Taschenlehrbuch Biologie

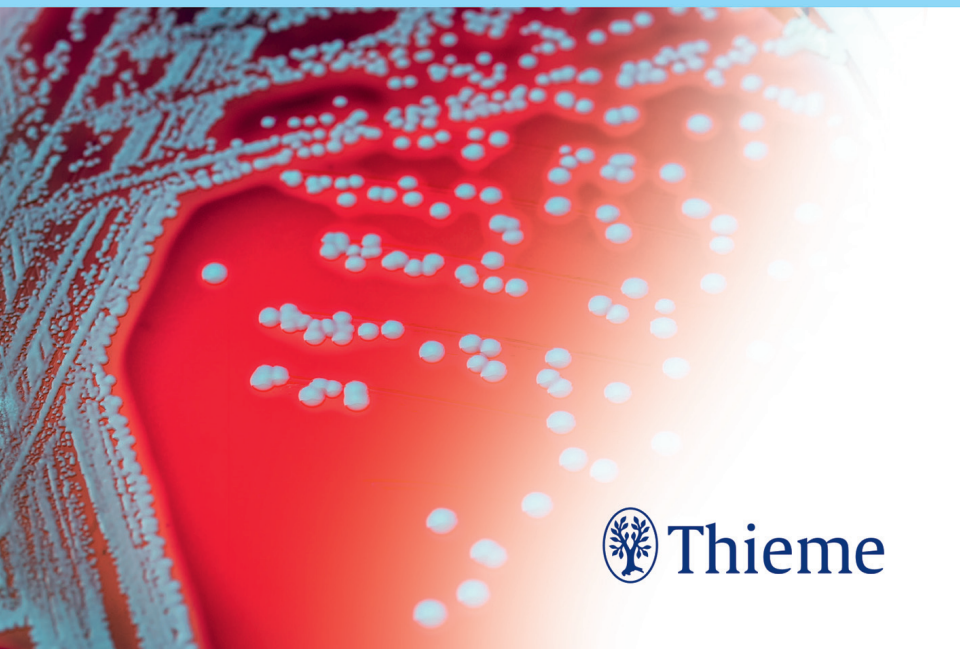
Mikrobiologie

Online-Version

Herausgegeben von
Katharina Munk

Unter Mitarbeit von
Petra Dersch
Bernhard Eikmanns
Marcella Eikmanns
Reinhard Fischer
Dieter Jahn
Martina Jahn
Regina Nethe-Jaenchen
Natalia Requena
Beate Schultze

2. Auflage



Thieme

Auf einen Blick

1 Die Welt der Mikroorganismen 1

2 Struktur und Funktion der Zellen von Mikroorganismen 2

3 Systematik und Phylogenie 3

4 Viren 4

5 Pilze 5

6 Mikrobielle Genetik 6

7 Mikrobielles Wachstum 7

8 Der Energiestoffwechsel der Mikroorganismen 8

9 Biosyntheseleistungen von Mikroorganismen 9

10 Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen 10

11 Einfluss von Mikroorganismen auf Natur und Mensch 11

12 Mikrobielle Biotechnologie 12

13 Anhang 13

Taschenlehrbuch Biologie

Mikrobiologie

Herausgegeben von
Katharina Munk

Unter Mitarbeit von
Petra Dersch
Bernhard Eikmanns
Marcella Eikmanns
Reinhard Fischer
Dieter Jahn
Martina Jahn
Regina Nethe-Jaenchen
Natalia Requena
Beate Schultze

2., unveränderte Auflage

381 Abbildungen
43 Tabellen



Georg Thieme Verlag
Stuttgart · New York

Bibliografische Information
Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen National-bibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden **nicht** besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handele. Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

1. Auflage 2008

© 2018 Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14, D-70469 Stuttgart
www.thieme.de

Printed in Germany

Umschlaggestaltung: Thieme Gruppe

Umschlagabbildung: Staphylococcus aureus.
Original: analysis121980/Adobe Stock

Zeichnungen: H. Bernstädt-Neubert, Berlin;
Ch. von Solodkoff, Neckargemünd

Satz: Hagedorn Kommunikation, Viernheim
Gesetzt auf 3B2

Druck: Westermann Druck Zwickau GmbH, Zwickau

DOI 10.1055/b-006-149923

ISBN 978-3-13-242395-4 1 2 3 4 5 6

Auch erhältlich als E-Book:
eISBN (PDF) 978-3-13-242396-1
eISBN (epub) 978-3-13-242397-8

Vorwort

Für die Studierenden wird es immer schwieriger bei dem wachsenden Informationsangebot und der Flut an täglich neu hinzukommenden Forschungsergebnissen im Rahmen des kurzen **Bachelor-Studiums der Biologie**, ein Verständnis für biologische Zusammenhänge und Prinzipien zu entwickeln. Die verschiedenen biologischen Fachbücher als Reihe herauszubringen, bietet die Möglichkeit, die **Zusammenhänge zwischen den Fachgebieten** herauszuarbeiten. Vier Bände enthalten das relevante Grundwissen der **Zoologie**, **Botanik**, **Mikrobiologie** und **Genetik**. Um die Gemeinsamkeiten der Organismen herauszustellen und gleichzeitig die Überschneidungen zwischen den Bänden möglichst gering zu halten, haben wir diesen „klassischen" Fächern zwei übergreifende Bände zur Seite gestellt: Den Band **Biochemie · Zellbiologie**, der sich mit der Zelle als der kleinsten Lebenseinheit beschäftigt, und den Band **Evolution · Ökologie**, der sich mit Interaktionen befasst, die über den einzelnen Organismus hinausgehen und ganze Lebensgemeinschaften und Ökosysteme betreffen.

Die an der Buchreihe beteiligten **über 40 Autoren** sind in Lehre und Forschung **erfahrene Dozenten** ihrer Fachgebiete. Ihre Erfahrungen mit den seit einigen Jahren laufenden Bachelor-Studiengängen haben sie in diese Taschenbücher eingebracht, die Stofffülle auf ein überschaubares Basiswissen reduziert und durch eine fächerübergreifende, vergleichende Darstellung und viele Verweise Querverbindungen zwischen den einzelnen biologischen Disziplinen hergestellt. So vermitteln die Bände einen zusammenhängenden Überblick über die Basisinhalte der Biologie.

In dem Band **Mikrobiologie** werden die wichtigsten Gruppen der Bacteria, Archaea, Viren und Pilze im Hinblick auf ihre Besonderheiten in Aufbau und Organisation und ihre phylogenetische Klassifikation vorgestellt sowie in ihrer globalen Bedeutung eingeordnet. Mikroorganismen haben enorme Stoffwechselfähigkeiten entwickelt, um sich die vielfältigen Lebensräume dieser Erde, darunter auch extreme Habitate wie heiße Quellen oder Salz- und Alkaliseen, erfolgreich zu erschließen. Die vielfältigen Wege mikrobieller Energiegewinnung und Biosynthesen lassen sich auf eine begrenzte Zahl von Elementarprozessen zurückführen. Sie werden verständlich dargestellt, ebenso wie die molekularen und genetischen Prozesse, die Voraussetzung für das erfolgreiche Anpassungsvermögen der Mikroorganismen sind. Die mikrobielle Biotechnologie hat sich zur Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts entwickelt: Bakterien, Pilze und ihre Enzyme werden zunehmend zur Stoffproduktion und -umwandlung in den Bereichen Ernährung, Gesundheit, Pharma, Chemie und Umwelt eingesetzt.

Die **Ursprünge** dieser Taschenlehrbuch-Reihe zur Biologie gehen auf eine Initiative des Gustav Fischer Verlages im Sommer 1997 zurück. An dieser Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Arne Schäffler danken, der damals das Zustandekommen der Reihe ermöglichte und mit seinen vielen wertvollen Ratschlägen ihren Werdegang begleitet hat. Ermutigt durch den Erfolg der ersten

Auflage, die 2000 und 2001 unter dem Namen *Grundstudium Biologie* im Spektrum-Verlag erschien, und die starke positive Resonanz von Studenten und Dozenten, haben wir eine neue Auflage in Angriff genommen, die mittlerweile durch zahlreiche neue Autoren unterstützt wird.

Mein besonderer **Dank** gilt dem Georg Thieme Verlag für die neue Herausgabe der Reihe in ihrer jetzigen Taschenbuchform und der großzügigen farbigen Gestaltung.

Frau Marianne Mauch als verantwortliche Programmplanerin danke ich für ihre Begeisterung für das Projekt, die effiziente Hilfe und ihre wertvolle Unterstützung bei der Weiterführung des Konzepts. Die Zusammenarbeit macht mir sehr viel Spaß. Frau Elsbeth Elwing hat mit ihrer fröhlichen Ruhe stets alle noch so aussichtslosen Terminprobleme bei der Herstellung gelöst. Auch allen anderen Mitarbeitern des Verlages, die mit ihrer Arbeit zum Gelingen der Bände beigetragen haben, sei gedankt. Besonders auch Michael Zepf, der alle meine technischen Anfragen immer rasch und zuverlässig beantwortet hat.

Besonders bedanke ich mich auch bei Frau Christiane von Solodkoff sowie bei Frau Henny Bernstädt-Neubert für die sehr persönliche Zusammenarbeit und die kreative und professionelle Umsetzung – zeitweilig im Dauereinsatz – der teilweise chaotischen Vorlagen in die nun hier vorliegenden, hervorragend gelungenen Abbildungen.

Reinhard Rachel (Regensburg), Andrea Maisner (Marburg), Ralf Wagner (Marburg), Peter Laun (Salzburg), Elizabeth Richardson (Athens, GA, USA), Marvin Karos (Marburg), Klaus Tenberge (Münster), Robert Bauer (Tübingen), Nadine Zekert (Karlsruhe), Nicole Sievers (Marburg), Janina Purschwitz (Karlsruhe), Saturnino Herrero de Vega (Karlsruhe), Hans Ulrich Moesch (Marburg), Meritxell Riquelme (Ensenada, Mexico), Norio Takeshita (Karlsruhe), Danuta Galetzka (Marburg), Daniel Veith (Karlsruhe), Monika Krüger (Leipzig), Gerhard Kost (Marburg), Rolf Rösser (Marburg), Paola Bonfante (Turin, Italien), Francis Martin (Lyon, Frankreich), Matthias Hahn (Kaiserslautern), Andreas Mosbach (Kaiserslautern), Stefanie Heupel (Karlsruhe), Manfred Rohde (Braunschweig), Mike Hasenberg (Braunschweig), Rolf Jaenchen (Zwingenberg) sowie Astrid Brandis-Heep (Marburg) danke ich für die zur Verfügung gestellten Originale und Erika Kothe (Jena) für die Ratschläge zu Kapitel 5. Einige fotografische Abbildungen wurden aus anderen Lehrbüchern des Thieme-Verlags übernommen. Für die freundliche Genehmigung und Überlassung bedanke ich mich ganz herzlich bei den jeweiligen Autoren und Urhebern.

Für die geniale Unterstützung im Hintergrund danke ich meiner Mutter, die für unser leibliches Wohlergehen sorgte, meiner Tochter, die mich daran erinnerte, dass auch die Familie interessant sein kann, meinen beiden Söhnen für die kompetente und permanente Computerbetreuung ohne jegliche Pannen und Abstürze und meinem Ehemann Matthias Munk für die vielen fachlichen Diskussionen und Ermutigungen.

Das hier vorliegende Werk ist eine Gemeinschaftsleistung aller an der Buchreihe beteiligten Autoren. Mit großem Einsatz haben sie nicht nur die eigenen Kapitel geschrieben, die anderen Kapitel korrigiert, sondern auch mit vielen konstruktiven Anregungen zu den Inhalten der anderen Bände fachübergreifende Zusammenhänge hergestellt. Wir hoffen, dass dadurch ein Gesamtwerk entstanden ist, dessen Lektüre Ihnen nicht nur gute Voraussetzungen für das Bestehen Ihrer Prüfungen vermittelt, sondern auch Ihre Begeisterung für das Fach Biologie weckt.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg in Ihrem Studium!

Dr. Katharina Munk
E-Mail: MunkReihe@web.de
August 2008

So arbeiten Sie effektiv mit der Taschenlehrbuch-Reihe

Die Bücher bieten Ihnen vielfältige didaktische Hilfen, sowohl für die Phase, in der Sie die Grundlagen erarbeiten, als auch für die schnelle und effiziente Stoffwiederholung kurz vor einer Ihrer Prüfungen.

Einführende Abschnitte geben Ihnen einen **ersten Überblick** und nehmen die wichtigsten Schlüsselbegriffe vorweg. Hier erhalten Sie den „Rahmen", in den Sie den folgenden Inhalt einordnen können.

Um Ihnen trotz der Stofffülle alle relevanten Inhalte im handlichen Taschenbuch-Format bieten zu können, sind die **Texte** möglichst **kurz gefasst**, aber dennoch **verständlich formuliert** – mit vielen **Hervorhebungen** für eine optimale Orientierung und einen raschen Informationszugriff.

Kleingedruckte Abschnitte mit zusätzlichen Details, Beispielen oder weiterführenden Informationen ermöglichen Ihnen einen „Blick über den Tellerrand".

Zahlreiche **farbige Abbildungen** und eindrucksvolle **mikroskopische** oder **elektronenmikroskopische Aufnahmen** helfen Ihnen, sich komplexe Sachverhalte zu erschließen.

In grün markierten Abschnitten finden Sie Informationen über **Anwendungsmöglichkeiten**, die sich aus den beschriebenen biologischen Prinzipien ergeben. ◀

Orange gekennzeichnete Abschnitte erläutern konkrete **Methoden**, die Sie entweder in Ihrer experimentellen Arbeit selbst beherrschen müssen, oder die für Anwendungen z.B. in großtechnischem Maßstab von Bedeutung sind. ◀

Repetitorien am Ende der Abschnitte greifen die wichtigsten neuen Begriffe nochmals auf. Sie sind ideal zum Lernen und zum Nachschlagen! Außerdem erfüllen sie die Funktion eines **Glossars**, da die Definitionen anhand der farbigen Seitenzahl im Sachverzeichnis leicht nachgeschlagen werden können.

Das **Zusatzangebot im Internet**: www.thieme.de/go/taschenlehrbuch-biologie

Anhand zahlreicher **Prüfungsfragen** zu jedem Kapitel und den ausführlichen Antworten können Sie Ihr Wissen selbst überprüfen.

Die Zahl der Internet-Seiten, die sich mit biologischen Themen befassen, ist groß und steigt stetig. Aus dem unübersichtlichen Angebot haben wir für Sie neben einer Auswahl der wichtigsten **weiterführenden Literatur** einige **Internet-Adressen** zusammengestellt, die Ihnen als nützlichen Einstieg für weiterführende Recherchen dienen sollen.

Wie bei einem Werk diesen Umfanges zu erwarten, ist auch diese Taschenlehrbuch-Reihe sicher nicht frei von Fehlern. Wir sind daher dankbar für Hinweise. Anregungen und Verbesserungsvorschläge können Sie uns jederzeit mailen.

Die uns bekannten **Korrekturen** werden wir auf der oben genannten Internetseite zusammenfassen und aktualisieren.

Adressen

Prof. Dr. Petra Dersch
Technische Universität
Braunschweig
Institut für Mikrobiologie
Spielmannstraße 7
38106 Braunschweig

Prof. Dr. Bernhard Eikmanns
Universität Ulm
Institut für Mikrobiologie
und Biotechnologie
89069 Ulm

Dr. Marcella Eikmanns
Ochsengasse 34
89077 Ulm

Prof. Dr. Reinhard Fischer
Universität Karlsruhe
Institut für Angewandte
Biowissenschaften
Abteilung für Angewandte
Mikrobiologie
Hertzstraße 16
76187 Karlsruhe

Prof. Dr. Dieter Jahn
Technische Universität
Braunschweig
Institut für Mikrobiologie
Spielmannstraße 7
38106 Braunschweig

Dr. Martina Jahn
Technische Universität
Braunschweig
Institut für Mikrobiologie
Spielmannstraße 7
38106 Braunschweig

Dr. Katharina Munk
Untere Beltz 12
65510 Idstein

Dr. Regina Nethe-Jaenchen
Bickenbacher Weg 9
64673 Zwingenberg

Prof. Dr. Natalie Requena
Universität Karlsruhe
Institut für Angewandte
Biowissenschaften
Abteilung für Pflanzen-
Mikroben-Interaktionen
Hertzstraße 16
76187 Karlsruhe

Dr. Beate Schultze
Kirchstraße 9
34519 Diemelsee

Inhaltsverzeichnis

1 **Die Welt der Mikroorganismen** 1
1.1 Winzlinge mit großem Anpassungsvermögen 1
1.2 Mikroorganismen in der Natur 5
1.3 Mikrobielle Besiedelung von Wirtsorganismen 8
1.4 Mikroorganismen im Dienst des Menschen 11

2 **Struktur und Funktion der Zellen von Mikroorganismen** 14
2.1 Die Zelle: Grundeinheit des Lebens 14
2.1.1 Zellgröße 16
2.1.2 Zellformen und Zellverbände 17
2.2 Die Endosymbiontentheorie 19
2.2.1 Endosymbiosen als flexibles Prinzip der Evolution 20
2.2.2 Die Entstehung der Organellen 21
2.3 Zellstrukturen 25
2.3.1 Zellmembranen 25
2.3.2 Zellhülle 30
2.3.3 Exopolymere 39
2.3.4 Bewegungsformen 42
2.3.5 Cytoskelett 51
2.3.6 Zelleinschlusskörper und ihre Funktion 52
2.4 Zelldifferenzierung 54
2.4.1 Dauerformen bei eukaryotischen Einzellern 55
2.4.2 Endosporen 56
2.4.3 Andere Dauerformen 58

3 **Systematik und Phylogenie** 59
3.1 Grundlagen 59
3.2 Methoden der Bakterientaxonomie 60
3.3 Das System der drei Urreiche 64
3.3.1 Sequenzanalysen und Phylogenie 64
3.3.2 Der neue Stammbaum des Lebens 67
3.4 Die Entwicklungslinien der Bacteria 70
3.4.1 Aquificae, Thermodesulfobacteria und Thermotogae 71
3.4.2 Chloroflexi: Schwefelfreie Grüne Bakterien 72
3.4.3 Chlorobi (Grüne Schwefelbakterien) 73
3.4.4 Deinococcus-Thermus 74
3.4.5 Spirochaetes 75

3.4.6 Bacteroidetes . . . 75
3.4.7 Chlamydiae . . . 76
3.4.8 Cyanobacteria . . . 77
3.4.9 Firmicutes . . . 78
3.4.10 Actinobacteria . . . 81
3.4.11 Proteobacteria . . . 83
3.4.12 Weitere Entwicklungslinien der Bacteria . . . 96
3.5 Die Entwicklungslinien der Archaea . . . 98
3.5.1 Crenarchaeota . . . 100
3.5.2 Euryarchaeota . . . 102
3.5.3 Weitere Entwicklungslinien der Archaea . . . 105

4 **Viren** . . . 106
4.1 Struktur- und Vermehrungsprinzipien der Viren . . . 106
4.2 Virale Genomtypen und Virusgruppen . . . 112
4.2.1 DNA-Viren . . . 114
4.2.2 RNA-Viren . . . 119
4.2.3 Retroviren . . . 123
4.2.4 Viroide und defekte Viren . . . 128
4.2.5 Prionen . . . 129
4.3 Strategien der Virusinfektion . . . 130
4.4 Methoden zum Nachweis von Viren . . . 134
4.4.1 Elektronenmikroskopische Nachweisverfahren . . . 134
4.4.2 Zellbiologische Nachweisverfahren . . . 135
4.4.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren . . . 137
4.4.4 Immunologische Nachweisverfahren . . . 138

5 **Pilze** . . . 140
5.1 Was sind Pilze? . . . 140
5.1.1 Das System der Pilze . . . 141
5.1.2 Der Aufbau der pilzlichen Zelle . . . 142
5.1.3 Stoffwechsel der Pilze . . . 147
5.1.4 Sekundärmetabolite . . . 147
5.2 Molekularbiologie mit Pilzen . . . 150
5.2.1 Mutation und Selektion . . . 150
5.2.2 Transformation mit Pilzen . . . 154
5.3 Alternative Wuchsformen: Hefe oder Hyphe? . . . 156
5.4 Sporenbildung . . . 161
5.4.1 Pilze können sehen – Lichtwahrnehmung . . . 165
5.4.2 Pilze haben eine innere Uhr . . . 169
5.4.3 Altersforschung bei Pilzen . . . 170

5.4.4 Sex ja – Inzucht nein: Die Wahl des richtigen Partners ... 171
5.4.5 Kommunikation über Pheromone ... 173
5.5 Pilze als Lebenspartner ... 177
5.5.1 Flechten ... 177
5.5.2 Die Mykorrhiza ... 180
5.6 Pathogene Pilze ... 183
5.7 Kuriositäten ... 187
5.7.1 „Schießende" Pilze ... 187
5.7.2 „Pilze" auf Wanderschaft ... 187
5.7.3 „Räuberische Pilze" ... 189

6 Mikrobielle Genetik ... 190
6.1 Das genetische System der Mikroorganismen ... 190
6.1.1 Struktur der DNA ... 190
6.1.2 Mikrobielle Genome ... 194
6.1.3 Mikrobielle Chromosomen ... 197
6.1.4 DNA-Replikation ... 201
6.1.5 Transkription ... 204
6.1.6 Translation ... 207
6.1.7 Proteinfaltung, Modifikation und Stabilität ... 211
6.2 Veränderungen der Erbsubstanz durch Mutationen ... 213
6.2.1 Mutationen und Mutanten ... 214
6.2.2 DNA-Reparatur-Mechanismen ... 227
6.3 Veränderungen der Erbsubstanz durch Rekombination 230
6.4 Biologie der Plasmide ... 233
6.4.1 Replikationsursprung, Kopienzahl und Kompatibilität ... 233
6.5 Transponierbare Elemente ... 238
6.6 Gentransfer ... 240
6.6.1 Transformation ... 240
6.6.2 Transduktion ... 244
6.6.3 Konjugation ... 247
6.6.4**!!** Einschränkung des Gentransfers durch Restriktion und Modifikation ... 254

7 Mikrobielles Wachstum ... 257
7.1 Wachstumsansprüche von Mikroorganismen ... 257
7.1.1 Makro- und Mikroelemente ... 257
7.1.2 Wachstumsfaktoren ... 260
7.1.3 Nährmedien ... 261
7.2 Wachstum und Vermehrung ... 262
7.2.1 Zellteilung bei Mikroorganismen ... 263

7.2.2 Wachstum bei Mikroorganismen 265
7.2.3 Messung des Wachstums 271
7.3 Sicherheit im Umgang mit Mikroorganismen 277
7.3.1 Sterilisation und Desinfektion 278
7.3.2 Sicherheit im Labor 281
7.4 Kultivierung von Mikroorganismen 285
7.4.1 Kultivierung im Labormaßstab 285
7.4.2 Kultivierung im industriellen Maßstab 289
7.4.3 Statische und kontinuierliche Kultur 290
7.4.4 Anreicherung von Mikroorganismen 294
7.4.5 Isolierung von Mikroorganismen 295
7.5 Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen 299
7.5.1 Mikroskopische Untersuchungen 299
7.5.2 Untersuchung von Stoffwechselprozessen 300
7.5.3 Molekularbiologische Untersuchungen 303

8 Der Energiestoffwechsel der Mikroorganismen 304
8.1 Grundprinzipien des Energiestoffwechsels 304
8.1.1 Energie- und Leistungsstoffwechsel und ihre Verknüpfung 304
8.1.2 Stoffwechselvielfalt der Mikroorganismen 306
8.2 Bioenergetische Grundlagen 309
8.2.1 Änderung der Freien Energie im Verlauf einer chemischen Reaktion 311
8.2.2 Redoxreaktionen und das Redoxpotential 314
8.2.3 Das elektrochemische Potential 316
8.3 Mechanismen der Energiekonservierung 319
8.3.1 Substratstufenphosphorylierung 320
8.3.2 Elektronentransportphosphorylierung 321
8.4 Phototrophie 333
8.4.1 Photosynthetische Pigmente 336
8.4.2 Antennensysteme und photosynthetische Membranen 338
8.4.3 Reaktionszentren der Photosysteme 340
8.4.4 Lichtgetriebener Elektronentransport mit einem Photosystem 340
8.4.5 Lichtgetriebener Elektronentransport mit zwei Photosystemen 343
8.4.6 Die lichtgetriebene Protonenpumpe der Haloarchaea 346
8.5 Chemoorganotrophie: I. Zentrale Abbauwege zur Oxidation organischer Verbindungen 349
8.5.1 Die Glykolyse: Der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg 350
8.5.2 Der Entner-Doudoroff-Weg 352

8.5.3 Der Phosphoketolase-Weg 355
8.5.4 Oxidation des Pyruvats 355
8.5.5 Der Citratzyklus 355
8.5.6 Die β-Oxidation der Fettsäuren 357
8.6 Chemoorganotrophie: II. Aerobe und anaerobe Atmung 359
8.6.1 Aerobe Atmung 361
8.6.2 Nitratatmung 364
8.6.3 Fumaratatmung 365
8.6.4 Sulfatatmung 366
8.6.5 Methanogenese 367
8.6.6 Acetogenese 371
8.7 Chemoorganotrophie: III. Gärung 374
8.7.1 Milchsäuregärung 376
8.7.2 Ethanolgärung 378
8.7.3 Gemischte Säuregärung 379
8.7.4 Propionsäuregärung 381
8.7.5 Buttersäuregärung und Lösungmittelgärung 383
8.7.6 Vergärung von Aminosäuren 385
8.7.7 Vergärung von Citrat 386
8.8 Chemolithotrophie 388
8.8.1 Nitrifikanten: Ammonium- und nitritoxidierende Bakterien 391
8.8.2 Sulfurikanten: Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen 391
8.8.3 Eisenoxidierende Bakterien 392
8.8.4 Wasserstoffoxidierende Bakterien 393
8.8.5 Kohlenmonoxidoxidierende Bakterien 393

9 Biosyntheseleistungen von Mikroorganismen 395
9.1 Stoffaufnahme und Transport 395
9.2 Das Netzwerk des Stoffwechsels 402
9.2.1 Anaplerotische Reaktionen 404
9.2.2 CO_2-Fixierung in Prokaryoten 408
9.3 Die Biosynthese von Monomeren in Mikroorganismen 414
9.3.1 Monosaccharide 415
9.3.2 Aminosäuren 417
9.3.3 Nucleotide 421
9.3.4 Fettsäuren 424
9.4 Die Synthese von Polymeren in Mikroorganismen 427
9.4.1 Polysaccharide 428
9.4.2 Lipide 429

9.4.3 Nucleinsäuren und Proteine 433
9.5 Die Synthese der bakteriellen Zellwand 435
9.5.1 Die Biosynthese des Peptidoglykans 435
9.5.2 Biosynthese archaebakterieller Zellwände 442

10 Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen 444
10.1 Grundlagen der Anpassung von Mikroorganismen an Veränderungen in ihrem Lebensraum 444
10.1.1 Organismus und Umwelt 444
10.1.2 Umweltreiz und molekulare Antwort 445
10.1.3 Regulatoren der Anpassung 447
10.1.4 Regulon, Modulon, Stimulon 449
10.2 Anpassung an Temperaturbedingungen 452
10.2.1 Anpassung an extreme Temperaturen 453
10.2.2 Hitzeschock-Antwort 455
10.2.3 Kälteschock-Antwort 457
10.3 Anpassung an pH-Bedingungen 458
10.3.1! Anpassung an Lebensräume mit extremen pH-Werten 460
10.3.2! Säure-Base-Schock-Antwort 461
10.4 Anpassung an osmotische Bedingungen 463
10.4.1 Wasseraktivität 463
10.4.2 Halophile Mikroorganismen 465
10.4.3 Anpassung an Standorte extremer Osmolarität 466
10.4.4 Osmoschock-Antwort 466
10.5 Anpassung an Sauerstoffpartialdruck und Sauerstoffstress 469
10.5.1 Sauerstoff und Energiegewinnung 469
10.5.2 Regulation des Energiestoffwechsels 470
10.5.3 Sauerstoffstress 472
10.5.4 Sauerstoffstress-Antwort 473
10.6 Stoffwechselsteuerung durch stringente Kontrolle, Attenuation, RNA-Schalter, Stationärphase und Katabolitenregulation 475
10.6.1 Stringente Kontrolle 476
10.6.2 Steuerung der Aminosäure- und Cofaktorenbiosynthese auf Ebene der RNA durch Attenuation und RNA-Schalter . . 478
10.6.3 Stationärphase und generelle Stressantwort 480
10.6.4 Regulation des Katabolismus 483
10.7 Regulation der Assimilation und Fixierung von Stickstoff 486
10.7.1 Regulation der Stickstoffassimilation 487
10.7.2 Kontrolle der Stickstofffixierung 489

10.8 Regulation der Phosphorassimilation 491
10.9 Regulation der Sporulation von *Bacillus subtilis* 493
10.9.1 Sporenbildung bei Bakterien 493
10.9.2 Molekulare Regulation der Sporenbildung in *B. subtilis* . . . 495

11 Einfluss von Mikroorganismen auf Natur und Mensch 498
11.1 Auf- und Abbau von Biomasse 498
11.1.1 Der Biomassekreislauf 498
11.1.2 Zusammensetzung und Depolymerisierung der Biomasse 500
11.2 Stoffkreisläufe 512
11.2.1 Kohlenstoffkreislauf 513
11.2.2 Stickstoffkreislauf 517
11.2.3 Schwefelkreislauf 524
11.2.4 Phosphorkreislauf 528
11.3 Mikrobielle Besiedelung des Menschen 529
11.3.1 Die Normalflora des Menschen 530
11.3.2 Pathogene Mikroorganismen 533
11.3.3 Übertragungswege 536
11.3.4 Infektionskrankheiten des Menschen 536
11.3.5 Infektionsschutz 545
11.3.6 Infektionstherapie 546

12 Mikrobielle Biotechnologie 549
12.1 Mikroorganismen und mikrobielle Enzyme im Dienste des Menschen 549
12.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung der mikrobiellen Biotechnologie 551
12.1.2 Der Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie . . 552
12.2 Lebensmittelherstellung und -veredelung 555
12.2.1 Fermentierte Lebensmittel 555
12.2.2 Alkoholische Getränke 556
12.2.3 Essig 557
12.3 Stoffproduktion mit Mikroorganismen 558
12.3.1 Ablauf biotechnologischer Produktionsverfahren 559
12.3.2 Biomasse als Produkt 561
12.3.3 Mikrobielle Produkte für Gesundheit und Ernährung 562
12.3.4 Mikrobielle Produkte für technische Zwecke 573
12.3.5 Mikrobielle Produktion von Enzymen 574
12.4 Stoffumwandlung mit Mikroorganismen und Enzymen 576
12.4.1 Biotransformationen 577
12.4.2 Stoffumwandlung mit mikrobiellen Enzymen 577

12.5 Umweltbiotechnologie 580
12.5.1 Abwasseraufbereitung 580
12.5.2 Abbau von Naturstoffen 583
12.5.3 Bodensanierung und Abbau von Xenobiotika 583
12.5.4 Mikrobielle Luftreinigung 584

13 **Anhang** 587
Bildquellen 587
Sachverzeichnis 589

1 Die Welt der Mikroorganismen

Regina Nethe-Jaenchen

1.1 Winzlinge mit großem Anpassungsvermögen

Mikroorganismen sind eine Gruppe sehr unterschiedlicher **kleiner** Organismen. Ihre Größe liegt zwischen 0,02 µm und 1 mm, morphologische Eigenschaften von Mikroorganismen werden daher immer mikroskopisch untersucht. Zu den Mikroorganismen gehören tierische Einzeller, Hefen, kleine Hyphenpilze, Algen, Bakterien und Viren. Aufgrund ihrer großen **Anpassungsfähigkeit** sind Mikroorganismen in der Lage, sich in allen Bereichen unserer Umwelt erfolgreich anzusiedeln.

Als Teilgebiet der Biologie befasst sich die Mikrobiologie mit den **Mikroorganismen**, einer heterogenen Gruppe von meist einzelligen Organismen, deren gemeinsames Merkmal ihre geringe Größe ist.

Mikroorganismen sind mit dem unbewaffneten Auge nicht zu erkennen und wurden deshalb erst entdeckt, nachdem die ersten, noch sehr primitiven Mikroskope durch **Robert Hooke** (1664) und einige Jahre später durch **Antonie van Leeuwenhoek** entwickelt worden waren (Abb. 1.**1**). Erst im 19. Jahrhundert entstand die Mikrobiologie als eigenständiges Fachgebiet: Nahezu zeitgleich erkannten Louis Pasteur Mikroorganismen als Ursache von Gärprozessen und Robert Koch Endosporen als Milzbranderreger. Später gelang Koch auch die Identifizierung der Erreger von Tuberkulose und Cholera. Seine Experimente zur Wundinfektion und die Arbeiten des Pathologen Jakob Henle

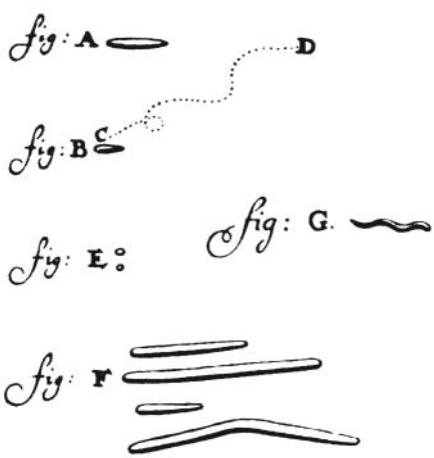


Abb. 1.**1** **Antonie van Leeuwenhoeks Zeichnungen der „kleinen Tierchen“.** Leeuwenhoek untersuchte 1684 mit seinem einfachen Mikroskop einen Wassertropfen und später auch andere Materialien, z. B. Zahnbelag. Er entdeckte winzige Organismen, die er detailliert beschrieb und zeichnete. Deutlich sind verschiedene Formen von Bakterien zu erkennen: gerade und gekrümmte Stäbchen (A, B, F), Spirillen (G) und Kokken (E). (C) bis (D) deutet offensichtlich eine beobachtete Bewegung an.

1

sind Grundlage der **Henle-Koch-Postulate**, nach denen ein Mikroorganismus als Verursacher einer Krankheit angesehen werden kann, wenn er sich nur im kranken Organismus nachweisen lässt, eine isolierte Reinkultur die typischen Krankheitssymptome auslöst und der Mikroorganismus anschließend erneut aus dem Kranken isoliert werden kann, ohne seine ursprünglichen Eigenschaften zu verlieren. Robert Koch gilt als Begründer der Bakteriologie und erhielt für seine Forschungsarbeiten im Jahre 1905 den Nobelpreis. In den folgenden Jahrzehnten wurden in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Mikrobiologie zahlreiche weitere Entdeckungen gemacht, die zum Verständnis molekularer und genetischer Zusammenhänge beitrugen. Viele dieser Forschungsergebnisse wurden mit einem Nobelpreis ausgezeichnet (Tab. 1.**1**).

Tab. 1.**1** **Historische Entwicklung der Mikrobiologie; Meilensteine der Forschung.**

Jahr	*Name*	*Entdeckung*	*Nobelpreis*
1684	Antonie van Leeuwenhoek	Bakterien	
1796	Edward Jenner	Pockenschutzimpfung	
1860	Louis Pasteur	alkoholische Gärung durch Hefen	
1882–84	Robert Koch	Erreger von Tuberkulose und Cholera	1905
1884	Christian Gram	Gramfärbung	
1897	Eduard Buchner	zellfreie Gärung	1907
1910	Francis Rous	Tumorviren	
1929	Alexander Fleming, Ernst B. Chain, Howard Florey	Penicillin	1945
1933	Gerhard Domagk	Sulfonamide	1939
1947	M. Delbrück, A. D. Hershey, S. E. Luria	Vermehrungsmechanismus und genetische Struktur von Viren	1969
1957	Barbara McClintock	mobile genetische Elemente	1983
1960	François Jacob, Jacques Monod	Modell des Operons	1965
1961	Peter Mitchell	chemiosmotische Theorie	1978
1977	Frederick Sanger	DNA-Sequenzierung	1980
1977	C. R. Woese, O. Kandler	Sonderstellung der Archaea, 3 Reiche	
1982	S. B. Prusiner	Prionen	1997
1983	Luc Montagnier, Robert Gallo	HIV (AIDS-Erreger)	
1985	J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel	Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodopseudomonas viridis*	1988
1985	K. B. Mullis	Polymerasekettenreaktion (PCR)	1993
1984	B. Marshall, R. Warren	*Helicobacter pylori* als Auslöser von Gastritis u. Magengeschwüren	2005

Durch die Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse zur **Phylogenie** von Mikroorganismen gewonnen werden (Kap. 3). Aufgrund dieser Daten wurde für die Entwicklung des Lebens ein Stammbaum erstellt, der aus einem eukaryotischen und zwei prokaryotischen Urreichen besteht. Zu den eukaryotischen Mikroorganismen gehören die **Protisten**, Einzeller, die sich entweder heterotroph wie Tiere oder autotroph wie Pflanzen ernähren, **Hefen** sowie einige mehrzellige kleine **Hyphenpilze**, z. B. Schimmelpilze (S. 141), zu den prokaryotischen Mikroorganismen **Bacteria** und **Archaea** (S. 70, S. 98). Eine eigenständige Gruppe bilden die **Viren**, die jedoch keine echten Lebewesen sind, da ihnen eine selbstständige Vermehrung und ein vollständiger Stoffwechsel fehlen (S. 106).

Die **Größe** der meisten Mikroorganismen liegt unter einem Millimeter, wobei der **Größenbereich** eine ähnlich große Spanne umfasst wie zwischen einer Fruchtfliege und einem Blauwal: Manche Amöben erreichen eine Größe von bis zu 1 mm, die kleinsten Viren haben nur einen Durchmesser von weniger als 0,02 µm (Abb. 1.**2**). Auch innerhalb der einzelnen Gruppen von Mikroorganismen gibt es erhebliche Größenunterschiede.

Drei Viertel der gesamten Biomasse auf der Erde werden von Mikroorganismen gebildet. Ein einziges Gramm Gartenerde enthält 10^7 bis 10^8 Bakterien, 500 000 Pilze und 80 000 Protisten. Dabei zeigen insbesondere die Bakterien eine große **Vielfalt** von Lebensweisen, sodass sie nahezu jede ökologische Nische besiedeln. Jede Bakterienzelle ist ein selbstständiger Organismus, der sich durch einfache **Zweiteilung** vermehrt, dabei entstehen aus einer Zelle in der Regel zwei identische Tochterzellen (S. 263). Im Vergleich zu den größeren eukaryotischen Zellen ist das Oberflächen/Volumen-Verhältnis einer Bakterienzelle sehr groß (S. 16), sodass sowohl die Aufnahme von Nährstoffen, als auch die Ausscheidung von Abfallprodukten sichergestellt ist. Bei ausreichender Nährstoffversorgung teilt sich eine Bakterienzelle wie *Escherichia coli* alle 20 Minuten, sodass in kürzester Zeit eine riesige Population heranwächst und eine **rasche Vermehrung** ihrer Biomasse (S. 269) erfolgt. Die häufigen Replikationszyklen mit den dabei auftretenden Mutationen ermöglichen eine schnelle **physiologische Anpassung** an neue Umweltbedingungen und Lebensräume: Die Atmosphäre ist bis zu einem Kilometer Höhe reich an Bakteriensporen; marine Mikroben findet man noch in Tiefen von 10 km unter dem Meeresspiegel; auch auf und in tierischen und pflanzlichen Wirtsorganismen leben zahlreiche Bakterienarten. Selbst in scheinbar lebensfeindlichen Umgebungen existieren Mikroorganismen. Marine Bakterien zeigen eine besonders hohe **Salztoleranz**, einige sind sogar abhängig von bestimmten Salzkonzentrationen. Die in den Tiefen des Pazifischen Grabens lebenden Bakterien wachsen bei einem **Druck** von 500 bis 1000 bar (entspricht 500 000 bis 1 000 000 hPa) und **Temperaturen** von nur 4 bis 10 °C. In heißen **Schwefelquellen**, die häufig auch ein stark saures Milieu aufweisen, leben zahlreiche Bakterienarten bei Temperaturen von teilweise weit über 90 °C, und auch aus alkalischen **Sodaseen**, z. B. in Ägypten, sind Bakterien isoliert worden. Diese

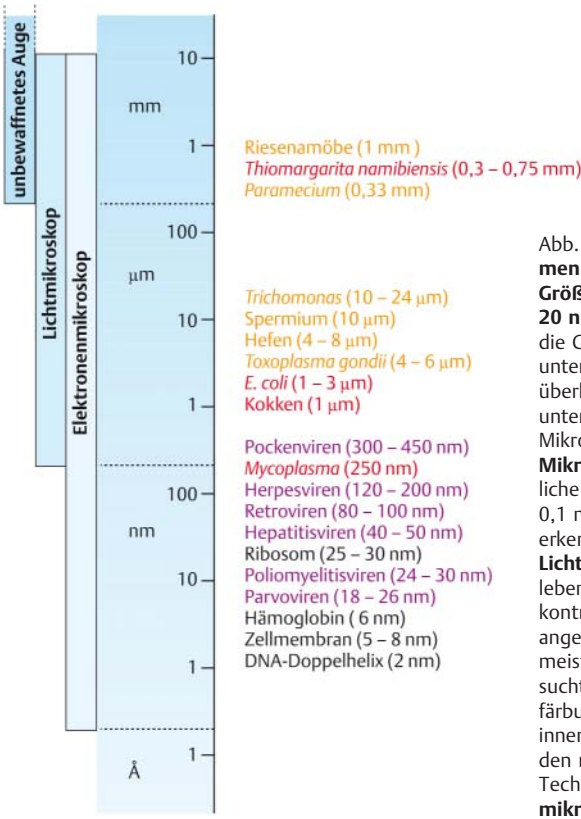


Abb. 1.2 **Mikroorganismen umfassen einen Größenbereich von unter 20 nm bis zu 1 mm**, wobei die Größenbereiche der unterschiedlichen Gruppen überlappen. Üblicherweise untersucht man einzelne Mikroorganismen unter dem **Mikroskop**, da das menschliche Auge Objekte unter 0,1 mm Größe nicht mehr erkennen kann. Unter dem **Lichtmikroskop** lassen sich lebende Zellen im Phasenkontrast beobachten, angefärbte Zellen werden meist im Hellfeld untersucht, z. B. bei der Gramfärbung (S. 33). Äußere und innere Zellstrukturen werden mithilfe verschiedener Techniken im **Elektronenmikroskop** sichtbar gemacht.

außerordentlich unterschiedlichen Lebensräume erfordern von den Mikroorganismen spezielle **Anpassungsmechanismen** auf genetischer und physiologischer Ebene (Kap. 10).

Während Menschen und Tiere zur Erhaltung ihrer Lebensfunktionen essentiell auf **Sauerstoff** angewiesen sind, findet man unter den Mikroorganismen neben **aeroben** auch **anaerobe** Arten. Einige Bakterienarten, z. B. *E. coli,* sind **fakultativ**, sie können als Anpassung an Änderungen der Sauerstoffkonzentration ihren Energiestoffwechsel von aerob auf anaerob umschalten. **Phototrophe** Mikroorganismen nutzen wie Pflanzen das Sonnenlicht als Energiequelle, **chemotrophe** verwenden chemische Energiesubstrate (S. 307). Als Kohlenstoffquelle verwenden Mikroorganismen sowohl $\mathbf{CO_2}$ als auch eine Vielzahl von organischen Verbindungen (S. 308).

Die wachsenden Erkenntnisse über die Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen an die unterschiedlichsten Standorte ermöglichen neben den traditionellen Nutzungsbereichen auch völlig neue **Anwendungen** der vielfältigen mikrobiellen **Stoffwechselleistungen** (Kap. 12).

Mikroorganismen: Organismen, deren Größe unter einem Millimeter liegt.
- **Eukaryoten:** Hefen (4–8 µm), tierische Einzeller (200–500 µm, manche Amöben bis 1 mm), einzellige Algen.
- **Prokaryoten:** Bacteria und Archaea (0,2–5 µm), wegen ihrer großen Anpassungsfähigkeit besiedeln Bakterien alle Bereiche unserer Umwelt.
- **Viren:** 0,02–0,45 µm.

1.2 Mikroorganismen in der Natur

Anaerobe Mikroorganismen sind die **ältesten Lebensformen** auf der Erde; Voraussetzung für die Entwicklung aller Sauerstoff abhängigen Organismen war die **Sauerstoffproduktion** durch photosynthetische Bakterien. An den **Stoffkreisläufen** der biologisch wichtigen Elemente Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff, Schwefel und Phosphor sind Mikroorganismen entscheidend beteiligt. Dabei werden die verschiedenen Oxidationsstufen von jeweils spezialisierten Bakterien als Elektronendonor oder Elektronenakzeptor verwendet.

Das Alter der Erde wird auf etwa 4,6 Milliarden Jahre geschätzt. Die Zusammensetzung von 3,8 Milliarden Jahre alten Sedimentsgesteinen in Grönland spricht dafür, dass bereits zu diesem Zeitpunkt flüssiges Wasser auf der Erde vorhanden war, eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen für die Entstehung von Leben (📖 *Ökologie, Evolution*). Tatsächlich wurden in ca. 3,6 Milliarden Jahre alten Felsen **Mikrofossilien** gefunden, die heutigen filamentösen Bakterien ähneln. Da die Atmosphäre zu diesem frühen Zeitpunkt nahezu keinen Sauerstoff enthielt, stammen die Ablagerungen in den ältesten Felsen vermutlich von **anoxygenen** photosynthetischen Bakterien wie Purpurbakterien und Grünen Bakterien (S. 72, S. 83). In Ablagerungen, die vor zwei Milliarden Jahren oder später entstanden, findet man zunehmend auch Spuren von Cyanobakterien, durch deren Photosynthese im Verlauf von 1,5 Milliarden Jahren die heutige Sauerstoffkonzentration der Erdatmosphäre erreicht wurde. Als Produzenten von Biomasse und allmählich ansteigenden Mengen verfügbaren Sauerstoffs waren Cyanobakterien daher die Wegbereiter für die Entwicklung aller Sauerstoff abhängigen heutigen Lebewesen.

Nach einem von starken Veränderungen geprägten Zeitraum von etwa 2,5 Milliarden Jahren ist die Zusammensetzung unserer Biosphäre seit ca. 1 Milliarde Jahren annähernd konstant (Abb. 1.**3**). Dabei sind die biologisch wichtigen Ele-

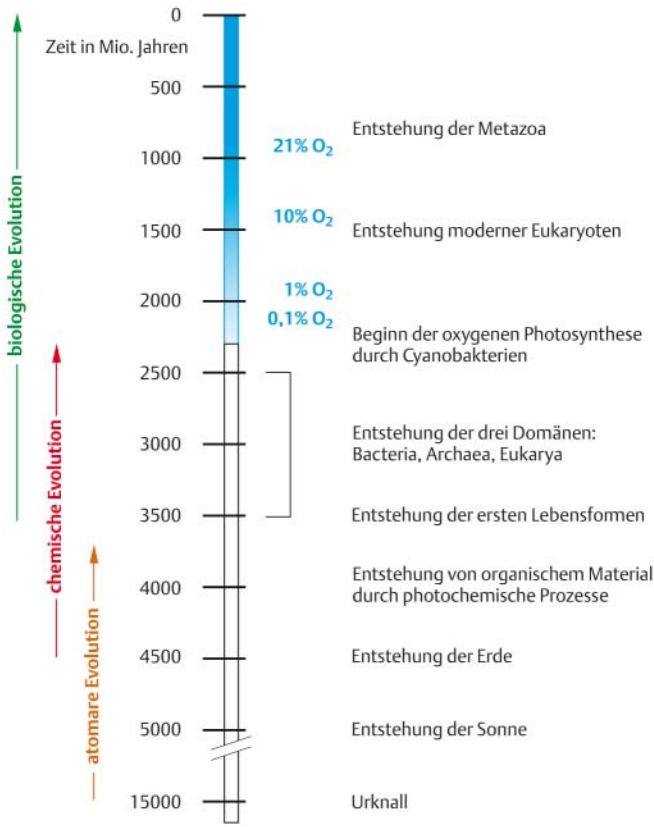


Abb. 1.3 **Die chemische und biologische Evolution der Erde.** Nach der Entstehung der Erde vor etwa 4,6 Milliarden Jahren entstanden durch photochemische Prozesse allmählich organische Verbindungen, aus denen sich vor ca. 3,6 Milliarden Jahren erste Lebensformen entwickelten. Mit dem Beginn der oxygenen Photosynthese durch Cyanobakterien stieg der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre stetig an bis auf den heutigen Wert von 21 %. Erst nach dem Erreichen dieser O_2-Konzentration begann die Evolution der vielzelligen Metazoa, die relativ schnell eine enorme Artenvielfalt entwickelten.

mente Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor in **Stoffkreisläufe** eingebunden, die vor allem auf der Aktivität von Lebewesen beruhen (S. 512).

Im **Kohlenstoffkreislauf** fixieren Pflanzen und viele Bakterienarten atmosphärisches **CO_2** und liefern so **organische Verbindungen** für den Energie- und Baustoffwechsel von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen. Durch die **aerobe**

Atmung sowie die **Gärprozesse** der Anaerobier werden die organischen Verbindungen wieder zu CO_2 oxidiert und der Atmosphäre zugeführt. Ebenfalls am Kohlenstoffkreislauf beteiligt sind anaerobe Bakterien, die Methan (**CH_4**) erzeugen, und aerobe Bakterien, die dieses Methan wieder zu CO_2 oxidieren. Insbesondere für die höheren Organismen ist der Kohlenstoffkreislauf eng mit dem **Sauerstoffkreislauf** verknüpft.

Ausgangspunkt des **Stickstoffkreislaufs** ist der in der Atmosphäre vorhandene elementare Stickstoff (**N_2**). Weder Pflanzen noch Tiere sind in der Lage, Stickstoff in dieser Form für die Synthese ihrer Proteine und Nucleinsäuren zu nutzen. **Stickstofffixierende** Bodenbakterien, einige von ihnen in Assoziation mit höheren Pflanzen, erzeugen Ammonium (**NH_4^+**), das dann von Pflanzen und Tieren in organische Verbindungen eingebaut wird. **Nitrifizierende** Bakterien setzen NH_4^+ zu Nitrit (**NO_2^-**) und weiter zu Nitrat (**NO_3^-**) um, das von Pflanzen als bevorzugte Stickstoffquelle genutzt und von **denitrifizierenden** Bakterien zu N_2 umgesetzt und dann wieder in die Atmosphäre abgegeben wird. Der in Proteinen und Nucleinsäuren organisch gebundene Stickstoff wird durch **Fäulnisbakterien** zu Ammonium abgebaut.

Schwefelhaltige Verbindungen werden von zahlreichen Bakteriengruppen in ihrem Stoffwechsel verwendet, wobei die unterschiedlichen Oxidationsstufen von jeweils spezialisierten Bakterien genutzt werden. Auf diese Weise wird der **Schwefelkreislauf** ausschließlich durch Prokaryoten aufrechterhalten, während viele Eukaryoten für die Deckung ihres Schwefelbedarfs auf die Stoffwechselleistungen von Bakterien angewiesen sind.

Am **Phosphorkreislauf** nehmen neben Tieren und Pflanzen auch Schimmelpilze und bestimmte Bakterienarten teil. Dabei sind Mikroorganismen sowohl an der Mobilisierung des anorganisch gebundenen Phosphats beteiligt, das dann in organische Verbindungen wie Nucleotide und Phospholipide eingebaut wird, als auch an der Mineralisierung von organischen Phosphorverbindungen.

Mikroorganismen in der Natur: Mikroorganismen sind die ältesten Lebensformen auf der Erde und an allen biologisch wichtigen Stoffkreisläufen beteiligt. Erst die Sauerstoffproduktion durch Cyanobakterien schuf die Bedingungen für die Entstehung Sauerstoff abhängiger Organismen.

1

1.3 Mikrobielle Besiedelung von Wirtsorganismen

Die **Normalflora** von gesunden Menschen und Tieren besteht aus vielen unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen, die für ihre Wirte in der Regel unschädlich oder sogar nützlich sind. Als Verursacher von **Infektionskrankheiten** sind pathogene Mikroorganismen auch heute noch für ein Drittel der weltweit auftretenden Todesfälle verantwortlich. Klassische Infektionskrankheiten wie Tuberkulose treten in den letzten Jahren auch in hoch entwickelten Industrieländern wieder häufiger auf, wobei **Antibiotikaresistenzen** die Therapie zunehmend erschweren. Neben den klassischen Viruskrankheiten wie Masern oder Röteln gewinnen zunehmend neue humanpathogene Viren, z. B. HIV oder verschiedene hämorrhagische Viren, sowie Prionen als völlig neuartige Krankheitserreger an Bedeutung. In Deutschland regelt das **Infektionsschutzgesetz** alle gesetzlichen Maßnahmen zum Gesundheitsschutz der Bevölkerung.

Zahlreiche Mikroorganismen leben als Mitglieder der **Normalflora** von gesunden Menschen und Tieren in enger Gemeinschaft mit ihren Wirten. Sie besiedeln als natürlicher **Schutz** sämtliche Körperoberflächen wie Haut oder Schleimhäute oder erfüllen Aufgaben im Verdauungstrakt: Beispielsweise synthetisieren bestimmte Darmbakterien lebenswichtige **Vitamine** oder wirken bei der **Verdauung** mit. Unter bestimmten Bedingungen, z. B. bei immungeschwächten Menschen, können Mitglieder der Normalflora Krankheiten auslösen, normalerweise werden **Infektionskrankheiten** jedoch von **pathogenen Mikroorganismen** verursacht, die aus der Umwelt aufgenommen werden und sich dann im Wirtsorganismus vermehren**.** Dabei werden die Krankheitserreger in den meisten Fällen durch ihre Wirte direkt oder indirekt weiter verbreitet. Obwohl die Infektionskrankheiten durch erfolgreiche Impfkampagnen und neue Therapiemöglichkeiten in den Jahrzehnten nach dem 2. Weltkrieg bereits besiegt schienen, hat die Bedrohung durch alte und neue Seuchen in den letzten Jahren wieder deutlich zugenommen. Noch immer sind Infektionskrankheiten weltweit die häufigste Todesursache, ein Drittel der jährlichen Todesfälle entfällt auf akute Atemwegsinfekte, Durchfallerkrankungen, Tuberkulose, Malaria, Hepatitis B oder AIDS. Besonders betroffen sind Kinder in Entwicklungsländern, wo nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) jährlich neun Millionen Kinder unter fünf Jahren an Infektionskrankheiten sterben. Etwa ein Viertel dieser Todesfälle könnte durch entsprechende Impfmaßnahmen vermieden werden. Doch auch in hoch entwickelten westlichen Ländern mit guter medizinischer Versorgung ist eine Rückkehr schon fast vergessener Krankheiten wie **Tuberkulose** oder **Diphtherie** festzustellen. Zusätzlich wird die Ausbreitung durch menschliche Einflüsse begünstigt, insbesondere durch die hohe Mobilität.

Werden heute Erreger wie **SARS** durch Flugreisen verbreitet, so trug in früheren Jahrhunderten vor allem die Schifffahrt zur **Verbreitung** von Seuchen bei. **Pocken** und **Masern** wurden von den Truppen der spanischen Eroberer in fremde Länder eingeschleppt; die bis dahin in Europa unbekannte **Syphilis** brachten die Entdecker Amerikas bei ihrer Rückkehr nach Spanien mit. Eine der größten **Pest**epidemien fand im 14. Jahrhundert statt, dabei erfolgte die Ausbreitung der Pest von Zentralasien aus über die Seidenstraße, einem damals bedeutenden Handelsweg. 1347 erreichte die Pest die Stadt Caffa am Schwarzen Meer (heute Feodossija) und von da aus mit Schiffen Konstantinopel, Kairo und Messina. Im folgenden Jahr waren weitere Küstenstädte und ihr Umland rund ums Mittelmeer betroffen, über Italien und küstennahe Gebiete Frankreichs erfolgte in den Jahren 1348 bis 1350 die weitere Verbreitung landeinwärts bis zur Atlantik- und Nordseeküste. Von dort gelang dem Pesterreger per Schiff der Sprung nach Großbritannien und Skandinavien. Bevor die Epidemie 1352 nach fünf Jahren zu Ende ging, breitete sie sich weit ins Landesinnere Russlands aus und näherte sich damit wieder ihrem Ausgangsgebiet. Allein in Europa forderte diese Pestepidemie über 20 Millionen Tote, das entsprach etwa einem Viertel der damaligen Bevölkerung. Bis heute gibt es weltweit zahlreiche Pestherde, von denen immer wieder kleinere lokale Epidemien ausgehen (Abb. 1.**4**).

Auch als **Biowaffen** wurden Pestbakterien schon im Mittelalter eingesetzt, heute werden sie von der WHO zusammen mit anderen pathogenen Bakterien (z. B. Milzbrand oder Q-Fieber), Viren (z. B. hämorrhagische Viren oder Pocken) und einigen Toxinen (z. B. Botulinustoxin oder Ricin) zu den zwölf gefährlichsten biologischen Kampfstoffen gezählt („Dreckiges Dutzend" der B-Waffen). In den 1940er Jahren setzte die japanische

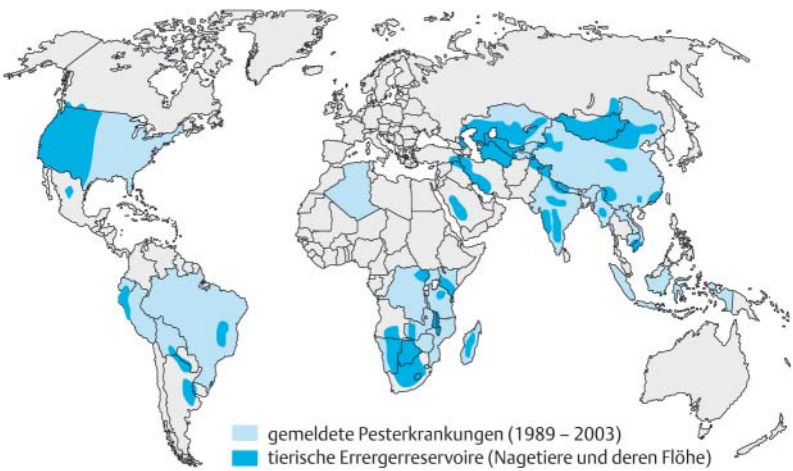


Abb. 1.**4** **Gemeldete Pesterkrankungen und tierische Erregerreservoire zwischen 1989 und 2003 (nach Angaben der WHO).** In den betroffenen Gebieten existiert eine Wildnagerpopulation, in der der Pesterreger sich dauerhaft etablieren kann. Bei Kontakten zwischen Wildnagern und Hausratten kommt es zur Übertragung des Erregers und nachfolgend auch zu lokalen Pestepidemien in der menschlichen Population. Als Vehikel für den Pesterreger fungieren in beiden Fällen infizierte Rattenflöhe, daher spielt der soziale und hygienische Standard einer Bevölkerung für die Ausbreitung eine entscheidende Rolle.

1

Armee infizierte Pestflöhe gegen China ein und verursachte so mehrere lokale Pestausbrüche. Nach dem Krieg kam es bei der Demontage der Produktionsanlagen zur versehentlichen Freisetzung von Pesterregern, die eine Epidemie mit mehr als 20 000 Toten auslöste. Während des Kalten Krieges wurden in der Sowjetunion erfolgreich Biowaffen entwickelt, die Pestbakterien als Aerosol versprühen sollten. Im Zuge wachsender weltweiter Spannungen und der Bedrohung durch terroristische Gruppen wird die Gefahr eines Einsatzes von biologischen Kampfstoffen zunehmend wieder als Risiko angesehen. Ein Planspiel der Gesundheitsbehörden in Denver, Colorado im Mai 2001 offenbarte erschreckende Defizite bezüglich der Verfügbarkeit von entsprechend ausgebildetem medizinischem Personal und notwendiger Antibiotika bei der angenommenen Ausbringung eines Aerosols aus Pestbakterien im Stadtzentrum. Eine Verbesserung der Ausbildung von Ärzten und Pflegepersonal, die Ausarbeitung spezieller Notfallpläne für Mitarbeiter des Zivil- und Katastrophenschutzes sowie Entwicklung und Bevorratung von Impfstoffen und Medikamenten sind daher erforderlich, um auf einen Anschlag mit Biowaffen reagieren zu können.

Der weltweite Handel trägt ebenfalls zur Verbreitung von Seuchen bei, beispielsweise von BSE durch den Export von infiziertem Tierfutter. Der BSE-Erreger gehört zu den **Prionen**, die lange als „unkonventionelle Viren" angesehen wurden. Erst Anfang der 1980er Jahre wurden sie als Proteine identifiziert, die bei Menschen und Tieren verschiedene degenerative Erkrankungen des Gehirns verursachen (S. 129).

1985 gelangten mit Dengueviren infizierte Tigermoskitos in Autoreifen, die Wasserlachen enthielten, von Asien in den Süden der USA, von wo sich das **Denguefieber** inzwischen über 17 Bundesstaaten ausgebreitet hat. Auch Bewässerungsprojekte können die Ausbreitung eines Krankheitserregers fördern: In Ägypten wurde durch den Bau des Assuan-Staudammes der Lebensraum von Süßwasserschnecken erweitert, die dem parasitischen Wurm *Schistosoma*, dem Erreger der **Bilharziose**, als Zwischenwirt dienen.

Durch die Erschließung bisher unbesiedelter Gebiete kommt der Mensch zunehmend mit Erregern in Kontakt, die an menschliche Wirte nicht angepasst sind und daher meist sehr schwerwiegend verlaufende Krankheiten mit hoher Letalität auslösen, z. B. die wiederholten Ausbrüche von hämorrhagischen Fiebererkrankungen in Afrika durch das Ebola-Virus und andere Viren.

Mangelnde Lebensmittelhygiene führt immer wieder zu Infektionen mit **Salmonellen** oder pathogenen *Escherichia-coli*-Stämmen wie **e**ntero**t**oxischen (**ETEC**) oder **e**ntero**h**ämorrhagischen ***E. coli*** (**EHEC**), die insbesondere bei älteren oder geschwächten Patienten tödlich verlaufen können.

