

1 Einführung in die Zellbiologie*

Alle Lebewesen auf unserer Erde haben ungeachtet ihrer immensen Vielfalt von Zigmillionen verschiedener Arten grundlegende strukturelle Gemeinsamkeiten. So ist die kleinste selbst organisierte Einheit, aus der ein komplexes Lebewesen wie der Mensch, eine Kuh oder ein Baum aufgebaut ist oder aus dem die einfachsten Lebewesen wie die Mikroorganismen bestehen, die Zelle. In jeder Zelle laufen chemische Reaktionen ab, die Materie aus der Umgebung aufnehmen und die diese „Rohstoffe“ zur Selbsterhaltung und Vermehrung nutzen.

Aus naturwissenschaftlicher Sicht ist die einzelne Zelle eine (bio-)chemische Fabrik, die den Prinzipien der Thermodynamik sowie allen anderen naturwissenschaftlichen Grundgesetzen unterliegt. Wenn wir uns daher die enorme stoffliche und energetische Leistungsfähigkeit von Zellen zur Herstellung von Produkten oder dem Abbau von Abfallstoffen zunutze machen wollen – und dies ist das Ziel der Bioprozesstechnik – dann müssen wir die grundlegenden molekularen Abläufe in einer Zelle verstehen. Dominiert werden diese Abläufe durch das Zusammenspiel von in jeder Zelle vorkommenden Biopolymeren: der DNA (engl. *desoxyribonucleic acid*), der RNA (engl. *ribonucleic acid*) und den Proteinen. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem molekularen Aufbau, der Organisation, dem Informationsfluss in der Zelle und der Zellvermehrung.

1.1 Die Zelle als kleinste lebende Einheit

Naturwissenschaftlich betrachtet ist „Leben“ durch definierte Mindesteigenschaften charakterisiert. Diese sind ein eigener Stoffwechsel (Metabolismus), die Fähigkeiten zur Vermehrung

(Replikation) und die Möglichkeit der Anpassung an die Umwelt durch Veränderung der individuellen Erbanlagen (Mutation). Dabei spielt sich alles auf der Ebene der Moleküle ab. „Leben“ ist folglich an eine Abgrenzung (Kompartimentierung) von der Umgebung gebunden, da nur dadurch die für das Leben notwendige molekulare Ordnung aufrechterhalten werden kann.

Die kleinste Einheit, die in der Lage ist, die molekulare Ordnung für Metabolismus, Replikation und Mutation zu gewährleisten, ist die Zelle. Sie stellt energetisch ein „offenes System“ dar, das in einem ständigen Stoff- und Energieaustausch mit seiner Umgebung steht (Abb. 1.1). Die Aufgabe der selektiven Kompartimentierung von Molekülen wird bei jeder Zelle von einer flexiblen Membran – der Plasmamembran – mit einer 6–10 nm dicken Lipiddoppelschicht-Struktur übernommen, die zu einem großen Teil aus amphipatischen Phospholipiden besteht. Die Fähigkeit einer Zelle, den ständigen Stoff- und Energieaustausch mit der Umgebung durch die Regulation der molekularen Vorgänge in einem inneren Fließgleichgewicht zu halten, wird als **Homöostase** bezeichnet.

Die meisten Lebewesen sind Einzeller und werden aufgrund ihrer Abmessungen in der Größenordnung von ca. 1–10 µm als Mikroorganismen bezeichnet. Höhere Lebewesen des Tier- und Pflanzenreichs sind hingegen grundsätzlich vielzellig und bestehen aus verschiedenen Zellgruppen, die auf bestimmte Funktionen spezialisiert sind und oft unterschiedlich aussehen. Die Erbsubstanz der unterschiedlichen Zellgruppen eines Organismus ist jedoch identisch. Die **Zelldifferenzierung** der höheren Lebewesen vollzieht sich während ihres Wachstums über ein komplexes molekulares Kommunikationssystem zwischen den Zellen und beruht letztlich auf dem

* Autoren: Lutz Fischer, Horst Chmiel

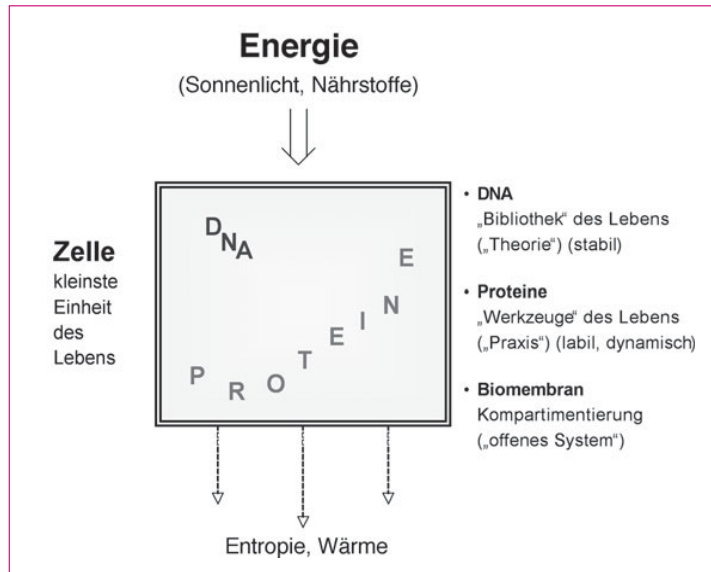


Abb. 1.1 Stark vereinfachte, schematische Darstellung des „offenen Systems“ Zelle

dauerhaften An- bzw. Abschalten funktioneller Teilbereiche der Erbsubstanz, also dem gezielten Ablesen bzw. Blockieren von Genen. Die genauen molekularen Zusammenhänge, die zur Zelldifferenzierung eines Organismus führen, sind Thema der Entwicklungsbiologie. Es sei an dieser Stelle bereits erwähnt, dass nicht nur Mikroorganismen zur Stoffproduktion in einem Bioreaktor kultiviert werden können, sondern auch speziell präparierte Zellen von Pflanzen oder Tieren. Man spricht dann von Zellkulturen bzw. Zellkulturtechnik.

Trotz der enormen Unterschiede in Form, Größe und Komplexität folgen alle Zellen von Lebewesen den gleichen molekularen Grundprinzipien und bestehen aus den gleichen Grundbausteinen. Dies wollen wir im Folgenden näher betrachten.

1.1.1 Erbinformation wird in Desoxyribonucleinsäure (DNA) gespeichert

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein helikales, doppelsträngiges Biopolymer und bildet die Erbsubstanz – das Genom – eines Organismus (Abb. 1.2). Die Monomereinheit der DNA heißt

Desoxyribonucleotid und besteht aus zwei Teilen: einem Zucker (Desoxyribose) mit gebundener Phosphatgruppe und einer Base, die entweder eine **Purinbase**, Adenin (A), Guanin (G), oder eine **Pyrimidinbase**, Cytosin (C), Thymin (T), sein kann. Die Desoxyribonucleotide der DNA sind über ihre Zuckerphosphatgruppen (Phosphodiesterbindungen) kovalent zu linearen Polydesoxyribonucleotidsträngen kondensiert. Die beiden Polydesoxyribonucleotidstränge der DNA lagern sich komplementär über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen ihrer einzelnen Basen aneinander. Dabei bildet A mit T zwei und C mit G drei spezifische **Wasserstoffbrückenbindungen** aus.

Obwohl diese Bindungen einzeln betrachtet relativ schwach und labil sind, ergibt sich durch die Gesamtsumme aller Bindungen zwischen zwei komplementären DNA-Strängen eine genügend hohe Stabilität. Bei dem kleinsten heute bekannten Genom eines Lebewesens, dem parasitären Bakterium *Mycoplasma genitalium*, trägt die Anzahl der Basenpaare (engl. *base pairs*; bp) in seinem DNA-Doppelstrang beispielsweise 580 070 bp. Dementsprechend ergeben sich theoretisch je nach Gehalt an A/T bzw. C/G in der DNA zwischen mindestens 1 160 140 (bei 100 % A/T) und höchstens 1 740 210 (bei 100 % C/G) Wasserstoffbrückenbindungen.

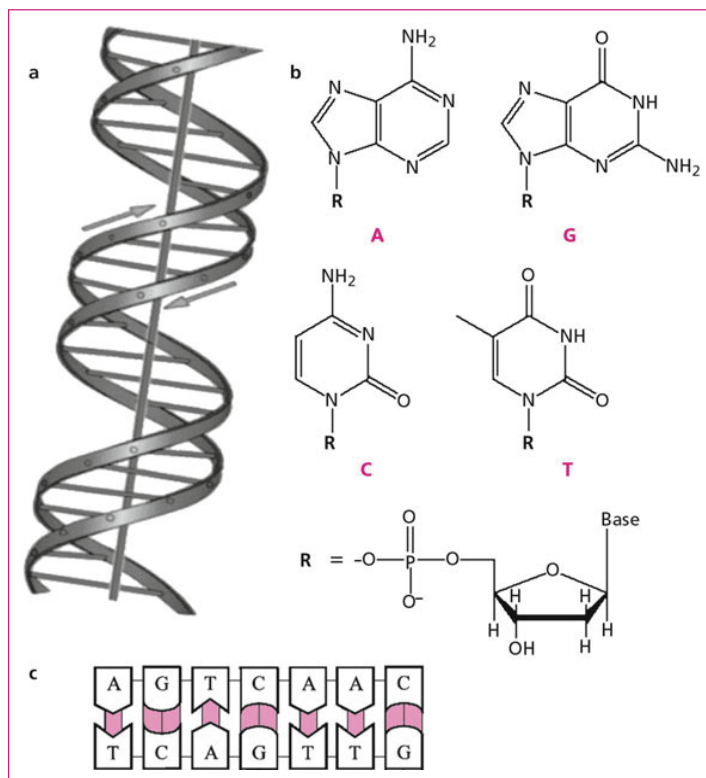


Abb. 1.2 (a) Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Doppelhelix, (b) ihre monomeren Bausteine, die Desoxyribonucleotide Adenosinphosphat [A], Guanosinphosphat [G], Cytidinphosphat [C] und Thyminphosphat [T] und (c) die Komplementarität der Basenpaare (schematisch)

Die Informationen zum Bauplan, Stoffwechsel und der Vermehrung von Zellen sind bei allen Lebewesen einheitlich aus den vier verschiedenen „chemischen Buchstaben“ der Basen A, T, C und G der DNA geschrieben. Diese vier „chemischen Buchstaben“ werden wiederum von allen Lebewesen bei der Proteinbiosynthese in einen „Drei-Buchstaben-Code“ (Triplet) verschlüsselt. Es ergeben sich $4^3 = 64$ verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für ein Triplet an Nucleotiden, das als **Codon** bezeichnet wird.

Die meisten Codons codieren bei einer späteren Proteinbiosynthese für eine bestimmte Aminosäure des zu bauenden Proteins, das chemisch ein großes Polypeptid aus meist mehr als 100 Aminosäure-Einheiten darstellt. Dabei ist zu beachten, dass es für einige Aminosäuren mehrere Codons gibt, für andere hingegen nur eins. Beispielsweise codieren für die Aminosäure Serin (Ser) die vier DNA-Codons AGT, AGA, AGG und AGC, für Tryptophan indessen nur

ein einziges Codon ACC. Ein besonderes Codon ist das Startcodon (**Initiationscodon**; ATG). Es zeigt den Beginn eines Gens, das für ein Protein codiert, an. Drei andere Codons bestimmen das Ende eines Gens (**Terminationscodons**; TAA, TAG, TGA). Auf diese Weise ist die DNA in viele funktionelle Informationseinheiten, die man als Gene bezeichnet, gegliedert.

