten Reaktionen gleichzeitig und nebeneinander in jeder Zelle ablaufen. Zusätzlich können Enzyme – häufig die für Abbaureaktionen verantwortlichen Enzyme wie die „Hydrolasen“ – mittels spezieller Transportproteine aus der Zelle ausgeschleust werden, um in der Umgebung der Zelle Reaktionen zu katalysieren (**extrazelluläre Enzyme**). So werden beispielsweise von diversen Mikroorganismen Cellulasen oder Proteasen ausgeschieden, um Cellulose oder Proteinaggregate in der Zellumgebung in ihre monomeren Bausteine Glucose bzw. Aminosäuren zu zerlegen. Diese Bausteine werden dann wiederum über andere Transportproteine in die Zelle aufgenommen

und dienen der Zelle als wertvolle Energie- und Nährstoffe für die Lebenserhaltung, das Wachstum und die Vermehrung.

Enzyme sind, wie die anderen Proteine auch, an die Bedingungen des Lebens angepasst. Das bedeutet, dass sie je nach Lebensraum der einzelnen Organismen bei -20°C bis zu $+100^{\circ}\text{C}$, bei pH-Wert 1 bis 12 in wässriger Lösung und bei Atmosphärendruck katalytisch aktiv sein können. Da die meisten Organismen mesophil zwischen $+10^{\circ}\text{C}$ und $+50^{\circ}\text{C}$ und bei einem pH-Wert von 5 bis 8 leben, sind auch die meisten Enzyme an diese Bedingungen angepasst. Die Archaeobakterien besiedeln jedoch auch extreme Standorte (Kapitel 1) und besitzen deshalb an diese Bedingungen speziell angepasste Enzyme. Eine zuckerspaltende β -Glykosidase des thermophilen Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* ist beispielsweise bei 70°C bis 100°C hochaktiv und über mehrere Tage stabil, da dies der „natürliche“ Lebenstemperaturbereich dieses Organismus ist, der unter anderem im Schlamm von Geysiren anzutreffen ist. Die Enzyme des Menschen sind hingegen an konstante ca. 37°C angepasst, zwischen etwa 25°C und 42°C aktiv und sehr labil bei Temperaturen oberhalb von 40°C .

Die **Bezeichnung eines Enzyms** richtet sich nach der von ihm katalysierten Reaktion und den beteiligten Substraten. Ein Enzym, das Glucose oxidiert, wird mit dem Trivialnamen Glucose-Oxidase bezeichnet; ein Enzym, das Phosphat abspalten kann, mit dem Trivialnamen Phosphatase usw. Die Trivialnamen von Enzymen sind jedoch zu unpräzise. Die wissenschaftlich korrekte Nomenklatur für Enzyme ist durch die Enzymkommission international festgelegt (International Union of Biochemistry and Molecular Biology; IUBMB). In Tabelle 2.2 sind die sechs Hauptklassen der Enzyme aufgeführt. Jedem Enzym ist eine EC-Nummer zur eindeutigen Kennzeichnung zugeordnet. Die erste Ziffer gibt eine der sechs Hauptklassen an, d. h. den übergeordneten Reaktionstyp. Unterschieden werden Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. Die zweite und dritte Zahl definieren die katalysierte Reaktion genauer, und die letzte Zahl ist die laufende Nummer des Enzyms innerhalb der Unterklasse. So wird die oben genannte Glucose-Oxidase (Oxidoreduktase) unter EC 1.1.3.4 geführt und mit dem systematischen Namen „ β -D-Glucose:Oxygen 1-Oxidoreduktase“ bezeichnet. Man sollte daher in wissenschaftlichen Berichten unter anderem immer zu Beginn die korrekte EC-Nummer des Enzyms nennen. Dieselbe EC-Nummer wird für die gleichen Enzyme aus verschiedenen Organismen und mit verschiedenen Eigenschaften (Aminosäuresequenz, Substratspektrum, pH-Optimum, Temperaturoptimum etc.) vergeben, z. B. für die Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Entscheidend ist, dass die Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren. Es ist deshalb unbedingt notwendig, die „Herkunft“ (Quelle) des Enzyms mit anzugeben, d. h. den Organismus zu nennen, aus dem das Enzym stammt, isoliert und untersucht wurde.

Neben den Proteinen können prinzipiell auch andere Biomoleküle katalytische Eigenschaften zeigen, wie die in Kapitel 1 angesprochenen Ribozyme, die aus RNA-Molekülen bestehen (Abschnitt 1.1.3). Der Begriff „Biokatalysator“ bezeichnet in der Technologie nicht immer nur ein „Enzym“. Es können auch biokatalytisch eingesetzte ganze Zellen, Zellfragmente oder immobilisierte Zellen bzw. Enzyme damit gemeint sein.

Tabelle 2.2 Auszug aus dem System zur Klassifizierung der Enzyme, festgelegt durch die internationale Enzymkommission (IUBMB) (modifiziert nach Kula, in Präve et al. 1987). Es gibt sechs Hauptklassen, die weiteren Unterklassen sind nicht vollständig aufgeführt (s. Text). Die aktuell vollständige Klassifizierung ist im Internet frei zugänglich einzusehen (<http://www.expasy.ch/enzyme/>)

1.	Oxidoreduktasen – katalysieren Oxidations-Reduktionsreaktionen durch Übertragung von Wasserstoff und/oder Elektronen
1.1	für -CH-OH-Gruppen
1.2	für -C=O-Gruppen
1.3	für -CH=CH-Gruppen
1.4	für -CH-NH ₂ -Gruppen
1.5	für -CH-NH-Gruppen
1.6	für NADH; NADPH
2.	Transferasen – katalysieren die Übertragung von funktionellen Gruppen
2.1	Gruppen mit einem C-Atom
2.2	Aldehyd- oder Keton-Gruppen
2.3	Acygruppen
2.4	Glykosylgruppen
2.7	Phosphatgruppen
2.8	Schwefel enthaltende Gruppen
3.	Hydrolasen – katalysieren hydrolytische Reaktionen
3.1	Ester
3.2	Glykosidische Bindungen
3.4	Peptidbindungen
3.5	andere C-N-Bindungen
3.6	Säureanhydride
4.	Lyasen – katalysieren Abspaltungsreaktionen auf nicht-hydrolytischem Wege unter Zurücklassung einer Doppelbindung bzw. die Anlagerung von Gruppen an Doppelbindungen
4.1	-C=C-
4.2	-C=O
4.3	-C=N-
5.	Isomerasen – katalysieren reversible Umwandlungen isomerer Verbindungen
5.1	Racemasen
6.	Ligasen (Synthetasen) – katalysieren die kovalente Verknüpfung zweier Moleküle unter Spaltung einer energiereichen Verbindung (ATP)
6.1	C-O
6.2	C-S
6.3	C-N
6.4	C-C

2.1.7 Enzymkatalyse

Enzyme sind „echte“ Katalysatoren. Sie gehen aus der von ihnen katalysierten Reaktion unverändert hervor und stellen in extrem kurzer Zeit das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion her (s. u.). Enzyme beschleunigen die Geschwindigkeit einer von ihnen katalysierten Reaktion um einen Faktor von 10^8 bis 10^{20} und dies unter moderaten pH- und Temperaturbedingungen. Die Moleküle, die mit den Enzymen interagieren (wechselwirken) und dabei chemisch verändert werden, bezeichnet man als **Substrate** und nicht, wie ansonsten allgemein bei Proteinen üblich, als Liganden.

Besonders bemerkenswerte und herausragende Eigenschaften der Enzyme sind ihre **Selektivitäten**. Jedes Enzym katalysiert in der Regel nur einen Reaktionstyp (**reaktionsselektiv**) an einer bestimmten Stelle des Substratmoleküls (**regioselektiv**), auch wenn mehrere gleich reaktive Gruppen im Substratmolekül vorkommen. Enzyme sind weiterhin **stereoselektiv**, d. h. sie unterscheiden zwischen der enantiomeren D- und L-Form der Aminosäuren und Zucker bzw. der R- und S-Form anderer chiraler Substanzen (R,S ist die allgemeine Nomenklatur für Enantiomere nach der Cahn-Ingold-Prelog-Regel). Zudem muss ein Substratmolekül eine partielle, strukturelle Komplementarität zum **aktiven Zentrum** des Enzyms – das ist die Stelle am Protein, an der das Substrat bindet und die Reaktion abläuft – aufweisen, da es ansonsten nicht als Substrat akzeptiert wird (**substratselektiv**).

Die strukturelle Toleranz, die ein Enzym für seine Substrate besitzt, kann je nach Herkunft und Aufgabe des Enzyms variieren. Man spricht demgemäß von einem breiten oder engen **Substratspektrum**. So setzt beispielsweise die Hexokinase (EC 2.7.1.1; ATP:D-Hexose 6-Phosphotransferase; erstes Enzym in der Glykolyse, s. Abb. 2.20) von *E. coli* strukturell ähnliche Substrate wie D-Glucose, D-Fructose und D-Mannose mit ATP zu den entsprechenden D-Hexose-6-phosphaten um. Die Aspartase (EC 4.3.1.1; L-Aspartat:Ammonium-Lyase) von *E. coli* akzeptiert hingegen nur L-Aspartat als Substrat, sie ist somit spezifisch für ein einziges Substratmolekül.

Die enorme Selektivität von Enzymen ermöglicht in wässriger Lösung gezielte Reaktionen in komplexen Reaktionsgemischen und ohne die

Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Enzyme sind aufgrund all dieser Eigenschaften für biotechnologische Anwendungen in Bioreaktoren von größtem Interesse. Im Folgenden soll das allgemeine Prinzip der Enzymkatalyse erläutert werden.

Bei jeder chemischen Reaktion muss zuerst eine Energiebarriere überwunden werden, damit bestehende Bindungen an einem Molekül aufgebrochen und neu verknüpft werden können und die Reaktion abläuft. Die dafür notwendige Energie wird als **Aktivierungsenergie** (ΔG^\ddagger) bezeichnet (Abb. 2.11a). Der Punkt mit dem höchsten Energiewert kennzeichnet den labilen Übergangszustand $[S^\ddagger]$ des reagierenden Moleküls bei der entsprechenden Reaktion ($S \rightarrow P$), der erreicht werden muss, damit sich aus einem Edukt S ein Produkt P bilden kann. Bei der hydrolytischen Spaltung einer Peptidbindung (Amidbindung), die wir als Beispiel betrachten wollen, ist der **Übergangszustand** der Reaktion beispielsweise durch ein tetraedrisches C-Atom gekennzeichnet (Abb. 2.12). Es müssen drastische Reaktionsbedingungen gewählt werden, damit die Peptidbindungen in Proteinen chemisch hydrolysiert werden (6 M HCl, 100 °C, mehrere Stunden).

Beachtet werden muss zudem, dass aus thermodynamischen Gründen eine Reaktion nur dann spontan ablaufen kann, wenn das Energieniveau des entstehenden Produktes (P) niedriger ist, als das des Eduktes (S). Bei solch einer Reaktion wird Energie freigesetzt, es resultiert ein negatives ΔG ($-\Delta G$) und die Reaktion ist **exergon**. Wäre hingegen das Energieniveau des Produktes höher als das des Eduktes, würde man für die Reaktion Energie benötigen. Es resultierte ein positives ΔG ($+\Delta G$) für die Reaktion, die **endergon** wäre und ohne Energiezufuhr nicht spontan ablaufen würde. Das ΔG einer Reaktion hängt von den Bedingungen (Temperatur, Druck, Konzentrationen) ab und wird durch die Ableitung der Gibbs-Funktion beschrieben.

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \cdot \ln \frac{[\text{Produkte}]}{[\text{Edukte}]}$$

(Ableitung der Gibbs-Funktion)

Dabei beschreibt $\Delta G^{0'}$ die biologisch verfügbare Energie der Reaktion unter Standardbedingungen (25 °C; 1 bar Druck; pH 7,0; 1 M der Stoffe), R die Gaskonstante, T die Temperatur und $[\text{Pro-}]$

dukte] bzw. [Edukte] die Konzentrationen der Stoffe zu Beginn der Reaktion. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, ist $\Delta G = 0$.

Der Wert für ΔG einer Reaktion erlaubt somit eine Aussage darüber, ob diese Reaktion thermodynamisch möglich ist, sagt jedoch nichts über ihre Geschwindigkeit aus. Ein negativer ΔG -Wert zeigt an, dass eine Reaktion spontan ablaufen könnte, aber nicht, ob sie tatsächlich mit einer wahrnehmbaren Geschwindigkeit vonstattengeht. Die Verbrennung des Papiers dieses Buches zu CO_2 und H_2O ist beispielsweise eine stark exergone Reaktion, offensichtlich findet sie jedoch spontan nicht statt, sondern dazu bedarf es einer Aktivierung (z. B. durch ein brennendes Streichholz). Die tatsächliche Geschwindigkeit einer Reaktion hängt von der bereits erwähnten freien Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger ab, die der Differenz der freien Energie zwischen dem Substrat und dem Übergangszustand (S^\ddagger) entspricht (Abb. 2.11a). Reaktionen mit einer hohen Aktivierungsenergie laufen spontan nicht oder nur sehr langsam ab.

Enzyme beeinflussen nicht den Wert für ΔG einer chemischen Reaktion, d. h. sie sind nicht

in der Lage, eine thermodynamisch unmögliche Reaktion zu ermöglichen. Enzyme beschleunigen jedoch thermodynamisch mögliche Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger der betreffenden Reaktion herabsetzen und die Einstellung des Gleichgewichts der Reaktion enorm beschleunigen (Faktor zwischen 10^8 und 10^{20}).

Die entscheidende Herabsetzung der Aktivierungsenergie einer Reaktion durch ein Enzym ($\Delta G_E^\ddagger \ll \Delta G^\ddagger$) resultiert aus der **Stabilisierung des Übergangszustands** am Substratmolekül (ES^\ddagger) (Abb. 2.11b). Enzyme sind im aktiven Zentrum deshalb nicht präzise komplementär zu ihren Substraten – dann wären es „Antikörper“ und würden die bestehende Substratstruktur thermodynamisch zusätzlich stabilisieren –, sondern sie sind optimal komplementär zur instabilen Übergangszustandsgeometrie ihrer Substrate bei der Reaktion (Kirby 1996).

Zuerst wird das Substrat über **statische Bindungen** im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden $[\text{ES}]$. Nach der Substratbindung kommen aufgrund der Enzymstruktur weitere **dynamische Bindungen** im aktiven Zentrum ins Spiel,

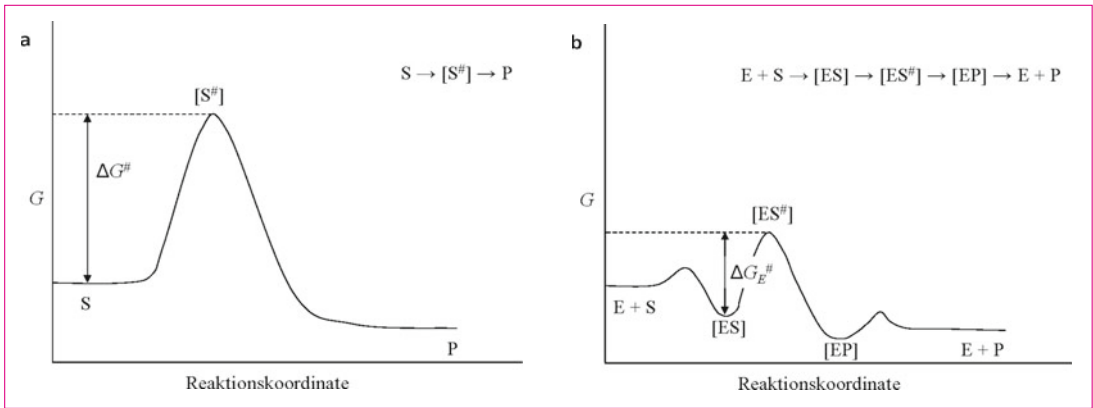


Abb. 2.11 Übergangszustandsdiagramm einer (a) chemischen und (b) enzymatischen Reaktion (G = freie Enthalpie; E = Enzym; S = Substrat; S^\ddagger = Substrat im Übergangszustand; P = Produkt; ΔG^\ddagger = freie Aktivierungsenthalpie/-energie, nicht katalysiert; ΔG_E^\ddagger = freie Aktivierungsenthalpie/-energie, enzymkatalysiert)

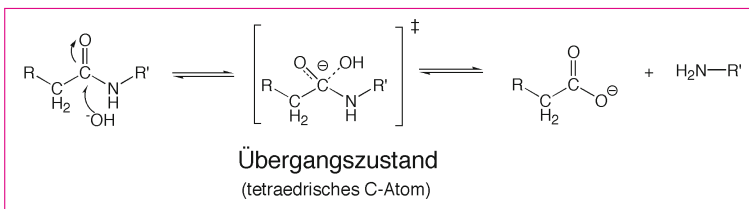


Abb. 2.12 Hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung (Amidspaltung) und instabiler Übergangszustand der Reaktion

die mit dem Substrat wechselwirken und es in seinen Übergangszustand überführen [ES[#]]. Das Substrat im Übergangszustand kann jetzt in das energieärmere Produkt abreagieren [EP] und das Produkt wird freigesetzt.

Die bereits in Abbildung 2.12 angesprochene hydrolytische Peptidspaltung (exergon; ΔG^0 je nach Seitengruppen der Aminosäuren zwischen ca. -10 und -15 kJ/mol) wird enzymatisch beispielsweise von Verdauungsenzymen wie Chymotrypsin katalysiert, für das der Reaktionsmechanismus detailliert aufgeklärt ist. Chymotrypsin hat eine hydrophobe Bindungstasche im aktiven Zentrum, die selektiv hydrophobe aromatische Reste von bestimmten Aminosäuren

(L-Trp, L-Phe, L-Tyr) in Peptiden bzw. Proteinen als Substrate erkennt, bindet und in die richtige Position bringt. Hier spielen die statischen Bindungen zwischen Enzym und Substrat die entscheidende Rolle. Es folgt über das Wechselspiel mehrerer dynamischer Bindungen ein nucleophiler Angriff des Serinrestes vom Chymotrypsin (Serin-Protease) im aktiven Zentrum auf das C-Atom der zu spaltenden Peptidbindung unter Bildung des kurzlebigen tetraedrischen Übergangszustandes [ES[#]]. Dieser nucleophile Angriff wird durch das Zusammenspiel einer **katalytischen Triade** (Ser \leftrightarrow His \leftrightarrow Asp) ermöglicht und der tetraedrische Übergangszustand wird durch ein „Oxianionen-Loch“ im aktiven Zentrum stabilisiert (Abb. 2.13). Es folgen Umlagerungen am tetraedrischen C-Atom, die zur Spaltung der Peptidbindung, Freisetzung des Aminorestes und Bildung eines Acyl-Enzym-Zwischenproduktes führen (Abb. 2.14). Dann lagert sich anstelle des freigesetzten Aminorestes ein Wassermolekül im aktiven Zentrum an, das aktiviert durch einen Histidinrest erneut nucleophil das C-Atom des Acyl-Enzym-Zwischenproduktes angreift, wiederum in einen tetraedrischen Übergangszustand überführt [E-Acyl[#]], der nach erneuten Umlagerungen den Carboxylrest der Peptidbindung freisetzt. Chymotrypsin ist in seinen ursprünglichen Zustand versetzt, und die Peptidbindung wurde in mehreren Teilschritten hydrolysiert.