Auch Impfstoffe und Antibiotika sind nicht ohne Risiko. Direkt aus menschlichem oder tierischem Material gewonnene Impfseren oder andere Blutprodukte sind gelegentlich mit unbekannten Viren kontaminiert, beispielsweise wurden in den 1980er Jahren zahlreiche Bluter durch verseuchte Gerinnungspräparate mit **HIV** infiziert. Die zunehmende Entstehung von **Antibiotikaresistenzen** erschwert die erfolgreiche Bekämpfung von bakteriellen Infektionskrankheiten, wobei der allzu sorglose Umgang mit diesen „Wunderwaffen" in der Human- und Veterinärmedizin zur Entstehung dieses Problems beigetragen hat. Für die nationale und internationale Gesundheitspolitik resultiert die Notwendigkeit, der Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten wieder mehr Aufmerksamkeit zu schenken. Eine entscheidende Rolle kommt dabei

der Versorgung mit sauberem Trinkwasser zu. Jährlich sterben weltweit vier Millionen Kinder an Krankheiten, die durch unsauberes Wasser verbreitet werden. Entsprechende Projekte im Rahmen der Entwicklungshilfe sollen eine bessere Trinkwasserversorgung gewährleisten. Von großem Interesse sind auch die Ausbreitungsmechanismen der Erreger sowie ihre speziellen Anpassungen an die Lebensbedingungen ihrer Wirtsorganismen und Überträger. Neben der Finanzierung von Forschungs- und Therapieeinrichtungen sind die Schaffung gesetzlicher Grundlagen und das Verständnis für die Zusammenhänge zwischen menschlichem Verhalten und Infektionskrankheiten für die Optimierung der Seuchenbekämpfungsmaßnahmen notwendig. Das deutsche **Infektionsschutzgesetz**, das 2001 an die Stelle des alten Bundesseuchengesetzes trat, regelt die Erforschung von übertragbaren Krankheiten, Identifizierung und Bekämpfung von sowie den Umgang mit Krankheitserregern, die Krankheitsprophylaxe und den Informationsaustausch auf nationaler und internationale Ebene (S. 545).

Normalflora: Besteht im gesunden Organismus aus zahlreichen Arten von Mikroorganismen, die für ihre Wirte wichtige Funktionen erfüllen (z. B. Schutz, Vitaminproduktion, Verdauung).
Pathogene Mikroorganismen: Verursacher von klassischen und neuen Infektionskrankheiten, verantwortlich für ein Drittel der Todesfälle weltweit.

1.4 Mikroorganismen im Dienst des Menschen

Schon seit Jahrtausenden nutzt der Mensch mikrobielle Stoffwechselleistungen. Heute hat sich daraus der zukunftsträchtige Industriezweig der **Biotechnologie** mit einer breiten Palette von Anwendungsmöglichkeiten entwickelt: Neben traditionellen **Nahrungs-** und **Genussmitteln** werden viele Zusatzstoffe für die Lebensmittelindustrie mithilfe von Mikroorganismen produziert. Bei der industriellen Herstellung von Vitaminen und Steroiden führen Bakterien spezielle Syntheseschritte durch. Zahlreiche **Medizinprodukte** werden mithilfe von z. T. transgenen Mikroorganismen hergestellt, beispielsweise Antibiotika, Impfstoffe oder Insulin. Auch für technische Anwendungen werden zunehmend mikrobielle **Enzyme** eingesetzt, die meist aus transgenen Bakterien stammen. In **Kläranlagen** bauen verschiedene Gemeinschaften von Mikroorganismen aerob und anaerob organische Rückstände im Abwasser ab. Bei der **Bodensanierung** kommen auf den Abbau komplexer oder aromatischer Verbindungen spezialisierte Bakterien zum Einsatz. Bei der **mikrobiellen Laugung** werden unlösliche Metallverbindungen durch Bakterien in lösliche überführt, aus denen dann das Metall gewonnen wird.

1

Zahlreiche industrielle Herstellungsverfahren nutzen die Fähigkeiten von Mikroorganismen (S. 559). Dabei werden entweder ganze Zellen für den gesamten Produktionsprozess verwendet oder nur bestimmte Biosyntheseleistungen von Mikroorganismen durchgeführt (Abb. 1.**5**). Voraussetzung für die Entwicklung der **Biotechnologie** sind Kenntnisse über Eigenschaften, Wachstumsbedürfnisse und Stoffwechselprozesse verschiedener Mikroorganismen und technische Fortschritte bei der Züchtung und Handhabung großer Mengen von Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen sowie bei der anschließenden Reinigung des gewünschten Endproduktes (S. 560). Der Einsatz gentechnischer Methoden (📖*Genetik*) bei einigen Herstellungsverfahren hat das Spektrum der Möglichkeiten um neue Anwendungsbereiche erweitert. Die wirtschaftliche Bedeutung der Biotechnologie ist in den vergangenen 20 Jahren stark gewachsen, die Umsätze der europäischen Biotechnologieindustrie stiegen allein im Jahr 2002 um 39 % auf 21,5 Milliarden Euro. Insbesondere im Pharmabereich haben sich inzwischen zahlreiche gentechnisch hergestellte Produkte erfolgreich auf dem Markt etabliert, beispielsweise erzielten 2002 in Deutschland 104 Unternehmen im Bereich der biotechnologischen Diagnostik einen Umsatz von 625 Millionen Euro.

Der biotechnologische Bereich mit der längsten Tradition ist die Konservierung von Lebensmitteln durch Milchsäurebakterien und die Herstellung von Bier und Wein mithilfe von fermentierenden Hefen, die schon vor Jahrtausenden in Ägypten üblich war. Heute werden dazu speziell optimierte Stämme verwendet, die eine möglichst hohe Ausbeute und gleich bleibende Qualität garantieren. Sie werden in der industriellen Großproduktion eingesetzt, einige auch in Privathaushalten, z. B. Backhefe oder Joghurt-Starterkulturen. Von Mikroorganismen

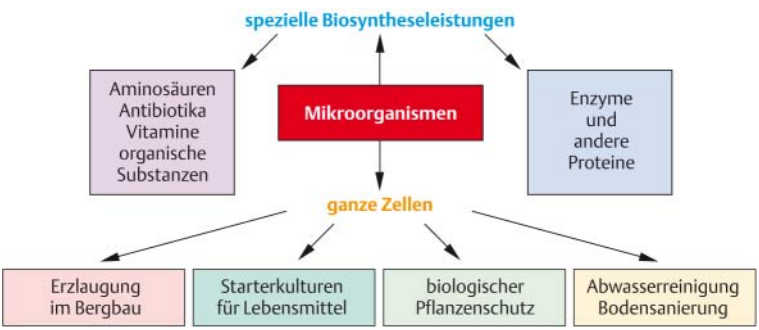


Abb. 1.**5** **Mikroorganismen in der Biotechnologie.** Mikroorganismen werden als ganze Zellen für unterschiedliche industrielle Prozesse im Bergbau, in der Lebensmittelherstellung, im Pflanzen- und Umweltschutz eingesetzt, oder spezielle Syntheseleistungen bzw. Enzyme werden bei der Herstellung verschiedener niedermolekularer und hochmolekularer Substanzen genutzt.

produzierte **Polysaccharide** und **Aminosäuren** werden als Zusatzstoffe in der Lebensmittel- und Tierfutterindustrie verwendet.

Die bekanntesten medizinischen Produkte, die ganz oder teilweise von Mikroorganismen produziert werden, sind die **Antibiotika**, die von Schimmelpilzen, z. B. *Penicillium chrysogenum*, und verschiedenen Bakterienarten wie *Bacillus*- oder *Streptomyces*-Stämmen ausgeschieden werden. Bei der Herstellung von **Steroiden** und **Vitaminen** werden meist nur wenige spezifische Schritte in der Synthesekette von Bakterien durchgeführt, während die übrige Synthese aus ökonomischen Gründen chemisch erfolgt. Die Therapie des Diabetes mellitus erfordert eine regelmäßige Zufuhr des Pankreashormons **Insulin**, das noch bis vor wenigen Jahren aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen oder Rindern gewonnen wurde. Inzwischen wird vorwiegend von gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestelltes Humaninsulin eingesetzt. Auch verschiedene Impfstoffe werden mithilfe transgener Mikroorganismen hergestellt.

In jüngster Zeit hat vor allem die technische Anwendung von Mikroorganismen stark zugenommen, z. B. enthalten Waschmittel Proteasen und Lipasen zur Fleckenentfernung bei niedrigen Temperaturen, Pektinase wird zur Fruchtsaftherstellung verwendet. Viele **Enzyme** für industrielle Verarbeitungsprozesse oder Produkte stammen aus transgenen Mikroorganismen. Auch für **Abwasserreinigung** und **Bodensanierung** werden die Fähigkeiten von Mikroorganismen genutzt. Die biologische Stufe einer modernen **Kläranlage** besteht aus einer Gemeinschaft von aeroben Mikroorganismen, die organische Verunreinigungen im Wasser abbauen. Festere Bestandteile des eingeleiteten Schmutzwassers werden mechanisch abgetrennt und im Faulturm von anaeroben Bakterien zersetzt. Das dabei entstehende Methangas kann als Energieträger genutzt werden. Bei der biologischen Bodensanierung, z. B. von ehemaligen Fabrikgeländen oder Tankstellenanlagen, werden toxische oder komplexe, z. B. aromatische, Verbindungen von speziellen Bakterien zu ungiftigen Produkten abgebaut. Für die **mikrobielle Laugung** werden *Acidithiobacillus*-Stämme verwendet, die in ihrem Energiestoffwechsel Erze oder Mineralien oxidieren und die enthaltenen Metalle dabei in wasserlösliche Formen überführen, die dann durch chemische Behandlung in die reine Metallform umgewandelt werden. Besonders beim Abbau von Kupfererzen ist diese Methode bereits erfolgreich angewendet worden.

Biotechnologische Nutzung von Mikroorganismen:
- Herstellung verschiedener Nahrungs- und Genussmittel, Lebensmittelzusatzstoffe und Medizinprodukte mithilfe von z. T. transgenen Mikroorganismen.
- Einsatz von isolierten mikrobiellen Enzymen für Produktionsprozesse und als Produktzusätze.
- Reinigung von Abwasser und kontaminierten Böden durch Gemeinschaften von spezialisierten Mikroorganismen.
- Überführung von unlöslichen Metallerzen in lösliche Formen durch mikrobielle Laugung.

2 Struktur und Funktion der Zellen von Mikroorganismen

Regina Nethe-Jaenchen, Marcella Eikmanns (2.3.2 und 2.3.3)

2.1 Die Zelle: Grundeinheit des Lebens

Als kleinste sich selbstständig vermehrende Lebenseinheit ist die **Zelle** Baustein aller Lebewesen. Der Zellinnenraum wird von der Cytoplasmamembran begrenzt, über die ein Stoff- und Informationsaustausch mit der Umgebung stattfindet. Im Zellinneren laufen zahlreiche Stoffwechselprozesse ab. Prokaryotische und eukaryotische Zellen unterscheiden sich in ihrer Struktur und Organisation. **Eukaryoten** haben einen echten Zellkern, Zellorganellen und 80S-Ribosomen, **Prokaryoten** besitzen ein Nucleoid, 70S-Ribosomen und keine Organellen. Die **Größe** eines Einzellers hängt von verschiedenen Faktoren ab: Genomgröße und Anzahl der für Reproduktion und Stoffwechsel erforderlichen Enzyme bestimmen die Mindestgröße, das Oberflächen/Volumen-Verhältnis und die interne Diffusionsgeschwindigkeit die maximale Größe. Große Zellen besitzen ein internes Transportsystem, um alle Bereiche mit Nährstoffen zu versorgen. Die **Form** einer Zelle ist genetisch determiniert und bei differenzierten Zellen in Geweben komplexer Eukaryoten oft funktionsabhängig. Prokaryotische Zellen sind meist Kokken, Stäbchen oder davon abgeleitete Formen, sie lagern sich häufig zu arttypischen **Zellverbänden** zusammen oder bilden Biofilme, in denen die einzelnen Zellen jedoch selbstständig bleiben.

Die **Zelle** ist die kleinste **lebens-** und **vermehrungsfähige Einheit** und Baustein aller Lebewesen. Obwohl die Zellen von Mikroorganismen und die jeweils gewebespezifisch differenzierten Zellen komplexer Organismen untereinander große Unterschiede aufweisen, existieren in allen heute lebenden Organismen nur zwei in ihrer grundsätzlichen Struktur und inneren Organisation unterscheidbare Zelltypen (Abb. 2.**1**): Die Zellen der einzelligen **Prokaryoten**, die die beiden Urreiche der **Bacteria** und der **Archaea** bilden, und die Zellen aller ein- und mehrzelligen **Eukaryoten**, die zum dritten Urreich, den **Eukarya**, zusammengefasst werden. Die Bezeichnungen Prokaryoten und Eukaryoten leiten sich vom Hauptmerkmal der eukaryotischen Zellen ab, dem Besitz eines echten, von einer doppelten Membran umgebenen **Zellkerns** (griech. eu-: gut, echt; pro-: bevor; karyon: Kern), in dem das Genom lokalisiert ist. Neben dem Zellkern besitzen Eukaryoten noch weitere **Kompartimente**, die durch eine Membran vom Cytoplasma abgegrenzt sind, z. B. Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, die pflanzlichen Plastiden, Endosomen, Microbodies und die Vakuolen bei Pflanzen- und Pilzzellen. Die prokaryotische Zelle ist die evolutio-

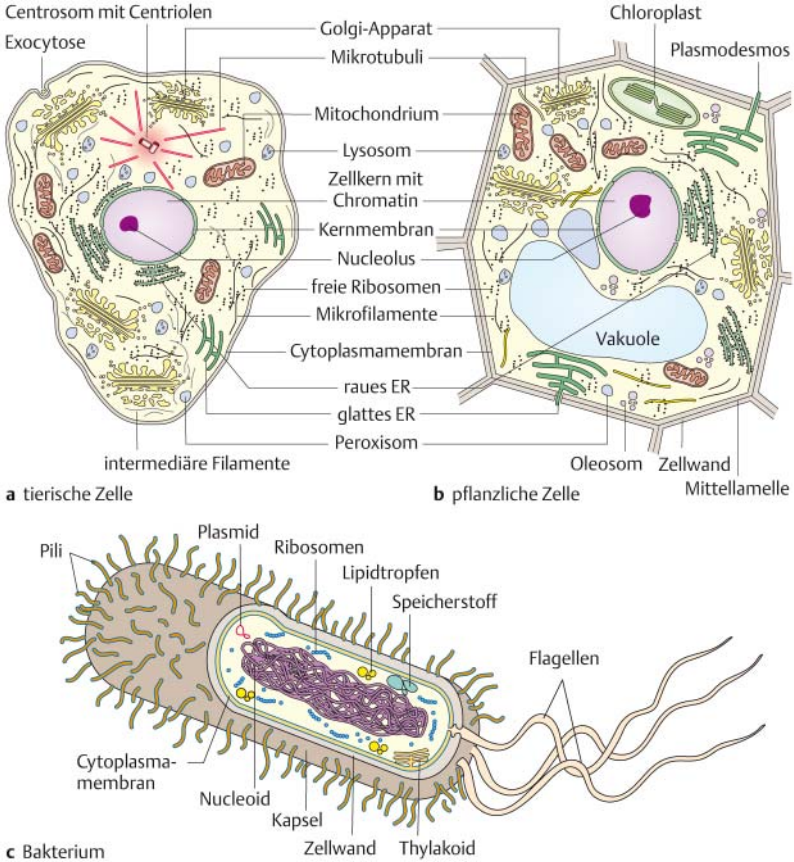


Abb. 2.1 **Struktur von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. a** Tierische Zelle, **b** Pflanzliche Zelle, **c** Bakterienzelle.

när ältere Zellform, sie ist insgesamt einfacher strukturiert und besitzt keinen von einer Membran umgebenen Zellkern, auch die Kompartimentierung und die Organellen der eukaryotischen Zellen fehlen ihr. Bei Prokaryoten liegt die DNA frei im Cytoplasma, ist jedoch in einer kernähnlichen Struktur, dem **Nucleoid**, organisiert. Als Konsequenz sind bei den Prokaryoten Transkription und Translation nicht räumlich voneinander getrennt, sondern beide Prozesse laufen nebeneinander im Cytoplasma ab. Die Proteinsynthese findet in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen an jeweils charakteristischen **Ribosomen** statt, die unterschiedlich groß sind und aus je zwei Untereinheiten bestehen. Nach ihrem Sedimentationsverhalten bei der Zentrifugation werden die pro-

karyotischen Ribosomen als **70S-Ribosomen** bezeichnet, die eukaryotischen als **80S-Ribosomen**. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer struktureller und funktioneller Merkmale, die für die prokaryotische bzw. eukaryotische Zelle charakteristisch sind (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Innerhalb der Prokaryoten und Eukaryoten werden anhand jeweils typischer Eigenschaften die Zellen der beiden prokaryotischen Urreiche Bacteria und Archaea sowie unter den Eukaryoten die Zellen von Tieren, Pflanzen und Pilzen unterschieden (Abb. 2.**1a** u. **b**).

2.1.1 Zellgröße

Für die **Größe** einer sich selbst reproduzierenden, frei lebenden Zelle gibt es eine untere und eine obere Grenze. Limitierend für die **untere Grenze** sind die benötigte **Genomgröße** sowie die **Anzahl** der für Reproduktion und Stoffwechselprozesse erforderlichen **Ribosomen** und **Enzyme**. Das kleinste bekannte Genom eines sich selbstständig und unabhängig vermehrenden Organismus besitzt mit 580 kbp *Mycoplasma genitalium*, ein Schleimhautparasit, der beim Menschen Harnwegsinfektionen verursacht. Das Genom des 2002 von K. Stetter entdeckten Archaeons *Nanoarchaeum equitans*, das in der Tiefsee auf anderen Archaeen wächst, hat eine Größe von nur 490 kbp; mit 450 kbp noch kleiner ist das Genom von Bakterien der Gattung *Buchnera*, die obligat als Endosymbionten in Blattläusen leben. Die **obere Grenze** einer Zelle wird durch die **Nährstoffversorgung** sowohl von außen in die Zelle hinein als auch innerhalb der Zelle bestimmt. Entscheidend für den Stoffaustausch mit der Umgebung ist das **Oberflächen/Volumen-Verhältnis**. Kleine Zellen haben im Verhältnis zum Volumen eine große Oberfläche, sodass die Aufnahme von Nährstoffen und die Ausscheidung von Abfallprodukten in ausreichendem Maße möglich sind. Größere Zellen haben ihre Oberfläche durch Einstülpungen der Cytoplasmamembran vergrößert, aus denen die vor allem für die größeren eukaryotischen Zellen typischen **Kompartimente** (📖*Biochemie, Zellbiologie*) als interne Reaktionsräume entstanden. Über Membranvesikel, die sowohl mit den internen Membranen als auch mit der Cytoplasmamembran fusionieren, findet ein Stoffaustausch zwischen den einzelnen Kompartimenten und mit der Umgebung statt. Entscheidend für den Stofftransport innerhalb der Zelle ist die **Diffusionsgeschwindigkeit** im Cytoplasma, die bei kleinen Zellen ausreicht, um alle Bereiche der Zelle mit Nährstoffen zu versorgen. In größeren Zellen hat sich ein Netzwerk aus Proteinfilamenten entwickelt, das als internes Transportsystem fungiert und den Zellen als **Cytoskelett** Stabilität verleiht.

Der **Größenbereich** eukaryotischer Zellen reicht von ca. 5 µm Durchmesser bei Hefezellen bis zu 1 mm bei einigen Riesenamöben und Eizellen. Einige eukaryotische Zellen sind noch größer, beispielsweise Eidotterzellen, Algenzellen oder die Axone mancher Nervenzellen mit einer Länge von bis zu 1 m. Prokaryotische Zellen sind in der Regel deutlich kleiner als eukaryotische, ihr Größenspektrum reicht von ca. 200 nm Durchmesser bei *Mycoplasma* bis zu *Epulopis-*

cium fishelsoni, dessen Zellen 80 mal 600 µm groß werden können, und dem anaeroben Sulfid oxidierenden Bakterium *Thiomargarita namibiensis* mit bis zu 750 µm Länge, das 1999 vor der Küste Namibias isoliert wurde.

Diese **Riesenbakterien**, die sogar mit bloßem Auge zu sehen sind, weisen einige Besonderheiten auf. *T. namibiensis* enthält eine Nitrat speichernde Vakuole, die bis zu 98 % des Zellvolumens einnimmt (S. 53), sodass der Anteil des stoffwechselaktiven Cytoplasmas dem normal großer Bakterien entspricht. *E. fishelsoni* lebt ausschließlich im Darm des Goldtupfen-Doktorfisches *Acanthurus nigrofuscus,* wo die Bakterien im 24-Stunden-Rhythmus einen speziellen Lebenszyklus durchlaufen, in dessen Verlauf sich im Inneren einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entwickeln, die unter Zerstörung der Mutterzelle freigesetzt werden. Die Mutterzelle erreicht ihre maximale Größe tagsüber während der aktiven Fressphase des Wirtes, wenn die Nährstoffkonzentration im Darm sehr hoch ist. Unter diesen Bedingungen kann auch bei relativ großen Zellen noch eine ausreichende Diffusion stattfinden. Unter dem Elektronenmikroskop erkennbare Strukturen aus Vesikeln und Tubuli dienen möglicherweise dem internen Transport.

2.1.2 Zellformen und Zellverbände

Die Form eukaryotischer Zellen in einem Gewebeverband ist häufig an die spezielle Funktion der Zellen angepasst, **einzellige Organismen** wie Bakterien sind in der Regel kugelig bis oval (**Kokken**) oder **stäbchenförmig**, davon abgeleitete Formen sind **Spirillen**, **Spirochaeten** oder **Vibrionen** (Abb. 2.**2a**). Die Form einer Zelle bestimmt das Oberflächen/Volumen-Verhältnis, es ist für Stäbchenformen günstiger als für Kokken. Die Zellform ist **genetisch festgelegt** und stellt daher ein taxonomisches Merkmal dar. Sie wird durch die Zellwand (S. 30) aufrechterhalten. Zellwandlose Prokaryoten, die es sowohl unter den Bacteria (Mycoplasmen) als auch unter den Archaea (*Thermoplasma*) gibt, haben daher keine definierte Form, sie sind **pleomorph**. Zur osmotischen Stabilisierung dieser Zellen enthält ihre Cytoplasmamembran Steroide oder Lipoglykane.

Obwohl es bei Einzellern keine echten Gewebe gibt, bilden einige Arten **Zellverbände**, in denen jedoch jede Einzelzelle als eigenständiger Organismus existiert. **Zellteilungsverbände** entstehen bei vielen Bakterien-Spezies durch unvollständige Teilungen. Abhängig von der Anzahl der Teilungen und der Lage der Teilungsebene bilden sich dabei arttypische Formen wie Diplokokken, Streptokokken oder Staphylokokken (Abb. 2.**2b**). Viele Cyanobacteria bilden **Coenobien**, in denen über mehrere Generationen die Tochterzellen nach der Teilung entweder in einer Gallerthülle oder innerhalb der Zellwand ihrer Mutterzellen zusammenbleiben, bis die äußerste Schicht schließlich aufplatzt. Bei *Nostoc* sind die Zellen innerhalb einer Exopolysaccharidschicht in langen **Fäden** angeordnet, in denen die Stickstoff fixierenden Heterocysten über plasmodesmenartige Kanäle (Mikroplasmodesmen) mit ihren Nachbarzellen in Verbindung stehen. **Zellkolonien** eukaryotischer Einzeller wie *Volvox* lassen bereits erste Differenzierungen und eine Aufgabenteilung erkennen. Alle ihre Zellen gehen aus einer Mutterzelle hervor und stehen ständig miteinander in Verbindung. **Aggregationsverbände**

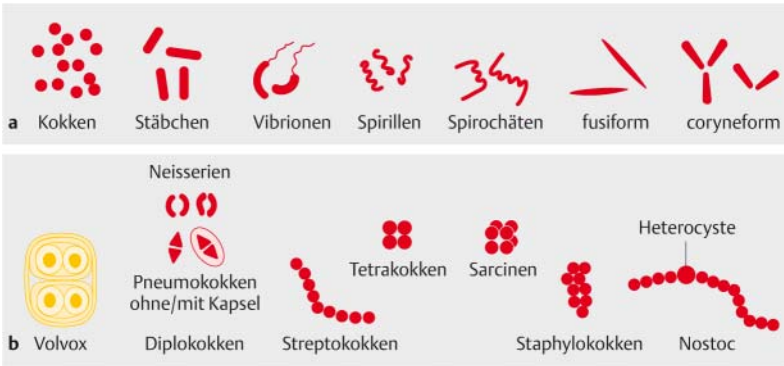


Abb. 2.2 **Grundformen von Bakterien. a** Einzelzellen. **b** Zellverbände.

entstehen durch die Zusammenlagerung von ursprünglich selbstständigen, beweglichen Einzelzellen, die durch eine extrazelluläre Matrix (S. 39) zusammen gehalten werden. **Biofilme** sind die wahrscheinlich häufigste Aggregationsform von Mikroorganismen in der Natur. Sie entstehen durch die Ansiedelung frei lebender Bakterien und deren nachfolgende Vermehrung auf einer Oberfläche. Die schützende Matrix ermöglicht den Mikroorganismen die Besiedelung von Habitaten, an denen sich Einzelzellen, z. B. aufgrund von Strömungen, sonst nicht halten könnten; innerhalb der Matrix können die Mikroorganismen in gewissem Umfang ihre Umweltbedingungen selbst regulieren. Gemeinschaften aus unterschiedlichen Spezies ergänzen sich in ihren physiologischen Fähigkeiten und ermöglichen ein Überleben (S. 265) in Habitaten mit ungünstigem Nährstoffangebot.

Aggregationsverbände sind auch bei Myxobakterien und Schleimpilzen verbreitet. Abhängig von der Spezies verschmelzen bei Schleimpilzen die Protoplasten der Einzelzellen zu einem vielkernigen **Plasmodium** oder bleiben als selbstständige Zellen erhalten.

Zelle: Kleinste lebens- und vermehrungsfähige Einheit, Grundbaustein aller Lebewesen. Zwei grundsätzlich in Struktur und Organisation unterschiedliche Zelltypen.
- **Eukaryoten:** Besitzen echten Zellkern, Kompartimente, 80S-Ribosomen, Organellen.
- **Prokaryoten:** Nucleoid, 70S-Ribosomen, selten Kompartimente, keine Organellen.

Zellgröße: Minimale Größe bedingt durch Genomgröße und Anzahl der für die Reproduktion benötigten Ribosomen und Enzyme, maximale Größe bedingt durch das für den Stoffaustausch nötige Oberflächen/Volumen-Verhältnis und die innere Diffusionsgeschwindigkeit.

Zellform: Genetisch determiniert, bei Prokaryoten meist kugelig oder stäbchenförmig oder davon abgeleitete Formen.
Zellverbände von Einzellern: Bestehen aus selbstständigen Einzelzellen, oft von extrazellulärer Matrix umgeben. Zellteilungsverbände und Aggregationsverbände.
- **Zellteilungsverbände:** Entstehen durch unvollständige Trennung der Einzelzellen nach der Zellteilung. Arttypische Formen wie Diplo-, Strepto-, Staphylokokken, Coenobien, Fäden, Zellkolonien.
- **Aggregationsverbände:** Entstehen durch Zusammenlagerung von ursprünglich selbstständigen Zellen einer oder mehrerer Arten. Beispiele: Biofilme, Myxobakterien, Schleimpilze.

Coenobium: Zellverband aus Tochterzellen, die nach der Teilung in einer Gallerthülle oder innerhalb der alten Zellwand der Mutterzelle zusammen bleiben.
Plasmodium: Entsteht durch Verschmelzung mehrerer Protoplasten, enthält zahlreiche Zellkerne. Bei vielen Schleimpilzen nach der Aggregation.
Zellkolonie: Geht aus einer gemeinsamen Mutterzelle hervor, Zellen stehen ständig miteinander in Verbindung, erste Differenzierungen.

2.2 Die Endosymbiontentheorie

Nach der **Endosymbiontentheorie** stammen **Mitochondrien** und **Plastiden** von Prokaryoten ab, die von einer urkaryotischen Zelle als Endosymbionten aufgenommen und zu Organellen reduziert wurden. Strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen der Organellen mit Prokaryoten wie der Besitz eigener DNA, 70S-Ribosomen und der prokaryotische Zusammensetzung der inneren Membran stützen die Endosymbiontentheorie. Die Fettsäure-Synthase und die in der inneren Membran lokalisierte ATP-Synthase sind wie die entsprechenden Enzyme von Prokaryoten aufgebaut. Ein großer Teil der Gene für Organellenproteine wurde im Verlauf der Coevolution in das Kerngenom verlagert. Sequenzhomologien von Mitochondrien zu Alpha-Proteobacteria und von Plastiden zu Cyanobacteria belegen die prokaryotische Herkunft der Organellen. Einige eukaryotische Zellen besitzen keine Mitochondrien, sondern Mitosomen oder Hydrogenosomen.

Die **Wasserstoff-Hypothese** geht nicht von der Existenz einer eukaryotischen Urzelle aus, sondern postuliert die Entstehung der Eukaryoten aus der Endosymbiose einer fakultativ anaeroben Wasserstoff produzierenden Bacteria-Zelle mit einem Wasserstoff abhängigen, autotrophen Archaeon. Dabei entstand der eukaryotische Zellkern durch die Verschmelzung des Archaea-Genoms mit dem größten Teil des Bacteria-Genoms und die nachfolgende Einschließung in einer Doppelmembran. Mitochondrien, Mitosomen und Hydrogenosomen stammen von der aufgenommenen Bacteria-Zelle ab, die zum Organell domestiziert wurde.

2.2.1 Endosymbiosen als flexibles Prinzip der Evolution

Symbiosen zwischen heutigen Eukaryoten und Einzellern sind oft **Endosymbiosen**, bei denen der Mikroorganismus als Endosymbiont im Organismus des Partners lebt, häufig sogar innerhalb der Zellen (**Endocytosymbiose**). Dabei sind die Partner entweder obligat aufeinander angewiesen, z. B. bei *Buchnera* in Blattläusen, oder auch getrennt lebensfähig (z. B. *Paramecium* und *Chlorella*, das „grüne Paramecium"). Schon zu Beginn der biologischen Evolution haben Bakterien eukaryotische Zellen besiedelt und sich im Laufe der Zeit zu obligaten Endosymbionten oder Endoparasiten entwickelt. Grundvoraussetzung für ihre dauerhafte und stabile Etablierung innerhalb der Wirtszelle ist die Verhinderung ihrer Verdauung, weshalb viele heutige Endoparasiten wirksame Strategien für ihr Überleben innerhalb der Wirtszelle besitzen.

Schätzungen zufolge leben ca. 20 % aller **Insekten** in obligater Symbiose mit intrazellulären Bakterien, einige sogar mit mehreren unterschiedlichen **Endosymbionten**. Das Alter verschiedener Symbiosen konnte auf 50 bis 250 Millionen Jahre datiert werden. Die Endosymbiosen haben zur perfekten Adaptation ihrer Wirte an spezielle Habitate beigetragen und beeinflussen häufig auch Vermehrung, physiologische Fähigkeiten oder Pathogenität des Wirtsorganismus (s. u.). Die Genome der endosymbiontischen Bakterien sind im Vergleich zu denen ihrer frei lebenden Verwandten deutlich reduziert. Die Auswahl der Gene ist dabei an die Erfordernisse des Wirtes in seinem speziellen Lebensraum angepasst, was die Endosymbionten für ihre Wirte unentbehrlich macht. Tsetsefliegen, die sich von Blut ernähren, benötigen vor allem B-Vitamine. Entsprechend sind in *Wigglesworthia*, dem obligaten Endosymbionten der Tsetsefliege, vor allem Biosynthesegene für diese Vitamine aktiv.

Die völlige Anpassung an die Bedürfnisse ihrer Wirte hat umgekehrt jedoch die Konsequenz, dass die Endosymbionten für ihr eigenes Fortbestehen von Überleben und Fortpflanzung ihrer Wirte abhängig sind. Da primäre Endosymbionten nur maternal an die nächste Generation weitergegeben werden, ist ein überproportionaler Anteil weiblicher Nachkommen für sie von Vorteil. Tatsächlich finden sich bei *Wolbachia*, einem obligaten Endosymbionten bei vielen Insekten, mehrere Mechanismen zur Beeinflussung der Geschlechterverteilung zugunsten weiblicher Tiere.

Die Sequenzen der **16S-rRNA** der Endosymbionten zeigen in vielen Fällen Übereinstimmungen mit denen frei lebender Bakterien, vor allem aus der Gruppe der Proteobacteria, zu der auch **viele pathogene Bakterien** gehören. So lassen sich Endosymbionten der Gattung *Wolbachia* den Alpha-Proteobacteria zuordnen. Aus dieser Gruppe stammen auch die Mitochondrien (S. 21) und der obligat intrazelluläre Endoparasit *Rickettsia prowazeki*, der Erreger des epidemischen Fleckfiebers. Zu den Beta-Proteobacteria gehören Endosymbionten von Mehlkäfern ebenso wie pathogene Bakterien der Gattung *Bordetella*, die z. B. Keuchhusten verursachen. Symbiontische Bakterien von Blattläusen, Tsetse-Fliegen, Ameisen und Zecken aus der Gruppe der Gamma-Proteobacteria sind verwandt mit den intrazellulären pathogenen Bakterien *Coxiella burnetii* (Q-Fieber) und *Francisella tularensis* (Tularämie).

Vergleichende Untersuchungen von Chloroplasten und obligat intrazellulären pathogenen Chlamydien mit Cyanobacteria sprechen ebenfalls für einen gemeinsamen Vorläufer.

Die phylogenetische Verwandtschaft vieler endosymbiontischer und endoparasitärer Bakterien deutet darauf hin, dass die beiden Lebensformen einen gemeinsamen Ursprung haben und Aufnahme und intrazelluläre Anpassung der Bakterien in beiden Fällen nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft. Möglicherweise hat sich erst im Verlauf der Coevolution entschieden, ob ein aufgenommenes Bakterium zu einem Endosymbionten oder zu einem Endoparasiten wurde, indem Teile des Genoms verloren gingen oder umgekehrt neue Gene, z. B. für Pathogenitätsfaktoren oder physiologische Fähigkeiten, erworben wurden.

▶ Vor wenigen Jahren wurde entdeckt, dass der von Kriebelmücken übertragene Fadenwurm ***Onchocercus volvulus***, der in tropischen Gebieten Afrikas und Amerikas die Onchozerkose (Flussblindheit) verursacht, ein obligat endosymbiontisches Bakterium der Gattung *Wolbachia* beherbergt. Würmer, deren **Endosymbionten** mithilfe von Antibiotika abgetötet wurden, konnten auf Dauer keine Nachkommen mehr produzieren, sodass der Infektionskreislauf unterbrochen war. Pathogene Endoparasiten des Menschen wie ***Plasmodium*** (Malaria) und ***Toxoplasma gondii*** (Toxoplasmose) gehören zur Gruppe der Apicomplexa, die durch den Besitz eines **Apikoplasten** gekennzeichnet sind. Erst vor kurzem konnten diese Strukturen als komplexe Plastiden mit eigenem Genom identifiziert werden. Obwohl dieses Genom kaum noch Photosynthesegene enthält, sind einige der verbliebenen aktiven Gene des Apikoplasten offensichtlich funktionell wichtig für den Entwicklungszyklus des Parasiten. Die Apikoplasten könnten daher als Ziel für spezifische **Chemotherapeutika** dienen. ◀

2.2.2 Die Entstehung der Organellen

Die in ihren Grundzügen bereits 1883 formulierte **Endosymbiontentheorie** postuliert, dass die **Mitochondrien und Plastiden** der eukaryotischen Zellen **von selbstständigen Prokaryoten abstammen**, die von Vorläuferzellen heutiger Eukaryoten als Endosymbionten aufgenommen und im Verlauf der Coevolution zu Organellen domestiziert wurden. Inzwischen belegen zahlreiche Befunde diese Theorie:

Plastiden und Mitochondrien werden nicht de novo synthetisiert, sondern gehen wie Zellen durch **Zweiteilung** aus ihresgleichen hervor, wobei in allen Plastiden und den Mitochondrien bestimmter Chrysophyceen das prokaryotische Zellteilungs-Protein FtsZ (S. 263) beteiligt ist, in den meisten anderen Mitochondrien das funktionell ähnliche Dynamin.

Beide Organellen sind von **zwei Membranen** umgeben, die im Unterschied zu anderen zellulären Membranen nicht am Membranfluss innerhalb der Zelle beteiligt sind. Diese Doppelmembran trennt das Plasma der Organellen vom Cytoplasma der Wirtszelle. Untersuchungen haben gezeigt, dass die äußere Membran in ihrer Zusammensetzung einer eukaryotischen Membran entspricht. Die innere Membran enthält dagegen das Phospholipid Cardiolipin, das sonst nur bei Prokaryoten vorkommt, während die bei Eukaryoten verbreiteten Steroide fehlen. Auch bei rezenten Symbiosen wird der Endosymbiont meist von zwei

Membranen umhüllt, wobei die innere vom Endosymbionten und die äußere von der Wirtszelle stammt.

2

Schon früh wurde entdeckt, dass die Organellen **eigene DNA** besitzen, die bis auf einige Ausnahmen (*Genetik*) wie bei den meisten Prokaryoten ringförmig ist und keine Histone enthält. Dieses Genom codiert für bestimmte Organellenproteine, in Mitochondrien beispielsweise einige Atmungskettenproteine, die rRNAs, sowie beim Menschen auch alle benötigten tRNAs. Irritierend war zunächst der Befund, dass ein Großteil der Gene für Organellenproteine im Zellkern lokalisiert ist und die entsprechenden Proteine erst posttranslational in die Organellen transportiert werden, beispielsweise werden die Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase zum Teil im Kern und zum Teil mitochondrial codiert. Inzwischen konnte jedoch experimentell nachgewiesen werden, dass im Verlauf der Coevolution zahlreiche ursprünglich prokaryotische Gene vom Organellengenom in den Zellkern verlagert worden sind (**intertaxonische Kombination**). Die Zahl der so transferierten Gene ist umso größer, je höher der Entwicklungsstand eines Eukaryoten ist.

Auch die **mRNA** in Mitochondrien und Plastiden entspricht eher der von Prokaryoten, die für Eukaryoten typische Cap-Sequenz am 5′-Ende und der Poly-A-Schwanz am 3′-Ende fehlen ihr. Die Translation findet an **70S-Ribosomen** statt und auch die Initiationsfaktoren entsprechen denen von Prokaryoten. Aus diesem Grund hemmen Antibiotika wie Streptomycin und Chloramphenicol, deren Wirkort die 70S-Ribosomen sind, die Proteinsynthese in Plastiden und Mitochondrien, während Inhibitoren der 80S-Ribosomen wie Cycloheximid keine Wirkung zeigen.

Einige Enzyme und Stoffwechselwege in den Organellen zeigen ebenfalls deutliche Übereinstimmungen mit Prokaryoten. Die **Fettsäure-Synthase** besteht wie bei Prokaryoten aus sieben Einzelenzymen und nicht wie bei Eukaryoten aus einem Enzymkomplex (S. 424). Die in der inneren Mitochondrienmembran und in den Thylakoiden von Chloroplasten lokalisierte **ATP-Synthase** entspricht der F-Typ ATP-Synthase in der Cytoplasmamembran von Prokaryoten (*Biochemie, Zellbiologie*).

Entscheidend für die allgemeine Anerkennung der Endosymbiontentheorie waren **Sequenzanalysen** von Nucleinsäuren und Proteinen der Organellen und heutiger Prokaryoten. Diese Analysen zeigen eine hohe genetische Übereinstimmung von Mitochondrien mit respiratorischen Bakterien aus der Gruppe der Alpha-Proteobacteria und von Plastiden mit Cyanobacteria (S. 77, S. 83). Dagegen bestehen kaum Ähnlichkeiten mit den eukaryotischen Genom-Sequenzen. Vergleiche der Sequenzen von Mitochondrien und Plastiden ergaben keine gemeinsame Abstammung. Beide Befunde sprechen gegen die alternativ zur Endosymbiontentheorie entwickelte **Kompartimentierungshypothese** (auch: Plasmid-Hypothese), nach der die Organellen der Eukaryoten autonom durch Membraneinstülpungen entstanden sein sollen, bei denen Plasmide mit Genclustern aus der Kern-DNA eingeschlossen wurden.

Die klassische Endosymbiontentheorie postuliert die Existenz einer Urzelle, die bereits einen Zellkern, aber weder Mitochondrien noch Plastiden besaß. Rezente Eukaryoten ohne Mitochondrien wurden daher lange als ursprüngliche Eukaryoten angesehen. Im Unterschied dazu geht die erst vor wenigen Jahren formulierte **Wasserstoff-Hypothese** nicht von einer eukaryotischen Urzelle aus, sondern von der endosymbiontischen Aufnahme eines fakultativ anaeroben Alpha-Proteobacteriums, das ATP sowohl aerob über eine Atmungskette als auch anaerob über Fermentation produzieren konnte, durch ein anaerobes, autotrophes, methanogenes Archaeon. Durch das vom Endosymbionten produzierte H_2 wurde das Archaeon unabhängig von externen Wasserstoffquellen. Im Verlauf der Coevolution wanderte der größte Teil des Endosymbionten-Genoms in die Archaeon-Zelle und verschmolz mit der Archaeon-DNA. Das so entstandene Misch-Genom wurde nachfolgend in einer Kernmembran eingeschlossen und bildete den Ursprung des eukaryotischen Genoms. Das aufgenommene Alpha-Proteobacterium wurde zum Organell domestiziert. Es stellt den gemeinsamen Vorfahren von Mitochondrien, Mitosomen und Hydrogenosmen dar (s. u.), die sich abhängig vom jeweiligen anaeroben oder aeroben Lebensraum entwickelten. Die Wasserstoff-Hypothese steht nicht nur mit den Ergebnissen von Sequenzvergleichen in Einklang, sondern liefert auch eine Erklärung dafür, dass eukaryotische Genome und Stoffwechselwege Gemeinsamkeiten sowohl mit den Archaea als auch mit den Bacteria (📖 *Ökologie, Evolution*) aufweisen.

In den Mitochondrien wird Pyruvat durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH) oxidativ decarboxyliert und über den Citratzyklus vollständig zu CO_2 oxidiert (S. 355 und 📖 *Biochemie*). Die ATP-Synthese erfolgt über Elektronentransportphosphorylierung, als terminaler Elektronenakzeptor fungiert normalerweise O_2. Eine Reihe von Eukaryoten besitzt jedoch **anaerobe Mitochondrien**, in denen als terminaler Elektronenakzeptor entweder Nitrat (*Fusarium oxysporum*) oder Nitrit (*Cylindrocarpon tonkinense*) dient oder Fumarat wie bei *Fasciola hepaticum* (Leberegel) und *Ascaris suum* (Schweinespulwurm).

Einige anaerobe Ciliaten, Trichomonaden und Pilze besitzen **Hydrogenosomen** anstelle von Mitochondrien. Diese Organellen sind ca. 1 µm groß und vermehren sich durch **Zweiteilung**. Wie Mitochondrien sind auch Hydrogenosomen von einer **Doppelmembran** umgeben und konservieren Energie in Form von ATP, ihnen fehlen jedoch Atmungskette, Cytochrome und ATP-Synthase sowie der bei Mitochondrien in der Matrix lokalisierte Citratzyklus. Die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat wird in Hydrogenosomen nicht durch die PDH, sondern durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase katalysiert, dabei entstehen Acetyl-CoA und CO_2. Die bei der Reaktion frei werdenden Elektronen werden zunächst auf Ferredoxin und dann über eine Hydrogenase auf Protonen übertragen, dabei entsteht H_2 (Name!). Acetyl-CoA wird anschließend zu Acetat umgesetzt, wobei **ATP** über **Substratstufenphosphorylierung** gebildet wird. Mit Ausnahme der Hydrogenosomen des Ciliaten *Nyctotherus ovalis*, einem Darmbewohner der Küchenschabe, besitzen Hydrogenosomen im Unterschied zu Mitochondrien **kein eigenes Genom**. Bei ihnen wurde im Verlauf der Coevolution das komplette Genom in den Kern der Wirtszelle übertragen.

Andere amitochondriale einzellige Eukaryoten besitzen weder Mitochondrien noch Hydrogenosomen, bei ihnen sind sämtliche Enzyme des Energiestoffwechsels im Cyto-

plasma lokalisiert. Bei einigen dieser anaeroben oder mikroaerophilen Organismen, z. B. *Entamoeba histolytica* oder *Giardia intestinalis*, wurden jedoch von einer Doppelmembran umgebene **Mitosomen** gefunden, die wie die Hydrogenosomen kein Genom enthalten. Kern-codierte Mitosomen-Proteine werden mithilfe von N-terminalen Signalsequenzen, die große Ähnlichkeit mit entsprechenden Signalpeptiden mitochondrialer und hydrogenosomaler Proteine haben, in die Mitosomen importiert. Ein Mitosomen-Protein von *E. histolytica*, dessen Signalsequenz experimentell durch die eines Mitochondrien-Proteins von *Trypanosoma cruzi* ersetzt worden war, wurde mithilfe dieser fremden Signalsequenz in das Mitosom importiert. Umgekehrt war ein mitosomales Signalpeptid aus *G. intestinalis* in der Lage, den Import eines cytosomal synthetisierten Proteins in Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* zu steuern. Gemeinsam mit den strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen sowie Sequenzvergleichen einiger Proteine und von mitochondrialen Genomen mit dem Restgenom des Hydrogenosoms von *N. ovalis*, das für Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette codiert, sind diese Befunde starke Indizien für einen gemeinsamen Ursprung der drei Organellen.

Heutige Landpflanzen, Grün- und Rotalgen sowie die Glaucophyta (einzellige Süßwasserflagellaten) besitzen **einfache Plastiden** mit zwei Membranen. Phylogenetischen Vergleichen zufolge stammen alle einfachen Plastiden von einem ursprünglichen Cyanobakterium ab. Einige Algen besitzen Plastiden mit drei oder vier Membranen, sie entstanden, indem ein bereits plastidenhaltiger einzelliger Eukaryot von einem anderen Eukaryoten aufgenommen und anschließend zu einer **komplexen Plastide** reduziert wurde. Sequenzvergleiche zeigen, dass diese **sekundären Endosymbiosen** mehrmals stattgefunden haben, wobei entweder eine photosynthetische Grünalge oder eine Rotalge aufgenommen wurde (Grüne bzw. Rote Linie). In beiden Fällen gibt es jeweils eine Gruppe von Algen, deren Plastiden von vier Membranen umgeben sind, wobei sich zwischen den beiden Membranpaaren ein Restgenom, das **Nucleomorph**, befindet, das aus dem jeweiligen Endosymbionten stammt. Bei anderen Algen ging das Nucleomorph und bei einigen auch eine der Membranen im Verlauf der Coevolution verloren. Einige Dinoflagellaten besitzen Plastiden mit fünf Membranen, die über eine **tertiäre Endocytosymbiose** durch die Aufnahme einer einzelligen Alge mit komplexen Plastiden entstanden sind.

Endosymbiose: Lebensgemeinschaft zweier Organismen mit Vorteilen für beide, wobei der Mikroorganismus im Inneren des größeren Organismus lebt.
Endocytosymbiose: Endosymbiose, bei der der Mikroorganismus innerhalb der Zelle(n) des Partners lebt, oft einfach als Endosymbiose bezeichnet, primäre, sekundäre und tertiäre Endocytosymbiose.
Nucleomorph: Zwischen den beiden Membranpaaren lokalisiertes Restgenom der aufgenommenen Alge bei einigen komplexen Plastiden.

Endosymbiontentheorie: Theorie zur Entstehung der eukaryotischen Zellen und ihrer Organellen, nach der Mitochondrien und Chloroplasten sich jeweils aus Bakterien entwickelt haben, die von einer urkaryotischen Zelle als Endosymbionten aufgenommen wurden. Folgende Eigenschaften der Organellen belegen die Endosymbiontentheorie: Vermehrung durch Zweiteilung, ringförmiges eigenes Genom, Prokaryoten-typische Zusammensetzung der inneren Membran, 70S-Ribosomen, mRNA und Initiationsfaktoren der Proteinsynthese prokaryotisch, Sequenzhomologien der 16S-rRNA mit bestimmten Bakteriengruppen.
Kompartimentierungshypothese: Hypothese, nach der Mitochondrien und Plastiden in einer urkaryotischen Zelle autonom durch Membraneinstülpungen entstanden sind, bei denen Kern-DNA in Plasmid-Form eingeschlossen wurde. Inzwischen durch Sequenzanalysen widerlegt.
Wasserstoff-Hypothese: Neue Variante der Endosymbiontentheorie, nach der die eukaryotischen Zellen aus der Endosymbiose eines Archaeons mit einem Alpha-Proteobacterium hervorgeht. Der eukaryotische Zellkern entstand nach dieser Hypothese durch die Verschmelzung des Archaeon-Genom und Genen des endosymbiontischen Alpha-Proteobacteriums, die in das Archaeon-Genom transferiert wurden, der Endosymbiont wurde zum Organell domestiziert.
Hydrogenosomen: Organellen von einigen anaeroben Ciliaten, Trichomonaden und Pilzen anstelle von Mitochondrien, besitzen meist kein eigenes Genom, ATP-Produktion über Substratstufenphosphorylierung.

2.3 Zellstrukturen

2.3.1 Zellmembranen

Die meisten **Zellmembranen** sind Einheitsmembranen aus einer Phospholipiddoppelschicht mit integralen und peripheren Proteinen. Die chemische Zusammensetzung der Membranen unterscheidet sich bei Eukarya, Bacteria und Archaea: Eukarya und Bacteria besitzen **Esterlipide**, Archaea ausschließlich **Etherlipide**. Die **Cytoplasmamembran** grenzt die Zelle von ihrer Umgebung ab und bildet eine Permeabilitätsbarriere für wasserlösliche Verbindungen und Ionen. **Intrazelluläre Membranen** bilden bei Eukaryoten verschiedene Kompartimente, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Bei Prokaryoten gibt es nur in einigen Gruppen interne Membranen, die Komponenten der Photosynthese oder spezielle membranständige Enzyme enthalten.

Die meisten zellulären Membranen sind nach dem Prinzip der **Einheitsmembran** (unit membrane, *Zellbiologie*) aufgebaut und stets in sich geschlossen. Sie bestehen aus einer flüssigen **Phospholipiddoppelschicht** (Bilayer), die in unregelmäßigen Abständen **integrale und periphere Proteine** enthält, die innerhalb der Lipidschicht frei beweglich sind (Fluid-Mosaik-Modell, *Biochemie*,

Zellbiologie). Integrale Proteine sind feste Bestandteile der Membran. Sie sind kovalent an ein Lipid oder ein Protein gebunden oder ihre Polypeptidkette durchspannt als Transmembranprotein die gesamte Membran. Periphere Proteine sind auf der Innen- oder der Außenseite über nicht kovalente Bindungen mit einem Membranlipid oder einem integralen Protein der Membran assoziiert und können relativ leicht abgelöst werden. Für die Struktur der Membran sind vor allem die Lipide, meist Phospholipide (S. 430), ausschlaggebend, die Proteine haben Enzymfunktion (*Biochemie, Zellbiologie*) oder sie vermitteln zwischen dem Zellinneren und der Umgebung, z. B. als Zell- und Signalrezeptoren oder Translokasen (S. 399). Das Verhältnis von Proteinen zu Lipiden in einer Membran ist abhängig von ihrer jeweiligen Funktion, z. B. ist der Gehalt an Proteinen und Lipiden in der äußeren Mitochondrienmembran etwa gleich groß, während die innere Mitochondrienmembran, in der die Komponenten der Atmungskette lokalisiert sind, fast dreimal so viel Protein enthält wie Lipide.

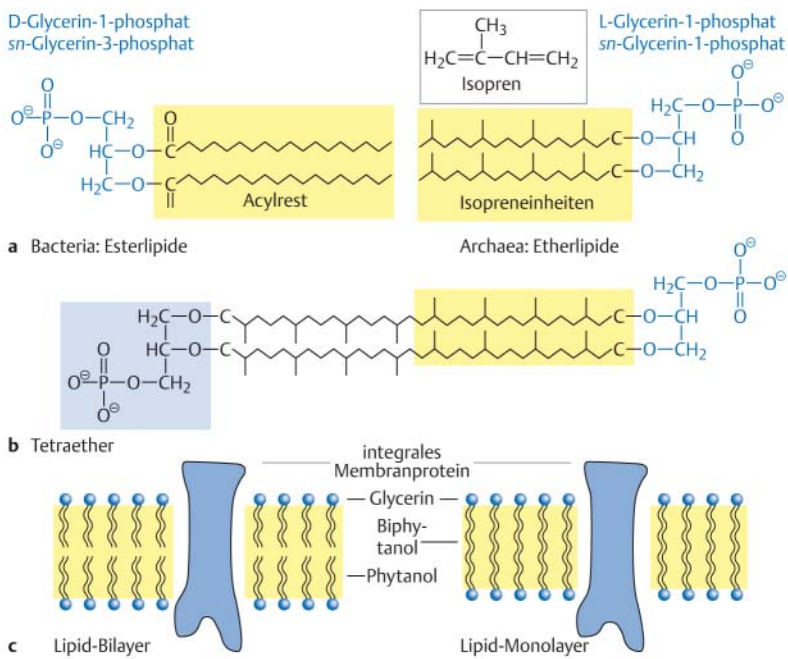


Abb. 2.3 **Membranaufbau. a** Die Membranen der Bacteria enthalten Esterlipide. Bei Archaea sind lange Kohlenwasserstoffketten aus Isopreneinheiten über Etherbindungen mit Glycerin verbunden. **b** Durch kovalente Bindungen zwischen zwei Etherlipiden können Tetraether entstehen. **c** Membranen aus Tetraethern bestehen nicht aus zwei voneinander trennbaren Schichten (Bilayer), sondern bilden eine Einheit (Monolayer).

Die **chemische Zusammensetzung** der Membran ist bei den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich. Die Membranen der **Eukaryoten** und der meisten **Bacteria** enthalten **Esterlipide** (Abb. 2.**3**), bei denen zwei der drei Hydroxylgruppen von **D-Glycerin** mit langkettigen Fettsäuren von 14 bis 18 C-Atomen verestert sind, die dritte trägt eine Phosphatgruppe (Phospholipide) oder einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest (Glykolipide). Die **Fettsäurezusammensetzung** beeinflusst **Fluidität** und **Permeabilität** einer Membran: Ungesättigte und verzweigte Fettsäuren ermöglichen auch bei niedrigen Temperaturen noch eine hohe Fluidität, Cyclopropanfettsäuren erhöhen die Säuretoleranz, indem sie die Permeabilität für Protonen verringern. Bei einer Änderung der Wachstumsbedingungen kann die Fettsäurezusammensetzung der Membran entsprechend angepasst werden (S. 271). Um die **Stabilität** der Membran zu erhöhen, werden häufig weitere hydrophobe Verbindungen eingelagert. Eukaryotische Membranen enthalten das Steroid **Cholesterin** (Abb. 2.**4**), das innerhalb der Bacteria nur bei den Methanotrophen und den zellwandlosen Mycoplasmen (S. 80, S. 87) vorkommt. Die meisten Bacteria besitzen stattdessen die strukturell verwandten **Hopanoide** (Abb. 2.**4**) zur Stabilisierung ihrer Membranen.

In den Membranen der **Archaea** sind keine Esterlipide enthalten, sondern **Etherlipide**, in denen ein Glycerinmolekül über Etherbindungen mit Seitenketten von 20 C-Atomen Länge verbunden ist, die aus **Isopreneinheiten** aufgebaut sind. Im Unterschied zu den Eukarya und Bacteria verwenden Archaea **L-Glycerin** anstelle von D-Glycerin. Über die Verzweigungen der Seitenketten können die Etherlipide miteinander verknüpft werden. Wenn diese Verknüpfungen zwischen den gegenüberliegenden Lipiden der beiden Membranschichten stattfinden, entsteht eine Lipidmonoschicht (Monolayer, Abb. 2.**3**). Die Verwendung von Etherlipiden und auch die Ausbildung einer Monoschicht gewährleisten

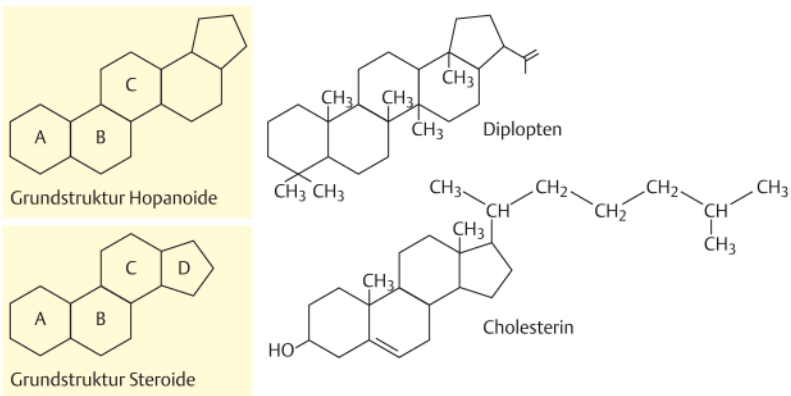


Abb. 2.**4** **Struktur der Hopanoide und Steroide.**

die Stabilität der Membran auch unter den oft extremen Temperatur- und pH-Bedingungen in den Lebensräumen der Archaea (Abb. 2.**5a**). Auch bei einigen thermophilen Bacteria wurden Etherlipide gefunden, sie besitzen jedoch stets auch Esterlipide. Im Unterschied zu den Etherlipiden der Archaea enthalten Etherlipide von Bacteria wie die Esterlipide D-Glycerin. Die Membranen zellwandloser Archaea der thermophilen Gattung *Thermoplasma* (Abb. 2.**5b**) werden durch **Lipoglykan** stabilisiert, ein glykosyliertes Tetraetherlipid, das eine Lipidmonoschicht bildet.

Intrazelluläre Membranen kommen vor allem bei Eukaryoten vor, wo sie die verschiedenen **Kompartimente** (📖*Zellbiologie, Biochemie*) bilden.

Eine Kompartimentierung durch innere Membranen findet man in prokaryotischen Zellen nur bei einigen speziellen Gruppen. Diese intracytoplasmatischen Membranen entstehen durch **Invaginationen** und schlauchförmiges Wachstum der Cytoplasmamembran**,** sie enthalten membranständige Enzyme und Komponenten von Elektronentransportketten, z. B. Elektronencarrier. Einige phototrophe Bakterien (S. 77 und S. 83) besitzen spezielle Membranen: Bei Cyanobacteria findet die Photosynthese in mit Phycobilisomen besetzten **Thylakoiden** statt (Abb. 2.**6**), bei Purpurbakterien in **Chromatophoren**, die speziesabhängig als Vesikel, Tubuli oder Lamellen ausgebildet sind. Bei Heliobacteria und Grünen Bakterien ist der Photosyntheseapparat dagegen in der Cytoplasmamembran lokalisiert, letztere besitzen zusätzlich **Chlorosomen** (S. 54), die mit der Cyto-

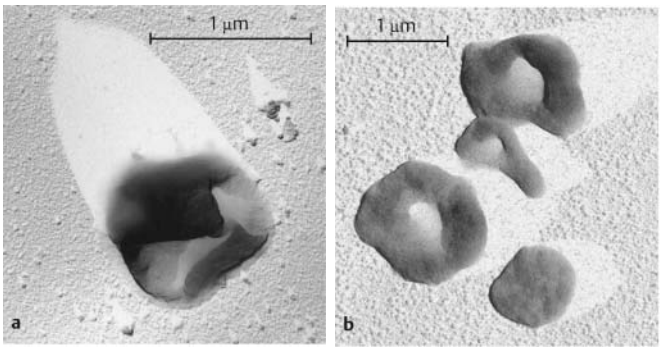


Abb. 2.**5** **Archaea. a** *Sulfolobus acidocaldarius* gehört zu den hyperthermophilen Crenarchaeota und wächst optimal bei pH-Werten von 2–3 und einer Temperatur von 75–85 °C. Die Zellen sind unregelmäßig geformte, oft gelappte Kokken. Sie können auch begeißelt sein. **b** *Thermoplasma.* Die zellwandlosen Zellen sind sehr unregelmäßig geformt und gelappt. Sie können auch Flagellen aufweisen, deren Funktion nicht geklärt ist. Die Zellen wurden mit Glutaraldehyd (2 %) fixiert und auf einen mit einem Kohlefilm beschichteten elektronenmikroskopischen Objektträger (Grid) aufgetragen, luftgetrocknet und schräg unter einem Winkel von 15° mit Platin/Kohle bedampft. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM). (Von R. Rachel, Regensburg)

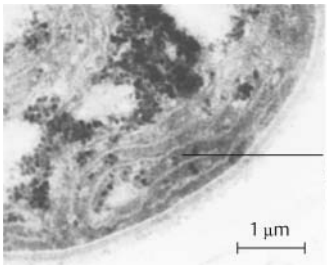


Abb. 2.6 **Photosynthetische Membranen eines Cyanobakteriums.** (EM-Aufnahme aus Plattner, Hentschel, Thieme 2006).

plasmamembran assoziiert, jedoch nur von einer einschichtigen Hülle aus Glykolipiden (nonunit membrane) umgeben sind.

Auch **methanotrophe Bakterien** (S. 86) besitzen **interne Membransysteme**, die anhand ihrer Struktur als **Typ I** oder **Typ II** unterschieden werden, und im Unterschied zu den meisten anderen prokaryotischen Membranen **Steroide** enthalten. In diesen Membranen ist die **Methan-Monooxygenase** lokalisiert. Dieses Enzym katalysiert die Methanoxidation mit Sauerstoff, die Grundlage des Stoffwechsels von Methanotrophen ist (S. 389).