Gene sind definierte Abschnitte auf der DNA. Sie codieren für eine einzelne Polypeptidkette, wenn die Gensequenz für die Proteinbiosynthese bestimmt ist. Einige Gene codieren hingegen für spezielle Ribonukleinsäuren (RNA) oder für die Regulation von anderen Genen. Wenn ein Gen für eine Polypeptidkette oder eine RNA codiert, nennt man es Strukturen.

Bei der Zellteilung – der Vermehrung (Replikation) von Zellen – ist der erwähnte komplementäre Aufbau der DNA von entscheidender Bedeutung. Der Doppelstrang der Polydesoxyribonucleotidketten wird von Enzymen (Prote-

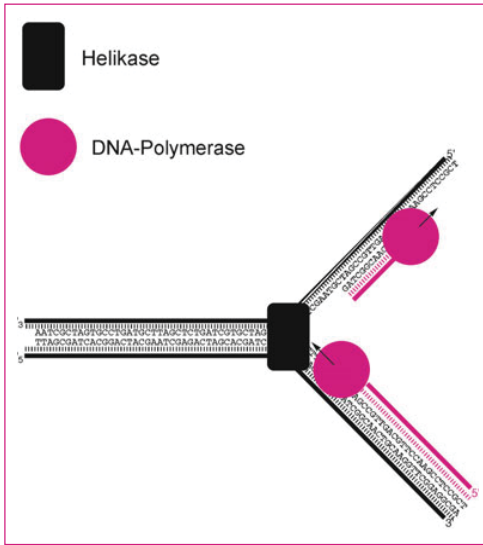


Abb. 1.3 Enzymatische Replikation von DNA (vereinfachte Version, schematisch). Weitere wichtige Enzyme sind in dem Schema nicht berücksichtigt (Details siehe Voet und Voet 2002)

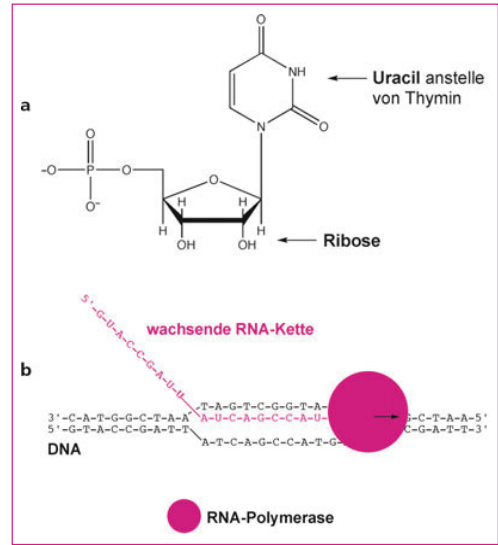


Abb. 1.4 (a) Das Ribonucleotid Uridinphosphat mit Uracil (U) als Base und Ribose als Zuckerbaustein der RNA. (b) Die Komplementarität von RNA zur DNA bei der RNA-Synthese (schematisch)

in; s. u.) aufgebrochen, und beide Einzelstränge dienen anderen Enzymen als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Polydesoxyribonucleotidstrangs, der mit dem „alten“ Strang identisch ist (Abb. 1.3). Auf diese Weise ist die DNA einer fiktiven Mutterzelle verdoppelt (repliziert) und kann auf die beiden neu entstehenden Tochterzellen verteilt werden. Die Weitergabe aller Erbinformationen an die Nachkommen ist gesichert. Die Möglichkeiten und Folgen von Kopierfehlern bei diesem Vorgang werden unter Abschnitt 1.3.3 behandelt.

1.1.2 Die makromolekulare Mindestausstattung einer Zelle

Neben der DNA mit den Erbinformationen, den Genen, benötigt eine lebende Zelle weitere Biopolymere: die **Ribonucleinsäuren** (RNA) und die Proteine. Erst durch das Zusammenspiel dieser drei Polymerklassen kann „Leben“ stattfinden. Genau wie bei der DNA kommen RNA und Proteine ubiquitär in den Zellen aller

Organismen unserer Erde vor und sind jeweils aus den gleichen Bausteinen aufgebaut. Polysaccharide und Lipide sind weitere Makromoleküle in der Zelle, die durch den Stoffwechsel entstehen; für die folgenden Betrachtungen sind sie jedoch nicht maßgeblich. Auf die Bedeutung der Lipide als Hauptbestandteil einer notwendigen Plasmamembran ist bereits hingewiesen worden.

Die RNA ist wie die DNA aus kondensierten Nucleotiden zusammengesetzt. Es gibt jedoch einige entscheidende Unterschiede (Abb. 1.4). Das Zucker-Phosphat-Gerüst der RNA enthält Ribose anstelle von Desoxyribose, statt der Pyrimidinbase Thymin (T) wie in der DNA ist immer die Pyrimidinbase Uracil (U) eingebaut, und die RNA liegt nicht in komplementären Doppelsträngen, sondern als individueller Einzelstrang vor, der viel kürzer als ein kompletter DNA-Einzelstrang ist. Im Gegensatz zur DNA unterliegt die RNA einem ständigen Auf- und Abbau in der Zelle. Die wichtigsten Aufgaben der RNA werden unter Abschnitt 1.1.3 erläutert.

Die **Proteine** sind die eigentlichen „Macher“ einer Zelle. Sie übernehmen die für das Leben

einer Zelle so bedeutenden Funktionen wie beispielsweise die Katalyse von chemischen Reaktionen (Enzyme), den selektiven Transport von Molekülen durch die Membranen (Transportproteine), die Fortbewegung (kontraktile Proteine), die Signalweitergabe zur Zellkommunikation (Rezeptorproteine) oder die Formgebung (Strukturproteine). Proteine sind allgemein aus 20 unterschiedlichen, monomeren Bausteinen, den Aminosäuren, aufgebaut (Kapitel 2). Die Aminosäuren sind untereinander über eine Amidbindung (Peptidbindung) kovalent verknüpft und geben einem Protein aufgrund ihrer chemischen sowie sterischen Eigenschaften eine individuelle dreidimensionale Struktur und eine spezifische biologische Funktion.

Eine herausragende Stellung innerhalb der Proteine nehmen die biokatalytisch aktiven **Enzyme** ein. Sie ermöglichen den gesamten Stoffwechsel einer Zelle (**Metabolismus**), der aus abbauenden, oftmals Energie freisetzenden Stoffwechselwegen und -reaktionen (**Katabolismus**) und aus aufbauenden, syntheseorientierten Stoffwechselwegen und -reaktionen (**Anabolismus**) besteht. So werden ebenso die Replikation von DNA bei der Zellteilung sowie die ständig notwendigen RNA- und Proteinsynthesen einer Zelle – bis auf eine Ausnahme (Ribosom, s. u.) – durch selektive Kondensationsreaktionen von speziellen Enzymen realisiert.

1.1.3 Der Informationsfluss in der Zelle (Proteinbiosynthese)

Der vielseitige Einsatz der Bioprozesstechnik zur Herstellung von Produkten wie – um nur einige exemplarisch aufzuführen – technische Enzyme für die Waschmittel-, Pharma- oder Lebensmittelindustrie, Pharmaproteine (Faktor VIII u. a.), Insulin, Interferone, Antikörper oder Stoffwechselprodukte wie Ethanol, Citronensäure, Xanthan, Antibiotika u. v. m. ist immer, direkt oder indirekt, abhängig von einem effektiven und optimalen Ablauf der Proteinbiosynthese in den kultivierten Zellen. Die dabei zellulär erzeugten Enzyme katalysieren aus einfachen Nährstoffen, wie beispielsweise Glucose und Ammoniumsalz, komplexe Wertstoffe unseres Alltags. Es ist daher

eminently wichtig, die für alle Zellen gültigen, grundlegenden Zusammenhänge der Proteinbiosynthese zu verstehen.

Die DNA stellt sinnbildlich eine Art stabile, organismusspezifische molekulare „Gebrauchsanweisung“ für die Form, Struktur und Lebensaktivitäten einer Zelle dar. Ihre funktionellen Informationseinheiten – die Gene – müssen aber zuerst in RNA abgeschrieben (transkribiert) bzw. in Proteine übersetzt (translatiert) werden, bevor sie der Zelle aktiv nutzen. Diese Vorgänge sind stark energieabhängig, und deshalb werden durch molekulare Regulationsmechanismen nur Gene transkribiert, die für die aktuelle Umgebungssituation für die Zelle vorteilhaft sind.

Stark vereinfacht und zusammenfassend ausgedrückt sind die genetischen Informationen auf der DNA in Gene unterteilt, die in einem ersten Schritt durch enzymatische Aktivitäten in komplementäre RNA-Fragmente transkribiert werden (Abb. 1.5). Für die Informationsweitergabe zur Synthese eines Proteins nach Bauplan eines Strukturgens ist die **mRNA** zuständig. Sie wird in einem komplexen Translationsvorgang, an dem **tRNA**, **rRNA** und Proteine beteiligt sind, als Matrize zur Proteinbiosynthese verwendet. Für jedes Protein existiert somit eine eigene mRNA, die mehrmals als Matrize benutzt werden kann, bis sie enzymatisch wieder abgebaut wird.

Die Transkription eines Gens in RNA erfolgt durch das gleiche Prinzip der Basenkomplementarität wie bei der Replikation (s. o.). Nur ist hier ein anderes Enzym (RNA-Polymerase) beteiligt, welches anstelle der Desoxyribonucleotide die Ribonucleotide komplementär anordnet und über Phosphodiesterbindungen kondensiert. Da bei der RNA die Base Thymin (T) durch die Base Uracil (U) ersetzt ist, entstünde folglich aus einem Genfragment mit der Sequenz ATGC-CATGGTCAACA die komplementäre RNA mit der Sequenz UACGGUACCAGUUGU.

Die RNA nimmt je nach Sequenz – also der genauen Reihenfolge ihrer Ribonucleotidmonomere – verschiedene Aufgaben in der Zelle wahr (Abb. 1.5). Sie ist oftmals für die Übertragung der genetischen Informationen von der DNA an die Orte der Biosynthese, dies sind die Ribosomen (s. u.), verantwortlich. Diese RNA wird aufgrund ihrer „Kuriertätigkeit“ als Boten-RNA bezeichnet (engl. *messenger RNA*; mRNA).

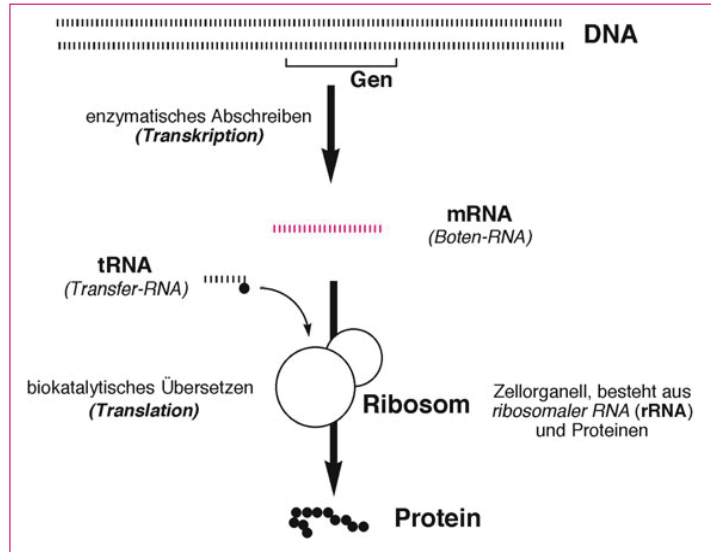


Abb. 1.5 Schematischer Informationsfluss in der Zelle (Details siehe Text)

Des Weiteren ist RNA entscheidend bei der Translation des genetischen Codes in die dazugehörige Proteinsequenz am Ribosom beteiligt. Die hierfür zuständige RNA heißt allgemein Transfer-RNA (tRNA), besitzt an exponierter Stelle im Molekül mit einer typischen Kleeblattstruktur je eine spezifische Codon-Erkennungsstelle (Anti-Codon) und ist mit der dazugehörigen Aminosäure beladen (Abb. 1.6). So wird beispielsweise die für die Aminosäure Threonin verantwortliche tRNA als $tRNA^{Thr}$ bezeichnet und ist mit dem Anti-Codon UGG, das zu dem Codon ACC der mRNA komplementär ist, ausgestattet.