Als ein weiteres Beispiel wird – ohne nochmals auf die Bildung von Übergangszuständen näher einzugehen – die Umsetzung von 3-Phosphoglycerinaldehyd am aktiven Zentrum der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

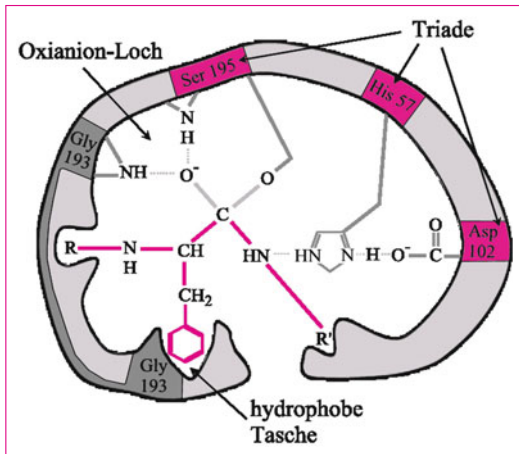


Abb. 2.13 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Chymotrypsin mit dem „Oxianionen-Loch“ (Details s. Text)

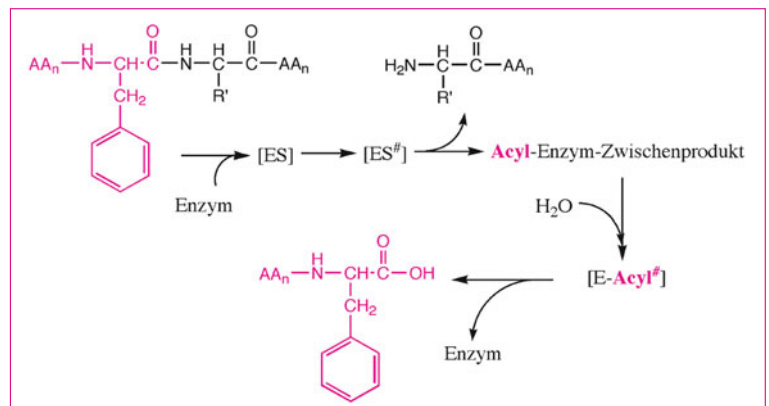


Abb. 2.14 Zweistufiger Reaktionsmechanismus von Chymotrypsin (schematisch); AA_n = weitere Aminosäuren des Proteins

(GAP-DH), einem wichtigen Enzym der Glykolyse, dargestellt (Abb. 2.15). Hierbei handelt es sich um eine Oxidation unter Mitwirkung des Coenzyms Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+), das dabei reduziert wird.

Zuerst bindet das Substrat, 3-Phosphoglycerinaldehyd, im aktiven Zentrum der GAP-DH, in dem bereits auch NAD^+ gebunden vorliegt. Die erste Teilreaktion ist eine kovalente Thiohalbacetalbindung des Substrates an die SH-Gruppe eines Cysteins. Im zweiten Schritt wird das Substrat durch NAD^+ oxidiert, d. h. eine OH-Gruppe wird unter gleichzeitiger Reduktion des Coenzyms zu einer Carbonylfunktion umgewandelt. Es entsteht ein reaktiver Thioester. Im dritten Schritt wird das reduzierte NADH gegen oxidiertes NAD^+ aus der Lösung ausgetauscht. Im

letzten Schritt wird das kovalent gebundene oxidierte Substrat durch Phosphat phosphorolytisch gespalten (Angriff durch P_i). Das nunmehr vorliegende Produkt, 1,3-Diphosphoglycerat, wird aus dem Enzym-Produkt-Komplex entlassen, so dass neues Substrat am aktiven Zentrum binden kann; die Reaktion kann von Neuem beginnen.

Die Aldehydoxidation im zweiten Schritt der Reaktionssequenz, eine exergone Reaktion, treibt die Synthese des energiereichen 1,3-Diphosphoglycerats an. Die durch die Oxidation gebildete energiereiche Thioesterverbindung kann chemisch außer durch Phosphat auch durch andere nucleophile Verbindungen (z. B. Wasser, Amine) gespalten werden. Dies wären im Sinne der Enzymreaktion unerwünschte Nebenreaktionen. Durch die Proteinstruktur des aktiven Zentrums

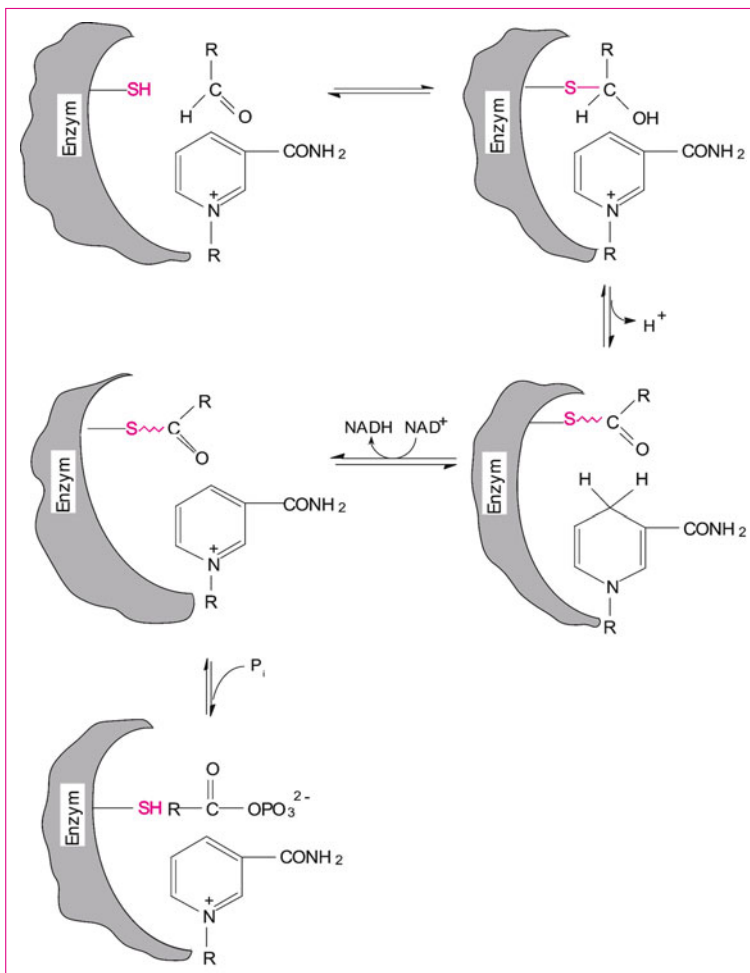


Abb. 2.15 Teilreaktionen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (nach Berg et al. 2007); R = Molekülrest

wird aber selektiv nur einem Phosphatmolekül der Zugang ermöglicht.

Anhand dieser beiden Beispiele wird das Prinzip der Enzymkatalyse sichtbar. Eine Reaktion verläuft schrittweise, in mehreren Teilreaktionen. Erst werden die Reaktanden im aktiven Zentrum zusammengebracht, dann folgen durch aktivierte Seitenketten des Enzyms (nucleophile bzw. acide oder basische Seitenketten) Angriffe auf spezielle Bereiche der Reaktanden, die die jeweiligen Übergangszustände der Reaktion stabilisieren. Die energiereicheren, reaktionsfähigen Zwischenprodukte werden dabei durch die Proteinstruktur im aktiven Zentrum so abgeschirmt, dass keine Nebenreaktionen stattfinden können.

2.1.8 Coenzyme und Cofaktoren

Bei der Umsetzung von 3-Phosphoglycerinaldehyd durch die NAD^+ -abhängige Oxidoreduktase GAP-DH (Abb. 2.15) und beim Speichern bzw. Transport von O_2 durch Myoglobin bzw. Hämoglobin (Abschnitt 2.1.5) haben wir bereits zwei wichtige Beispiele kennengelernt, wie Proteine ihr chemisches Potenzial zur Ausübung ihrer Funktion weiter steigern können, nämlich durch die Beteiligung von Coenzymen bzw. Cofaktoren. Sind die Coenzyme bzw. Cofaktoren an das Protein assoziiert, liegt ein **Holoprotein** vor; sind diese Moleküle dissoziiert, wird das Protein als **Apoprotein** bezeichnet (aktives Holoprotein \rightleftharpoons inaktives Apoprotein + Cofaktor).

Als **Coenzyme** werden organische Moleküle wie Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+)

bzw. das phosphorylierte Derivat (NADP^+), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN) oder auch Adenosintriphosphat (ATP) bezeichnet, die am Enzym binden und stöchiometrisch bei der Reaktion umgesetzt werden. Sie müssten aus diesem Grund eigentlich – wie manchmal auch praktiziert – präziser als **Cosubstrate** angesprochen werden, da sie nicht unverändert aus einem Reaktionszyklus hervorgehen, sondern erst in einer weiteren Reaktion, meist von anderen Enzymen im Stoffwechsel, wieder regeneriert werden müssen. Die Coenzyme leiten sich in der Regel von **Vitaminen** ab, aus denen sie in der Zelle biosynthetisch erzeugt werden. Die erstgenannten Coenzyme NAD^+ , NADP^+ , FAD und FMN sind besonders bei diversen Oxidoreduktase-katalysierten Reaktionen notwendig, da sie als Redoxkomponenten leicht reduziert bzw. oxidiert werden können. Die reduzierte Form dieser Coenzyme stellt zudem einen „chemischen Energiespeicher“ für die Zelle dar (Abschnitt 2.2.1). Die für die Oxidoreduktationsreaktionen relevanten Molekülreste von FAD bzw. FMN sowie NAD^+ bzw. NADP^+ sind in Abbildung 2.16a, b dargestellt.

Das ATP oder andere Nucleotidtriphosphate sind energiereiche Coenzyme, die direkt für das Übertragen von Phosphatgruppen genutzt werden und die durch Spaltung der Phosphoestergruppe(n) frei werdende Energie (exergone Reaktion) für gekoppelte endergone Reaktionen zur Verfügung stellen.

Wenn organische Cofaktoren, wie beispielsweise die Hämgruppe (Porphyrinringsystem) von Myoglobin bzw. Hämoglobin, entweder kovalent am Protein gebunden sind oder aufgrund sehr hoher nicht-kovalenter Bindungskräfte nicht ohne De-

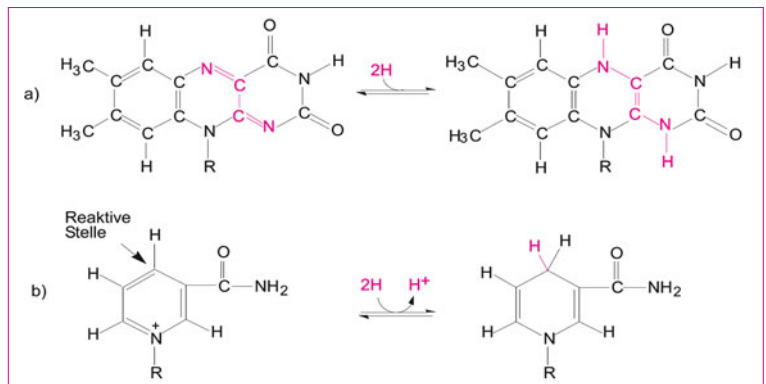


Abb. 2.16 Zwei häufig auftretende Cofaktoren (Coenzyme) für die Enzymkatalyse von Redoxreaktionen; (a) Flavinanteil von FAD bzw. FMN; (b) Nikotinamidanteil von NAD^+ bzw. NADP^+ ; R = Molekülrest

Tabelle 2.3 Beispiele von Enzymen, die Metall-Ionen als Cofaktoren besitzen.

Ca ²⁺	α -Amylase, Kollagenase, Triacylglycerid-Lipase, Mikrokokken-Nuclease
Co ²⁺	Glucose-Isomerase (<i>Bacillus coagulans</i>)
Cu ²⁺ (Cu ⁺)	Galactose-Oxidase, Tyrosinase
Fe ²⁺ oder Fe ³⁺	Katalase, Cytochrome, Peroxidasen
Mg ²⁺	Desoxyribonuclease (Schweinepankreas), DNA-Polymerasen
Mn ²⁺	Arginase
Na ⁺	Plasmamembran-ATPase (benötigt noch K ⁺ und Mg ²⁺)
Zn ²⁺	Alkoholdehydrogenase (<i>Homo sapiens</i>), Alkalische Phosphatase (<i>Escherichia coli</i>), Carboxypeptidase B (<i>Homo sapiens</i>)

naturierung vom Protein getrennt werden können, bezeichnet man sie als **prothetische Gruppe**.

Anorganische Cofaktoren wie die in Tabelle 2.3 dargestellten Metall-Ionen, können bei diversen Proteinen ebenfalls die Funktion von Cofaktoren ausüben. Metall-Ionen nehmen beispielsweise als Redoxpartner an manchen Enzymreaktionen teil, oder sie sind speziell zur besseren Stabilisierung der Proteinstruktur erforderlich.

2.2 Stoffwechsel

Wie im ersten Kapitel gezeigt wurde, sind lebende Zellen in der Lage, aus einfachen Substanzen komplizierte, fortpflanzungsfähige, lebendige Systeme aufzubauen. Eine solch komplexe Zellstruktur enthält in der Zelle zwischen verschiedenen Membrankompartimenten Konzentrationsgradienten, pH-Differenzen und andere, damit verbundene Ungleichgewichte. Nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik, der eine Entropievermehrung bei jedem Vorgang fordert, muss

ein so hochorganisiertes System die Ordnung – oder was gleichbedeutend ist, einen Zustand konstanter, geringer Entropie (Unordnung) – durch Energiezufuhr von außen erkaufen, d.h. einer konstanten Entropie im Bereich der metabolisch aktiven Zelle entspricht eine Entropiezunahme des Systems Zelle plus Umwelt. Mit der Umwelt werden dabei Stoffe und Energie ausgetauscht. Ein solches offenes System befindet sich in einem sogenannten **Fließgleichgewicht**, gekennzeichnet durch Stoffdurchsatz bei konstanter Entropie. Während ein geschlossenes System bei konstanter Entropie keine Arbeit zu leisten vermag, kann ein offenes System auch im Fließgleichgewicht Arbeit leisten und über vielfältige metabolische Reaktionen komplexe Zellstrukturen erhalten oder bei der Zellvermehrung neu aufbauen. Als **Stoffwechsel** wird also der Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung und die Stoffumsetzung in der Zelle bezeichnet. Dabei werden der Abbau von komplexen Biomolekülen in die Grundbausteine (**Katabolismus**) und die Synthese von in der Zelle benötigten Biomolekülen aus einfachen Vorläufern (**Anabolismus**) unterschieden.

2.2.1 Grundmechanismen des Stoffwechsels und der Energiegewinnung

Wie im vorstehenden Abschnitt beschrieben, können Enzyme nur thermodynamisch mögliche Reaktionen beschleunigen, also Reaktionen, die durch eine Verringerung der **freien Energie** der Endprodukte im Vergleich zu den Ausgangsprodukten charakterisiert sind (d.h. der ΔG -Wert ist negativ). Die Erhaltung der Ordnung in der Zelle und der Aufbau von zelleigenen Substanzen, die für Wachstum und Zellerneuerung gebraucht werden, sind Reaktionen, die endergon verlaufen (d.h. der ΔG -Wert ist positiv). Dies bedeutet, dass diese Reaktionen trotz der Beteiligung von Enzymen nur unter Energiezufuhr stattfinden können. Die zum Ablauf dieser Reaktionen nötige freie Energie stammt meist aus einer **gekoppelten exergonen Reaktion** wie der Spaltung einer Phosphoestergruppe im ATP (s.u., Abb. 2.17b) oder einer Oxidation von reduzierten Coenzymen (s.o.). Diese chemisch gebundene Energie

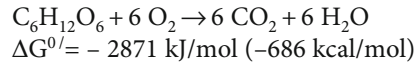
können Organismen aus unterschiedlichen Quellen gewinnen. **Autotrophe Organismen** (griech. *autos* = selbst; *trophos* = Nahrung) können freie Energie durch den Prozess der Photosynthese aus dem Sonnenlicht oder durch Oxidation anorganischer Substanzen, wie z. B. NH_3 , H_2S oder Fe^{2+} gewinnen – man bezeichnet diese Organismen als „photoautotroph“ bzw. „chemolithotroph“. Im Gegensatz dazu beziehen **heterotrophe Organismen** (griech. *heteros* = der andere von beiden) die chemisch gebundene Energie aus der Oxidation organischer Verbindungen wie Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen; sie sind daher letztlich von autotrophen Organismen abhängig.

Wasserstoff spielt im Stoffwechsel eine zentrale Rolle. Autotrophe Organismen nutzen die ihnen zur Verfügung stehende Energie (z. B. Strahlungsenergie), um Wasser in Sauerstoff und Wasserstoff zu spalten und Letzteren durch Bindung an Kohlenstoff in einen „aktivierten“ Zustand zu überführen und in Form von Kohlenhydraten und anderen organischen Verbindungen zu speichern. Umgekehrt nutzen heterotrophe Organismen die Potenzialdifferenz zwischen Wasserstoff und Sauerstoff als Energiequelle, indem sie den Wasserstoff aus der Kohlenstoffbindung lösen und ihn mit Sauerstoff unter Energiegewinnung freisetzen. Die Oxidation des Wasserstoffs erfolgt dabei stufenweise, wobei die jeweils frei werdende Energie in biochemische Energie umgewandelt und benutzt wird, die Funktionen des Organismus aufrechtzuerhalten.