Strukturell ähnlich aufgebaute interne Membranen gibt es bei vielen **nitrifizierenden Bakterien** (S. 85), die in ihrem Energiestoffwechsel unter Sauerstoffverbrauch Ammoniak zu Nitrit bzw. Nitrit zu Nitrat oxidieren (S. 391). Die Ammoniakoxidation wird von der membranständigen **Ammonium-Monooxygenase** katalysiert.

Membranen: Phospholipiddoppelschicht mit integralen und peripheren Proteinen (Einheitsmembran). Chemische Zusammensetzung unterschiedlich bei Eukarya, Bacteria und Archaea.
- **Eukarya:** Esterlipide, D-Glycerin, Steroide (Cholesterin).
- **Bacteria:** Esterlipide, D-Glycerin, Hopanoide, bei methanogenen Steroide, bei zellwandlosen Mycoplasmen Steroide und Lipoglykane.
- **Archaea:** Etherlipide, L-Glycerin, Steroide und Lipoglykane bei *Thermoplasma*.

Intrazelluläre Membranen: Dienen der Oberflächenvergrößerung, vorwiegend bei Eukaryoten, bei Prokaryoten nur bestimmte Gruppen.
- **Eukaryoten:** Kompartimente, kontraktile Vakuole bei einigen Einzellern.
- **Prokaryoten:** Photosynthetische Membranen: Thylakoide (Cyanobakteria), Chromatophoren (Purpurbakterien), interne Membranen bei methanotrophen und nitrifizierenden Bakterien enthalten Enzyme.

2.3.2 Zellhülle

Einzellige Organismen sind meist von einer **Zellwand**, einem rigiden Exoskelett umhüllt, das ihnen Form und Stabilität verleiht. Während eukaryotische Mikroorganismen ein Exoskelett aus **Cellulose** (Pflanzen) oder **Chitin** (Pilze) besitzen, besteht das Exoskelett der Bacteria aus **Peptidoglykan** (**Murein**), das der Archaea entweder aus Protein oder einem **Pseudomurein**. Die **gramnegativen Bacteria** besitzen einen Mureinsacculus aus ein bis zwei Lagen Peptidoglykan, dem eine äußere Membran aufgelagert ist. Diese äußere Membran trägt das charakteristische **Lipopolysaccharid**. Das Kompartiment zwischen Cytoplasmamembran und **äußerer Membran** wird als **Periplasma** bezeichnet. Durch **Porine** in der äußeren Membran, können niedermolekulare Verbindungen ins Periplasma gelangen. Bei den **grampositiven Bacteria** besteht der Mureinsacculus aus bis zu 25 Schichten Peptidoglykan, in ihn sind **Teichon-** und **Teichuronsäuren** eingelagert. Die Zellen vieler Prokaryoten tragen zusätzlich **Surface(S)-Layer** aus Protein. Einige bilden **Kapseln** oder **Schleime** aus Exopolymeren.

Der Reaktionsraum der Zelle, das Cytoplasma, wird durch die Cytoplasmamembran begrenzt, doch nahezu alle Mikroorganismen bilden Strukturen aus, die die Zelle **außerhalb der Cytoplasmamembran** umgeben und unter dem Begriff der **Zellhülle** zusammengefasst werden. Viele dieser Strukturen sind für das Überleben des Organismus essentiell. Die dominante Struktur der Zellhülle ist die **Zellwand**, deren primäre Aufgabe es ist, der Zelle **mechanische Stabilität** zu verleihen und die Aufrechterhaltung ihrer spezifischen Form zu garantieren. Häufig bildet die Zellwand auch eine zusätzliche **Permeabilitätsbarriere**. Mit ihrer äußersten Zellwandschicht tritt die Zelle in **Kontakt** zu ihrer Umwelt. Hier finden sich Strukturen, die für die Besiedelung verschiedener Habitate von Bedeutung sind.

Tierische Mikroorganismen haben keine Zellwände, andere eukaryotische Mikroorganismen besitzen dagegen in der Regel Polysaccharidzellwände. So besteht die Zellwand einzelliger Pflanzen aus Cellulose (Glucose, β1→4-glykosidische Bindung) und diejenige vieler einzelliger Pilze aus Chitin (N-Acetylglucosamin, β1→4-glykosidische Bindung).

Peptidoglykan: Das Zellwandpolymer der Bacteria

Die Zellwand der Bacteria besteht aus der hochmolekularen Verbindung **Peptidoglykan** oder **Murein**, dessen Grundgerüst aus den Zuckerderivaten **N-Acetylglucosamin** und **N-Acetylmuraminsäure** gebildet wird (Abb. 2.**7a**). Diese Zuckerbausteine sind alternierend β1→4-glykosidisch verknüpft und bilden so Polysaccharidketten. An die Lactylreste jeder N-Acetylmuraminsäure sind über Peptidbindungen Peptide aus vier Aminosäuren geknüpft. In diesen Peptiden fin-

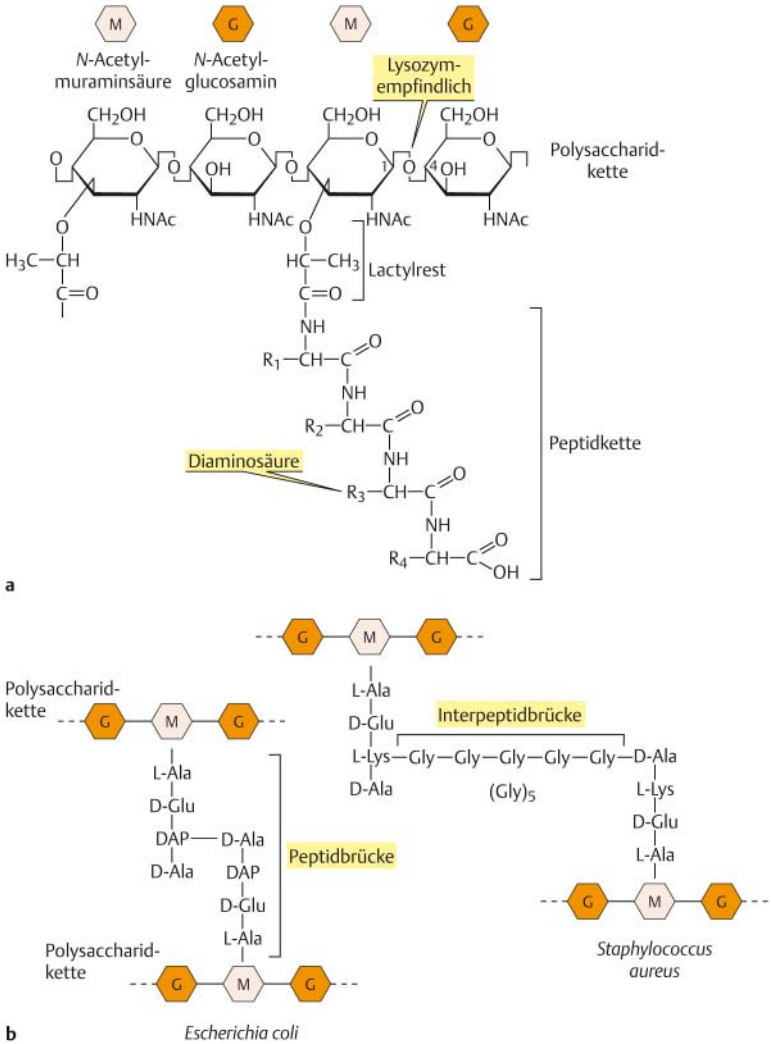


Abb. 2.7 **Die Struktur des Peptidoglykans. a** Die Polysaccharidkette besteht aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure; die Anknüpfung der Peptidkette erfolgt über eine Peptidbindung an den Lactylrest der N-Acetylmuraminsäure. Als Diaminosäuren kommen Diaminopimelinsäure und Lysin vor. **b** Aufbau der Peptidbrücke bei *E. coli* (gramnegativ) und *Staphylococcus aureus* (grampositiv).

den sich einige ungewöhnliche Aminosäuren, z. B. D-Alanin und D-Glutaminsäure sowie die zwei Aminogruppen tragende Aminosäure **Meso-Diaminopimelinsäure (DAP)**. Über Diaminosäuren werden Peptide benachbarter Peptidoglykanketten kovalent verbunden. Der Aufbau der **Peptidbrücken** unterscheidet sich bei verschiedenen Organismen: Bei gramnegativen Bacteria erfolgt die Verknüpfung der Peptide direkt über die Diaminosäure Diaminopimelinsäure, die mit ihrer zweiten Aminogruppe eine weitere Peptidbindung mit der Carboxylgruppe der terminalen Aminosäure der zweiten Peptidkette ausbildet. Bei grampositiven Bacteria findet man dagegen **Interpeptidbrücken** unterschiedlicher Zusammensetzung zwischen den Peptiden zweier Peptidoglykanketten. Außerdem tritt hier häufig Lysin an Stelle von Diaminopimelinsäure als Diaminosäure auf (Abb. 2.**7b**). Durch die Vernetzung der Polysaccharidketten über die Peptidbrücken entsteht ein die Zelle umhüllendes Riesenmolekül, der **Mureinsacculus**.

Das Bauprinzip des Peptidoglykans ist bis auf die Unterschiede in den Peptidbrücken bei gramnegativen und grampositiven Bacteria identisch, im Hinblick auf den Peptidoglykangehalt der Zellhülle gibt es jedoch große Unterschiede (Abb. 2.**8**): Bei den **gramnegativen Bacteria** besteht der stabile Mureinsacculus nur aus **ein bis zwei Schichten Peptidoglykan** und die dem Mureinsacculus aufgelagerte äußere Membran macht den Hauptteil der Zellhülle aus. Im Gegensatz

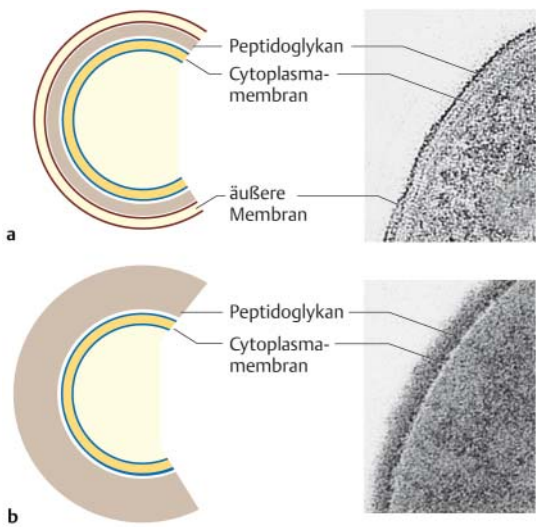


Abb. 2.**8** Die Zellwand gramnegativer und grampositiver Bacteria. **a** *E. coli*, **b** *Streptococcus*. (TEM-Aufnahmen: Vergr. 210 000fach, 150 000fach, aus Plattner, Hentschel, Thieme 2006)

dazu besitzen **grampositive Bacteria** bis zu **25 Schichten Peptidoglykan** und der Mureinsacculus ist die dominierende Struktur ihrer Zellhülle.

Der Mureinsacculus bildet das **rigide Exoskelett** der Bacteria. Da normalerweise die Konzentration gelöster Substanzen im Cytoplasma der Zellen deutlich höher ist als im Außenmedium, strömt Wasser seinem Konzentrationsgradienten folgend in die Zellen ein. Diesem Wassereinstrom stellt sich der Mureinsacculus entgegen, und es baut sich ein Innendruck oder **Zellturgor** auf, für den Werte von ca. 5 atm bei *E. coli* und von bis zu 25 atm in grampositiven Bacteria gemessen wurden. Anders als die flexible Cytoplasmamembran vermag der kovalent vernetzte Mureinsacculus diesem Druck standzuhalten. Er steht jedoch dauernd unter mechanischer Belastung und bei Schwächung seiner Struktur drohen die Zellen zu platzen (Zelllyse).

Lysozym spaltet die β1→4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure in den Polysaccharidketten des Peptidoglykans und zerstört damit dessen Struktur. In hypotonischem Medium (Konzentration gelöster Substanzen im Cytoplasma höher als im extrazellulären Raum) führt Lysozym daher zur Lyse der Zellen. Durch die Wahl eines isotonischen Mediums (Konzentration gelöster Substanzen in extrazellulären Raum und im Cytoplasma identisch) kann jedoch die Lyse der Zellen verhindert werden und man erhält zellwandlose **Protoplasten**. Haften der Zellmembran noch Reste der Zellwand an, so spricht man von Sphäroplasten. Lysozym findet sich in den Körpersekreten von Tieren, z. B. Speichel und Tränenflüssigkeit, und dient dort der Abwehr pathogener Bakterien. Auch einige Bakterienviren tragen Lysozymgene. Das Lysozym sorgt hier für die Freisetzung der Viren aus der Wirtszelle.

Das Peptidoglykan ist auch der Angriffsort des Antibiotikums **Penicillin**. Im Gegensatz zum Lysozym zerstört Penicillin jedoch nicht das fertige Peptidoglykangerüst, sondern stört die korrekte Ausbildung der Peptidbrücken während der Neusynthese des Wandmaterials (S. 435). Entsprechend führt Penicillin auch nur bei wachsenden Bakterienzellen, die ihre Zellwand erweitern, zur Zelllyse, während ruhende Zellen unversehrt bleiben.

Eine Besonderheit stellen die **Mycoplasmen** dar, eine Gruppe der Bacteria, die kein Peptidoglykan besitzen und kein Exoskelett ausbilden. Stammesgeschichtlich werden sie zu den grampositiven Bacteria mit niedrigem chromosomalen GC-Gehalt (Firmicutes, S. 78) gerechnet. Mycoplasmen sind trotz fehlenden Exoskeletts deutlich widerstandsfähiger gegenüber osmotischer Lyse als Protoplasten. Dafür sind Steroide in der Cytoplasmamembran der Mycoplasmen verantwortlich, die diese strukturell stabilisieren (S. 27).

Die unterschiedliche Dicke ihrer Peptidoglykanzellwand ist der Grund dafür, dass sich grampositive und gramnegative Bacteria durch die **Gramfärbung** unterscheiden lassen (Abb. 2.**9**). Bei dieser Färbemethode werden zuerst alle Zellen eines hitzefixierten Bakterienausstrichs (S. 300) mit **Kristallviolett** violett/blau angefärbt. Mit anschließend zugesetztem **Jod** bildet sich ein Lack, ein wasserunlöslicher Kristallviolett-Jod-Komplex. Der folgende Waschschritt mit **Alkohol** ist entscheidend für die Differenzierung: Alkohol entzieht dem Mureinsacculus Wasser, sodass er stark zusammenschrumpft. Bei grampositiven Bacteria mit ihren zahlreichen

a

Färbeschritt	Aussehen der Bakterien	
	grampositiv	gramnegativ
vor der Färbung		
1. Färbung (Kristallviolett)		
nach Behandlung mit Alkohol		
nach Gegenfärbung (Safranin)		

b



Abb. 2.**9** **Gramfärbung.**

Peptidoglykanschichten führt das dazu, dass der Mureinsacculus gänzlich undurchlässig wird und der blaue/violette Farbstoffkomplex in den Zellen zurückgehalten wird. Im Gegensatz dazu behält der dünne Mureinsacculus der gramnegativen Bacteria auch nach Dehydratisierung noch unzählige Poren, durch die der Farbstoffkomplex ausgewaschen werden kann. Diese Zellen können dann mittels eines zweiten Farbstoffes (Safranin, rot) gegengefärbt werden, sodass sie lichtmikroskopisch differenziert werden können. Untersucht man die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop, kann auf die zweite Färbung verzichtet werden. ◀

Die Zellwände der Archaea

Auch die Archaea besitzen rigide Zellwandsacculi, jedoch findet sich bei ihnen **kein universell verbreitetes Zellwandpolymer**. In keinem Fall wird Murein gebildet, daher sind alle Archaea resistent gegenüber Lysozym und Penicillin. Nur bei einigen Vertretern der Methan bildenden und der halophilen Archaea wurden Zellwände aus Polysacchariden gefunden. Einige *Methanobacterium*-Spezies bilden Zellwände aus einem Polysaccharid, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Peptidoglykan der Bacteria als **Pseudopeptidoglykan** oder **Pseudomurein** bezeichnet wird (Abb. 2.**10**). Auch hier sind Zuckerketten über Peptidbrücken verknüpft. Die Zuckerketten enthalten jedoch an Stelle der Muraminsäure Talosaminuronsäure, die alternierend β1→3-glykosidisch mit N-Acetylglucosamin verknüpft ist. In den Peptidbrücken finden sich keine D-Aminosäuren.

Weit verbreitet unter den Archaea sind Zellwände aus Proteinen oder Glykoproteinen. Eine spezielle, membranständige Domäne dieser Proteine verankert

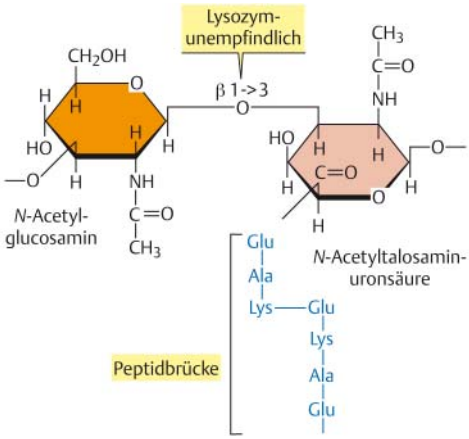


Abb. 2.**10** **Zellwände der Archaea.** Die Struktur des archaebakteriellen Pseudomureins (*Methanobacterium*).

sie an der Cytoplasmamembran. Die Zellwand wird meist aus einer einlagigen Schicht einer einzigen (Glyko-)Proteinspezies gebildet. Diese Schicht wird als **Surface-Layer** oder **S-Schicht** bezeichnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen auf der Zelloberfläche solcher Archaea eine hexagonale oder viereckige Musterung, die das Ergebnis einer streng geordneten Zusammenlagerung der (Glyko-)Proteine ist. Man spricht auch von einer parakristallinen Oberflächenschicht.

Mit den Gattungen *Thermoplasma* und *Ferroplasma* existieren auch bei den Archaea Organismen ohne Zellwand, die zudem extrem thermophil und acidophil sind. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber osmotischem Stress und extremen Umweltbedingungen wird durch die besondere Struktur ihrer Cytoplasmamembran (S. 26, Abb. 2.**3b**) erreicht.

Die äußere Membran der gramnegativen Bacteria

Dem einlagigen Mureinsacculus ist in der Zellhülle der gramnegativen Bacteria eine **äußere Membran** aufgelagert. Wie die Cytoplasmamembran besteht auch diese äußere Membran aus Molekülen mit lipophilen und hydrophilen Bereichen, die in wässrigem Milieu eine Doppelschicht ausbilden (S. 26). Im Unterschied zur Cytoplasmamembran ist die äußere Membran jedoch asymmetrisch aufgebaut, d. h. inneres und äußeres Membranblatt zeigen eine unterschiedliche Zusammensetzung. Das innere Membranblatt besteht aus Phospholipiden. Eingelagerte Lipoproteine (Murein-Lipoprotein) stellen eine kovalente Verbindung zum Mureinsacculus her. Das äußere Membranblatt der äußeren Membran besteht dagegen fast ausschließlich aus dem komplexen **Lipopolysaccharid** (LPS, Abb. 2.**11**), in dessen Struktur drei Abschnitte zu unterscheiden sind: Das

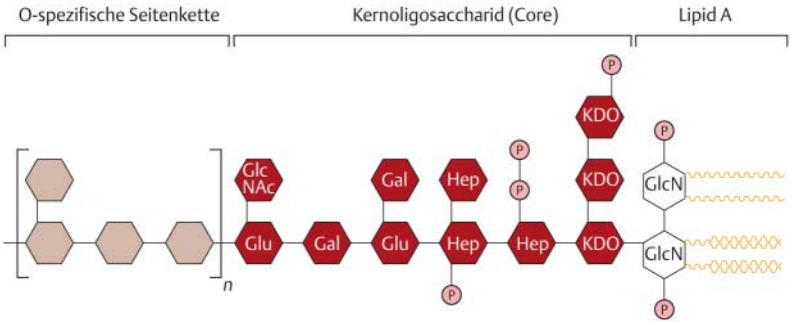


Abb. 2.**11** **Struktur des Lipopolysaccharids der äußeren Membran gramnegativer Bacteria.**

Lipid A, der lipophile Teil des Moleküls, **Kern-Oligosaccharid** und **O-spezifische Seitenkette**, die zusammen die dem Außenraum zugewandte hydrophile Polysaccharidkette bilden.

Das **Lipid A** besteht aus zwei phosphorylierten Glucosaminresten (β1→6-glykosidisch verbunden), an die sechs Fettsäurereste geknüpft sind. Das **Kern-Oligosaccharid** ist über die Zuckersäure 2-Keto-3-desoxyoctonsäure mit dem Lipid A verbunden. In der Kernregion sind neben Hexosen typischerweise auch Heptosen vertreten. Die **O-spezifische Seitenkette** zeichnet sich durch eine hohe Variabilität auch innerhalb einer Spezies aus. So wiederholen sich hier Einheiten aus vier oder fünf Zuckerresten, auch verzweigt miteinander verknüpft, in variabler Anzahl. Als ungewöhnliche Bestandteile kommen Didesoxyzucker vor.

Durch den Polysaccharidanteil des LPS besitzen gramnegative Bacteria eine hydrophile Zelloberfläche, die hydrophobe Agentien wie etwa die Gallensäuren der Säuger oder einige Antibiotika abweist. Die O-spezifische Seitenkette des LPS ist zudem diejenige Oberflächenstruktur, die als Antigen wirkt, d. h. die das Immunsystem von Säugetieren zur Bildung von Antikörpern anregt. Durch die hohe Variabilität in der Zuckerzusammensetzung der O-spezifischen Seitenkette entgehen **pathogene Organismen** dem Immunsystem des Wirtes. Durch Analyse der Struktur der O-spezifischen Seitenkette können für pathogene Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Salmonella* oder *Shigella* verschiedene **Serotypen** identifiziert werden, also solche Stämme, die sich nur in ihren antigenen Eigenschaften unterscheiden. Bei pathogenen, gramnegativen Organismen wird das Lipopolysaccharid auch als **Endotoxin** bezeichnet, da es eine toxische Wirkung auf den Wirt ausübt. Dabei beruht die Toxizität auf dem Lipid A-Anteil des LPS, der nach Lyse der Zellen freigesetzt wird. Das Endotoxin ruft eine allgemeine Entzündungsreaktion hervor und kann einen septischen Schock im Wirtsorganismus auslösen.

Die äußere Membran der gramnegativen Bacteria stellt eine wirksame Permeabilitätsbarriere dar, sodass zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran ein zusätzlicher, von der Zelle kontrollierter Reaktionsraum entsteht, der als **Periplasma** oder **periplasmatischer Raum** bezeichnet wird (Abb. 2.**12a**). In

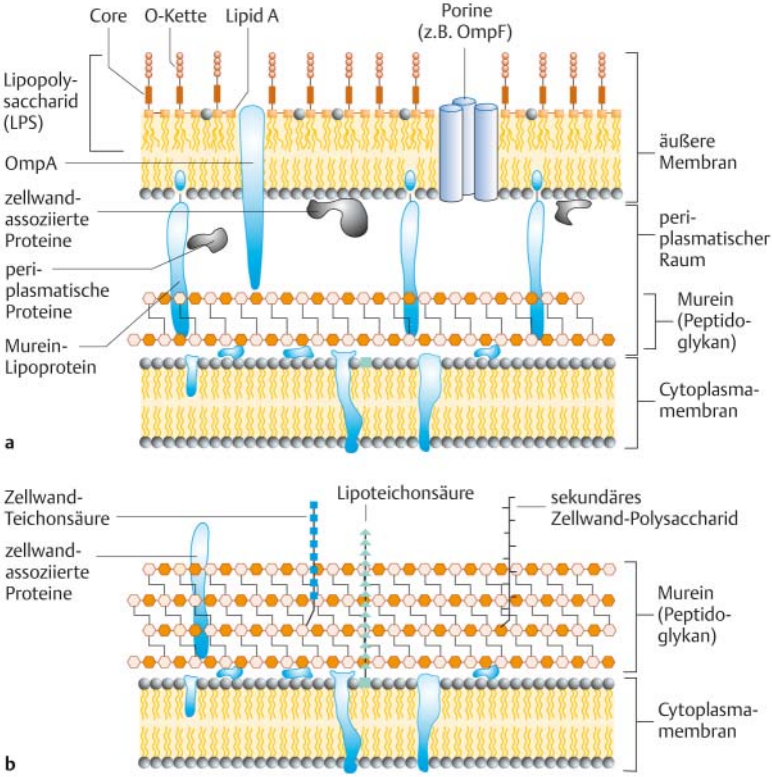


Abb. 2.**12** **Struktureller Aufbau der Zellhülle der Bacteria. a** Gramnegative Bacteria, **b** grampositive Bacteria.

diesem Kompartiment befinden sich neben dem stark hydrierten Mureinsacculus zahlreiche Proteine, die über die Cytoplasmamembran ausgeschieden werden und im Periplasma bestimmte Funktionen erfüllen. Dazu gehören hydrolytische Enzyme, die den Abbau verschiedener Nährstoffe einleiten, Bindeproteine, die den in der Cytoplasmamembran sitzenden Transportproteinen unterschiedliche Verbindungen zuliefern, oder Chemorezeptoren, die an der Chemotaxis beteiligt sind. All diese Proteine werden durch die äußere Membran im Periplasma zurückgehalten. Hydrophile Verbindungen bis zu einer Größe von 600–700 Dalton passieren die äußere Membran durch **Porine** (Abb. 9.**1**). Diese bilden, aus drei identischen Proteinuntereinheiten aufgebaut, wassergefüllte Kanäle, durch die die verschiedenen Verbindungen entlang ihrem Konzentrationsgradienten ins Periplasma diffundieren können.

Besonderheiten der Zellwände grampositiver Bacteria

Die herausragende Struktur der Zellwand grampositiver Bacteria ist der vielschichtige Mureinsacculus. In diesen sind gewöhnlich noch weitere Polysaccharidverbindungen (sekundäre Zellwandpolysaccharide) eingelagert. Weit verbreitet sind Teichon- und Teichuronsäuren. **Teichonsäuren** (Abb. 2.**13a**) sind Polymere aus Polyalkoholen (Ribitol oder Glycerin) und Phosphatgruppen, die alternierend durch Phosphatesterbindungen verknüpft sind. An weitere Alkoholfunktionen der Polyalkohole sind Zucker und Aminosäuren gebunden.

Teichuronsäuren bestehen aus Zuckersäuren. Mit ihren zahlreichen Phosphat- bzw. Carboxylgruppen verleihen Teichon- und Teichuronsäuren der Zelloberfläche der grampositiven Bacteria eine negative Ladung, durch die zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} gebunden werden. Einige Teichonsäuren sind kovalent an Phospholipide der Cytoplasmamembran gebunden und werden als **Lipoteichonsäuren** bezeichnet.

Der Aufbau der Zellwand grampositiver Bacteria ist in Abb. 2.**12b** zusammengefasst.

Eine Besonderheit unter den grampositiven Bacteria stellt eine als **Mycolata** zusammengefasste Gruppe von Organismen dar, zu der die Gattungen *Mycobacterium*, *Corynebacterium* und *Nocardia* gehören. Deren Zellwand zeichnet sich durch einen sonst bei grampositiven Organismen nicht zu findenden hohen Gehalt an Lipiden aus, die den Zellen eine hydrophobe Oberfläche verleihen. Bei diesen Lipiden handelt es sich um sogenannte **Mycolsäuren**, langkettige β-Hydroxy-Fettsäuren mit einem langkettigem Alkylrest am α-C-Atom (Abb. 2.**13b**). Tatsächlich bilden die Mycolsäuren auf der Außenseite des Mureinsacculus eine Doppelschicht, also eine Struktur analog zur äußeren Membran der gramnegativen Bacteria. Dazu passend wurden in der Zellwand Mycolsäure-bildender Organismen Porin-ähnliche Proteine gefunden. Ein je nach Organismus unterschiedlich großer Anteil der Mycolsäuren der inneren Schicht der Doppelschicht ist kovalent über Polysaccharidketten vorwiegend aus Galactose und Arabinose (Arabinogalactan) an das Peptidoglykan gebunden. Die restlichen Mycolsäuren liegen frei als Trehalosekonjugate in innerer und äußerer Schicht der Doppelschicht vor. Der Lipidgehalt ihrer Zellwand ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass Mykobakterien, darunter auch der Erreger der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*), aggressiven Stoffen wie starken Basen und Phenol widerstehen können.

Mykobakterien werden durch den Nachweis ihrer **Säurefestigkeit** (Ziehl-Neelsen-Färbung) identifiziert: Sie behalten die Färbung mit dem basischen Farbstoff Fuchsin (mit Phenol, um das Eindringen in die Lipidschicht zu erleichtern) auch nach Behandlung

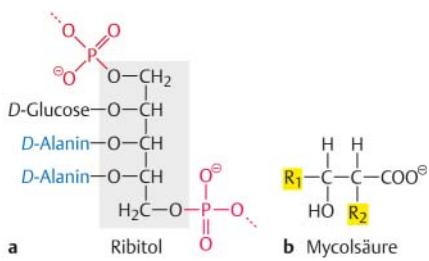


Abb. 2.**13** **Zellwandbestandteile.**
a Ribitolsäure aus *Bacillus subtilis*.
b Mycolsäuren aus *Mycobacterium* und *Corynebacterium*.

mit einem Säure/Alkoholgemisch bei. Die Färbung der Zellen beruht auf der Bindung des positiv geladenen Fuchsins an die Carboxylatgruppe der Mycolsäure. Im Gegensatz dazu sind Corynebakterien, die ebenfalls Mycolsäuren bilden, nicht säurefest. Ihre Mycolsäuren unterscheiden sich von denen der Mycobakterien durch kürzere Fettsäureketten, ein geringerer Anteil der Mycolsäuren ist an den Mureinsacculus gebunden. Daraus resultierende Unterschiede in der Struktur der gebildeten Lipidschicht müssen für das andersartige Verhalten der Corynebakterien im Säurefestigkeitstest verantwortlich sein.

Surface(S)-Layer der Bacteria

Viele Vertreter der Bacteria tragen auf ihrer Zelloberfläche eine Proteinschicht, die als **Surface(S)-Layer** bezeichnet wird und aus einer einzigen Proteinsorte in zweidimensionaler, parakristalliner Anordnung besteht. Zellhüllen aus regelmäßig angeordneten Proteinen sind auch bei den Archaea verbreitet (S. 35) und werden dort ebenfalls als S-Layer bezeichnet. Allerdings erfüllen sie bei diesen Organismen die essentielle Funktion eines mechanischen Stützskeletts für die Zellen. Bei den Bacteria, die als Stützskelett über den Mureinsacculus verfügen, sind die S-Layer nicht essentiell und werden unter Laborbedingungen häufig nicht gebildet. Aufgrund der zahllosen Poren definierter Größe zwischen den Proteinen besteht die Funktion der S-Layer wahrscheinlich darin, als eine Art Sieb Moleküle oder Partikel ab einer bestimmten Größe von der Zelle fernzuhalten (z. B. Viren) oder auch von der Zelle gebildete und ausgeschiedene Moleküle in der Nähe der Zelle zurückzuhalten (z. B. Exoenzyme).

Bei grampositiven Bacteria sind spezielle sekundäre Zellwandpolysaccharide nachgewiesen, die kovalent mit dem Mureinsacculus verbunden sind und durch nicht kovalente Interaktion die Proteine der S-Layer an den Mureinsacculus binden. Die S-Layer-Proteine grampositiver Bacteria sind außerdem häufig glykosyliert. Die Glykosylketten können aus bis zu 150 Zuckern bestehen. Sie weisen in ihrer Struktur Ähnlichkeit mit dem Polysaccharidanteil des Lipopolysaccharids gramnegativer Bacteria auf. So besitzen die Glykosylketten der S-Layer-Proteine eine im Aufbau wenig variable Region und eine terminale, in Bezug auf die Zuckerbausteine und ihre Anordnung hochvariable Region. Es ist daher anzunehmen, dass diese Strukturen in Säugern als Antigen wirken und ihre hohe Variabilität dazu dient, dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen.

2.3.3 Exopolymere

Die Zellen vieler Prokaryoten sind in eine Matrix aus **Exopolymeren** (meist **Exopolysaccharide**, seltener **Exopolypeptide**) eingebettet. Ist diese Zellumhüllung starr, fest an die Zelle gebunden und so dicht gepackt, dass kleine Partikel wie Tuscheteilchen nicht eindringen können, so spricht man von einer **Kapsel**. Im Gegensatz dazu bestehen **Schleime** aus flexiblerem Material, sie sind nicht an die Zelle gebunden und schließen kleine Partikel nicht aus. Kapseln und Schleime sind nicht essentiell, sie werden häufig auch nur dann gebildet, wenn über die

Nährstoffe im Kulturmedium die entsprechenden Bausteine für die Synthese der Exopolymere verfügbar sind.

2

Kapseln und Schleimen kommen vielfältige Aufgaben zu. Sie bieten den von ihnen umhüllten Zellen **Schutz vor Austrocknung**, da sie in starkem Maße Wasser binden. Sie erschweren den Angriff von Antibiotika. Mit ihrer Hilfe **maskieren** pathogene Organismen die Strukturen ihrer eigentlichen Zelloberfläche und können so dem Immunsystem des Wirts entgehen. Schließlich entstehen durch die Schleimeinbettung Zellaggregate, die auf Oberflächen zu ausgedehnten **Biofilmen** (S. 265) heranwachsen können. *Leuconostoc mesenteroides*, ein heterofermentatives Milchsäurebakterium, umgibt sich mit einer Schleimschicht aus Dextran (Glucose, α1→6-glykosidische Bindung).Voraussetzung ist, dass im Kulturmedium das Disaccharid Saccharose im Überschuss vorhanden ist. Einige Essigsäurebakterien (*Acetobacter*) bilden Cellulose (Glucose, β1→4-glykosidische Bindung) als Exopolysaccharid. Xanthan, eine mit Trisaccharid-Seitenketten substituierte Cellulose, wird von *Xanthomonas campestris*, einem zu den Pseudomonaden gehörenden Bakterium, synthetisiert. Polypeptid-Kapseln findet man bei einigen Bacillus-Arten.

Plaques auf dem menschlichen Zahnschmelz liefern ein anschauliches Beispiel für die Bedeutung einer extrazellulären Polysaccharidmatrix für die bakterielle Besiedelung eines besonderen Habitats. Die Zähne tragen zum Schutz des Zahnschmelzes eine dünne Schicht aus adsorbierten Speichelproteinen, die als **Pellikel** bezeichnet wird und die von einigen Streptokokkenarten zur Anheftung an die Zahnoberfläche genutzt wird. Die Bakterien nutzen Saccharose aus Nahrungsresten, um das Polyfructan **Laevan** zu synthetisieren. Dieses bildet die extrazelluläre klebrige Polysaccharidmatrix, in der die Bakterien geschützt sowohl gegen mechanische Ablösung durch Zunge und Speichel als auch gegen die antimikrobiellen Enzyme Lysozym und Lactoperoxidase zu dicken Zahnbelägen, den Plaques, heranwachsen können. Im Innern der Plaques herrschen durch die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen anaerobe Bedingungen, und die dichte Polysaccharidmatrix behindert die Diffusion von Sauerstoff, sodass auch obligat anaerobe Bakterien wachsen und zur Ausdehnung der Plaques beitragen. Die Vergärung von Glucose zu Milchsäure ist schließlich verantwortlich für die Zerstörung des Zahnschmelzes (**Karies**) durch die Plaquebakterien. ◀

Die bakteriellen Exopolysaccharide **Xanthan** und **Dextran** sind auch von wirtschaftlichem Interesse und werden auf biotechnologischem Weg hergestellt. Xanthan, das aus einem vielfach wiederholten Baustein aus fünf Hexoseresten besteht, bildet den extrazellulären Schleim des pflanzenpathogenen Bakteriums *Xanthomonas campestris* und wird in der Lebensmittelindustrie als **Verdickungsmittel** eingesetzt. Es wird vom Menschen nicht verstoffwechselt. Aufgrund seiner Quellfähigkeit wird es auch bei der Erdölförderung zum Austreiben des Öls genutzt.

Peptidoglykan (Murein): Ketten aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure über Peptidbrücken vernetzt; bildet den Mureinsacculus, die mechanisch belastbare Zellwand der Bacteria.
Lysozym: Enzym, das die β1→4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure im Peptidoglykan spaltet.
Penicillin: Antibiotikum des Pilzes *Penicillium chrysogenum*; verhindert die Ausbildung der Peptidbrücken im Peptidoglykan.
Protoplasten: Zellen ohne Zellwand; nur von Cytoplasmamembran umhüllt; osmotisch labil.
Gramfärbung: Methode zur Anfärbung von Bakterien; erlaubt die Differenzierung aufgrund der Stärke des Mureinsacculus.
Gramnegative Bacteria: 1-schichtiger Mureinsacculus.
Grampositive Bacteria: Mureinsacculus aus bis zu 25 Schichten Peptidoglykan.
Mycoplasmen: Gruppe von Bakterien ohne Mureinsacculus; gehören zu den grampositiven Bacteria.
Pseudopeptidoglykan (Pseudomurein): Zellwandpolysaccharid einiger Methan bildender Archaea; strukturell dem Peptidoglykan der Bacteria ähnlich, jedoch N-Acetyltalosaminuronsäure an Stelle von N-Acetylmuraminsäure.
Surface(S)-Layer: Oberflächenschicht aus einer einzigen (Glyko)-Proteinspezies in parakristalliner Anordnung; bei vielen Archaea die eigentliche, mechanisch belastbare Zellwandstruktur; S-Layer sind auch bei den Bacteria weit verbreitet, hier jedoch nicht essentiell.
Äußere Membran gramnegativer Bacteria: Die Zelle umhüllende, dem Mureinsacculus aufgelagerte Lipiddoppelschicht.
Lipopolysaccharid: Komplexes Lipid der äußeren Membran gramnegativer Bacteria; Lipidanteil: Lipid A, in äußeres Blatt der Lipiddoppelschicht eingelagert, wirkt in Säugern toxisch (Endotoxin), wenn durch Lyse der Bakterienzelle freigesetzt; Polysaccharidanteil: der Umgebung zugewandt; besteht aus Kern-Oligosaccharid und hochvariabler O-spezifischer Seitenkette.
Serotypen: Stämme einer Bakterienspezies, die sich nur durch ihre antigenen Eigenschaften unterscheiden.
Teichon-, Teichuronsäuren: Sekundäre Zellwandpolysaccharide grampositiver Bacteria; in Murein eingelagert; tragen Säurefunktionen: Phosphatgruppen (Teichonsäuren), Carboxylgruppen von Zuckersäuren (Teichuronsäuren).
Mycolsäuren: Spezielle Lipide der Zellwand einiger grampositiver Bacteria (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*).
Säurefestigkeit: Färbetest zur Identifizierung von Mykobakterien.
Exopolymere: Von Bakterien gebildete, außerhalb der Zellen angehäufte Polymere aus Polysacchariden oder Peptiden.
Kapsel: Starre, dicht gepackte Zellumhüllung aus Exopolymeren.
Schleim: Flexible, nicht klar umgrenzte Matrix aus Exopolymeren, in die Zellen eingebettet sind.

2.3.4 Bewegungsformen

Viele eukaryotische Mikroorganismen bewegen sich schwimmend mit **Geißeln** oder **Cilien**, die aus Mikrotubuli aufgebaut sind, Schleimpilze und Amöben bewegen sich kriechend durch Ausstülpung des Cytoplasmas. Als Energiequelle dient ATP. Die **Gleitbewegung** einiger Prokaryoten auf festen Oberflächen wird durch unterschiedliche Mechanismen bewirkt: Cyanobacteria und Myxobakterien gleiten mithilfe einer Schleimschicht, bei anderen gramnegativen Bacteria vermitteln zwischen den beiden Membranen eingelagerte Proteine die Bewegung, wobei als Energielieferant der Protonengradient dient. Die koordinierte gleitende Bewegung zahlreicher Zellen in Biofilmen oder zur Fruchtkörperbildung bei Myxobakterien wird durch **Typ-IV-Pili** vermittelt. Spirochaeten besitzen **Endoflagellen**, deren Rotation abwechselnd die Vorwärtsbewegung und das Zusammenkrümmen des Zellkörpers bewirken. Verschiedene Gruppen von Bakterien bewegen sich durch die Rotation einer oder mehrerer **Flagellen**. Die Flagellen bestehen aus Filament, Haken und Basalkörper. Hauptbestandteil des Filaments von Bacteria ist Flagellin, als Energiequelle dient ein Ionengradient über der Cytoplasmamembran. Die Bewegungsrichtung kann durch äußere Reize beeinflusst werden.

Bewegung bei eukaryotischen Mikroorganismen

Viele einzellige **Eukaryoten** bewegen sich schwimmend mithilfe von **Geißeln** oder **Cilien**, deren Aufbau identisch ist. Beide bestehen aus neun peripheren Doppeltubuli, die kreisförmig um zwei einzelne Mikrotubuli angeordnet (**9+2-Muster**, 🕮 *Biochemie*, *Zellbiologie*) und untereinander durch weitere Proteine verbunden sind (Abb. 2.**14**). Geißeln sind jedoch deutlich länger als Cilien und meist nur in ein oder zwei Exemplaren pro Zelle vorhanden, während eine Zelle mehrere Hundert Cilien tragen kann. Diese Grundstruktur wird von der

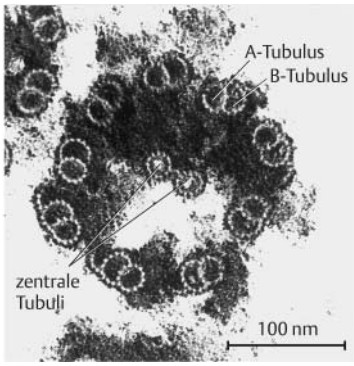


Abb. 2.**14** **Eukaryotische Flagelle.** Querschnitt durch ein Flagellum einer Spermatide der Mehlmotte (*Ephestia kuehniella*). Die Protofilamente der Mikrotubuli sind durch Inkubation mit Gerbsäure sichtbar gemacht. Man erkennt das zentrale Paar der Mikrotubuli und die peripheren aus dem kompletten A- und dem inkompletten B-Tubulus zusammengesetzten Doppeltubuli. (EM-Aufnahme von K. W. Wolf, Kingston, Jamaica).

Cytoplasmamembran umgeben und geht von einem Basalkörper mit neun kreisförmig angeordneten Dreifachtubuli aus, in dem die zentralen Mikrotubuli fehlen. Das Schlagen der Geißel wird durch das Motorprotein Dynein bewirkt, das unter **ATP-Verbrauch** die Mikrotubuli verschiebt und so eine lokale Krümmung der Geißel verursacht. Dieser Vorgang setzt sich wellenförmig meist über die gesamte Länge der Geißel fort, die daraufhin eine **Ruderbewegung** durchführt. Abhängig von ihrer Insertion am vorderen bzw. hinteren Zellpol wirken eukaryotische Geißeln als **Zug-** oder **Schubgeißel**. Die **amöboide Bewegung** (📖*Biochemie, Zellbiologie*) von Schleimpilzen und Amöben ist mit Formveränderungen der Zellen verbunden. Die Bewegung erfolgt durch Fortsätze, die durch Ausstülpung des Cytoplasmas am Zellrand (Pseudopodien) entstehen, nachfolgend strömt das gesamte Cytoplasma mit dem Zellkern in den Fortsatz, sodass die Zelle in eine bestimmte Richtung verlagert wird, sie „kriecht". Bei einigen Gruppen sind an der amöboiden Bewegung **Actinfilamente** beteiligt und **ATP** dient als **Energiequelle**.

Bewegung bei Prokaryoten

Einige Prokaryoten aus der Entwicklungslinie Bacteria bewegen sich in wasserarmen Umgebungen, z. B: in Biofilmen, gleitend. Dabei lassen sich unterschiedliche **Gleitmechanismen** unterscheiden: Filamentöse Cyanobacteria wie *Oscillatoria* oder *Anabaena* stoßen über Poren an der Zellunterseite einen **Polysaccharidschleim** aus, der die Fortbewegung der Zelle auf einer festen Oberfläche vermittelt. Auch bei Myxobakterien, z. B. *Myxococcus*, lässt sich am hinteren Zellpol das Ausströmen von Schleimfäden beobachten, die bei der Gleitbewegung von einzelnen Zellen offenbar eine Rolle spielen. Vermutlich sind zusätzlich Proteinkomplexe, die sich entlang eines Filaments vom vorderen zum hinteren Zellpol bewegen, an dieser Bewegung beteiligt. Einige gramnegative Bacteria, z. B. *Cytophaga* oder *Flavobacterium*, bewegen sich bei Kontakt mit einer Oberfläche durch kleine Proteine (**Motoren**) zwischen innerer und äußerer Membran vorwärts, die über den Protonengradienten angetrieben werden. Eine weitere Form der Gleitbewegung, die bei der Ausdehnung von Bakterienkolonien auf Oberflächen und bei der Aggregation von Myxobakterien zur Fruchtkörperbildung eine Rolle spielt, wird durch Anheftung der Zellen an eine Oberfläche mit **Typ-IV-Pili** (s. u.) vermittelt, die sich zusammenziehen und wieder ausdehnen und so die Zelle ruckartig vorwärts bewegen (**twitching**, engl. to twitch: zucken, reißen).

Die spiraligen Zellen der **Spirochaeten** besitzen einen flexiblen Zellkörper, der von Cytoplasmamembran und Zellwand umgeben ist. An jedem Ende entspringen jeweils eine oder mehrere Flagellen, die sich als **Axialfilament** um den Zellkörper winden, ihr Aufbau ähnelt dem anderer bakterieller Flagellen (S. 45). Da die Flagellen innerhalb einer flexiblen Hüllmembran (äußere Membran) liegen, die den Zellkörper umgibt, werden sie als **Endoflagellen** bezeichnet (Abb. 2.**15**). Die typische **schraubenförmige Bewegung** der Spirochaeten kommt durch die

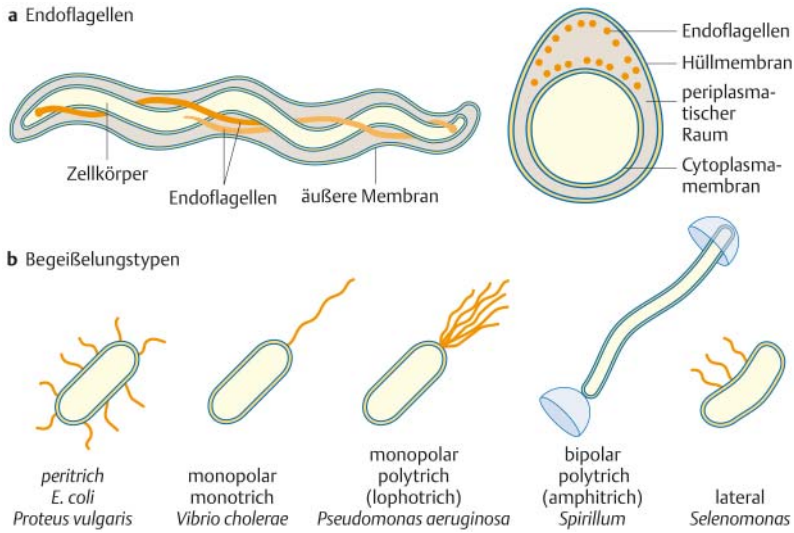


Abb. 2.**15** **Bakterielle Flagellen. a** Endoflagellen, **b** Begeißelungstypen.

Rotation der Endoflagellen zustande: Wenn alle Flagellen sich in die gleiche Richtung drehen, dreht sich die gesamte Zelle und schwimmt geradeaus, rotieren die an den gegenüber liegenden Polen inserierten Flagellen gegeneinander, kontrahiert sich die Zelle. Diese Bewegungsform ermöglicht den Spirochaeten, sich auch durch hoch visköse Medien zu bewegen, was insbesondere für die pathogenen Spezies beim Durchdringen von Schleimschichten in ihren eukaryotischen Wirtsorganismen von Bedeutung ist.

Die **Schwimmbewegung** vieler Prokaryoten erfolgt mithilfe von **Flagellen**, deren Aufbau und Funktion sich grundsätzlich von den Geißeln der Eukaryoten unterscheiden (S. 42). Flagellen sind sehr dünne, extrazelluläre Fäden, die nicht wie die eukaryotischen Geißeln von der Cytoplasmamembran umhüllt werden. Anhand der Anordnung der Flagellen und ihrer Anzahl werden verschiedene **Begeißelungstypen** unterschieden. Bei **peritricher** Begeißelung befinden sich zahlreiche Flagellen auf der gesamten Zelloberfläche, bei **polarer** Begeißelung sind die Flagellen entweder einzeln (**monotrich**) oder als Bündel (**polytrich**) an einem (**monopolar**) oder an den beiden gegenüberliegenden Zellpolen (**bipolar**) angeordnet, bei **lateraler** Begeißelung an den Zellseiten. Prokaryoten ohne Begeißelung sind **atrich**, bei einigen werden Flagellen nur unter bestimmten Bedingungen ausgebildet (s. u.).

Das Bodenbakterium *Geobacter metallireducens* wurde erstmalig 1987 bei Washington aus dem Potomac River isoliert. *G. metallireducens* **oxidiert** in metallhaltigen Böden **organische Verbindungen zu CO_2** und verwendet dabei Metallverbindungen, meist Eisen- oder Manganoxide, als terminalen Elektronenakzeptor (Metallatmung). *Geobacter* ist unter anderem von großem Interesse für **Entgiftungsprozesse**, da die Bakterien sowohl **aromatische Verbindungen** wie Petroleum abbauen, als auch hochgiftige **radioaktive Metallverbindungen**, beispielsweise Uranverbindungen, als Elektronenakzeptor nutzen können. Dabei werden diese in unlösliche Formen überführt und so aus dem Grundwasser entfernt. Lange nahm man an, dass *G. metallireducens* unbeweglich ist. Eine Genom-Analyse erbrachte jedoch den überraschenden Befund, dass alle für die Ausbildung von Flagellen nötigen Gene vorhanden sind. Wenn *Geobacter* in der näheren Umgebung nur unlösliche Fe(III)- oder Mn(IV)-Oxide zur Verfügung standen, bildeten die Bakterien nicht nur Flagellen aus, sondern bewegten sich mithilfe von **Metallsensoren**, für die weitere neu entdeckte Gene codieren, auch gezielt auf nutzbare Metallverbindungen zu. Offensichtlich wird die Bildung von Flagellen und damit die Beweglichkeit von *G. metallireducens* von der Verfügbarkeit reduzierbarer Metalloxide reguliert, die **Flagellen** sind also **induzierbar**. ◀

Aufbau und Synthese von Bacteria-Flagellen

Bacteria-Flagellen sind hohl und haben eine Länge zwischen 5 und 20 µm und einen Durchmesser von 18–24 nm. Sie bestehen aus drei morphologischen Komponenten: dem Filament, dem Haken und dem Basalkörper (Abb. 2.**16**). Das **Filament** ist aus helikal angeordneten Molekülen des Proteins **Flagellin** aufgebaut, dessen Molekulargewicht abhängig von der Spezies zwischen 30 und 60 kDa liegt, bei *E. coli* sind es 55 kDa. Die Windung der Helix ist entweder linkshändig (*E. coli*) oder rechtshändig (*Sinorhizobium meliloti*), der Abstand zwischen zwei benachbarten Windungen ist artspezifisch und jeweils konstant. Flagellin ist kein Motorprotein, das Filament ist in sich starr. Der **Haken** besteht ebenfalls aus einer einzigen Proteinart und bildet die Verbindung zwischen Filament und Basalkörper. Der **Basalkörper** verankert die Flagelle in der Cytoplasmamembran und fungiert als **Flagellenmotor**. Er besteht aus einem hohlen **zentralen Schaft**, der über mehrere Ringe in der Zellhülle gelagert ist. Der in der Ebene der Cytoplasmamembran liegende **MS-Ring** bildet zusammen mit den **FliG-Proteinen** des unterhalb der Cytoplasmamembran lokalisierten **C-Rings** den **Rotor** des Flagellenmotors. Da der Rotor fest mit dem zentralen Schaft verbunden ist, überträgt er seine Drehbewegung auf die gesamte Flagelle. Den **Stator** des Flagellenmotors bildet der **Mot-Komplex**, der den MS-Ring umgibt und aus den Proteinen MotA und dem fest in der Peptidoglykanschicht verankerten MotB besteht. Durch von MotA und MotB gebildete, radial angeordnete **Ionenkanäle** fließen Protonen oder bei alkalophilen Bakterien wie *Vibrio* Na^+-Ionen, die die Energie zur Erzeugung des Drehmoments liefern. Für eine Umdrehung müssen ca. 1000 Protonen durch den Protonenkanal fließen. Im Flagellenmotor wird so die elektrochemische Energie des transmembranalen Ionengradienten in mecha-

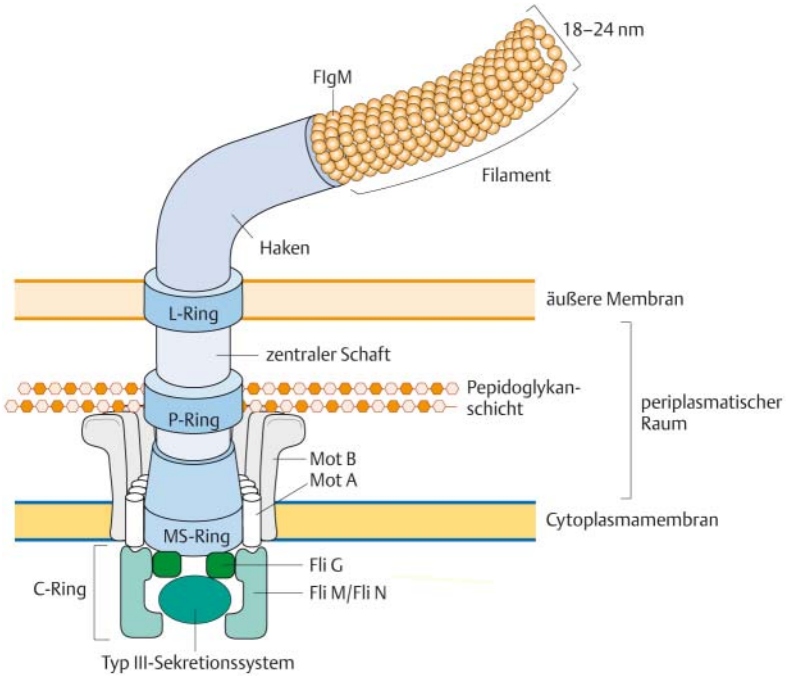


Abb. 2.**16** **Aufbau der Bacteria-Flagellen.**

nische Energie umgewandelt. Nach dem gleichen Prinzip funktionieren bakterielle ATP-Synthasen, die ebenfalls einen Ionengradienten zur Erzeugung eines Drehmoments nutzen (📖*Biochemie*, *Zellbiologie*). Über das zum C-Ring gehörende Protein FliM wird die Drehrichtung des Rotors gesteuert, die Komponenten des C-Rings (FliG, FliM, FliN) werden daher auch als **Switch-Komplex** bezeichnet. Gramnegative Bakterien besitzen als zusätzliche Drehlager für die Flagelle in der Peptidoglykanschicht den **P-Ring** und in der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Membran den **L-Ring**.

Die **Synthese** bakterieller Flagellen erfolgt mithilfe eines im MS-Ring des Basalkörpers lokalisierten **Typ III-Sekretionssystems**, über das nacheinander die an den Ribosomen synthetisierten Proteine für den Aufbau der Flagelle angeliefert werden. Dabei werden zuerst die Proteine für den zentralen Schaft und den Haken transportiert und zusammengebaut und nachfolgend die Flagellin-Monomere durch den hohlen Schaft nach außen befördert und an der Spitze in das wachsende Filament eingebaut. Bei vielen pathogenen gramnegativen Bakterien wie *Shigella* oder *Salmonella* vermitteln Typ III-Sekretionssysteme die Trans-

lokation von bakteriellen Effektorproteinen in die eukaryotischen Wirtszellen und stellen daher entscheidende Pathogenitätsfaktoren dar.

Andere Zellanhängsel sind Fimbrien und Pili, die unterschiedliche Funktionen haben. **Fimbrien** (auch: **Typ-I-Pili**) sind häufig in sehr großer Zahl pro Zelle vorhanden und dienen der Anheftung an Oberflächen oder bei pathogenen Bakterien an spezifische Rezeptoren der Wirtszellen, wo sie als Kolonisationsfaktoren wirken. Fimbrien sind dünner und mit 2–5 µm auch deutlich kürzer als Flagellen. Fimbrienproteine spielen als **F-Antigene** eine Rolle bei vielen bakteriellen Schleimhautinfektionen. **Pili** sind meist nur in ein bis zwei Kopien pro Zelle vorhanden und etwa 10 µm lang. Der **F-Pilus** (auch: Sexpilus) verbindet bei der Konjugation die beiden Zellen und vermittelt den Austausch von DNA. **Typ-IV-Pili** spielen eine Rolle bei bestimmten Gleitbewegungen (s. o.).

Bewegungsablauf und Chemotaxis bei Bacteria

Anders als die eukaryotischen Geißeln führen bakterielle Flagellen eine **Rotationsbewegung** aus, sodass die Zelle wie von einer Schiffsschraube angetrieben wird. Die Rotationsgeschwindigkeit erreicht bei peritrich begeißelten Zellen von *E. coli* ca. 15 000 rpm, monopolar begeißelte Vibrionen sind mit ca. 100 000 rpm deutlich schneller. Flagellen können **im Uhrzeigersinn** (cw, **c**lock**w**ise) oder **gegen den Uhrzeigersinn** (ccw, **c**ounter**c**lock**w**ise) rotieren. Die Änderung der Rotationsrichtung erfolgt zufällig oder als Reaktion auf einen äußeren Reiz. Bei peritrich begeißelten Bakterien wie *E. coli* bilden die Flagellen bei **Rotation gegen den Uhrzeigersinn** ein geordnetes Bündel, in dem **alle Flagellen koordiniert** zusammen wirken, sodass die Zelle geradlinig vorwärts schwimmt. Ändert sich der Drehsinn und die Flagellen rotieren **im Uhrzeigersinn**, fliegt das Flagellenbündel auseinander und die einzelnen Flagellen „ziehen" die Zelle jeweils in unterschiedliche Richtungen. Die Folge ist ein kurzzeitiges **Taumeln**, bei dem die Richtung zufällig verändert wird. Nach erneuter Umkehr der Drehrichtung ordnen die Flagellen sich wieder zum Bündel und die Zelle schwimmt in die neue Richtung. Bei polar begeißelten Bakterien, z. B. Spirillen, führt die Umkehr des Drehsinns auch zu einer Umkehr der Bewegungsrichtung. Das komplette Flagellenbündel stülpt sich um und die Zelle schwimmt rückwärts.

Der Bewegungsablauf von *E. coli* besteht aus einer regelmäßigen Abfolge von geradlinigen Schwimmbewegungen (Läufe) und zwischengeschaltetem Taumeln, das eine Richtungsänderung bewirkt. Der Mechanismus der Taumelbewegung ist abhängig von der Windungsrichtung der Flagellin-Helices. Die Abfolge von Läufen und Taumelbewegungen kann unter dem Einfluss eines äußeren Reizes so verändert werden, dass die Zelle sich in der Summe auf einen positiven Reiz (**Lockstoff**) zu oder von einem negativen Reiz (**Schreckstoff**) weg bewegt. Man bezeichnet dieses Verhalten entsprechend als positive bzw. negative **Chemotaxis** (Abb. 2.**17**). Die Wahrnehmung chemischer Reize erfolgt über Transmembranproteine in der Cytoplasmamembran, die einen zeitlichen Konzentrationsgradienten messen und die Information über eine Signaltransduktionskette an die Fli-Proteine (s. o.) weiterleiten. In Richtung des aufsteigenden Lockstoff-

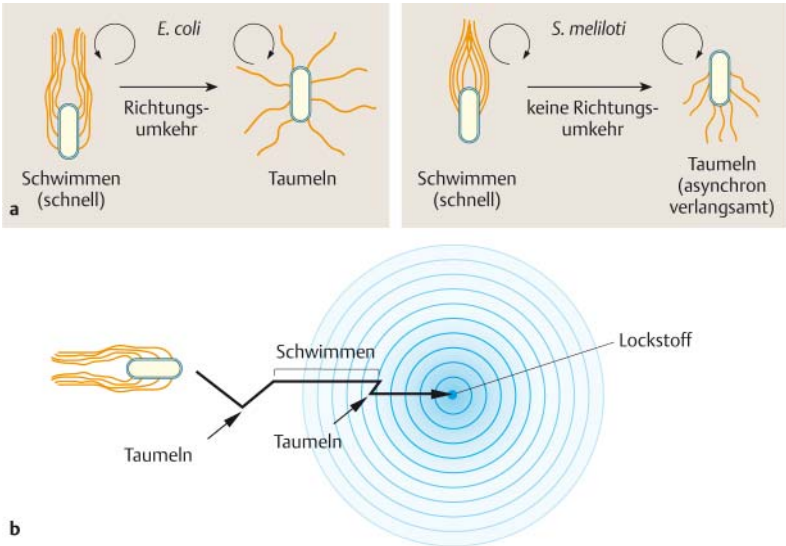


Abb. 2.**17** **Bewegungsablauf. a** Bei den linkshändigen Flagellen von *E. coli* erfolgt die geradlinige Schwimmbewegung bei Rotation gegen den Uhrzeigersinn, ein Wechsel zur Rotation im Uhrzeigersinn führt zum Taumeln. Bei den komplexen rechtshändigen Flagellen von *S. meliloti* findet dagegen keine Umkehr der Rotationsrichtung statt, die Flagellen rotieren sowohl während des Laufs als auch während des Taumelns stets im Uhrzeigersinn. Hier erfolgt der Wechsel vom Lauf zur Taumelbewegung durch die asynchrone Verlangsamung der Rotationsgeschwindigkeit einzelner Flagellen des geordneten Bündels, das daraufhin auseinander fällt. **b** Chemotaxis.

gradienten bzw. des absteigenden Schreckstoffgradienten wird dann die Dauer der Läufe verlängert und die Taumelhäufigkeit erniedrigt. Die Orientierung frei beweglicher Organismen nach dem Sauerstoffgehalt wird als **Aerotaxis** bezeichnet, phototrophe Organismen zeigen häufig **Phototaxis**. Als Sensor für den Sauerstoffgehalt fungiert die Cytochrom-Oxidase, Lichtsensoren sind Chlorophyll bei Cyanobacteria und Bakteriochlorophylle bei anoxygenen phototrophen Bakterien.