Eine weitere Aufgabe übernimmt RNA in der Zelle durch die Beteiligung an der Bildung von sehr großen dimeren RNA-Protein-Komplexen, die die Orte der Proteinbiosynthese sind und als Ribosomen bezeichnet werden. Dementsprechend wird diejenige RNA, die aufgrund ihrer Sequenz für ein Ribosom bestimmt ist, ribosomale RNA genannt (engl. *ribosomal RNA*; rRNA).

Im Jahr 1982 entdeckte man auch katalytisch aktive RNA-Moleküle, sogenannte **Ribozyme**, die einfache, aber wichtige Spaltungs- und Ligationsreaktionen an RNA- und DNA-Molekülen durchführen. Eine rRNA katalysiert – wahrscheinlich als rudimentärer Teil einer „RNA-Welt“ der frü-

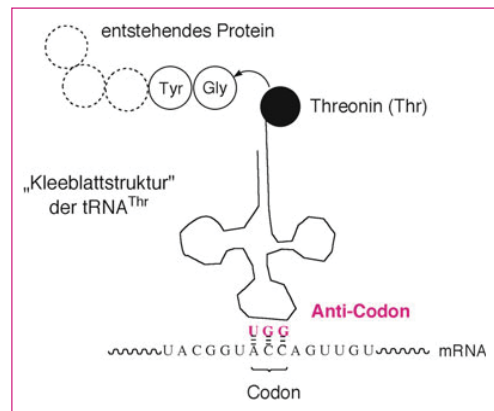


Abb. 1.6 Schematische Struktur der tRNA am Beispiel der $tRNA^{Thr}$ und komplementäre Bindung an das Codon der mRNA (Vorgang am Ribosom)

hen Erdgeschichte – sogar die Peptidbindungen bei der Proteinbiosynthese am Ribosom. Protein-katalysatoren, die Enzyme, besitzen somit kein Monopol bei der Biokatalyse, sind aber aufgrund ihres wesentlich komplexeren (bio-)chemischen Aufbaus aus 20 unterschiedlichen Aminosäuren viel besser für die vielseitigen Aufgaben im Stoffwechsel geeignet.

1.2 Verschiedene Zelltypen, Viren und Phagen

In dem vorangegangenen Abschnitt haben wir uns mit den für alle lebenden Zellen geltenden Grundprinzipien beschäftigt. Jetzt soll auf die wichtigsten Besonderheiten der heute existierenden Zelltypen eingegangen werden, die prokaryotische und die eukaryotische Zelle. Neben diesen selbst organisierten, lebensfähigen Zellen, die zur Homöostase befähigt sind, gibt es noch andere DNA oder RNA enthaltende Vesikel in der Natur: Viren und Phagen. Sie können sich nicht selbstständig vermehren, besitzen auch keinen Stoffwechsel und sind durch eine Proteinhülle und manchmal eine zusätzliche Membran geschützt. Sie werden folglich wissenschaftlich nicht als Lebewesen betrachtet.

Dennoch sind Viren und Phagen manchmal hilfreiche Werkzeuge in der Gentechnik. Durch ihre Fähigkeit, DNA oder RNA in Organismen einzuschleusen, den Organismus zu „infizieren“, zwingen sie den „Wirtsorganismus“ seine Stoffwechselleistung nach dem Fahrplan des Viren- bzw. Phagen-Erbguts umzustellen. Dieses Viren-/Phagen-Prinzip lässt sich gentechnisch gezielt zum Einschleusen von gewünschten

Genen in einen Wirtsorganismus nutzen. Auf der anderen Seite muss man die Viren-/Phagen-Thematik ebenfalls kennen, wenn man sich mit der Kultivierung von Zellen beschäftigt, da eine Infektion von Zellen in einem Bioprozess unter allen Umständen vermieden werden muss.

1.2.1 Prokaryoten

Die prokaryotische Zelle (Prokaryot) stellt die ursprünglichste Form der heutzutage lebenden Organismen dar. Zu den Prokaryoten gehören alle Bakterien, die in zwei große Gruppen, die **Bacteria** (frühere Bezeichnung Eubacteria) und die **Archaea** (oder Archaeobacteria), unterteilt werden (Abb. 1.7). Sie leben meist als unabhängige Einzelzellen.

Prokaryoten sind im Vergleich zu Eukaryoten wesentlich einfacher aufgebaut. Die große ringförmige DNA der Prokaryoten – das Bakteriengenom – liegt frei im Cytoplasma der Zelle, die wenig kompartimentiert ist und keine distinkten membranumschlossenen Zellorganellen besitzt (Abb. 1.8). Neben dem Bakteriengenom besitzen viele Bakterien ein oder mehrere **Plasmide**, das sind sehr kleine ringförmige DNA-Moleküle, die

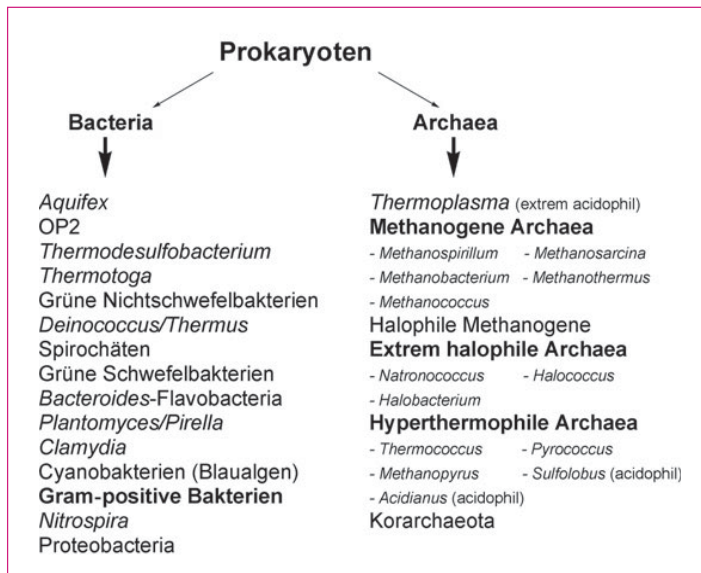


Abb. 1.7 Einteilung der Prokaryoten nach phylogenetischen Kriterien (Sequenzvergleich der 16S-rRNA; modifiziert nach Madigan und Martinko 2006)

sich unabhängig vom Genom vermehren und zwischen den Bakterien übertragen werden können (bei der Konjugation). Sie tragen nur wenige Gene, beispielsweise für Fertilitätsfaktoren (F-Faktoren) oder Resistenzfaktoren (R-Faktoren) und sind für die prinzipielle Lebensfähigkeit des Prokaryoten entbehrlich. In der Gentechnik spielen Plasmide als Transportvehikel für rekombinante DNA eine wichtige Rolle.

Die chemische Energiegewinnung in Form der Biosynthese von Adenosintriphosphat (ATP), das eine in allen Lebewesen vorkommende universelle „Energiewährung“ darstellt, findet an der **Zellmembran** (Cytoplasmamembran) statt. Die Zellmembran besteht aus einer bimolekularen Schicht von amphipatischen Phospholipiden, deren hydrophobe Molekülteile nach innen und hydrophile (polare) Molekülteile nach außen gerichtet sind. In die Lipiddoppelschicht sind Proteine integriert, die für den selektiven Transport von Substanzen in und aus der Zelle verantwortlich sind (Transportproteine). Eingeschlossen von der Zellmembran ist das **Cytoplasma**. Es enthält den gesamten Inhalt einer Zelle, außer den nur bei Eukaryoten vorkommenden Zellkern. Zum Cytoplasma gehören das wässrige **Cytosol** mit den gelösten Proteinen, RNA, verschiedene Salze und Metabolite (Stoffwechselprodukte), die Ribosomen, Plasmide und die Speicherstoffe einer Zelle.

Die Ribosomen der Prokaryoten sind vom 70S-Typ und aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten aufgebaut, die zusammen aus 55 Proteinen und rRNA (5S-, 16S- und 23S-rRNA) bestehen. Das S ist eine **Svedberg-Einheit** und gibt an, mit welcher Sedimentationsgeschwindigkeit ein Teilchen in einer Ultrazentrifuge wandert. Die mRNA wird bei der Biosynthese eines Proteins an der Schnittstelle beider Untereinheiten des Ribosoms gebunden. Jede Zelle von *Escherichia coli*, ein Gram-negatives Bakterium, enthält beispielsweise ca. 15 000 oder mehr Ribosomen.

Die Bakterienzelle ist meist von einer stabilen Zellwand aus Peptidoglykan (**Murein**) umgeben, das bei den Archaeen und Eukaryoten nicht vorkommt. Man unterscheidet je nach Aufbau der Zellwand, die durch die sogenannte Gram-Färbung – eine seit 1884 von dem dänischen Bakteriologen H. C. J. Gram eingeführte Färbemethode für Bakterien – einfach untersucht werden kann, zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-positive Bakterien besitzen eine dickere Zellwand mit mehrschichtigem Mureinnetz. Die Gram-negative Zellwand besteht hingegen aus einem einschichtigen Mureinnetz, das jedoch nochmals von einer zweiten äußeren Membran aus Lipopolysacchariden, Lipoproteinen und Phospholipiden umgeben ist. Diese zweite Membran ist von großen Poren durch-

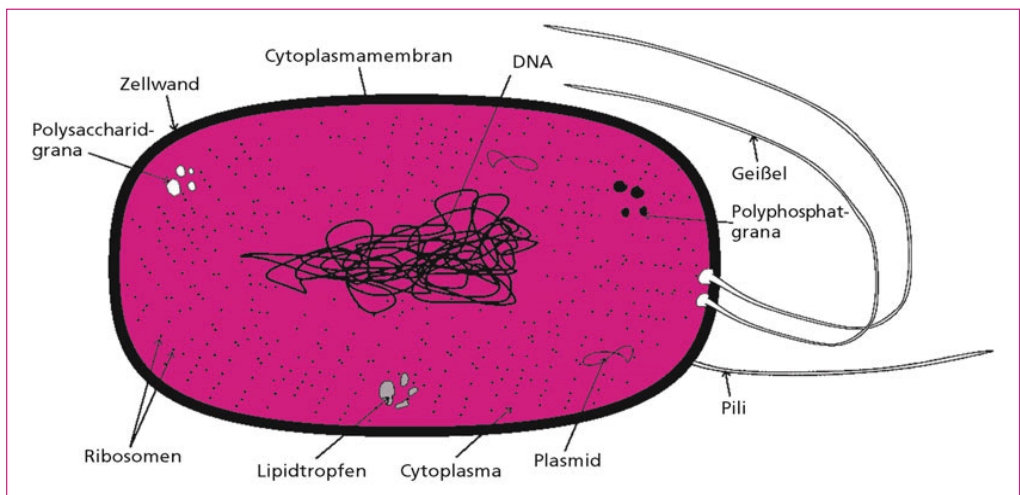


Abb. 1.8 Schematisches Längsschnittbild einer prokaryotischen Zelle (Bakterienzelle)

setzt, die Moleküle von ca. $M_r < 6000$ frei passieren lassen. Die Zellwand ist das mechanische Schutzskelett der Bakterien und verhindert das Platzen bei osmotischem Stress.