Wie kann die freie Energie einer exergonen Reaktion benutzt werden, um eine endergone Reaktion zu ermöglichen? Ein wichtiges Prinzip hierzu ist die Kopplung von chemischen Reaktionen in **Reaktionsketten**, d. h. die Produkte einer ersten Reaktion werden als Substrate der nachfolgenden Reaktion umgesetzt, dabei entstehende Produkte in einer Folgereaktion wiederum umgesetzt usw. Sehr oft werden endergone und exergone Reaktionen auf diese Weise stofflich miteinander gekoppelt. Da sich die freie Energie gekoppelter Reaktionen additiv aus den freien Energien der Einzelreaktionen zusammensetzt, kann eine exergone Reaktion eine mit ihr gekoppelte endergone Reaktion antreiben, sofern die Gesamtreaktion exergon ist.

Ein zweites wichtiges Prinzip des Stoffwechsels ist die Möglichkeit, die freie Energie exergonischer Reaktionen in energiereichen Ver-

bindungen zwischenzuspeichern und an anderer Stelle in der Zelle zu nutzen. Die meisten katabolen Stoffwechselwege verlaufen exergonisch, wie z. B. die Oxidation von Kohlenhydraten zu Wasser und Kohlendioxid bei der Zellatmung. Die Bruttogleichung für diese Reaktion lautet:



Die in energiereichen „Carriermolekülen“ gespeicherte freie Energie dieser Reaktion kann dann benutzt werden, um den in der Regel endergonisch verlaufenden anabolen Stoffwechsel zu ermöglichen.

Die wichtigste Substanz, mit der chemische Energie in der Zelle übertragen wird, ist das bereits mehrfach erwähnte „Coenzym“ **Adenosintriphosphat (ATP)**, die „Energiewährung der Zelle“ (Abb. 2.17a).

Unter Bedingungen des Zellmilieus tragen die Phosphatreste des ATPs negative Ladungen. Durch die Ladungsabstoßung von drei benachbarten Phosphatgruppen verhält sich das Molekül wie eine gespannte Feder. Bei der Abspaltung der ersten oder zweiten Phosphatgruppe wird Energie frei, die auf andere Reaktionspartner übertragen werden kann. Die Abspaltung eines Phosphatrestes führt zu Adenosindiphosphat (ADP) und liefert unter Standardbedingungen $\Delta G^0 = -30,5 \text{ kJ/mol}$ ($-7,3 \text{ kcal/mol}$). Legt man entsprechend der Ableitung der Gibbs-Funktion (Abschnitt 2.1.7) typische zelluläre Bedingungen zugrunde, so liegt der tatsächliche Wert für ΔG bei etwa -50 kJ/mol (-12 kcal/mol). Abbildung 2.17b zeigt schematisch, wie die exergone Spaltung von ATP in ADP und einen Phosphatrest mit der endergon verlaufenden Verknüpfung zweier Moleküle gekoppelt werden kann. Durch die verschiedenen katabolen Stoffwechselwege entsteht energiereicher, coenzymgebundener Wasserstoff (Abb. 2.19), der bei der Zellatmung für den Aufbau eines Protonen-/Ionen-Gradienten sorgt und im Zusammenspiel mit einer membranständigen **ATP-Synthase** das ADP wieder zu ATP phosphoryliert.

Aus der biochemischen Aufgabe von ATP wird verständlich, dass es fortlaufend gebildet und zu ADP und Phosphat abgebaut wird. Der Umsatz an ATP im menschlichen Körper ist beträchtlich und beträgt pro Tag ca. 40 kg. Bei körperlicher Höchstleistung wird der Umsatz bis zu 20-fach ge-

steigert. Dabei müssen die ATP-liefernden Reaktionen sehr schnell ansprechen, da die ATP-Menge, die in einer Zelle vorhanden ist, nur für wenige Sekunden zur Versorgung der Zelle ausreicht.

Neben ATP existieren noch andere wichtige als Zwischenspeicher freier Energie bzw. Carrier energiereicher Gruppen genutzte Moleküle. Beispiele sind die bereits erwähnten Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ . Diese Verbindungen können zu NADH und NADPH reduziert werden und fungieren in diesem Zustand als Speicher für „energiereiche“ Hydrid-Ionen (zwei Elektronen plus ein Proton), die sie auf andere Moleküle übertragen können. Dies spielt bei reduktiven Biosyntheseschritten des Anabolismus bzw. bei der Atmungskettenphosphorylierung eine große Rolle (s. u.).

Eine Energieskala für verschiedene biologisch relevante Energien ist in Abbildung 2.18 dargestellt. Für die Umrechnung von geläufigen

Kilokalorien(kcal)-Werten in Kilojoule(kJ)-Werte wird $1 \text{ kcal} = 4,185 \text{ kJ}$ zugrunde gelegt. Um thermische Schwingungen in einem Molekül anregen zu können, sind ca. $2,5 \text{ kJ/mol}$ ($0,6 \text{ kcal/mol}$) erforderlich. Dazu reicht z. B. die Raumtemperatur aus. Um schwache Bindungen, wie sie bei der Stabilisierung eines Proteins auftreten, zu spalten, sind etwa 15 kJ/mol (ca. $3,5 \text{ kcal/mol}$) erforderlich. Die Spaltung einer Phosphatgruppe aus ATP liefert ca. 50 kJ/mol (12 kcal/mol). Sichtbares Licht kann diese Energie bereitstellen, wie dies bei der Photosynthese geschieht. Grünes Licht hat einen Energiegehalt von ca. 239 kJ/mol (57 kcal/mol). Zur Spaltung stabilerer C–C-Bindungen sind $347,5 \text{ kJ/mol}$ oder 78 kcal/mol , d. h. energiereicheres UV-Licht, erforderlich. Der Energiegehalt eines ganzen Moleküls, etwa von Glucose, entspricht mehr als 1500 kJ/mol .

2.2.2 Kataboler Stoffwechsel

Die Nutzung der chemischen Energie von Nahrungssubstanzen, z. B. von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen, erfolgt in Reaktionen des katabolen Stoffwechsels. Hierbei wird, wie bereits angedeutet, der in diesen organischen Molekülen durch Bindung an Kohlenstoff in einem „aktivierten“ Zustand gespeicherte Wasserstoff schrittweise freigesetzt und auf Sauerstoff übertragen. Die wichtigsten Reaktionsketten, die beim Abbau dieser Substanzen beteiligt sind, sollen kurz dargestellt werden.

Zunächst werden die polymeren Substanzen, die beispielsweise als Energiespeicher in der Zelle oder aus der Nahrung zur Verfügung stehen, enzymatisch in ihre Grundbausteine (z. B. Zucker, Fettsäuren [Abb. 2.3], Aminosäuren [Abb. 2.4]) zerlegt. Liegen diese Bausteine bereits separat in

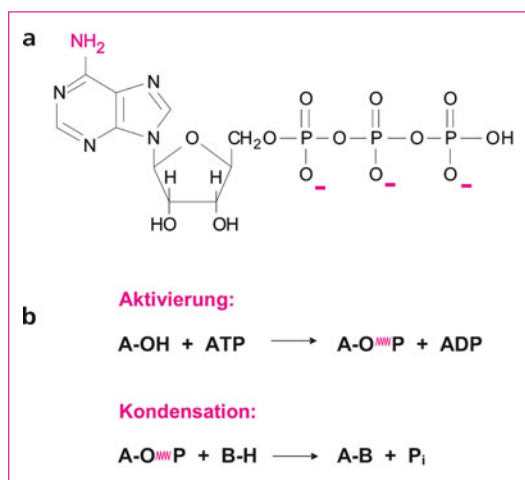


Abb. 2.17 (a) Adenosinetrifosphat, die molekulare Energieüberträgersubstanz in der Zelle. (b) Koppelung der Spaltung von ATP mit der Kondensation der Moleküle A und B

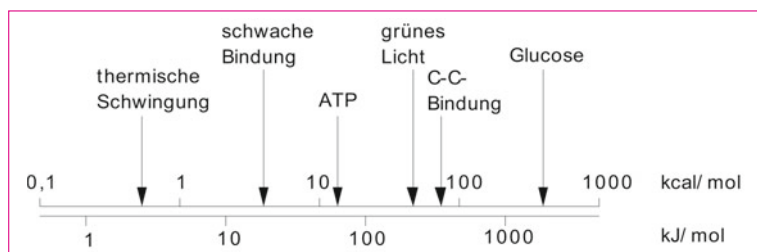


Abb. 2.18 Energiebeträge biologisch wichtiger Energieträger (nach Berg et al. 2007)

der Nahrung vor, so erfolgt die direkte Umsetzung. Diese Grundbausteine werden in charakteristischen Stoffwechselwegen in C_3 - oder C_2 -Verbindungen umgesetzt, die dann in den nachfolgenden Stoffwechselreaktionen weiter oxidiert werden (Abb. 2.19).

Der **Abbau von Glucose** in der Zelle erfolgt über die **Glykolyse** zu Pyruvat (Synonyme: Brenztraubensäure, α -Ketopropionsäure) und zum Acetyl-CoA (Synonyme: S-Acetyl-Coenzym A; „aktivierte Essigsäure“). Der Acetylrest von Acetyl-CoA wird im **Citronensäurezyklus** (Synonym: Citratzyklus)

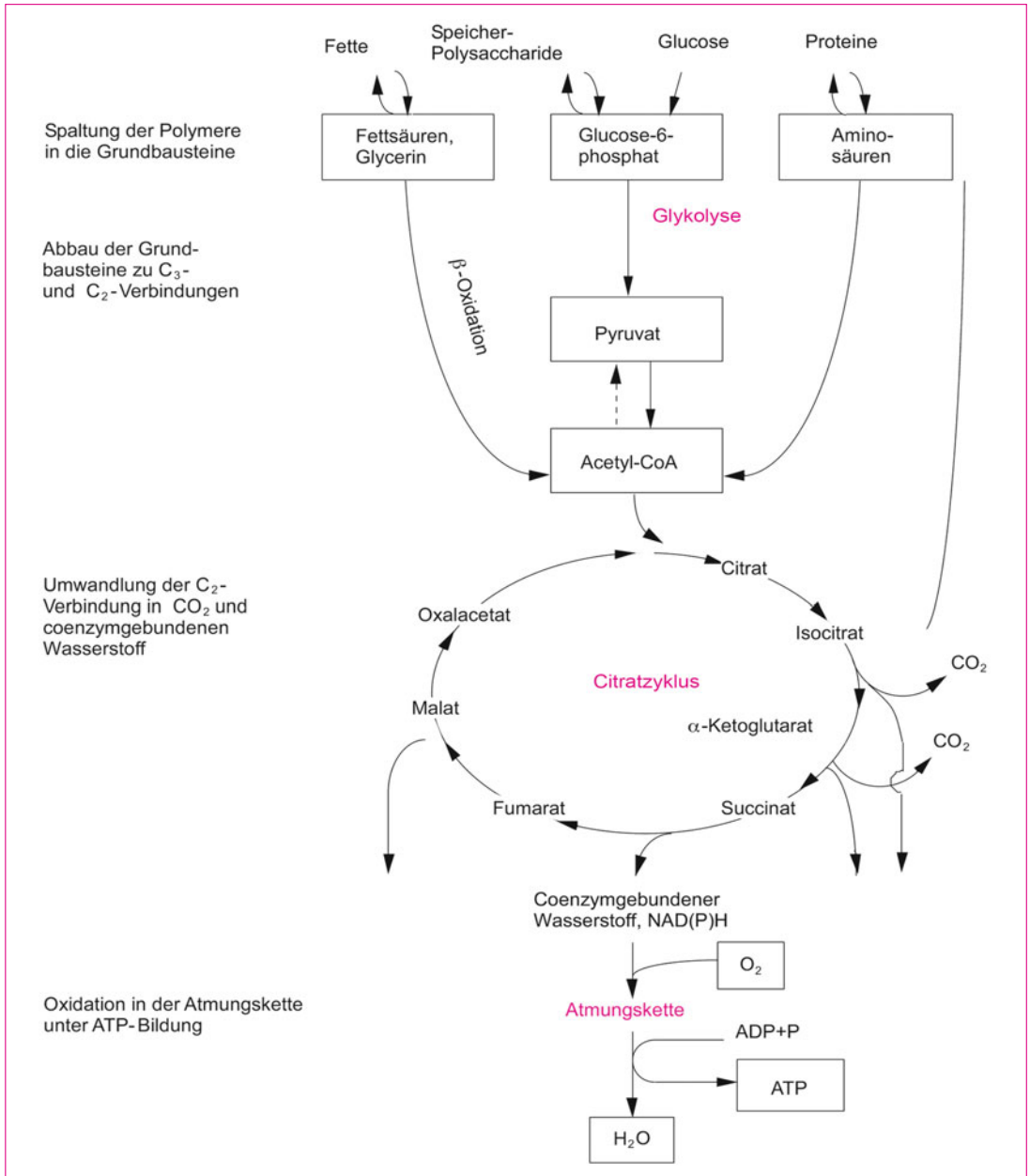


Abb. 2.19 Übersicht über die wichtigsten Abbaupfade (katabole Stoffwechselwege)

zu Kohlendioxid oxidiert, welches als Endprodukt der Kohlenstoffoxidation aus den Zellen entweicht. Der von der Glucose stammende Wasserstoff liegt nun an Coenzymmoleküle (NADH, FADH₂) gebunden vor. In der **Atmungskette** erfolgt dann allgemein betrachtet die schrittweise Oxidation mithilfe von Sauerstoff unter Bildung von Wasser und Adenosintriphosphat (ATP).

Der katabole Stoffwechsel ist eng an den anabolen (aufbauenden) Stoffwechsel gekoppelt. Anabole Reaktionsketten gehen von Bausteinen aus, die als Zwischenprodukte der abbauenden Reaktionswege zur Verfügung stehen. Die Substanzen, die in der Glykolyse und im Citronensäurezyklus vorliegen, werden in vielfältiger Weise für den Aufbau zelleigener Bausteine genutzt. Beispielsweise wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citronensäurezyklus, Asparaginsäure gebildet, die wiederum Ausgangspunkt für die Biosynthese von Lysin, Methionin, Threonin und Isoleucin ist. Einige dieser anabolen Reaktionen führen zu Substanzen, die auch im technischen Maßstab biotechnologisch hergestellt werden. Zum genaueren Studium dieser Stoffwechselwege wird auf die weiterführenden Lehrbücher der Biochemie verwiesen.

2.2.3 Glykolyse

Im biologischen Kohlenstoffkreislauf ist ein großer Anteil des Kohlenstoffs in Form polymerer Zucker, z. B. als Cellulose oder Stärke, gebunden. Der biologische Umsatz dieser Verbindungen übertrifft die Menge aller technisch produzierten Substanzen um mehrere Größenordnungen. Die Biosynthese dieser Verbindungen – z. B. mithilfe der Photosynthese – und der biologische Abbau verlaufen über Glucosederivate. Deshalb sind Stoffwechselwege, die Glucosederivate umsetzen können, wie die Glykolyse, in fast allen Zellen vorhanden. Weitere Möglichkeiten, Glucose für die Zelle metabolisch zu nutzen sind der Pentosephosphatweg, der Glucose über C₅- bzw. C₄-Verbindungen metabolisiert, oder ein bei Prokaryoten gefundener Abbauweg, der Glucose vor der Spaltung in C₃-Einheiten in C₁-Stellung oxidiert.

Die Glykolyse soll stellvertretend für zahlreiche solcher metabolischen Reaktionsketten näher betrachtet werden (Abb. 2.20).

Beim Eintritt in die Zelle wird Glucose von Hexokinase mithilfe von ATP zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und damit aktiviert. Glucose-6-phosphat wird dann zu Fructose-6-phosphat isomerisiert, einem Zucker, der ebenfalls sechs Kohlenstoffatome enthält, aber keine Aldose, sondern eine Ketose ist. Fructose-6-phosphat wird im nächsten Schritt von Phosphofructokinase, einem regulatorischen, allosterischen Enzym, zu Fructose-1,6-diphosphat phosphoryliert. Für die Übertragung des Phosphatrestes wird wie beim ersten Phosphorylierungsschritt der Glykolyse ATP benötigt und hydrolysiert, um das Gleichgewicht der Reaktionen auf die Seite der Produkte zu verschieben. Im nächsten Schritt wird Fructose-1,6-diphosphat in zwei C₃-Verbindungen aufgespalten, die über Triosephosphat-Isomerase miteinander im Gleichgewicht stehen. Das 3-Phosphoglycerinaldehyd wird durch 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase ständig abgezogen, und über die angegebenen Schritte wird Pyruvat gebildet.

Die **ATP-Bilanz** dieser Reaktionskette sieht folgendermaßen aus: Für die Phosphorylierung der Glucose und des Fructose-6-phosphats wird jeweils ein Molekül ATP benötigt. Bei den Umsetzungen einer von zwei C₃-Verbindungen werden zwei Moleküle ATP gebildet. Als Gesamtbilanz werden also im Verlauf der Glykolyse eines C₆-Moleküls zwei ATP-Moleküle freigesetzt. Die Glykolyse ist insgesamt exergon, Teilreaktionen dieser Sequenz sind zwar unter Standardbedingungen (ΔG^0) endergonisch, z. B. die Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat in 3-Phosphoglycerinaldehyd, laufen jedoch unter den tatsächlichen, dynamischen Konzentrationsbedingungen der Zelle ab ($-\Delta G$; Abschnitt 2.1.7, Ableitung der Gibbs-Funktion).