Aufbau und Synthese von Archaea-Flagellen

Auch zahlreiche Archaea besitzen Zellanhänge, die oft vereinfachend als **Archaea-Flagellen** bezeichnet werden. Für die Zellanhänge von *Pyrococcus furiosus* und *Methanocaldococcus jannaschii* (Abb. 2.**18**) konnte gezeigt werden, dass sie multifunktionell sind und Aufgaben wahrnehmen, die denen von Flagellen, Fimbrien und Pili der Bacteria entsprechen. Ihr Durchmesser liegt zwischen

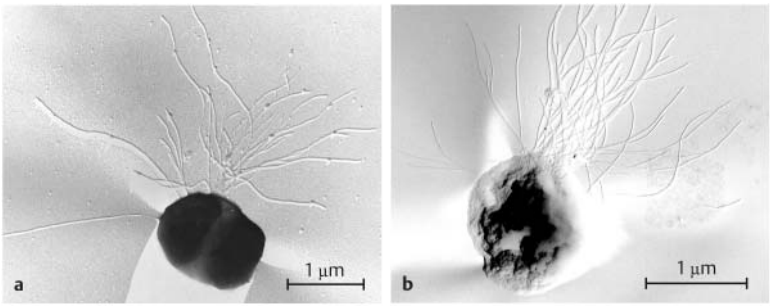


Abb. 2.**18** **Zellanhänge von Archaea.** *Pyrococcus furiosus* (**a**) und *Methanocaldococcus jannaschii* (**b**): Diese nahezu runden Kokken sind in der Regel stark begeißelt, mit bis zu 50 oder mehr Flagellen. Neuere Studien zeigen, dass diese multiplen Flagellen multifunktionell verwendet werden: Sie dienen der Bewegung, über Bündel aus ca. 50 Flagellen der Anheftung von zwei Zellen aneinander und der Anheftung der Zellen an natürliche Oberflächen, z. B. bei *Pc. furiosus* an Sandkörner, von denen die Zellen am Strand der Insel Vulcano isoliert wurden. (TEM-Aufnahmen von R. Rachel, Regensburg)

5 nm (Fimbrien) bis 10 nm bei *Pyrococcus* und *Archaeoglobus* und 13 nm bei *Sulfolobus*. Ob der unterschiedliche Durchmesser der Zellanhänge die unterschiedlichen Funktionen zur Folge hat, ist wahrscheinlich, aber nicht in allen Fällen nachgewiesen.

Wie Bacteria-Flagellen sind Archaea-Flagellen in der Cytoplasmamembran verankert, unterscheiden sich jedoch in Feinstruktur und Synthese. Archaea-Flagellen sind nicht hohl, ihre Filamente sind aus helikal angeordneten Monomeren von verschiedenen Homologen der **Archaea-Flagelline** FlaA und FlaB aufgebaut. Untersuchungen haben gezeigt, dass das Filament von *Halobacterium salinarum* linkshändig gewunden und der Abstand zwischen zwei Windungen kleiner ist als bei Bacteria. Im Unterschied zum Flagellin der Bacteria sind Archaea-Flagelline **glykosyliert** und werden als **Präflagelline** synthetisiert, die eine N-terminale Signalsequenz tragen. Erst durch die Abspaltung dieses Signalpeptids durch **spezifische Signal-Peptidasen**, die inzwischen in zahlreichen Euryarchaeota und Crenarchaeota gefunden wurden, entsteht das reife Archaea-Flagellin. Der Einbau der Monomere in das wachsende Filament erfolgt bei Archaea-Flagellen am basalen Ende und nicht wie bei Bacteria an der Flagellenspitze. Interessanterweise bestehen einige Ähnlichkeiten zwischen Archaea-Flagellen und bakteriellen Typ IV-Pili: Auch die Piline, aus denen Typ IV-Pili aufgebaut sind, werden als Präpiline synthetisiert und posttranslational glykosyliert. Die Signal-Peptidase, die die Präpilin-Signalsequenz abspaltet, zeigt Sequenzübereinstimmungen mit den Präflagellin-Signal-Peptidasen von Archaea. Wie die Archaea-Flagellen werden auch Typ IV-Pili von der Basis her synthetisiert. Möglicherweise verläuft auch der Export der Monomere in beiden Fällen ähnlich; dafür spricht, dass

eine Komponente der Archaea-Flagellen homolog zu einer ATPase ist, die bei Typ IV-Pili am Export der Piline beteiligt ist. Ein entscheidender Unterschied ist jedoch, dass Archaea-Flagellen im Gegensatz zu Typ IV-Pili eine **Rotationsbewegung** durchführen, die wie bei Bacteria-Flagellen über einen **Protonengradienten** angetrieben wird. Der genaue Ablauf von Synthese und Bewegungsmechanismus von Archaea-Flagellen ist Gegenstand aktueller Forschungsprojekte.

Bewegungsformen: Mikroorganismen können sich schwimmend, gleitend oder kriechend bewegen.
- **Eukarya:** Schwimmbewegung mit Geißeln oder Cilien, Aufbau aus Mikrotubuli (9+2-Prinzip), Geißeln wirken als Zug- oder Schubgeißel, Energiequelle ist ATP. Kriechbewegung bei Schleimpilzen und Amöben durch Ausstülpung des Cytoplasmas, Energiequelle ist ATP.
- **Bacteria:** Gleitbewegung bei Myxobakterien, Cyanobakterien und einigen anderen durch kleine rotierende Proteine zwischen innerer und äußerer Membran oder Typ-IV-Pili; Schwimmbewegung bei Spirochaeten durch Endoflagellen, die den Zellkörper als Axialfilament umwinden, bei anderen Bakterien durch extrazelluläre Flagellen.
- **Archaea:** Bisher nur Schwimmbewegung durch Flagellen bekannt.

Flagellen: Bestehen aus Filament, Haken und Basalkörper
- **Bacteria:** Filament ist hohl und hat einen Durchmesser von 18–24 nm, helikaler Aufbau aus Flagellin-Monomeren; Verlängerung erfolgt an der Flagellenspitze; Basalkörper fungiert als Motor, Bewegung durch Rotation der Flagellen, Wechsel zwischen Läufen und Taumeln, Energiequelle ist ein Ionengradient.
- **Archaea:** Filament ist nicht hohl und hat einen Durchmesser von 10–14 nm, helikaler Aufbau aus Monomeren verschiedener glykosylierter Archaea-Flagelline, Verlängerung erfolgt an der Flagellenbasis; Bewegung durch Rotation der Flagellen, Bewegungsmechanismus noch ungeklärt, Energiequelle ist ein Ionen(Protonen)gradient.

Begeißelungstypen: Peritrich: viele Flagellen auf der gesamten Zelloberfläche verteilt; monopolar monotrich: eine Flagelle an einem Zellpol, monopolar polytrich = lophotrich: Flagellenbündel an einem Zellpol; bipolar polytrich = amphitrich: je ein Flagellenbündel an jedem Zellpol; lateral: mehrere seitliche Flagellen.
Fimbrien: Auch Typ-I-Pili, dienen der Anheftung an Oberflächen oder Rezeptoren von Wirtszellen, meist in großer Zahl pro Zelle vorhanden.
Pili: Meist nur ein oder zwei pro Zelle, Beispiel: F-Pilus (auch Sexpilus) dient zur Herstellung von Zell-Zell-Kontakten bei der Konjugation; Typ-IV-Pili wirken bei Gleitbewegung mit.

2.3.5 Cytoskelett

Das **Cytoskelett** ist eine dynamische innere Stützstruktur aus flexiblen Filamenten und besteht bei Eukaryoten und Prokaryoten aus strukturell und teilweise auch funktionell homologen Elementen. Komponenten des Cytoskeletts sind an Bewegungen, Zellteilung, intrazellulären Transport und der Aufrecherhaltung der Zellform beteiligt.

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass nur in eukaryotischen Zellen ein dynamisches **Cytoskelett** aus flexiblen Filamenten vorhanden ist. Inzwischen konnte mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen werden, dass auch Bakterien alle aus Eukaryoten bekannten Elemente eines Cytoskeletts besitzen, und diese Homologe der entsprechenden eukaryotischen Elemente sind. Offensichtlich ist das Grundprinzip des Cytoskeletts bereits in der prokaryotischen Zelle entstanden und nicht, wie lange angenommen, erst nach Entstehen der ersten eukaryotischen Zelle.

Bei **Eukaryoten** besteht das Cytoskelett aus den drei Elementen Mikrotubuli, Mikrofilamenten und intermediären Filamenten (📖*Zellbiologie*, *Biochemie*). **Mikrotubuli** sind als Hohlzylinder aus dem Protein **Tubulin** aufgebaut. Sie sind mit verschiedenen anderen Proteinen assoziiert, darunter die Motorproteine Dynein und Kinesin. Mikrotubuli sind Bestandteil eukaryotischer Geißeln und Cilien und erfüllen Funktionen wie Vesikeltransport durch die Zelle oder Ausbildung des Spindelapparates während der Zellteilung. **Mikrofilamente** (auch: Actinfilamente) bestehen aus dem Protein **Actin** und sind meist netzartig unterhalb der Cytoplasmamembran angeordnet, wo sie für die Stabilität der Zelle sorgen und membranständige Proteine an ihrer Position fixieren. Bei Amöben sind sie an der Bewegung durch Membranausstülpungen (Pseudopodien) beteiligt. Gemeinsam mit ihrem Motorprotein Myosin steuern Mikrofilamente die Muskelbewegung und transportieren Vesikel über kurze Strecken innerhalb der Zelle. **Intermediäre Filamente** bestehen aus verschiedenen Proteinfilamenten, die eine besonders hohe Zugfestigkeit aufweisen. Sie sind insbesondere für die mechanische Stabilität vieler tierischer Zellen zuständig.

Das **bakterielle Cytoskelett** beinhaltet drei Klassen von Proteinfilamenten. Zuerst entdeckt wurde **FtsZ**, ein Protein, das strukturell dem eukaryotischen Tubulin ähnelt und wie dieses GTP bindet und hydrolysiert. FtsZ wurde sowohl in Bacteria als auch in Archaea nachgewiesen und ist für die Zellteilung essentiell (S. 263). Durch Polymerisation und Bildung des dynamischen Z-Ringes in der Zellmitte leitet FtsZ die für die Zellteilung notwendige Septumbildung ein. Dieser Prozess wird durch eine Reihe weiterer Proteine kontrolliert, darunter die **Min**-Proteine, die in *E. coli* durch die Inhibierung der FtsZ-Polymerisation eine Zellteilung in der Nähe der Zellpole verhindern (S. 264). Da in vielen eukaryotischen Zellen die Zellteilung durch die Ausbildung eines Actinringes initiiert wird, ent-

spricht FtsZ hier funktionell dem eukaryotischen Actin, obwohl es strukturell dem eukaryotischen Tubulin ähnelt. Strukturelle Homologe des eukaryotischen Actins sind die bakteriellen Proteine der **MreB**-Familie, die wie Actin ATP binden und hydrolysieren. MreB bildet helikale Filamente unterhalb der Cytoplasmamembran und bestimmt bei stäbchenförmigen Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentis* und *E. coli* die gestreckte Zellform. Außerdem wirkt MreB bei der Chromosomen-Segregation im Verlauf der Zellteilung mit. Die Ausbildung des Spindelapparates zur Trennung der Chromosomen wird in eukaryotischen Zellen nicht von Actin, sondern von Tubulin übernommen (s. o.), sodass in dieser Hinsicht MreB funktionell dem eukaryotischen Tubulin entspricht. Auch das Plasmid-codierte Protein **ParM** hat strukturelle Ähnlichkeit mit Actin, es kontrolliert bei der Zellteilung die Aufteilung von Plasmiden auf die Tochterzellen. Den Intermediären Filamenten der Eukaryoten entspricht sowohl strukturell als auch funktionell das **Crescentin**, das für die Aufrechterhaltung der gekrümmten Zellform von *C. crescentis* sorgt (S. 94).

2.3.6 Zelleinschlusskörper und ihre Funktion

Zelleinschlusskörper haben unterschiedliche Funktionen. Als Speicherstoffe dienen Granula oder Tröpfchen aus Polysacchariden, Fetten und fettartigen Substanzen, Polypeptiden, Polyphosphaten und Schwefel. Andere Zelleinschlusskörper sind Gasvakuolen, Carboxysomen, Chlorosomen und Magnetosomen.

Die Zellen vieler Mikroorganismen enthalten mikroskopisch sichtbare Zelleinschlusskörper. Bei Energie- und Substratüberschuss synthetisieren viele Mikroorganismen **Speicherstoffe** und lagern sie in Form von Granula oder Tröpfchen im Cytoplasma ab. Die Reservestoffe sind wasserunlöslich und beeinflussen daher nicht das osmotische Gleichgewicht in der Zelle. Unter limitierenden Bedingungen stehen sie dann als Kohlenstoff- und Energiespeicher zur Verfügung.

Als **Speicherpolysaccharide** (S. 428) wurden in Bakterien **Glykogen**, **Stärke**, **Polyglucose** und **Dextrane** (Exopolysaccharide, S. 40) nachgewiesen, Glykogen und Dextrane kommen auch bei Hefen vor.

Fette und fettähnliche Substanzen akkumulieren in den Zellen zu Tröpfchen oder Granula, die wegen ihrer starken Lichtbrechung gut zu erkennen sind. **Neutralfette** (Triglyceride, auch: Triacylglycerine) kommen vor allem bei eukaryotischen Mikroorganismen vor, aber auch in einigen grampositiven Bakterien (S. 431). Sehr verbreitet bei Bacteria und Archaea sind **Poly-β-Hydroxyalkanoate** (**PHA**, S. 432), insbesondere **Poly-β-Hydroxybuttersäure** (**PHB**), bei einer Gruppe gramnegativer Bakterien dienen auch **Wachsester** als Reservestoffe (S. 430).

Cyanobacteria und einige chemotrophe Bakterien verwenden das **Polypeptid Cyanophycin** als Energie- und Stickstoffspeicher. Cyanophycin ist ein Copolymer aus L-Arginin und L-Asparaginsäure, das bereits 1887 in Cyanobacteria gefunden wurde (Name!). Inzwischen konnte Cyanophycin auch in verschiedenen chemotrophen Bakterien, beispielsweise *Acinetobacter baylii,* nachgewiesen werden. Cyanophycin wird aus den Aminosäuren Arginin und Asparaginsäure in einer einzigen ATP-abhängigen Reaktion durch das Enzym **Cyanophycin-Synthetase** synthetisiert. Die Synthese findet an der Cytoplasmamembran und nicht wie die Proteinbiosynthese an den Ribosomen statt. Cyanophycin wird in **Granula** im Cytoplasma akkumuliert.

Volutin-Granula (auch: metachromatische Granula) bei vielen Bakterien und eukaryotischen Mikroorganismen bestehen aus **Polyphosphaten**, die als Phosphatspeicher dienen. Das Riesenbakterium *Thiomargarita namibiensis* oxidiert im Energiestoffwechsel Sulfid mit Nitrat als Elektronenakzeptor. Da im Lebensraum des Bakteriums nicht immer beide Substrate in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, speichern die Zellen **Nitrat** in hoch konzentrierter Form in einer großen Vakuole.

Den bei der Oxidation von Sulfid entstehenden **Schwefel** speichern die Bakterien in der äußeren Cytoplasmaschicht in Form von kleinen **Granula**, die den Zellen die charakteristische weiße Farbe verleihen. Auch viele andere Bakterien, die in ihrem Energie- oder Baustoffwechsel Schwefelwasserstoff zu Sulfat oxidieren, speichern elementaren Schwefel in Form stark lichtbrechender Tröpfchen. Grüne Schwefelbakterien lagern den Schwefel extrazellulär ab, bei Schwefel-Purpurbakterien erfolgt die Ablagerung extra- oder intrazellulär (S. 73, S. 84). Wird Schwefelwasserstoff im Lebensraum limitierend, oxidieren die Bakterien den gespeicherten Schwefel zu Sulfat. Auch einige chemotrophe Bakterien wie *Beggiatoa*, die reduzierte Schwefelverbindungen in mehreren Schritten zu Sulfat oxidieren, lagern elementaren Schwefel, das erste Zwischenprodukt, in ihren Zellen ab.

Einige Zelleinschlusskörper von Bakterien sind keine Speicherstoffe, sondern haben **andere Funktionen**. **Gasvakuolen** verleihen den Zellen von Cyanobacteria, Haloarchaea und anoxygenen photosynthetischen Bakterien Auftrieb in ihrem aquatischen Lebensraum, sodass sie aus tieferen Wasserschichten in solche mit höherer Lichtintensität und günstigerer Nährstoff- oder Sauerstoffkonzentration gelangen. Gasvakuolen bestehen aus zahlreichen spindelförmigen **Gasvesikeln**, die durchlässig für Gase, aber nicht für Wasser sind. Diese selektive Durchlässigkeit wird durch eine Proteinschicht erreicht, die außen hydrophil und innen hydrophob ist. Die Bakterien, die Kohlendioxid über den Calvinzyklus (S. 409) fixieren wie die phototrophen Cyanobacteria und verschiedene chemoautotrophe Bakterien, besitzen **Carboxysomen**, die das Schlüsselenzym des Calvinzyklus, Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, in semikristalliner Form enthalten. Carboxysomen sind von einer einschichtigen Proteinhülle umgeben. Die Vorstufe des **Proteins Bti**, das von *Bacillus thuringiensis* gebildet wird und für bestimmte Insekten toxisch ist, ist in **kristalliner Form** in sporulierenden Bakterien enthal-

ten, im Darm der Insekten wird das Protoxin in die aktive Form umgewandelt. **Chlorosomen** der Grünen Bakterien sind von einer einfachen Lipidschicht umgeben und enthalten Bakteriochlorophylle und andere Komponenten der Photosynthese. Sie sind mit der Cytoplasmamembran assoziiert und fungieren als Lichtsammelkomplexe. **Magnetosomen** sind von einer einschichtigen Membran aus Proteinen, Phospho- und Glykolipiden umgebene kugelige Gebilde und bestehen aus Kristallen von Magnetit (Fe_3O_4) oder Greigit (Fe_3S_4). Sie ordnen sich in der Zelle kettenförmig in Längsrichtung an und bilden so einen magnetischen Dipol. Mit ihrer Hilfe richten sich magnetotaktische Bakterien wie *Magnetospirillum* und einige Algen im Magnetfeld der Erde aus, um sich in Richtung sauerstoffarmer Gewässerzonen zu bewegen. Im Unterschied zu anderen Taxien (s. o.) wurde bei der Magnetotaxis bisher noch kein sensorisches System zur Reizweiterleitung gefunden.

Cytoskelett: Intrazelluläre Struktur aus flexiblen Filamenten bei Eukaryoten und Prokaryoten. Sorgt bei der Zellteilung für Septumbildung und Chromosomensegregation, weitere Aufgaben sind Bewegungen, Stabilisierung der Zelle und interne Transporte; Prokaryotische Elemente sind den eukaryotischen strukturell und z. T. funktionell homolog.
- **Eukaryotische Elemente:** Mikrotubuli (Tubulin), Mikrofilamente (Actin), intermediäre Filamente (verschiedene Proteinfilamente mit hoher Zugfestigkeit).
- **Prokaryotische Elemente:** FTsZ, ParM (strukturell homolog zu Tubulin), MreB (strukturell homolog zu Actin), Crescentin (homolog zu intermediären Filamenten).

Zelleinschlusskörper: Mikroskopische sichtbare Granula, Tröpfchen oder Kristalle in der Zelle, Einschlüsse sind häufig Speicherstoffe, manche haben andere Funktionen: Gasvakuolen (regulieren das Schwebeniveau aquatischer Bakterien); Carboxysomen (Orte der CO_2-Fixierung, enthalten Rubisco); Chlorosomen (Lichtsammelkomplexe bei Grünen Bakterien, enthalten Pigmente); Magnetosomen (enthalten magnetische Eisenverbindungen, ermöglichen Ausrichtung magnetotaktischer Bakterien im Magnetfeld der Erde).
Speicherstoffe: Polysaccharide (Glykogen, Stärke, Polyglucose, Dextrane); Fette oder fettähnliche Substanzen (Neutralfette, PHB, Wachsester); Cyanophycin; elementarer Schwefel, Polyphosphate, Nitrat.

2.4 Zelldifferenzierung

Die **Differenzierung** von vegetativen Zellen zu metabolisch inaktiven **Dauerformen** oder besonderen **Verbreitungsformen** kommt bei eukaryotischen Einzellern und bei Prokaryoten vor. Kieselsäure-haltige **Cysten** sind Dauerformen bei bestimmten Algen, bei einigen tierischen Einzellern stellen umweltresistente Cysten die Verbreitungsform dar. Die Hefe *Candida albicans*

wächst abhängig von den Wachstumsbedingungen als Einzelzelle, Pseudomycel oder echtes Mycel und bildet **Chlamydosporen** als Dauerform. Bestimmte, meist grampositive Bacteria bilden zum Überstehen ungünstiger Bedingungen langlebige **Endosporen**, die resistent gegen Hitze, Austrocknung, UV-Strahlung und Chemikalien sind. Endosporen enthalten Calciumdipicolinat und kleine, säurelösliche Proteine (SASP). Unter günstigen Bedingungen keimen die Endosporen wieder zu vegetativen Zellen aus. Myxobakterien bilden an ihren Fruchtkörpern **Myxosporen**, die gegen Hitze, Austrocknung und UV-Strahlen resistent sind. Methylotrophe Bakterien bilden durch Knospung Exosporen, die gegen Hitze und Austrocknung resistent sind. Die Cysten frei lebender N_2-Fixierer entstehen durch Einkapselung ganzer Zellen. Sie sind resistent gegen Austrocknung, jedoch nicht gegen Hitze. Die **Konidien** der Aktinomyceten entstehen durch Abschnürung aus Lufthyphen, sie dienen als Austrocknungs-resistente Verbreitungsform.

Zelldifferenzierungen in dem Maße wie bei den komplexen mehrzelligen Eukaryoten kommen bei Einzellern nicht vor. Unter bestimmten Bedingungen bilden jedoch sowohl einige eukaryotische Einzeller als auch viele Prokaryoten **besondere Zellformen** mit unterschiedlichen Funktionen. **Dauerformen** dienen dem Überstehen ungünstiger äußerer Bedingungen, manche Arten bilden besondere **Verbreitungsformen**. Einige Bakterien fixieren Stickstoff in speziellen Zellen (S. 486, 520). Im Lebenszyklus gestielter Bakterien kommen sessile und bewegliche Zellformen vor (S. 93).

2.4.1 Dauerformen bei eukaryotischen Einzellern

Einige einzellige **Algen**, z. B. Diatomeen und Chrysophyceen, kapseln sich unter schlechten Lebensbedingungen in kugeligen, **Kieselsäure** enthaltenden **Cysten** ab. Werden die Bedingungen wieder günstiger, verlassen die Algen die Cysten und vermehren sich erneut. Auch bei einigen **tierischen Einzellern** dienen relativ langlebige Cysten als umweltresistente Dauerform, die insbesondere bei den pathogenen Formen auch die Verbreitungsform darstellt. Dabei enthält eine Cyste von *Entamoeba histolytica*, dem Erreger der Amöbenruhr, einen einzigen Parasiten, während die im Gewebe des Wirtes eingekapselte Cyste des Toxoplasmose-Erregers *Toxoplasma gondii* Hunderte von einzelnen Parasiten enthalten kann (S. 538). Unter den **Hefen** zeigt insbesondere *Candida albicans* große morphologische Wandlungsfähigkeit. *C. albicans* wächst nicht nur in der **einzelligen Hefeform**, sondern kann auch **Pseudomycelien** und bei invasivem Wachstum innerhalb eines Wirtsorganismus sogar **echte Mycelien** mit Trennwänden bilden. Bei Nährstoffmangel bildet *C. albicans* als Dauerformen **Chlamydosporen** mit einer widerstandsfähigen Zellwand, die ein wichtiges Unterscheidungskriterium zu anderen Hefen darstellen.

2.4.2 Endosporen

Endosporen sind ein charakteristisches Merkmal der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium*, aber auch einiger anderer Bakterien (Tab. 2.**1**). Endosporen werden bei Nährstoffmangel gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase innerhalb einer vegetativen Zelle gebildet, wobei **Form und Lage** der Endospore **arttypisch** sind. Die gebildete Endospore ist **sehr widerstandsfähig** gegen Trockenheit, Hitze, UV-Strahlen, extreme pH-Werte und chemische Desinfektion. Sie befindet sich in einem Ruhezustand, der sehr lange andauern kann. Gelangt die Endospore in ein günstiges Milieu, keimt sie wieder zu einer vegetativen Zelle aus und beginnt sich zu teilen. Bei der Untersuchung alter Herbarien des Kew Garden bei London wurden lebensfähige Sporen von *B. subtilis* und *B. licheniformis* aus Erdproben isoliert, die an nachweislich 200 bis über 300 Jahre alten Pflanzenwurzeln hafteten. Andere Darstellungen berichten von lebensfähigen *Bacillus*-Sporen, die mehrere Tausend Jahre alt waren und 1995 wurden aus dem

Tab. 2.**1** **Endosporenbildner.**

Gattung	*Gramverhalten*	*Eigenschaften*	*Besonderheiten*
Bacillus	positiv	Stäbchen, aerob bis fakultativ anaerob, oft beweglich	einige Spezies Antibiotikaproduzenten, pathogene Spezies: *B. anthracis* (Milzbrand)
Clostridium	positiv	Stäbchen, strikt anaerob, begeißelt, verschiedene Gärungen (Buttersäure-, Aceton u. Butanolbildung)	mehrere pathogene Spezies: *C. perfringens* (Gasbrand), *C. tetani* (Tetanus), *C. botulinum* (Botulismus)
Desulfotomaculum	negativ (aber grampositive Zellwand)	Stäbchen, obligat anaerob, Sulfatreduzierer	ein 2006 bei Johannesburg entdeckter *Desulfotomaculum*-Stamm nutzt radioaktive Strahlung als Energiequelle
Sporomusa	negativ	gekrümmte Stäbchen, anaerob	Homoacetogenes Wachstum möglich
Sporosarcina	positiv	Kokken in Tetraden angeordnet, strikt aerob, oft beweglich	alkalitolerant
Sporolactobacillus	positiv	Stäbchen, mikroaerophil, homofermentative Milchsäuregärung	einziges sporenbildendes Milchsäurebakterium, Sporen weniger hitzeresistent als die von *Bacillus*
Anaerobacter	positiv	Stäbchen	bis zu fünf Endosporen pro Zelle, N_2-Fixierer
Sporohalobacter	negativ	Stäbchen, aerob	halophil
Heliobacterium	positiv	Stäbchen, anaerob	phototroph

Magen einer Biene, die zwischen 25 und 40 Millionen Jahre in Bernstein konserviert war, keimfähige Sporen isoliert.

Endosporen sind unter dem Mikroskop als **stark lichtbrechende**, runde bis ovale Strukturen zu erkennen. Sie können nur mit speziellen Farbstoffen, z. B. Malachitgrün, angefärbt werden, für die zur Anfärbung vegetativer Zellen verwendeten basischen Farbstoffe sind sie impermeabel. Endosporen sind von einer dicken mehrschichtigen Hülle umgeben. Äußere und innere **Sporenhülle** bestehen aus Protein, bei einigen Arten sind sie von einer zusätzlichen lockeren Proteinschicht, dem **Exosporangium** umgeben. Unter der Sporenhülle liegt die **Sporenrinde** (**Cortex**) aus zahlreichen vernetzten Schichten eines speziellen Peptidoglykans, das anders aufgebaut ist als die Zellwand vegetativer Zellen. Im Cortex befindet sich der **Sporenprotoplast** (**Core**) mit Zellwand und Cytoplasmamembran, der im Cytoplasma das Nucleoid enthält. Der Wassergehalt des Core-Cytoplasmas beträgt nur 10 bis 30 % von dem der vegetativen Zelle. Diese starke **Dehydrierung** erhöht die Resistenz der Endospore gegenüber Hitze und Chemikalien und sorgt gleichzeitig für die Einstellung der Stoffwechselaktivitäten. Der pH-Wert des gelartigen Cytoplasmas liegt mit 5,5 bis 6 ca. 1 bis 1,5 Einheiten unter dem einer vegetativen Zelle.

Im Cytoplasma der Endospore sind große Mengen an **Dipicolinat** und kleine säurelösliche Proteine (**SASP**, **s**mall **a**cid **s**oluble **p**roteins) enthalten, die in vegetativen Zellen nicht vorkommen. Die negativ geladene Dipicolinsäure bildet über Ca^{2+}-Ionen Komplexe (Abb. 10.**23**) und ist für die hohe Thermostabilität der Endosporen verantwortlich. Die **SASPs** haben zwei unterschiedliche Funktionen: sie binden an die Core-DNA und schützen sie vor Austrocknung, Hitze und UV-Strahlung, bei der Auskeimung der Spore dienen sie als Kohlenstoff- und Energiequelle.

Die Bildung von Endosporen (Abb. 10.**23**) startet mit einer inäqualen Zellteilung, die durch Limitierung eines Wachstumssubstrates und den daraus resultierenden Mangel an Guaninnucleotiden induziert wird. An der **Endosporenbildung** sind über 200 Gene beteiligt, der Ablauf wird durch verschiedene **σ-Faktoren** kontrolliert (S. 495).

Die **Auskeimung** der Sporen erfolgt nach **Aktivierung** durch einen äußeren Reiz, z. B. Erhitzung auf Temperaturen von 80 bis 100 °C. Diesen Effekt nutzen Sterilisationsverfahren für Sporenbildner aus (S. 280). Die so aktivierte Spore beginnt mit der **Keimung**, wenn Nährstoffe zur Verfügung stehen. Nach der Aufnahme von Wasser und daraus resultierender Quellung werden die SASP abgebaut, DNA, RNA und Proteine werden neu synthetisiert. Der Cortex wird abgebaut und der Gehalt an Calciumdipicolinat sinkt, gleichzeitig verliert die Spore ihre Resistenzen. Schließlich verlässt die Zelle die Sporenhülle und beginnt sich zu teilen.

2.4.3 Andere Dauerformen

Andere Dauerformen haben eine deutlich **geringere Hitze- und Austrocknungsresistenz** als Endosporen. Unter ungünstigen Umweltbedingungen bilden die meisten **Myxobakterien** Fruchtkörper aus, in denen vegetative Zellen durch Ausbildung dicker Querwände zu runden **Myxosporen** differenzieren. Die metabolisch weitgehend inaktiven Sporen keimen bei verbesserten Umweltbedingungen wieder zu vegetativen Zellen aus. Die **Exosporen** methylotropher Bakterien der Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* entstehen durch Knospung an vegetativen Zellen. Exosporen sind metabolisch inaktiv, sie besitzen eine Exosporenwand, aber keinen Cortex und sie enthalten auch kein Dipicolinat. Bei frei lebenden N_2-Fixierern wie *Azotobacter* entstehen durch die Abkapselung ganzer Zellen **Cysten** als Ruhestadien. Sie enthalten große Mengen an **Poly-β-Hydroxybuttersäure** (**PHB**) und besitzen eine komplexe Zellwand aus Alginat, Protein und Lipiden. In der Zellwand lassen sich Exine und Intine unterscheiden. Cysten sind resistent gegen Austrocknung, aber nicht gegen Hitze. Die **Konidien** (Exosporen) von **Actinomyceten** werden durch Querwandbildungen in Lufthyphen gebildet und stellen Verbreitungsformen dar. Sie sind resistenter gegen Austrocknung als die vegetativen Zellen.

Zelldifferenzierungen bei Einzellern: Dauerformen, Verbreitungsformen, spezielle Zellen zur N_2-Fixierung, unterschiedliche Zelltypen im Entwicklungszyklus.
Eukaryoten:
- **Cysten:** Dauerformen bei einigen Algen und tierischen Einzellern, bei pathogenen auch Verbreitungsform.
- **Chlamydosporen:** Dauerform bei *Candida albicans.*

Prokaryotische Dauerformen:
- **Endosporen:** Sehr langlebige Dauerformen bei einigen Bakteriengruppen, extrem resistent gegen Hitze, Austrocknung, UV-Strahlen und Chemikalien, enthalten Calciumdipicolinat und SASP, Auskeimung durch Erhitzen induzierbar.
- **Myxosporen:** Dauerformen von Myxobakterien, Bildung aus vegetativen Zellen am Fruchtkörper, resistent gegen Hitze, Austrocknung und UV-Strahlen.
- **Exosporen:** Dauerform von methylotrophen Bakterien, entstehen durch Knospung an vegetativen Zellen, resistent gegen Hitze und Austrocknung.
- **Cysten:** Dauerstadien einiger frei lebender N_2-Fixierer, entstehen durch Abkapselung vegetativer Zellen, enthalten große Mengen PHB, resistent gegen Austrocknung.

Konidien: Verbreitungsformen von Aktinomyceten, entstehen durch Querwandbildung in Lufthyphen, resistent gegen Austrocknung.

3 Systematik und Phylogenie

Regina Nethe-Jaenchen

3.1 Grundlagen

Die **Systematik** ordnet Prokaryoten anhand **phänotypischer** Merkmale in ein taxonomisches System ein. Weil sie unter morphologischen Aspekten nur unzureichend charakterisiert werden können, beruht die **konventionelle Taxonomie** der Prokaryoten vorwiegend auf physiologischen Merkmalen. Die **molekulare Taxonomie** verwendet zusätzlich immunologische und genotypische Eigenschaften zur Identifizierung unbekannter Isolate. Die Namensgebung erfolgt nach einer festgelegten Nomenklatur, eine Reinkultur wird als Typstamm in einer Kultursammlung aufbewahrt. Ziel der **Phylogenie** ist die Aufklärung von Abstammung und Verwandtschaftsverhältnissen verschiedener Organismen durch vergleichende Untersuchungen **genotypischer** Eigenschaften.

Die ersten Ordnungssysteme für Pflanzen und Tiere waren künstliche Systeme, die auf ausgewählten Ähnlichkeitsmerkmalen basierten, z. B. das 1753 von Carl v. Linné entwickelte System für Blütenpflanzen. Erst nach Akzeptanz der Abstammungslehre von Charles Darwin wurden mithilfe von Fossilienfunden phylogenetische Systeme erstellt, die im Idealfall sowohl die Identifizierung eines unbekannten Objektes über einen spezifischen Merkmalskatalog (Bestimmungsschlüssel) ermöglichen als auch die stammesgeschichtliche Entwicklung wiedergeben.

Ebenso wie in Zoologie und Botanik gliedert sich auch die **Systematik** der Mikrobiologie in hierarchisch gestaffelte **Taxa**: Art, Gattung, Familie, Ordnung, Klasse, Abteilung, Reich. Die Einordnung erfolgt dabei vorwiegend anhand **phänotypischer Eigenschaften**. Die Wissenschaft der biologischen Klassifizierung von Lebewesen bezeichnet man als **Taxonomie**. Die Zuordnungskriterien sind auf der Stufe der Art sehr spezifisch und werden mit ansteigender Hierarchie immer unspezifischer. Für die Allgemeingültigkeit dieser Systematik ist eine verbindliche **Nomenklatur** erforderlich, nach der neu entdeckte Organismen benannt werden. Für Mikroorganismen wird die binomische Nomenklatur der klassischen Biologie nach Carl v. Linné verwendet, die jedem Organismus einen Gattungs- und einen Artnamen zuordnet, z. B. *Escherichia coli*. Die offizielle Nomenklatur folgt den Vorschriften des „International Code of Nomenclature of Bacteria“, neu vergebenen Namen, die diese Voraussetzung nicht erfüllen, wird die Bezeichnung „*Candidatus*“ vorangestellt. Ein neues Isolat, das anhand der durchgeführten Identifizierungsuntersuchungen in keine der bereits bekannten Arten eingeordnet werden kann, wird nach festgelegten Regeln benannt, die

Übereinstimmung bzw. Verschiedenheit bestimmter Merkmale mit denen bereits klassifizierter Organismen berücksichtigen. Eine Reinkultur des neu benannten Mikroorganismus wird als Typstamm an eine Kultursammlung wie die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) geschickt und dort als Lyophilisat aufbewahrt (S. 297), das unter geeigneten Wachstumsbedingungen wieder kultiviert werden kann.

Die **Phylogenie** (Stammesgeschichte) erforscht Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Mikroorganismen und ihre Abstammung von gemeinsamen Vorfahren. Mit den Daten werden Stammbäume erstellt, aus denen sich die Evolution sowohl von Mikroorganismen als auch von höheren Organismen ablesen lässt. Die dabei angewendeten Methoden beziehen sich im Unterschied zur klassischen Phylogenie der Botanik und der Zoologie bei Mikroorganismen vor allem auf **genotypische** Eigenschaften.

Bei der **Entwicklung** einer Systematik für Prokaryoten, die ihre phylogenetische Verwandtschaft und ihre Abstammung von gemeinsamen Urformen berücksichtigt, orientierte man sich zunächst an den **Kriterien** der Systematik von Vielzellern. Diese Organismen besitzen hoch differenzierte Gewebe, weitere Merkmale sind Fortpflanzungsart und Embryonalentwicklung, sodass zahlreiche **morphologische** Unterscheidungskriterien für ihre Einordnung zur Verfügung stehen. Bei den einzelligen Bakterien ermöglicht erst die zusätzliche Berücksichtigung **physiologischer** Eigenschaften eine eindeutige Identifizierung. In den vergangenen 20 bis 30 Jahren wurde eine Vielzahl von mikrobiellen Enzymen gereinigt und charakterisiert, z. B. DNAse, RNAse, Restriktionsenzyme, DNA- und RNA-Polymerasen (📖 *Genetik*). Sie stehen heute für Routineuntersuchungen von Prokaryoten auf **molekularer** Ebene zur Verfügung. Insbesondere neuere Erkenntnisse zur Phylogenie beruhen auf diesen Untersuchungen und erlauben auch die Einordnung von nicht kultivierbaren Bakterien in einen Stammbaum.

Systematik: Hierarchische Ordnung der Lebewesen in geschachtelten Taxa.
Taxonomie: Beschreiben und Ordnen der Artenvielfalt nach bestimmten Gesichtspunkten.
Taxon: Ordnungseinheit im System der Natur, z. B. Art, Gattung, Familie, Ordnung, Klasse, Abteilung und Reich.
Phylogenie: Stammesgeschichtliche Entwicklung der Lebewesen, Einordnung in Stammbäume erfolgt anhand genotypischer Merkmale.
Phänotyp: Gesamtheit der äußeren Eigenschaften eines Organismus.
Genotyp: Gesamtheit der genetischen Anlagen eines Organismus.

3.2 Methoden der Bakterientaxonomie

Die Identifizierung unbekannter Mikroorganismen und ihre taxonomische Einordnung erfolgt nach einem **dichotomen Bestimmungsschlüssel** mithilfe von **konventionellen** und **molekularen Methoden**. Morphologische Eigenschaften werden mikroskopisch an lebenden oder angefärbten Zellen

untersucht, physiologische Fähigkeiten durch die Anzüchtung auf speziellen Nährböden. Der Nachweis spezifischer Antigene, der GC-Gehalt und der Vergleich von Nucleinsäuresequenzen dienen als weitere Einordnungskriterien.

Bei der Identifizierung eines unbekannten Bakterienisolates wird nach einem **dichotomen Bestimmungsschlüssel** verfahren, wie er auch in botanischen und zoologischen Bestimmungsbüchern üblich ist. Das klassische mikrobiologische Bestimmungsbuch ist **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, dessen vierbändige erste Auflage zurzeit überarbeitet und auf fünf Bände erweitert wird, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ist eine einbändige Kurzfassung. **The Prokaryotes**, ein weiteres Standardwerk zur Prokaryotensystematik, berücksichtigt in stärkerem Maße die phylogenetische Abstammung und ist 2006 in der dritten Auflage erschienen, die jetzt insgesamt sieben Bände umfasst.

In der Praxis erfolgt die Identifizierung und taxonomische Einordnung von Bakterien noch häufig mit **konventionellen Methoden**. Für die Artbestimmung wird eine Reinkultur (S. 296) verwendet.

Mikroskopische Untersuchungen werden an lebenden oder an fixierten und gefärbten Zellen durchgeführt. Unter dem Phasenkontrastmikroskop werden Form, Zusammenlagerungen, Sporenbildung und Beweglichkeit von lebenden Bakterienzellen untersucht. Mithilfe von Einfachfärbungen fixierter Bakterienausstriche werden Geißeln, Sporen oder Speicherstoffe dargestellt, mit Differentialfärbungen werden verschiedene Bakterien differenziert, z. B. grampositive und gramnegative mit der Gramfärbung (S. 33). Kapseln, ein Pathogenitätsfaktor vieler pathogener Bakterien (S. 533), lassen sich im Tuschepräparat darstellen (S. 300). Anzahl und Anordnung der Geißeln sowie strukturelle Feinheiten einer Bakterienzelle sind nur unter dem Elektronenmikroskop sichtbar; für routinemäßige Identifizierungen sind diese Methoden jedoch zu aufwendig und zu kostspielig.

Da die Morphologie von Bakterien für eine Identifizierung nicht ausreicht, wird zusätzlich auf bestimmte **physiologische Fähigkeiten** getestet. Anhand ihrer sehr unterschiedlichen Lebensräume können Bakterien beispielsweise als thermophil, acidophil, aerob oder anaerob charakterisiert werden, Energiesubstrate und Stoffwechselendprodukte bieten weitere Unterscheidungskriterien. Zur Identifizierung morphologisch nicht unterscheidbarer Bakterien werden **Differentialnährböden** verwendet, denen Indikatorfarbstoffe und/oder Hemmstoffe zugesetzt sind (S. 301).

In der medizinischen Diagnostik werden zunehmend auch **molekulare Methoden** verwendet. Zu den molekularen Identifizierungsverfahren gehören sowohl **immunologische Methoden**, vor allem zur Unterscheidung von Subspezies, als auch molekulargenetische, beispielsweise die Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA oder der Hybridisierungsrate zwischen Nucleinsäure-Einzelsträngen verschiedener Organismen.

Aufgrund der Basenpaarungsregel nach Chargaff lässt sich der prozentuale Anteil der Summe von Guanin (G) und Cytosin (C), der **GC-Gehalt**, an der Gesamtmenge aller vier Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin und Cytosin ermitteln:

(G + C) / (A + T + G + C) · 100 = GC-Gehalt in %

Grundlage der Methode ist die unterschiedliche Anzahl von **Wasserstoffbrücken** zwischen den beiden möglichen Basenpaaren: drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin und zwei zwischen Adenin und Thymin. Wird eine doppelsträngige DNA schrittweise erhitzt, werden die Wasserstoffbrücken zerstört und die DNA denaturiert zu Einzelsträngen, sie „schmilzt". Die benötigte Temperatur ist umso höher, je größer der GC-Gehalt der DNA ist. Das Schmelzen der DNA lässt sich photometrisch bei 260 nm verfolgen und in Form einer **Schmelzkurve** (Abb. 3.**1**) darstellen. Die Absorption doppelsträngiger DNA ist durch die enge Nachbarschaft der Basen in der Doppelhelix im Vergleich zur Absorption einzelsträngiger DNA geringer, sodass es mit steigender Temperatur durch die zunehmenden Einzelstrangbereiche zu einem Anstieg der Absorption kommt, dieser Effekt wird als **hyperchromer Shift** bezeichnet. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Proben-DNA als Einzelstrang vorliegt, wird als **Schmelzpunkt (T_M)** definiert. Mit Hilfe des Schmelzpunktes kann der GC-Gehalt der DNA berechnet werden. Innerhalb der Prokaryoten findet man GC-Gehalte der DNA zwischen 20 % und knapp 80 %, bei den Eukaryoten ist die Spannbreite geringer (Tab. 3.**1**). Dabei korreliert eine phänotypische Ähnlichkeit von Organismen nicht immer auch mit dem jeweiligen GC-Gehalt ihrer DNA. In einigen Fällen ergab eine genauere Überprüfung, dass diese Organismen weniger eng miteinander verwandt sind, als aufgrund der phänotypischen Merkmale angenommen worden war. Organismen derselben Art besitzen einen nahezu identischen GC-Gehalt, solche aus einer Gattung liegen im gleichen Größenbereich. Allerdings kann auch die DNA von Organismen, die weder taxonomisch noch phylogenetisch verwandt sind, einen gleich hohen GC-Gehalt besitzen. ◀

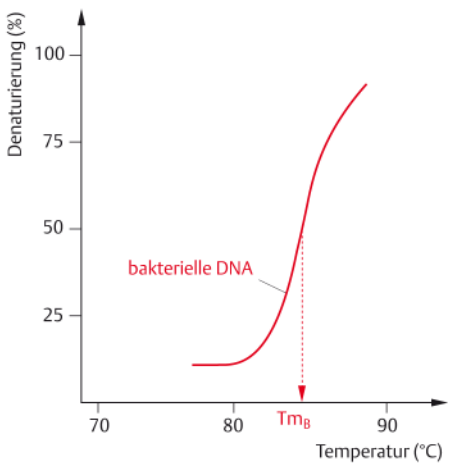


Abb. 3.**1** **Schmelzkurve.** In der Schmelzkurve der DNA treten mit zunehmender Temperatur immer mehr einzelsträngige DNA-Abschnitte auf. Die relative Absorption bei der Wellenlänge 260 nm erhöht sich. Wenn nur noch einzelsträngige DNA-Abschnitte vorliegen, steigt die Absorption nicht mehr weiter an. Der T_m liegt bei der halbmaximalen Absorption der Einzelstrang-DNA.

Tab. 3.1 **GC-Gehalt der DNA bei verschiedenen Organismen.** Die eukaryotischen Gruppen Tiere, Pflanzen und Algen zeigen eine deutlich geringere Spannbreite als die prokaryotischen Bacteria und Archaea.

Gruppe	*GC-Gehalt (mol %)*	*Gruppe*	*GC-Gehalt (mol %)*
Tiere	35–43	einzellige Eukaryoten	21–66
Pflanzen	33–48	Bacteria	20–78
Algen	36–68	Archaea	26–61
Pilze	21–60		

Während bei der Messung des GC-Gehaltes nur die relative Menge der einzelnen Nucleotide bestimmt wird, spielt für **Hybridisierungen** die Nucleotid- bzw. Basensequenz die entscheidende Rolle (📖*Genetik*). Das Ausmaß der Hybridisierung ist ein Maß für die Übereinstimmung der Basensequenz zweier Bakterien und damit ihrer Verwandtschaft. Die DNA:DNA-Hybridisierung eignet sich sehr gut für die Aufklärung engerer verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Bakterien. Bei Organismen derselben Art beträgt die **Hybridisierungsrate** mindestens 70 %, Isolate mit Hybridisierungsraten von mindestens 25 % gehören derselben Gattung an. Als Standard (= 100 %) dient die Hybridisierung denaturierter DNA aus einem einzigen Bakterium. Vergleiche zwischen taxonomisch nur weitläufig verwandten Bakterien liefern keine verwertbaren Ergebnisse, da die Hybridisierungsraten zu gering sind. Auch für phylogenetische Fragestellungen ist diese Methode nicht geeignet, da die Hybridisierungsrate keine Informationen zur Abstammung liefert.

Für die schnelle Identifizierung von Bakterien in der klinischen Diagnostik oder bei der Untersuchung von Wasser- und Lebensmittelproben wird häufig die **Ribotypisierung** angewendet. Die DNA verschiedener Bakterien wird jeweils mit einer bestimmten Restriktionsendonuclease geschnitten und die entstandenen Restriktionsfragmente anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (S. 294). Bei der Ribotypisierung wird die DNA der Restriktionsfragmente anschließend mit einer gegen rRNA-Gene gerichteten Fluoreszenz-markierten DNA-Sonde hybridisiert und so spezifisch die für ribosomale RNA codierende DNA sichtbar gemacht. Das erzeugte Bandenmuster ist charakteristisch für jede Spezies und Subspezies. Alternativ können die rRNA-Gene zunächst mithilfe spezifischer Sonden durch PCR amplifiziert und anschließend mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden. Bei der nachfolgenden elektrophoretischen Auftrennung erhält man dann ein charakteristisches Bandenmuster, das nur aus Restriktionsfragmenten der rRNA-Gene besteht.

Dichotomer Bestimmungsschlüssel: Bestimmungskatalog für die systematische Einordnung von Organismen, der sich auf jeder Stufe in zwei mögliche Wege verzweigt.
GC-Gehalt: Anteil der Basen Guanin und Cytosin am Gesamtgehalt aller vier Basen in einer DNA.

Schmelzkurve: Darstellung der Absorption einer DNA bei 260 nm als Funktion der Temperatur.
Schmelzpunkt: Temperatur, bei der die halbmaximale Absorption der Einzelstrang-DNA erreicht ist, d. h. die Hälfte der vorhandenen DNA einzelsträngig vorliegt, entspricht dem Wendepunkt der Schmelzkurve. Ist ein Maß für den GC-Gehalt einer DNA.
Hybridisierungsrate: Rate der Doppelstrang-Ausbildung zweier Einzelstränge.
Ribotypisierung: Mit demselben Restriktionsenzym erzeugte Restriktionsfragmente von rRNA-Genen unterschiedlicher Bakterien werden elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Bandenmuster differenziert.

3.3 Das System der drei Urreiche

Die **phylogenetische Verwandtschaft** verschiedener Organismen wird heute insbesondere durch den Vergleich **genotypischer Eigenschaften** untersucht. Dazu werden bei Prokaryoten die Basensequenzen der 16S rRNA, bei Eukaryoten der entsprechenden 18S rRNA verglichen und aus dem Grad der Übereinstimmung ihre **evolutionäre Distanz** bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgen mit speziellen **Computerprogrammen**. Mit den ermittelten Sequenzdaten wurde ein phylogenetischer **Stammbaum** erstellt, der alle heute existierenden Lebewesen den **drei Urreichen** (**Domänen**) Eukarya, Bacteria und Archaea zuordnet. Innerhalb dieser Urreiche gibt es jeweils eine Reihe von phylogenetischen **Entwicklungslinien**. Alle Mitglieder einer Domäne, einer Entwicklungslinie und jedes hierarchischen Taxons weisen jeweils charakteristische **Signatursequenzen** der rRNA auf, über die sie der entsprechenden systematischen Gruppe zugeordnet werden können. Mithilfe verschiedener Methoden kann diese Zuordnung sowohl an ganzen Zellen als auch für das gesamte Metagenom eines bestimmten Habitats erfolgen.

3.3.1 Sequenzanalysen und Phylogenie

Anfang der 1970er-Jahre entwickelte der amerikanische Mikrobiologe **Carl Woese** die **16S rRNA-Analyse**. Aus den Daten, die Rückschlüsse auf die **phylogenetische Verwandtschaft** von Mikroorganismen und die Abstammung von gemeinsamen Vorfahren erlauben, entstand ein neuer Stammbaum des Lebens, der alle Organismen in drei Domänen, Bacteria, Archaea und Eukarya, einordnet. Inzwischen wurde die 16S rRNA-Sequenzanalyse weitestgehend standardisiert und automatisiert.

Die Proteinbiosynthese findet bei allen Organismen an den **Ribosomen** statt. Sie sind jeweils aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt und unterscheiden sich bei Eukaryoten und Prokaryoten in ihrer Größe und damit in ihrem Sedimentationsverhalten bei der

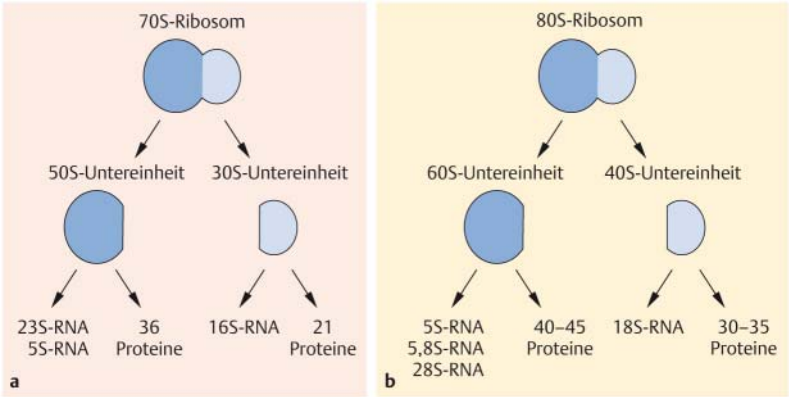


Abb. 3.**2** **Die zelluläre Proteinsynthese-Fabrik.** Vergleich von Struktur und Zusammensetzung eines prokaryotischen (**a**) und eines eukaryotischen (**b**) Ribosoms. Der S-Wert bezeichnet die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Teilchens bei einer Ultrazentrifugation.

Ultrazentrifuation. Neben zahlreichen Proteinen enthalten die Ribosomenuntereinheiten auch ribosomale RNA (rRNA) (Abb. 3.**2**), deren Basensequenz sich im Laufe der Evolution durch zufällige Mutationen verändert hat. Da umso mehr Mutationen stattgefunden haben, je mehr Zeit vergangen ist, können Unterschiede in der **Basensequenz** als Maß für die **evolutionäre Distanz** zweier Organismen angesehen werden. Andererseits enthält die rRNA auch eine große Anzahl konservierter Bereiche, die bei Sequenzvergleichen von verschiedenen Organismen als Orientierungshilfen dienen. Mit etwa 1500 Nucleotiden ist die **16S rRNA** von Prokaryoten groß genug für Sequenzanalysen und experimentell besser zu handhaben als die größere 23S rRNA. Für eukaryotische Organismen wird entsprechend die **18S rRNA** sequenziert (📖 *Genetik*).

Ein Computer vergleicht die Sequenzen und errechnet aus dem Prozentsatz der nicht identischen Basensequenzen die evolutionäre Distanz. Innerhalb einer Spezies liegen die Sequenzunterschiede der 16S rRNA unter 3 %, innerhalb einer Gattung unter 5 %. Ein Korrekturfaktor berücksichtigt eventuelle Rückmutationen. Um aus den Sequenzvergleichen einen Stammbaum zu erstellen, der mit allen erhaltenen Daten so gut wie möglich übereinstimmt, werden die errechneten evolutionären Abstände mithilfe spezieller Algorithmen bearbeitet. Die auf diese Weise ermittelten Stammbäume werden entweder fächerförmig oder als Dendrogramme grafisch dargestellt, wobei die Länge der Verzweigungen zwischen zwei Organismen direkt proportional zu ihrem evolutionären Abstand ist.

An definierten Positionen der 16S rRNA bzw. der 18S rRNA befinden sich als **Signatursequenzen** bezeichnete kurze Oligonucleotidsequenzen oder einzelne Basen, die typisch für alle Mitglieder einer Domäne sind. Auch für Gruppen innerhalb einer Domäne, z. T. sogar für eine bestimmte Gattung oder Spezies, wurden solche **gruppenspezifischen Sequenzen** nachgewiesen, sodass unbekannte Mikroorganismen über entsprechende rRNA-Sonden anhand dieser Sequenzen identifiziert und eingeordnet werden können.

Mithilfe der **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)** kann diese Identifizierung direkt an ganzen Zellen erfolgen, auch an nicht kultivierbaren. Dazu werden die Zellen zunächst mit entsprechenden Reagenzien behandelt und so für die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sonden durchlässig gemacht. Nach Zugabe der markierten RNA-Sonden kann ihre Bindung an die rRNA in den Ribosomen anhand der Fluoreszenz der Zellen unter dem Fluoreszenzphotometer beobachtet werden. Die Methode liefert sehr schnell exakte Ergebnisse, was insbesondere in der klinischen Diagnostik von Bedeutung ist. Verwendet man unterschiedliche Farbstoffe für die unterschiedlichen gruppenspezifischen Sequenzen, können auch mikrobielle Gemeinschaften untersucht und ihre Mitglieder entsprechend zugeordnet werden.

Für phylogenetische Untersuchungen von mikrobiellen Gemeinschaften werden die konservierten Bereiche der rRNA genutzt (**Metagenom-Analysen**, s. u.). Dazu wird die gesamte DNA einer mikrobiellen Gemeinschaft extrahiert und nachfolgend sämtliche 16S rRNA-Gene mithilfe von Sonden, die an die konservierten Bereiche binden, amplifiziert und dann sequenziert. Aus den Sequenzierungsdaten kann ein phylogenetischer Stammbaum für die untersuchte Gemeinschaft von Mikroorganismen erstellt werden, der auch die nicht kultivierbaren Mitglieder erfasst. ◀

Die große Anzahl von Sequenzierungsprojekten, die heute weltweit bearbeitet werden, reicht von rRNA-Analysen über vollständige Sequenzierungen der Genome zahlreicher Bacteria, Archaea und Eukarya bis zur Analyse der gesamten genomischen Information aller Mikroorganismen eines bestimmten Biotops oder einer Lebensgemeinschaft (**Metagenom**).

Mit der **Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST)** können mehrere Hundert Proben gleichzeitig untersucht werden. Dazu werden ca. 500 Nucleotide lange DNA-Fragmente aus 7 bis 9 Haushaltsgenen (housekeeping genes) amplifiziert und sequenziert. Diese Gene codieren für essentielle Enzyme und existieren jeweils in Organismus-spezifischen Allelen. Durch Vergleichen der für jedes Gen ermittelten Allele können verschiedene Stämme innerhalb einer Spezies differenziert und ihre phylogenetische Verwandtschaft bestimmt werden, für die Einordnung von weniger eng verwandten Organismen, z. B. verschiedenen Gattungen, ist die Methode wegen ihrer hohen Empfindlichkeit dagegen weniger geeignet.

Die Sequenzierungen kompletter Genome konnten erst nach der Entwicklung von **Sequenzierungsautomaten** durchgeführt werden. Heute werden Genome fast ausschließlich durch **Pyrosequenzierung** sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzierungsdaten werden gespeichert, mit speziellen Computerprogrammen (Algorithmen) bearbeitet (**Annotation**) und in **Datenbanken** organisiert, die über das Internet abgerufen werden können. Datenanbieter sind Universitäten und andere Forschungseinrichtungen, Firmen oder Zeitschriften. In Europa stellt beispielsweise das European Molecular Biology Laboratory (EMBL) unter http://www.embl-heidelberg.de, in den Vereinigten Staaten von Amerika das National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Informationen zu zahlreichen Forschungsprojekten in der Zell- und Molekularbiologie zur Verfügung.

Pyrosequenzierung ist ein sehr schnelles und effizientes Sequenzierungs-Verfahren, bei dem mithilfe von einigen Enzymen und Substraten der wachsende Nucleinsäurestrang noch während der Polymerisierung sequenziert wird. Dabei macht man sich zunutze, dass die DNA-Polymerase beim Einbau jedes Desoxynucleotidtriphosphates (dNTP) in einen wachsenden DNA-Strang **Pyrophosphat** (**PP_i**) abspaltet. Bei der Pyrosequenzierung wird dieses PP_i mit zugesetztem Adenosin-5'-phosphosulfat (**APS**) durch das Enzym **Sulfurylase** zu **ATP** umgesetzt. Das gebildete ATP liefert die Energie für die nachfolgende Umsetzung des Hilfssubstrats **Luciferin** zu Oxyluciferin. Bei dieser durch das Enzym **Luciferase** katalysierten Reaktion wird proportional zur ATP-Menge sichtbares **Licht** emittiert, das mithilfe eines CCD-Sensors (CCD, charge coupled device) quantitativ erfasst und in einem **Pyrogramm** entsprechend der eingestrahlten Lichtmenge (Peakhöhe) grafisch dargestellt wird. Der Versuchsansatz wird nacheinander für alle vier dNTPs durchgeführt und nach jedem Durchgang verbliebenes freies dNTP und überschüssiges ATP durch das Enzym **Apyrase** abgebaut. Anstelle von dATP, das direkt mit Luciferin reagieren würde, wird ein modifiziertes Desoxyadenosintriphosphat verwendet, das nur von der Polymerase, nicht jedoch von der Luciferase als Substrat erkannt wird. Aus dem erhaltenen Pyrogramm lässt sich direkt die Nucleotidsequenz des neu synthetisierten Strangs ablesen.

$$(DNA)_n + dTNP \xrightleftharpoons{\text{DNA-Polymerase}} (DNA)_{n+1} + PP_i$$

$$PP_i + APS \xrightleftharpoons{\text{Sulfurylase}} ATP$$

$$ATP + \text{Luciferin} \xrightleftharpoons{\text{Luciferase}} \text{Oxyluciferin} + h\nu \text{ (Licht)}$$

$$dNTP \xrightleftharpoons{\text{Apyrase}} dNDP + P_i \quad dNMP + 2\ P_i$$

$$ATP \xrightleftharpoons{\text{Apyrase}} ADP + P_i \quad AMP + 2\ P_i$$

3.3.2 Der neue Stammbaum des Lebens

Die Auswertung der Sequenzanalysen der 16S rRNA von Prokaryoten bzw. der 18S rRNA von Eukaryoten hat ergeben, dass sich alle heutigen Lebewesen auf der Erde in **drei großen Urreichen** bzw. **Domänen** (**Drei-Urreiche-System**) entwickelt haben, die sich in zahlreiche phylogenetische Entwicklungslinien aufteilen (Abb. 3.**3**). Zwei dieser Domänen, die Bacteria (früher Eubakterien) und die Archaea (früher Archaebakterien), sind prokaryotisch. Die Domäne der Eukarya, aus der alle Tiere, Pflanzen, Pilze und auch die einzelligen Eukaryoten hervorgegangen sind, entspricht dem eukaryotischen Zelltyp. Alle drei Domänen sind entwicklungsgeschichtlich sehr alt. Die Wurzel des Stammbaums markiert den Punkt der Evolution, an dem sich die drei Domänen voneinander differenziert und getrennt weiter entwickelt haben. In jeder der drei Domänen gibt es zahlreiche Gene, die zwei oder sogar allen drei Domänen gemeinsam sind, aber auch jeweils charakteristische und einzigartige Eigenschaften. Beispielsweise enthält nur die Zellwand der Bacteria **Peptidoglykan**, weder Eukarya noch Archaea besitzen dieses Polymer. Die Membranen der Bacteria und der Eukarya enthalten **Esterlipide**, die der Archaea ausschließlich **Etherlipide** (S. 26 und S. 430,

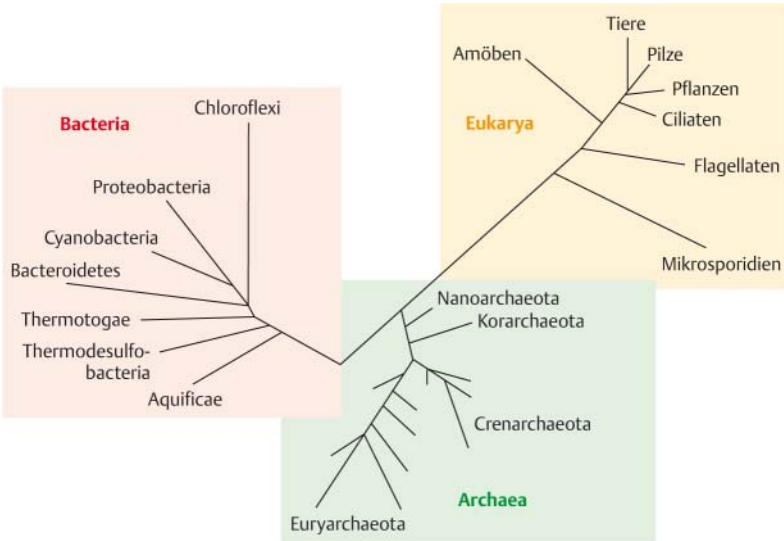


Abb. 3.**3** **Stammbaum des Lebens.** Mit Hilfe von Sequenzierungsanalysen der 16S bzw. 18S rRNA wurde ein Stammbaum ermittelt, der alle prokaryotischen und eukaryotischen Lebewesen in drei Urreiche mit einem gemeinsamen Ursprung einordnet.