Viele Bakterien bilden unter bestimmten Stressbedingungen hitzetolerante **Endosporen** (Überdauerungsformen) aus. Bei einer Endospore ist die Zellwand zusätzlich von einer „Rinde“ aus vernetzten Glykopeptid-Polymeren und einer dicken, stark proteinhaltigen Sporenhülle umgeben. Das „aufkonzentrierte“ Cytoplasma nimmt nur noch ein geringes Gesamtvolumen ein, und es werden keine nennenswerten Stoffwechselaktivitäten festgestellt. Dieser mögliche Zustand einer Bakterienzelle sollte insbesondere bei der Sterilisation von Fermentern, Rohrleitungen, Ventilen, Messsonden etc. besonders beachtet werden.

Eine Sonderstellung innerhalb der Prokaryoten nehmen die **Cyanobakterien**, auch Blaualgen genannt, ein. Sie sind zur Photosynthese fähig und somit in der Lage, CO_2 mithilfe von Lichtenergie und einem Elektronendonator zu reduzieren und organische Verbindungen für das Wachstum aufzubauen. Cyanobakterien verwenden – wie grüne Pflanzen und Algen – Wasser als Elektronendonator, im Gegensatz zu photosynthetisierenden Bakterien, die stärker reduzierende Verbindungen wie H_2S benötigen. Unter den Cyanobakterien findet man die genügsamsten Organismen, die zurzeit leben. Da sie CO_2 und auch N_2 „fixieren“ können, sind sie praktisch in der Lage, von Wasser, Licht und Luft zu leben.

Für das Anwendungspotenzial der Gentechnik (engl. *genetic engineering*) ist die „direkte“ und im Vergleich zu den Eukaryoten (Abschnitt 1.2.2) einfachere Art und Weise der Genexpression bei Prokaryoten von großem Vorteil. Genexpression bedeutet die Erzeugung eines zu beobachtenden Phänotyps durch ein Gen, also die Realisierung der genetischen Information durch Transkription, Translation und ggf. nachgeschaltete Modifikationen der Proteine. Am ausführlichsten ist die Genexpression bei *E. coli* untersucht, welches neben anderen Mikroorganismen im menschlichen Darm vorkommt und der erste „klassische“ Modellorganismus der Molekularbiologen war.

Bei der Genexpression der Prokaryoten können die RNA- und Proteinbiosynthese gleichzeitig ablaufen, da sich die DNA frei als Doppelstrang im Cytosol befindet und sich die Ribo-

somen an die an der DNA entstehende mRNA anlagern (Abb. 1.9). Außerdem befinden sich oftmals die Gene eines gesamten Stoffwechselweges unmittelbar hintereinander auf der DNA, und die Genexpression wird von einer gemeinsamen Regeleinheit kontrolliert. Die in solch einem Fall transkribierte mRNA codiert gleich für mehrere Proteine – sie ist **polycistronisch** –, und am Ribosom werden folglich mehrere Proteine gleichzeitig translatiert. Diese „direkte“, schnelle Genexpression verleiht den Prokaryoten eine enorme Produktivität (Stoffumsatz pro Zeit) und eine schnelle Adaptation an sich verändernde Umgebungsbedingungen. Beides sind wichtige Kriterien für die Bioprozesstechnik.

Die Fähigkeit zur Nutzung jeder ökologischen Nische und praktisch jedes organischen Moleküls als Nahrung sowie die verschiedenen Formen der Energiegewinnung haben im Laufe der Evolution eine ungeheure Vielfalt an Prokaryoten hervorgebracht. Eine kleine exemplarische Auswahl von ihnen ist in Tabelle 1.1 dargestellt. Prokaryoten besitzen im Vergleich zu den Eukaryoten eine weit größere biochemische Diversität und Anpassungsfähigkeit.

Die Gruppe der Archaeen wurde zuerst als Bewohner extremer Standorte, wie heiße Quellen, Salzseen, Tiefseegeysire oder Kläranlagen entdeckt. Archaeen kommen aber auch in Böden, Seen und dem Wiederkäuermagen vor. Sie werden von den Bacteria aufgrund eines etwas anderen Ribosomen- sowie Zellwandaufbaus, besonderer Stoffwechselwege (u. a. Methanbildung) und besonderer Coenzyme unterschieden.

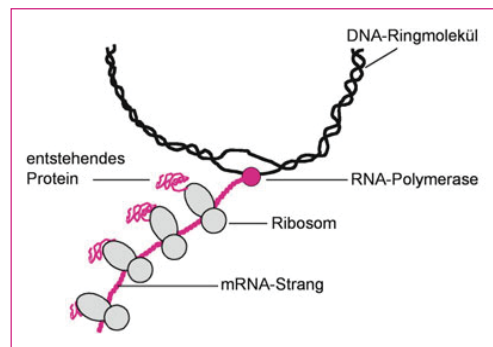


Abb. 1.9 Genexpression bei einem Prokaryoten (schematischer Ausschnitt des Cytosols einer Zelle)

Tabelle 1.1 Kleine Auswahl an technisch interessanten Prokaryoten und deren Produkte

Bakterienname	Charakteristische Eigenschaften	Technische Nutzung/Produkte
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Gram-positiv oder Gram-negativ, Stäbchen, Kokken, obligat anaerob	zweite Stufe der anaeroben Abwasserreinigung: Methan
<i>Acetobacter aceti</i>	Gram-negativ, Stäbchen, begeißelt, säuretolerant, Schleimbildner, aerob	Essigsäure
<i>Lactobacillus spec.</i>	Gram-positiv, Stäbchen, homo- u. heterofermentativ	Milchsäure
<i>Propionibacterium</i>	Gram-positiv, Stäbchen, anaerob	Propionsäure
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Gram-positiv, Stäbchen, sporenbildend, anaerob	Butanol, Aceton, Buttersäure
<i>Zymomonas mobilis</i>	Gram-negativ, Stäbchen, fakultativ anaerob	Ethanol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negativ, Stäbchen, polar begeißelt, aerob	Rhamnolipide
<i>Xanthomonas campestris</i>	Gram-negativ, Stäbchen, polar begeißelt, aerob	Xanthan
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gram-positiv, Stäbchen, aerob	Aminosäuren
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Gram-positiv, Stäbchen	Exoenzyme, Amylase
<i>Streptomyces tendae</i>	Mycelbildner, Lufthyphen mit exogenen Sporen, aerob, Gram-positiv	Nikkomycin
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativ, Stäbchen, fakultativ anaerob	„Arbeitstier“ des Biotechnikers (Genetik), Herstellung gentechnisch gewonnener Produkte (z. B. Insulin)

Die Archaeobakterien sind mit hochinteressanten Enzymen ausgestattet, die unter extremen Bedingungen (pH, Ionenstärke, Temperatur) stabil und aktiv sind. Beispielsweise ist dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* der Durchbruch und die enorme Verbreitung der Polymerasekettenreaktion (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) in der Molekularbiologie zuzuschreiben, da es eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) besitzt, die heute von vielen Wissenschaftlern zur *in vitro*-Vermehrung (Amplifikation) von DNA im Labor eingesetzt wird.

1.2.2 Eukaryoten

Im Vergleich zu den prokaryotischen Zellen sind eukaryotische Zellen wesentlich komplexer in ihrem zellulären Aufbau und bei der Genexpression. Viele Eukaryoten bilden vielzellige Organis-

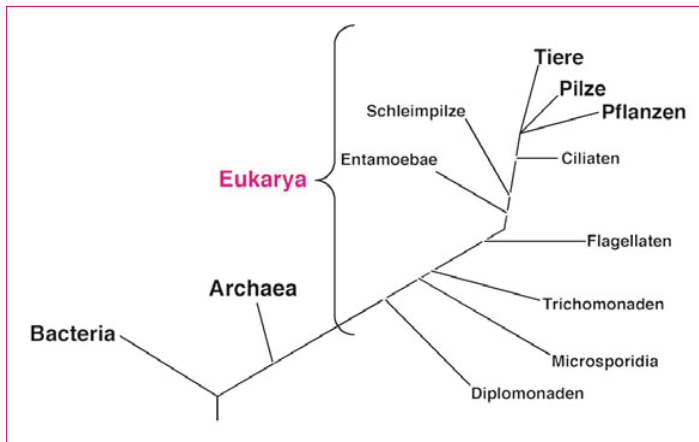
men, die einen von Prokaryoten unerreichbaren Komplexitätsgrad besitzen. Zu den Eukaryoten gehören alle Pilze (inklusive der einzelligen Hefen) sowie alle Organismen des Tier- und Pflanzenreichs (Abb. 1.10).

Es gibt gute wissenschaftliche Belege, dass die Ur-Eukaryoten (von griech. *eu* = richtig; *karyon* = Kern) bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution aus den Ur-Prokaryoten hervorgegangen sind und einige Ur-Eukaryoten „räuberisch“ lebten (Abschnitt 1.3.3). Die partiell eigenständigen Zellorganellen der heutigen Eukaryoten – die Mitochondrien (Bestandteil aller Eukaryoten) und die Chloroplasten (nur Pflanzenreich) – waren vermutlich einmal aerobe bzw. photosynthetisch aktive Bakterien, die, nachdem sie von einer räuberischen Ur-Eukaryotenzelle eingefangen wurden, eine dauerhafte Endosymbiose mit ihrem Räuber eingegangen sind (**Endosymbionten-Hypothese**).

Eine typische Eukaryotenzelle (Abb. 1.11) ist mit einem mittleren Durchmesser von ca.

Tabelle 1.2 Wichtige Unterschiede zwischen Eukaryoten und Prokaryoten

Merkmal	Prokaryoten	Eukaryoten
Zellaufbau	einfach	komplex
DNA	kovalent geschlossener DNA-Ring, frei im Cytosol (Plasmide vorhanden)	Chromosomen im membranumschlossenen Zellkern (Plasmide selten)
Zellorganellen	nein	ja
Ort der Energiegewinnung	Cytoplasmamembran	Mitochondrien
Zellwand aus Peptidoglycan	ja (nicht Archaea)	nein
Ribosomen	70S-Typ	80S-Typ
Introns in den meisten Genen	nein	ja

**Abb. 1.10** Einteilung der Eukaryoten in einen universellen phylogenetischen Stammbaum (Basis ist ein Sequenzvergleich der rRNA; modifiziert nach Madigan und Martinko 2006)

10–30 µm viel größer als die meisten Prokaryotenzellen (ca. 1–3 µm) und besitzt ein 1 000- bis 10 000-mal größeres Volumen. Dadurch kommt es im Vergleich zur Prokaryotenzelle, die ein wesentlich größeres Oberfläche/Volumen-Verhältnis aufweist, zu einem Nachteil, wenn es um die Stofftransportgeschwindigkeit von Nährstoffen aus der Umgebung bzw. der Abgabe von Stoffwechselprodukten an die Umgebung geht. Dies ist mit ein wesentlicher Grund, weshalb Prokaryoten eine höhere Wachstums- und Stoffwechselgeschwindigkeit als die komplexeren Eukaryoten zeigen. Tabelle 1.2 stellt weitere Unterschiede zwischen beiden Zelltypen dar.

Das charakteristische Merkmal der Eukaryotenzelle ist der von einer Kernhülle aus zwei Membranen umgebene **Zellkern** (Nucleus), der

das **Genom** enthält (Abb. 1.11). Die beiden Membranen der Kernhülle sind durch einen engen Zwischenraum getrennt, an einigen Öffnungen – den Kernporen – jedoch vereint und mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER), einem speziellen Membranlabyrinth der Eukaryotenzelle, verbunden. Die DNA bildet im Zellkern zusammen mit speziellen Proteinen, insbesondere basischen Histonen, ein spiralförmiges Grundgerüst, das **Chromatin**. Bei der Zellteilung verdichtet sich das Chromatin so stark, dass es zu kompakten Stäbchenstrukturen – den **Chromosomen** – kondensiert, die unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind. Geringe Mengen an DNA befinden sich auch in **Mitochondrien** und **Chloroplasten**. Im Zellkern befindet sich außerdem der **Nucleolus**, ein speziell für die rRNA-Synthese verant-

wortlicher Bereich. Der Nucleolus stellt eine Art „Ribosomen-Fabrik“ dar.