Der Reaktionsmechanismus der Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 1,3-Diphosphoglycerat wurde bei der Einführung der Enzyme bereits genauer vorgestellt (Abb. 2.15). Diese Phosphorylierung erfolgt im Unterschied zu den anderen Phosphorylierungen, die ATP benötigen, mit freiem Phosphat. Dazu wird die Redoxreaktion von NAD⁺ zu NADH + H⁺ benötigt. Als Zwischenprodukt bildet sich eine energiereiche, am Enzym kovalent gebundene Zwischenstufe, die durch Phosphat gespalten wird. Die Energie, die in 1,3-Diphosphoglycerat gespeichert ist, wird in den nachfolgenden Schritten

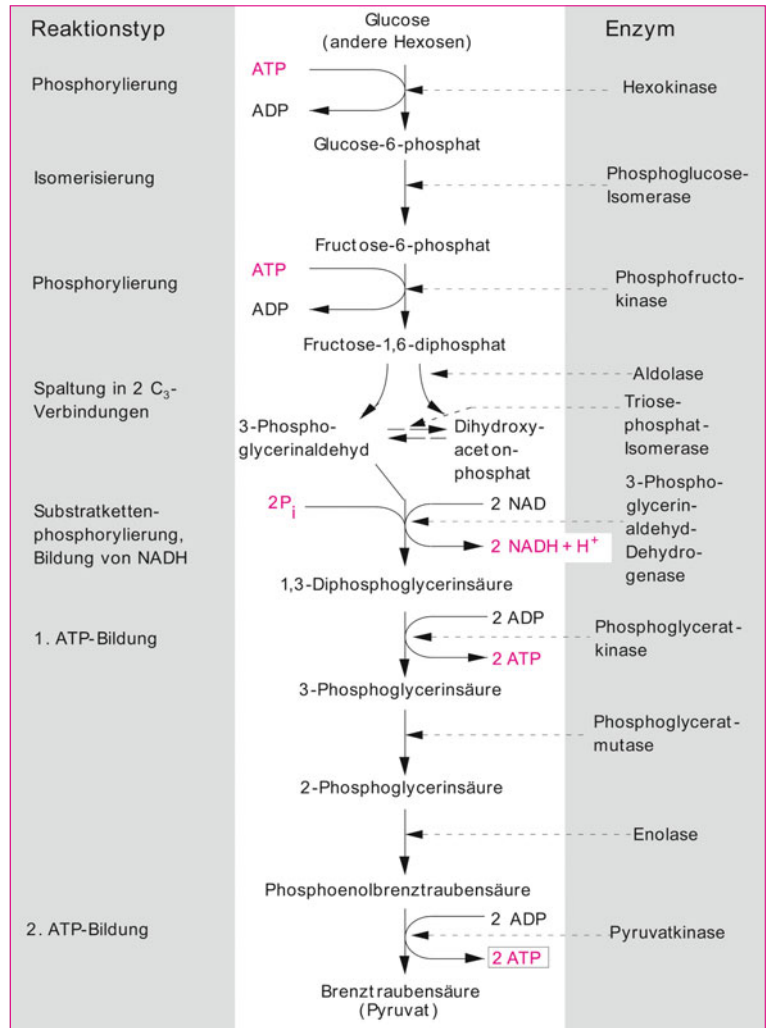


Abb. 2.20 Glykolyse

auf ADP unter ATP-Bildung übertragen. Diese Art der Phosphorylierung, ausgehend von freiem Phosphat unter Nutzung von Redoxenergie, wird **Substratkettenphosphorylierung** genannt.

2.2.4 Zellatmung

Biochemiker und Zellbiologen benutzen oftmals den Begriff „Zellatmung“ und beziehen dies im engeren Sinne auf die molekularen Prozesse, durch die aerobe Zellen O₂ verbrauchen und CO₂ produzieren. Diese Prozesse sind in drei wichtige Abschnitte untergliedert:

1. Organische Moleküle wie Zucker (z. B. Glucose, Glykolyse), Aminosäuren und Fettsäuren werden zu C₂-Molekülen in Form von Acetyl-CoA oxidiert.
2. Die Acetyl-CoA-Moleküle werden in den Citronensäurezyklus eingeschleust und enzymatisch weiter zu CO₂ oxidiert. Die durch die Oxidation freigesetzte Energie wird in Form von reduzierten Energiecarriern, den Coenzymen NADH und FADH₂, konserviert.
3. Die in diesen Energiecarriern gespeicherte Energie wird durch Re-Oxidation freigesetzt, indem diese Protonen (H⁺) und Elektronen an membrangebundene Proteinkomplexe abgeben. Die membrangebundenen Proteinkom-

plexe (Enzyme), die sogenannte Atmungskette, geben die Elektronen an den endgültigen Akzeptor O_2 weiter, und es entsteht unter Einbeziehung freier Protonen (H^+) Wasser (H_2O). Der durch die Atmungskette über eine Membran erzeugte Protonen- und Ionengradient (s. u.) wird zur Bildung von ATP durch die ebenfalls membranständige ATP-Synthase genutzt.

Der Quotient von bei der Zellatmung produziertem Kohlendioxid und verbrauchtem Sauerstoff in einem Kultivierungsprozess wird als **respiratorischer Quotient** (RQ) bezeichnet. Er kann z. B. als Stoffverhältnis von gebildetem CO_2 zu verbrauchtem O_2 bestimmt werden.

Bei der Umsetzung der Zucker werden aus sechs O_2 -Molekülen sechs CO_2 -Moleküle gebildet, d. h. der Quotient ist 1. Bei Fetten und Proteinen beträgt der Quotient 0,71 bzw. 0,8. Bei der Veratmung sauerstoffreicher Säuren, die häufig in Pflanzen auftreten (z. B. Weinsäure, Apfelsäure), ist der respiratorische Quotient größer als 1. Wird Schimmelpilzen gleichzeitig Kohlenhydrat und Fett im Wachstumsmedium angeboten, dann bleibt der Quotient zunächst 1, bis das Kohlenhydrat verbraucht ist, und sinkt dann auf den Wert für die Fettsäure ab. Vom respiratorischen Quotienten kann also näherungsweise auf die Art der Substratverwertung geschlossen werden.

In der eukaryotischen Zelle erfolgen die sich an die Glykolyse anschließenden Oxidationschritte des Citronensäurezyklus (Citratzyklus) und der Atmungskette in den **Mitochondrien**, den Kraftwerken der Zelle. Hierzu wird das bei der Glykolyse gebildete Pyruvat in die Mitochondrien transportiert und über das intermediär gebildete Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust und dort zu CO_2 oxidiert. Der bei diesen Schritten anfallende, an Coenzyme ($NADH$, $FADH_2$) gebundene Wasserstoff wird dann, wie bereits eingangs erläutert, über verschiedene Redoxreaktionen der membrangebundenen Enzyme der **Atmungskette** auf Sauerstoff übertragen. Weiterhin wird der im Cytoplasma bei der Glykolyse gebildete, an $NADH$ gebundene Wasserstoff an den Mitochondrien von Trägersubstanzen übernommen und ins Innere der Mitochondrien transportiert und dort ebenfalls in die Atmungskette eingespeist; dies führt zur Regenerierung des für die Substratkettenphos-

phorylierung essenziellen NAD^+ im Cytoplasma. Die Redoxreaktionen, d. h. die Übertragung des Wasserstoffs auf den Sauerstoff, führen zum Aufbau eines Protonengradienten über der inneren Membran der Mitochondrien. Dieser Gradient treibt ATP-synthetisierende Enzyme an (ATP-Synthasen), die sich ebenfalls in der inneren Membran der Mitochondrien befinden. Diese Art der Phosphorylierung von ADP wird **oxidative Phosphorylierung** genannt und liefert 32 ATP-Moleküle pro Glucosemolekül. Durch den Citratzyklus in den Mitochondrien kommen noch zwei Moleküle Guanosintriphosphat (GTP) dazu, die energetisch als ATP-Äquivalent angesehen werden können. Zusammen mit den aus der Glykolyse gebildeten zwei Molekülen ATP werden also insgesamt 36 Moleküle ATP pro Glucosemolekül erzeugt. Der Wirkungsgrad der Energieübertragung beträgt bei Standardbedingungen 38 %, liegt aber bei den realen Konzentrationsverhältnissen der Zelle höher.

In prokaryotischen Zellen finden die membrangebundenen Reaktionen der Atmungskette und der ATP-Synthese an der Zellmembran statt.

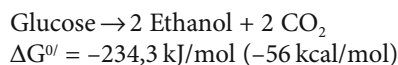
Bei reichlichem Nahrungsangebot werden neben ATP makromolekulare Energiespeichermoleküle in den Zellen synthetisiert. Für die Langzeitspeicherung werden meist Zuckerpolymere, z. B. Stärke oder Glykogen, als unlösliche Speichergamula angesammelt. Bei Bedarf werden diese Substanzen wieder in die monomeren Bausteine gespalten und im Stoffwechsel umgesetzt.

2.2.5 Gärungen

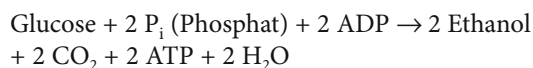
Unter anaeroben Bedingungen, die eine vollständige Oxidation von Kohlenhydraten zu CO_2 und Wasser nicht erlauben, erfolgt in vielen Organismen ein **teilweiser Abbau**. Man bezeichnet diese Prozesse als Gärungen. Im Vergleich zur oben beschriebenen vollständigen Oxidation von Glucose ist die ATP-Ausbeute der Glykolyse mit zwei Molekülen ATP gering. Diese Möglichkeit der ATP-Bildung durch Substratkettenphosphorylierung ist für Organismen, die keine Atmungskette besitzen, wie etwa die obligaten Anaerobier, die einzige Möglichkeit zur ATP-Synthese. Sie dient auch bei manchen ansonsten aerob lebenden Organismen

bei Sauerstoffmangel zur Aufrechterhaltung von Zellprozessen. Das in der Glykolyse gebildete Pyruvat wird dabei über Folgereaktionen, z. B. bei der alkoholischen Gärung über die in Abbildung 2.21 aufgezeigte Ethanolbildung, umgesetzt.

Für die Bruttogleichung der Alkoholgärung durch Hefen ergibt sich:



Unter Berücksichtigung der ATP-Synthese ergibt sich als Nettoreaktion der alkoholischen Gärung:



Bei der Gärung entsteht ein verhältnismäßig **energiereiches Produkt** wie Ethanol, das in der Regel ausgeschieden wird. Weitere Beispiele für Produkte, die bei Gärprozessen gebildet werden, sind Milchsäure (Lactat), Propionsäure (Propionat), Ameisensäure (Formiat), Buttersäure (Butyrat) und Essigsäure (Acetat). Abbildung 2.22 zeigt bekannte Stoffwechselwege, die bei Gärungsreaktionen beobachtet werden. Allen Folgereaktionen ist gemein, dass sie zur Re-Oxidation des NADH zu NAD⁺ führen – in Abbildung 2.22 als Aufnahme von [2H] dargestellt –, welches für den Ablauf der Glykolyse zur Substratkettenphosphorylierung benötigt wird (Abb. 2.20). Ohne diese Regenerierung von NAD⁺ durch die Folgereaktionen würde die Glykolyse und

Abb. 2.21 Enzymkatalysierte Reaktionen in Hefen bei der Umwandlung von Pyruvat zu Ethanol (Gärung)

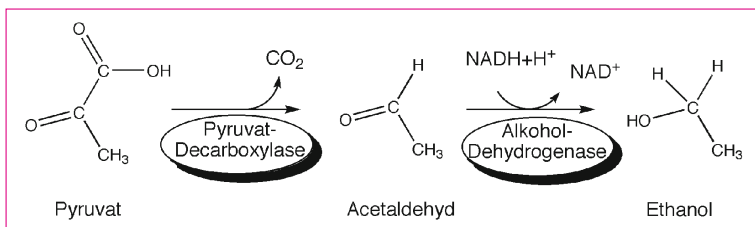
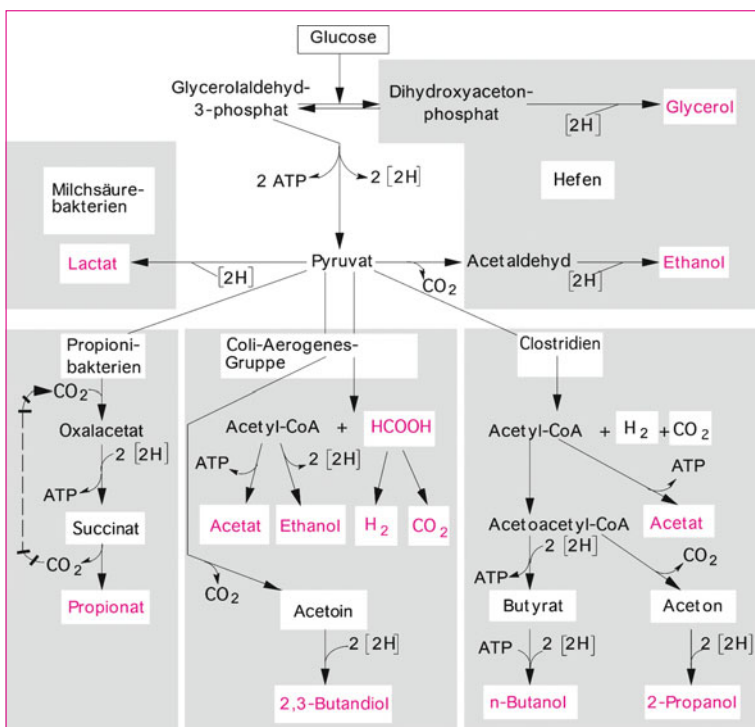


Abb. 2.22 Produkte aus der Vergärung von Glucose durch die wichtigsten Gruppen der Gärorganismen (nach Wartenberg 1989)



damit die ATP-Produktion schnell zum Erliegen kommen.

Wie bereits erwähnt, können **anaerobe Organismen** Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht nutzen, da sie über keine der Atmungskette vergleichbaren Enzymsysteme verfügen. Stattdessen werden die Reduktionsäquivalente, wie $[2H]$ auch genannt werden, von organischen Molekülen aufgenommen. Entsprechend der geringeren ATP-Ausbeute sind das Wachstum und die Zellausbeute, bezogen auf das Nährsubstrat, gegenüber aeroben Mikroorganismen drastisch geringer. Ähnlich den beschriebenen Gärungsreaktionen bilden Anaerobier dabei für die biotechnologische Nutzung interessante Substanzen, z. B. Ethanol oder Methan (Biogas), die aus der Zelle ausgeschieden werden.

Diese Eigenschaften der Anaerobier werden bei der anaeroben Reinigung belasteter Abwasserströme genutzt. Im Vergleich zu aeroben Organismen entstehen nutzbares Biogas und wesentlich geringere Mengen an Klärschlamm.

2.3 Regulation zellulärer Vorgänge

Eine grundlegende Eigenschaft aller Lebewesen ist die Fähigkeit, ihren Stoffwechsel sowie ihre sonstigen Aktivitäten den äußeren Bedingungen anzupassen. Diese **Fähigkeit zur Anpassung** beruht auf einer äußerst komplexen sensorischen und regulatorischen Maschinerie, deren Grundbausteine bereits vorgestellt wurden und deren Zusammenspiel in diesem Kapitel näher betrachtet werden soll.

Die molekularen Mechanismen der Stoffwechsel-Steuerung sind auch für die Bioprozesstechnik sehr wichtig. Im Verlauf einer **Kultivierung von Zellen** im Rührkessel wird die eingesetzte Kohlenstoff- und Energie-Quelle (z. B. Glucose) verbraucht, und die Zellzahl nimmt während einer Kultivierung um mehrere Größenordnungen zu. Jede Zelle ist also einer Konzentrationsabnahme der Nährstoffe und zunehmender Konkurrenz um gelösten Sauerstoff im Medium ausgesetzt. Selbst bei kontinuierlichen Verfahren sind lokale Änderungen der Reaktionsbedingungen im Bereich der Zudosierung von Medium

nicht auszuschließen. Bei Produktions-Bioreaktoren (ca. $> 1 \text{ m}^3$) treten, z. B. aufgrund von Geschwindigkeitsgradienten zwischen Rührelement und Reaktorgehäuse, Reaktionskompartimente mit verschiedenen Reaktionsbedingungen auf (Kapitel 7), denen die Zellen ausgesetzt sind. Je nach den dabei auftretenden Konzentrationsgradienten und Zeitkonstanten wird eine Zelle auf solche Änderungen reagieren. Das Verständnis der dabei zugrunde liegenden Regulationsmechanismen ist für die Optimierung und Modellierung biotechnologischer Verfahren essenziell.

2.3.1 Biologische Zeitkonstanten

Der Zeitbedarf für biologische Reaktionen ist aus Abbildung 2.23 ersichtlich. Die schnellsten Vorgänge in biologischen Systemen laufen im Bereich von Picosekunden ab, z. B. der Primärvorgang beim Sehen. Die gezielte Bewegung von Molekülen hängt von deren Größe ab, beispielsweise verlaufen Knickbewegungen von Proteinen in mehreren Nanosekunden. Die Entspiralisierung doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure (DNA), einem sehr großen Molekül, erfordert Mikrosekunden. Richtwert für den Zeitbedarf einer enzymatischen Reaktion sind Millisekunden. Er hängt stark von der Anzahl der Reaktionsschritte ab. Die schnellsten enzymatischen Umsetzungen verlaufen im Bereich von Mikrosekunden.

Carboanhydrase, ein Enzym, das die Hydratisierung von CO_2 und damit den Austausch zwischen wässriger und gasförmiger Phase, z. B. in den Gefäßen der Lunge, katalysiert, setzt in einer Sekunde 1 000 000 Moleküle um ($k_{\text{cat}} = 1,0 \times 10^6$). Dies ist zehnmillionenfach schneller als die unkatalysierte Reaktion und entspricht der theoretisch möglichen Umsatzgeschwindigkeit, die sich aus den Diffusionsstrecken am Enzym ergeben.

Mehrstufige Reaktionen, mit mehreren Reaktionspartnern, z. B. Redoxreaktionen, können bis zu einer halben Sekunde für den Umsatz eines Moleküls benötigen. Die Synthese eines Proteins, welches die Kondensation von vielen Aminosäuren erfordert, braucht einige Sekunden. Dies sind auch Zeitkonstanten, die für Regelprozesse, die molekulare Änderungen erfordern, mindestens zu veranschlagen sind. Die Verdopplungszeit ei-

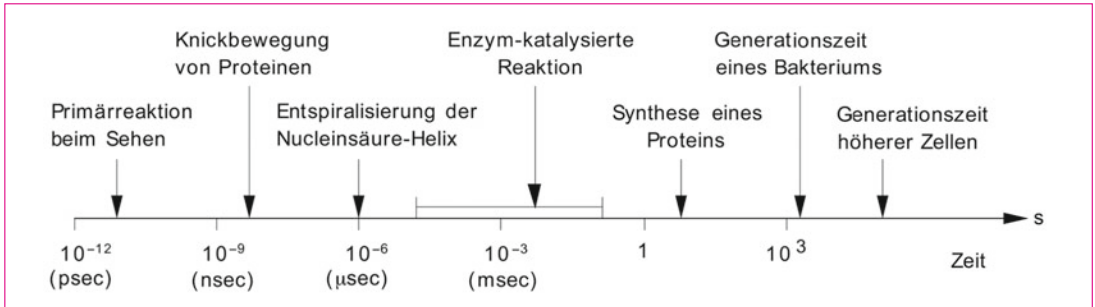


Abb. 2.23 Typische Zeitkonstanten biologischer Reaktionen (nach Berg et al. 2007)

nes Bakteriums, z. B. von dem bereits mehrfach erwähnten *Escherichia coli*, einem „Arbeitspferd“ der Biotechnologen, beträgt unter günstigen Wachstumsbedingungen etwa 20 Minuten. Die Zellen der Eukaryoten, die einen komplexeren Stoffwechsel aufweisen, benötigen zur Verdoppelung der Zellzahl in der Regel wesentlich länger, z. B. mehrere Stunden bis zu Tagen.