(*Zellbiologie*). Typische Unterschiede gibt es auch bei Anzahl und Zusammensetzung der **RNA-Polymerasen**. Bacteria besitzen eine einzige RNA-Polymerase, die aus vier Untereinheiten besteht. In den einzelnen Gruppen der Archaea existieren mehrere verschiedene RNA-Polymerasen mit 8 bis 10 Untereinheiten. Eukarya besitzen drei RNA-Polymerasen, von denen eine sogar bis zu 12 Untereinheiten enthalten kann.

Die Einzigartigkeit der Bacteria-RNA-Polymerase wird für diagnostische und therapeutische Zwecke genutzt, beispielsweise wird Tuberkulose u. a. mit dem für das Bacteria-Enzym spezifischen **RNA-Polymerase-Hemmer** Rifampicin behandelt. Bei der Proteinbiosynthese zeigen die jeweiligen Mitglieder der drei Urreiche ebenfalls einige charakteristische Besonderheiten. Aufgrund dieser Unterschiede ist die Wirksamkeit von **Proteinsynthese-Hemmern** häufig auf nur eine Domäne beschränkt, z. B. wirkt das Antibiotikum Erythromycin nur bei Mitgliedern der Bacteria, dagegen hemmt das früher gegen Pilzerkrankungen eingesetzte Cycloheximid nur die eukaryotische Proteinsynthese.

Diese Befunde lassen sich mit der Hypothese erklären, dass vor der Entstehung der drei Urreiche ein Pool aus mehreren primitiven Zelllinien existierte, die alle von einem gemeinsamen Vorfahren abstammten und zwischen denen in hohem Maße **horizontaler Gentransfer** stattfand. Ausgehend von der so entstandenen Gründerpopulation entstanden dann die unterschiedlichen Domänen,

wobei der horizontale Gentransfer immer mehr eingeschränkt wurde. Dabei trennten sich zunächst die Bacteria-Linie und die Archaea/Eukarya-Linie, die sich später in die beiden Linien Archaea und Eukarya aufteilte. Archaea und Eukarya sind phylogenetisch enger miteinander als jeweils mit den Bacteria verwandt. Der Abzweigungspunkt der Archaea-Linie liegt näher an der Wurzel des Stammbaumes als die Ursprünge der beiden anderen Linien. Die heutigen Archaea, die oft unter ähnlich extremen Bedingungen leben, wie sie vermutlich auf der frühen Erde vorherrschten, (z. B. heiße Schwefelquellen), repräsentieren daher die Urform des Lebens in stärkerem Maße als die Bacteria oder die Eukarya. Nach der Trennung bildeten sich in jedem der drei Urreiche durch Mutation und Selektion innerhalb des jeweiligen Genpools zahlreiche Arten aus. Bei vielen eukaryotischen Organismen entwickelten sich **sexuelle Fortpflanzungsmechanismen**, die eine Vermischung der Genome zweier Individuen und damit die Neukombination von Eigenschaften sichern, ohne die grundsätzlichen Charakteristika einer Art zu verändern. Bei Prokaryoten hat sich die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers z. B. in Form der bei vielen Arten verbreiteten **Plasmide** erhalten. Während das bakterielle Chromosom die genetische Stabilität einer Art sichert, ermöglichen die auf Plasmiden lokalisierten Eigenschaften, die nicht nur vertikal, sondern auch horizontal weitergegeben werden, schnelle Anpassungen an veränderte Umweltbedingungen.

Evolution: Entwicklung von Lebewesen aus ihren Vorfahren und Entstehung neuer Arten.
Annotation: Bearbeitung der Sequenzierungsdaten mit speziellen Computerprogrammen (Algorithmen) und Einordnung in Datenbanken, Algorithmus: nach einem vorgegebenen Schema ablaufender Rechenvorgang.
Evolutionäre Distanz: Maß für den Zeitpunkt, an dem sich die phylogenetischen Entwicklungslinien zweier Organismen voneinander getrennt haben, ermittelt aus dem Prozentsatz der nicht homologen Sequenzen.
Phylogenetischer Stammbaum: Grafische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen verschiedenen Organismen, basiert z. B. auf Analysen der 16S bzw. 18S rRNA; Dendrogramm geeignet für detaillierte Stammbäume; Fächerform geeignet für Übersicht.
Drei-Urreiche-System: Modell der Einteilung aller Lebewesen anhand von rRNA-Analysen in die drei Urreiche (Domänen): Eukarya, Bacteria, Archaea. Zwei prokaryotische und eine eukaryotische Domäne.
Signatursequenzen: Basensequenzen der rRNA, die bei allen Mitgliedern einer Domäne (domänenspezifisch) oder einer Gruppe innerhalb einer Domäne (gruppenspezifisch) identisch sind.

3.4 Die Entwicklungslinien der Bacteria

Die phylogenetisch ältesten Entwicklungslinien **Aquificae**, **Thermodesulfobacteria** und **Thermotogae** enthalten hyperthermophile Bakterien. Sie wachsen chemolithotroph oder chemoorganotroph bei extrem hohen Temperaturen, wie sie wahrscheinlich auf der frühen Erde vorherrschten, und weisen einige Ähnlichkeiten mit den Archaea auf. Die Mitglieder der Linie **Chloroflexi** sind thermophile**,** meist phototrophe Bakterien. Sie besitzen Bakteriochlorophyll *a* in der Cytoplasmamembran und Bakteriochlorophyll *c* in Chlorosomen und betreiben anoxygene Photosynthese. CO_2 wird über den Hydroxypropionatweg fixiert. **Chlorobi** sind strikt anaerob und obligat phototroph und lagern Schwefel extrazellulär. Sie besitzen Bakteriochlorophyll *a* in der Cytoplasmamembran und speziesabhängig Bakteriochlorophyll *c*, *d* oder *g* in Chlorosomen, CO_2 wird über den reduktiven Citratzyklus fixiert. Die Mitglieder der **Deinococcus-Thermus**-Linie sind ungewöhnlich resistent gegenüber radioaktiver Strahlung und chemischen Mutagenen. Sie besitzen ein besonders effizientes DNA-Reparatur-System und eine spezielle DNA-Organisation. Die Zellen der **Spirochaetes** sind durch ihre besondere Gestalt und Bewegungsform gekennzeichnet, sie sind spiralig und beweglich durch ein aus Endoflagellen gebildetes Axialfilament. Zu den **Bacteroidetes** gehören sehr unterschiedliche Mitglieder. Sie sind aerob, anaerob, aquatisch, marin, psychrophil, Kommensalen oder pathogen. Einige bewegen sich gleitend und bauen Polymere wie Cellulose ab. Die **Chlamydiae** sind eine Gruppe von obligat parasitischen Bakterien mit nur geringen physiologischen Fähigkeiten. Sie besitzen kein Peptidoglykan, einige Arten sind pathogen. **Cyanobacteria** sind morphologisch sehr heterogen. Sie sind durch ihre oxygene Photosynthese gekennzeichnet, die sich von der Photosynthese anderer Prokaryoten deutlich unterscheidet: Sie besitzen zwei Photosysteme und als photosynthetische Pigmente Chlorophyll *a* in komplexen photosynthetischen Membranen und Phycobiline in Phycobilisomen. Einige Arten fixieren Stickstoff.

Die ursprünglich anhand der typischen Zellwand aus zahlreichen Peptidoglykanschichten definierte Entwicklungslinie **Grampositive Bakterien** ist anhand des GC-Gehalts der DNA ihrer Mitglieder in **Actinobacteria** (Grampositive mit hohem GC-Gehalt) und **Firmicutes** (Grampositive mit niedrigem GC-Gehalt) unterteilt worden. Die Entwicklungslinie Actinobacteria enthält die Propionsäurebakterien, Streptomyceten, coryneforme Bakterien, den symbiontischen Stickstofffixierer *Frankia* und *Bifidobacterium*, ein Mitglied der menschlichen Darmflora. Zur Entwicklungslinie Firmicutes gehören die Sporenbildner (z. B. *Bacillus* und *Clostridium*), die phototrophen strikt anaeroben Heliobacteria, Milchsäurebakterien, verschiedene Kokken und die zellwandlosen Mollicutes.

Die größte Entwicklungslinie ist die der **Proteobacteria**, die die Klassen Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Proteobacteria mit zahlreichen morpholo-

gisch und physiologisch sehr verschiedenen Mitgliedern enthält, darunter die phototrophen Purpurbakterien, die anoxygene Photosynthese betreiben und die Bakteriochlorophylle a und b sowie Carotinoide besitzen. Weiter gehört die große Gruppe der Enterobakterien mit zahlreichen apathogenen und pathogenen Mitgliedern in diese Entwicklungslinie sowie verschiedene chemolithotrophe Bacteria, Methylotrophe, Essigsäurebakterien und zahlreiche weitere Bacteria mit speziellen physiologischen oder morphologischen Eigenschaften. Obligate Zellparasiten innerhalb der Proteobacteria sind die Rickettsien.

In der Domäne Bacteria wurden inzwischen 26 über 16S rRNA-Sequenzanalysen offizielle phylogenetische Entwicklungslinien (Phyla) identifiziert, von denen mehrere bisher ausschließlich durch Sequenzanalysen der rRNA-Gene von mikrobiellen Gemeinschaften ermittelt wurden. Die tatsächliche Anzahl von Entwicklungslinien wird auf bis zu 50 geschätzt, die wichtigsten (Abb. 3.**4**) werden nachfolgend vorgestellt.

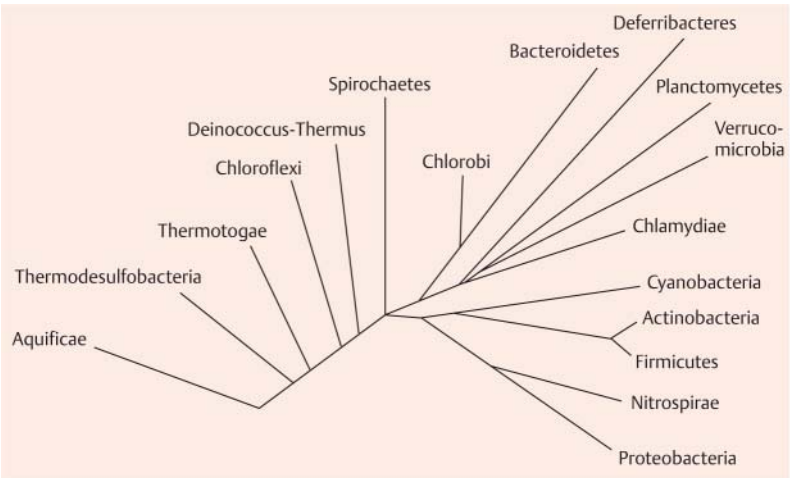


Abb. 3.**4** **Phylogenetische Entwicklungslinien der Bacteria.**

3.4.1 Aquificae, Thermodesulfobacteria und Thermotogae

Namensgebend für diese drei ältesten phylogenetischen Entwicklungslinien waren die Gattungen *Aquifex*, *Thermodesulfobacterium* und *Thermotoga.* Außer ihrer hohen Hitzetoleranz haben Mitglieder dieser Entwicklungslinien auch einige andere Eigenschaften mit **Archaea** gemeinsam: Das Genom von *Thermotoga* besteht zu einem Fünftel aus Genen hyperthermophiler Archaea, ein

Befund, der die Hypothese des horizontalen Gentransfers vor der Trennung der drei Urreiche stützt. Die Membranlipide von *Thermodesulfobacterium* sind **Etherlipide** wie die der Archaea, allerdings von abweichender chemischer Zusammensetzung.

Aquifex besiedelt vulkanische Quellen unter dem Meeresspiegel und ist mikroaerophil (= O_2-Konzentrationen unter 21 %). Das Wachstum erfolgt ausschließlich chemolithoautotroph mit H_2, S^0 oder $S_2O_3^{2-}$ als Elektronendonor, CO_2 wird über den reduktiven Citratzyklus fixiert. Bei einem Wachstumsoptimum von 85°C und einem Maximum von 95°C wird die **Hitzetoleranz** von *Aquifex* nur von einigen hyperthermophilen Archaea übertroffen. Mit einem Wachstumsoptimum von 70°C ist *Thermodesulfobacterium* unter den Bacteria der Sulfatreduzierer mit der höchsten Hitzetoleranz. *Thermodesulfobacterium* ist strikt anaerob und reduziert Sulfat mit verschiedenen Elektronendonoren, z. B. Lactat, Pyruvat oder Ethanol. *Thermotoga* ist anaerob und wächst chemoorganotroph in heißen Quellen auf verschiedenen organischen Substraten wie Zuckern oder Proteinen, das Wachstumsoptimum liegt bei 80°C. Alternativ kann *Thermotoga* Fe^{3+} mit H_2 als Elektronendonor zu Fe^{2+} reduzieren. Die Zellen von *Thermotoga* sind von einer äußeren Hülle umgeben (lat. toga: Bedeckung).

Aquificae: Hyperthermophil (Optimum 85°C), mikroaerophil, chemolithotroph.
Thermotogae: Hyperthermophil (Optimum 80°C), anaerob, chemoorganotroph, 20 % Archaea-Gene, äußere Hülle.
Thermodesulfobacteria: Hyperthermophil (Optimum 70°C), strikt anaerob, Sulfatreduzierer, Etherlipide.

3.4.2 Chloroflexi: Schwefelfreie Grüne Bakterien

Die **Chloroflexi** (Schwefelfreie Grüne Bakterien) sind die älteste **photosynthetische** phylogenetische Entwicklungslinie und leben, häufig vergesellschaftet mit Cyanobakterien, in heißen Quellen, wo sie dicke Bakterienmatten bilden. Namensgeber für die phylogenetische Entwicklungslinie der Chloroflexi war die Gattung *Chloroflexus*, deren Name auf die hohe **physiologische Flexibilität** hindeutet: *Chloroflexus* kann photoheterotroph auf vielen organischen Substraten oder photoautotroph mit CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Bei autotrophem Wachstum fixiert *Chloroflexus* CO_2 über den **Hydroxypropionatweg** (S. 412). Als photosynthetische Pigmente besitzt *Chloroflexus* Bakteriochlorophyll *c*, das wie bei den Chlorobi in Chlorosomen lokalisiert ist und als Lichtsammelkomplex fungiert, und in der Cytoplasmamembran Bakteriochlorophyll *a* als photosynthetisches Reaktionszentrum, das dem der Purpurbakterien ähnelt. Im Dunkeln wächst *Chloroflexus* aerob und oxidiert verschiedene organische Substrate, unter diesen Bedingungen wird die Synthese des Photosyntheseapparates unterdrückt. Schwefelfreie Grüne Bakterien sind in der Lage, H_2S zu oxidieren, bilden aber keine Schwefelablagerungen. Weitere Mitglieder der Chloroflexi

sind *Oscillochloris* und *Chloronema*, deren Zellen ungewöhnlich groß sind, sowie *Heliothrix* und *Roseiflexus*, die weder Bakteriochlorophyll *c* noch Chlorosomen besitzen.

Chloroflexi: Anoxygene Photosynthese, Bakteriochlorophyll *a* und in Chlorosomen Bakteriochlorophyll *c*, photoheterotroph oder photoautotroph, CO_2-Fixierung über Hydroxypropionatweg, Dunkelwachstum aerob chemoheterotroph.

3.4.3 Chlorobi (Grüne Schwefelbakterien)

Der Name **Chlorobi** leitet sich von der Gattung *Chlorobium* ab, der deutsche Name „Grüne Schwefelbakterien" geht auf die relativ hohe Toleranz gegenüber H_2S zurück, das als Elektronendonor verwendet wird. Grüne Schwefelbakterien leben als Plankton in Seen. Sie sind unbeweglich und besitzen **Gasvakuolen** innerhalb ihrer Zellen, mit deren Hilfe sie im Wasser schweben und sich so nach der Lichtintensität ausrichten können (S. 53). Alle kultivierten Grünen Schwefelbakterien sind **strikt anaerob** und **obligat phototroph**, Sauerstoff inhibiert die Synthese der photosynthetisch aktiven Pigmente und Strukturen. Grüne Schwefelbakterien sind nicht in der Lage, im Dunkeln zu atmen und können nur einfache organische Substanzen assimilieren. Sie besitzen alle geringe Mengen Bakteriochlorophyll *a* in der Cytoplasmamembran und zusätzlich speziesabhängig die Bakteriochlorophylle *c*, *d* oder *e* in **Chlorosomen** (S. 54). Schwefelwasserstoff (H_2S) als Elektronendonor (S. 392) wird zunächst zu S^0 oxidiert, das **extrazellulär** gelagert wird. Wird H_2S limitierend, oxidieren die Bakterien den gelagerten Schwefel zu SO_4^{2-}. Bei autotrophem Wachstum fixieren Chlorobi CO_2 über den **reduktiven Citratzyklus** (S. 411). Einige Grüne Schwefelbakterien bilden **Konsortien** mit chemoorganotrophen Bakterien. In diesen Lebensgemeinschaften zweier unterschiedlicher Bakterienarten ist die chemoorganotrophe Zelle stets von mehreren phototrophen umgeben, die an ihrer Oberfläche haften. Da sich die Partner synchron teilen, findet zwischen ihnen offensichtlich eine Form der Kommunikation statt.

Überraschenderweise wurden kürzlich auch in einem neu entdeckten Bakterium, das unter **aeroben** Bedingungen Photosynthese betreibt, **Chlorosomen** gefunden. *Candidatus* Chloracidobacterium thermophilum lebt in Gemeinschaft mit Cyanobakterien in heißen Quellen im Yellowstone Nationalpark und konnte anhand von 16S rRNA-Sequenzanalysen dem ebenfalls neuen Phylum **Acidobacteria** zugeordnet werden. *Ca.* Chloracidobacterium thermophilum ist bisher das einzige photosynthetische Mitglied der Acidobacteria, deren Mitglieder fast ausschließlich über Metagenom-Analysen von Habitaten nachgewiesen wurden. Das Wasser im Lebensraum von *Ca.* Chloracidobacterium thermophilum ist 50 bis 66°C warm und alkalisch (pH: 8,5). Die Bakterien synthetisieren **zwei verschiedene Chlorophylle** und besitzen eine sehr große Anzahl von Chlorosomen, die jeweils ca. 250 000 Chlorophyll-Moleküle enthalten, sodass *Ca.* Chloracidobacterium thermophilum

auch bei geringer Lichtintensität gegenüber den in seinem Lebensraum vorherrschenden Cyanobakterien konkurrenzfähig ist. Möglicherweise liefert die Entdeckung von *Ca.* Chloracidobacterium thermophilum neue Erkenntnisse über die Evolution der Photosynthese. ◀

Chlorobi: Anoxygene Photosynthese, Bakteriochlorophyll *a* und in Chlorosomen speziesabhängig Bakteriochlorophyll *c*, *d* oder *e*, strikt anaerob, obligat phototroph. Extrazelluläre Schwefelablagerung, CO_2-Fixierung über reduktiven Citratzyklus.

3.4.4 Deinococcus-Thermus

Die Mitglieder dieser Entwicklungslinie mit der einzigen Klasse **Deinococci** besitzen ein ungewöhnliches Peptidoglykan, das Ornithin anstelle von Diaminopimelinsäure enthält. Die Mitglieder der Gattung ***Thermus*** sind thermophil und wachsen chemoorganotroph, die bekannteste Art ist *Thermus aquaticus*, aus dem die äußerst hitzestabile, für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, 🕮*Genetik*) verwendete DNA-Polymerase Taq stammt. Die Gattung ***Deinococcus*** zeigt eine außerordentliche **Resistenz gegenüber radioaktiver Strahlung**, *Deinococcus radiodurans* wurde z. B. schon aus der direkten Umgebung von Atomreaktoren isoliert. Eine Rolle spielt hierbei vermutlich die komplexe mehrschichtige Zellwand, die noch von einer äußeren Membran umgeben ist. Auch gegenüber chemischen Mutagenen ist *D. radiodurans* sehr viel resistenter als andere Organismen. Für diese hohe Resistenz gegenüber Schädigungen der DNA ist die äußerst effiziente DNA-Reparatur verantwortlich, für die *D. radiodurans* mehrere voneinander unabhängige Systeme besitzt. Vermutlich trägt auch die besondere Organisation der DNA in *D. radiodurans* zur außerordentlich hohen DNA-Stabilität bei. In nicht teilungsaktiven Zellen von *D. radiodurans* ist die Erbinformation vierfach vorhanden und der Doppelstrang in toroidaler Form (lat. torus, beschreibt die geometrische Form eines dreidimensionalen Ringes, ähnlich einem Schwimmreifen) auf vier Kompartimente verteilt. Diese extrem dichte Packung der DNA ermöglicht die hohe Effizienz der DNA-Reparatur, weil auch nach Strangbrüchen die beiden komplementären Stränge nicht auseinander driften, sodass die Fehlerquote der Reparaturenzyme deutlich geringer ist als in anderen Bakterien. Homologe Rekombination zwischen den Nucleotiden benachbarter Kompartimente unterstützt zusätzlich die korrekte Reparatur geschädigter DNA und die nachfolgende erneute Zellteilung.

Deinococci: Peptidoglykan enthält Ornithin anstelle von Diaminopimelinsäure.
***Deinococcus*:** Hohe Resistenz gegenüber radioaktiver Strahlung und chemischen Mutagenen, mehrschichtige Zellwand, mehrere DNA-Reparatur-Systeme, vierfaches Nucleoid.
***Thermus*:** Thermophil, chemoorganotroph, hitzestabile DNA-Polymerase (Taq).

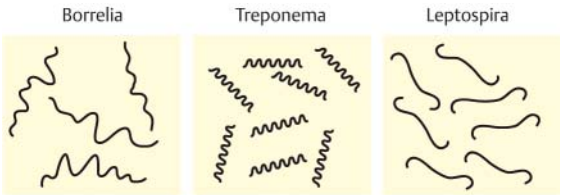


Abb. 3.**5** **Charakteristische Formen von Spirochäten.** Bei *Borrelia* sind die Windungen sehr unregelmäßig. Die Zellen von *Treponema* sind sehr dünn und korkenzieherartig gewunden. *Leptospira*-Zellen besitzen durch die hakenförmigen Enden eine charakteristische „Kleiderbügelform".

3.4.5 Spirochaetes

Die Mitglieder dieser Entwicklungslinie haben spiralige, teilweise sehr unregelmäßig geformte Zellen und sind beweglich (Abb. 3.**5**). Ihr Bewegungsmechanismus unterscheidet sich von dem aller anderen beweglichen Prokaryoten und wird durch Endoflagellen vermittelt, die das **Axialfilament** bilden (S. 44, Abb. 2.**15**). Neben apathogenen Arten, die vorwiegend Gewässer besiedeln, enthält diese Entwicklungslinie auch Arten, die als Kommensalen oder Parasiten von Tieren leben. Mehrere Arten sind humanpathogen, z. B. *Treponema pallidum* (Syphilis), *Borrelia burgdorferi* (Borreliose) und verschiedene *Leptospira*-Arten (Leptospirosen, z. B. Weil'sche Krankheit). *B. burgdorferi* besitzt eine ungewöhnliche genetische Ausstattung: neben einem linearen Chromosom enthalten die Zellen zusätzlich bis zu 12 lineare und 9 zirkuläre Plasmide, die insgesamt für etwa 40 % der genetischen Information codieren.

Spirochaetes: Spiralige Form, beweglich durch Endoflagellen, apathogene, Kommensalen und pathogene Arten.

3.4.6 Bacteroidetes

Die Entwicklungslinie **Bacteroidetes** enthält die drei Klassen **Bacteroidetes**, **Flavobacteria** und **Sphingobacteria** mit jeweils zahlreichen Mitgliedern. Namensgeber für die Klasse Bacteroidetes und die gesamte Entwicklungslinie war die Gattung *Bacteroides*, deren Mitglieder als Kommensalen im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren oder frei in Gewässern leben. *Bacteroides* ist obligat anaerob und mit bis zu 10^{11} Zellen pro Gramm Stuhl die zahlenmäßig größte Bakteriengruppe in der menschlichen Darmflora (S. 531). Einige *Bacteroides*-Arten können endogene Infektionen verursachen, z. T. als Mischinfektionen mit aeroben Bakterien. Im Unterschied zu den meisten anderen Prokaryoten synthetisiert *Bacteroides* Sphingolipide (S. 429 und 📖*Biochemie, Zellbiologie*), die normalerweise für Eukaryoten charakteristisch sind. *Flavobacterium*, nach dem die

Klasse Flavobacteria benannt ist, wächst aerob in aquatischen und marinen Habitaten, *Polaribacter* und *Psychroflexus* sind psychrophil (S. 453). *Cytophaga* gehört zur Klasse der Sphingobacteria und bewegt sich gleitend (S. 43), *Sporocytophaga* bildet Mikrocysten als Ruhestadien. *Cytophaga* und *Sporocytophaga* sind obligat aerob und bauen Polysaccharide wie Cellulose oder Chitin ab, einige auch Agar. Ein Großteil der Cellulosezersetzung an sauerstoffreichen natürlichen Standorten geht auf ihre Aktivität zurück. Bestimmte proteolytische *Cytophaga*-Spezies sind pathogen für Fische.

Bacteroidetes: Zahlreiche Mitglieder in sehr unterschiedlichen Lebensräumen.
***Bacteroides*:** Obligat anaerob, Kommensalen im menschlichen Darm, synthetisiert Sphingolipide.
***Flavobacterium*:** Aerob, aquatisch oder marin.
***Psychrobacter*, *Psychroflexus*:** Psychrophil.
***Cytophaga*:** Obligat aerob, Fisch-pathogene Spezies.

3.4.7 Chlamydiae

Die Mitglieder des Phylums **Chlamydiae**, das nach der bekanntesten Gattung *Chlamydia* benannt ist, besitzen die geringsten physiologischen Fähigkeiten aller Bacteria und sind **obligate Zellparasiten**. Das für die Domäne typische Peptidoglykan ist in den Zellwänden der Chlamydiae nicht nachweisbar, interessanterweise wurden bei der Sequenzierung des Genoms von *C. trachomatis* jedoch Gene für die Peptidoglykan-Synthese gefunden. Die bisherige Annahme, dass Chlamydiae Energieparasiten sind, wurde in Frage gestellt, da die Genom-Analyse zeigte, dass ATP-Synthese-Gene vorhanden sind. Drei pathogene Arten sind bekannt: *Chlamydia trachomatis* (Trachom der Augen, Infektionen des Genitaltraktes), *Chlamydophila psittaci* (Psittakose, auch: Papageienkrankheit) und *Chlamydophila pneumoniae* (Atemwegsinfektionen). In den durch Arteriosklerose verengten Blutgefäßen vieler Herzinfarktpatienten wurde *C. pneumoniae* ebenfalls nachgewiesen; allerdings ist noch ungeklärt, ob ein ursächlicher Zusammenhang besteht. Im Verlauf des Infektionszyklus findet ein Wechsel zwischen zwei unterschiedlichen Zelltypen statt: Die kleinen, relativ widerstandsfähigen Elementarkörper stellen die infektiöse Verbreitungseinheit dar, die nicht infektiösen deutlich größeren Initialkörper (auch: Retikulärzelle) leben nur innerhalb der Wirtszellen und vermehren sich durch Querteilung.

Chlamydiae: Obligate Zellparasiten, kein Peptidoglykan, geringe physiologische Fähigkeiten, drei humanpathogene Spezies.

3.4.8 Cyanobacteria

Die Entwicklungslinie **Cyanobacteria** enthält eine große Anzahl meist **obligat phototropher** Bakterien. Im Unterschied zu photosynthetischen Bakterien anderer Entwicklungslinien enthalten Cyanobacteria **zwei Photosysteme**, ihre Photosynthese ist **oxygen** wie die der grünen Pflanzen (S. 343). Morphologisch lassen sich fünf Gruppen unterscheiden: Einzelzellen, die sich durch Zweiteilung vermehren und solche, die durch multiple Spaltungen Kolonien bilden, sowie filamentöse Formen mit oder ohne Heterocysten zur Stickstofffixierung (S. 486) und verzweigte Filamente. In den Kolonien oder Filamenten werden die Zellen durch Schleime oder Hüllen zusammengehalten. Viele Cyanobacteria sind beweglich und die Arten, die als Plankton in Gewässern leben, besitzen Gasvakuolen, um sich jeweils in der Zone mit der günstigsten Lichtintensität aufhalten zu können. Als photosynthetisch aktives Pigment besitzen Cyanobacteria wie die grünen Pflanzen **Chlorophyll *a***, das in den Zellen in mehrschichtigen, teils sehr komplexen Membranen lokalisiert ist (Abb. 3.**6**). Zusätzlich sind **Phycobiline** als **akzessorische Pigmente** der Photosynthese vorhanden. Sie sind in den **Phycobilisomen** an die photosynthetischen Membranen angelagert. Viele Cyanobacteria bilden starke **Neurotoxine,** die bei massivem Wachstum in Gewässern die dort lebende Tierwelt schädigen können. Die ältesten Mikrofossilien von Cyanobacteria lassen sich auf ca. drei Milliarden Jahre zurückdatieren. Zu



Abb. 3.**6** **In Teilung befindliches Cyanobakterium.** An den Zellrändern befinden sich die Thylakoidmembranen, in denen die Photopigmente lokalisiert sind. (Aus Westermann, M., A. Ernst, S. Brass, P. Böger, W. Wehrmeyer. Arch. Microbiol. 162 [1994] 222)

dieser Zeit war die Atmosphäre noch anaerob und vermutlich hat erst die oxygene Photosynthese der ersten Cyanobacteria den Sauerstoffgehalt allmählich so weit erhöht, dass aerobes Leben auf der Erde möglich wurde (Abb. 1.**3**). Als Energie- und Stickstoffspeicher synthetisieren viele Cyanobacteria Cyanophycin, ein Copolymer aus Aspartat und Arginin (S. 53).

Die Ordnung **Prochlorales** (auch: Prochlorophyten) enthält mehrere Familien, deren Mitglieder nicht nur ein Chlorophyll *a*, sondern anstelle von Phycobilinen auch **Chlorophyll *b*** wie die Chloroplasten besitzen. *Prochloron* lebt als Endosymbiont von marinen Seescheiden und besitzt ausgeprägte interne Thylakoidmembranen. In Seescheiden im australischen Great Barrier Reef wurde neben *Prochloron* noch ein zweiter zu den Prochlorales gehörender Endosymbiont gefunden: *Acaryochloris* besitzt kein Chlorophyll *a*, sondern **Chlorophyll *d***, das auch bei Rotalgen vorkommt.

Cyanobacteria: oxygene Photosynthese, zwei Photosysteme, Chlorophyll *a*, Phycobiline in Phycobilisomen als akzessorische Pigmente. Einzelzellen oder filamentöse Formen, speziesabhängig: Beweglichkeit, Stickstofffixierung, Gasvakuolen, Neurotoxine.
Prochlorales: Ordnung der Cyanobacteria, besitzen Chlorophyll *a* (oder *d*) und *b*, Endosymbionten.

3.4.9 Firmicutes

Als **Firmicutes** bilden die grampositven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt eine eigene Entwicklungslinie, deren Mitglieder morphologisch und physiologisch sehr unterschiedlich sind. Einige Firmicutes bilden unter ungünstigen Umweltverhältnissen Endosporen (S. 56). Die meisten **Sporenbildner** sind Stäbchen, für deren Identifizierung Form und intrazelluläre Lage der Spore eine wichtige Rolle spielen. Mitglieder der Gattung *Bacillus* wachsen aerob oder fakultativ im Boden, viele bauen mithilfe von hydrolytischen Exoenzymen Polymere ab. In der Sporulationsphase produzieren zahlreiche *Bacillus*-Arten Antibiotika, z. B. Gramicidin oder Polymyxin. Eine human- und tierpathogene Spezies ist der Milzbranderreger *Bacillus anthracis*. Einige *Bacillus*-Arten (z. B. *Bacillus thuringiensis*) produzieren während der Sporulation Insektizide, die zur biologischen Insektenbekämpfung eingesetzt werden (S. 53). Die Gattung *Clostridium* enthält strikt anaerobe Bodenbakterien, einige leben auch in anaeroben Bereichen des Darmtrakts von Säugern. Clostridien besitzen keine Atmungskette und fermentieren verschiedene Kohlenhydrate oder Aminosäuren pH-abhängig entweder zu organischen Säuren wie Butyrat und Acetat oder zu neutralen Verbindungen wie Butanol und Aceton. Die mikrobiellen Synthesen dieser Lösungsmittel waren früher von industriellem Interesse, zurzeit ist die rein chemische Herstellung kostengünstiger. Das könnte sich bei steigenden Rohölpreisen in naher Zukunft wieder ändern. Manche *Clostridium*-Arten fixieren Stickstoff, z. B. *C. pasteuria-*

num. Beim Wachstum auf Aminosäuren unterscheidet man zwei Fermentationstypen: Einige Clostridien fermentieren einzelne Aminosäuren, andere Arten jeweils ein Paar von Aminosäuren, bei denen eine als Elektronendonor, die andere als Elektronenakzeptor fungiert (Stickland-Reaktion, S. 385). Human- oder tierpathogene Arten sind *Clostridium perfringens* (Gasbrand), *C. botulinum* (Botulismus) und *C. tetani* (Tetanus).

Auch einige Arten der strikt anaeroben, phototrophen **Heliobacteria**, deren natürlicher Lebensraum vor allem Reisfelder sind, bilden Endosporen. Heliobacteria besitzen kein Bakteriochlorophyll a wie die Grünen Bakterien und die Purpurbakterien, sondern ausschließlich **Bakteriochlorophyll *g***. Dieses Photopigment, das nicht in speziellen internen Membranen lokalisiert, sondern mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist, kommt in keiner der anderen Gruppen vor. Im Dunkeln wachsen Heliobacteria chemotroph.

Milchsäurebakterien sind eine morphologisch heterogene Gruppe von unbeweglichen, Sauerstoff-toleranten Firmicutes, deren gemeinsames Merkmal die anaerobe Produktion von Milchsäure aus Zuckern ist. Da ihnen wichtige Komponenten der Atmungskette fehlen, bilden sie ATP nur über Substratstufenphosphorylierung. **Homofermentative** Milchsäurebakterien (z. B. *Streptococcus*) setzen Zucker über die Glykolyse ausschließlich zu Milchsäure um, während **heterofermentative** (z. B. *Leuconostoc*) Glucose über den Phosphoketolase-Weg (S. 355) oxidieren und als Endprodukte zu gleichen Teilen Milchsäure, Ethanol und CO_2 bilden. Ihnen fehlt die Aldolase, ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Traditionell spielen Milchsäurebakterien für die Produktion bestimmter Lebensmittel, vor allem Sauermilchprodukte, sowie Silage als Tierfutter eine wichtige Rolle (S. 556).

Viele **grampositive Kokken** gehören zur Entwicklungslinie der Firmicutes, z. B. die Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Sarcina*. Bei ihrer Zellteilung entstehen charakteristische, arttypische Zusammenlagerungen (S. 18, Abb. 2.**2**), die wichtige Kriterien zur Identifizierung darstellen. Einige grampositive Kokken leben als Kommensalen oder Parasiten von Mensch und Tier, es gibt jedoch auch pathogene Arten. Beispielsweise kann *Staphylococcus aureus*, dessen Kolonien typischerweise goldgelb pigmentiert sind, verschiedene eitrige Entzündungen auslösen, bestimmte Stämme von *Streptococcus pyogenes* verursachen Scharlach und *Listeria monocytogenes*, ein intrazellulärer Parasit, der über verschiedene Lebensmittel übertragen wird, kann bei immunschwachen Menschen zu einer schweren Listeriose führen. Der normalerweise harmlose Hautbewohner *Staphylococcus epidermidis* ist an der Entstehung von Akne beteiligt und kann schwerwiegende Infektionen verursachen, wenn er ins Körperinnere gelangt (S. 542). Ursache für die auftretenden Krankheitssymptome ist die Produktion zellschädigender Enzyme oder Toxine. Streptokokken werden anhand ihres Hämolysevermögens in Gruppen eingeteilt: β-hämolysierende Streptokokken produzieren Hämolysine und führen eine vollständige Hämolyse durch, α-hämolysierende („vergrünende“) Streptokokken setzen Hämoglobin zu

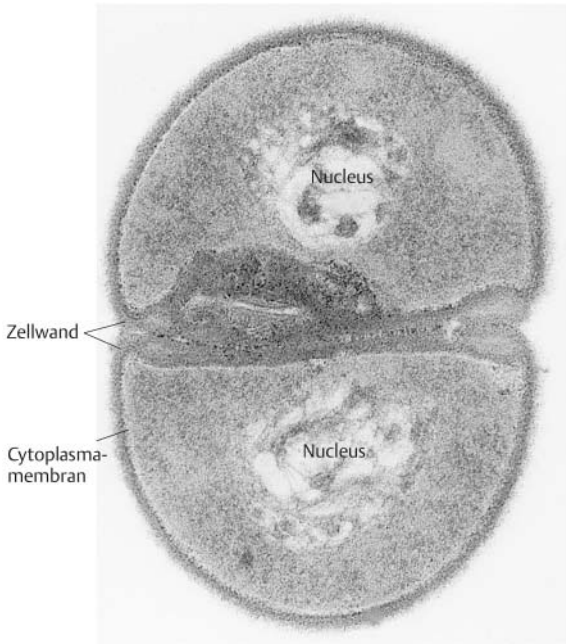


Abb. 3.7 **In Teilung befindliche Streptococcus-Zelle.** (EM-Aufnahme von J. Schlepper-Schäfer, Konstanz, aus Plattner, Hentschel, Thieme 2006)

Methämoglobin um, wodurch um die Kolonien eine grüne Zone entsteht. Streptokokken ohne Hämolysevermögen bilden eine eigene Gruppe. Weitere Bestimmungskriterien für Streptokokken sind verschiedene Polysaccharid-Antigene auf der Zelloberfläche (Lancefield-Gruppierung).

Die Klasse **Mollicutes**, die demnächst aus der Entwicklungslinie der Firmicutes ausgegliedert und als eigenes Phylum **Tenericutes** zusammengefasst werden soll, enthält verschiedene Bacteria, die keine Zellwand (Peptidoglykan) besitzen, z. B. die **Mycoplasmen**. Die Zellen von *Mycoplasma* sind sehr klein, die Genomgröße liegt zwischen 1100 und 580 kbp. Mycoplasmen leben meist parasitisch in Tieren oder Pflanzen, einige Arten sind pathogen. Wegen ihrer relativ stabilen Cytoplasmamembran sind Mycoplasmen gegenüber osmotischen Schwankungen der Umgebung weniger empfindlich als künstlich erzeugte Protoplasten von Bakterien, die normalerweise von einer Zellwand umgeben sind. Bei einigen Mycoplasmen-Arten enthält die Cytoplasmamembran sogar **Steroide**, was für prokaryotische Membranen ungewöhnlich ist (S. 27 und 🕮*Biochemie, Zellbiologie*). Wie Methanotrophe (s. u.) synthetisieren auch Mycoplasmen diese Sterole nicht selbst, sondern nehmen sie aus der Umgebung auf.

Firmicutes: Grampositive Bacteria mit niedrigem GC-Gehalt, morphologisch und physiologisch sehr verschieden.
Sporenbildner: Bilden unter ungünstigen Bedingungen Endosporen, aerob (z. B. *Bacillus*), anaerob (z. B. *Clostridium*, Heliobacteria).
***Bacillus*:** Einige Arten von *Bacillus* produzieren Antibiotika, andere Insektizide, pathogene Art: *B. anthracis*.
***Clostridium*:** Keine Atmungskette, Wachstum ausschließlich fermentativ auf Kohlenhydraten oder Aminosäuren, pathogene Arten: *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. botulinum*.
Heliobacteria: Strikt anaerob, phototroph, anoxygene Photosynthese, Bakteriochlorophyll g.
Milchsäurebakterien: Unbeweglich, anaerob, fermentieren Zucker zu Milchsäure; homofermentative bilden über die Glykolyse ausschließlich Milchsäure, heterofermentative über den Phosphoketolase-Weg Milchsäure, Ethanol und CO_2.
Grampositive Kokken: Bilden oft arttypische Zusammenlagerungen, z. B. *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, häufig Kommensalen oder Parasiten, einige pathogene Arten, z. B. *Staphylococcus aureus*.
Mollicutes: Klasse von zellwandlosen Firmicutes, z. B. *Mycoplasma*. Sehr kleines Genom, Cytoplasmamembran enthält Sterole. Meist Parasiten oder pathogen.

3.4.10 Actinobacteria

Die Entwicklungslinie **Actinobacteria** mit der einzigen Klasse Actinobacteria umfasst die grampositiven Bacteria mit hohem, deutlich über 50 % liegendem GC-Gehalt. Bei den Mitgliedern dieses Phylums handelt es sich vorwiegend um Stäbchen oder filamentöse, z. T. auch unregelmäßige Formen; es gibt jedoch auch sphärische Zellen wie die der Gattung *Micrococcus*, die den Staphylokokken ähneln.

Die Ordnung **Actinomycetales** enthält zahlreiche Familien der Actinobacteria. **Propionsäurebakterien** sind anaerobe, unbewegliche Stäbchen, die aus Milchsäure oder verschiedenen anderen Energiesubstraten als Hauptprodukt Propionsäure bilden, außerdem geringere Mengen Essigsäure und CO_2. (S. 381). Sowohl der charakteristische Geschmack als auch die typischen großen Löcher (CO_2-Bildung) des Schweizer Emmentaler Käses gehen auf die Aktivität von Propionsäurebakterien der Gattung *Propionibacterium* zurück, die im Pansen von Wiederkäuern leben, aus deren Labmagen das bei der Käseherstellung für die Milchproteinausfällung verwendete Labferment traditionellerweise gewonnen wird. Mit der Zugabe des Labfermentes gelangen auch die Bakterien in den reifenden Käse. *Propionibacterium acne* wird häufig zusammen mit *Staphylococcus epidermidis* (s. o.) in den Hautläsionen von Patienten mit Acne vulgaris nachgewiesen.

Streptomyceten werden vor allem im Boden gefunden, das von ihnen produzierte Geosmin erzeugt den typischen Waldbodengeruch. Sie wachsen wie Pilze als verzweigte **Mycelien**. Form und Struktur des Substratmycels und des

meist sporenbildenden Luftmycels dienen als wichtige Kriterien bei der Identifizierung der einzelnen Arten. Namensgebend ist die Gattung *Streptomyces*, deren Mitglieder als Produzenten zahlreicher in der Humanmedizin verwendeter Antibiotika wie Erythromycin, Tetracycline oder Nystatin von Bedeutung sind. Das Genom von Streptomyceten ist sehr groß und im Gegensatz zu dem der meisten anderen Bakterien linear und nicht zirkulär.

Coryneforme Bakterien sind aerob und unbeweglich, ihre Zellen haben eine unregelmäßige, an einem Ende oft keulenartig verdickte Form (griech. coryne: Keule). Mikroskopisch lassen sich häufig V-förmige Zusammenlagerungen beobachten, die durch eine als **Schnappteilung** bezeichnete Besonderheit bei der Zellteilung entstehen: Die Zellwand besteht aus zwei Schichten, von denen nur die innere an der Zellteilung beteiligt ist, sodass die Tochterzellen zunächst gemeinsam in der äußeren Schicht liegen. Diese reißt dann ruckartig an einer Stelle ein, wodurch die beiden Zellen in diesem Bereich auseinander „schnappen" und die V-Form entsteht. Die wichtigsten coryneformen Bakterien sind die *Arthrobacter*-Arten, die in der Erde leben und im Verlauf ihres Entwicklungszyklus ihre Gestalt zwischen Kugel- und Stäbchenform wechseln, sowie die Gattung *Corynebacterium* mit der pathogenen Art *Corynebacterium diphtheriae* (S. 542). Für die industrielle Produktion von Glutamat (Salz der Glutaminsäure) und anderen Aminosäuren wird weltweit *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (S. 570). Da Glutamat normalerweise nicht ausgeschieden wird, entzieht man Produktionsstämmen von *C. glutamicum* z. B. das essentielle Vitamin Biotin, wodurch die Phospholipidzusammensetzung der Zellmembran stark verändert wird. Durch diese Veränderung wird wahrscheinlich ein Transportprotein aktiviert, das Glutamat aus der Zelle in das umgebende Medium exportiert.

Die Zellwand von **Mykobakterien** enthält langkettige Mycolsäuren (S. 38). Zu den Mykobakterien gehören verschiedene saprophytische Arten, aber auch human- und tierpathogene wie *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose, S. 543), *M. bovis* (Rindertuberkulose), *M. avis* (Geflügeltuberkulose) oder *M. leprae* (Lepra). Die pathogenen *Mycobacterium*-Arten wachsen deutlich langsamer als die apathogenen.

Die Familie der **Frankiaceae** enthält nur die **stickstofffixierende** Art *Frankia alni,* die entweder frei im Boden oder symbiontisch in der Rhizosphäre einiger verholzender Pflanzen, z. B. Erlen oder Sanddorn, vorkommt.

Die Ordnung **Bifidobacteriales** enthält die Familie der **Bifidobacteriaceae**, deren bekannteste Gattung ***Bifidobacterium*** zur Normalflora des Menschen gehört. Insbesondere in der Darmflora gestillter Säuglinge werden fast ausschließlich Bifidobakterien nachgewiesen (S. 530). Charakteristisch ist ihr besonderer Abbauweg für Zucker (***Bifidobacterium*-Gärung**), über den Glucose zu Acetat und Lactat im Verhältnis 3 zu 2 abgebaut wird. Schlüsselenzym der *Bifidobacterium*-Gärung ist wie bei der heterofermentativen Milchsäuregärung eine **Phosphoketolase** (S. 377), die jedoch im Unterschied zur Phosphoketolase der heterofermentativen Milchsäurebakterien auch Fructose-6-phosphat umsetzt.

Mit 2,5 ATP pro Glucose übertrifft die Energieausbeute der *Bifidobacterium*-Gärung sowohl die der heterofermentativen Milchsäuregärung (1 ATP pro Glucose) als auch die der homofermentativen (2 ATP pro Glucose).

Actinobacteria: Grampositive Bacteria mit hohem GC-Gehalt, meist Stäbchen oder filamentöse Formen.
Propionsäurebakterien: Anaerob, unbeweglich, setzen verschiedene Substrate, z. B. Milchsäure, hauptsächlich zu Propionsäure um, *Propionibacterium* lebt im Pansen von Wiederkäuern.
Streptomyceten: Bodenbewohner, Wachstum als verzweigte Mycelien, lineares, sehr großes Genom, viele Antibiotikaproduzenten.
Coryneforme: Aerob, unbeweglich, unregelmäßige, oft keulenartig verdickte Zellform, V-förmige Zusammenlagerung durch Schnappteilung, *Corynebacterium*: pathogene Art *C. diphtheriae*, Aminosäureproduzent *C. glutamicum*, *Arthrobacter*: Bodenbewohner, Wechsel zwischen Stäbchen- und Kugelform.
Mykobakterien: Säure- und Alkoholfestigkeit durch Mycolsäuren in der Zellwand, Nachweis mit Ziehl-Neelsen-Färbung, saprophytische und pathogene Arten (*M. tuberculosis, M. leprae, M. bovis, M. avis*).
***Frankia alni*:** Stickstofffixierer, lebt als Symbiont in der Rhizosphäre einiger Bäume und Sträucher.
***Bifidobacterium*:** Gehört zur menschlichen Normalflora, insbesondere gestillter Säuglinge, bauen Glucose zu Acetat und Lactat ab (*Bifidobacterium*-Gärung).

3.4.11 Proteobacteria

Die größte Entwicklungslinie ist die der **Proteobacteria**, die sich in die fünf Klassen **Alpha-**, **Beta-**, **Gamma-**, **Delta-** und **Epsilon-Proteobacteria** gliedert. Sie enthält eine Vielzahl gramnegativer Bacteria mit sehr unterschiedlichen physiologischen Fähigkeiten. Entsprechend sind Mitglieder dieses Phylums sowohl medizinisch als auch für die landwirtschaftliche und industrielle Nutzung von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise geht die ganze Linie auf einen photosynthetischen Vorfahren zurück, und ein Teil der Gruppe hat im Laufe der Evolution andere Strategien der Energiekonservierung entwickelt.

Purpurbakterien

Die phototrophen **Purpurbakterien** besitzen die **Bakteriochlorophylle *a*** und ***b*** sowie verschiedene **Carotinoide** als akzessorische Pigmente und gehören zu den Klassen Alpha-, Beta- oder Gamma-Proteobacteria. Die Photopigmente sind in ein internes Membransystem integriert, das von der Cytoplasmamembran synthetisiert wird und auch mit ihr verbunden ist. Diese photosynthetischen Membranen liegen entweder in Form flacher **Lamellen** oder als runde **Vesikel** vor, die oft den Großteil der Zelle ausfüllen. Ebenso wie die Grünen Bakterien zeigen Purpurbakterien große morphologische Vielfalt und werden aufgrund ihrer H_2S-Toleranz in die **Schwefelfreien Purpurbakterien** (z. B. Rhodospi-

rillaceae) und die **Schwefelpurpurbakterien** (z. B. Chromatiaceae) eingeteilt. Zwar können die meisten Mitglieder beider Gruppen H_2S oxidieren, aber nur die Schwefelpurpurbakterien vertragen höhere H_2S-Konzentrationen und lagern elementaren Schwefel extern oder intern ab. Wie bei den Grünen Bakterien dient er bei H_2S-Limitierung als Schwefelquelle. Die Schwefelfreien Purpurbakterien zeigen große Flexibilität in ihrem Wachstumsverhalten. Im Dunkeln wachsen die meisten aerob, einige sind sogar in der Lage, anaerob organische Substrate zu fermentieren und viele können N_2 fixieren. Schwefelpurpurbakterien nutzen nur wenige organische Substanzen als Kohlenstoffquelle und nur bestimmte Arten wachsen im Dunkeln. Einige Schwefelpurpurbakterien enthalten wie die Grünen Schwefelbakterien Gasvakuolen.

Chemolithotrophe

Chemolithotrophe Proteobacteria oxidieren in ihrem Energiestoffwechsel verschiedene anorganische Substrate (S. 388 und Tab. 3.**2**), viele Chemolithotrophe sind außerdem in der Lage, autotroph mit Kohlendioxid (CO_2) als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (S. 408).

Eine Reihe von morphologisch sehr heterogenen Proteobacteria aus den Klassen Alpha-, Beta-, Gamma- und Epsilon-Proteobacteria oxidiert im Energiestoffwechsel reduzierte Schwefelverbindungen. Unter aeroben Bedingungen fungiert dabei Sauerstoff (O_2) als Elektronenakzeptor, anaerob wachsende **Schwefeloxidierer** übertragen die Elektronen auf Nitrat (anaerobe Atmung, S. 391). Man unterscheidet zwischen Schwefeloxidierern, die in neutralem Milieu (z. B. *Beggiatoa*) und solchen, die in saurem Milieu wachsen (z. B. *Acidithiobacillus ferrooxidans*). Die am häufigsten verwendeten Schwefelverbindungen sind **Sulfid** (**H_2S**), **Schwefel** (**S^0**) oder **Thiosulfat** (**$S_2O_3^{2-}$**), die in mehreren Schritten zu Sulfat (**SO_4^{2-}**) oxidiert werden (S. 524). Bei der Oxidation von Sulfid entsteht zunächst Schwefel, der häufig von den Bakterien innerhalb der Zelle gespeichert wird. Wie bei den Schwefel oxidierenden phototrophen Chromatiaceae und Chlorobiaceae dient er als Energiereserve, wenn die Sulfidkonzentration absinkt. Durch das Wachstum der Schwefeloxidierer entsteht Schwefelsäure (H_2SO_4), was zu einer

Tab. 3.**2** **Elektronendonoren chemolithotropher Proteobacteria.**

Elektronendonor	*Beispiel*	*Klasse*
H_2	*Cupriavidus necator*	Beta-Proteobacteria
H_2S	*Achromatium*	Gamma-Proteobacteria
S^0	*Acidithiobacillus thiooxidans*	Gamma-Proteobacteria
NH_4^+	*Nitrosomonas*	Beta-Proteobacteria
NO_2^-	*Nitrobacter*	Alpha-Proteobacteria
Fe^{2+}	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	Gamma-Proteobacteria

starken pH-Absenkung führt, die von **acidophilen** Schwefeloxidierern erheblich besser toleriert wird als von den Arten, die neutrale Bedingungen bevorzugen. Acidophile Arten wie *A. ferrooxidans* sind meist auch **Eisenoxidierer** und oxidieren in saurem Milieu zur Energiekonservierung Fe^{2+} zu Fe^{3+}. In neutralem Milieu wäre diese aerobe Reaktion kaum möglich, da dort die Rate der spontanen (chemischen) Eisenoxidation so hoch ist, dass sich keine nennenswerten Mengen an Fe^{2+} anreichern. In der Natur findet man *A. ferrooxidans* z. B. in sauren Abwässern aus Kohlengruben, die oft große Mengen an zweiwertigen Eisenverbindungen enthalten. Biotechnologisch nutzt man die Fähigkeit der Bakterien, unlösliche Metallsulfide (z. B. Kupfersulfid) zu löslichen Sulfaten zu oxidieren und sie so aus Erzen zu gewinnen.

Nitrifizierende Bakterien oxidieren reduzierte Stickstoffverbindungen im Boden und in Gewässern: Ammoniakoxidierer (z. B. *Nitrosomonas*) oxidieren Ammonium zu Nitrit und gehören zu den Beta-Proteobacteria, Nitritoxidierer (z. B. *Nitrobacter*) aus der Klasse Alpha-Proteobacteria oxidieren das Nitrit dann weiter zum Nitrat (NO_3^-) (S. 391). Nitrifizierende Bakterien sind von großer Bedeutung im Stickstoffkreislauf (S. 517), da sie aus Fäulnisprozessen und durch denitrifizierende bzw. stickstofffixierende Bakterien freigesetztes Ammoniak wieder zu Nitrat oxidieren und so für die Assimilation durch Pflanzen, Pilze und Bakterien zugänglich machen. Die **Nitrifikation** führt durch die Entstehung von Salpetersäure (HNO_3) zu einer starken Ansäuerung der Umgebung. Morphologisch sind Nitrifizierer uneinheitlich, viele besitzen **interne Membransysteme**, in denen die Enzyme **Ammoniak-Monooxygenase** und **Nitrit-Oxidase** lokalisiert sind.

Erst vor wenigen Jahren wurde eine Bakterienart entdeckt, die unter anaeroben Bedingungen Ammoniak oxidiert. Diese als **Anammox** (**An**aerobe **Amm**oniak-**Ox**idation) bezeichnete Reaktion wird von *Candidatus* **Brocadia anammoxidans** durchgeführt, einem Mitglied des Phylums Planctomycetes. Die Bakterien oxidieren Ammoniak mit Nitrit in mehreren Schritten zu molekularem Stickstoff (N_2) und Wasser. Dabei entsteht als Zwischenprodukt das hochgiftige und in Verbindung mit Oxidationsmitteln explosive **Hydrazin**. Die Reaktion läuft innerhalb der Bakterienzelle in einem speziellen Kompartiment, dem **Anammoxosom**, ab. Dieses Kompartiment ist von einer extrem dichten Membran umgeben, deren einzigartige Membranlipide aus fünf leiterartig aneinander hängenden Kohlenstoffringen (**Ladderane**) bestehen. In ihren natürlichen Lebensräumen, z. B. Kläranlagen, lebt *Ca.* Brocadia anammoxidans vergesellschaftet mit aeroben Ammoniakoxidierern, die das benötigte Nitrit liefern. Die anaerobe Ammoniak-Oxidation durch *Ca.* Brocadia anammoxidans ist in mehrfacher Hinsicht auch anwendungstechnisch interessant: In der Abwasserreinigung ist Anammox gegenüber der klassischen biologischen Methode, Stickstoffverunreinigungen durch Nitrifikation/Denitrifikation aus dem Abwasser zu entfernen, nicht nur kostengünstiger, sondern vermindert auch den Kohlendioxidausstoß um nahezu 90 %, denn *Ca.* Brocadia anammoxidans verbraucht kein O_2 und wächst autotroph mit CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle. Entsprechende Anlagen wurden bereits in

Nordrhein-Westfalen und den Niederlanden realisiert. Das ungewöhnliche Zwischenprodukt Hydrazin wird als Raketentreibstoff, z. B. in der Raumfahrttechnik, eingesetzt und bisher mithilfe aufwändiger Verfahren chemisch hergestellt, sodass sich auch hier neue Möglichkeiten eröffnen. Mit *Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis und dem marinen *Candidatus* Scalindua sorokinii wurden zwei weitere Anammox-Bakterien identifiziert. ◀

Im Unterschied zur Mehrzahl der Schwefeloxidierer und Nitrifizierer sind die meisten **Wasserstoffoxidierer** nicht obligat, sondern fakultativ chemolithotroph und wachsen unter entsprechenden Bedingungen auch chemoorganotroph (S. 393). Viele Wasserstoffoxidierer sind außerdem in der Lage, autotroph mit CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Aerobe Wasserstoffoxidierer oxidieren H_2 mit O_2 als Elektronenakzeptor zu H_2O, sie werden auch als **Knallgasbakterien** bezeichnet. Wasserstoffoxidierer gibt es in den Entwicklungslinien Proteobacteria (z. B. *Paracoccus denitrificans*: Alpha-Proteobacteria, *Cupriavidus necator*: Beta-Proteobacteria), Actinobacteria (z. B. *Arthrobacter*), Firmicutes (z. B. *Bacillus schlegelii*) und Aquificae (z. B. *Hydrogenobacter*). Neben Eisen benötigen alle Wasserstoffoxidierer **Nickel** als Cofaktor für ihre **Hydrogenase**. Von großer ökologischer Bedeutung ist die Fähigkeit vieler Wasserstoffoxidierer, Kohlenmonoxid (CO) zu Kohlendioxid (CO_2) zu oxidieren. Diese Reaktion trägt zur Beseitigung des giftigen Kohlenmonoxids bei, das durch unvollständige Verbrennungsprozesse in die Atmosphäre gelangt. Das entstandene CO_2 wird bei autotrophem Wachstum über den Calvin-Zyklus (S. 409) fixiert.

Methylotrophe und Methanotrophe

Methylotrophe Proteobacteria nutzen als Energie- und Kohlenstoffquelle zahlreiche verschiedene Substrate, deren gemeinsames Merkmal ist, dass sie keine C-C-Verbindung enthalten. Während **fakultativ Methylotrophe** auch Substrate oxidieren können, die C-C-Bindungen enthalten, z. B. Fettsäuren, Alkohole und Zucker, wachsen **obligat Methylotrophe** ausschließlich auf Substraten ohne C-C-Bindungen. Viele Methylotrophe oxidieren neben anderen C_1-Verbindungen auch Methangas (CH_4), sie sind **methanotroph**. Da für die Oxidation von **Methan** Sauerstoff benötigt wird, sind alle methanotrophen Bakterien obligat aerob, während einige fakultativ methylotrophe auch anaerob, z. B. mit Nitrat, wachsen können. Natürliche Standorte für Methanotrophe sind z. B. Sümpfe oder Gewässer, in denen Methan verfügbar ist. Morphologisch ist die Gruppe uneinheitlich, die Mehrzahl ist beweglich. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass Methanotrophe ein ausgeprägtes **internes Membransystem** besitzen, das offenbar bei der Methanoxidation eine Rolle spielt. Diese Membranen sind entweder in Form flacher Scheiben in der Zelle angeordnet (Typ I), oder sie verlaufen in mehreren Schichten rund um die Peripherie der Zelle (Typ II), sodass die methanotrophen Bakterien anhand ihres Membrantyps in zwei Gruppen unterteilt werden. Methanotrophe mit Typ-I-Membranen gehören zu den Gamma-

Proteobacteria, ihr Citratzyklus ist unvollständig und sie sind obligat methylotroph, Typ-II-Methanotrophe sind Alpha-Proteobacteria und besitzen den vollständigen Citratzyklus. Ein charakteristischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht auch bei der Assimilierung von C_1-Komponenten für den Baustoffwechsel. Bakterien mit Typ-I-Membranen, z. B. *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter* und *Methylococcus*, synthetisieren die notwendigen C-C-Bindungen über den Ribulosemonophosphat-Weg. Methanotrophe mit Typ-II-Membranen, z. B. *Methylosinus* und *Methylocystis*, synthetisieren die notwendigen C-C-Bindungen über den Serinweg. Eine weitere Besonderheit bei den Methanotrophen ist das Vorhandensein von Steroiden, die normalerweise nur in eukaryotischen Membranen vorkommen.