Die Mitochondrien zählen ebenso wie der Zellkern zu den **Zellorganellen** eines Eukaryoten. Sie haben etwa die Größe und Form eines

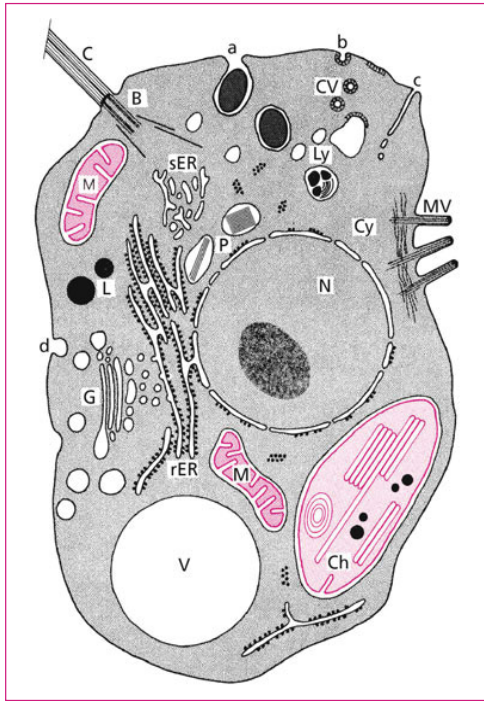


Abb. 1.11 Schematische Darstellung eines Eukaryoten (Kleinig et al. 1999). N = Zellkern mit Nucleolus; Cy = Cytoplasma mit einigen freien Polysomen; Ch = Chloroplast mit Thylakoiden, Stärkekorn und Lipidglobuli; M = Mitochondrium; sER = glattes ER (endoplasmatisches Reticulum); rER = raues ER, mit Polysomenbesatz; G = Golgi-Apparat (Dictyosom); V = Vakuole; Ly = Lysosomen; CV = coated vesicles; P = Peroxisomen mit Proteinkristallen; L = Lipidkörper (Oleosomen); C = Cilie oder Geißel; B = Basalkörper; MV = Mikrovilli. a, b, c = Endocytoseformen: a = Endocytose von Partikeln (Phagocytose); b = rezeptorvermittelte Endocytose über coated pits und coated vesicles; c = Endocytose gelösten Materials (Pinocytose); d = Exocytose. Miteinander mischbare Plasmen (Cytoplasma und Karyoplasma) sind grau, die mit anderen Plasmen nicht mischbaren Plasmen (Mitoplasma und Plastoplasma) sind farbig dargestellt; nicht-plasmatische Phasen sind weiß und Lipidphasen schwarz. Kern- und Cytoskelett sind nicht berücksichtigt, außer Actinfilamenten der Mikrovilli, die in einem Terminalgeflecht verankert sind, und einigen Mikrotubuli in Nähe der Geißelbasis

Prokaryoten, besitzen eine eigene ringförmige DNA, 70S-Ribosomen und eine Doppelmembran, vermehren sich durch Zweiteilung und sind speziell für die oxidative Phosphorylierung – also die Energiegewinnung – verantwortlich. All diese Befunde stützen die oben erwähnte Endosymbionten-Hypothese.

Analoges gilt für die nur bei zur Photosynthese fähigen Eukaryoten vorkommenden Chloroplasten. Sie betreiben Photosynthese auf nahezu die gleiche Weise wie Cyanobakterien, nämlich durch Absorption des Sonnenlichts im membrangebundenen Chlorophyll. Es spricht einiges dafür, dass Algen und Pflanzen aus der Symbiose mit Cyanobakterien hervorgegangen sind.

Das bereits oben erwähnte **endoplasmatische Reticulum (ER)** gehört wie der **Golgi-Apparat**, die Kernhülle und die kleinen Vesikel wie **Lysosomen** und **Peroxisomen** zu einem dynamischen, Labyrinth-artigen Membransystem der Zelle. Dieses Membransystem unterliegt einem ständigen Wandel, und es schnüren sich permanent Membranvesikel der einen Struktur ab, um sich zu einer anderen zu bewegen und mit ihr zu verschmelzen.

Das ER wird in glattes und raues ER unterschieden, beide stehen in Verbindung. Das **glatte ER** ist der Ort der Lipidsynthese und einer Reihe anderer wichtiger Stoffwechselvorgänge. Das **raue ER** verdankt seinen Namen und sein Aussehen den Ribosomen, die an ihm haften. Am rauen ER werden die Proteine synthetisiert, die anschließend aus der Zelle exportiert werden sollen. Die anderen Proteine, die in der Zelle verbleiben, synthetisieren die cytosolischen Ribosomen.

Der Golgi-Apparat wird aus verbundenen Dictyosomen (charakteristisch angeordnete Membranvesikel) gebildet. Man erkennt ihn meist als Stapel abgeflachter Membranzisternen mit kleinen kugelförmigen Vesikeln an den Enden. Der Golgi-Apparat ist asymmetrisch aufgebaut und hauptsächlich für die Verteilung und Sortierung von Proteinen und Enzymen innerhalb der Zelle und nach draußen verantwortlich. In den Lysosomen befinden sich hydrolytische Enzyme, die wie eine Art „Zell-Recycling-System“ den katalytischen Abbau von komplexen Molekülen (Proteine, Lipide, Polysaccharide, RNA) in ihre Monomere realisieren. In den Peroxisomen fin-

den stattdessen „geschützt“ Oxidationsreaktionen zum Abbau von Aminosäuren und Fetten statt, bei denen freie Radikale und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen. Das hochreaktive, „schädliche“ Wasserstoffperoxid wird sofort von dem Enzym Katalase, das in großen Mengen in den Peroxisomen vorkommt, zu Wasser und Sauerstoff gespalten.

Eine weitere Besonderheit der Eukaryotenzelle ist das aus einem Proteinfilament-System (Mikrotubuli, Actin- und Intermediärfilamente) bestehende **Cytoskelett**. Es stabilisiert die Zellform, strukturiert das Cytoplasma und sorgt für die Bewegung von Zellorganellen und Cytosol. Das Cytoskelett ist nicht etwa starr, sondern es kann sich drastisch umordnen. Der externe Bewegungsapparat, die **Cilien** und **Flagellen**, ist über das Cytoskelett mit der Zelle befestigt und ermöglicht die gerichtete Fortbewegung der Zelle.

Pflanzen- und Pilzzellen besitzen meist zusätzlich flüssigkeitsgefüllte Vesikel, die **Vakuolen**. Sie machen typischerweise mehr als ein Drittel, manchmal bis zu 90 %, des Zellvolumens aus und sind sehr vielseitige Zellorganellen. Sie enthalten hydrolytische Enzyme und dienen je nach Organismus als Speicherorganell (Nähr-, Abfall-, Giftstoffe) und als Regulator des pflanzlichen Turgordrucks (osmotischer Druck, der die Zellform stabilisiert). Die Vakuolenmembran wird als **Tonoplast** bezeichnet.

Die Ribosomen der Eukaryoten (außer den bakterienähnlichen Ribosomen der Mitochondrien und der Chloroplasten) sind vom größeren und komplexeren 80S-Typ und ebenfalls aus zwei Untereinheiten aufgebaut. Das 80S-Ribosom besteht insgesamt aus über 80 verschiedenen Proteinen und verschiedenen rRNAs (5S-, 5,8S-, 18S- und 28S-rRNA).

Die Genexpression des Eukaryotengenoms verläuft wesentlich komplexer als bei den Prokaryoten (Abb. 1.12). Es gibt bei der Transkription der Gene und der Translation der mRNA, die immer getrennt stattfinden, zusätzliche Schritte, die letztlich die Variations-, Regulations- und Reparaturmöglichkeiten der Synthese eines Merkmals wesentlich erhöhen.

Die Strukturgene der Eukaryoten enthalten im Allgemeinen codierende und nicht-codierende Desoxynucleotidsequenzen. Der codierende Teilbereich eines Gens wird als **Exon**, der nicht-

codierende als **Intron** bezeichnet. Bei der Transkription eines Strukturgens im Zellkern wird enzymatisch zuerst eine prä-mRNA („unreife“ RNA) synthetisiert, die sowohl Exons als auch Introns enthält. Die Introns werden anschließend aus der prä-mRNA herausgeschnitten, und die Exons werden zu einer „reifen“ mRNA verknüpft. Man spricht vom **Spleißen** der prä-mRNA. Bei den Eukaryoten wird die mRNA an ihren Enden noch zusätzlich prozessiert (5'-Cap = Methylguanosin-Rest; 3'-Polyadenylat-Schwanz). Im Unterschied zu den Prokaryoten ist die mRNA **monocistronisch**, das bedeutet, von einer prä-mRNA leitet sich immer nur ein Typ mRNA und daraus dann ein Polypeptid ab.

Nach der Translation der mRNA an den Ribosomen in ein Polypeptid bzw. Protein finden bei den Eukaryoten oft noch weitere (bio-)chemische Modifikationen der Proteine statt. Zu den bei Eukaryoten typischen posttranslationalen Modifikationen gehören insbesondere die Glykosylierungen von Proteinen. Aus diesem Grund ist die korrekte rekombinante Herstellung von eukaryotischen Glykoproteinen wie beispielsweise den Immunglobulinen (Antikörpern) in einem prokaryotischen Wirtsorganismus nicht möglich. Antikörper werden daher mit eukaryotischen Zellkulturen produziert.

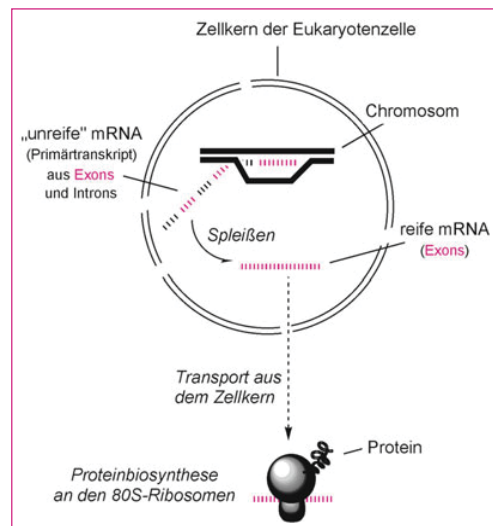


Abb. 1.12 Wichtige Schritte der Genexpression bei den Eukaryoten (schematisch)

1.2.3 Viren und Phagen

Fast alle Viren bestehen aus zwei Komponenten, einem Kern (Core) mit der Nucleinsäure (doppel- oder einzelsträngige DNA oder RNA) und einer Hülle aus gleichartigen Proteinuntereinheiten, die das Core umgibt und schützt. In manchen Fällen ist die Hülle von einer weiteren Hülle aus Lipiden umschlossen.

Phagen (griech. *phagein* = essen), oder auch **Bakteriophagen** genannt, sind Viren, die sich auf Bakterien spezialisiert haben. Die chemische Zusammensetzung, Symmetrie und Struktur der Viren sind die Grundlage für die Einteilung in verschiedene Gruppen (Tabelle 1.3). Viren sind zwischen 30 und 200 nm groß.