2.3.2 Grundmechanismen der Regulation

Als Reaktion eines lebenden Systems auf Veränderungen der Umwelt werden Stoffwechselvorgänge an- und abgeschaltet, d. h. die Aktivitäten von Enzymen gezielt verändert. Dies ist durch Änderung der Aktivität der bereits synthetisierten Enzyme oder durch Änderung der Expression (*de novo*) von Enzymmolekülen möglich. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt durch eine Vielzahl von Mechanismen, von denen einige in Abbildung 2.24 schematisch dargestellt sind.

2.3.2.1 Regulation auf der Ebene der Nucleinsäuren

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, ist die genetische Information einer Zelle als Abfolge von Basen auf der Desoxyribonucleinsäure (DNA) festgelegt. Dieser Zentralspeicher der Information, das Genom des Organismus, ist in jeder Zelle vorhanden und einer großen Bibliothek vergleichbar. Die in der DNA enthaltene Information ist in funktionellen Einheiten (den Genen) or-

ganisiert, die in den meisten Fällen die Informationen für die Synthese von Proteinen beinhalten, aber auch die für tRNAs und rRNAs (s. u.). Die Zahl der Gene eines Organismus hängt von seiner Komplexität ab. Prokaryoten besitzen in der Regel einige Tausend Gene, während die Genome hoch entwickelter Eukaryoten einige Zehntausend Gene umfassen.

Zur Realisierung der Information eines Gens (man bezeichnet dies als Genexpression) wird der Bereich der DNA, der die Information zur Synthese eines Proteins trägt, in sogenannte **messenger-RNA (mRNA)** überschrieben (weitere Details s. auch Abschnitt 1.1.3 und Abb. 1.5). Diesen Vorgang bezeichnet man als Transkription. Die Bildung der mRNA wird durch die RNA-Polymerase katalysiert, die sich an den Beginn eines Gens (den Promotor) anheftet, das dem Gen entsprechende DNA-Stück abfährt und dabei die zum DNA-Strang komplementäre RNA-Sequenz synthetisiert. Diese **messenger-RNA** gelangt bei Prokaryoten (s. auch Abschnitt 1.2.1) direkt oder bei Eukaryoten nach Prozessierung (Introns werden entfernt; s. auch Abschnitt 1.2.2) und spezifischem Transportprozess aus dem Zellkern heraus zu den **Ribosomen**, die gemäß dem genetischen Code die Nucleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzen (Translation) und so ein Protein synthetisieren. Die in einer Zelle insgesamt vorhandenen mRNA-Moleküle bilden ein Maß für die Proteinausstattung und damit letztlich für die metabolische Aktivität der Zelle. Bildlich gesprochen wird aus der Zentralbibliothek ein Satz von Bauplänen für ganz bestimmte, gerade benötigte Proteine kopiert und per Bote zur Proteinfabrik gebracht. Dort wird

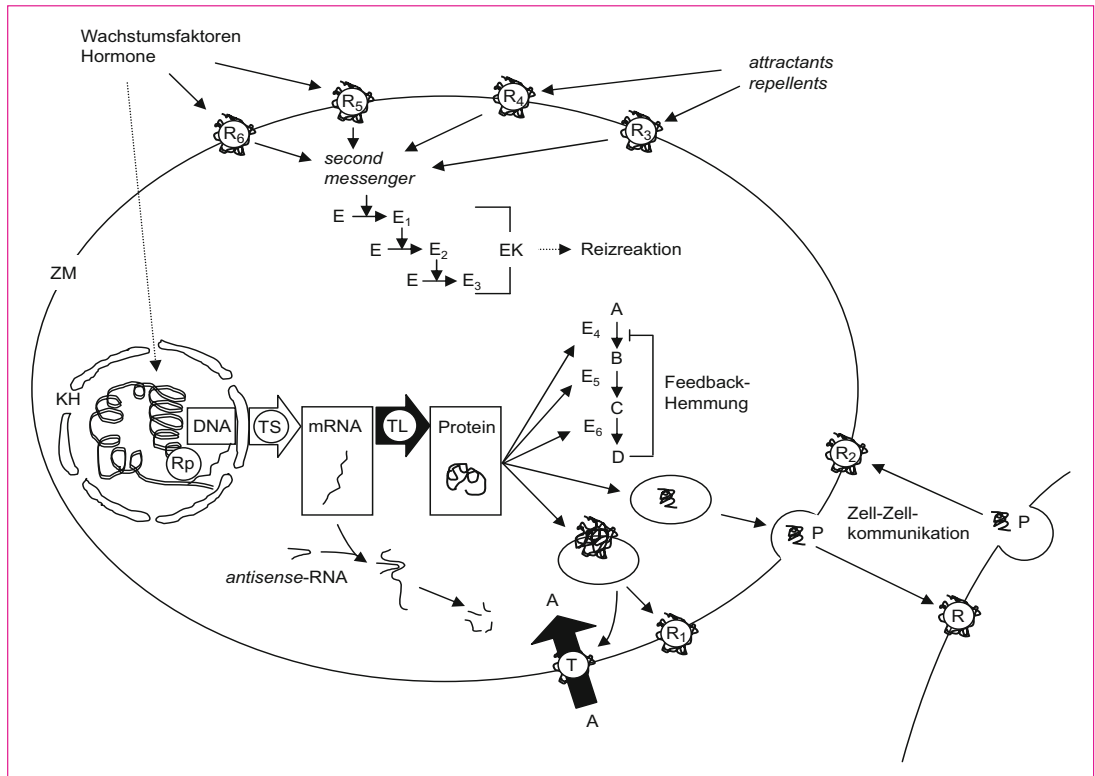


Abb. 2.24 Beispiele für biologische Regelkreise einer Zelle. E, E₁, E₂, E₃,... = Enzyme; R, R₁, R₂, R₃,... = Rezeptoren; Rp = RNA-Polymerase; T = Transportprotein; P = als Hormon wirkendes Peptid; EK = Enzymkaskade; KH = Kernhülle (bei Eukaryoten); ZM = Zellmembran; TS = Transkription; TL = Translation; A, B, C, D = Substanzen des Stoffwechsels

anhand der Baupläne nach genau festgelegten Regeln die Synthese der entsprechenden Proteine durchgeführt.

Mit modernen molekularbiologischen Methoden ist es heute möglich, in einem Schritt Informationen über die Expression einer Vielzahl von Genen in einer Zelle zu erhalten. Man verwendet hierzu sogenannte DNA-Chips, die auf kleinstem Raum molekulare Sonden für sehr viele Gene des betreffenden Organismus tragen. Durch Auswertung der Reaktion der verschiedenen Sonden mit der Gesamtpopulation zellulärer mRNA kann auf das Vorhandensein der mRNA der jeweiligen Gene geschlossen und ein umfassendes Expressionsprofil der Zelle abgeleitet werden. Vergleiche der Expressionsprofile von Zellen unter unterschiedlichen metabolischen Bedingungen bzw. von normalen und krankhaft veränderten Zellen sind ein wichtiges Hilfsmittel, um die an den

jeweiligen Veränderungen beteiligten Gene zu identifizieren.

Bei Prokaryoten erfolgt die **Regulation der Genexpression** hauptsächlich durch Kontrolle der Transkription. Oftmals wird hierbei der Promotor eines Gens durch die Bindung eines Repressorproteins blockiert, sodass die nachfolgende DNA-Sequenz durch **RNA-Polymerase** nicht mehr abgelesen werden kann. Gene, die die Enzyme für die verschiedenen Schritte eines Biosynthese- oder Abbaupfades codieren, sind oftmals in einer funktionellen Einheit, einem **Operon**, zusammengefasst. Die Gene des gesamten Operons werden dann von der RNA-Polymerase in einem Stück abgelesen und die resultierende mRNA anschließend in die verschiedenen Proteine translatiert. Dies ermöglicht auf relativ einfache Weise die koordinierte Regulation der betreffenden Gene. Diese Art der

Regulation wird in Abschnitt 2.3.3.2 am Beispiel des Lactose-Operons genauer beschrieben.

Bei Eukaryoten sind die Mechanismen der Regulation der Genexpression sehr komplex und vielschichtig. Eukaryotische DNA ist in der Zelle mit Histonproteinen assoziiert, wodurch das Ablesen der DNA-Sequenzen erschwert wird. Zur Expression eines Gens sind in der Regel Transkriptionsfaktoren notwendig, Proteine, die an den Promotor bzw. an weitere Kontrollbereiche des Gens binden, dort gezielte Veränderungen der Histonmoleküle induzieren und das Ablesen des Gens erlauben. Bei Eukaryoten wird die Kontrolle der Genexpression auf der Ebene der Transkription durch weitere Regulationsmechanismen ergänzt. Eukaryotische mRNA wird nach ihrer Transkription durch zusätzliche Reifungsschritte verändert und muss aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert werden – diese Schritte können ebenfalls durch Regulationsmechanismen beeinflusst werden. Schließlich kann die Effizienz der Translation von mRNA-Molekülen durch Bindung regulatorischer Proteine an die RNA moduliert werden. In der Summe tragen all diese Mechanismen zur Regulation der Expression des betreffenden Gens bei.

2.3.2.2 Regulation auf der Ebene der Proteine

Veränderungen des Stoffwechsels einer Zelle erfolgen nicht nur durch Regulation der Genexpression und damit der Menge bestimmter Enzyme; in vielen Fällen wird auch die katalytische Aktivität der vorhandenen Enzyme beeinflusst. Dies geschieht durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen.

1. Allosterische Konformationsänderungen können durch reversible Bindung kleiner Moleküle (Liganden) an das Protein oder durch Interaktion mit anderen Proteinen induziert werden und führen oftmals zu Veränderungen der Aktivität eines Proteins (Abschnitt 2.1.5). Allosterische Effekte werden beispielsweise zur Koordination vieler Stoffwechselwege durch **Feedback-Hemmung** ausgenutzt (Abb. 2.25). In dem hier gezeigten schematischen Beispiel wird aus der Ausgangssubstanz A über mehrere enzymatische Reaktionsschritte das Endprodukt E gebildet. Liegt genügend E vor, sodass

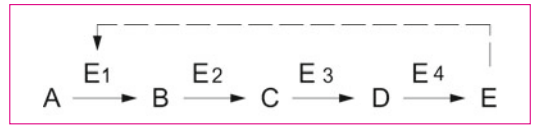


Abb. 2.25 Schematische Darstellung der Feedback-Regulation (Endprodukt-Hemmung). A bis E = Substrate eines Stoffwechselweges; E₁ bis E₄ = Enzyme des Stoffwechselweges, E₁ = allosterisches Enzym (Schrittmacher-Enzym)

eine weitere Synthese unerwünscht ist, so wird nicht nur der letzte Schritt der Synthese, sondern die ganze Synthesekette abgeschaltet. Dies erfolgt z. B. über eine allosterische Hemmung des ersten Enzyms (E₁) durch die Substanz E, dem Endprodukt der Synthesekette. Auf diese Weise kann die Aktivität der gesamten Synthesekette graduell den Bedürfnissen der Zelle angepasst werden. Allosterische Effekte führen oftmals, ähnlich wie bei der Signalverarbeitung eines Computers, zu zwei „Schaltzuständen“ eines Proteins, wobei das betreffende Protein dann als molekularer Schalter fungiert. Beispiele für **allosterische Schaltmoleküle** sind membrangebundene „7-Helix“-Hormonrezeptoren, die die Bindung eines Hormonmoleküls über die Zellmembran hinweg ins Innere der Zelle melden (Abb. 2.26). An der Signalübertragung sind mehrere Proteine beteiligt, die allosterisch miteinander wechselwirken. Die Bindung des Hormons verändert die Konformation des Rezeptorproteins R und eines GTP/GDP-bindenden Proteins G (G-Protein), sodass G für GTP eine erhöhte Affinität erhält. Bindet GTP an G, so wird die Adenylatcyclase, ein Enzym, welches die Umsetzung von ATP zu zyklischem AMP (cAMP) katalysiert, aktiviert. Freigesetztes cAMP aktiviert eine Proteinkinase, wodurch die Phosphorylierung von Proteinen ausgelöst wird und letztlich deren Aktivität reguliert wird. Der Rezeptorkomplex kann das Hormonsignal auch abschalten. Dies erfolgt über das G-Protein, welches in einer langsamen Reaktion gebundenes GTP zu GDP spaltet. Sobald GDP an G gebunden vorliegt, wird die Adenylatcyclase in Umkehrung der Aktivierungsreaktion abgeschaltet.

Das als Folge der Hormonbindung in der Zelle gebildete cAMP wird als **second mes-**

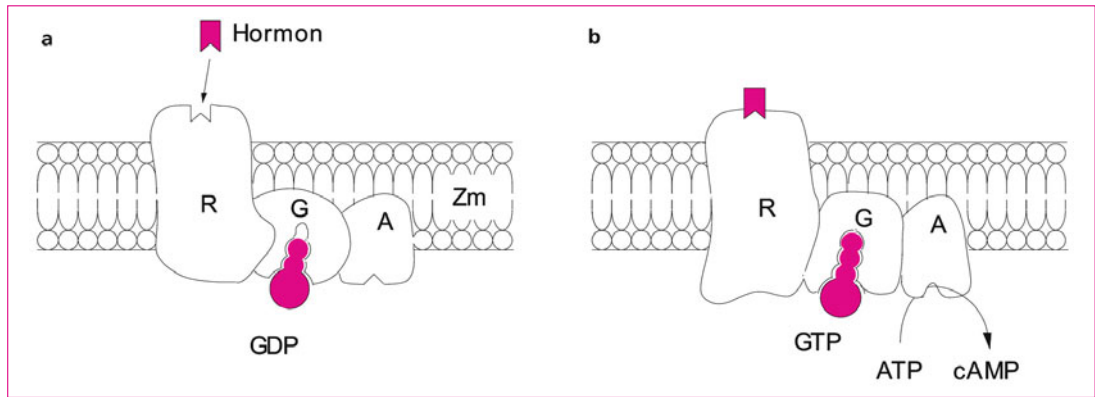


Abb. 2.26 Hormonrezeptoren als Beispiel allosterischer molekularer Schalter. (a) Das Rezeptorprotein (R) ist frei; und das GTP/GDP-bindende Protein (G-Protein, G) besitzt eine schlechte Affinität zu GTP; A = Adenylatcyclase; Zm = Zellmembran. (b) Der Ligand (Hormon) bindet an den Rezeptor und beeinflusst die Konformation von G (hohe Affinität zu GTP), die Adenylatcyclase (A) ist jetzt aktiviert und synthetisiert cAMP (*second messenger*)

senger, als zweite, zellinterne Signalsubstanz des Hormonsignals, bezeichnet. Außer cAMP fungieren noch weitere Moleküle als *second messenger* in Zellen, z. B. cGMP, Calcium-Ionen und Abbauprodukte von bestimmten Membranlipiden wie Diacylglycerol und Inositolphosphate.

- Neben allosterischen Effekten stellen **reversible kovalente Modifikationen** von Proteinen einen grundlegenden Mechanismus zur Regulation ihrer Aktivität dar. Eine der häufigsten Modifikationen dieser Art ist die Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste eines Proteins. Zum Beispiel wird die Glykogenphosphorylase, die Zuckereinheiten aus dem Energiespeicher Glykogen freisetzt, durch Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes aktiviert (s. auch Abschnitt 2.1.5). Die Phosphorylierung von Proteinen wird durch spezifische Proteinkinasen katalysiert, wobei ATP als Donor der Phosphorylgruppe dient. Proteinphosphorylierungen sind reversibel, da die Phosphatreste hydrolytisch durch Proteinphosphatasen entfernt werden können. Phosphorylierungen von Proteinen spielen ebenfalls bei Signalweiterleitungsprozessen in der Zelle eine extrem wichtige Rolle. Die betreffenden Proteine verhalten sich dabei wie molekulare Schalter, die zwischen dem phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand wechseln können.

- Ein weiterer Mechanismus der Regulation der Aktivität eines Enzyms ist die **proteolytische Aktivierung**. Hierbei wird durch Hydrolyse einer oder weniger Peptidbindungen ein inaktives, als **Proenzym** oder **Zymogen** bezeichnetes Enzym aktiviert. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Regulationsmechanismen ist diese Aktivierung irreversibel. Beispiele für diesen Regulationsmechanismus sind die Aktivierung von Verdauungsenzymen wie Trypsin oder Chymotrypsin oder der Enzyme der Blutgerinnungskaskade. Diese Prozesse können, anders als die Proteinphosphorylierungen, auch außerhalb der Zelle stattfinden, da hierzu keine Energiequelle (ATP) benötigt wird.

2.3.3 Komplexe zelluläre Regelkreise

Bei der Anpassung von Organismen an veränderte Umweltbedingungen spielen oft komplexe Regelkreise eine Rolle, wobei die beschriebenen Regulationsmechanismen variieren und in unterschiedlicher Weise kombiniert sein können. Die Anpassung von Organismen an veränderte Umweltbedingungen setzt die Aufnahme und Verarbeitung von Informationen bzw. Signalen aus der Umwelt voraus. Hierbei spielen zumeist selektive

Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Rolle, die mit spezifischen Substanzen in der Umwelt wechselwirken und – als Folge dieser Wechselwirkung – ein entsprechendes Signal in der Zelle auslösen. Man findet solche Signalerkennungs- und -verarbeitungsmechanismen sowohl bei Bakterien als auch bei Zellen höherer Organismen. Bakterienzellen können beispielsweise Konzentrationsgradienten verschiedener chemischer Substanzen wahrnehmen und ihre Schwimmrichtung zu diesen Substanzen hin (positive Chemotaxis) oder von ihnen weg (negative Chemotaxis) ändern. Zellen höherer Organismen besitzen extrem diversifizierte Signaltransduktionsmechanismen, die sowohl der Wahrnehmung von Reizen aus der Umwelt als auch der Kommunikation zwischen den Zellen eines Organismus dienen. Im Folgenden soll auf einige Beispiele komplexer Regelkreise eingegangen werden.