Sulfat- und Schwefelreduzierer

Sulfat- bzw. **Schwefelreduzierer** reduzieren in ihrem Energiestoffwechsel Sulfat oder Schwefel mit Wasserstoff oder einem organischen Elektronendonor zu H_2S (S. 366). Diese Reaktion wird als **dissimilatorische Sulfatreduktion** bzw. **dissimilatorische Schwefelreduktion** bezeichnet. Im Gegensatz zu den Schwefeloxidierern wachsen diese Bakterien anaerob, ihre Sauerstofftoleranz ist jedoch deutlich größer als zunächst angenommen wurde. Ihr natürlicher Lebensraum sind anaerobe Bereiche im Boden oder in Gewässern, die ausreichende Mengen an Schwefel oder Sulfat sowie organische Verbindungen enthalten. Wenn diese Standorte außerdem eisenhaltig sind, ist die Anwesenheit von Sulfatreduzierern am schwarzen Eisensulfidniederschlag (FeS) gut zu erkennen. Die starke H_2S-Anreicherung durch das Wachstum der Bakterien kann Korrosionsschäden an Metallteilen wie Brückenträgern verursachen und zu Vergiftungen führen, z. B. bei Ölbohrungen. Die meisten Schwefel- und Sulfatreduzierer gehören zu den Delta-Proteobacteria, die sporenbildende Gattung *Desulfotomaculum* zu den Firmicutes und *Thermodesulfobacterium* zur Entwicklungslinie Thermodesulfobacteria. Abhängig von den jeweils verwendeten Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren unterscheidet man verschiedene Gruppen.

Essigsäurebakterien

Essigsäurebakterien sind aerobe, gramnegative, peritrich oder polar begeißelte Stäbchen der Klasse Alpha-Proteobacteria, die Alkohole zu organischen Säuren oxidieren, beispielsweise Ethanol zu Essigsäure. Verschiedene technische Verfahren nutzen diese Fähigkeit zur Essigherstellung (S. 557). Die Bakterien zeigen dabei eine recht hohe Säuretoleranz; die meisten Arten wachsen noch bei pH-Werten unter 5. Innerhalb der Essigsäurebakterien werden **Überoxidierer** und **Unteroxidierer** unterschieden. Die Überoxidierer (z. B. *Acetobacter*) besitzen einen vollständigen Citratzyklus und sind daher in der Lage, die entstandene Essigsäure vollständig zu CO_2 zu oxidieren. Die Unteroxidierer (z. B. *Gluconobacter*) sind dazu nicht fähig, da ihr Citratzyklus unvollständig ist. Essigsäurebak-

Tab. 3.**3** **Freilebende und symbiontische Stickstofffixierer.**

Entwicklungslinie	*Gattung*	*N_2-Fixierung*
Cyanobacteria	*Anabaena*	freilebend
Firmicutes	*Heliobacterium*	freilebend
Firmicutes	*Clostridium*	freilebend
Actinobacteria	*Frankia*	symbiontisch (Actinorrhiza)
Alpha-Proteobacteria	*Sinorhizobium*	symbiontisch
Beta-Proteobacteria	*Alcaligenes*	freilebend
Gamma-Proteobacteria	*Klebsiella*	freilebend
Gamma-Proteobacteria	*Azotobacter*	freilebend oder in assoziativer Symbiose
Euryarchaeota	*Methanococcus*	freilebend
Euryarchaeota	*Halobacterium*	freilebend

terien siedeln sich häufig in aus Früchten hergestellten alkoholischen Getränken wie Wein oder Apfelwein an.

Stickstofffixierer

Stickstofffixierer kommen in verschiedenen Entwicklungslinien der Bacteria und auch bei Archaea vor (Tab. 3.**3**). Die Fähigkeit zur **Fixierung von N_2** ist auf Prokaryoten beschränkt, die den **Nitrogenase-Komplex** besitzen, der **Eisen** und **Molybdän** als Cofaktoren benötigt (S. 521). Wegen seiner hohen Sauerstoffempfindlichkeit existieren bei Stickstofffixieren unterschiedliche Schutzmechanismen für den Enzymkomplex. Neben **freilebenden Stickstofffixierern** gibt es auch Bakterien, die, z. T. ausschließlich, in einer Symbiose mit bestimmten Pflanzen Luftstickstoff fixieren. **Symbiontische Stickstofffixierer** leben entweder eng assoziiert mit Pflanzenwurzeln, z. B. *Azotobacter* bei bestimmten Süßgräsern, als **Actinorrhiza** (S. 522) an Pflanzenwurzeln wie *Frankia alni* (S. 82) oder sogar innerhalb der Wurzeln wie *Sinorhizobium* bei Leguminosen. Das durch die Fixierung von N_2 gebildete Ammonium versorgt die Pflanze mit verwertbarem Stickstoff.

Pseudomonaden

Pseudomonaden sind gramnegative, polar begeißelte, gerade oder leicht gebogene Stäbchen, die entweder zu den Alpha-, Beta- oder Gamma-Proteobacteria gehören und Energiesubstrate ausschließlich aerob oder anaerob veratmen, niemals fermentieren. Im Unterschied zu den morphologisch sehr ähnlichen Enterobakterien (s. u.) bilden Pseudomonaden beim Wachstum auf Glucose kein Gas und sind Oxidase-positiv. Die meisten Pseudomonaden können eine Vielzahl

Tab. 3.**4** **Pseudomonaden.**

Beispiel	*Klasse*	*Besonderheit/Pathogenität*
Pseudomonas aeruginosa	Gamma-Proteobacteria	Synthese von Pyocyanin (blaugrünes Pigment), opportunistisch pathogen: nosokomiale Infektionen
Pseudomonas fluorescens	Gamma-Proteobacteria	Gelatineverflüssigung, nicht pathogen
Pseudomonas syringae	Gamma-Proteobacteria	Pflanzenpathogen: Chlorose, Blattnekrosen (Blattfleckenkrankheit), z. B. Zuckerrüben, Erbsen
Burkholderia cepacia	Beta-Proteobacteria	Pflanzenpathogen: Zwiebelfäule, Lungeninfektionen bei Patienten mit Mukoviszidose
Burkholderia mallei	Beta-Proteobacteria	Tierpathogen, v. a. Esel, Maultiere, Pferde: Malleus (Rotz), gelegentliche Übertragung auf Menschen
Burkholderia pseudomallei	Beta-Proteobacteria	Tier- und humanpathogen, Melioidose (Pseudorotz), vorwiegend Südostasien, Nordaustralien
Ralstonia solanacearum	Beta-Proteobacteria	Pflanzenpathogen, Braunfäule bei Kartoffeln, Welke bei Kartoffeln, Tomaten u. anderen Nachtschattengewächsen
Xanthomonas campestris	Gamma-Proteobacteria	Bromhaltiges gelbes Pigment, pflanzenpathogen: Adernschwärze bei Kohlarten
Xanthomonas axonopodis	Gamma-Proteobacteria	Bromhaltiges gelbes Pigment, pflanzenpathogen: Zitronenkrebs
Zoogloea ramigera	Beta-Proteobacteria	nicht pathogenes Abwasserbakterium (Belebtschlamm), Synthese von Exopolymeren führt zur Bildung einer verzweigten Schleimhülle („Bäumchenbakterium“)

von Substraten verwerten, z. B. Zucker, Fettsäuren, Alkohole, Aminosäuren und sogar aromatische Verbindungen. Glucose wird über den **Entner-Doudoroff-Weg** (S. 352) zu Pyruvat oxidiert. Die Gruppe enthält zahlreiche apathogene Bakterien, aber auch pflanzen- und tierpathogene (Tab. 3.**4**). *Pseudomonas carboxydovorans* besitzt eine membrangebundene Hydrogenase und kann, wie viele Wasserstoffoxidierer, auch CO zu CO_2 oxidieren.

Die Gattung ***Zymomonas*** ist nah verwandt mit den Pseudomonaden, obwohl ihre Mitglieder Zucker fermentieren und wie Bier- und Weinhefen **Glucose** zu **Ethanol** vergären. *Zymomonas* kommt in tropischen Ländern in bzw. auf verschiedenen Pflanzen vor und wird zur Herstellung landestypischer alkoholischer Getränke aus Agaven, Zuckerrohr oder Palmsaft eingesetzt.

Enterobacteriaceae (Enterobakterien)

Eine sehr große Gruppe von fakultativen, meist peritrich begeißelten gramnegativen Stäbchen ist die Familie der **Enterobacteriaceae** aus der Klasse der Gamma-Proteobacteria. Viele Enterobakterien gehören zur menschlichen und tierischen **Normalflora**, können jedoch als **Opportunisten endogene** oder **nosokomiale Infektionen** hervorrufen; einige **pathogene** Arten sind Verursacher von definierten Krankheitsbildern wie Ruhr, Typhus oder Pest (S. 542). Zur Identifizierung der Gattung verwendet man häufig eine Kombination aus Nachweistests für bestimmte Stoffwechselleistungen (S. 302). Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wachsen Enterobakterien auf zuckerhaltigen Medien aerob, bei Sauerstofflimitierung vergären sie die Zucker. Anhand der Endprodukte werden die beiden Fermentationstypen „Gemischte Säuregärung" und „Butandiol-Gärung" unterschieden (S. 379).

Die bekannteste Gattung der Enterobakterien mit gemischter Säuregärung ist ***Escherichia***, ihre Mitglieder leben häufig als Produzenten von Vitaminen, insbesondere Vitamin K, in der menschlichen Darmflora. ***Escherichia coli*** gehört zu den am besten untersuchten Prokaryoten, da viele grundlegende Untersuchungen an ihnen durchgeführt worden sind. Bestimmte Stämme der normalerweise apathogenen Spezies, die Pathogenitätsfaktoren erworben haben, können verschiedene Krankheitsbilder verursachen (S. 533).

Die Gattung ***Shigella*** dagegen ist grundsätzlich pathogen, mehrere Spezies, die vor allem über verseuchtes Wasser oder Nahrungsmittel aufgenommen werden, verursachen die schwere Darmkrankheit Shigellenruhr. Hybridisierungsversuche zeigen eine sehr enge Verwandtschaft zwischen *Shigella* und *Escherichia*, die DNA:DNA-Hybridisierungsrate beträgt 50 %.

Mit 70 % noch höher ist die DNA:DNA-Hybridisierungsrate zwischen *Escherichia* und der ebenfalls pathogenen Gattung ***Salmonella***. Verschiedene *Salmonella*-Arten verursachen Krankheiten wie Typhus, Paratyphus oder schwere Brechdurchfälle. Konsequenterweise müssten *Escherichia* und *Shigella* wegen der hohen DNA-Übereinstimmung in dieselbe Gattung, *Escherichia* und *Salmonella* sogar in dieselbe Art eingeordnet werden (S. 63). Um die Eindeutigkeit der medizinischen Diagnostik zu gewährleisten, wird jedoch auf diese Korrektur verzichtet und die bisherige Einteilung beibehalten. Die Identifizierung der verschiedenen *Salmonella*-Stämme erfolgt durch die immunologische Bestimmung bestimmter Oberflächen-Antigene.

Die Mitglieder der Gattung ***Proteus*** sind durch ihre besonders starke Beweglichkeit gekennzeichnet und besitzen das Enzym **Urease**, das Harnstoff in Ammoniak (NH_3) und CO_2 spaltet. *Proteus mirabilis* tritt als opportunistischer Verursacher von Harnwegsinfektionen in Erscheinung, charakteristisch ist der stechende Ammoniakgeruch des Urins. Bei Wachstum auf Festmedium lässt sich ein Phänomen beobachten, das als „**Schwärmen**" bezeichnet wird: Im Außenbereich einer Kolonie ist die Motilität der Bakterien höher als im Inneren,

sodass die äußeren Zellen sich in alle Richtungen ein Stück von der Mutterkolonie entfernen. Nach einer kurzen Strecke verlangsamt sich ihre Bewegung und kommt zum Stillstand, die Zellen beginnen sich zu teilen und neue Kolonien zu bilden, bis nach einer Weile die äußeren Zellen wieder ausschwärmen. Auf diese Weise entstehen abwechselnd Zonen mit hoher und niedriger Zelldichte, die auf der Agaroberfläche als konzentrische Kreise erscheinen.

Die Gattung ***Yersinia*** enthält pathogene und apathogene Arten. Die bekannteste pathogene ist *Yersinia pestis* (S. 9). Für Menschen pathogen ist außerdem die Art *Y. enterocolitica*, die Magen-Darm-Infektionen verursacht.

Enterobacter, ***Klebsiella*** und ***Serratia*** gehören zu den Butandiol-Fermentierern. *Enterobacter aerogenes* kommt im Boden und im Wasser, aber auch im Darm von Warmblütern vor und kann gelegentlich opportunistische Infektionen verursachen. *Klebsiella* fixiert im Unterschied zu anderen Enterobakterien N_2, *Klebsiella pneumoniae* kann als opportunistischer Krankheitserreger Lungenentzündung auslösen. *Serratia* ist ein verbreiteter Boden- und Wasserbewohner, kommt jedoch auch im Darm verschiedener Tiere vor. *Serratia marcescens* wächst gut auf stärkehaltigen Nährböden und bildet in der stationären Wachstumsphase den antibiotisch wirksamen roten Farbstoff Prodigiosin. Zahlreiche Fälle der Rotfärbung von Hostien, die im Mittelalter als „wundersame Erscheinung von Christi Blut" gedeutet wurden, gehen vermutlich auf das Wachstum von *S. marcescens* zurück und trugen den Bakterien später den Namen „Hostienpilz" ein.

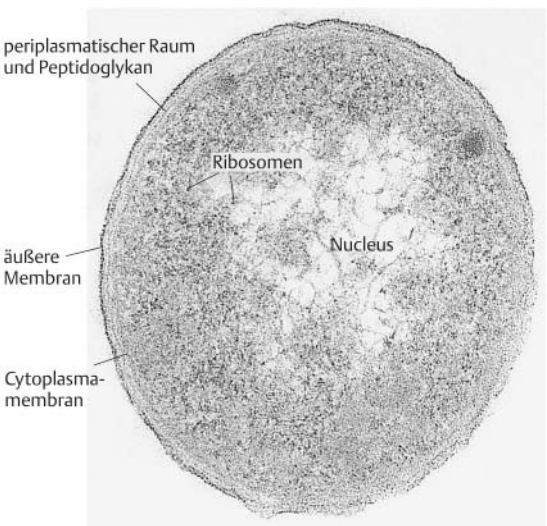


Abb. 3.**8** ***Escherichia coli.*** (EM-Aufnahme von J. Schlepper-Schäfer, Konstanz, aus Plattner, Hentschel, Thieme 2006)

Proteobacteria mit spezieller Morphologie

Spirillen sind gramnegative, spiralig gekrümmte Bakterien mit polarer Begeißelung aus allen fünf Klassen der Proteobacteria (Tab. 3.**5**). Die physiologischen Fähigkeiten von Spirillen sind vielfältig, einige wachsen aerob, andere fakultativ und auch phototrophe wie *Thiospirillum* sind vertreten. Ebenfalls zur Gruppe der Spirillen gehören die assoziativen Stickstofffixierer der Gattung *Azospirillum* (S. 522) und die pathogenen Vertreter *Campylobacter* und *Helicobacter*. Einen ungewöhnlichen Lebenszyklus hat der Bakterienparasit *Bdellovibrio*, der vorwiegend Pseudomonaden und Enterobakterien befällt (Abb. 3.**9**).

Vibrionen sind gramnegative, häufig gekrümmte, bewegliche Stäbchen aus der Klasse der Gamma-Proteobacteria, die morphologisch große Ähnlichkeit mit Enterobakterien und Pseudomonaden besitzen. Die Differenzierung erfolgt daher mithilfe physiologischer Tests, z. B. der Vergärung von Zuckern oder dem Besitz des Enzyms Oxidase. Viele Mitglieder der Gattung *Vibrio* leben in aquatischen oder marinen Gewässern, eine wichtige humanpathogene Art, die hauptsächlich über kontaminiertes Trinkwasser übertragen wird, ist *Vibrio cholerae* (S. 542). Einige Mitglieder der Gattungen *Vibrio* und *Photobacterium* werden auch als **Leuchtbakterien** bezeichnet, weil sie in Symbiosen mit Meerestieren oder als saprophytische Bewohner von totem organischem Material **Bioluminiszenz** (S. 268) zeigen. Das bekannteste Beispiel ist *Vibrio fischeri,* das als Symbiont in den Leuchtorganen bestimmter Fische und Kalmare lebt.

Tab. 3.**5** **Spirillen.**

Gattung/Art	*Klasse*	*Eigenschaften*
Azospirillum	Alpha-Proteobacteria	mikroaerophil, N_2-Fixierer, Bodenbewohner, assoziative Symbiose mit Gräsern (Rhizosphäre)
Rhodospirillum	Alpha-Proteobacteria	Phototroph (Schwefelfreie Purpurbakterien)
Magneto-spirillum	Alpha-Proteobacteria	mikroaerophil, magnetotaktisch durch Besitz von Magnetosomen
Spirillum volutans	Beta-Proteobacteria	mikroaerophil, Wasserbewohner, Zellen sehr groß (bis 1,7 · 60 µm)
Spirillum minus	Beta-Proteobacteria	pathogen (Rattenbissfieber syn. Sodoku), wird durch Nagerbiss übertragen
Thiospirillum	Gamma-Proteobacteria	phototroph (Schwefelpurpurbakterien)
Bdellovibrio bacteriovorus	Delta-Proteobacteria	aerob, sehr schnell beweglich, Bakterienparasit
Helicobacter pylori	Epsilon-Proteobacteria	aerob oder mikroaerophil, Urease, pathogen (Gastritis, Magengeschwüre, Zwölffingerdarmgeschwüre, evtl. Magenkarzinom)
Campylo-bacter:jejuni	Epsilon-Proteobacteria	aerob oder mikroaerophil, Kommensalen, Gastroenteritis bei Mensch und Tier

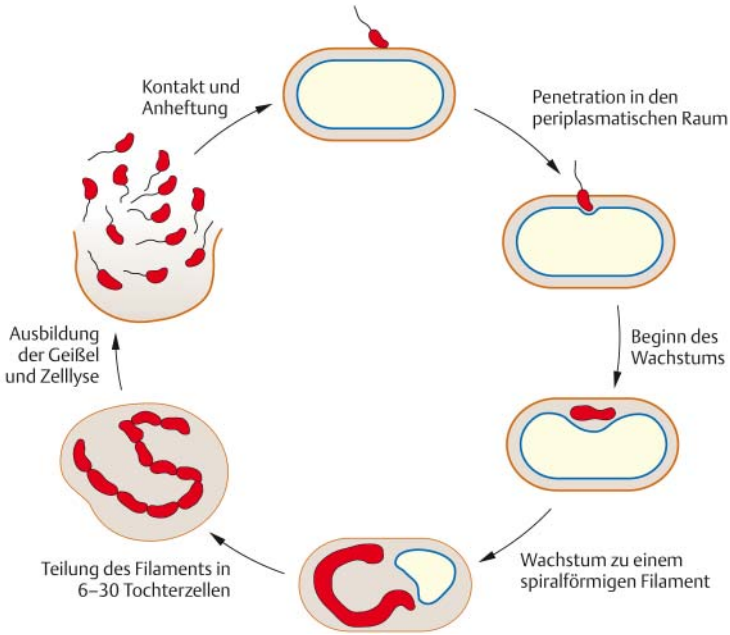


Abb. 3.**9** **Entwicklungszyklus von *Bdellovibrio bacteriovorus*.** Nach der Anheftung an ein gramnegatives Bakterium dringt der Parasit in den periplasmatischen Raum ein. Dort wächst er zu einem langen gekrümmten Filament an, aus dem sich abhängig von der Größe der jeweiligen Wirtszelle eine Kette von 6 bis 30 *Bdellovibrio*-Zellen bildet. Dabei schrumpft das Cytoplasma der Wirtszelle immer stärker und verschwindet schließlich ganz. Nach ihrer vollständigen Trennung und der Ausbildung der Geißeln werden die Tochterparasiten durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt.

Gramnegative Kokken sind aerobe Mitglieder der Beta- oder Gamma-Proteobacteria, die keine Flagellen besitzen. Einige Spezies der Gattung *Acinetobacter* zeigen jedoch Twitching (S. 43). Die Gattung ***Neisseria*** enthält mit *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* zwei bedeutende pathogene Vertreter (S. 542), ihre Zellen sind stets kugelig und bilden meist **Diploformen**. Wegen ihrer oft eher stäbchenartigen Form, die erst bei älteren Kulturen kugelig wird, werden die Mitglieder anderen Gattungen auch als **Coccobacilli** bezeichnet.

Besondere Zellteilungsformen findet man bei **gestielten** und **knospenden Bakterien**, die in der Mehrzahl zu den Alpha-Proteobacteria gehören, *Planctomyces* und *Pirella* stammen aus der Entwicklungslinie Planctomycetes. Durch eine **asymmetrische Zellteilung** (S. 263) entsteht an der Mutterzelle eine kleinere Tochterzelle. Dabei findet ein polares Zellwachstum statt, das von einem bestimmten Punkt der Mutterzelle ausgeht. Bei *Hyphomicrobium* und der phototrophen Gat-

tung *Rhodomicrobium* entsteht an der Mutterzelle eine Hyphe, an deren Ende sich eine Knospe bildet. Diese entwickelt sich zu einer begeißelten Tochterzelle, löst sich nach einiger Zeit von der Mutterzelle ab und beginnt einen eigenen Vermehrungszyklus. Auch bei ***Caulobacter crescentis*** entstehen im Verlauf des normalen Lebenszyklus durch die asymmetrische Zellteilung zwei unterschiedliche Zelltypen, die sich sowohl funktionell als auch morphologisch unterscheiden: unbewegliche Stielzellen und bewegliche Schwärmerzellen (Abb. 3.**10**). Die **Stielzelle**, die mithilfe ihres Stiels an einer Oberfläche haftet, fungiert als **Stammzelle**: Sie wächst und produziert durch wiederholte inäquale Teilungen weitere Schwärmerzellen. Die **Schwärmerzellen** bleiben zunächst beweglich, später verlieren sie ihre Flagellen und bilden ebenfalls einen Stiel aus. Nach ihrer Umwandlung zur Stielzelle heften sie sich an eine Oberfläche und beginnen einen neuen Vermehrungszyklus. Der autotrophe Wasserbewohner *Galionella* oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+}, das gebildete $Fe(OH)_3$ lagert sich als rotbraune Schicht auf dem spiralig gedrehten Stiel der Bakterien ab, der im Unterschied zu *Caulobacter* seitlich an der Zelle sitzt und kein Cytoplasma enthält. *Galionella* gehört zur Klasse der Beta-Proteobacteria.

Gleitende Bakterien aus verschiedenen Entwicklungslinien haben mehrere unterschiedliche Mechanismen entwickelt, sich ohne Beteiligung von Flagellen vorwärts zu bewegen (S. 43). Einige Mitglieder des Phylums Bacteroidetes, z. B. *Cytophaga*, besitzen zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran kleine Proteinkörper, die wie ein Kugellager funktionieren und so die Zelle gleiten lassen. Filamentöse Cyanobacteria, z. B. *Oscillatoria*, bewegen sich auf festen Oberflächen mithilfe von Schleim, den sie selbst ausscheiden. Bei *Myxococcus,* die zur Klasse der Delta-Proteobacteria gehören, scheinen beide Mechanismen bei der Bewegung von Einzelzellen beteiligt zu sein. Bei Nährstoffmangel aggregieren vegetative Zellen von Myxobakterien zu einer hügelartigen Masse, die sich anschließend in einen Stiel und einen Fruchtkörper differenziert. Die zur Fruchtkörperbildung notwendige koordinierte Bewegung zahlreicher Zellen basiert auf dem Vorhandensein von Typ IV-Pili (S. 43, S. 47). Die im Fruchtkörper

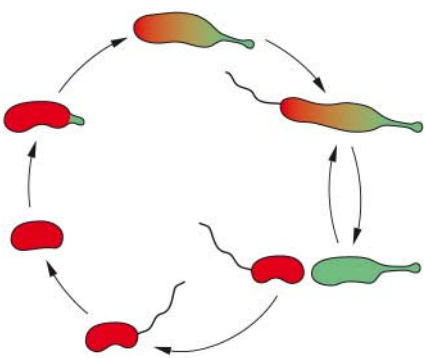


Abb. 3.**10** **Lebenszyklus von *Caulobacter*.** Eine gestielte Zelle bildet bei jeder Teilung eine begeißelte Schwärmerzelle. Jede dieser Schwärmerzellen verliert nach Erreichen eines neuen Lebensraumes ihre Flagelle, bildet einen Stiel aus und wird so zu einer sesshaften Stielzelle.

enthaltenen Zellen wandeln sich in Myxosporen um, die sich später ablösen und erneut zu vegetativen Zellen auskeimen können (S. 58). Myxobakterien leben häufig auf verrottendem Pflanzenmaterial, z. B. Baumrinde, wo die oft stark gefärbten Fruchtkörper gut zu erkennen sind. Das Genom des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* ist mit über 13 Mbp das größte bekannte prokaryotische Genom. Es enthält fast 10 000 Gene und damit deutlich mehr als das der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit nur 6000.

Scheidenbakterien gehören zu den Beta-Proteobacteria und bestehen aus einer langen, röhrenartigen Umhüllung (Scheide), die eine Kette aus zahlreichen stäbchenförmigen Einzelzellen umgibt, die sich innerhalb der Scheide durch Zweiteilung vermehren. Das Längenwachstum der Hülle findet nur an den beiden Enden statt. Scheidenbakterien sind aerob und leben häufig in Gewässern, wo sie organisches Material abbauen. In eisen- oder manganreichen Habitaten ist die Scheide der Bakterien oft von einer Schicht aus Eisen- bzw. Manganoxid bedeckt. Unter ungünstigen Bedingungen verlassen einzelne bewegliche Zellen die Hülle und suchen als Schwärmer einen neuen Lebensraum. Sind die Lebensbedingungen wieder günstiger, vermehren sie sich durch Zweiteilung und synthetisieren dabei neues Hüllmaterial. Die bekanntesten Gattungen sind *Sphaerotilus* und *Leptothrix*. *Leptothrix* enthält in der Hülle ein Enzym, das die Oxidation von Mn^{2+} zu MnO_2 katalysiert. Starkes Wachstum von *Sphaerotilus* führt gelegentlich zu Problemen in Kläranlagen.

Rickettsien

Rickettsien sind sehr kleine, gramnegative Bakterien, die mit Ausnahme der Gattung *Coxiella* (Gamma-Proteobacteria) zur Klasse der Alpha-Proteobacteria gehören. Sie besitzen DNA und RNA, Ribosomen und Peptidoglykan. Obwohl sie über deutlich mehr physiologische Fähigkeiten verfügen als Chlamydiae (S. 76), sind Rickettsien bis auf die Gattung *Rochalimaea* ebenfalls **obligat intrazelluläre Zellparasiten**. Rickettsien sind wenig umweltstabil und werden in der Regel durch tierische Vektoren (Zecken, Flöhe, Läuse) auf ihre Wirte übertragen, bei denen

Tab. 3.**6** **Rickettsien.**

Gattung/Spezies	*Klasse*	*Krankheit*	*Vektor/Bemerkung*
Rickettsia prowazeki	Alpha-Proteobacteria	Fleckfieber	Kleiderlaus
Bartonella quintana (syn. *Rochalimaea quintana)*	Alpha-Proteobacteria	Fünf-Tage-Fieber (auch Schützengrabenfieber)	Kleiderlaus
Coxiella burnetii	Gamma-Proteobacteria	Q-Fieber	Zecken
Ehrlichia chaffeensis	Alpha-Proteobacteria	Humane monozytäre Ehrlichiose	Zecken
Wolbachia	Alpha-Proteobacteria	nicht humanpathogen	Endosymbiont von Filarien u. Insekten

sie verschiedene schwerwiegende Infektionskrankheiten verursachen (Tab. 3.**6**). Obwohl *Wolbachia* selbst nicht humanpathogen ist, spielen Mitglieder dieser Gattung bei Flussblindheit und Elephantiasis eine entscheidende Rolle (S. 21).

3

3.4.12 Weitere Entwicklungslinien der Bacteria

Als eigenes Phylum **Thermomicrobia** wurde die strikt aerobe, chemotrophe Gattung *Thermomicrobium*, deren Zellwand kein Peptidoglykan enthält, von den Chloroflexi abgetrennt. Die Membranlipide von *Thermomicrobium* enthalten weder Ester- noch Etherbindungen und anstelle von Glycerin Dialkohole. Die **Deferribacteres** sind eine phylogenetische Entwicklungslinie von obligat anaeroben Bakterien, die eine Vielzahl von terminalen Elektronenakzeptoren zur anaeroben Respiration nutzen, darunter auch Fe^{3+} oder Mn^{4+}. Die **Planctomycetes** haben einige morphologische Besonderheiten: Ihre Zellwände bestehen vorwiegend aus Protein anstelle von Peptidoglykan und entsprechen dem Typ der S-Layer. Die Zellen zeigen eine für Prokaryoten untypische Kompartimentierung, einige besitzen sogar ein von einer Membran umhülltes Nucleoid. Bei *Planctomyces* findet ein zyklischer Wechsel zwischen sessilen gestielten Zellen und beweglichen Schwärmerzellen statt. Die Mitglieder der Entwicklungslinie **Verrucomicrobia** sind weit verbreitet in aquatischen, marinen und terrestrischen Lebensräumen, ihre Zellen besitzen typischerweise mehrere Fortsätze (Prosthecae). Zur Entwicklungslinie **Nitrospirae** gehören marine nitrifizierende Spirillen der Gattung *Nitrospira*, die im Unterschied zu nitrifizierenden Proteobacteria (s. o.) keine internen Membranen enthalten, außerdem die Eisen oxidierende Gattung *Leptospirillum* und thermophile Sulfatreduzierer der Gattung *Thermodesulfovibrio*.

Proteobacteria: Größte Entwicklungslinie der Bacteria, gramnegative Bacteria mit unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften, fünf Klassen: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Proteobacteria.
Purpurbakterien: Phototroph, anoxygene Photosynthese, Bakteriochlorophyll *a* und *b*, Carotinoide als akzessorische Pigmente, photosynthetische Membranen speziesabhängig Lamellen oder Vesikel.
- **Schwefelfreie Purpurbakterien:** Geringe H_2S-Toleranz, meist aerobes Dunkelwachstum, keine Schwefelablagerung.
- **Schwefelpurpurbakterien:** Höhere H_2S-Toleranz, kaum Dunkelwachstum, interne oder externe Schwefelablagerung.

Chemolithotrophe: Oxidieren anorganische Energiesubstrate.
Schwefeloxidierer: Oxidieren in neutralem oder saurem Milieu reduzierte Schwefelverbindungen mit O_2 oder NO_3^- zu SO_4^{2-}; interne Schwefelablagerung bei Reduktion von Sulfid; acidophile oxidieren auch Fe^{2+} zu Fe^{3+}.
Nitrifizierer: Oxidieren reduzierte Stickstoffverbindungen, viele besitzen interne Membranen:
- **Ammoniakoxidierer:** Oxidieren NH_4^+ zu NO_2^-, z. B. *Nitrosomonas*.
- **Nitritoxidierer:** Oxidieren NO_2^- zu NO_3^-, z. B. *Nitrobacter*.

Methylotrophe: Nutzen als Energie und Kohlenstoffquelle Substrate ohne C-C-Bindung.
- **Fakultativ Methylotrophe:** Können auch Substrate mit C-C-Bindungen oxidieren.
- **Obligat Methylotrophe:** Oxidieren nur Verbindungen ohne C-C-Bindungen.

Methanotrophe: Obligat methylotrophe, die auch Methan (CH_4) oxidieren. Besitz von Internen Membranen und Steroiden. Methanotrophe mit Typ I-Membranen haben einen unvollständigen Citratzyklus und assimilieren C_1-Verbindungen über den Ribulosemonophosphatweg, methanotrophe mit Typ II-Membranen haben den vollständigen Citratzyklus und assimilieren C_1-Verbindungen über den Serinweg.
Sulfat- und Schwefelreduzierer: Reduzieren SO_4^{2-} oder S^0 mit H_2 oder einem organischen Elektronendonor zu H_2S (dissimilatorische Sulfat- bzw. Schwefelreduktion); können Korrosionsschäden und Vergiftungen verursachen.
Essigsäurebakterien: Oxidieren Alkohole zu organischen Säuren, z. B. Ethanol zu Essigsäure; hohe Säuretoleranz. Überoxidierer (z. B. *Acetobacter*) besitzen einen vollständigen Citratzyklus und oxidieren Essigsäure vollständig zu CO_2, Unteroxidierer (z. B. *Gluconobacter*) besitzen einen unvollständigen Citratzyklus und bilden bei Wachstum auf Ethanol Essigsäure als Endprodukt. Sie werden zur Essigherstellung genutzt.
Stickstofffixierer: Fixieren unter anaeroben Bedingungen Luftstickstoff (N_2) mithilfe des Nitrogenase-Komplexes. Freilebende Stickstofffixierer werden unterschieden von symbiontischen, die in Assoziation oder Symbiosen mit bestimmten Pflanzen Stickstoff fixieren; Nutzung als Gründüngung.
Pseudomonaden: Polar begeißelte Stäbchen; können eine Vielzahl von Energiesubstraten nutzen, keine Fermentation, immer aerobe oder anaerobe Atmung, Glucose-Oxidation über Entner-Doudoroff-Weg. Einige pflanzen- und tierpathogene Spezies, z. B. *Burkholderia mallei*. *Zymomonas* vergärt Glucose zu Ethanol.
Enterobakterien: Fakultative, meist peritrich begeißelte Stäbchen, viele gehören zur Normalflora von Säugern, manche sind opportunistische Krankheitserreger, einige pathogene Spezies, Fermentationstypen „Gemischte Säuregärung" und „Butandiol-Gärung".
- ***Escherichia coli*:** Vitaminproduktion in der Darmflora, einige pathogene Spezies, gemischte Säuregärung.
- ***Shigella*:** Stets pathogen (Shigellenruhr), gemischte Säuregärung, eng verwandt mit *E. coli*.
- ***Salmonella*:** Stets pathogen (z. B. Typhus), gemischte Säuregärung, sehr eng verwandt mit *E. coli*.
- ***Proteus*:** Stark beweglich („Schwärmen" auf Festmedium), besitzen Urease, opportunistischer Verursacher von Harnwegsinfektionen, gemischte Säuregärung.
- ***Yersinia*:** Einige pathogene Spezies, z. B. *Yersinia pestis*, gemischte Säuregärung.
- ***Enterobacter*:** Vorkommen im Boden und im Wasser, gelegentlich opportunistische Infektionen, Butandiol-Gärung.
- ***Klebsiella*:** *K. pneumoniae* verursacht opportunistische Lungeninfektionen, Butandiol-Gärung.
- ***Serratia*:** Vorkommen im Boden und im Wasser, Wachstum auf stärkehaltigen Nährböden, roter Farbstoff Prodigiosin wirkt antibiotisch („Hostienpilz").

Proteobacteria mit spezieller Morphologie: Proteobacteria mit Besonderheiten der Zellform, der Bewegung oder der Zellteilung.

- **Spirillen:** Zellen spiralig mit polarer Begeißelung, aerobe, fakultative, phototrophe u. pathogene Spezies (z. B. *Helicobacter pylori*), Bakterienparasit *Bdellovibrio.*
- **Vibrionen:** Bewegliche, meist gekrümmte Stäbchen, aquatisch oder marin, einige pathogene Spezies (z. B. *Vibrio cholerae*), einige zeigen Biolumineszenz, z. B. *V. fischeri.*
- **Gramnegative Kokken:** Aerob, keine Flagellen, oft Diploformen, Twitching-Bewegung bei *Acinetobacter*, pathogene Spezies *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoeae.*
- **Gestielte und knospende Bakterien:** Durch asymmetrische Zellteilung bildet sich bei knospenden Bakterien eine Tochterzelle an der Mutterzelle, bei einigen Spezies (z. B. *Hyphomicrobium*) am Ende einer Hyphe. Gestielte Bakterien bilden im Verlauf ihres Lebenszyklus sesshafte gestielte Zellen und bewegliche Schwärmerzellen, z. B. *Caulobacter, Galionella.*
- **Gleitende Bakterien:** Gleitende Bewegung auf festen Oberflächen, beruht auf unterschiedlichen Mechanismen: *Cytophaga* (Phylum Bacteroidetes) besitzt rotierende Proteine zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran; filamentöse Cyanobacteria (z. B. *Oscillatoria*) scheiden eine Schleimschicht aus, bei *Myxococcus* sind beide Mechanismen an der Bewegung von Einzelzellen beteiligt, Fruchtkörperbildung erfordert Typ IV-Pili.
- **Scheidenbakterien:** Kette von Einzelzellen in röhrenförmiger Hülle (Scheide), Vermehrung durch Zweiteilung, Scheide wächst nur an den Enden, bei Nährstoffmangel verlassen einzelne Schwärmerzellen die Hülle, vermehren sich in einem neuen Lebensraum und bilden erneut eine Hülle, Hüllen sind oft von Eisen- oder Manganoxidschicht bedeckt.

Rickettsien: Obligat intrazelluläre Zellparasiten, Besitz von Peptidoglykan, DNA, RNA und Ribosomen, zahlreiche pathogene Spezies (z. B. *Rickettsia prowazeki*, Fleckfieber), Übertragung durch tierische Vektoren, z. B. Läuse, *Wolbachia*-Arten sind obligate Endosymbionten von Insekten und einigen Filarien.

3.5 Die Entwicklungslinien der Archaea

Die Entwicklungslinie der **Crenarchaeota** enthält zahlreiche **hyperthermophile** Gattungen, die chemolithotroph oder chemoorganotroph mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren wachsen, einige auch aerob. Als Anpassungen an die extremen Temperaturen im Lebensraum besitzen sie Membranen, die eine Lipidmonoschicht ausbilden, spezielle Proteinfaltungen, die durch ein Hitzeschock-Protein stabilisiert werden, und eine besonders hitzestabile Genom-Organisation. Eine Gruppe von bislang nicht kultivierten **psychrophilen** marinen Crenarchaeota wurde durch Sequenzanalysen der rRNA-Gene mariner Lebensgemeinschaften in sehr kaltem Meereswasser oder in Flüssigkeitsbläschen im Polareis identifiziert. Zur Entwicklungslinie **Euryarchaeota**

gehören mit den **extrem Halophilen**, den **Methanogenen**, den **Hyperthermophilen** und **extrem Acidophilen** mehrere Gruppen von Archaea, die an besonders extreme Standorte angepasst sind. Halophile benötigen sehr hohe NaCl-Konzentrationen für ihr Wachstum und besitzen mit Halorhodopsin ein spezielles Pigment zur lichtabhängigen Energiekonservierung. Methanogene sind als einzige Lebewesen in der Lage, durch die Reduktion zahlreicher verschiedener Substrate zu Methan Energie zu konservieren und stellen daher die Quelle der natürlichen Methanproduktion dar. Für die Komponenten der Methanogenese benötigen sie neben Eisen und Kobalt Nickel als essentielles Spurenelement. Zu den extrem acidophilen Euryarchaeota gehören auch *Ferroplasma* und *Thermoplasma*, die Lipoglykane zur Stabilisierung ihrer Cytoplasmamembran und Histone zur Stabilisierung des Genoms besitzen. Auch in der Entwicklungslinie der Euryarchaeota wurden mithilfe von rRNA-Sequenzanalysen **mariner** Lebensgemeinschaften **psychrophile** Mitglieder gefunden.

In der Domäne Archaea wurden inzwischen vier Hauptentwicklungslinien (Phyla) durch 16S rRNA-Sequenzanalysen ermittelt, bisher sind nur Mitglieder der Linien Crenarchaeota und Euryarchaeota in die offizielle Klassifizierung aufgenommen worden.

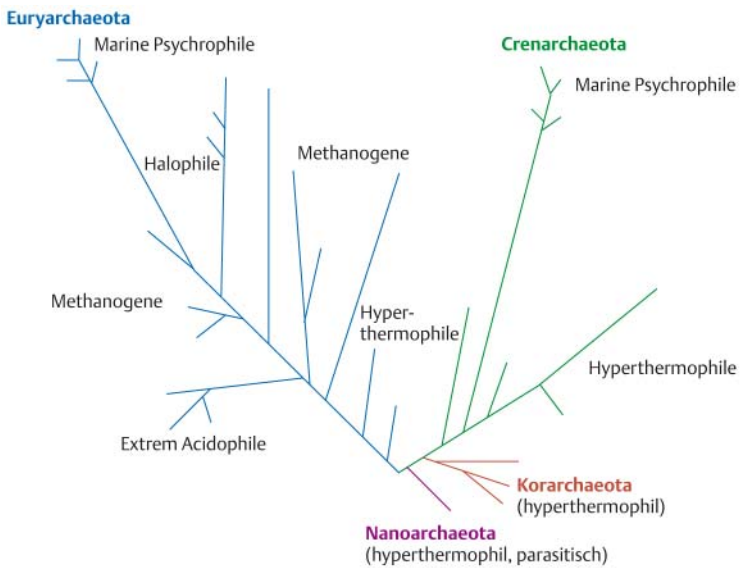


Abb. 3.**11** **Phylogenetische Entwicklungslinien der Archaea.**

3.5.1 Crenarchaeota

Lebensraum vieler **hyperthermophiler Crenarchaeota**, die bei Temperaturen über 80°C (Tab. 3.**7**) oder sogar oberhalb des Siedepunktes optimal wachsen, sind hydrothermale Quellen in der Tiefsee (**Schwarze** und **Weiße Raucher**, Black/White Smoker) oder geothermale Gebiete auf der Erdoberfläche. Dazu gehören beispielsweise schwefelhaltige Dampfquellen (**Solfataren**), in denen der aus der Tiefe aufsteigende Wasserdampf neben CO_2 und H_2 auch große Mengen an H_2S enthält. Der pH-Wert der heißen Quellen ist abhängig von ihrer geologischen Beschaffenheit. Während die meisten eher im neutralen oder schwach sauren Bereich liegen, herrschen in einigen der heißen Schwefelquellen stark saure Bedingungen vor. Einige hyperthermophile Crenarchaeota wie *Sulfolobus* oder *Acidianus* sind an dieses Milieu angepasst und wachsen optimal bei pH-Werten von 2 und einer Temperatur um 85°C.

Morphologisch ist die Gruppe sehr heterogen, man findet neben Stäbchen (*Thermoproteus*, Abb. 3.**12a**) und Kokken (*Thermosphaera*, Abb. 3.**12b**) auch scheibenförmige und unregelmäßig geformte Zellen (*Archaeoglobus*, Abb. 3.**12c**). Hyperthermophile Crenarchaeota zeigen große physiologische Vielfalt, viele wachsen chemolithotroph mit H_2 als Elektronendonor, als Elektronenakzeptor dient z. B. S^0, NO_3^- oder bei *Archaeoglobus* SO_4^{2-}, bei *Acidianus, Sulfolobus* oder *Pyrobaculum* auch O_2. Bei chemoorganotrophem Wachstum werden zahlreiche organische Substrate mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren oxidiert oder in einigen Gattungen auch fermentiert. Bei thermophilen Crenarchaeota findet man einige Besonderheiten, die dazu dienen, die Makromoleküle unter den extremen Temperaturen im Lebensraum dieser Organismen zu stabilisieren.

Tab. 3.**7** **Wachstumstemperaturen und pH-Optimum von hyperthermophilen Crenarchaeota.**

Gattung	*Temperatur-optimum (°C)*	*Maximale Wachstums-temperatur (°C)*	*pH-Optimum*
Sulfolobus	75–85	87	2–3
Acidianus	85–90	95	2
Thermoproteus	88	96	6
Thermosphaera	85	90	7
Pyrobaculum	100	102	6
Pyrodictium	105	110	6
Pyrolobus	105	113	5,5
Ignicoccus	90	103	5
Archaeoglobus	83	95	7
Pyrococcus	100	106	6–8

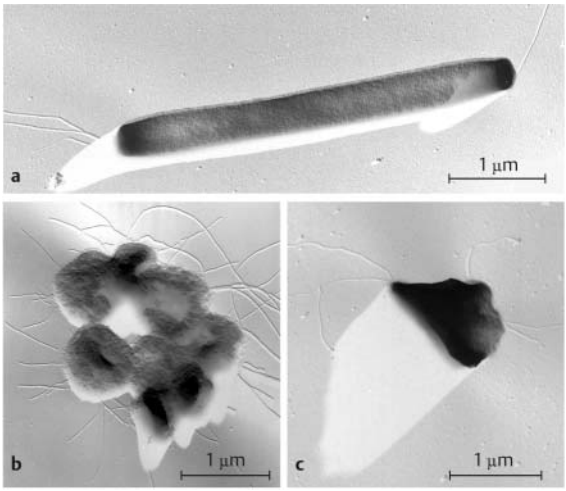


Abb. 3.**12** **Crenarchaeota. a** *Thermoproteus.* Die regelmäßigen Stäbchen mit einer Länge bis zu 10 µm und einem Durchmesser von 0,5 µm weisen am Zellende Zellanhänge auf, deren Funktion unklar ist. **b** *Thermosphaera aggregans.* Die kokkoiden Zellen bilden typischerweise Aggregate (Name!). Die Funktion der Zellanhänge ist ungeklärt. **c** *Archaeoglobus fulgidus*. Die Zellen sind (tatsächlich) unregelmäßig geformte Kokken, die wie hier mehrere Zellanhänge aufweisen können. Motilität ist nicht nachgewiesen, was die Frage nach der Funktion der Zellanhänge offen lässt. (TEM-Aufnahmen von R. Rachel, Regensburg)

Die in den Membranen der Archaea vorhandenen Etherlipide sind in Hyperthermophilen häufig über ihre Seitenketten durch kovalente Bindungen zu einer **Lipidmonoschicht** verknüpft, dadurch ist die Membran weniger hitzelabil als eine Lipiddoppelschicht. Ihre Proteine stabilisieren hyperthermophile Crenarchaeota durch eine spezielle Faltung, die sich aus der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) des Moleküls ableitet. Zusätzlich sorgt **Thermosom**, ein spezielles Chaperon (Hitzeschock-Protein, S. 455) in Archaea, für die Aufrecherhaltung der korrekten Faltung essentieller Proteine auch bei sehr hohen Temperaturen. Die DNA wird in einigen Organismen mithilfe von Soluten (S. 464) oder DNA-Bindeproteinen stabilisiert, andere besitzen das Enzym **Reverse Gyrase**, das im Unterschied zur Gyrase der mesophilen Organismen (S. 455 und 📖*Genetik*) eine positive Überspiralisierung (supercoil) der DNA bewirkt. Diese Struktur schützt die DNA vor Hitzedenaturierung. Thermophile Euryarchaeota besitzen **Histone** zur Stabilisierung ihrer DNA. Auch in marinen Crenarchaeota wurden Gene identifiziert, die für archaeelle Histone codieren.

Enzyme aus thermophilen und psychrophilen Archaea („**Extremozyme**“) sind von großem Interesse für industrielle Anwendungen (S. 574).

Crenarchaeota: Hyperthermophile und bisher nicht kultivierte psychrophile Archaea.

– **Hyperthermophile Crenarchaeota:** Leben in hydrothermalen Quellen der Tiefsee und in geothermalen Gebieten auf der Erde. z. B. Solfataren, das Temperaturoptimum liegt bei 75 bis über 100 °C. Abhängig von der Geologie ist der pH-Wert dieser Habitate neutral oder schwach bis stark sauer. Besondere Anpassungen an hohe Temperaturen: Lipidmonoschicht, spezielle hitzestabile Proteinfaltung, Chaperon (Thermosom) hält die korrekte Faltung der Proteine aufrecht, Reverse Gyrase und Histone stabilisieren die DNA.

***Sulfolobus*, *Acidianus*:** Acidophil (pH-Optimum 2).

– **Psychrophile Crenarchaeota:** Leben in sehr kaltem Meereswasser oder in Flüssigkeitsbläschen im Polareis, bisher nur über rRNA-Sequenzanalysen identifiziert.

3.5.2 Euryarchaeota

Extrem halophile Euryarchaeota werden nach der besonders gut untersuchten Gattung *Halobacterium* (Abb. 3.**13**) auch als Halobakterien bezeichnet, phylogenetisch korrekter ist der Begriff **Haloarchaea**. Sie wachsen meist aerob und sind auf NaCl-Konzentrationen von mindestens 9 % angewiesen, viele benötigen für optimales Wachstum noch deutlich höhere Konzentrationen, einige sogar im Sättigungsbereich (32 %). Eine Besonderheit sind die **extrem großen Plasmide** von *Halobacterium* und *Halococcus,* die bis zu einem Drittel der gesamten zellulären DNA ausmachen können. Die Zellwand von *Halobacterium* besteht aus Glykoproteinen mit einem besonders hohen Anteil an den negativ geladenen sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat. An diese lagern sich die positiv geladenen **Natriumionen** aus der Umgebung der Zelle an und stabilisieren so die Zellwand. Wenn die Natriumkonzentration des umgebenden Mediums zu gering ist, bricht dieses Stabilisierungssystem zusammen und die Zellen lysieren. Natürliche Lebensräume halophiler Euryarchaeota sind stark salzhaltige Gewässer wie das

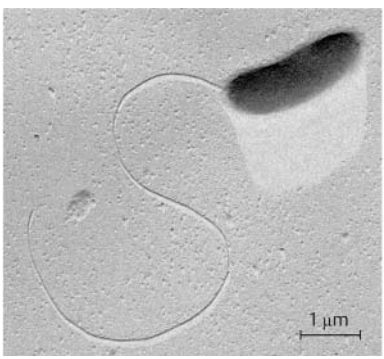


Abb. 3.**13** ***Halobacterium*.** *Halobacterium*-Zellen sind gerade, selten auch gebogene Stäbchen mit einer Länge von vermutlich 3–6 µm und einem Durchmesser von 0,5–1 µm. Sie sind motil. (TEM-Aufnahme von R. Rachel, Regensburg)

Tote Meer sowie viele Salz- oder Sodaseen, aber auch Salinen oder Meerwasserverdunstungsanlagen zur Salzgewinnung sowie stark gesalzene Nahrungsmittel wie Salzfisch. Meerwasser enthält durchschnittlich 2,7 % NaCl, der Große Salzsee in Utah die zehnfache Konzentration. Die Gattungen *Natronobacterium* und *Natrononococcus*, die in stark alkalischen Sodaseen leben, sind nicht nur extrem halophil, sondern mit einem pH-Optimum von etwa 10 auch **alkaliphil** (S. 458). Um ihre Zellen in der konzentrierten Salzlösung vor der Dehydratation zu schützen, pumpen extrem halophile Crenarchaeota Kaliumionen als **kompatibles Solut** (S. 464) in so hohen Konzentrationen ins Zellinnere, dass dadurch die außen herrschende Natriumkonzentration nicht nur ausgeglichen, sondern sogar noch übertroffen wird. Auch die Stabilität der Cytoplasmamembran, die wie die Zellwand einen hohen Anteil an Aspartat und Glutamat enthält, wird durch Kaliumionen gewährleistet, die sich im Zellinneren an die negativen Ladungen der sauren Aminosäuren anlagern. Die Konzentration anderer Ionen wie Mg^{2+} oder Cl^- ist dagegen innerhalb und außerhalb der Zellen gleich hoch. Viele der extrem halophilen Euryarchaeota nutzen unter Sauerstofflimitierung Licht zur Energiekonservierung. Anders als bei phototrophen Bacteria ist bei dieser lichtabhängigen ATP-Synthese jedoch weder Chlorophyll noch Bakteriochlorophyll beteiligt, sondern **Bakteriorhodopsin**, das als lichtabsorbierendes Pigment Retinal enthält und dem Sehpigment Rhodopsin ähnelt. Bei Absinken der Sauerstoffkonzentration der Umgebung wird Bakteriorhodopsin synthetisiert und in die Cytoplasmamembran inseriert (S. 347, 🕮 *Biochemie, Zellbiologie*. Außer Bakteriorhodopsin besitzt *Halobacterium* noch andere Rhodopsine: **Halorhodopsin** pumpt lichtabhängig Cl^- als Gegenion für K^+ ins Zellinnere, zwei weitere Rhodopsine steuern als Lichtsensoren phototaktische Bewegungen.

Methanogene Euryarchaeota besitzen die einzigartige Fähigkeit, in ihrem Energiestoffwechsel verschiedene Substrate zu Methan zu reduzieren (Tab. 3.**8**). Da die **Methanogenese** (S. 367 und S. 516) nur in Abwesenheit von Sauerstoff stattfinden kann, sind Methanogene auf strikt anaerobe Lebensräume wie Faultürme von Kläranlagen, anaerobe Sümpfe oder den Verdauungstrakt zahlreicher Tiere beschränkt. Morphologisch ist die Gruppe äußerst heterogen; sie enthält Spirillen, Stäbchen, Kokken, und auch einige sehr unregelmäßige Formen. Die Zellwände von methanogenen Euryarchaeota sind chemisch sehr unterschiedlich aufgebaut und bestehen bei *Methanobacterium* aus Pseudopeptidoglykan, bei *Methanocaldococcus* aus Proteinen und bei *Methanoplanus* aus Glykoproteinen. *Methanospirillum* besitzt eine S-Layer (S. 34) und die Zellwände von *Methanosarcina* bestehen aus dem Heteropolysaccharid Methanochondroitin. Die meisten Methanogenen sind in der Lage, Methan aus CO_2 und H_2 zu synthetisieren. Unter diesen Bedingungen fungiert CO_2 auch als Kohlenstoffquelle für den Baustoffwechsel (autotrophes Wachstum). Auch zahlreiche andere Verbindungen, darunter Formiat, Kohlenmonoxid, eine Reihe von Methylverbindungen und bei *Methanosarcina* und *Methanosaeta* auch Acetat können als Ausgangssubstrate dienen. *Methanosaeta* ist sogar ausschließlich auf Acetat als Ausgangs-

Tab. 3.8 **Substrate von Methanogenen.**

Gattung	*Morphologie*	*Substrat für Methanogenese*		
		CO_2, Formiat	*Methanol, Methylamin*	*Acetat*
Methanobacterium	Stäbchen	+	–	–
Methanobrevibacter	Kurzstäbchen	+	–	–
Methanococcus	Kokken	+	–	–
Methanospirillum	Spirillen	+	–	–
Methanosarcina	Kokken in Paketform	+	+	+
Methanosaeta	Stäbchen	–	–	+
Methanopyrus (thermophil)	Stäbchen in Kettenform	+	–	–
Methanolobus	unregelmäßige Kokken in Haufen	–	+	–
Methanohalobium (halophil)	unregelmäßige Kokken	–	+	–

substrat angewiesen und wächst bei deutlich niedrigeren Acetatkonzentrationen als *Methanosarcina*, das andere methylierte Verbindungen bevorzugt. Alle Methanogenen benötigen als essentielle Spurenelemente Eisen, Kobalt und **Nickel**, das in mehreren an der Methanogenese beteiligten Komponenten enthalten ist (S. 367). Viele Methanogene leben in Symbiosen mit eukaryotischen Organismen. So ist die Fähigkeit von Termiten und vielen anderen Insekten zur Holzzersetzung auf die Aktivität von Methanogenen in ihrem Darm zurückzuführen, auch als Endosymbionten verschiedener Protozoen wurden Methanogene gefunden. Ein besonders gut untersuchtes anaerobes Ökosystem stellt der Verdauungstrakt von Wiederkäuern dar. In ihrem Pansen leben zahlreiche Prokaryoten, die Cellulose, Stärke oder Pektin aus der pflanzlichen Nahrung der Tiere abbauen. Ihre Fermentationsprodukte werden anschließend durch methanogene Euryarchaeota zu Methan reduziert, das von den Wiederkäuern beim Aufstoßen in die Atmosphäre abgegeben wird. Dieser Prozess ist ökologisch von Bedeutung, da der weitaus größte Teil des weltweit entstehenden Methangases aus der biologischen Methanproduktion durch methanogene Euryarchaeota stammt.

Obwohl die meisten methanogenen Euryarchaeota mesophil sind, gibt es mit *Methanopyrus* auch einen hyperthermophilen Vertreter, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 100°C liegt. Eng verwandt mit *Methanopyrus* sind die hyperthermophilen Euryarchaeota *Thermococcus* und *Pyrococcus*, die jedoch keine Methanogenen sind.

Die Gattungen *Thermoplasma, Ferroplasma* und *Picrophilus* bilden eine eigene Ordnung und sind **extrem acidophil**, *Picrophilus* wächst optimal bei einem pH-Wert von 0,7. *Thermoplasma* und *Ferroplasma* besitzen wie die Mycoplasmen

keine Zellwand. Ferroplasma wächst optimal bei 35°C an eisenhaltigen Standorten oder in sauren Abflüssen von Bergwerken und oxidiert im Energiestoffwechsel Fe^{2+} zu Fe^{3+}. Interessanterweise enthalten 80 % der Proteine von *Ferroplasma acidiphilum* Eisenatome als Stabilisatoren. *Thermoplasma* ist thermophil und wächst aerob auf Abraumhalden von Kohlebergwerken. Um dem osmotischen Druck der Umgebung standhalten zu können, besitzt *Thermoplasma* spezielle **Lipopolysaccharide**, die zur Stabilisierung der Cytoplasmamembran beitragen. Diese **Lipoglykane** enthalten im Gegensatz zu den Lipopolysacchariden der äußeren Membran gramnegativer Bacteria kein Lipid A und auch keine Phosphatgruppe. Das sehr kleine Genom von *Thermoplasma* wird von einem archaeellen Histon stabilisiert.

3.5.3 Weitere Entwicklungslinien der Archaea

Die phylogenetisch älteste Linie in der Domäne Archaea sind die erst kürzlich entdeckten **Nanoarchaeota**, die dicht an der Wurzel des Stammbaums abzweigen. *Nanoarchaeum equitans* ist der einzige bisher bekannte Vertreter dieser Entwicklungslinie und lebt als obligater Parasit auf Zellen des thermophilen, autotrophen Archaeons *Ignicoccus*. *N. equitans* bildet sehr kleine Zellen aus und besitzt das kleinste bekannte Genom (S. 16), in dem interessanterweise auch zwei Histon-Gene gefunden wurden. Möglicherweise repräsentiert diese Entwicklungslinie die für eine lebensfähige Zelle unterste Grenze in Bezug auf Zell- und Genomgröße. Die zweitälteste Linie sind die **Korarchaeota**, eine Gruppe von bisher nicht kultivierten Archaea, die durch Sequenzanalyse sämtlicher rRNA-Gene einer mikrobiellen Gemeinschaft aus einer sehr heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark identifiziert wurde.

Euryarchaeota: Extrem halophile Euryarchaeota, methanogene Euryarchaeota, extrem acidophile Euryarchaeota, marine psychrophile Euryarchaeota.
Extrem halophile Euryarchaeota: Benötigen zum Wachstum erhöhte NaCl-Konzentrationen, Zellwand enthält hohen Anteil an sauren Aminosäuren und wird durch Na^+-Ionen stabilisiert; K^+-Ionen-Akkumulation verhindert Dehydratation, einige Gattungen, z. B. *Halobacterium*, besitzen extrem große Plasmide, einige Gattungen sind alkaliphil (z. B. *Natronococcus*), bei Sauerstoffmangel lichtabhängige Energiekonservierung durch Bakteriorhodopsin.
Methanogene Euryarchaeota: Strikt anaerob, reduzieren im Energiestoffwechsel verschiedene Substrate (z. B. CO_2, CO, Formiat, methylierte Verbindungen, Acetat, Pyruvat) zu Methan (Methanogenese), essentielle Spurenelemente sind Eisen, Kobalt, Nickel, häufig Symbiosen mit Tieren, z. B. Termiten, Wiederkäuer (Pansen), Methanproduktion ökologisch von Bedeutung.
Extrem acidophile Euryarchaeota: pH-Optimum sehr niedrig, z. B. unter 1 bei *Picrophilus*, *Thermoplasma* und *Ferroplasma* zellwandlos, *Thermoplasma*: Lipoglykane stabilisieren die Cytoplasmamembran, archaeelle Histone die DNA.
Marine psychrophile Euryarchaeota: Wurden bisher nur über rRNA-Sequenzanalysen identifiziert.

4 Viren

Beate Schultze

4.1 Struktur- und Vermehrungsprinzipien der Viren

Viren sind kleine, infektiöse Partikel, die aus Nucleinsäuren, Proteinen und gegebenenfalls aus Lipiden bestehen. Sie vermehren sich nur in lebenden Wirtszellen (obligat intrazellulär). Das **virale Genom** besteht entweder aus DNA oder RNA und ist von einer Proteinhülle umgeben, dem **Capsid**. Das Capsid kann je nach Virustyp helikale oder ikosaedrische Struktur aufweisen. Bei **umhüllten Viren** ist das Capsid zusätzlich von einer Lipiddoppelschicht umgeben. In dieser Virushülle sind viruskodierte **Glykoproteine** verankert, die unterschiedliche Funktionen übernehmen. Zwei Hüllen und weitere Strukturproteine sind bei **komplexen Viren** zu finden. Viren haben ihrer Ausstattung entsprechend **unterschiedliche Vermehrungsstrategien** in animalen-, pflanzlichen oder bakteriellen Wirtszellen.