Außerhalb einer Zelle handelt es sich bei Viren, wie unter Abschnitt 1.2 bereits erwähnt, einfach um unbelebte Partikel, die als **Virionen** bezeichnet werden. Trifft solch ein Virion jedoch auf seine spezifische Wirtszelle, so kann es sich an der Oberfläche anheften und durch Verschmelzen seiner Hülle mit der Zellmembran seine Nucleinsäure in die Zelle entlassen. Die Zelle ist „infiziert“, und der Zellstoffwechsel folgt jetzt den genetischen Informationen des Virengenoms, das um Größenordnungen kleiner ist als das Wirtsgenom. Viren sind Zellparasiten. Sie nutzen die Enzyme und Ribosomen

der Zelle so, dass sie nicht mehr ihre eigentlichen Aufgaben erfüllen, sondern viele neue Virionen herstellen. Die Virionen werden dann üblicherweise über Knospen an der Zellmembran freigesetzt. Die Virusproduktion geht dabei stundenlang weiter.

Manche Bakteriophagen besitzen **lytische Proteine**, die aktiv die Lysis (Auflösung) der Wirtszelle (Bakterienzelle) bewirken. Für den Phagen ist es entscheidend, dass er die Synthese oder Funktion dieser lytischen Proteine so lange blockiert, bis er ein sehr spätes Stadium seines Vermehrungszyklus erreicht hat und die korrekte Zusammensetzung des Viruspartikels gewährleistet ist. Ein besonders interessanter Fall liegt bei dem Phagen **Lambda** vor. Lambda ist ein lysogener Phage des Bakteriums *E. coli*, der über ein halbes Jahrhundert eingehend untersucht wurde. Er hat gelernt, in und mit seinem Wirt zu leben. Seine doppelsträngige DNA besteht aus ca. 45 000 bp und codiert für ca. 45 Proteine. Dagegen besitzt *E. coli* etwa 3 Millionen bp und ca. 5 000 verschiedene Proteine.

Wenn sich Lambda an die *E. coli*-Wirtszelle anheftet und seine DNA einschleust, kann das Virus zwei verschiedenen Fortpflanzungswegen folgen (Abb. 1.13): Entweder lässt es von *E. coli* die frühen Virusproteine synthetisieren, die eigene DNA replizieren, lässt beides zusammensetzen und lysiert die Zelle nach ca. 20 Minuten

Tabelle 1.3 Einteilung von Viren nach Nucleinsäure und Symmetrie (modifiziert nach Levine 1991)

Name des Virus (Zuordnung)	Nucleinsäure	Symmetriestruktur des Capsids
T7 (Bakteriophage)	doppelsträngige DNA	Kopf: kugeliger Ikosaeder Schwanz: spiralig, mit „Spikes“
M13 (Bakteriophage)	einzelsträngige, ringförmige DNA	spiraliger Stab
Lambda (λ) (Bakteriophage)	doppelsträngige, lineare DNA (48 502 bp)	Kopf: ikosaedrisch (64 nm) Schwanz: helikal (150 nm)
Tabakmosaikvirus (Pflanzenvirus)	einzelsträngige, gestreckte DNA (+)	spiraliger Proteinstab
Epstein-Barr-Virus (Tier: Herpesvirus)	doppelsträngige, gestreckte DNA (120 000–200 000 bp)	Ikosaeder; Proteinmantel und Lipidhülle (150–200 nm)
Affenvirus 40 (SV40) (Tier: Papovavirus)	doppelsträngige, ringförmige DNA (5 000–8 000 bp)	Ikosaeder; Proteinmantel (45–55 nm)
Poliovirus (Tier: Picornavirus)	RNA-(+)-Stränge, 7 000 Nucleotide	Ikosaeder; Proteinmantel (28 nm)

(das ist der lytische Vermehrungsweg); oder es exprimiert nur ein einziges Gen, dessen Protein das gesamte Virusgenom ruhig stellt, und die infizierende DNA wird in das Bakteriumgenom eingebaut (lysogener Vermehrungszyklus). Das Virusgenom wird dann normal mit dem Bakteriumgenom vermehrt. Welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird, hängt von den physiologischen Bedingungen in der Zelle und einem Wettlauf zwischen der Expression zweier Virusgene ab.

Analoge Wege findet man auch bei der Virusvermehrung in Eukaryoten. So ist bei den Affen bereits in den 50er-Jahren ein **Poliomavirus** („SV40“) entdeckt worden, das sich ebenfalls über einen **lytischen Zyklus** in infizierten Affenzellen vermehren kann. Ein weiteres Beispiel ist das Epstein-Barr-Virus, das den Menschen infi-

ziert. Von diesem Virus werden bei seinem lyso-genen Vermehrungsweg einige Gene exprimiert, und die dabei entstehenden Proteine induzieren in der Wirtszelle ein abnormales Zellwachstum, das als Krebstumor erkennbar wird. Das Epstein-Barr-Virus gehört somit zu der Gruppe der DNA-Tumoviren.

Die Viren und Phagen sind von den Bioverfahrenstechnikern besonders gefürchtet, da sie zu klein sind, um bei der Sterilfiltration von Medien zurückgehalten zu werden. Deshalb kann es zu einer unerfreulichen Infektion von insbesondere tierischen oder pflanzlichen Zellkulturen kommen, die zu einem Abbruch der Kultivierung und einem Ausfall der Produktion führt.

Die allgemein übliche Hitzesterilisation von Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen inaktiviert hingegen Viren und Phagen.

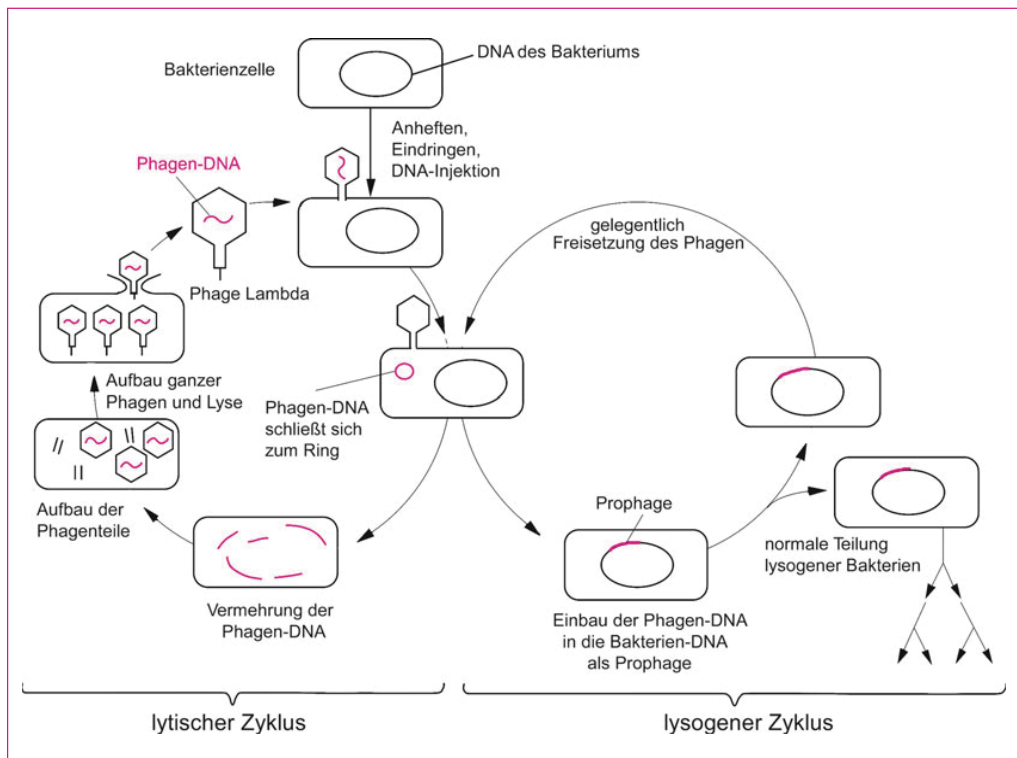


Abb. 1.13 Die Vermehrung des Phagen Lambda: Nach der Injektion der Phagen-DNA in das Wirtsbakterium setzt entweder die Vermehrung der Phagen-DNA ein (lytischer Zyklus), oder es entsteht durch Einbau der Phagen-DNA in die Bakterien-DNA ein lysogenes Bakterium, das sich vermehren kann; so entstehen viele lysogene Bakterien

1.3 Fortpflanzung und Evolution

Der Inbegriff des Lebens ist die Fähigkeit eines Organismus, sich selbst präzise replizieren und energieökonomisch organisieren zu können. Die Replikation besteht aus der Verdopplung der Erbanlagen, der annähernden Verdopplung der Zellbestandteile durch Genexpression und Stoffwechsel und aus der sich daran anschließenden Zellteilung. Die molekularen Grundlagen, wie in jeder Zelle DNA repliziert wird, sind bereits unter Abschnitt 1.1.1 (Abb. 1.3) erläutert worden. Bei diesem Replikationsschritt gibt es jedoch naturbedingte Fehlermöglichkeiten, die Veränderungen bzw. Weiterentwicklungen der Organismen (Evolution) erst ermöglicht haben und die für die heute auf der Erde anzutreffende Artenvielfalt verantwortlich sind.

1.3.1 Vermehrung von Zellen durch Zellteilung (asexuelle Fortpflanzung)

In der Bioprozesstechnik kommen oft Einzelzellen, pelletartige Zellverbände oder Mycelien von Pro- und Eukaryoten zum Einsatz, die sich asexuell durch direkte Zellteilung fortpflanzen. Die Vermehrungsrate der Zellen hängt von artspezifischen inneren und durch die Umgebung (Medium) bestimmten äußeren Faktoren wie Nährstoffangebot, Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration ab. Unter optimalen Bedingungen verdoppeln sich viele Bakterienzellen alle 20 bis 30 Minuten durch einfache **Zellteilung** (Abb. 1.14), nachdem die Replikation des ringförmigen Bakteriengenoms durch die DNA-Polymerase abgeschlossen ist.

Bei eukaryotischen Einzellern beträgt die Verdopplungszeit hingegen zwischen zwei und 50 Stunden. Die Ursachen liegen zum einen in ihrem größtenbedingten ungünstigeren Oberfläche/Volumen-Verhältnis sowie in der wesentlich komplexeren Genexpression (s. o.). Zum anderen ist aber auch die Replikation des Genoms im Zellkern viel aufwendiger und durchläuft mehrere Phasen, die als **Zellzyklus** angesprochen werden (Abb. 1.15).

Der Zellzyklus dauert von einer **Mitose** (Kernteilung) bis zur nächsten Mitose und umfasst alle dabei notwendigen Zwischenschritte, durch die eine Zelle ihren Inhalt verdoppelt und sich zweiteilt. Die Periode zwischen zwei Mitosen und somit die längste Periode eines Zellzyklus nimmt die **Interphase** ein, die die G₁-Phase, S-Phase und G₂-Phase umfasst. Die M-Phase besteht aus der Teilung des Zellkerns, der Mitose, und der anschließenden Teilung des Cytoplasmas, der **Cytokinese**.

In der Interphase muss eine Zelle ihren gesamten Zellinhalt verdoppeln, jedoch ist die S(Synthese)-Phase, in der die DNA in Form von Chromosomen im Zellkern repliziert wird, klar von den anderen Vorgängen abgrenzbar. Die G₁-Phase (G von engl. *gap* = Lücke) dient zur Vorbereitung der DNA-Synthese und die G₂-Phase als Vorbereitung für die Mitose und Cytokinese. In der M-Phase erfolgt die Verteilung der seit der S-Phase doppelt vorhandenen Chromosomen auf zwei Zellkerne (Mitose) und die Verteilung des Cytoplasmas mit seinen Organellen auf zwei Zellen (Cytokinese). Das sind aufwendige mechanische Vorgänge, deren fehlerfreie Umsetzung einen komplizierten Zellapparat voraussetzt. Die Mitose umfasst einzelne Abschnitte, die als Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase angesprochen werden. Hierzu wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, insbesondere auf Alberts et al. (2004).