2.3.3.1 Anpassungen im Wachstumsverhalten

Ein Mikroorganismus kann alternativ auf einer Vielzahl **verschiedener Kohlenstoff- und Energiequellen** wachsen. *E. coli* verwertet z. B. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Arabinose, Xylose, Rhamnose, Maltose, Lactose, Acetat, Succinat, Glycerol, Mannitol, Dulcitol, Sorbitol u. a. m. Diese Substanzen können nicht einfach durch die Zellmembran hindurch ins Innere der Zelle gelangen. Die Zelle verfügt für diese Substanzen über genetische Informationen zur Synthese **spezifischer Transportproteine** bzw. **-systeme** sowie für geeignete Enzyme zur Substratverwertung, welche bei Bedarf, d. h. Anwesenheit der betreffenden Substanz im Wachstumsmedium, in der Zelle synthetisiert werden.

Eine *E. coli*-Zelle nimmt bei schnellem Wachstum beispielsweise pro Sekunde bis zu 200 000 Moleküle Glucose auf, die zu Zellbausteinen und ca. 10^6 Molekülen ATP pro Sekunde umgesetzt werden. Die Proteinbiosynthese wird an etwa 20 000 Ribosomen pro Zelle durchgeführt. Dies entspricht etwa 40 % der Trockenmasse des Bakteriums. Pro Sekunde werden etwa 15 Aminosäuren am Ribosom zur Proteinsynthese umgesetzt und dabei drei energiereiche Moleküle (ein ATP, zwei GTP) pro Aminosäurekopplung benötigt. Dies entspricht ebenfalls einem Umsatz von ca.

10^6 Molekülen ATP pro Sekunde und Zelle, d. h. die meiste Energie wird bei schnellem Wachstum zur Proteinsynthese – insbesondere auch zur Vielfältigung der Ribosomen – gebraucht.

Beim Übergang von einem nährstoffreichen in ein -armes Medium wird die Proteinsynthese in *E. coli* abrupt angehalten. Das in der Zelle vorhandene ATP wäre innerhalb von Sekunden aufgebraucht, wenn die Proteinsynthese unvermindert weiterlaufen würde. Hierbei spielen Alarmsubstanzen („Alarmane“), wie das ungewöhnliche Nucleotid Guanosin-3'-diphosphat-5'-diphosphat (Guanosintetraphosphat; ppGpp), eine wichtige Rolle. ppGpp wirkt als intrazellulärer Botenstoff und inhibiert in koordinierter Weise die Synthese neuer Ribosomen-Komponenten und die Synthese von Enzymen für die DNA-Replikation. Gleichzeitig werden die Gene für die Aminosäurebiosynthese aktiviert. Als Folge des Mangels an Nährstoffen nimmt die Verdopplungszeit der Zellen dabei von 20 Minuten bis auf zehn Stunden und mehr zu.

2.3.3.2 Das Lactose-Operon

Die Regulation des Lactose-Operons von *E. coli* ist ein sehr gutes Beispiel dafür, wie die Anpassung an eine neue Kohlenstoff- und Energiequelle (Lactose) im Medium durch eine veränderte Genexpression erfolgt. Das Lactose-Operon ist in Abbildung 2.27 schematisch dargestellt. Zwei der insgesamt drei Strukturgene des Operons codieren für Proteine, die für die Aufnahme (Lactose-Permease) und die Hydrolyse (β -Galactosidase) von Lactose notwendig sind. Das dem Operon unmittelbar benachbarte Regulatorgen codiert für ein Repressorprotein, welches die Ablesung der genetischen Information des Lactose-Operons durch Bindung an den Operator – dies ist eine funktionelle DNA-Sequenz – kontrolliert. In Abwesenheit von Lactose im Medium bindet das permanent synthetisierte Repressorprotein an den Operator und blockiert dadurch fast vollständig die Transkription der Strukturgene durch die RNA-Polymerase. Diese Blockade wird aufgehoben, wenn das Bakterium im Medium Lactose vorfindet.

Die wenigen Lactose-Permease- (Transportprotein für Lactose in der Zellmembran) und β -Galactosidase-Moleküle, die trotz Repressor-

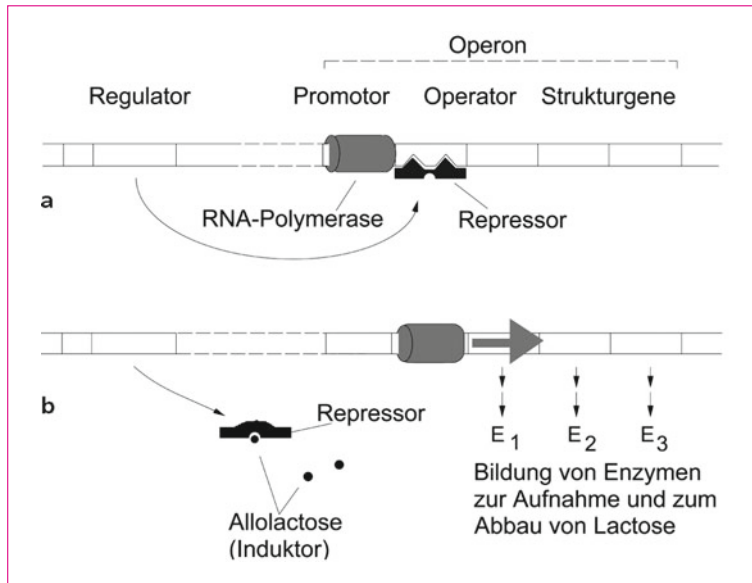


Abb. 2.27 Das Lactose-Operon in *E. coli*. Schema der negativen Regulation des Lactose-Operons (*lac*-Operon). Das Auftreten von Allolactose (Nebenprodukt bei der Lactosespaltung durch β -Galactosidase) in der Zelle hebt die negative Kontrolle auf. Allolactose induziert die Aktivierung der Gene für die Enzyme E₁, E₂ und E₃, die für die Verwertung von Lactose benötigt werden. (a) Ohne Lactose im Medium: Vom Regulatorgen ausgehend werden durch Proteinbiosynthese (nicht dargestellt) Repressorproteine gebildet. Ein Repressorprotein verschließt den Operator. Die RNA-Polymerase kann an den Promotor binden, jedoch nicht die Strukturgene transkribieren. (b) Mit Lactose im Medium: Das enzymatische Nebenprodukt Allolactose (Induktor) bindet an das Repressorprotein, dieses dissoziiert aufgrund einer Konformationsänderung vom Operator, und die RNA-Polymerase kann über den nunmehr offenen Operator die Strukturgene transkribieren

protein gebildet werden können, sorgen für das Einschleusen der Lactose in die Zelle und für ihre Spaltung in Galactose und Glucose. Bei der enzymatischen Spaltung entsteht durch zufällige Transglykosylierung in geringen Mengen **1,6-Allolactose**, ein Lactose-Isomer, das der **physiologische Induktor** für das Lactose-Operon ist. Die Allolactose bindet mit hoher Affinität an das Repressorprotein und verursacht eine allosterische Konformationsänderung des Repressors, der infolgedessen nicht mehr an die DNA, den Operator, binden kann. Die Folge ist, dass die RNA-Polymerase den dahinter liegenden Bereich der DNA, die Strukturgene, nun ständig ablesen kann, die entsprechende mRNA bildet und die Synthese von Lactose-Permease, β -Galactosidase und Thiogalactosid-Transacetylase am Ribosom erfolgt. Lactose wird jetzt effektiv metabolisiert, und die Zellen können sich bei ausreichender Konzentration anderer essenzieller Nährstoffe im Medium optimal vermehren.

Ist Lactose im Medium verbraucht, wird keine Allolactose mehr gebildet. Das Repressorprotein nimmt in Abwesenheit des Induktors seine ursprüngliche Konformation wieder an, bindet jetzt wieder an den Operator und blockiert dadurch die RNA-Polymerase fast vollständig. Durch dieses Prinzip der negativen Regulation wird verhindert, dass die Enzyme, die zur Verwertung von Lactose benötigt werden, unnötigerweise synthetisiert werden. Oft wird bei *in vitro*-Untersuchungen zum Lactose-Operon (*lac*-Operon) ein **künstlicher Induktor**, das **Iso-propylthiogalactosid (IPTG)**, verwendet, der strukturell der Allolactose ähnelt und deshalb ebenfalls effektiv an das Repressorprotein bindet, aber nicht enzymatisch von der β -Galactosidase abgebaut werden kann.

Neben dieser **negativen Kontrolle** durch das Repressorprotein wird die Expression des *lac*-Operons durch einen weiteren Mechanismus reguliert. Bei näherer Untersuchung zeigte sich

nämlich, dass beim Vorhandensein mehrerer Kohlenstoffquellen im Medium, z. B. Glucose neben Lactose, die erwartete Induktion der Lactoseverwertung so lange unterblieb, bis Glucose vollständig verbraucht war, d. h. Glucose kann die Lactose-Induktion aktiv unterdrücken. Im Wachstumsverhalten der Zellen tritt bei der Umstellung von der einen Energiequelle (Glucose) auf die andere (Lactose) ein zeitweiliger Wachstumsstillstand auf, sodass die Zunahme der Zellzahl in zwei Phasen erfolgt. Dieses Phänomen wird als **Diauxie** bezeichnet und spiegelt die Optimierung des Stoffwechsels der Zellen im Hinblick auf größtmögliche Effizienz wider. Da Glucose direkt in der Glykolyse abgebaut werden kann, ohne dass die Proteine des *lac*-Operons synthetisiert werden müssen, ist es ökonomisch sinnvoll, Lactose nur dann zu verwerten, wenn Glucose verbraucht ist.

Verantwortlich für die Inhibition des *lac*-Operons durch Glucose, der sogenannten **Katabolit-Repression**, ist das **CAP-Protein** (engl. *catabolite activator protein*). Das CAP-Protein muss an den Lactose-Promotor binden, damit das *lac*-Operon effektiv von der RNA-Polymerase abgelesen werden kann. Das CAP-Protein wird durch einen Liganden, **zyklisches AMP (cAMP)**, allosterisch reguliert. In Abwesenheit von Glucose ist die cAMP-Konzentration in der Zelle hoch, cAMP bindet an das CAP-Protein, welches als cAMP-CAP-Protein jetzt an den Lactose-Promotor bindet, und im Gegensatz zum Lactose-Repressor die Transkription des Operons durch die RNA-Polymerase stimuliert (**positive Kontrolle**). Ist gleichzeitig Lactose und damit der Induktor Allolactose vorhanden, gibt der Lactose-Repressor den Operator frei, was dann zur Expression der Strukturgene führt. In Gegenwart von Glucose ist die cAMP-Konzentration jedoch niedrig. CAP kann dann nicht an den Promotor binden; folglich unterbleibt die Stimulation der RNA-Polymerase. Das heißt, selbst wenn Lactose vorhanden ist und der Repressor den Operator freigegeben hat, unterbleibt die Expression der Strukturgene durch das Fehlen des CAP-Proteins nahezu vollständig.

Durch ähnliche Mechanismen, wie die hier am Beispiel des *lac*-Operons beschriebenen, wird auch die Expression der Enzyme für andere Stoffwechselwege kontrolliert.

2.3.3.3 Hormone und Wachstumsfaktoren

Bei höheren Zellen sind Signalsubstanzen, z. B. Hormone oder Wachstumsfaktoren, für die Steuerung komplexer Reaktionsabläufe, wie beispielsweise bei der Differenzierung von Zellen im Körper oder in Zellkultur, von Bedeutung. Bei diesen Vorgängen sind an mehreren Stellen molekulare Schalter beteiligt.

Als Beispiel wird die **Umschaltung** von Glykogen-Synthese auf Glykogen-Abbau bei einer Stresssituation durch das Hormon Adrenalin in Muskelzellen näher betrachtet. In der Zelle liegen die Enzyme für Abbau und Aufbau nebeneinander vor, durch die Regulation der Aktivität beider Enzymsysteme wird ein verhängnisvoller Kurzschluss vermieden. Bei einer plötzlich auftretenden Gefahr wird der Stoffwechsel durch einen Adrenalinstoß sehr schnell auf Energieerzeugung für eine bevorstehende Flucht umgestellt. Durch den Adrenalin-stimulus wird Glykogen, ein Speicherpolysaccharid, in der Zelle zu Glucose-1-phosphat-Bausteinen abgebaut, die über Glykolyse und oxidative Phosphorylierung zur ATP-Synthese umgesetzt werden.

Adrenalin bindet dabei an Zellrezeptoren und aktiviert als Folge der damit verbundenen allosterischen Konformationsänderung an der Innenseite der Zellmembran ein Enzym, das die Bildung zellinterner Signalsubstanzen, sogenannter *second messenger* (Abb. 2.24), veranlasst. In diesem Fall ist dies die Adenylat-Cyclase, die die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) als *second messenger* aus ATP katalysiert. cAMP aktiviert allosterisch eine Proteinkinase, die sowohl die Glykogen-abbauenden Enzyme als auch die Enzyme, die für die Glykogen-Synthese zuständig sind, phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung werden die abbauenden Enzyme in die aktive Form umgeschaltet. Im Gegensatz dazu werden die Glykogen-Synthesenzyme durch die Phosphorylierung inaktiviert. Bei einer Umkehrung der Situation werden beide Enzymsysteme durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert. Die Glykogen-spaltenden Enzyme werden dadurch inaktiviert und die synthetisierenden Enzyme aktiviert, d. h. der Organismus wird auf mögliche Neusynthese von Speichermolekülen umgestellt.

Ein Grundprinzip bei diesem und vielen anderen **Signaltransduktionswegen** ist die Ver-

stärkung des Signals. Im Falle der Glykogen-Mobilisierung wird dies durch eine Enzymkaskade erreicht, durch die eine um mehrere Größenordnungen verstärkte Reaktion durch wenige Signalmoleküle ausgelöst wird.

2.3.3.4 Regulation der Glykolyse

Ein Beispiel für die Steuerung komplexer Enzymnetzwerke durch allosterische Feedback-Regulation ist die Glykolyse, deren Einzelreaktionen bereits betrachtet wurden. Die Grundaufgaben der Glykolyse sind der Abbau von Glucose zur ATP-Gewinnung und die Bereitstellung von C_2 - und C_3 -Bausteinen für Aufbaureaktionen, z. B. für die Biosynthese einiger Aminosäuren. Meist sind die Kontrollpunkte einer Reaktionskette diejenigen Reaktionen, die ATP verbrauchen und daher thermodynamisch meist irreversibel sind und am Anfang einer Reaktionskette stehen. In der Glykolyse sind dies die Reaktionen, die durch Hexokinase und Phosphofructokinase katalysiert werden.

Der Hauptkontrollpunkt für die Regulierung der Glykolyse ist die tetramere **Phosphofructokinase (PFK)**. Bei hohem ATP-Gehalt der Zelle, gleichbedeutend mit ausreichend „chemischer Energie“ in der Zelle, wird Phosphofructokinase gehemmt, indem ATP als Ligand an das Enzym bindet und dabei allosterisch die Konformation des Enzyms verändert. Dies setzt die Katalysegeschwindigkeit der PFK herab. Wird die Energie aus ATP in Zellvorgängen verbraucht und dabei vermehrt Adenosindiphosphat (ADP) bzw. Adenosinmonophosphat (AMP) gebildet, so können ADP bzw. AMP die ATP-Hemmung aufheben, sie wirken als Aktivatoren.

Werden wenige C_2 - oder C_3 -Bausteine aus der Glykolyse für Biosynthesen abgezogen, so kommt es zu einer Anreicherung von Pyruvat und Citrat in der Zelle. Erhöhte Citratkonzentrationen führen ebenfalls zur Hemmung der Glykolyse, indem die ATP-Hemmung der Phosphofructokinase in Gegenwart von Citrat allosterisch verstärkt wird.

Die Grobregelung der Glykolyse durch Phosphofructokinase lässt sich also folgendermaßen zusammenfassen: Ist in der Zelle Bedarf für ATP und Synthesebausteine, so ist die Aktivität der Phosphofructokinase maximal, ist beides im

Überfluss vorhanden, so geht die Enzymaktivität durch allosterische Hemmung von ATP und Citrat fast gegen null zurück.

Steht genügend Energie zur Verfügung, so wird durch die Hemmung der Phosphofructokinase Fructose-6-phosphat und das im Gleichgewicht befindliche Glucose-6-phosphat angehäuft. Wenn keine Verwertung der Zuckerphosphate möglich ist, wird durch allosterische Produkt-hemmung der Hexokinase die Glucoseverwertung gehemmt.

Wird daher Zellen, die unter Sauerstoffmangel kultiviert werden, plötzlich Sauerstoff angeboten, so geht die Glucoseverwertung schlagartig zurück. Diese als **Pasteur-Effekt** bezeichnete Umstellung des Stoffwechsels ist aus den genannten Gründen sofort verständlich. Unter anaeroben Bedingungen wird die Glykolyse zur ATP-Synthese benutzt, d. h. der Glucoseumsatz ist wegen der geringen Effektivität der ATP-Bildung hoch. Wenn Sauerstoff zugegen ist, steigt aufgrund der sehr viel effektiveren ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung der ATP-Spiegel rapide an, was zur Hemmung der PFK und damit der Glykolyse bzw. des Glucoseumsatzes führt.

Manche Zellen können eine günstige Versorgungslage mit Energie (ATP) durch Synthese von **Speichermolekülen**, z. B. Stärke oder Glykogen, nutzen, indem das akkumulierte Glucose-6-phosphat für deren Synthese abgezogen wird. Signal für die Umstellung von Energieerzeugung auf Energiespeicherung ist das ATP/AMP-Verhältnis in der Zelle und relativ hohe Konzentrationen an phosphorylierter Glucose.

Bei der späteren Nutzung der „Glucosespeicher“ aufgrund von Energiemangel werden phosphorylierte Glucosemoleküle gebildet, die in die Glykolyse eingespeist werden können. Die Speicherung ist sehr effizient; die Energieverluste bei einem Speicherzyklus, ausgehend von Glucose-6-phosphat über die Polysaccharidform und zurück zum Glucose-6-phosphat, betragen nur ca. 3 %, d. h. fast 97 % der gespeicherten Energie stehen wieder zur Verfügung.