Viren unterscheiden sich von allen anderen Mikroorganismen. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und können sich erst in einer passenden Wirtszelle mit Hilfe des enzymatischen Apparates der infizierten Zelle vermehren. Viren sind also **obligate intrazelluläre Infektionserreger**. Die Inanspruchnahme der Zelle für die eigene Produktion führt zu den Symptomen der Infektion und häufig zum Zelltod. Die virale Nucleinsäure besteht entweder aus **DNA oder RNA**. Sie ist von einer schützenden Proteinhülle (**Capsid**) umgeben, diese Einheit aus Capsid und Nucleinsäure bezeichnet man als **Nucleocapsid**. Das Capsid verleiht dem Virus außerhalb der Wirtszelle eine sehr **stabile Struktur**. Zudem sind die Capsidproteine bei der **Verpackung** der Nucleinsäure dafür zuständig, die Nucleinsäure zu erkennen und zu binden.

Bei den Capsiden treten zwei Symmetrieformen auf, die offensichtlich während der Evolution für den Aufbau selektioniert wurden. Viren besitzen eine **helikale Symmetrie**, wenn die Capsidproteine schraubenförmig um die virale Nucleinsäure angeordnet sind. Ein Beispiel mit einer solchen stäbchenförmigen, tubulären Struktur ist das pflanzenpathogene Tabakmosaikvirus (TMV, Abb. 4.**1**). Bei Viren mit einer **ikosaedrischen Symmetrie** sind die Proteinuntereinheiten so angeordnet, dass eine kubische Form entsteht. Die Picornaviren stellen die kleinsten humanpathogenen Viren dar, die nach dem Prinzip des Ikosaeders aufgebaut sind (Abb. 4.**2**).

Bei **umhüllten Viren** ist das Capsid zusätzlich von einer **Lipiddoppelschicht** umgeben. Die Viruspartikel erhalten ihre Hülle beim letzten Schritt der Virusreifung, beim Budding an den zellulären Membranen der Wirtszelle. Die **Virushülle** setzt sich daher aus der zellulären Lipiddoppelschicht und viralen Glykoprote-

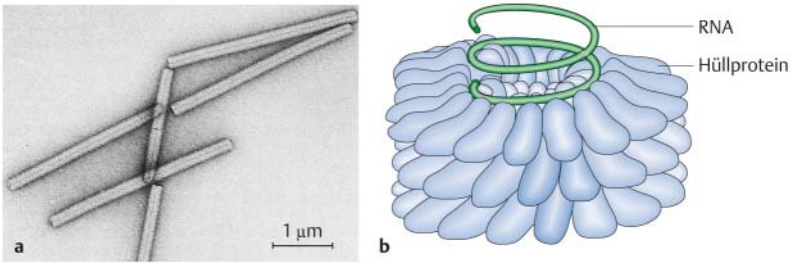


Abb. 4.**1** **Tabakmosaikviren. a** Elektronenmikroskopische Aufnahme (M. Wurtz, aus Hirsch-Kauffmann, Schweiger, Thieme 2006) **b** Schematische Darstellung der helikalen Anordnung der Capsidproteine um die virale zentrale RNA. Beim Zusammenbau werden jeweils zwei Doppelplatten mit je 34 Proteinuntereinheiten übereinander gestapelt, zwischen die sich die RNA schiebt, solange bis diese vollständig bedeckt ist.

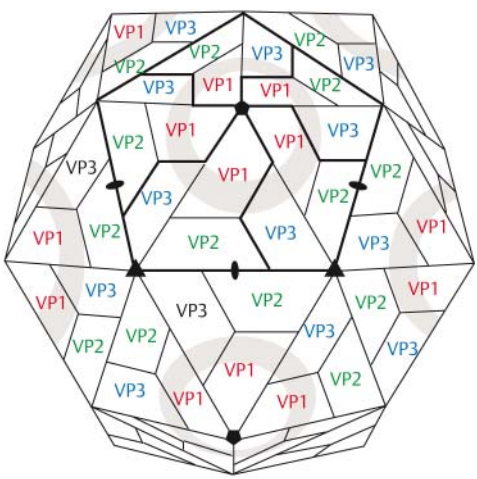


Abb. 4.**2** **Picornaviruscapsid, schematischer Aufbau.** VP1–4 sind strukturelle Virusproteine, wobei VP4 nach innen gerichtet ist und deshalb in dieser Darstellung nicht sichtbar ist.

inen zusammen. Virale **Matrixproteine** (M-Proteine) können die Hülle zusätzlich von innen auskleiden und den Kontakt mit dem Capsid vermitteln. Virale Glykoproteine mit multiplen hydrophoben Transmembrandomänen bilden Transportkanäle in der Virushülle. Die viruscodierten **Glykoproteine** mit kurzer Membrandomäne sind in der Hülle verankert und besitzen einen umfangreichen externen Proteinanteil (Abb. 4.**3**). Monomere lagern sich häufig zusammen und bilden sogenannte **Spikes**. Die Glykosylierung dieser Proteine ist wichtig für die richtige Faltung und den Transport durch die Zelle. Zusätzlich schützt die Glykosylierung vor dem Abbau durch Proteasen und erhält somit die Infektiosität des Virus. Während bei den nicht umhüllten Viren Capsidproteine die Aufgabe haben, den **Kontakt zur Wirtszelle** herzustellen und somit die Infektion der Zelle zu

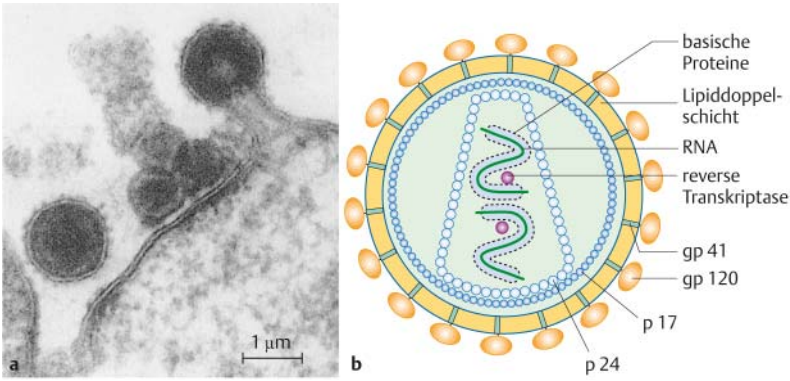


Abb. 4.**3** **Retroviren. a** Knospung von Rous-Sarkom-Viren. (EM-Aufnahme: Institut für Virologie, Gießen, aus Hirsch-Kauffmann, Schweiger, Thieme 2006) **b** HIV. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht. Die Oberflächenproteine werden von gp120 und von gp41 gebildet. Gp41 ist ein Transmembranprotein. Gp120 ist über nicht kovalente Bindungen mit gp41 verbunden. Die Virushülle wird innen mit p17, dem Matrixprotein, ausgekleidet. Das Capsidprotein p24 bildet die Capsidhülle und das Nucleoprotein p7 ist mit der RNA assoziiert. Weitere Proteine im Nucleocapsid sind die Reverse Transkriptase/RNase H, die Integrase und die Protease.

starten, vermitteln bei den umhüllten Viren häufig die Glykoproteine der Virushülle den Kontakt zu den **Zellrezeptoren**, ebenso können sie bei der **Fusion** der Virushülle mit den zellulären Membranen beteiligt sein.

Weitere Virusbestandteile sind bei den **komplexen Viren** zu finden. Bei den Pockenviren ist die DNA von einem S-förmigen Capsid umgeben und wird von zwei Hüllen umschlossen. Außerdem befinden sich noch zwei Polkörperchen im Viruspartikel. Bakteriophagen (Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren) besitzen neben dem Capsid, das als Kopfteil bezeichnet wird, auch einen Schwanzteil, der für Anheftung und Durchbrechen der Bakterienwand zuständig ist (Abb. 4.**4**).

Capsid und Hüllen bilden teilweise sehr **stabile Strukturen**, sie dienen dem viralen Genom außerhalb der Wirtszelle als Transportvehikel zur nächsten Wirtszelle. Dadurch bleibt die Infektiosität der Viren in extrazellulärer Umgebung wie Körperflüssigkeiten, Pflanzensaft, Lufttröpfchen oder Wasser erhalten. Manche Pflanzenviren können bis zu 24 Stunden in getrocknetem Blattmaterial überleben. In dieser Zustandsform außerhalb der Wirtszelle werden Viren auch als Viruspartikel oder Virionen bezeichnet.

Zusätzlich zu den Strukturproteinen führen einige Viren viruseigene Enzyme mit, die zur Replikation notwendig sind und von der Wirtszelle nicht zur Verfügung gestellt werden (RNA-abhängige RNA-Polymerase, Reverse Transkriptase, Integrase, u. a.).

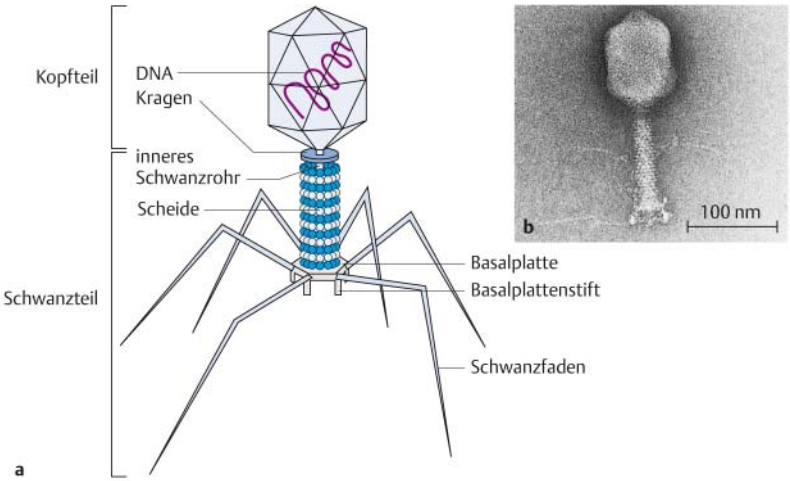


Abb. 4.**4** **T4-Phage. a** Der Kopf des Phagen hat eine polyedrische Struktur und enthält das Phagen-Genom. Der Schwanz des Phagen besteht aus einer hohlen Röhre, die von einer kontraktilen Scheide umgeben ist. Kopf und Schwanz sind über eine dünne Scheibe, den Kragen, miteinander verbunden. Am distalen Ende des Schwanzes befindet sich die hexagonale Basalplatte mit einem kurzen Stift an jeder Ecke und den sechs langen Schwanzfäden. **b** EM-Aufnahme eines T4-Phagen (Ten Heggeler, Basel, aus Hirsch-Kauffmann, Schweiger, Thieme 2006).

Die Gegebenheiten in den verschiedenen Wirten animaler Viren, Pflanzenviren und Bakteriophagen (S. 117) und die unterschiedliche virale Struktur und Ausstattung bestimmen einzelne Vorgänge bei der **Virusvermehrung** (Abb. 4.**10**, Abb. 4.**11**, Abb. 4.**12**). Die aufeinander abgestimmten Phasen laufen aber prinzipiell für jedes Virus gleichermaßen ab: Die Anlagerung oder **Adsorption** an die Wirtszelle beruht auf der Interaktion viraler Oberflächenproteine mit Proteinen auf der Wirtszelle. Bei nicht umhüllten Viren stellen bestimmte Capsidproteine, bei umhüllten Viren die Glykoproteine der Virushülle den Kontakt zu den zellulären Rezeptoren her, die nur zum Teil bekannt sind. Besitzt eine Zelle keinen für das Virus spezifischen Rezeptor, ist sie **resistent** und es kommt nicht zur Virusinfektion. Die Verteilung zellulärer Rezeptoren bestimmt deshalb das Wirtsspektrum bzw. den Zelltropismus eines Virus. Das Eindringen (**Penetration**) der Viren in die Zelle erfolgt bei nicht umhüllten Viren über rezeptorvermittelte Endocytose oder durch direktes Einbringen der viralen Nucleinsäure in das Zellinnere (s. u.). Bei umhüllten Viren fusioniert entweder die Virushülle direkt mit der Cytoplasmamembran, wodurch das virale Nucleocapsid in das Cytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wird oder das Virus gelangt ebenfalls über rezeptorvermittelte Endocytose in zelluläre Endosomen. Im sau-

ren Milieu der Endosomen werden virale Capsid- oder Hüllproteine aktiv und führen eine Lyse der Endosomenmembran bzw. eine Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran und damit Freisetzung des Nucleocapsid herbei. Das Nucleocapsid muss im Anschluss daran zu dem Kompartiment transportiert werden, in dem Transkription und Replikation stattfinden. Der Typ der Nucleinsäure entscheidet über den **Ort der Replikation**. DNA-Viren replizieren im Kern der Wirtszelle. Eine Ausnahme sind die Pockenviren, die über eine eigene DNA-abhängige RNA-Polymerase verfügen und im Cytoplasma replizieren. Die Freisetzung des Genoms aus dem Capsid (**Uncoating**) kann teilweise schon vor dem Transport in der Zelle beginnen, wobei die Bindung zwischen Capsidproteinen und Nukleinsäuren aufgehoben wird. Für den Transport der viralen Nucleinsäure oder Nucleocapside zum Kern und durch die Kernporen hindurch sind bestimmte Proteinkomponenten mit Kernlokalisationssignalen verantwortlich (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Die meisten RNA-Viren replizieren im Cytoplasma. Ausnahmen sind die Orthomyxo- und Bornaviren, deren Nucleocapside in den Kern transportiert werden. **Transkription** und **Replikation** verlaufen je nach Art des Virusgenoms sehr unterschiedlich (s. u.). Neu synthetisierte virale Bestandteile häufen sich in der infizierten Zelle an und lagern sich weitestgehend spontan zu übergeordneten Strukturen, in einem Prozess der als **Self-Assembly** bezeichnet wird, zusammen. Daran anschließen kann eine Reifung zum fertigen Capsid durch weitere Proteinmodifikationen oder proteolytische Spaltungen. Die **Freisetzung** der gebildeten Nucleocapside findet auf unterschiedlichen Wegen statt. Nicht umhüllte Viren verlassen die Zelle durch Lyse der Wirtszelle oder Exocytose. Umhüllte Viren erhalten ihre Lipidhülle durch einen Vorgang, der als Knospung (**Budding**) bezeichnet wird. Dazu werden die membranintegralen viralen Glykoproteine an bestimmten Membranstellen zusammengeführt (z. B. lipid rafts, 📖*Biochemie, Zellbiologie*). An diese Stellen lagern sich die Nucleocapside an und leiten die Abschnürung eines Vesikel ein. Findet das Budding an der Cytoplasmamembran statt, werden die Viren direkt in die Umgebung freigesetzt. Findet das Budding an einer intrazellulären Membran statt, wird das umhüllte Viruspartikel durch Exocytose freigesetzt.

Kinetik der Virusvermehrung: Die Kinetik der Virusvermehrung unterscheidet sich von dem charakteristischen exponentiellen Wachstum der Bakterien. Der Grund hierfür liegt darin, dass sich Viren nicht wie Bakterien durch Zweiteilung vermehren, sondern durch die Zusammensetzung verschiedener Komponenten entstehen. Die Bildung von Viren in der Wirtszelle verläuft linear mit der Zeit. Der Vermehrungszyklus z. B. des T4-Phagen lässt sich in Form einer Wachstumskurve darstellen (Abb. 4.**5**). Den Zeitraum vom Beginn der Infektion bis zum Ende der Synthesephase bezeichnet man als **Eklipsephase**. Während dieser Phase sind keine Viruspartikel nachweisbar. Nach dem Zusammenbau findet **intrazellulär** eine Anhäufung der reifen Phagenpartikel statt, extrazellulär sind noch keine Viruspartikel nachweisbar. Diese sogenannte **Latenzphase**, die bei T4 10–15 Minuten dauert, ist dadurch charakterisiert, dass keine Freisetzung von Phagenpartikeln aus den Zellen ins Medium stattfindet. Mit der Freisetzung der reifen Phagen beginnt die **Anstiegsphase**. Die Anzahl der **extrazellulären** Viren nimmt kontinuierlich zu, bis alle

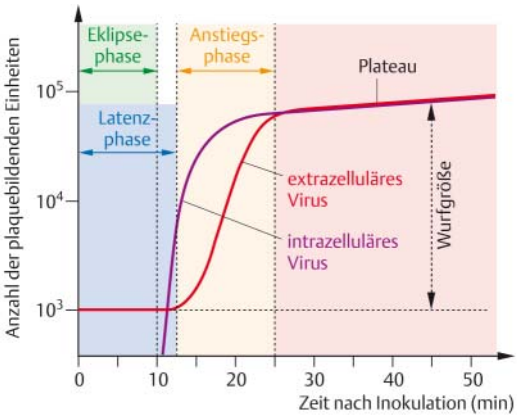


Abb. 4.5 **Wachstumskurve des T4-Phagen in *E. coli*.** Die rote Kurve zeigt die Zunahme extrazellulärer Viruspartikel, die von der Zelle unter Lyse freigesetzt wurden. Die Produktion von intrazellulären Viren (violette Kurve) wurde nach Aufbrechen der Zellen mit Chloroform ermittelt. Aus der Wachstumskurve lässt sich die Wurfgröße ermitteln, d. h. die durchschnittliche Anzahl der pro infizierter Zelle freigesetzten Phagen.

reifen Phagen komplett freigesetzt sind. Danach ist ein **Plateau**, d. h. ein Ende der Wachstumsphase mit dem Tod der Wirtszelle erreicht. Die Dauer eines kompletten Vermehrungszyklus entspricht dem Zeitraum zwischen dem Beginn des Experiments und dem Ende der Anstiegsphase. Für den Phagen T4 ist dies eine Dauer von ungefähr 25 Minuten. Mit den entsprechenden Kulturzellen lassen sich auch für andere Viren solche Wachstumskurven aufstellen. Die Dauer eines kompletten Vermehrungszyklus ist jedoch beträchtlich länger. Im Falle des Poliovirus, eines der schnell wachsenden Viren, beträgt ein Zyklus 5 bis 10 Stunden. Mit Pflanzenviren ist es nicht möglich, eine solche Wachstumskurve aufzustellen.

Viren: Infektiöse Einheiten, die entweder RNA oder DNA enthalten. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel. Für Replikation und Transkription sind sie auf die Wirtszelle angewiesen. Die Nucleinsäure ist von einem Capsid umgeben.
Umhüllte Viren: Besitzen neben dem Capsid noch eine Hülle aus einer Lipiddoppelschicht und darin verankerten viralen Proteinen.
Komplexe Viren: Viren, die neben Capsid und evt. Hülle noch weitere Strukturen besitzen, z. B. Kopf- und Schwanzteil bei Bakteriophagen, mehr als eine Hülle.
Capsid: Proteinhülle, die das virale Genom verpackt, schützt und Kontakt zur Wirtszelle aufnimmt.
Capsidsymmetrie:
– **helikal:** Die viralen Capsidproteine sind helikal um das virale Genom angeordnet.
– **ikosaedrisch:** Das Capsid besitzt die Struktur eines Ikosaeders.
Nucleocapsid: Einheit aus Capsid und Genom.
Spikes: Integrale Glykoproteine der Virushülle, die aus der viralen Oberfläche herausragen. Sie haben unterschiedliche Funktionen: u. a. Anheftung an den zellulären Rezeptor, Vermittlung der Fusion.
Phasen der Virusvermehrung: Adsorption, Penetration, Uncoating, Synthese der viralen Nucleinsäuren und Proteine (Replikation und Transkription), Assembly, Freisetzung.

4.2 Virale Genomtypen und Virusgruppen

Das virale Genom besteht entweder aus **RNA** oder **DNA**. Aufgrund ihres Genoms werden vier Virusgruppen unterschieden: **Einzelsträngige DNA-Viren**, **doppelsträngige DNA-Viren**, **einzelsträngige RNA-Viren** und **doppelsträngige RNA-Viren**. Viren mit einzelsträngiger RNA können in Plusstrang- und Minusstrang-Viren unterteilt werden. Das Genom einiger RNA-Viren ist **segmentiert**. Die einzelnen Virustypen besitzen unterschiedliche Mechanismen zur Replikation der viralen Nucleinsäuren in den Wirtszellen. Bei den Retroviren verläuft die Replikation über eine DNA-Zwischenstufe. Dazu benötigt das Virus die Reverse Transkriptase. Zu den virusähnlichen infektiösen Agentien gehören **Viroide**, **Satellitenviren**, und Defective-Interfering-Particles. **Prionen** sind infektiöse Proteine, bei denen keine Nucleinsäure nachgewiesen werden konnte.

Die **Größe** viraler Genome variiert zwischen 3,5 und 250 Kilobasen. *E. coli* infizierende RNA-Phagen (MS2, Qß) gehören zu den Viren mit dem kleinsten kompletten Genom, dessen Gene für nur vier Virus-spezifische Proteine codieren. Im Gegensatz dazu besitzen Viren mit großem Genom, z. B. das Pockenvirus, genetische Informationen für 200–300 Proteine. Viren enthalten jeweils nur eine Kopie des viralen Genoms, sie sind haploid. Eine Ausnahme bildet eine Gruppe der Retroviren, sie sind mit zwei fast identischen Kopien diploid.

Viren haben eine Reihe unterschiedlicher Strategien entwickelt, um den **Informationsgehalt** der wenigen vorhandenen Nucleinsäure zu **erhöhen**: Transkription beider Stränge eines doppelsträngigen Genoms, Verwendung mehrerer Initiations-, Start- und Stoppcodons pro Leserahmen, ribosomale Frameshift, überlappende Leseraster, Splicing von mRNA, Transaktivierung von Genen der Wirtszelle und deren Nutzung für die virale Replikation.

Auf der anderen Seite der Größenskala ist das **Mimivirus** mit 400 nm das **größte** bisher entdeckte Virus. Es vermehrt sich in der Amöbe *Acanthamoeba polyphaga* und wurde zuerst irrtümlich aufgrund seiner Größe und seines Aussehen als kleines kokkenförmiges Bakterium angesehen – aus dem täuschenden (mimicking) Virus wurde dann kurz Mimivirus. 2004 wurde die Struktur seines Erbguts veröffentlicht: Die Mimivirus-DNA ist über 1,2 Millionen Basenpaare groß und enthält 1260 Gene, darunter solche, die bisher nur von zellulären Organismen bekannt waren.

Das genomische Material liegt bei Viren in Form von **DNA** oder **RNA** vor. Entsprechend lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: DNA-Viren und RNA-Viren. Das **virale Genom** liegt entweder als einzelsträngiges oder als doppelsträngiges Molekül vor. So lassen sich die beiden Gruppen anhand der Genomstruktur weiter differenzieren in **Einzelstrang** (ss, **s**ingle **s**tranded)- oder **Doppelstrang** (ds, **d**ouble **s**tranded)-DNA-Viren, bzw. Einzelstrang (ss)- oder Doppelstrang (ds)-RNA-Viren.

Einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle bestehen aus einem Polynucleotidstrang. Treten komplementäre Sequenzfolgen auf, so kommt es in diesen Bereichen zu Basenpaarungen. Ein solches Genom wird trotz doppelsträngiger Bereiche als einzelsträngig bezeichnet. Die sekundäre Struktur des Polynucleotidstranges besitzt häufig eine funktionelle Bedeutung und kann in die Regulation der Expression viraler Gene involviert sein.

Die **Polarität** der mRNA eines Organismus ist mit plus festgelegt. Somit ist in einer Doppelstrang-DNA sowohl ein Strang mit **Pluspolarität** als auch einer

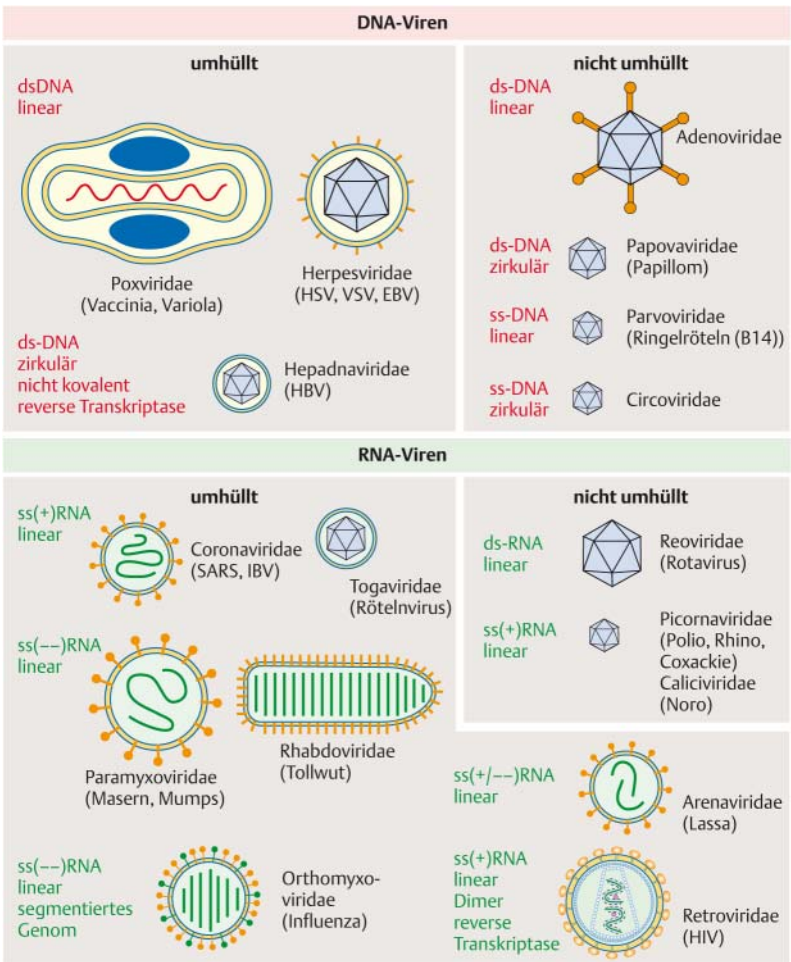


Abb. 4.6 **Virale Genomstrukturen.**

mit **Minuspolarität** vorhanden, während in einer Einzelstrang-DNA oder -RNA nur jeweils eine Form vorhanden ist. Picornaviren besitzen beispielsweise eine Plusstrang-ssRNA, während die Paramyxoviren eine Minusstrang-ssRNA als Genom aufweisen. Einen weiteren Nucleinsäuretyp findet man bei den Arenaviren: **ambisenseRNA**. Die einzelsträngige RNA besitzt gemischte Polarität: in einigen Abschnitten Pluspolarität in anderen Minuspolarität. Bei diesen Viren findet bereits auf der Ebene der Transkription eine Kontrolle über die Proteinexpression statt.

Die Nucleinsäure der meisten DNA-Viren ist an sich **infektiös**, d. h. die Transfektion nackter Virus-DNA führt zur Virusvermehrung, da die virale DNA von der wirtseigenen zellulären DNA-abhängigen Polymerase abgelesen wird. Auch die RNA von Plusstrang-RNA-Viren ist infektiös, da sie in der Zelle als mRNA fungiert. Am 5′ Ende der RNA finden sich Strukturen, die Bindung zu Ribosomen eingehen und das 3′-Ende besitzt oft eine Poly-A-Sequenz. Die RNA der Retroviren bildet hier eine Ausnahme. Sie ist zwar plussträngig, doch für die Replikation benötigt sie die Reverse Transkriptase. Bei den Minusstrang-Viren kann die RNA allein jedoch nicht zur Virusvermehrung führen, da die Zelle keine RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzt. Daher bringen diese Viren ihre eigene Polymerase als Bestandteil des Nucleocapsids mit in die Zelle.

4.2.1 DNA-Viren

Forschungen über die Evolution und den Ursprung von Viren machen deutlich, dass es bei **DNA-Viren** zu einem häufigen Genaustausch zwischen dem viralen Genom und dem der Wirtszellen gekommen ist. DNA-Viren nehmen einerseits über Rekombination zelluläre Gene in ihr Genom auf und geben sie auf diese Weise auch an andere Genome weiter, ein Beispiel sind die Thymidinkinasegene bei Herpesviren. Andererseits werden virale Gene in das Genom der Zelle integriert. Vermutlich sind kleinere DNA-Viren durch Kombination zellulärer Gene mit genetischen Elementen wie Plasmiden oder Transposons entstanden.

Zur Gruppe der **ssDNA-Viren** (ssDNA) gehört die Familie der **Parvoviridae**. Die Einzelstrang-DNA dieser Viren ist **linear** und kann sowohl Pluspolarität als auch Minuspolarität besitzen (Abb. 4.**7**). Ebenfalls ssDNA findet man bei den **Circoviren**. Diese ssDNA liegt jedoch in **zirkulärer** Form vor mit kovalent verbundenen Enden.

Vermehrungszyklus von ssDNA-Viren am Beispiel der Parvoviren: Parvoviren binden an Rezeptoren in der Zellmembran und gelangen über Endosomen ins Cytoplasma. In den Endosomen wird das Capsid abgebaut. Die Virus-DNA wird allmählich freigesetzt und gelangt zum Kern. Nach Adsorption an die Kernmembran wird die Virus-DNA in den Kern transportiert. Die DNA-Replikation findet im Kern durch einen modifizierten rollenden Haarnadelmechanismus (Rolling Hairpin Mechanism) statt (Abb. 4.**7**). Die Zellen müssen sich dazu in der S-Phase befinden. Zunächst wird die ssDNA zu einem Doppelstrang konvertiert. Die entstandene monomere doppelsträngige DNA dient als Matrize für die virale mRNA-Synthese. So können die frühen viralen Genprodukte NS1

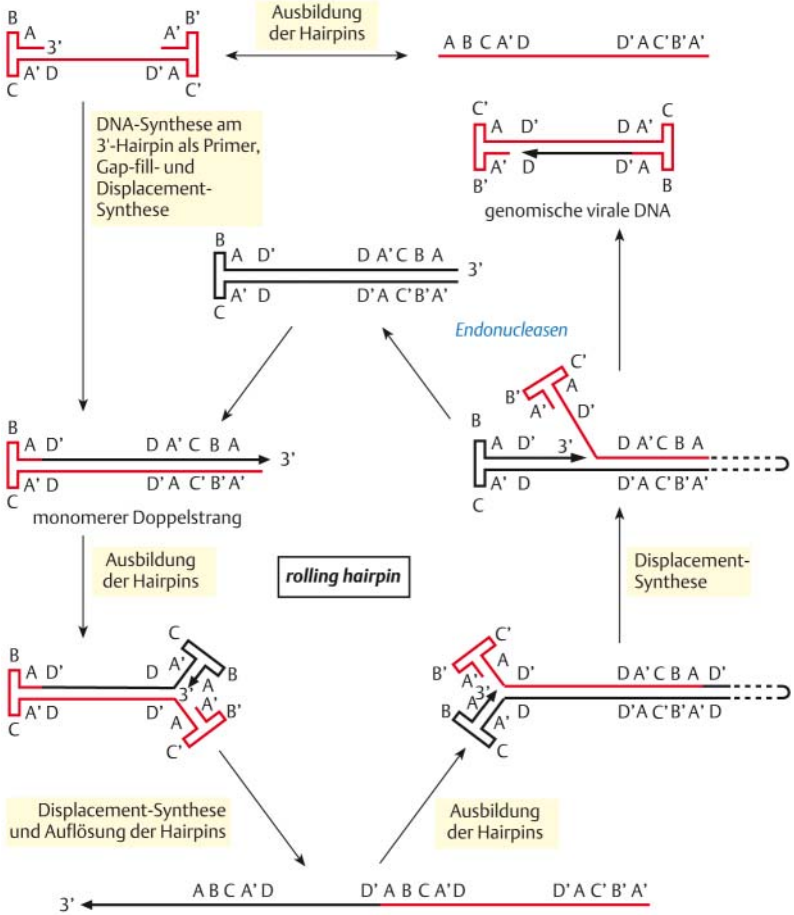


Abb. 4.7 **Replikation von Parvoviren nach dem rollenden Haarnadelmechanismus (Rolling Hairpin Mechanism).** Die Initiation der Replikation beginnt mit der Synthese zum Doppelstrang (Gap-fill-Synthese). Dabei dienen die invertierten terminalen Repeats (ITR) am 3′-Ende als Primer. Das 5′-Ende wird durch weitergehende Synthese aufgerollt (Displacement-Synthese). Die DNA wird bis zum 5′-Ende synthetisiert. Es findet ein Rearrangement statt, indem die ITR wieder ihre Haarnadelstruktur ausbilden. Es kommt nun wieder zur Displacement- und Gap-fill-Synthese, bis ein erster kompletter Synthese-Rundgang beendet ist. Endonucleasen schneiden die DNA-Einheiten aus. Es lagern sich Strukturproteine an und die Displacement-Synthese läuft weiter. Das Genom liegt in verpackter Form vor.

und NS2 synthetisiert werden, die für weitere Replikationsschritte benötigt werden. Die DNA-Replikation und die Transkription der späten Proteingene werden initiiert. Dies sind vor allem Strukturproteine, die wieder zum Kern wandern, wo das Virusassembly stattfindet. Die Viren werden über Zelllyse freigesetzt.

Zu den Viren mit **Doppelstrang-DNA** gehören die **Pocken-**, **Herpes-** und **Adenoviren**. Das Genom besteht aus einer **linearen** dsDNA. Eine **zirkuläre** dsDNA liegt bei den **Papovaviren** (Polyoma- und Papillomavirus) vor. Die Replikation läuft hier über einen Rolling-Circle-Mechanismus ab. Bei den **Hepadnaviren**, zu denen das Hepatitis-B-Virus gehört, ist die zirkuläre dsDNA nur **partiell doppelsträngig** und nicht kovalent geschlossen.

Vermehrungszyklus von dsDNA-Viren am Beispiel von SV40: Das Polyomavirus gelangt über Endocytose in die Zelle. Nach dem Transport zur Kernmembran und nachfolgendem Uncoating, kommt es zur Transkription der frühen mRNAs. Die translatierten T-Antigene sind zuständig für die weitere Regulation der Replikation. Die Replikation der DNA selbst beginnt am „Origin of Replication" (ori) und erfolgt durch zelluläre DNA-Polymerasen zur Produktion großer viraler Genommengen in einem „Rolling Circle", wobei ein Strang kontinuierlich, der andere diskontinuierlich synthetisiert wird. Eine bidirektionale Replikation findet statt, wenn geringere Virusmengen gebildet werden sollen. Als replikative

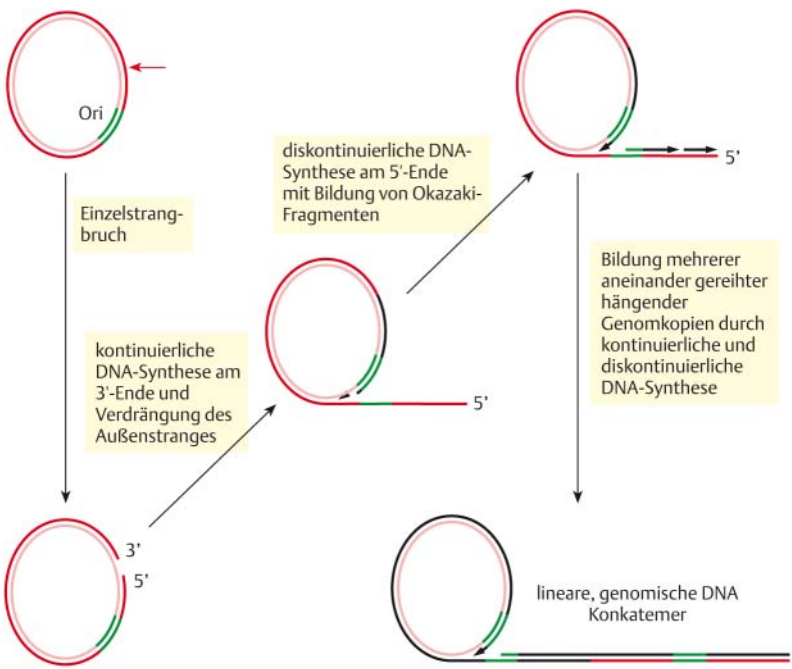


Abb. 4.8 **Rolling-Circle-Replikation der Polyomaviren.**

Intermediate entstehen ineinander hängende DNA-Ringe, die durch weiteres Processing getrennt werden. Nach Beendigung der DNA-Replikation werden die späten Proteine exprimiert. Dies sind vor allem Strukturproteine, die wieder zum Kern wandern. Dort findet die Verpackung der viralen DNA zusammen mit zellulären Histonen statt. Nach erfolgtem Assembly werden die Viren über Zelllyse freigesetzt.

Vermehrungszyklus von partiell dsDNA-Viren am Beispiel des Hepatitis-B-Virus: Das virale Genom des Hepatits-B-Virus (HBV) gelangt über Kernporen in den Zellkern. Dort wird zunächst die zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA komplettiert und zur zirkulären DNA geschlossen. Anschließend erfolgt die Plusstrang-RNA-Synthese durch die zelluläre RNA-Polymerase. Die entstandene mRNA dient zunächst der Synthese der viralen Proteine und der Reversen Transkriptase. Gleichzeitig ist sie Template für die Herstellung einer Doppelstrang-DNA. Die eigentliche reverse Transkription findet im Cytoplasma in Präcapsiden statt. Diese enthalten sowohl mRNA als Template als auch die Reverse Transkriptase. Nach erfolgter reverser Transkription und Reifung der Capside durchläuft das Virus Kernhülle, ER und Golgi-Apparat, wobei es seine Hülle erhält. Die Freisetzung erfolgt über Exocytose.

Eine lineare dsDNA findet sich bei dem Phagen λ. Der Doppelstrang besitzt an den 5′-Enden kurze Überhänge mit umgekehrt komplementären Basensequenzen. Unter entsprechenden Umständen kann die DNA eine zirkuläre Form einnehmen, indem die komplementären Basen miteinander Basenpaarungen bilden. Die Fähigkeit zur Ausbildung einer zirkulären DNA ist eine wichtige Voraussetzung für die Integration in das Genom der Wirtszelle, wie es bei lysogenen Infektionen (s. u.) der Fall ist.

Der Bakteriophage T4 gehört mit seinem komplexen Aufbau (Abb. 4.**10**) ebenfalls zu den **dsDNA-Viren**. Die Rezeptoren von T4 sind Lipoproteine der äußeren Schicht der bakteriellen Zellwand.

Vermehrungszyklus eines dsDNA-Phagen am Beispiel T4: Der Phage nimmt mit den Enden der Schwanzfäden den ersten Kontakt mit dem bakteriellen Zellwandrezeptor auf (**Adsorption**, Abb. 4.**10**). Die Gelenke der Schwanzfäden knicken ein, sodass die

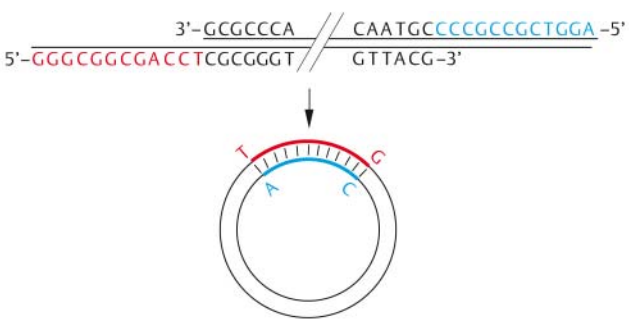


Abb. 4.**9** **Diagramm der dsDNA des Phagen λ.** Das lineare Molekül besitzt an seinen 5′-Enden kurze Überhänge. Die DNA kann zirkularisieren und die komplementären Sequenzen bilden Basenpaarungen. Nach der Infektion wird der Doppelstrang durch eine Ligase kovalent geschlossen.

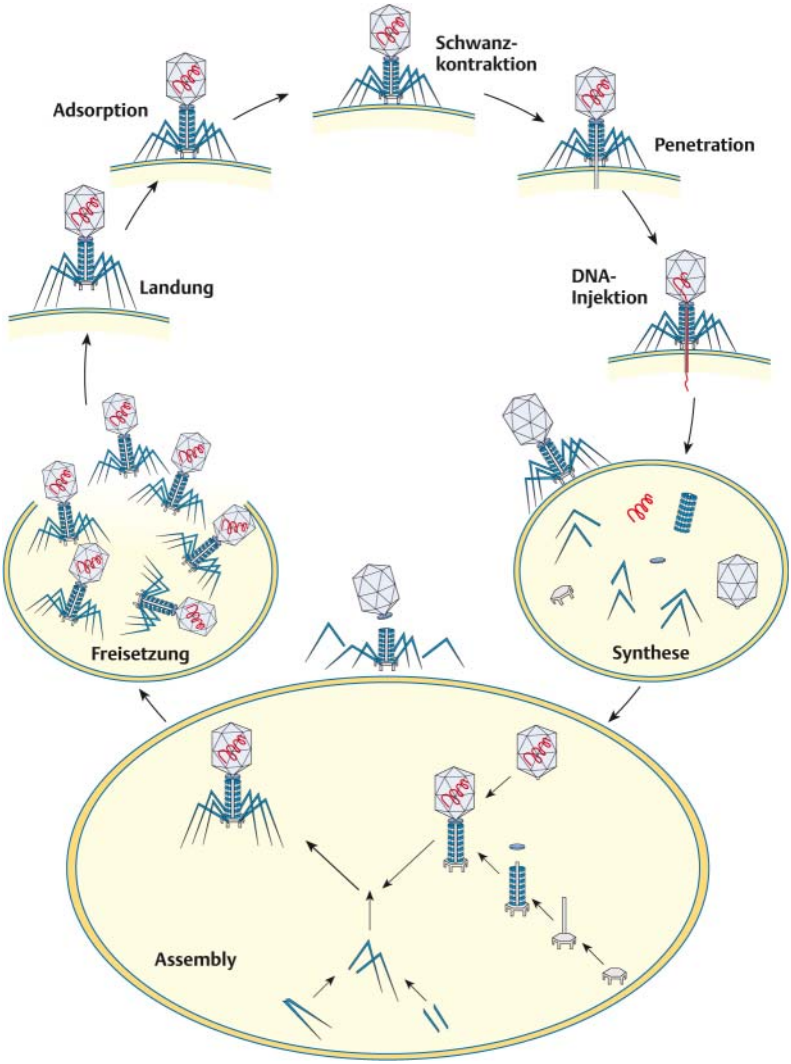


Abb. 4.**10** **Die Vermehrung des Phagen T4** wird in verschiedene Phasen unterteilt: Adsorption, Penetration, Synthese viraler Nucleinsäuren und Proteine, Assembly und Freisetzung.

Basalplatte in engen Kontakt mit der Oberfläche der Zellwand kommt. Durch Kontrahieren der Schwanzscheide durchstößt das innere Schwanzrohr die Zellwand (**Penetration**). Die dafür benötigte Energie liefert das in der Schwanzscheide enthaltene ATP. Die DNA wird in das Cytoplasma der Wirtszelle injiziert, die Proteinhülle verbleibt außerhalb. Kurz nach Eintritt der Phagen-DNA kommt es zu einer vollständigen Umstellung im Stoffwechsel der Wirtszelle. Zunächst wird die frühe mRNA des Phagen mit Hilfe bakterieller RNA-Polymerase gebildet. Durch Translation der frühen mRNA entstehen Enzyme und Faktoren, die eine weitere **Synthese** bakterieller DNA verhindern, deren Abbau vorantreiben und die Transkription der Phagengene beschleunigen. Die Phagen-DNA ist vor Selbstzerstörung geschützt, da sie 5-Hydroxymethylcytosin (HMC) an Stelle des gewöhnlichen Cytosins enthält. In der zweiten Hälfte der Synthesephase werden die „späten" Proteine gebildet. Dazu gehören die Strukturproteine des Phagen, Proteine, die beim Zusammenbau des Phagen beteiligt sind und die Phagen-Lysozyme. Beim **Assembly** wird zunächst die Basalplatte gebildet. Das innere Schwanzrohr wird aufgesetzt und von der Schwanzscheide umhüllt. Parallel dazu findet der Zusammenbau des Phagenkopfes statt. Nachdem die DNA im Kopf verpackt ist, heftet sich der fertige Kopf spontan an den Schwanz an. Erst danach werden die Schwanzfäden mit der Basalplatte verknüpft. Das Lysozym des Phagen führt zur Auflockerung der Zellwand und bereitet die nun folgende **Lyse** der Zelle vor.

Baculoviren sind Insektenviren mit doppelsträngiger DNA, sie befallen vor allem Schmetterlinge und Motten. Bei den Baculoviren sind ein oder auch mehrere Nucleocapside von einer Proteinhülle, einem Polyeder aus dem Protein Polyhedrin umgeben. Zur Bildung des Polyeders sind große Mengen Polyhedrin erforderlich, entsprechend besitzt das Polyhedringen einen außerordentlich starken **Promotor**. In gentechnologischen Verfahren lässt sich dieser Promotor dazu verwenden, nahezu jedes Eiweißmolekül in großen Mengen in Zellkultur herzustellen. Beispiele für Proteine, die mit Hilfe des Baculovirus-Systems hergestellt werden, sind **Interferon-alpha**, **Interleukin 2**, monoklonale Antikörper und Herpes- sowie Poliovirus-Proteine. Baculoviren werden auch in der Landwirtschaft zur **Kontrolle von Schadinsekten** eingesetzt, da sie über sehr unspezifische Rezeptoren zahlreiche unterschiedliche Wirtszellen infizieren können, aber dort keine viruseigenen Gene exprimieren und somit die Infektion keine negativen Auswirkungen auf Pflanzen, Tiere, Vögel, Fische oder andere Insekten hat. ◀

4.2.2 RNA-Viren

RNA-Viren stellen die größte Virusgruppe dar. RNA bildet komplexere Raumstrukturen aus als DNA und kann eigene enzymatische Funktionen entwickeln. Da RNA-Polymerasen keine Fehlerkorrekturfunktion haben, tritt eine **hohe Mutationsrate** bei RNA-Viren auf. Die Viren erhalten somit den Vorteil, sich an veränderte Wirtszellverhältnisse anzupassen. Durch die hohe Mutationsrate entsteht eine Vielzahl von Quasispezies desselben Virus mit teilweise neuen Eigenschaften. Durch eine hohe Mutationsfrequenz kann es aber auch zur Anhäufung nicht infektiöser Viren kommen. Bei DNA-Viren ist die Mutationsrate deutlich geringer als bei den RNA-Viren, trotzdem können auch DNA-Viren Resistenzen ausbilden (z. B. Acyclovir-Resistenz bei Herpes-simplex-Viren).

Die Bildung von **Quasispezies** mit neuen biologischen Eigenschaften konnte bei HIV gezeigt werden. HIV-infizierte Patienten besaßen bereits vor der Therapie mit AZT Mutanten mit **Resistenz** gegenüber diesem Reverse-Transkriptase-Hemmer. Bei einer solchen Therapie wird eine bereits vorhandene resistente Quasispezies selektioniert.

Bei einigen RNA-Viren besteht das Genom nicht aus einem durchgehenden Polynucleotidstrang sondern aus mehreren **RNA-Segmenten**. Bei diesen Viren kann es zum Reassortment der Segmente kommen, wodurch neue Virusvarianten entstehen (s. u. Influenzavirus).

Zu den Viren mit linearer **Doppelstrang-RNA** gehören die Enteritis verursachenden **Rotaviren** (Familie der Reoviridae). Das virale Genom besteht aus 10–12 Segmenten.

Vermehrungszyklus von dsRNA-Viren am Beispiel der Rotaviren: Nach Infektion der Wirtszelle läuft bei den Rotaviren die gesamte Virusreplikation im Cytoplasma ab, in partiell desintegrierten Capsidpartikeln. Die virale Plusstrang-RNA dient dabei nicht als mRNA. Vom Minusstrang wird mit Hilfe der viralen RNA-Polymerase die mRNA gebildet. Nach der Translation von regulatorischen Proteinen und Strukturproteinen wird die mRNA in ein Präcapsid verpackt. Dort dient sie als Template für die Synthese des zweiten Stranges. Die Präcapside mit den doppelsträngigen Genomsegmenten werden komplettiert, durch das ER geschleust, erhalten ein zweites Capsid und verlassen die Zelle über Lyse.

Zur Gruppe der Viren mit **Einzelstrang-RNA von negativer Polarität** gehören die **Paramyxoviren** (Mumps- und Masernvirus), die **Rhabdoviren** (Rhabiesvirus) und die **Orthomyxoviren** (Influenzaviren). Weitere Gemeinsamkeiten zwischen der Familie der Orthomyxoviridae und der Familie der Paramyxoviridae sind ein helikales Nucleocapsid und eine Virushülle. Dennoch sind diese Familien sehr verschieden. Das Genom der Orthomyxoviridae ist segmentiert und die RNA-Synthese dieser Viren findet im Nucleus statt. Im Gegensatz zu den Paramyxoviren benötigen die Orthomyxoviren einen Primer für die mRNA-Synthese. Gemeinsam ist ihnen jedoch, dass sie eine eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase besitzen, die im Virus verpackt in die Zelle gelangt.

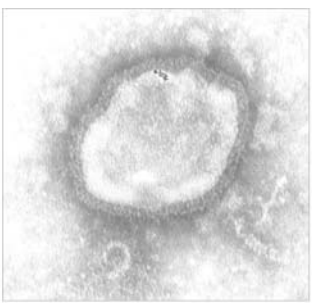
Vermehrungszyklus von ssRNA-Viren am Beispiel von Paramyxoviren: Nach Adsorption des Virus an den Zellrezeptor kommt es zur Fusion zwischen Virushülle und Zellmembran. Das Nucleocapsid wird in das Cytoplasma freigesetzt. Die virale RNA-Polymerase synthetisiert einen Plusstrang, der als Matrize für weitere Negativstränge dient. Während der Transkription bleiben die RNA-Stränge von Nucleocapsidproteinen umhüllt. Die viralen mRNAs besitzen CAP-Struktur, eine Poly-A-Sequenz und sind methyliert. Die Glykoproteine H und F werden über ER und Golgi-Apparat prozessiert und modifiziert. Das Matrixprotein ermöglicht eine Interaktion zwischen dem Nucleocapsid und der Region in der Plasmamembran, in der die Glykoproteine inseriert sind. Es kommt an dieser Stelle zum Budding des Virus.

Vermehrungszyklus von ssRNAViren am Beispiel der Influenzaviren: Die umhüllten Viren heften sich über Rezeptoren an die Zellmembran und gelangen über Endocytose in die Wirtszelle (Abb. 4.**11**). Nach Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran werden die freigesetzten Nucleocapside zum Kern transportiert. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase beginnt umgehend mit der Transkription der viralen RNA (vRNA) in

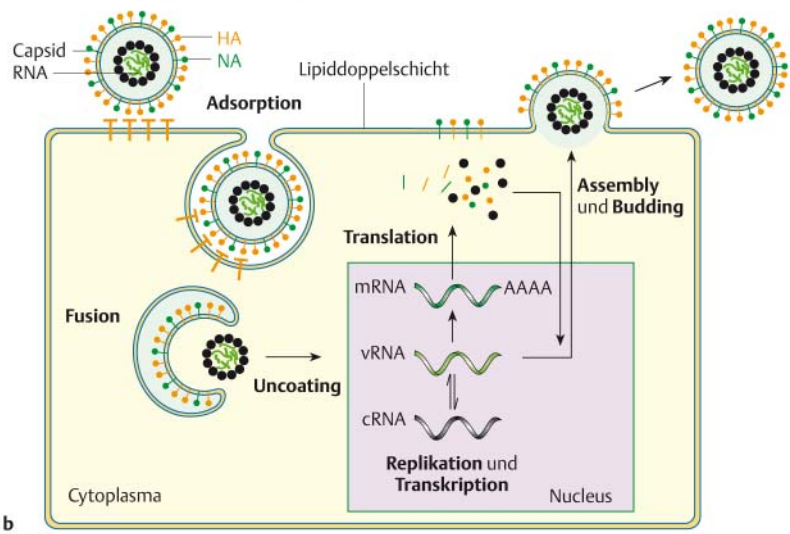
mRNA. Als Primer der mRNA-Synthese dient eine CAP-RNA-Struktur, die von zellulärer RNA durch ein virales Protein abgespalten und übertragen wird („cap snatching"). Von der vRNA werden zunächst Kopien (cRNA) hergestellt, die zur Replikation weiterer vRNA benötigt werden. Die Translation findet im Cytoplasma statt. Proteine mit Kernlokalisationssignal wandern wieder zum Nucleus, während ein Teil der viralen Proteine zur Cytoplasmamembran transportiert wird. Nach der Bildung des Nucleocapsids findet das Budding der Viren an der Zellmembran statt, wodurch die Viren ihre Hülle mit den darin inserierten viralen Glykoproteinen erhalten.

Influenzaviren werden aufgrund ihrer typspezifischen Nucleoprotein- und Membranprotein-Antigene in drei Gruppen eingeteilt: A, B, und C. Influenza C spielt fast keine Rolle bei Erkrankungen des Menschen. Influenza B kommt vor allem bei Kindern und Jugendlichen vor, der Erkrankungsverlauf ist milder als bei der Influenza A.

Influenza-A-Viren sind beim Menschen, Säugetieren (Schweine, Pferde) und in großer Vielfalt bei Vögeln, vor allem Wasservögeln, die häufigste Ursache von Epidemien und Pandemien.



a



b

Abb. 4.**11** **ssRNA-Viren. a** Masernvirus. (EM-Aufnahme, Vergr. 150 000fach: A. Maisner, Marburg) **b** Influenzavirus-Replikationszyklus.

In der Virushülle sind die beiden integralen Glykoproteine von großer Bedeutung. Das größere der beiden ist das **Hämagglutinin** (**HA**), das die Viren zum Anheften an die Wirtszellen brauchen, die **Neuraminidase** (**NA**) sorgt für die Freisetzung der Viren aus infizierten Zellen. Die aus der Hülle herausragenden Spikes enthalten die Oberflächenantigene des Virus, gegen die sich die Immunabwehr der Wirtszellen richtet. Inzwischen gibt es 15 nachgewiesene Subtypen des Hämagglutinins und neun Subtypen der Neuraminidase, die auch zur Benennung herangezogen werden. Bekanntheit erlangte der aviäre, hoch pathogene Influenzastamm vom Typ **H5N1,** der 1997 unter Geflügelbeständen in Hongkong auftrat. Die Behörden führten eine Massentötung durch, womit die Seuche vorübergehend zum Stillstand kam. 2003 tauchte sie in Gebieten von China, 2004 in Südkorea, Thailand, Japan und Indonesien wieder auf. 2005 wurden in Russland und Kasachstan auch Infektionen bei Wildvögeln festgestellt. Über die Vogelflugrouten breiteten sich die Viren weiter aus, im Februar 2006 wurden die ersten Erreger in Europa nachgewiesen. Bis dahin waren 170 Menschen an Vogelgrippe erkrankt und 90 von ihnen daran verstorben, die engen Kontakt zu infiziertem Geflügel hatten. Die Übertragung der Erreger infizierter Menschen auf andere Menschen konnte nur in einzelnen Fällen eindeutig bestätigt werden. Der hochpathogene Stamm H5N1 hat bislang keine Pandemie hervorrufen können.

Die **antigene Variabilität** der Influenzaviren ist die Hauptursache für das alljährliche Auftreten von neuen Influenzaerkrankungen. Sie lässt es bislang unmöglich erscheinen, Influenza durch Impfung vollständig unter Kontrolle zu bekommen. Antikörper gegen das HA-Protein können eine Influenzainfektion neutralisieren. Doch Variationen im globulären Teil des HA-Proteins durch einzelne Punktmutationen helfen den Viren, der Immunantwort zu entkommen. Eine solche Antigenveränderung wird als **Antigendrift** bezeichnet. Ein wesentlich stärkerer Antigenwandel, der bei Influenza-A-Viren zum Auftreten neuer Subtypen und somit zu neuen Pandemien führt, wird als **Antigenshift** bezeichnet. Bei einer gleichzeitigen Infektion einer Zielzelle mit zwei verschiedenen Subtypen kann es beim Verpacken der viralen RNA zum Austausch von funktionell homologen RNA-Segmenten kommen, so dass neue Virustypen mit veränderten Segmentkombinationen (**Reassortment**) entstehen. Wenn der neue Virusstamm besonders virulent ist, kann er eine weltweite Pandemie auslösen und zum Tod von Millionen Menschen führen, wie es bei der „Spanischen Grippe“ 1918 der Fall war.

Mutationen im HA sind für die unterschiedliche **Pathogenität** der Virusstämme verantwortlich. Das Hämagglutinin ist verantwortlich für die Anheftung des Virus an Rezeptoren der Wirtszelle. Im Anschluss an die **Adsorption** wird das Virus in zelluläre Endosomen internalisiert. HA-Proteine bestehen aus zwei Polypeptiden, HA1 und HA2, die über Cysteinbrücken miteinander verbunden sind. Die Ansäuerung der Endosomen verursacht eine Konformationsänderung, wodurch hydrophobe Bereiche des HA2-Proteins freigelegt werden und es zu einer Interaktion bzw. Fusion der Virushülle mit der Membran der Endosomen und damit **Freisetzung der viralen Nucleocapside** in das Cytoplasma der Wirtszelle kommt. Die **Fusionsaktivität** des Hämagglutinins ist abhängig vom gespaltenen Zustand des Proteins in die beiden Polypeptide. Das HA-Glykoprotein wird während des Transportes zur Cytoplasmamembran durch eine zelluläre **Protease** gespalten. Bei den hoch pathogenen aviären Stämmen sind Protease-Schnittstellen im HA vorhanden, die von ubiquitären Proteasen erkannt werden, während humanpathogene Influenzaviren durch Trypsin-ähnliche Proteasen aktiviert werden müssen.

Zu den Viren mit **Einzelstrang-RNA von positiver Polarität** gehören die **Picornaviren**, **Flaviviren**, **Togaviren**, **Coronaviren**, die Mehrzahl der **Pflanzenviren** und die einfachen *E. coli* infizierenden RNA-Phagen (**MS2**, **Qβ**). Nach erfolgter rezeptorvermittelter Endocytose und Freisetzung der vRNA in die Zelle findet die weitere Replikation dieser Viren im Cytoplasma statt. Zunächst werden virale Proteine und virale RNA synthetisiert. Dabei kann die virale RNA direkt als mRNA eine Proteinsynthese starten und benötigt weder die Transkription noch zelluläre Enzyme. Die Translation der RNA führt zu einem großen Polyprotein, das durch virale Proteasen in Capsidproteine und funktionelle Proteine gespalten wird. Die virale RNA-Polymerase synthetisiert über Minusstrangkopien neue vRNA mit Pluspolarität. Die Plusstrang-RNA wird anschließend in das Präcapsid verpackt und nach erfolgter Reifung findet die Freisetzung der Viren statt.

2002 trat in China erstmals das Akute Atemwegssyndrom (severe acute respiratory syndrome, **SARS**) auf mit sehr plötzlich auftretendem hohen Fieber, Muskelschmerzen, Husten und Atemnot, häufig Lungenentzündungen oder Lungenversagen. SARS entwickelte sich zu einer Epidemie, bei der in über 30 Ländern 8000 Menschen erkrankten, 774 verstarben. Erst 2003 konnte dank weltweiter Infektionskontrolle die Epidemie eingedämmt werden. Als Erreger wurde ein bis dahin unbekanntes Coronavirus entdeckt. Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ist neu in der menschlichen Population und unterscheidet sich in seiner Genomsequenz wesentlich von den bisher bekannten Coronaviren. Deshalb ist nicht davon auszugehen, dass SARS durch Mutationen bzw. Rekombination aus schon bekannten humanen Coronaviren entstanden ist, die banale Infekte der oberen Atemwege verursachen. Es scheint eher so, dass ein Coronavirus mit anderer Wirtsspezifität die Fähigkeit erlangt hat, auf Menschen übertragbar zu sein. Inzwischen gilt es als sehr wahrscheinlich, dass die Fledermaus der natürliche Wirt dieses Virus ist. Spezielle Therapien gibt es bislang nicht. Ansätze bieten die Entwicklung von Proteaseinhibitoren, die die Entstehung der RNA-Polymerase hemmen oder die Spaltung des S-Proteins unterbinden sollen, bzw. die Entwicklung von Inhibitoren der Coronavirus Acetylesterase, durch die die Virusreplikation beeinträchtigt werden soll. Es wird außerdem versucht, einen Impfstoff herzustellen, der auf isoliertem S-Protein basiert.

4.2.3 Retroviren

Die **einzelsträngige RNA** der **Retroviren** besitzt **positive Polarität**. Im Gegensatz zu den Plusstrang-Viren ist die RNA jedoch **nicht infektiös**, denn die Replikation der Retroviren verläuft über eine DNA-Zwischenstufe, für die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase notwendig ist. Diese **Reverse Transkriptase** wird im Nucleocapsid des Retrovirus mitgeführt. Im Capsid sind außerdem mindestens zwei Kopien der genomischen RNA enthalten.

Die Synthese von DNA an einem RNA-Template erfordert als Enzym eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die auch als **Reverse Transkriptase** bezeichnet wird. Die Entdeckung dieses Enzyms durch die Forscher Howard Temin und David Baltimore war ein Meilenstein in der Forschung, da bis dahin der Grundsatz galt, dass der Informationsfluss immer von DNA über RNA zum Protein läuft. Doch bei

den deshalb auch so bezeichneten Retroviren verläuft mit der Übersetzung der vorhandenen viralen RNA in DNA durch die Reverse Transkriptase der Informationsfluss in umgekehrter Richtung. Mit Hilfe dieses Enzyms ist es möglich, jede RNA in die komplementäre DNA (cDNA) zu überschreiben. Das Enzym findet daher heute vielseitige Anwendung in der Gentechnik, z. B. bei der Herstellung von **DNA-Chips** zur Untersuchung des Transkriptoms einer Zelle oder zur Erzeugung eines **intronfreien Inserts**, wenn ein eukaryotisches Protein durch ein bakterielles Expressionssystem hergestellt werden soll. Durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschriebene RNA kann auch über **Polymerasekettenreaktion**, **PCR**, amplifiziert werden. ◀

4

Retroviren sind umhüllte Viren mit charakteristischen Oberflächenspikes (Abb. 4.**3**).