Ein weiterer Aspekt bei der Zellteilung ist die Kopplung von Zellgröße und Vermehrung. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzen Mutter- und Tochterzelle unterschiedliche Größen. Die kleinere Tochterzelle, die als „Knospe“ aus der Mutterzelle hervorgeht, benötigt eine längere Zeit (G₁-Phase) als die Mutterzelle, um das „Abschnürungsereignis“ zu bewältigen und um selbst zu einer Knospung in der Lage zu sein. Man vermutet als Ursache eine konzentrationsabhängige Regulation des Zellzyklus durch zelleigene Substanzen.

Alle Zellen können in einen stationären Zustand übergehen. Die Dauer dieses Zustands ist bei einzelligen Organismen hauptsächlich von den Umgebungsbedingungen abhängig, beispielsweise bei der Limitierung eines Nährstoffes. Bei vielzelligen Organismen wie den höheren Pflanzen und Tieren kommen weitere organismusabhängige Faktoren hinzu. Man unterscheidet hier zwischen endogenen und exogenen

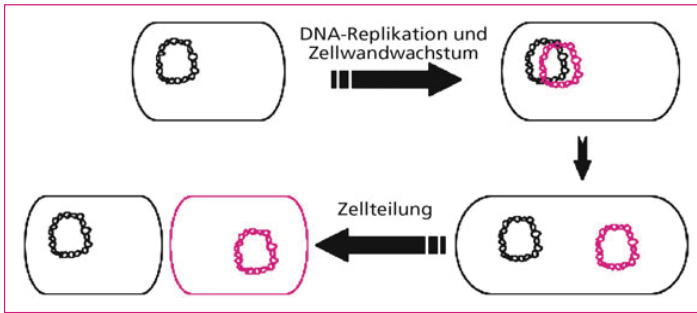


Abb. 1.14 Vorgang der Zellteilung bei einem Bakterium (schematisch)

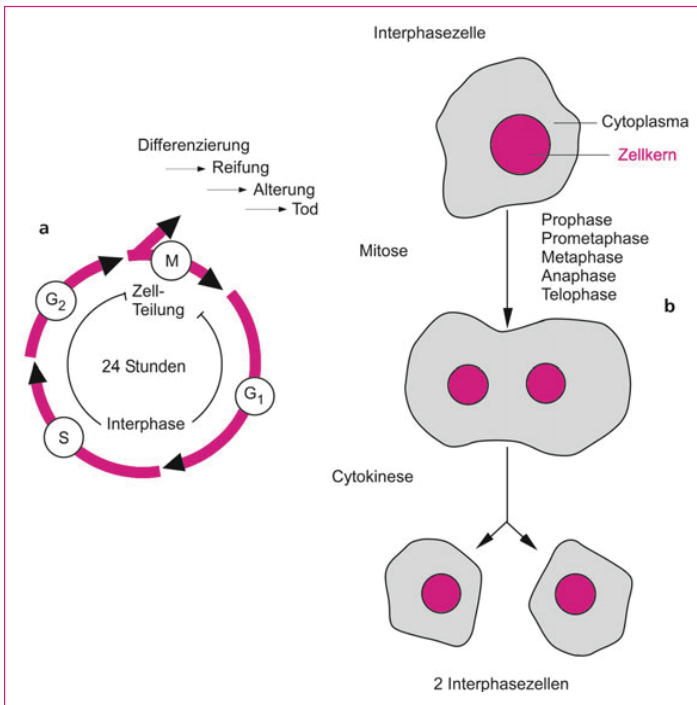


Abb. 1.15 Vorgang der Zellteilung bei einem Eukaryoten (schematisch, nach Alberts et al. 2004). (a) Der Zellzyklus (Interphase und Mitose) reicht von einer Zellteilung bis zur nächsten (bei Säugerzellen etwa 24 h). Die Interphase besteht zunächst aus einer Zeit ohne DNA-Synthese (G_1 -Phase, von *gap* = Pause), dann die Phase der DNA-Synthese (S-Phase) und schließlich vor der nächsten Teilung eine weitere Phase ohne DNA-Bildung (G_2 -Phase). (b) Auch die Mitosephase (Kernteilung) besteht aus verschiedenen unterscheidbaren Einzelphasen, an deren Ende die Cytokinese (Cytoplasmateilung) steht

Faktoren, je nachdem ob die Faktoren der zell-eigenen Genexpression entstammen oder von außerhalb der Zelle, z. B. Hormone oder Wachstumsfaktoren, aufgenommen wurden. Ein spezieller endogener Kontrollmechanismus liegt bei dem programmierten Zelltod von differenzierten Säugerzellen vor (**Apoptose**), der nach ca. 60 bis 70 Zellteilungen einsetzt und nicht zu vermeiden ist. Apoptose ist ein normaler Vorgang, der in vielzelligen Organismen häufig vorkommt und bei der Zellkulturtechnik eine Rolle spielt.

1.3.2 Die sexuelle Vermehrung

Neben der asexuellen Zellteilung vermehren sich viele Eukaryoten und einige Prokaryoten auf sexuellem Wege, d. h. die Genome zweier Individuen werden vermischt. Die Nachkommen der asexuellen Vermehrung besitzen das gleiche Genom wie ihr Elter (s. o.), die der sexuellen Vermehrung sind sowohl untereinander als auch von beiden Eltern genetisch verschieden. Der

evolutive Vorteil der Sexualität ist die Neukombination von Genen, wodurch bei sich ändernden Umweltbedingungen ein Wettbewerbsvorteil entsteht bzw. die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Organismus erhöht wird.

Die sexuelle Vermehrung eines Eukaryoten basiert grundsätzlich auf einem Wechsel in der Anzahl seiner Chromosomen. Durch Zelldifferenzierung können aus einer eukaryotischen Zelle mit einem doppelten Genom (**diploide Zelle**; doppelter Chromosomensatz) Zellen mit einem einfachen Genom (**haploide Zellen**; einfacher Chromosomensatz) entstehen. Wenn anschließend zwei haploide Eukaryotenzellen miteinander verschmelzen (fusionieren), ergibt sich wieder eine diploide Zelle (Abb. 1.16). Durch

Zyklen der Haploidie, Zellfusion, Diploidie und Meiose werden somit neue Genkombinationen geschaffen.

Den Vorgang, bei dem aus einer diploiden Eukaryotenzelle in der Regel vier haploide Tochterzellen entstehen, nennt man **Meiose**. Diese spezielle Form der Zellteilung einer diploiden Zelle fängt mit einem DNA-Replikationsschritt an, der die DNA verdoppelt. Dann folgen nacheinander zwei Zellteilungen, und es entstehen vier haploide Tochterzellen (Keimzellen). Die haploiden Keimzellen heißen **Gameten**. Es werden üblicherweise zwei Sorten von Gameten gebildet: Die einen sind weiblich (Oocyten), die anderen männlich (Spermien) und auf das Auffinden des anderen weiblichen Gameten spezia-

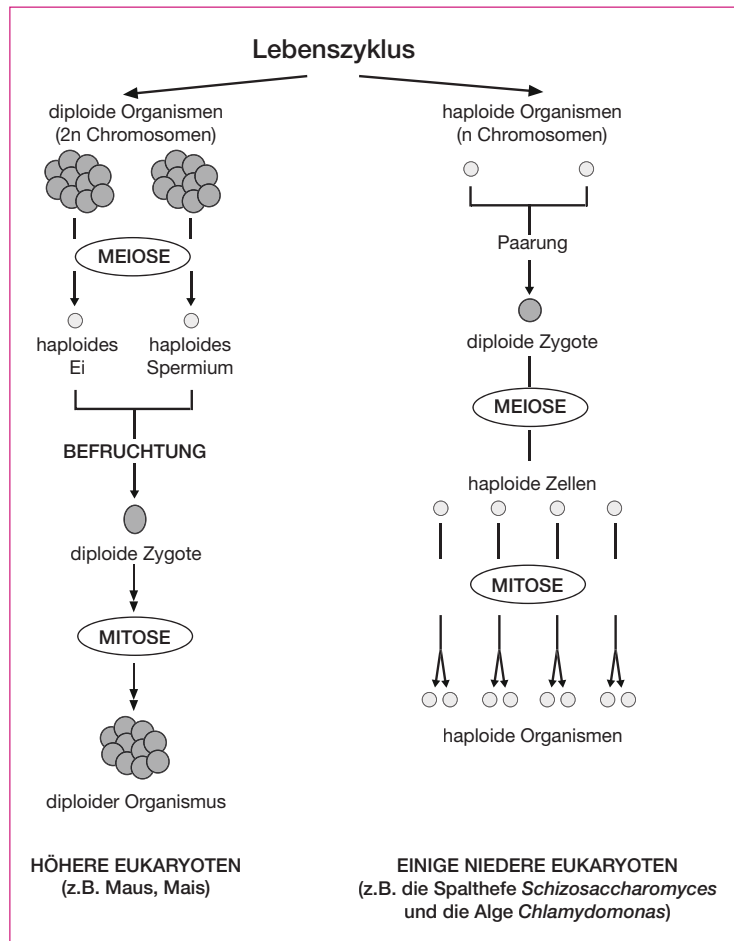


Abb. 1.16 Lebenszyklen von haploiden und diploiden eukaryotischen Zellen (modifiziert nach Alberts et al. 2004)

lisiert. Je eine Oocyte (Eizelle) vereinigt sich mit einem Spermium zu einer befruchteten Eizelle, der Zygote.

Die diploide Zygote vermehrt sich bei den höheren Eukaryoten (den meisten Pflanzen und vielzelligen Tieren) durch normale mitotische Teilungen, und die entstehenden diploiden Zellen differenzieren sich und bilden verschiedene Gewebe bzw. Organe aus. Lediglich bei der Differenzierung in die haploiden Geschlechtszellen (Keimzellen) findet Meiose statt. Diese Organismen leben in einer komplexen, langen diploiden Phase. Andersherum ist es bei einigen primitiven Organismen, wie den Spaltheften. Sie leben überwiegend als haploide Zellen, da sich bei ihnen die diploiden Zellen sofort nach ihrer Entstehung durch Meiose wieder in haploide Zellen teilen. Die haploiden Spaltpilze vermehren sich dann mitotisch.

Die Neukombination der Gene erfolgt bei der sexuellen Vermehrung aber nicht nur durch die Verschmelzung der zwei haploiden Elternzellen, obwohl allein dabei bereits 2^n verschiedene Gameten erzeugt werden, wenn n die Zahl der Chromosomen pro haploider Zelle ist. Tatsächlich ist die genetische Variabilität jedoch noch wesentlich größer, weil es während der Teilung I der meiotischen Zellteilung zu einem sogenannten Überkreuzen (engl. *crossing over*) der homologen, eng aneinander liegenden Chromosomen im Zellkern kommen kann. Dieser als **homologe Rekombination** bezeichnete Vorgang wird von Proteinen (u. a. RecA-Protein) und Enzymen (u. a. Endonucleasen, Helikasen, DNA-Ligasen) realisiert. Er beginnt mit einem Einzelstrangbruch in einem der homologen, doppelsträngigen DNA-Moleküle (DNA-Duplexe). Der Einzelstrang dieses Donor-DNA-Duplexes wird an eine komplementäre Sequenz des angrenzenden DNA-Duplexes (Akzeptor-DNA-Duplex) geführt, und es bildet sich ein Komplex, der den enzymatischen Einbau (Stranginvasion) in den benachbarten DNA-Doppelstrang ermöglicht. Parallel dazu wird der vorhandene, komplementäre DNA-Strang des Akzeptor-DNA-Duplexes in den jetzt freien Bereich des Donor-DNA-Duplexes integriert. Dadurch entsteht ein Überkreuzpunkt mit einer Hetero-Duplexregion, der enzymatisch aufgelöst wird und zwei rekombinante DNA-Duplexe entstehen lässt.