Die an diesem Beispiel dargestellten Mechanismen verdeutlichen die Bedeutung von **zentralen Kontrollpunkten** für die Regulation komplexer Enzymnetzwerke. Die Phosphofructokinase-Reaktion stellt eine zentrale Schalt-

stelle im Stoffwechsel dar, durch die der Umsatz der Glykolyse und die Umstellung von Energieerzeugung und -speicherung in weiten Grenzen reguliert werden. Die Kenntnis solcher zentraler Kontrollpunkte und ihrer regulatorischen Parameter ist für die Modellierung und Optimierung biotechnologischer Prozesse von großer Bedeutung.

2.4 Gentechnik

Die in der DNA eines Organismus gespeicherte genetische Information ist letztlich für sämtliche Aspekte der Struktur und Funktion des Organismus verantwortlich. Dabei umfasst die genetische Information sowohl die Bauanleitungen sämtlicher Proteine und RNA-Moleküle des Organismus als auch Informationen über deren zeitliche und räumliche Expression. Ausgehend von der Aufklärung der **Doppelhelix-Struktur der DNA** durch Watson und Crick im Jahr 1953 wurden die Vorgänge der Informationsweitergabe und -umsetzung detailliert untersucht. Das Verständnis dieser Vorgänge bildet die Basis der modernen Methoden der Gentechnik, die in diesem Abschnitt erläutert werden sollen. Durch gentechnische Verfahren ist es möglich, zellfremde DNA in eine Zelle einzuführen und dort zu exprimieren. Diese zusätzliche genetische Information wird in der Zelle wie die eigene DNA behandelt, d. h. die Zelle benutzt die zellfremde DNA zur Synthese der von ihr codierten Proteine. Hierdurch ergeben sich enorme Möglichkeiten für die Synthese und Gewinnung von Enzymen oder anderen Proteinen, die mit herkömmlichen Methoden nur mit großem Aufwand in größeren Mengen zu gewinnen sind. Ein klassisches Beispiel ist die genetische Modifizierung von Bakterien zur Synthese des Peptidhormons Insulin.

Eine mit enormem Potenzial für die Gentechnik verbundene Entwicklung der letzten Jahre stellen die Genomprojekte dar, deren Ziel die Aufklärung der vollständigen Nucleotidsequenzen der Genome verschiedener Organismen ist. Eine anschauliche Vorstellung der dabei anfallenden Informationsmengen ergibt folgender

Vergleich: Würde man die gesamte Sequenz des menschlichen Genoms (ca. 3×10^9 Basenpaare) als kontinuierlichen Text niederschreiben, so würde dies in der Schriftgröße dieses Buches eine Strecke von ca. 5 000 km ergeben (was in etwa der Entfernung London – New York entspricht). Die Gewinnung dieser gewaltigen Informationsmengen ist eng mit der Entwicklung effizienter und weitgehend automatisierter Verfahren der Nucleotidsequenzanalyse gekoppelt. Mittlerweile wurden die vollständigen Genome von vielen verschiedenen Bakterienspezies und einer Reihe von Eukaryoten, unter anderem des Menschen, ermittelt. Die Bedeutung dieser Genomprojekte liegt darin, dass durch die Verfügbarkeit der kompletten Sequenz des Organismus im Prinzip jedes seiner Gene zugänglich ist und mit gentechnischen Methoden weiter untersucht werden kann. Hierin steckt ein enormes Potenzial, das zum Verständnis komplexer Prozesse, wie z. B. der Zelldifferenzierung oder der Entstehung von Krankheiten, der Entwicklung von Medikamenten oder der biotechnologischen Produktion spezifischer Proteine und Enzyme, genutzt werden kann.

Die Analyse kompletter Genomsequenzen erlaubt auch wichtige Rückschlüsse über den Aufbau von Genomen. So hat sich beispielsweise gezeigt, dass Genome der Prokaryoten und relativ „einfacher“ Eukaryoten, wie z. B. das der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, sehr ökonomisch aufgebaut sind; der größte Teil der DNA dieser Organismen wird von den Genen des Organismus eingenommen. Im Gegensatz dazu besteht die DNA höherer Eukaryoten, wie z. B. die des Menschen, zum größten Teil aus nicht-codierenden und oftmals repetitiven Sequenzen, während die eigentlichen Gene hier nur einen verhältnismäßig kleinen Teil (ca. 5 %) des gesamten Genoms darstellen. Die Bedeutung dieser oftmals als *junk*-DNA bezeichneten, anscheinend nutzlosen Anteile des Genoms ist noch nicht geklärt; vermutlich spielen sie eine wichtige Rolle in der Evolution der Organismen. Erst kürzlich wurden molekulare Hinweise entdeckt, die den nicht-codierenden Sequenzen eine Bedeutung für die Regulation der Genexpression bescheinigten. Hier wird es durch die aktuelle Forschung in den nächsten Jahren wohl noch zu weiteren erstaunlichen Erkenntnissen kommen.

2.4.1 Enzyme als Werkzeuge in der Gentechnik

In der Gentechnik spielt eine Vielzahl von Enzymen eine Rolle, mit deren Hilfe DNA-Moleküle gezielt verändert werden können. Die wichtigsten dieser Enzyme, die gewissermaßen die „Werkzeuge“ des Gentechnikers darstellen, werden nachfolgend beschrieben.

2.4.1.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme, genauer gesagt **Restriktionsendonucleasen**, werden von vielen Bakterienarten und -stämmen gebildet und stellen in diesen Organismen einen Abwehrmechanismus gegen das Eindringen fremder DNA (z. B. der DNA eines Bakteriophagen) dar. Diese Enzyme erkennen eine kurze Nucleotidsequenz auf der DNA (meistens vier bis acht Basenpaare) und durchtrennen (hydrolysieren) die DNA an dieser Stelle. Hierdurch wird die Fremd-DNA in biologisch unwirksame Fragmente gespalten. Die zelleigene DNA wird durch spezifische Methylasen an diesen Erkennungssequenzen methyliert, sodass keine Spaltung der zelleigenen DNA durch das eigene Restriktionsenzym erfolgt. Zurzeit sind mehrere Hundert Restriktionsenzyme bekannt, die jeweils spezifische Sequenzmotive erkennen und die DNA in definierter Weise schneiden. Die Häufigkeit der Schnittstellen für ein bestimmtes Restriktionsenzym hängt von der Basenzahl der Erkennungssequenz ab. Bei vier möglichen, statistisch gleich verteilten Basen und vier Basenpaaren als Erkennungssequenz kommt diese Sequenz jeweils alle 256 (4^4), bei sechs Basenpaaren alle 4 096 (4^6) Positionen vor.

Charakteristisch für viele Restriktionsenzyme ist eine palindromartige Anordnung der Basen in der Erkennungssequenz, d. h. in Richtung der Pfeile gelesen ergibt sich für beide Stränge dieselbe Basenfolge (Abb. 2.28).

Die entstehenden Spaltstücke haben Einzelstrang-Endstücke (überlappende Enden), die sich aufgrund der Basenpaarung mit den komplementären Enden anderer Spaltstücke spontan zusammenlagern können (*sticky ends*), ohne dass die Doppelstränge dabei kovalent verknüpft sein müssen. Im Prinzip kann jedes nach „Verdau“

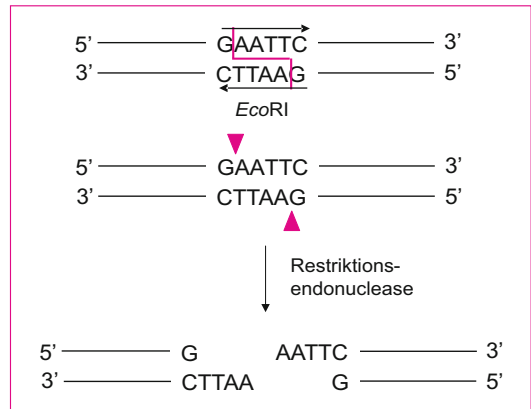


Abb. 2.28 Fragmentierung (Hydrolyse) von DNA durch eine Restriktionsendonuclease aus *E. coli*. Die Bezeichnung „*EcoRI*“ richtet sich nach dem Organismus aus dem die Restriktionsendonuclease isoliert wurde

(Spaltung) mit einem bestimmten Restriktionsenzym entstehende Fragmente mit beliebigen anderen, mit dem gleichen Enzym gebildeten Fragmenten über die komplementären Enden verknüpft werden.

2.4.1.2 DNA-Ligasen

DNA-Ligasen sind Enzyme, die nicht kovalent assoziierte DNA-Sequenzen in kovalent verknüpfte Doppelstränge überführen können – z. B. die in Abbildung 2.28 gezeigten, sich aufgrund der komplementären Basen spontan zusammenlagernden Enden von Restriktionsfragmenten. Diese Enzyme gehören zum natürlichen enzymatischen DNA-Reparatursystem der meisten Zellen. Das durch die Restriktionsenzyme ermöglichte Schneiden von DNA-Molekülen an spezifischen Stellen und die durch DNA-Ligasen ermöglichte Verknüpfung von Restriktionsfragmenten sind die wesentlichen Grundlagen bei der Erstellung rekombinanter (d. h. neu kombinierter) DNA.

2.4.1.3 Polymerasen

Polymerasen synthetisieren den zu einem einzelsträngigen Matrizenstrang komplementären Gegenstrang (Abb. 2.29). Je nach Art der dabei synthetisierten Nucleinsäure unterscheidet man DNA-Polymerasen und RNA-Polymerasen. Poly-

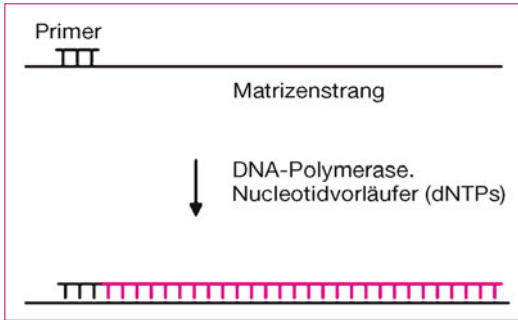


Abb. 2.29 Wirkungsweise der DNA-Polymerase (Details s. Text)

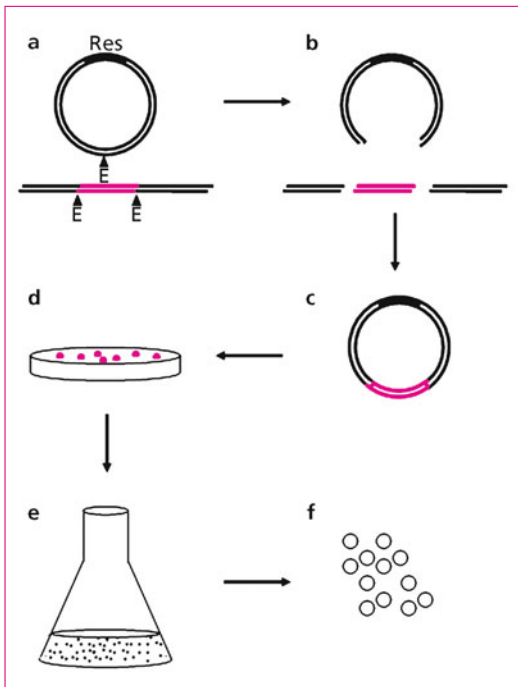


Abb. 2.30 Klonierung eines DNA-Fragments in einen Plasmidvektor. (a, b) Durch Verdau mit einer Restriktionsendonuclease (E) wird das Plasmid an einer definierten Stelle geöffnet und das zu klonierende DNA-Fragment freigesetzt. (c) Anschließend wird das DNA-Fragment mit dem Plasmid mittels DNA-Ligase kovalent verknüpft. (d) Nach Transformation der ligierten DNA (Plasmid) in Bakterien und Kultivieren auf einem Antibiotika-haltigen Nährboden bilden nur diejenigen Bakterien Kolonien, die aufgrund des in dem Plasmid vorhandenen Resistenzgens (Res) gegenüber dem Antibiotikum resistent sind. (e) Nach Vermehren der Bakterien einer Kolonie in Flüssigkultur kann (f) das rekombinante Plasmid aus den Bakterien isoliert werden

merasen spielen in einer Vielzahl gentechnischer Anwendungen wichtige Rollen, beispielsweise bei der Bestimmung der Nucleotidsequenz von DNA-Molekülen oder bei der Polymerasekettenreaktion (Abschnitt 2.4.3).

Für die praktische Anwendung von DNA-Polymerasen ist zu beachten, dass sie einen Primer benötigen, d. h. ein kurzes Stück einzelsträngiger DNA (oder RNA) mit einer zu dem zu kopierenden Matrizenstrang komplementären Basenfolge. Der Primer bindet an die entsprechende Stelle des Matrizenstrangs und stellt dadurch einen Ansatzpunkt – eine Art „Startsubstrat“ – für die Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase dar. Durch die Wahl eines geeigneten Primers kann daher vorherbestimmt werden, welcher Bereich eines DNA-Strangs kopiert wird. Dies ist beispielsweise bei der im Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Polymerasekettenreaktion von Bedeutung.

2.4.2 Die Klonierung eines Gens

Durch die Klonierung eines Gens ist es möglich, den zugrunde liegenden DNA-Abschnitt beliebig zu vermehren und mit molekularbiologischen Methoden in allen Einzelheiten zu untersuchen. Das klonierte Gen kann ferner in einen geeigneten Wirtsorganismus eingebracht werden, etwa um das von ihm codierte Protein gentechnisch zu erzeugen. Die Nucleotidsequenz des klonierten Gens – und damit auch die Aminosäuresequenz des betreffenden Proteins – kann durch Mutagenese gezielt verändert werden; dies ermöglicht die gentechnische Produktion von Biokatalysatoren (Enzymen) mit maßgeschneiderten Eigenschaften. Grundlage dieser Verfahren ist der Einbau der Gensequenz in einen **Klonierungsvektor**. Der Vektor fungiert dabei als „Vehikel“, welches es erlaubt, die eingebaute DNA-Sequenz in einem Organismus (z. B. in Bakterien) zu vermehren.

Organismen, deren Genom durch die Methoden der Gentechnik verändert wurde, bezeichnet man als GVOs (gentechnisch veränderte Organismen). Der Umgang mit diesen Organismen zu Forschungs- oder kommerziellen Zwecken ist an strenge gesetzliche Auflagen geknüpft. Je nach der Art des verwendeten Empfängerorga-

nismus und der Herkunft der in ihn eingeführten Fremd-DNA unterscheidet man verschiedene gentechnische Risiko- bzw. Sicherheitsstufen und damit einhergehende Anforderungen an die Ausstattung des Gentechniklabors oder einer Produktionsanlage.

Die meisten Vektoren leiten sich von bakteriellen **Plasmiden** ab, ringförmigen DNA-Molekülen, die in Bakterien neben der zelleigenen DNA koexistieren können und meist spezifisch zwischen Zellen einer Art übertragen werden. Neben den Plasmiden spielen von Bakteriophagen abgeleitete Vektorsysteme eine Rolle, deren Bedeutung unter anderem darin liegt, dass man mit ihnen relativ große DNA-Fragmente klonieren kann. Die meisten Klonierungsvektoren sind so beschaffen, dass sie nur in einem bestimmten Wirtsorganismus (z. B. dem Bakterium *E. coli*) benutzt werden können; mittels genetischer Methoden wurden jedoch auch Plasmide konstruiert, die in mehreren Zelltypen verwendet werden können, beispielsweise in *E. coli* und in Hefezellen. Solche *shuttle*-Vektoren werden oft benutzt, wenn das einklonierte Gen *in vitro* verändert werden soll. Dies wird in der Regel in dem einfacher zu handhabenden *E. coli*-System gemacht, bevor der Vektor nach Fertigstellung und Vermehrung in den eigentlichen Zielorganismus eingeführt wird.

Die Schritte bei der Klonierung eines Gens in einen Plasmidvektor sind in Abbildung 2.30 dargestellt. Um einen DNA-Abschnitt zu klonieren, werden die Vektor-DNA und der betreffende DNA-Abschnitt mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten, sodass lineare DNA-Stücke mit den gleichen überstehenden Endstücken entstehen. Diese Segmente assoziieren statistisch und bilden lineare oder zyklische Assoziate, die mit Ligasen kovalent verknüpft werden. Mit diesem DNA-Gemisch werden die Wirtszellen „**transformiert**“. Die Zellen werden vermehrt und anschließend auf den Gehalt an gewünschter DNA untersucht. Allerdings ist es normalerweise so, dass nur ein kleiner Anteil der Zellen überhaupt DNA aufnimmt. Diese Zellen müssen aus dem Zellgemisch mit verschiedenen Methoden selektiert werden. Hierzu bedient man sich eines **Selektionsmarkers**. Das Ausgangsplasmid enthält beispielsweise die Information für ein Enzym, welches ein Antibiotikum spalten

kann und der Zelle damit Resistenz gegen dieses Antibiotikum vermittelt. In Gegenwart des Antibiotikums können daher nur Zellen wachsen, die dieses Enzym und somit auch das Plasmid enthalten. Die Selektion der Bakterien findet auf einem festen Nährmedium statt, sodass sich einzelne Kolonien bilden. Die Bakterien einer Kolonie stellen einen **Klon** dar und enthalten das gleiche Plasmid, da sie alle von einer Zelle abstammen. Um dieses Plasmid zu gewinnen, legt man eine Kultur an, die man mit Bakterien aus der betreffenden Kolonie animpft. Durch Verdauung der aus dieser Kultur isolierten Plasmid-DNA mit dem bei der Klonierung verwendeten Restriktionsenzym kann dann überprüft werden, ob der Vektor das angebotene DNA-Fragment tatsächlich aufgenommen hat. Als Ergebnis stehen nun Zellen zur Verfügung, die das gewünschte Gen auf einem Vektor enthalten.

Aus biotechnologischer Sicht von sehr großer Bedeutung sind die sogenannten **Expressionsvektoren**, die die Bildung eines von dem klonierten Gen codierten Proteins, beispielsweise eines Enzyms, in dem Wirtsorganismus gestatten. Mithilfe solcher Vektoren ist es möglich, nahezu beliebige Proteine in großen Mengen herzustellen und z. B. als Biokatalysatoren für technische Synthesen zu verwenden. Expressionsvektoren besitzen zusätzliche Signale (Promotoren, Translationsstartstellen), die die Transkription und Translation des klonierten DNA-Abschnitts und damit die Expression des betreffenden Proteins ermöglichen. Als Wirtsorganismen für Expressionsvektoren kommen nicht nur Bakterien (prokaryotische Expressionsvektoren), sondern auch eukaryotische Zellen, wie z. B. Hefe- oder Gewebekulturzellen, infrage (eukaryotische Expressionsvektoren).

Expressionsvektoren sind oftmals so aufgebaut, dass sie die Synthese des gewünschten Proteins als „Fusionsprotein“ erlauben, d. h. das betreffende Protein trägt am Amino- oder Carboxylende eine zusätzliche Aminosäuresequenz. In der Regel verwendet man hier Aminosäuresequenzen, die eine Affinität zu einem bestimmten Liganden (z. B. einem Antikörper oder durch einen Polyhistidin-Schwanz [ein sogenannter His-Tag] zu einer Metallchelate-Matrix) aufweisen. Dies ermöglicht die schnelle und effiziente Reinigung des exprimierten Proteins durch eine entsprechende Affinitätschromatographie. Außerdem kann eine

Sequenz angefügt werden, die die Proteine als „extrazelluläre Proteine“ kennzeichnet und für ein Sezernieren aus der Zelle sorgt. Diese zusätzlichen Sequenzen sind oftmals so konzipiert, dass sie eine Erkennungsstelle für eine spezifische Protease aufweisen und bei Bedarf nach der Affinitätsreinigung des Proteins durch die Protease abgespalten werden können.

2.4.3 Polymerasekettenreaktion

Die Herstellung ausreichender Mengen eines bestimmten DNA-Fragments für die oben beschriebene Klonierung in einen Vektor ermöglicht effektiv die **Polymerasekettenreaktion** (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). Mit dieser Methode kann ein spezifischer DNA-Abschnitt aus einem DNA-Gemisch selektiv und effektiv im Reagenzglas vermehrt (amplifiziert) werden. Das Grundprinzip der Polymerasekettenreaktion ist in Abbildung 2.31 dargestellt. Ausgehend von wenigen DNA-Molekülen werden diese durch Erhitzen in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend kann jeder Einzelstrang

dann mit den zugesetzten komplementären Oligonucleotiden (Primern) assoziieren. Durch spezielle Verfahren ist es möglich, Oligonucleotide mit beliebiger Basensequenz synthetisch herzustellen – man wählt die Sequenz der zugesetzten Oligonucleotide so, dass sie den Bereich, den man vermehren möchte, flankieren. Anschließend werden die Oligonucleotide durch DNA-Polymerase zum Doppelstrang vervollständigt, d. h. die Oligonucleotide fungieren als **Primer** für die Polymerase (Abschnitt 2.4.1.3). Dem Ansatz müssen selbstverständlich alle für die Reaktion notwendigen Komponenten, wie beispielsweise die aktivierten DNA-Monomere (Desoxyribonucleotidtriphosphate), Mg^{2+} und Pufferlösung zugegeben werden. Die drei Schritte – Denaturierung der Doppelstränge, das Anlagern der Primer und die Synthese der komplementären Stränge – werden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt und bilden einen Reaktionszyklus. Pro Zyklus (Dauer ca. fünf bis zehn Minuten) wird die Zahl der Doppelstrang-DNA dabei jeweils verdoppelt, d. h. durch eine Abfolge mehrerer Zyklen (in der Regel beträgt die Zykluszahl $n = 30-40$) wird die gewünschte DNA exponentiell vervielfältigt (2^n).

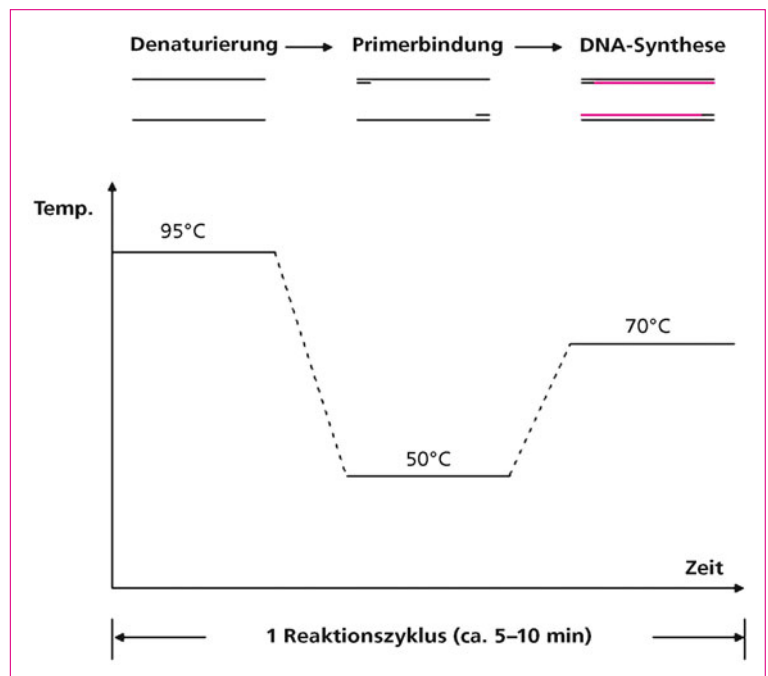


Abb. 2.31 Ein Reaktionszyklus bei der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technologie hat heute eine sehr weite Verbreitung erfahren. Ermöglicht wurde dies unter anderem durch die Verfügbarkeit von speziellen, hitzestabilen DNA-Polymerasen, die trotz der zum Teil hohen Reaktionstemperaturen ihre Aktivität über viele Reaktionszyklen behalten – eine solche hitzestabile DNA-Polymerase wurde beispielsweise aus dem in heißen Quellen vorkommenden Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert („*Taq*-Polymerase“). Durch Verwendung von PCR-Geräten, d. h. von programmierbaren Thermostaten, die die erforderlichen Erhitzungs- und Abkühlungsschritte durchführen, können die Reaktionen weitgehend automatisiert werden. Hierdurch können DNA-Sequenzen schnell und nahezu beliebig vermehrt werden. Eine gewisse Einschränkung bei der Anwendung der PCR besteht darin, dass zumindest die flankierenden Basensequenzen der zu amplifizierenden DNA bekannt sein müssen, damit spezifische Oligonucleotid-Primer synthetisiert werden können. Diese Informationen sind jedoch häufig aus Datenbanken zugänglich – durch die Fortschritte im Bereich der Genomik (s. o.) ist es heute beispielsweise möglich, nahezu jeden beliebigen Abschnitt des menschlichen Genoms in kürzester Zeit zu vervielfältigen.

Ein wesentliches Merkmal der Polymerasekettenreaktion ist ihre hohe Empfindlichkeit: Da die Vermehrung des von den Oligonucleotiden flankierten DNA-Bereichs exponentiell erfolgt, ist es möglich, die gewünschte Ziel-DNA zu amplifizieren, auch wenn nur extrem geringe Ausgangs-DNA-Mengen zur Verfügung stehen; es muss dann nur die Zahl der Reaktionszyklen erhöht werden. Hierdurch erschließt die PCR-Technologie neue Anwendungsgebiete, die mit herkömmlichen Klonierungsverfahren nicht oder nur mit großem Aufwand zugänglich sind. Als Beispiel sei der in der Kriminalistik eingesetzte „genetische Fingerabdruck“ einer Person genannt, der aus äußerst geringen DNA-Spuren erstellt werden kann. Ebenso kann aus den Überresten verstorbener Personen oder aus Museumsmaterial ausgestorbener Tiere DNA isoliert und durch PCR amplifiziert werden. Auf diese Weise konnten z. B. die genetischen Verwandtschaften von Pharaonen nachträglich festgestellt oder das Mammut in den Stammbaum der Elefanten eingeordnet werden.

2.4.5 Proteindesign (*protein engineering*)

Für die Biotechnologie sind Verfahren von großer Bedeutung, durch die die Aminosäuresequenz (und damit einhergehend die Eigenschaften) von Proteinen gezielt verändert werden können. Durch Proteindesign (engl. *protein engineering*) ist es beispielsweise möglich, die Substratspezifität eines Enzyms zu verändern und dadurch neue biokatalytische Anwendungen zu erschließen. Will man einen gezielten Aminosäureaustausch (z. B. Phenylalanin gegen Tyrosin) an einer vorherbestimmten Stelle eines Proteins erreichen, so verwendet man in der Regel synthetische Oligonucleotide, in denen die Basensequenz in der gewünschten Weise verändert ist (in dem obigen Beispiel wird die für Phenylalanin codierende Basensequenz „TTC“ durch die für Tyrosin codierende Sequenz „TAC“ ersetzt). Setzt man diese Oligonucleotide in einer PCR-Reaktion ein, so entstehen überwiegend DNA-Produkte mit der veränderten („mutierten“) Sequenz (Abb. 2.32). Durch Einklonieren in einen Expressionsvektor kann dann das Enzym mit der mutierten Aminosäuresequenz gewonnen werden. Strategien, bei denen das Protein in gezielter Weise verändert wird, setzen normalerweise voraus, dass bereits detaillierte Informationen über das Protein, beispielsweise über seine räumliche Struktur oder sein aktives Zentrum, vorliegen.

Eine interessante und erfolgreiche Alternative zu dieser gezielten Vorgehensweise stellt das Prinzip der **Zufallsmutagenese** dar (evolutives Proteindesign). Hierbei wird das Gen für das betreffende Enzym zunächst ungerichtet an unterschiedlichen Stellen mutiert. Dies kann z. B. dadurch erreicht werden, dass man den für das Enzym codierenden DNA-Bereich in einer PCR-Reaktion unter suboptimalen Bedingungen amplifiziert und anschließend in einen Expressionsvektor kloniert. Die Fehlerhäufigkeit der hitzestabilen DNA-Polymerase wird dadurch erhöht, und es werden falsche Basen eingebaut. Da diese Fehler mehr oder weniger zufällig verteilt sind, erhält man nach Klonierung der erzeugten „Gen-Bank“ in Bakterienzellen auf diese Weise eine Sammlung von Zufallsvarianten des Enzyms, von denen viele einen oder mehrere

Aminosäureaustausche haben. Die einzelnen Varianten werden nun unter den gewünschten Eigenschaftsbedingungen auf ihre enzymatischen Fähigkeiten (z. B. erhöhte Temperaturstabilität, verändertes Substratspektrum, höhere Enantioselektivität etc.) untersucht, um die Kandidaten mit den „verbesserten“ technologischen Eigenschaften zu finden. In der Regel haben die meisten Mutationen negative Auswirkungen auf die Aktivität eines Enzyms, es ist daher notwendig, eine entsprechend große Zahl (meist Tausende) von Varianten zu testen. Mit entsprechend konzipierten automatisierten Hochdurchsatzverfahren ist dies jedoch ohne Weiteres möglich. Diese Hochdurchsatzverfahren werden im Englischen als **high throughput screening (HTS)** bezeichnet. Durch mehrere aufeinanderfolgende Zyklen von Zufallsmutagenese und Aktivitäts-Screening der erhaltenen Mutanten ist es möglich, die Eigenschaften eines Enzyms sukzessive in der gewünschten Richtung zu optimieren.

Eine verwandte Strategie ist das als **exon shuffling** bekannte Verfahren. Dieses Verfahren ist ebenfalls den natürlichen Evolutionsmechanismen nachempfunden. Bei den meisten Genen

der Eukaryoten liegen die Protein-codierenden DNA-Bereiche nicht in einem zusammenhängenden Stück vor, sondern sie sind in einzelne Teilbereiche aufgeteilt (Exons), die erst auf RNA-Ebene durch Entfernen (*splicing*) der Zwischenbereiche (Introns) zu einer funktionellen Einheit zusammengefügt werden. Die einzelnen Exons codieren oftmals für funktionelle Teilbereiche (Domänen) des betreffenden Proteins. Die Zahl der Exons kann je nach Gen sehr unterschiedlich sein und bis zu mehrere Dutzend betragen. Man nimmt an, dass die Organisation der Gene in getrennten Stücken einen Vorteil in der Evolution darstellt. Durch Rekombinationsprozesse ist es relativ leicht möglich, Exons verschiedener Gene neu miteinander zu kombinieren und dadurch neue Gene mit neuen Proteinfunktionen zu erzeugen. Bei der Methode des *exon shuffling* versucht man diesen evolutionären Prozess im Reagenzglas nachzuvollziehen – man spricht daher hierbei auch von *protein evolution*. In Abbildung 2.33 ist dies schematisch dargestellt. Ausgehend von mehreren Proteinen mit unterschiedlichen funktionellen Domänen werden durch PCR mittels geeigneter Oligonucleo-

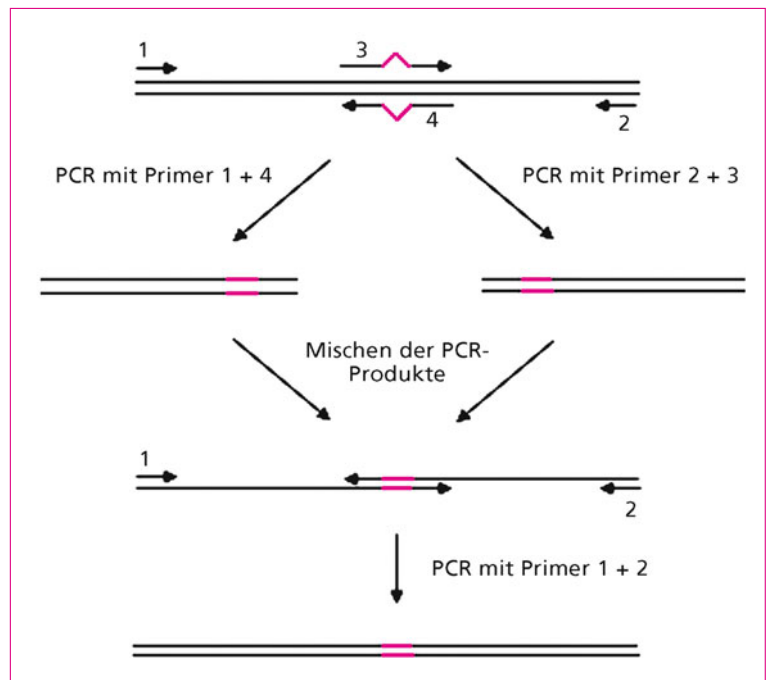


Abb. 2.32 Oligonucleotid-gesteuerte Mutagenese mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Primer 3 und 4 sind so konzipiert, dass sie die gewünschte Nucleotidsequenz (roter Bereich) enthalten

tid-Primer die den einzelnen Proteindomänen entsprechenden DNA-Bereiche amplifiziert. Die hierbei benutzten Oligonucleotide sind so konzipiert, dass die jeweiligen Enden der resultierenden Domänen komplementär sind – mischt man nun die verschiedenen Domänen zusammen und führt weitere PCR-Reaktionen durch, so ergeben sich zufällige Neukombinationen der eingesetzten Domänen. Kloniert man das resultierende PCR-Gemisch in einen Expressionsvektor, erhält man letztlich eine Sammlung neuartiger Proteine, die wiederum durch Screeningverfahren auf das Vorhandensein gewünschter Eigenschaften untersucht werden können. Das hier geschilderte

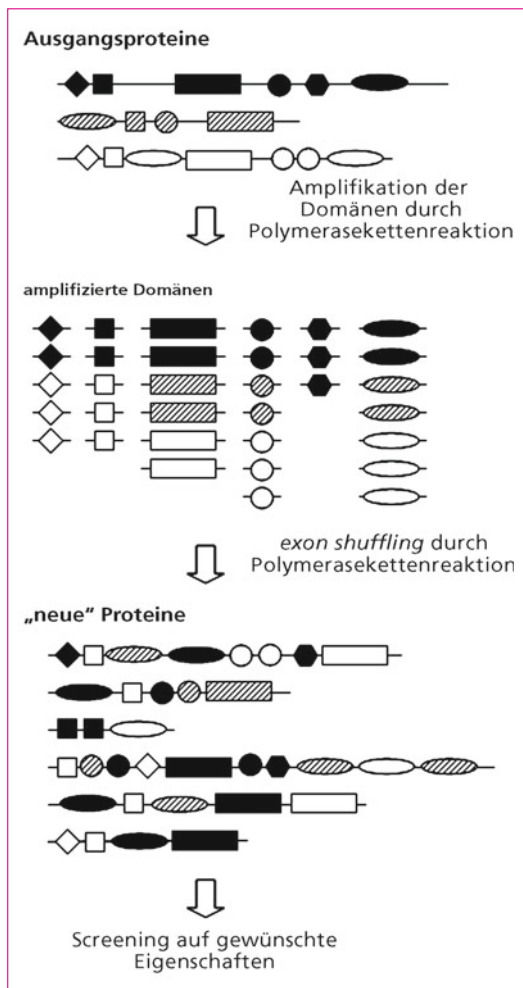


Abb. 2.33 Exon shuffling (weitere Erklärungen s. Text)

Grundprinzip kann in vielfacher Weise angewandt werden. Beispielsweise können die Domänen einander entsprechender Proteine verschiedener Organismen durch *shuffling* neu gemischt werden. Alternativ können Domänen verwandter Proteine eines Organismus oder vollkommen unterschiedlicher Proteine neu kombiniert werden. Durch den Einsatz der PCR-Technologie bei den einzelnen Schritten erfolgt gleichzeitig eine Zufallsmutagenese, sodass zusätzlich auch die Aminosäuresequenz der einzelnen Domänen variiert wird.

Anhand verschiedener Beispiele wurde erläutert, dass durch *directed protein evolution* beispielsweise die Stabilität, die Substrat- oder die Enantioselektivität von Enzymen verändert werden kann. Für Enzyme, die in biotechnologischen Prozessen eingesetzt werden, sind solche Verbesserungen der Eigenschaften von extrem großem Interesse, da hierdurch bestehende Herstellungsverfahren optimiert bzw. neue Anwendungsgebiete erschlossen werden können.

Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2005): Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Verlag Wiley-VCH, Weinheim
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2007): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Brown, T. A. (2007): Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Brown, T. A. (2007): Genome und Gene. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2009): Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Hartmeier, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer Verlag, Heidelberg
- Kirby, A. J. (1996): Enzyme – Mechanismus, Modellreaktion und Mimetika. Angew. Chem. 108: 770–790
- Müller-Esterl, W. (2009): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Nelson, D., Cox, M. (2008): Lehninger Biochemie. Springer Verlag, Heidelberg
- Knippers, R. (2006): Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D. A. (Hrsg.) (1987): Handbuch der Biotechnologie. Oldenbourg Verlag, München
- Renneberg, R. (2009): Biotechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Wartenberg, A. (1989): Einführung in die Biotechnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart



<http://www.springer.com/978-3-8274-2476-1>

Bioprozesstechnik

Chmiel, H. (Hrsg.)

2011, XIV, 546 S. 405 Abb., Hardcover

ISBN: 978-3-8274-2476-1