Bei Bakterien, die selbstverständlich keine Meiose durchlaufen, findet homologe Rekombination bei der Übertragung von Fragmenten homologer, aber genetisch verschiedener DNA von einem Donorchromosom zu einer Empfängerzelle statt. Es gibt hierzu prinzipiell drei unterschiedliche Möglichkeiten: die **Konjugation**, die **Transduktion** und die **Transformation**. Als Konjugation wird ein Vorgang zwischen zwei Bakterienzellen beschrieben, die zeitweise über eine Cytoplasmabrücke (Sex-Pili) miteinander verbunden sind und genomische DNA bzw. Plasmide austauschen. Die Transduktion beschreibt den Transfer von Donor-DNA in ein Bakterium durch einen Virus. Bei der Transformation wird hingegen freie DNA (DNA-Teilstücke), die beispielsweise von einer lysierten Bakterienzelle freigesetzt wurde, von einer anderen Zelle (kompetente Zelle) aufgenommen. Zu einer natürlichen Transformation sind nur bestimmte Bakterienstämme oder Spezies befähigt (z. B. *Bacillus subtilis*), die kompetenzspezifische Proteine besitzen.

1.3.3 Prinzipien der Evolution

Im Jahr 1858 publizierten Charles Darwin und Alfred Russel Wallace erstmals die Hypothese, dass die natürliche Selektion für die Entstehung von neuen phänotypischen Organismusvarianten und letztlich neuen Arten verantwortlich ist. Ein Jahr später lieferte Darwin in *The Origin of Species* eine lange Liste an Befunden, die diese Hypothese eindrucksvoll untermauerten. Darwin trug damit bahnbrechend zur heutigen, wissenschaftlich unbestrittenen Akzeptanz der Abstammungslehre (Evolutionstheorie) in den Biowissenschaften bei.

Die **Evolutionstheorie** besagt, dass alle heutigen Lebewesen auf der Erde im Verlauf der erdgeschichtlichen Entwicklung aus primitiv organisierten Vorfahren entstanden sind, die sich entsprechend den Umweltbedingungen angepasst und unabhängig weiterentwickelt haben. Über die Entstehung des Lebens sagt sie nichts.

Hierfür gibt es wiederum andere wissenschaftliche Hypothesen, die von einer „chemischen Evolution“, die der biologischen vorausge-

gangen ist, ausgehen (Geibel 1987). Bei der chemischen Evolutionstheorie sind auf der Erde vor ca. 4,5 Milliarden Jahren unter den Bedingungen der Ur-Atmosphäre (partiell hohe Temperaturen und hoher Druck, UV-Licht, CO_2 , N_2 und H_2) biologisch bedeutsame Substanzen wie Aminosäuren, Carbonsäuren, Zucker und Fettsäuren entstanden. Die Entstehung dieser Moleküle unter imitierten Ur-Atmosphäre-Bedingungen konnte vielfach experimentell bestätigt werden.

Aufgrund der mittlerweile diversen Fossilienfunde von Mikroorganismen, die durch moderne Isotopenstudien erdgeschichtlich eingeordnet werden konnten, lässt sich nachweisen, dass es **Ur-Prokaryoten** bereits vor 3,5 Milliarden Jahren auf der Erde gab (Kutschera und Niklas 2004). Weitere Fossilienfunde belegen die Existenz von Ur-Cyanobakterien vor 2,7 Milliarden und ersten einzelligen **Ur-Eukaryoten** vor 1,9 Milliarden Jahren. Die ersten fossilen, sich sexuell vermehrenden, mehrzelligen Ur-Eukaryoten (Rotalgen) existierten bereits vor 1,2 Milliarden Jahren. Durch die unglaublich hohen genetischen Rekombinationsmöglichkeiten bei der sexuellen Vermehrungsform von Zellen scheint dann in der Evolution ein Durchbruch stattgefunden zu haben, der die Entstehung der höheren Pilze, Tiere und Pflanzen vor ca. 0,5–0,6 Milliarden Jahren ermöglichte.

Die Prinzipien der biologischen Evolution basieren auf dem Wechselspiel zwischen Vermehrung eines Organismus, natürlicher Veränderung seines Erbguts durch Fehler bei der Replikation (**Mutationen**) oder genetischer **Rekombination** (s. o.) und der **Selektion** zufällig vorteilhafter genetischer Veränderungen durch die Umwelt (Abb. 1.17). Die Umwelt ist dabei der Sammelbegriff für die verschiedenartigsten Einflüsse auf den Makro- und Mikrokosmos des Organismus wie Klima, Atmosphäre, Sonnenenergie, Nährstoffangebot, Konkurrenten, Feinde, pH-Wert, Temperatur, Druck und vieles mehr. Evolution bewirkt eine Anpassung von Lebewesen an die aktuell gegebenen, realen Bedingungen. Die „besten und stärksten“ Organismen überleben (engl. *survival of the fittest*) und sind an eine bestimmte ökologische Nische angepasst. Dabei sollte man beachten, dass erfahrungsgemäß die meisten zufälligen Mutationen nachteilig, oft sogar letal sind und die wenigsten Mutationen einen Vorteil für den Organismus bedeuten.

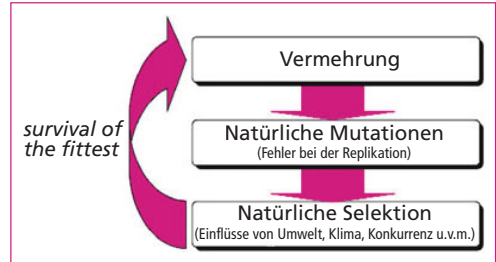


Abb. 1.17 Prinzip der Evolution

In diesem Zusammenhang sollten wir einige Ursachen für die natürlichen, unvermeidbaren Mutationen bei der Replikation von DNA diskutieren, die in der frühen Entwicklungsgeschichte des Lebens der Motor für die Evolution gewesen sein müssen und die auch heute und in der Zukunft eine ständige Fortführung der Evolution garantieren. Die durch sexuelle Vermehrung gewährleistete Veränderung des Erbguts, die selbstverständlich keine Mutationen darstellen, wurde bereits im Abschnitt 1.3.2 angesprochen.

Die DNA und die Nucleotide werden zeit- und umgebungsabhängig aufgrund spontaner chemischer Reaktionen wie Tautomerien, Desaminierungen, Oxidationen oder Methylierungen an den Basen geschädigt. Bei der komplementären Anlagerung der Basen während der Replikation von DNA kommt es dann zu Fehlpaarungen. Damit ist in der Tochterzelle die DNA-Sequenz verändert, man spricht von Mutation. Dies kann, wenn das „veränderte“ Codon später für den Einbau einer anderen Aminosäure in ein Protein verantwortlich ist, zu einer Eigenschaftsveränderung des Proteins führen. Mehrere solcher Mutationsereignisse in einer Generation und/oder in den Folgegenerationen ergeben eine zunehmende Abweichung der DNA-Sequenzen innerhalb einer Verwandtschaftslinie. Es resultieren abweichende Eigenschaftsmerkmale, die nachteilig, neutral oder vorteilhaft für den Organismus sein können. Die vorteilhaften Mutationen werden von der Umwelt positiv selektioniert.

Eine weitere, wenn auch viel geringere, Fehlermöglichkeit bei der Replikation der DNA liegt in der enzymatischen Reaktion, die von DNA-Polymerasen katalysiert wird. Dieser Vorgang ist sehr komplex und läuft dennoch mit einem

hohen Grad an Zuverlässigkeit ab, da es mehrere Typen von enzymatischen DNA-Reparaturmechanismen in der Zelle gibt, die im Übrigen auch die bereits oben genannten chemischen DNA-Schäden oftmals reparieren können. Bei der DNA-Polymerase des Bakteriums *E. coli* tritt beispielsweise bei nur einem von 10^9 bis 10^{10} eingebauten Nucleotiden ein Fehler auf. Dennoch kommt es zu Fehlern, die eine natürliche Mutationsquelle darstellen. Insgesamt schätzt man die Wahrscheinlichkeit eines unbeabsichtigten natürlichen Mutationsereignisses in Abhängigkeit vom Organismus auf 10^{-5} bis 10^{-9} pro Zellteilung.

Mutationen können auch „vorprogrammiert“ sein. Sowohl bei Eukaryoten (z. B. Mais, Hefe) als auch bei Prokaryoten (Bakterien) sind transponierbare genetische Elemente (**Transposons**) in der genomischen DNA und den Plasmiden gefunden worden, die an verschiedenen Stellen im Genom enzymatisch zufällig ein- und ausgebaut werden. Diese „springenden“ Elemente können sehr kurze, einfache Sequenzen besitzen, die beim Einbau in ein Gen eine Mutation auslösen.

Bestimmte Umweltfaktoren, wie diverse chemische Agenzien (u. a. Alkaloide, Ethylmethansulfonat), UV-, Röntgen- oder Ionenstrahlung, lösen ebenfalls durch Schädigung der DNA verstärkt Mutationen aus, die für den Organismus gesundheitsschädlich oder tödlich sind. Nichtsdestotrotz hat sich der gezielte Einsatz von mutagenen Agenzien oder UV-Strahlung in Züchtungsverfahren bei Pflanzen und Mikroorganismen seit über einem halben Jahrhundert bewährt (**klassische Mutagenese**). Längst bevor die modernen Methoden der Gentechnik zur Verfügung standen, wurden Antibiotika- oder Citronensäure-Produktionsstämme wie die Pilze *Penicillium chrysogenum* bzw. *Aspergillus niger* durch vielfach wiederholte klassische Mutagenese

und Selektion im Labor in den technisch gewünschten Biosyntheseleistungen um Größenordnungen verbessert. Aufgrund der heutigen Möglichkeiten der Gentechnik und der Bioanalytik werden die Prinzipien der Evolution auf molekularer Ebene immer besser verstanden und gezielt und erfolgreich für die Züchtung von Mikroorganismen zur Steigerung der selektiven Stoffproduktion eingesetzt.

In dieser Einführung in die Zellbiologie wurden die Unterschiede zwischen Prokaryoten und Eukaryoten als Ergebnis verschiedenartiger Evolutionsstrategien dargestellt. Sie beschränkt sich bewusst auf die Sachverhalte, die Voraussetzung für die Behandlung der späteren Kapitel sind. Sie muss insbesondere im Zusammenhang mit dem folgenden Kapitel gesehen werden, wo auf die Bausteine und den Stoffwechsel der Zelle sowie die Regulation zellulärer Vorgänge eingegangen wird.

Literatur

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004): Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Fuchs, G., Schlegel, H. G. (2007): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Geibel, K. (1987): Chemische Evolution. In Siewing, R. (Hrsg.) Evolution. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Kleinig, H., Sitte, P., Maier, U. (1999) Zellbiologie. 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kutschera, U., Niklas, K. J. (2004): The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. Naturwissenschaften 91, 255–276
- Levine, A. J. (1991): Viren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006): Brock Mikrobiologie, Pearson Studium, München
- Nelson, D., Cox, M. (2008): Lehninger Biochemie, Springer Verlag, Berlin
- Voet, D., Voet, J. G. (2002): Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Bioprozesstechnik

Chmiel, H.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (Hrsg.)

2018, XV, 586 S. 392 Abb., 246 Abb. in Farbe.,

Hardcover

ISBN: 978-3-662-54041-1