Nach Anheftung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle, kommt es zur Verschmelzung der Hülle mit der Zellmembran. Das Nucleocapsid wird freigesetzt und das virale Genom gelangt in das Cytoplasma (Abb. 4.**12**). Von einem der beiden RNA-Genome wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase eine einzelsträngige DNA-Kopie hergestellt. Die Reverse Transkriptase ist ebenso zuständig für den anschließenden Abbau der viralen RNA (**RNAse-H-Aktivität**) und die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Die doppelsträngige DNA wird in den Nucleus transportiert und dort in die Wirts-DNA integriert, und zwar durch

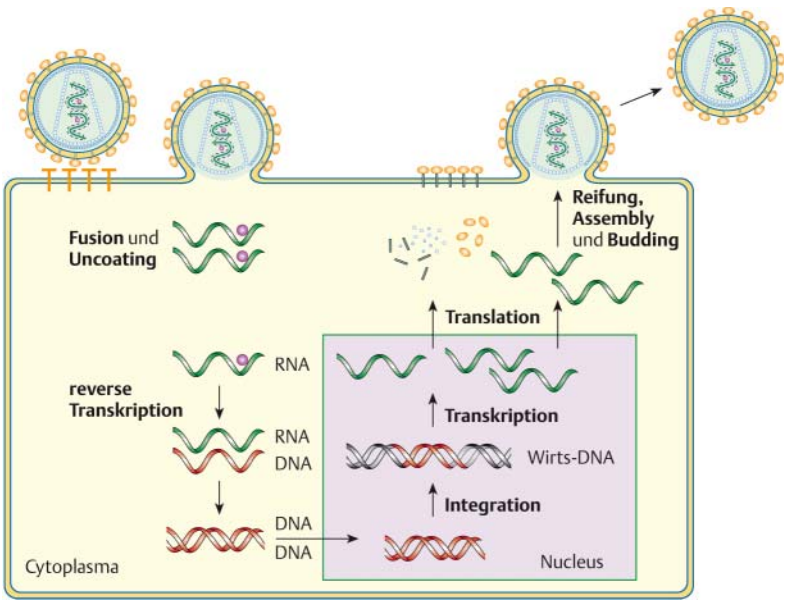


Abb. 4.**12** **Replikationszyklus von Retroviren am Beispiel von HIV.**

einen Mechanismus, der analog zur Integration von Transposons verläuft. Hierbei ist das viruseigene Enzym **Integrase** beteiligt. Einmal integriert, verhält sich die virale DNA, die jetzt als **Provirus** bezeichnet wird, als stabiles genetisches Element und kann dort **latent** verbleiben. Wenn es zur Aktivierung und Virusproduktion kommt, beginnt die Transkription durch zelluläre RNA-Polymerasen. Es werden Transkripte in voller Länge und auch kürzere gespleißte Transkripte gebildet. An den Polyribosomen entsteht durch Translation ein Polyprotein, das im weiteren Prozess durch eine viruseigene Protease in die einzelnen funktionellen Proteine geschnitten wird. Die viralen Hüllproteine lagern sich in der Zellmembran ein und markieren somit die Bereiche an denen später das Budding der Viren stattfindet.

Das **Humane-Immundefizienz-Virus** (**HIV**) gehört zur Gruppe der Retroviren und ist der Erreger des erworbenen Immundefektsyndroms (AIDS). Die bevorzugten Zielzellen dieses Virus sind aktivierte $CD4^+$-T-Lymphocyten, doch das Virus infiziert auch andere Zelltypen einschließlich Makrophagen. Man unterscheidet zwei HIV-Typen: HIV-1 und HIV-2. Obwohl es bei einer HIV-2-Infektion wesentlich später zum Ausbruch der Krankheit kommt, zeigen die beiden Virustypen ansonsten ein einheitliches Krankheitsbild. HIV-2-Infektionen sind vornehmlich in West-Afrika zu finden, während Infektionen mit HIV-1 weltweit auftreten.

Die Viruspartikel besitzen ein Nucleocapsid, das mindestens zwei Kopien der plus-RNA, die Reverse Transkriptase und die Integrase enthält. In die Virushülle sind Spikes inseriert. Sie bestehen aus dem Transmembranprotein gp41 das durch nicht kovalente Interaktionen mit dem stark glykosylierten gp120 verbunden ist. Das Matrixprotein p17 kleidet die Virushülle von innen aus. Das Virusprotein p24 ist ein Hauptbestandteil des Capsids.

Untersuchungen zeigen, dass $CD4^+$-Rezeptoren zwar notwendig sind für die Infektion, aber nicht ausreichend für das Eindringen in die Wirtszelle. Als Korezeptoren für HIV wurden Rezeptoren für Chemokine entdeckt. CCR5-Rezeptoren sind in der frühen Phase der HIV-Infektion beteiligt. Sie ermöglichen die Infektion von Makrophagen. Weitere Korezeptoren sind CXCR4, auch bekannt als Fusinrezeptor und CCR2. Sobald gp120 an $CD4^+$ bindet, findet eine Konformationsänderung statt, die zur erhöhten Affinität für den Chemokin-Rezeptor führt. Die Bindung an den Chemokin-Rezeptor verursacht eine Konformationsänderung im gp41-Fusionsprotein von HIV, wodurch die Fusion von Virusmembran und Zellmembran eingeleitet wird.

Nach **Fusion** der Virushülle mit der Wirtszellmembran und dem **Uncoating** wird von einem der beiden RNA-Genome mit Hilfe der Reversen Transkriptase eine einzelsträngige DNA-Kopie hergestellt (**Reverse Transkription**). Der Einzelstrang wird zur Doppelstrang-DNA komplettiert und in das Genom der Wirtszelle integriert (**Integration**). Das Provirus kann lange Zeit latent bleiben, ehe es aktiviert wird und die Virusbildung beginnt. Von der integrierten Virus-DNA wird durch **Transkription** mRNA synthetisiert, die im Cytoplasma **translatiert** wird und zur Produktion von Virusproteinen führt. Vom Provirus wird auch neue Virus-RNA gebildet, die später in die Viruspartikel eingebaut wird. Nachdem Zusammensetzung und **Budding** an der Cytoplasmamembran stattgefunden haben, findet eine weitere Capsidreifung außerhalb der Zelle statt. Bei diesem Reifungsvorgang wird zum einen das Vorläuferprotein „Gag“ bestehend aus Matrixprotein (p17), Capsidprotein (p24) und Nucleoprotein (p7) sowie das Vorläuferprotein „Gag-Pol“ durch die HIV-Protease gespalten.

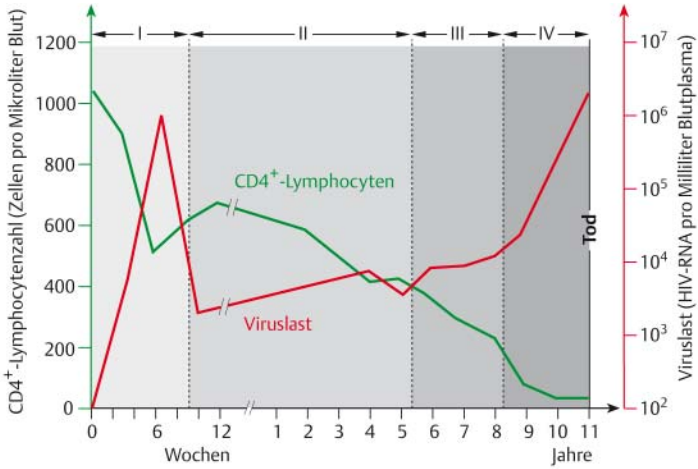


Abb. 4.**13** **Der Verlauf einer HIV-Infektion wird in 4 Phasen unterteilt.**

Der **Krankheitsverlauf** kann in vier Phasen unterteilt werden (Abb. 4.**13**). **Akute Phase:** 2–6 Wochen nach der Infektion können grippeähnliche Symptome wie Fieber, Nachtschweiß, geschwollene Lymphknoten, Übelkeit usw. auftreten. Wird das Virus über Sexualkontakt aufgenommen, so binden dendritische Zellen die mit HIV beladenen Makrophagen und transportieren sie zu den Lymphknoten. Dort werden zunächst $CD4^+$-T-Lymphocyten infiziert, später werden andere Zelltypen befallen. Der Virustiter im Blut ist sehr hoch. Die Anzahl der $CD4^+$-Zellen nimmt kurzfristig ab, erreicht aber bald einen normalen Titer. Die akute Phase dauert 4–6 Wochen. **Latenzphase:** Cytotoxische B- und T-Lymphocyten zeigen eine starke Abwehrreaktion und können das Virus fast vollständig aus der „Zirkulation" entfernen. Zwar wird in den infizierten Zellen viel Virus gebildet, doch das Immunsystem kann die Viren schnell neutralisieren. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein zwischen zerstörten und neu gebildeten T4-Lymphocyten. Ein kleiner Anteil der infizierten T-Lymphocyten bleibt jedoch als „Gedächtniszellen" erhalten und trägt das HIV als Provirus im Genom. Im Blut der Patienten ist kaum Virus nachweisbar, doch die Virusproduktion findet weiter statt in Lymphknoten, dendritischen Zellen und Makrophagen. Körperliche Symptome treten keine auf. **Aids related complex** (**ARC**): Die Zahl der $CD4^+$-Zellen nimmt rasch ab. In dieser Phase gibt es nur eine geringe spezifische Immunabwehr gegen HIV, da die spezifischen $CD4^+$-Zellen selbst infiziert werden und eine Apoptose von $CD4^+$- und $CD8^+$-Zellen eingeleitet wird. Es kommt zu Erkrankungen, die auf eine Schwächung des Immunsystems hinweisen. Charakteristisch für dieses Stadium sind chronischer Durchfall, Pilzbefall von Mund und Rachen, Nerven-Funktionstörungen, Lymphknotenschwellung und stetiger Gewichtsverlust. **AIDS** ist das Endstadium der HIV-Infektion. Die Zahl der $CD4^+$-Lymphocyten sinkt und der Virustiter steigt schnell an. Es kommt zum Auftreten von lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen: Lungenentzündung mit schwer behandelbaren Keimen (Pneumocystis), Infektionen des Nervensystem bis hin zur Hirnhautentzündung, typische Tumoren (Kaposi-Sarkom, Lymphome), ausgedehnter Pilzbefall in Luft- und Speiseröhre bzw. Lungen, Herpesinfektionen, Tuberkulose.

Die **Wahrscheinlichkeit der Übertragung** durch Bluttransfusionen oder Blutkomponenten konnte durch Spenderselektion und durch Anwendung des Anti-HIV-Tests in jeder Einzelspende sowie durch permanente Elimination aller infizierten Spender in Deutschland auf ein Restrisiko von 1:1 Mio. gesenkt werden. Die sexuelle Übertragung, heterosexuell und homosexuell, ist mittlerweile die häufigste Art der Verbreitung. Die vertikale Infektion von der HIV-infizierten Mutter auf das Neugeborene kann bei der Geburt über Blut geschehen. Die Übertragung über Stillen ist ebenfalls möglich. Eine HIV-Übertragung findet nicht über Insekten und andere Arthropoden statt. HIV wird nicht über Tröpfcheninfektion, durch Hautkontakt oder normales familiäres Zusammenleben übertragen.

Dem jährlichen UN-Aidsbericht (2005) zufolge starben bisher 25 Millionen Menschen an der Immunschwäche. Derzeit leben weltweit fast 40 Millionen Menschen mit dem Aids-Virus, davon rund 660 000 Kinder. Es gab 4,1 Millionen Neuinfektionen in 2005. Obwohl bisher kein Mittel zur Heilung gefunden werden konnte, ist es möglich geworden, die tödliche Erkrankung in eine Behandelbare zu wandeln. Erstes Ziel dabei ist es, die Vermehrung der Viren im Körper zu hemmen und so die Schwächung des Immunsystems aufzuhalten. Zur Zeit werden drei Wirkstoffklassen angewandt: Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren und Fusionsinhibitoren. Da das Virus schnell Resistenzen gegenüber einzelnen Medikamente entwickelt, setzt man zur Bekämpfung von HIV eine dreifach **Kombinationstherapie** ein, die „hochaktive antiretrovirale Therapie“ (HAART). Diese besteht aus Inhibitoren der Reversen Transkriptase und Proteaseinhibitoren.

Retroviren können Gene besitzen, die nach Integration in die chromosomale DNA, Tumoren induzierende Wirkung zeigen, sogenannte onc-Gene oder **Onkogene**. Klassisches Beispiel eines transformierenden Virus ist das Rous-Sarkom-Virus (Abb. 4.**3**), das beim Huhn Sarkome erzeugt. Für die Tumorentstehung wird das *src*-Gen verantwortlich gemacht. Das Genprodukt ist eine Tyrosin-Kinase, die zelluläre Proteine phosphoryliert und dadurch das Zellwachstum beeinflusst.

Man konnte nachweisen, dass virale **onc-Gene** zellulären **Ursprungs** sind. Onc-Gene kommen in den Genomen aller höheren Tierarten vor. Die Funktion ihrer Genprodukte in der Zelle ist vielfältig und häufig mit der **Regulation des Zellwachstums** verbunden. Die zellulären onc-Gene sind an sich nicht onkogen, weil ihre Expression aufgrund ihres krebserzeugenden Potentials normalerweise streng reguliert wird. Im Laufe der Evolution müssen die zellulären onc-Gene in das Genom der Retroviren gelangt sein. Man nimmt an, dass Retroviren in unmittelbarer Nähe zum zellulären onc-Gen integriert worden sind. Bei der Replikation ist dann das virale Genom mitsamt dem zellulären onc-Gen transkribiert und in das Virus verpackt worden. Die onc-Gene der Viren haben sich unabhängig von den zellulären Genen weiterentwickelt, so dass die viralen onc-Gene (onc^v) und die zellulären onc-Gene (onc^c) nicht mehr identisch sind, im oben genannten Beispiel unterscheidet sich das virale src-Genprodukt in einer einzigen Aminosäure von der zellulären Tyrosin-Kinase. Gelangt ein solches verändertes onc-Gen zusammen mit dem restlichen retroviralen Genom in das Wirtsgenom, entfaltet es unter dem Einfluss der viralen Steuerelemente seine **onkogene Wirkung**. Aber auch Retroviren, deren Genome keine Onkogene enthalten, können tumorinduzierend wirken, wenn z. B. das virale Genom in direkter Nachbarschaft eines zellulären onc-Gens integriert und das zelluläre onc-Gen unter dem Einfluss starker viraler Promotoren dauerhaft verstärkt exprimiert wird (📖 *Genetik*) oder im Verlauf der Virusreplikation gebildete virale Proteine direkt die Transkription bestimmter zellulärer Gene aktivieren. Auf diesem Mechanis-

mus beruht die Entstehung bestimmter **Leukämien** durch das **Humane T-Zell-Leukämie-Virus**. Retroviren scheinen aber ansonsten für die Tumorentstehung beim Menschen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Auch DNA-Viren werden in kausalen Zusammenhang mit bestimmten menschlichen Tumoren gebracht, z. B. das **Humane Papillomaviren** mit **Zervixkarzinom**, **EBV** (**Epstein-Barr-Virus**), mit **Burkitt-Lymphom** oder **HBV** mit **Leberzellkarzinom**. Die onkogene Wirkung der DNA-Viren beruht auf der direkten Inaktivierung bestimmter zellulärer Proteine, sogenannter Tumorsuppressorproteine, durch virale Regulatorproteine, deren physiologische Funktion darin besteht, unkontrolliertes Zellwachstum zu verhindern.

4.2.4 Viroide und defekte Viren

Viroide wurden zuerst bei Untersuchungen der Spindelknollenkrankheit an Kartoffeln beobachtet. Das infektiöse Agens verhielt sich ähnlich wie ein Virus, konnte aber nicht durch Ultrazentrifugation pelletiert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich um **nackte RNA** ohne weitere Hüllproteine handelt. Die infektiöse RNA der Viroide ist ein **ringförmig geschlossener Einzelstrang** und besteht aus 250–400 Nucleotiden. Komplementäre Sequenzen ermöglichen Basenpaarungen innerhalb kurzer Bereiche, an die sich unpaare Regionen anschließen. Die Enden werden von kleinen unpaaren Loops gebildet. Die RNA codiert nicht für Proteine und wird nicht von einem Capsid umschlossen. Während der Infektion wird das RNA-Molekül repliziert und interferiert mit dem Nucleinsäurestoffwechsels des Wirtes. Es kommt zur Verfärbung der Blätter und Früchte sowie verlangsamtem Wachstum und Fehlbildung der Pflanze.

Defekte Viren sind nicht im Besitz der gesamten Gene, die für einen kompletten Infektionszyklus notwendig sind. Viele der defekten Viren weisen Deletionen auf. Diese entstehen oft im Verlauf der Replikation aus Wildtypviren, wenn es z. B. zum Übergreifen der Nucleinsäurepolymerase auf ein anderes Template kommt. Aufgrund der Deletionen benötigen defekte Viren ein weiteres Virus, das sogenannte **Helfervirus**, das die fehlenden Funktionen bereitstellt. Trotz des Helfervirus muss ein defektes Virus, wenn es vermehrt werden soll, mindestens noch folgende Funktionen besitzen: Signale für die Polymerase, zur Replikation des Genoms und Verpackungssignale am Genom. Defekte Viren konkurrieren mit dem Helfervirus bei der Vermehrung um Replikationsapparat, Hüllproteine und Capsidproteine. Daher fällt die Replikation der Helferviren meistens weniger effektiv aus als ohne Anwesenheit eines defekten Virus (Partikel). Man bezeichnet dieses Phänomen als Beeinträchtigung (interference) und diese defekten Partikel als **Defective Interfering Particles** (DI particles). In vitro können defekte Viren zur Etablierung persistenter Infektionen, zur Beeinträchtigung des Virustiters und zur Eliminierung replizierender Viren führen.

Defekte Viren, die nicht durch spontane Mutationen auftreten, sondern prinzipiell einen defekten Zustand besitzen, werden als **Satellitenviren** bezeichnet. Hierzu gehört das Hepatitis-D-Virus, das nur zusammen mit dem Hepatits-B-Virus als Helfervirus repliziert.

4.2.5 Prionen

Prionen sind infektiöse Proteine (protein infectious agent, PrP). Früher wurden Erkrankungen wie **Scrapie** bei Schafen, Gehirnerkrankungen von Nerzen und Rinderwahn (BSE) den langsam verlaufenden Viruserkrankungen zugeordnet. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass diese neue Art der Infektion durch falsch gefaltete Proteine, Prionen, hervorgerufen wird. Bei Menschen sind es die Kuru-Krankheit und die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD), die durch Prionen verursacht werden. Bei der Creutzfeld-Jakob-Krankheit kann die **falsche Proteinfaltung** auch genetisch bedingt sein. All diesen Krankheiten ist gemeinsam, dass eine lange Inkubationszeit vorausgeht, es zur Degeneration des Gehirns kommt, eine **spongiforme Encephalopathie** auftritt mit **Vakuolenbildung** und Ablagerungen von fibrillären Aggregaten, die PrP^{sc} enthalten. Die Erkrankung verläuft in allen Fällen tödlich.

Das erste Prion wurde im Zusammenhang mit Scrapie bei Schafen charakterisiert (**PrP^{sc}**). Das physiologische Protein (**PrP^{c}**) wird von einem zellulären Gen codiert, es ist an der Zellmembran über einen **Glykosylphosphatidylinositol-** (**GPI**)**-Anker** gebunden. Die höchste Expressionsrate findet man in Neuronen. PrP^{c} ist bei den meisten der bislang untersuchten Tierspezies zu finden. Doch Versuche mit Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass es nicht essentiell ist. Man vermutet, dass das Protein bei der synaptischen Funktion, aber auch bei der Schlafregulation und der Regulation des Immunsystems eine Rolle spielt. Das Protein kommt vor allem auf der Zelloberfläche vor und schützt die Zelle vor freien Radikalen. Neueste Forschungsergebnisse diskutieren auch eine Bedeutung der Prionen bei der Neurogenese.

PrP^{c} und das pathologische Protein (PrP^{sc}) haben die gleiche Aminosäuresequenz und die gleichen post-translationalen Modifikationen. Sie besitzen jedoch eine unterschiedliche Konformation. Die normale Form enthält einen großen Anteil an α-Helices während dieser bei PrP^{sc} in der **β-Faltblattstruktur** vorliegt (📖*Biochemie*, *Zellbiologie*). Das so veränderte Protein polymerisiert und kann in der Zelle nicht mehr abgebaut werden. PrP^{sc} wirkt als **Matrize** und drängt dem physiologischen Protein seine β-Faltblattstruktur auf. Unklar ist dabei, ob Chaperone (📖*Genetik*) an der Umwandlung beteiligt sind. So kommt es zu einer Art Kettenreaktion, bei der große Mengen falsch gefalteter Proteine entstehen.

PrP^{sc} verursacht weder die Bildung einer zellulären noch die Bildung einer humoralen Antwort. Der Grund hierfür ist bislang unbekannt. Prionen sind gegenüber äußeren Einflüssen sehr stabil. Sie sind unempfindlich gegenüber UV- und Gammastrahlen sowie Hitze und herkömmlichen Desinfektionsmitteln. Feuchte Hitze wird noch immer als die effektivste Methode zur Inaktivierung betrachtet (S. 281).

DNA-Viren: Geringe Mutationsrate, Fehlerkorrekturfunktion, Rekombination möglich, zirkulärer oder linearer DNA-Strang.
Polarität: Die Polarität von Einzelstrang-Viren kann plus oder minus sein. Ausnahme ist die ambisenseRNA mit Plus- und Minuspolarität.
RNA-Viren: RNA bildet komplexe Raumstruktur, Enzymfunktion möglich, hohe Mutationsrate, keine Fehlerkorrekturfunktion, bei segmentiertem Genom ist Reassortment möglich.
Retroviren: Einzelsträngige RNA-Viren mit positiver Polarität, Replikation läuft über DNA-Zwischenstufe ab, Integration in das Wirtsgenom.
Provirus: Virale DNA wird mit Hilfe der Integrase in das Wirtsgenom integriert und verbleibt dort als latent bis zur Aktivierung.
Reverse Transkriptase: Enzym, das von einer RNA eine einzelsträngige DNA-Kopie herstellt, der RNA-Strang wird dabei abgebaut (RNAseH-Aktivität) und der komplementäre DNA-Strang synthetisiert.
onc-Gene (Onkogene): Retrovirale Gene, die nach Integration in die chromosomale DNA Tumoren induzieren können.
Viroide: Infektiöses Agens bei Pflanzen, ringförmig geschlossene Einzelstrang-RNA, keine Hüllproteine.
Defekte Viren: Besitzen kein komplettes Genom, sind bei der Vermehrung auf Helferviren angewiesen.
Satellitenviren: Defekte Viren, die nicht spontan sondern prinzipiell in einem defekten Zustand auftreten. Sie benötigen zur Vermehrung ein Helfervirus.
DI particles (defective-interfering-particles): Defekte Viren, die das Wachstum des Helfervirus auf verschiedenen Art beeinträchtigen.
Prionen (protein infectious agent): Infektiöse Proteine (PrP^{sc}) verursachen spongiforme Encephalopathien, indem sie den intakten zellulären Proteine (PrP^{c}) die eigene falsche Faltung aufdrängen. PrP^{sc} wirken dabei wie eine Matrize.

4.3 Strategien der Virusinfektion

Sowohl bei Menschen und Tieren als auch bei Pflanzen gibt es Beispiele für **generalisierte Infektionen**, die sich im ganzen Organismus ausbreiten und Beispiele für **lokalisierte Infektionen**. Bei der Vermehrung von Phagen werden zwei Arten der Infektionen unterschieden: **lytische** und **lysogene Infektionen**. Dauerhafte Infektionen können unbemerkt bleiben (latent) oder aber persistent und produktiv sein. Es gibt verschiedene Übertragungswege für eine Virusinfektion: Neben dem **direkten** oder **indirekten Kontakt** können auch Vektoren als Überträger in Betracht kommen.

Der Begriff der **Virusinfektion** bezeichnet das Eindringen eines Virus in eine Zelle. Nach dem Eindringen kann die Interaktion von Virus und Zelle im **tierischen Organismus** zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen führen: Das Virus vermehrt sich rasch und effizient in der Wirtszelle. Es kommt zur Produktion großer Virus-

mengen, der Zellmetabolismus verändert sich dabei derart, dass es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Wirtszelle und zum Zelluntergang kommt (**cytopathischer Effekt**). Man bezeichnet diese Art der Virusinfektion als **lytischen Infektionszyklus** und die Viren entsprechend als cythopathogene Viren (z. B. Herpes-simplex-Viren, Pockenviren). Bei der **nicht lytischen Infektion** verursachen die Viren keine direkten Zellschäden. Die Zelle ist in ihrer Funktion wenig gestört und neu gebildete Viren werden nach und nach teilweise über einen langen Zeitraum hinweg über **Exocytose** oder Budding freigesetzt. Die Zellschädigung tritt erst durch die Immunabwehr ein: Cytotoxische T-Zellen erkennen die viralen Epitope auf der Zellöberfläche und eliminieren die infizierten Zellen z. B. bei Infektionen mit Hepatitis-B-Virus oder Rötelnvirus.

Im weiteren Verlauf kann eine Virusinfektion entweder auf ein bestimmtes Organsystem innerhalb des Organismus beschränkt bleiben oder in unmittelbarer Nähe der Eintrittsstelle im Wirtsorganismus stattfinden. Eine solche **lokalisierte** Infektion steht im Gegensatz zu einer Virusvermehrung, die sich auf den ganzen Körper ausbreitet und zu einer **generalisierten** bzw. **systemischen** Infektion führt. Bei der generalisierten Infektion von Menschen und Tieren findet der Transport der Viren über den Blutweg, das lymphatische System oder über Nervenbahnen statt.

Das **Papillomavirus** ist ein typisches Beispiel für **lokalisierte** Infektionen. Es kommt zur Bildung von **Warzen** oder Papillomen in der Epidermis der Haut in unmittelbarer Nähe zur Eintrittsstelle. Bei **Influenzaviren** ist die Infektion auf einen bestimmten **Bereich**, den Respirationstrakt, beschränkt. Die Infektion beginnt im Flimmerepithel des oberen Respirationstraktes und breitet sich dann auf Tracheen und Bronchien aus.

Ein Beispiel für eine **generalisierte** Infektion ist das **Pockenvirus**, ein für den Menschen hochpathogenes Virus. Eintrittspforte für das Pockenvirus ist der Nasen-Rachenraum. Das Virus wandert in das umliegende lymphatische Gewebe. Viruspartikel breiten sich auf Leber, Milz und Lunge aus und vermehren sich dort. Es folgt eine zweite Ausbreitung über die **Blutbahn**, eine Lokalisation in den Schleimhäuten und schließlich in der Haut. Dort kommt es zur Bildung der typischen „Pocken". Das **Tollwutvirus** vermehrt sich zunächst an der Eintrittspforte im Muskel und Bindegewebe. Anschließend findet ein Übergang auf **periphere Nerven** statt und ein retrograder Transport zum Zentralen Nervensystem. Dort kommt es zur eigentlichen Virusvermehrung, die zu massiven pathologischen Schäden führt. Später wandert das Virus in die Speicheldrüsen und andere Organe, wodurch die Virusübertragung ermöglicht wird.

Eine Infektion kann in eine dauerhafte, **chronische Infektion** übergehen. Chronische Infektionen verlaufen **persistierend**, d. h. je nach Kontrolle durch das Immunsystem mit permanenter Virusbildung in unterschiedlichen Mengen oder latent ohne Virusausbildung. Bei der **latenten Infektion** ist zwar das intakte Virusgenom in der infizierten Zelle vorhanden, doch es werden keine neuen Viren gebildet. Folglich bleibt auch eine Schädigung der Wirtszelle aus. Die Latenz kann auch als „virale Überlebensstrategie" bezeichnet werden, denn die betroffenen Viren entgehen so der Abwehr durch das Immunsystem. Eine Latenz kann sich auf unterschiedliche Weise etablieren: Bei den Herpesviren liegt das

Genom als zirkuläres Molekül in mehreren Kopien im Zellkern vor und wird als **Episom** bezeichnet. Bei der Teilung der Wirtszelle werden die Episome mit amplifiziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Unter bestimmten Umständen kann der virale Vermehrungszyklus aktiviert werden, es kommt zur Bildung und Freisetzung von Viren. Das virale Genom bleibt bei diesem Vorgang erhalten und kann in den latenten Zustand wieder übergehen.

Das **Herpesvirus Typ 3** verursacht **Windpocken**. Dabei vermehrt sich das Virus in den Lymphknoten, in der Milz und Leber sowie in Hautzellen. Nachdem die akute Infektion vorbei ist, bleibt das Virus in den Ganglien der sensiblen Nervenzellen zurück. Nach vielen Jahrzehnten kann die latente Infektion in den Ganglien durch verschiedenste Faktoren wie starke Sonnenbestrahlung, psychische Faktoren, Stoffwechselkrankheiten oder weitere unbekannte Faktoren beendet werden und das Virus wird wieder zur Vermehrung angeregt. Es kommt zur Ausbildung des Herpes Zoster (**Gürtelrose**).

Bei den Retroviren ist das virale Genom in das Wirtszellgenom integriert und wird als **Provirus** bezeichnet. Entsprechend der zelleigenen Gene wird das Provirus an die Tochterzellen weitergegeben. Intrazelluläre Veränderungen können auch hier die Latenzphase beenden und zur Virusproduktion führen.

Das Eindringen von Viruspartikeln in das Cytoplasma einer **Pflanzenzelle** verläuft anders als bei tierischen Organismen. Hier müssen massive Schutzgewebe überwunden werden. Weder spezifisch lysierende Enzyme noch Rezeptoren sind daran beteiligt. Pflanzenviren benutzen ausschließlich Wunden als Eintrittspforte. Solche Wunden entstehen zum Beispiel durch Pflanzenschädlinge, Verwundungen durch Kulturmaßnahmen des Menschen oder durch das natürliche Wurzelwachstum. Die **lokalen Symptome** nach dem Eindringen von Viren in die Zelle sind Flecken, Ringe oder auch konzentrische Ringe und Linien, die sich vor allem auf den Blattflächen der Pflanzen finden. Die infizierten Zellen sterben ab und hinterlassen Nekrosen. Die Größe der Läsionen ist von deren Anzahl abhängig. Je mehr Läsionen auf einem Blatt vorhanden sind, desto kleiner ist die einzelne Läsion. Viren, die solche Symptome hervorrufen sind beispielsweise ***P**runus **n**ecrotic **r**ingspot **v**irus* (PNRSV) oder ***I**ris **y**ellow **s**pot **v**irus* (IYSV).

Bei Pflanzen tritt eine **generalisierte Infektion** wesentlich häufiger auf als eine lokale Infektion. Die Ausbreitung des Virus erfolgt über Plasmodesmen (📖*Biochemie, Zellbiologie*) und Leitbündel (📖*Botanik*). Die Symptome einer generalisierten Infektion sind Wachstumsstörungen, Chlorosen (Vergilbungen), Verwelken und abnorme Entwicklungen von Blättern und Früchten. Generalisierte Infektionen der Pflanzen führen immer zu **wirtschaftlichen Verlusten** bei der Ernte. Das Tabakmosaikvirus (TMV), eines der klassischen Beispiele der Virusforschung, verursacht mosaikartige Schädigungen der Gewebe und führt zur Erkrankung der Tabakpflanze.

Bei der Vermehrung von **Bakteriophagen** in Prokaryoten werden zwei Arten der Infektionen unterschieden: lytische Infektionen und lysogene Infektionen. **Lytische Infektionen** werden zum Beispiel von *E. coli* infizierenden T2- oder T4-Phagen verursacht. Der Phage vermehrt sich in der Wirtszelle, bringt diese

zum Platzen (Lyse) und ermöglicht somit die Freisetzung zahlreicher reifer Phagenpartikel.

Lysogene Infektionen werden durch sogenannte **temperente Phagen** verursacht, zu denen der Phage Lambda gehört. Infiziert der Phage *E. coli* K12-Zellen, so findet weder eine Vermehrung noch eine Lyse statt. Die lysogenen Zellen zeigen keine Anzeichen einer Infektion. Bei temperenten Phagen wird die DNA in das Bakterienchromosom integriert und bei der Zellvermehrung ebenfalls dupliziert, so dass alle Nachkommen wiederum lysogen sind. Durch äußere Einflüsse (UV-Strahlung), selten jedoch spontan, kann es bei dem integrierten Phagen (**Prophagen**) zu einer Ausgliederung kommen, die eine Vermehrung und Freisetzung infektiöser Phagen zur Folge hat.

Temperente Phagen sind deshalb von Bedeutung, weil sie den Phänotyp der lysogenen Zelle verändern können. Epsilon-Phagen verändern die aus Lipopolysacchariden (LPS) bestehenden Oberflächenantigene der Wirtszelle und somit deren Antigenität. LPS Moleküle bilden außerdem die Rezeptoren für Epsilon-Phagen auf der Wirtszelle. Durch die Veränderung der eigenen Rezeptoren nach Infektion von *Salmonella*, verhindern sie einen Befall der Zelle mit weiteren Phagen. Die Entstehung einer Immunität gegen weitere Phagen beruht bei den meisten Prophagen jedoch auf der Bildung eines cytoplasmatischen Repressorproteins, das die Vermehrung vegetativer Phagen verhindert. Des Weiteren verhindert dieses Protein die Ausgliederung des Prophagen und unterstützt den Ablauf einer lysogenen Infektion.

Eine andere Art der Veränderung, die durch temperente Phagen verursacht wird, ist die **pathogene Konversion**. Das Diphtheriebakterium (*Corynebacterium diphtheriae*) führt durch die Bildung eines starken Toxins zur Erkrankung des Pharynx. Die bakteriellen Stämme, die **Diphtherie** verursachen, sind alle mit einer Gruppe von **β-Phagen** infiziert. Diese Phagen tragen das *tox*-Gen für das Diphtherie-**Toxin** auf ihrem Phagen-Genom. Stämme, die nicht mit diesen Phagen infiziert sind, verursachen keine Diphtherie. Solche pathogenen Phagen-Konversionen scheinen recht häufig zu sein. Weitere Beispiele finden sich bei den Erregern von Botulismus und Scharlach.

Lokale Infektion: Infektion in unmittelbarer Nähe zur Eintrittstelle oder Beschränkung der Infektion auf ein bestimmtes Organsystem (z. B. Respirationstrakt).
Generalisierte Infektion: Virusvermehrung breitet sich auf den ganzen Organismus aus. Der Transport der Viren findet über Blutbahn, Lymphe oder Nerven statt, bei Pflanzen über Plasmodesmen und Leitbündel.
Lytische Infektion: Die rasche und effiziente Virusvermehrung in der infizierten Zelle führt zum Absterben der Zelle, und damit zur Freisetzung der Viruspartikel.
Latente Virusinfektion: Das intakte Virusgenom ist in der Zelle vorhanden als Provirus oder Episom, doch es findet, solange keine Reaktivierung erfolgt, keine Virusbildung statt.

Lysogene Infektionen: Werden durch temperente Phagen verursacht, die sich in das Genom der Wirtszelle integrieren. Die Zellen zeigen keine Anzeichen einer Infektion.
Temperente Phagen: Integrieren ihre DNA in das Bakteriengenom (Prophage). Bei der Zellvermehrung wird die Phagen-DNA ebenfalls dupliziert.
Pathogene Konversion: Bakterien können durch temperente Phagen in ihren pathogenen Eigenschaften verändert werden.

4.4 Methoden zum Nachweis von Viren

Der Nachweis von Viren kann mit **elektronenmikroskopischen Methoden** erfolgen. **Zellbiologische Systeme**, die virusbedingte cytopathische Effekte oder Läsionen aufweisen, sind für einen raschen Virusnachweis geeignet. Der Hämagglutinationstest kann bei Viren eingesetzt werden, die Erythrocyten binden. Zur Bestimmung der Infektiosität von Viren eignen sich Plaque-Tests oder Endpunkttitration. Zu den häufig verwendeten **molekularbiologischen** Nachweismethoden zählen gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-/DNA-Segmenten, Nucleinsäuresequenzierung, Hybridisierung und PCR. Als **immunologisches** Nachweisverfahren wird vor allem der Festphasenimmunassay verwendet.

4.4.1 Elektronenmikroskopische Nachweisverfahren

Viren können aufgrund ihrer Größe nur mit Hilfe des **Elektronenmikroskops** sichtbar gemacht werden (📖*Zellbiologie, Biochemie*). Am häufigsten wird dabei Phosphorwolframsäure als Kontrastmittel verwendet. Zur Darstellung der Oberflächenstruktur dient die **Rasterelektronenmikroskopie**. In der **Immunelektronenmikroskopie** wird das Virus von markierten Antikörpern erkannt. Die Antikörper erhalten als Marker elektronendichtes Material wie Gold. Im Elektronenmikroskop kann auch die Anzahl der Viruspartikel eindeutig bestimmt werden. Zur Virussuspension wird das gleiche Volumen einer Latexsuspension mit bekannter Konzentration gegeben. Im Elektronenmikroskop werden die Latexpartikel und die Viruspartikel, die zu einem Tropfen gehören, gezählt. Aus dem Verhältnis Latexpartikel zu Viruspartikel kann man die Gesamtkonzentration der Virussuspension errechnen. Die Elektronenmikroskopie ist zwar eine schnelle Methode zum Nachweis von Viren, aber sie ist apparativ aufwendig und setzt eine entsprechend hohe Konzentration an Viruspartikeln voraus.

4.4.2 Zellbiologische Nachweisverfahren

Um effektiv und rasch Viren nachweisen zu können, sind **zellbiologische Systeme** gut geeignet, die einen **cytopathischen Effekt** (**CPE**) kurz nach der Infektion aufweisen. Primäre Zellkulturen sind hierbei am effektivsten. Die Virusinfektion kann über den erregerspezifische CPE oder einen Immunfluoreszenztest mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Frisch angelegte, primäre Zellkulturen stehen oft nicht zur Verfügung. Daher verwendet man sekundäre Kulturen, die bereits mehrere Passagen hinter sich haben. Ist die Anzahl der Passagen jedoch zu hoch, so zeigen die meisten Zellkulturen so viele Degenerationsdefekte, dass sie nicht mehr für die Virusisolierung eingesetzt werden können. Stabiler sind permanente Zelllinien, die man aus Tumorgewebe isoliert hat.

Neben dem qualitativen Virusnachweis ist es oft auch erforderlich, eine **quantitative Bestimmung** der Viruspartikel durchzuführen. Unter den tierpathogenen Viren gibt es viele, die Erythrocyten agglutinieren. Diese Eigenschaft ermöglicht einen schnellen und einfachen Test zur Titration von Viren, den **Hämagglutinationstest** (Abb. 4.**14**).

Der **Hämagglutinationstest** ist zwar ein sehr schneller, jedoch nur ein relativer Test, um die Anzahl der Viruspartikel zu bestimmen. Aufgrund der enormen Größendifferenz zwischen Erythrocyt und Virus kann ein Viruspartikel maximal zwei Erythrocyten binden. Übersteigt die Anzahl der Viren die Anzahl der Erythrocyten,

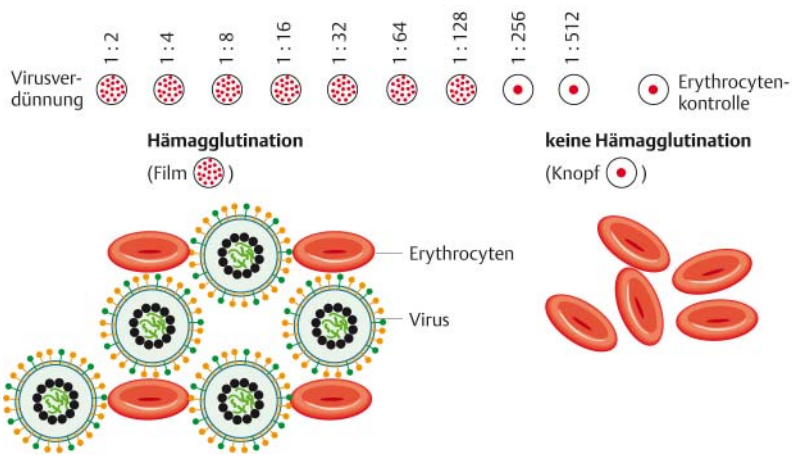


Abb. 4.**14** **Hämagglutinationstest.** Nicht agglutinierte, sedimentierte Erythrocyten bilden einen Knopf am Boden der Vertiefung der Mikrotiterplatte. Die gleichmäßig verteilten agglutinierten Zellen (Film) sind bis zu einer Verdünnung von 1:128 zu sehen, d. h. der Titer der Virusprobe beträgt 128 Hämagglutinationseinheiten. Die Erythrocytenkontrolle enthält kein Virus: Die Zellen setzen sich ab und bilden einen Knopf.

werden die Erythrocyten vernetzt, bilden ein Gitter und ergeben das typische Hämagglutinationsmuster. Ist jedoch die Anzahl der Zellen höher als die Anzahl der Viren, findet keine Vernetzung und somit keine Hämagglutination statt. Von der zu quantifizierenden Virussuspension wird eine Verdünnungsreihe in Zweier-Potenzen hergestellt. Zu den einzelnen Verdünnungen wird ein definiertes Volumen einer Erythrocytensuspension gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde haben sich die nicht agglutinierten Zellen als Knopf am Boden der Vertiefung abgesetzt. Agglutinierte Zellen bilden einen dünnen Film über dem Boden. Der Titer wird als Kehrwert der größten Verdünnung definiert, die noch Hämagglutination verursacht. ◀

Wird in einer Probe die Anzahl der Viruspartikel durch einen Hämagglutinationstest bestimmt, so wird nicht zwischen infektiösen und nicht infektiösen Viruspartikeln unterschieden. Im Plaque-Test dagegen wird nur die Anzahl der infektiösen Viruspartikel bestimmt.

▶ Der **Plaque-Test** wurde ursprünglich für Bakteriophagen entwickelt, er ist einfach, sehr genau und von hoher Reproduzierbarkeit (Abb. 4.**15**). Die phagenhaltige Probe wird mit einer flüssigen Bakterienkultur und geschmolzenem Agar gemischt und auf einer Kulturschale mit entsprechendem Nähragar ausgesät. Die Bakteriophagen diffundieren durch den Agar, treffen auf ein Bakterium und infizieren es. Das Bakterium lysiert nach einiger Zeit und setzt zahlreiche reife Phagen frei, die wiederum neue Bakterien in unmittelbarer Nachbarschaft infizieren. Bakterien, die nicht infiziert werden, wachsen zu einem dichten Zellrasen aus. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag erscheinen die lysierten Bereiche als transparente Plaques und heben sich vom trüben Hintergrund ab. Das Ergebnis dieses Tests wird in „Plaque bildenden Einheiten" angegeben (**p**laque **f**orming **u**nits, pfu). Dieser Test kann auch mit tierpathogenen Viren durchgeführt werden, wobei die Bakterien durch Zellkulturen ersetzt werden. ◀

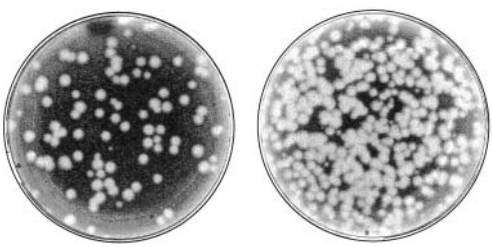


Abb. 4.**15** **Plaque-Test.** Zellkulturschalen mit MDCK-Zellen (**m**adin **d**arby **c**anine **k**idney) wurden mit 1 ml einer Influenza A-Virus-Suspension in der Verdünnung von 10^{-5} bzw. 2×10^{-6} infiziert. Die infizierten Kulturen wurden mit Agar-haltigem Medium zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Anfärbung des Zellrasens wurde die Kulturschale über Nacht mit Kristallviolettlösung gefärbt. Auf den Abbildungen können ca. 90 bzw. 450 Plaques gezählt werden. Die pfu/ml ergeben sich aus der Anzahl der Plaques pro ml mal dem reziproken Wert der Verdünnungsstufe. Für die Titerberechnung gilt: Bei einer Verdünnung von 2×10^{-6} wurden ca. 90 Plaques erhalten. Die unverdünnte Ausgangslösung enthält somit $90/2 \times 10^{-6} = 4{,}5 \times 10^{7}$ pfu/ml. (Aufnahme: R. Wagner, Marburg)

In der Pflanzenvirologie wird der **Biotest** als empfindliche Nachweismethode von Viren eingesetzt. Dies ist ein Test mit einer zumeist mechanischen Übertragung von Viren auf Pflanzen. Das Auftreten von virusspezifischen Symptomen an der Pflanze dient als Virusnachweis.

Zur Durchführung eines **Biotests** werden zunächst verdächtige virushaltige Blätter in Puffer zerrieben. Die Blätter der Versuchspflanze werden an ihrer Oberseite durch ein Schleifmittel verletzt, damit die mechanische Barriere der Pflanze (Cuticula, Zellwand) überwunden werden kann. Als Schleifmittel wird üblicherweise Karborundum oder Diatomeenerde eingesetzt. Möglichst junge und Symptome zeigende Blätter werden ausgewählt, da die Viruskonzentration später an diesen Stellen am höchsten ist, und mit Virussuspension eingerieben. Bei positivem Befund erscheinen nach zwei bis vierzehn Tagen je nach Virus-Wirt-Kombination auf den Pflanzen virusspezifische Symptome. Als Testpflanzen werden leicht kultivierbare Spezies verschiedener Familien ausgewählt, wobei eine Spezies davon der virusverdächtigen Pflanzenprobe verwandt sein sollte. Wird im Biotest das Virus einer infizierten Kartoffelpflanze untersucht, so bieten sich als Testpflanzen verschiedene Tabaksorten oder auch Petunien an, die wie die Kartoffel zu den Nachtschattengewächsen gehören. Manche Arten zeigen ein breites Wirtsspektrum und werden von besonders vielen unterschiedlichen Viren infiziert.

Die Bestimmung der Infektiosität von cytopathogenen Viren, die weder Plaques noch Läsionen bilden, kann durch die **Endpunkttitration** erfolgen. Aus einer Verdünnungsreihe wird jede Verdünnungsstufe in mehrere Kulturen inokuliert. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird die Anzahl der infizierten und gesunden Versuchsansätze bestimmt. Kulturen, die mit der geringsten Verdünnung infiziert wurden, sollten alle Anzeichen einer Infektion zeigen, während Kulturen, denen die höchst Virusverdünnung inokuliert wurde, gesund sein sollten. Für das Ergebnis des Versuches ist die höchste Verdünnung von Bedeutung, die mindestens 50 % der Wirtszellkulturen infiziert. Diese Verdünnung wird als **Letale Dosis** ($\mathbf{LD_{50}}$) oder **Infektiöse Dosis** ($\mathbf{ID_{50}}$) bezeichnet. Der Nachteil dieses Infektiositätstests ist, dass man eine große Anzahl an Testkulturen bzw. Organismen benötigt.

4.4.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Bei manchen RNA-Viren wird eine **gelelektrophoretische Analyse** von RNA-Segmenten durchgeführt. Die Analyse der Segmentprofile ermöglicht im Falle der Rotaviren eine virusstammspezifische Zuordnung. Bei DNA-Viren wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen die Nucleinsäure zunächst in Fragmente zerlegt und anschließend durch Gelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Die **Nucleinsäuresequenzierung** ist ein weiteres Nachweisverfahren für Viren. Es gibt verschiedene Methoden, doch erfolgt die Sequenzierung immer ausgehend von der DNA, sodass RNA-Moleküle zunächst durch Reverse Transkriptase in DNA überschrieben werden müssen. Ein Abgleich mit Gendatenbanken macht die Zuordnung der Sequenzen möglich.

Durch **Hybridisierung** werden bestimmte Nucleotidsequenzen in einer DNA-Probe nachgewiesen (*Genetik*). An eine zur gesuchten Nucleotidsequenz komplementäre DNA wird ein Markermolekül angehängt. In der Hybridisierungsreaktion lagert sich die sogenannte „Gensonde" an die gesuchte virale Nucleinsäure und macht sie sichtbar. Die **Polymerasekettenreaktion** (**PCR**) (*Genetik*) findet u. a. in der medizinischen Diagnostik ihre Anwendung, um Virusstämme zu charakterisieren, um Impfvirus vom entsprechenden Wildtyp zu unterscheiden, um HIV-DNA im Blut von infizierten Patienten nachzuweisen oder um Hepatitis-B-DNA im Serum zu bestimmen.

4.4.4 Immunologische Nachweisverfahren

Es gibt eine Reihe **immunologischer Nachweisverfahren** für Viren. Mit Hilfe von **Antiseren** oder **monoklonalen Antikörpern** lassen sich Viren oder virale Proteine bestimmen. Die spezifischen Antikörper können zwischen verschiedenen Stämmen und Subtypen unterscheiden. Bei den Antigennachweisen werden häufig **Festphasenimmunassays** verwendet. Mit Hilfe trägerfixierter Antikörper wird das gesuchte Antigen aus der Probenflüssigkeit immunadsorbiert. Als Trägermaterial dienen Mikrotiterplatte oder (Mikro-) Kunststoffkügelchen. Anschließend wird mit einem markierten Antikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, überschichtet. Das Signal des Markermoleküls kann gemessen werden. Dabei handelt es sich um Fluoreszenz, Chemolumineszenz, Radio- oder Enzymaktivität.

Elektronenmikroskopie: Viren können aufgrund ihrer Größe nur im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Rasterelektronenmikroskopie dient zur Darstellung der Oberflächenstruktur von Viren. Immunelektronenmikroskopie kann mit Hilfe markierter Antikörper Viren nachweisen.
CPE: Der virusbedingte cytopathische Effekt ist ein Indikator für die Infektion einer Zellkultur mit Viren.
Hämagglutinationstest: Dieser Test wird bei Viren eingesetzt, die Erythrocyten binden können.
Plaque-Test: Infektiositätstest, der ursprünglich für Bakteriophagen entwickelt wurde.
Biotest: Nachweismethode für pflanzenpathogene Viren.
Endpunkttitration: Die Infektiosität von Viren, die weder Plaques noch Läsionen bilden, wird durch Endpunkttitration bestimmt.
Gelelektrophorese: Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Segmenten und DNA-Segmenten ergibt ein typisches Segmentprofil und kann zum Virusnachweis herangezogen werden.

Nucleinsäuresequenzierung: Erfolgt immer ausgehend von DNA. Virale Sequenzen können in Gendatenbanken mit bekannten Sequenzen verglichen werden.
Hybridisierung: Bestimmte Nucleotidsequenzen können in einer DNA-Probe mit Hilfe einer „Gensonde" nachgewiesen werden.
Polymerasekettenreaktion: PCR, Nachweisverfahren für kleinste DNA-Mengen.
Festphasenimmunassay: Spezifische Antikörper, die auf einem Träger fixiert sind, immunadsorbieren virale Antigene. Die Antikörper-Antigenkomplexe werden mit spezifischen markierten Antikörpern nachgewiesen.

5 Pilze

Natalia Requena, Reinhard Fischer

5.1 Was sind Pilze?

Pilze sind eine faszinierende Organismengruppe. Sie sind in der Natur weit verbreitet und besiedeln vor allem unterschiedlichste terrestrische aber auch aquatische Habitate, in denen sie aufgrund ihrer **stoffwechselphysiologischen Vielseitigkeit** maßgeblich an der Stoffumsetzung beteiligt sind. Einige Pilze leben mit Pflanzen in einer Lebensgemeinschaft, während andere an Pflanzen oder Tieren parasitieren, und antibiotikaproduzierende Pilze retten seit vielen Jahrzehnten unser Leben. Pilze werden seit vielen Jahrhunderten in der Lebensmittelherstellung verwendet und sind ebenso lange als „schädliche" Schimmelpilze bekannt, die Erntevorräte verderben können.

Pilze sind **eukaryotische Mikroorganismen**, von denen mehr als 69 000 Arten beschrieben wurden und deren Gesamtartenzahl auf $1{,}5 \cdot 10^6$ geschätzt wird.

Die morphologische Vielseitigkeit der Pilze reicht von der mikroskopisch kleinen Bäckerhefe bis zu den mehrere Zentimeter großen Fruchtkörpern der



Abb. 5.1 **Pilze in der Mikrobiologie? a** Die Zellen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) messen 5–6 µm im Durchmesser und sind nur mit dem Mikroskop zu sehen. Beide Zellen bilden gerade eine neue Tochterzelle. Bei der linken Zelle sind die Geburtsnarben der vorherigen Töchter schön zu sehen. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme wurde nachträglich koloriert. **b** Dagegen bildet der Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) große Fruchtkörper mit bis zu 15 cm messenden Hüten aus. Im Inneren bestehen diese allerdings aus einem Geflecht von Pilzfäden, die einen Durchmesser von wenigen Mikrometern haben. (Aufnahme a von P. Laun, Salzburg)

uns bekannten Speise- oder Giftpilze, die zu den höheren Pilzen zählen (Abb. 5.**1**). Allerdings bestehen die Fruchtkörper aus Hyphengeflechten, dem **Plektenchym**, und nicht aus echten Gewebeverbänden wie bei Pflanzen und Tieren.

Lange Zeit war die **Mykologie** sehr stark von systematischen und morphologischen Aspekten geprägt. In den letzten Jahren haben Pilze in viele andere, vor allem molekularbiologische, Forschungsrichtungen Einzug gehalten. Dieser Entwicklung soll in diesem Kapitel Rechnung getragen werden, indem die modernen Aspekte der molekularen Mykologie in den Vordergrund gestellt werden. Wir werden in erster Linie versuchen, die wesentlichen Charakteristika der Pilze als Organismen zu vermitteln und nicht ihre systematische und morphologische Vielfalt.

5.1.1 Das System der Pilze

Jeder Pilzsammler kennt die enorme Vielfalt der Fruchtkörper im Herbst in unseren Wäldern und weiß um die Schwierigkeiten der exakten Bestimmung. Ähnlich große Probleme gibt es bei der wissenschaftlichen, **systematischen Einordnung** der Pilze, was dazu führte, dass erst kürzlich eine Neugruppierung aufgrund von umfangreichen molekularen Untersuchungen, wie der **18S rRNA-Analyse** (S. 64), erfolgte (Tree of Life Web Project, www.tolweb.org/tree). Demnach ist das Reich der Pilze eine Schwestergruppe der Tiere, mit denen sie auch einige morphologische und physiologische Gemeinsamkeiten aufweisen, wie das Vorhandensein von Chitin oder die Sekretion von hydrolytischen Enzymen zum Abbau polymerer Substrate. Das Reich der Pilze gliedert sich in mindestens acht Phyla, von denen die Basidiomycota und die Ascomycota etwa 95 % aller bekannten Pilze beherbergen.

Die meisten Arten der **Basidiomycota** wachsen filamentös. Das Phylum erhielt den Namen aufgrund der sexuellen Vermehrungsstruktur der **Basidie**, einem Ständer, auf dem vier meiotische Sporen gebildet werden (s. u.). Neben der sexuellen Vermehrung sind einige dieser Pilze auch zu einer asexuellen Reproduktion befähigt. Zu den Basidiomycota zählen nicht nur die meisten unserer **Speisepilze**, sondern auch pathogene Vertreter wie die pflanzenpathogenen **Rost-** und **Brandpilze** oder die humanpathogene Hefe *Cryptococcus*.

Die **Ascomycota** sind einzellige oder fädige Organismen, die in flüssigen Habitaten (Nektar) und im Boden in großer Zahl vorkommen. Während der sexuellen Vermehrung bilden sie in schlauchartigen Zellen (**Ascus**) Sporen aus. Daneben sind asexuelle Vermehrungsformen weit verbreitet. Zu den Ascomycota zählen unsere **Bäckerhefe**, viele gemeinhin als „**Schimmelpilze**“ bezeichnete Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Alternaria* sowie größere Vertreter, wie der orangerote Becherling oder die von vielen geliebte Trüffel.

Die **Glomeromycota** werden jetzt als Schwestergruppe der Asco- und Basidiomycota und als eigenes Phylum betrachtet. Sie wurden lange Zeit zu den Zygomycota gezählt. Die Glomeromycota sind als **endomykorrhizabildende** Pilze

überaus weit verbreitet, spielen eine große Rolle für die Versorgung der Pflanzen mit Mineralien und waren vermutlich für die Pflanzen bei der Besiedelung des terrestrischen Lebensraumes sehr wichtig.

Die **Zygomycota** sind überwiegend fädig, wobei die Pilzhyphen größtenteils nicht septiert sind. Sie können sich asexuell durch die Bildung von unbeweglichen Sporen in Sporangien und sexuell durch die Ausbildung einer **Zygospore** vermehren. Die Zygospore wird nach der Fusion von zwei speziellen Hyphen (Gametangien) gebildet. Eine der bekanntesten Arten sind die saprotroph lebenden Vertreter der Gattung **Mucor**, die in Böden aber auch auf Dung zu finden sind.

Bei den **Chytridiomycota** handelt es sich meist um **einzellige** Organismen, die sich sexuell durch die Bildung beweglicher Gameten fortpflanzen und Zoosporen für die asexuelle Verbreitung produzieren. Sie leben oft in aquatischen Ökosystemen oder in feuchten Böden und führen meist eine saprotrophe Lebensweise. Viele Arten zeichnen sich durch die Produktion von Exoenzymen aus und tragen zur Verwertung von **Cellulose** oder **Chitin** im Boden bei. *Synchytrium endobioticum* ist als Parasit unserer Speisekartoffel von Bedeutung. Die systematische Zugehörigkeit vieler bislang zu den Zygomycota oder Chytridiomycota gezählten Pilze sowie die Definition der Phyla und Subphyla ist leider immer noch im Fluss und soll hier nicht weiter vertieft werden.

5.1.2 Der Aufbau der pilzlichen Zelle

Viele Pilze besitzen eine feste **Zellwand**, ähnlich wie Pflanzen. Während allerdings die pflanzliche Zellwand aus Cellulose aufgebaut ist, bildet das ansonsten in Arthropoden vorkommende **Chitin** in Pilzen eine wesentliche Strukturkomponente. Daneben sind verschiedene andere Glucan- und Mannanpolymere sowie Proteine am Aufbau der pilzlichen Zellwand beteiligt. Außerdem ist in vielen Pilzzellwänden Melanin eingelagert. Pilze kommen als **Einzelzellen** vor, die sich durch **Knospung** (Sprosshefe, z. B. Bäckerhefe) oder durch **Zweiteilung** (Spalthefe) vermehren, oder sie bilden lange Fäden, die **Hyphen**, die nur an der äußersten Spitze wachsen (Schimmelpilze, höhere Pilze). Die Pilzfäden sind in vielen Pilzen durch Querwände, die **Septen**, unterteilt. Der Aufbau der Septen ist unterschiedlich und wird als systematisches Merkmal verwendet (Abb. 5.**2**).

Während Vertreter der **Zygomycota**, **Chytridiomycota** und **Glomeromycota** kaum Septen in vegetativen Hyphen besitzen und deshalb ein **Syncytium** darstellen, sind sie in Asco- und Basidiomyceten vorhanden. In Glomeromyceten z. B. findet man Septen nur in absterbenden Hyphen oder während der Sporenbildung. In **Ascomyceten** sind die **Septen** meistens relativ einfach gebaut und nicht völlig geschlossen, sondern lassen einen zentralen **Porus** frei. Dieser Porus stellt nicht nur eine Cytoplasmabrücke dar, sondern in vielen Pilzen können sogar Organellen wie die Zellkerne durch die Septen wandern. Die Septen sind also nicht mit echten Zellwänden vergleichbar. Deshalb werden die „Zellen“,

die in einer Hyphe durch die Septen abgegrenzt werden, als **Hyphenkompartimente** bezeichnet. Der Porus stellt allerdings ein Problem dar, wenn ein Hyphenkompartiment verletzt wird und aufgrund des hohen osmotischen intrazellulären Drucks das Cytoplasma austritt. Um zu verhindern, dass die gesamte Hyphe ausläuft, bilden Ascomyceten einen Pfropfen, ein von einer Membran umgebener Proteinkristall (**Woronin-Körper**, Abb. 5.**2c**), der bei einer Verletzung der Hyphe den Porus zu den angrenzenden Hyphenkompartimenten verschließt. Die komplexesten Septen kommen in **Basidiomyceten** vor, zu denen die meisten unserer Speisepilze gehören. Hier ist der zentrale Porus durch eine Porenkappe verschlossen, die vom endoplasmatischen Retikulum gebildet wird und dem Porus auf beiden Seiten im Cytoplasma aufsitzt (Abb. 5.**2d**).

Die Mehrzahl der Pilze besitzt Kompartimente, die mehrere **Zellkerne** beinhalten und in denen die **DNA** in mehreren Chromosomen organisiert vorliegt. Die Chromosomen sind im Vergleich zu denen höherer Eukaryoten relativ klein und die Zahl variiert beträchtlich (Tab. 5.**1**). Ein weiterer wichtiger Unter-

Tab. 5.**1** **Genome einiger Pilze.** 1996 wurde als erstes eukaryotisches Genom das von **S. cerevisiae** entschlüsselt, seitdem wächst die Liste der vollständig sequenzierten Pilzgenome rasch.

	Art	*Genomgröße in Megabasen*	*Anzahl der Chromosomen*	*geschätzte Zahl proteincodierender Gene*	*Eigenschaft*
Ascomycota	*Saccharomyces cerevisiae*	12	16	5800	Bier, Wein, Brot, Modellorganismus
	Schizosaccharomyces pombe	14	3	4730	Modellorganismus
	Aspergillus nidulans	30	8	9500	Modellorganismus
	A. fumigatus	28	8	9900	potenziell humanpathogen
	A. niger	34	8	14 200	industrieller Produzent, z. B. Zitronensäure
	A. oryzae	37	8	14 100	Sakeherstellung, industrieller Produzent
	Neurospora crassa	39	7	10 100	Modellorganismus
	Magnaporthe grisea	38	7	11 100	Reispathogen
	Candida albicans	15	8	6400	potenziell humanpathogen
Basidiomycota	*Cryptococcus neoformans*	19	14	6500	potenziell humanpathogen
	Ustilago maydis	20	20	6900	Maisbrandpilz
	Laccaria bicolor	65	n. b.	ca. 20 000	bildet Ektomykorrhiza

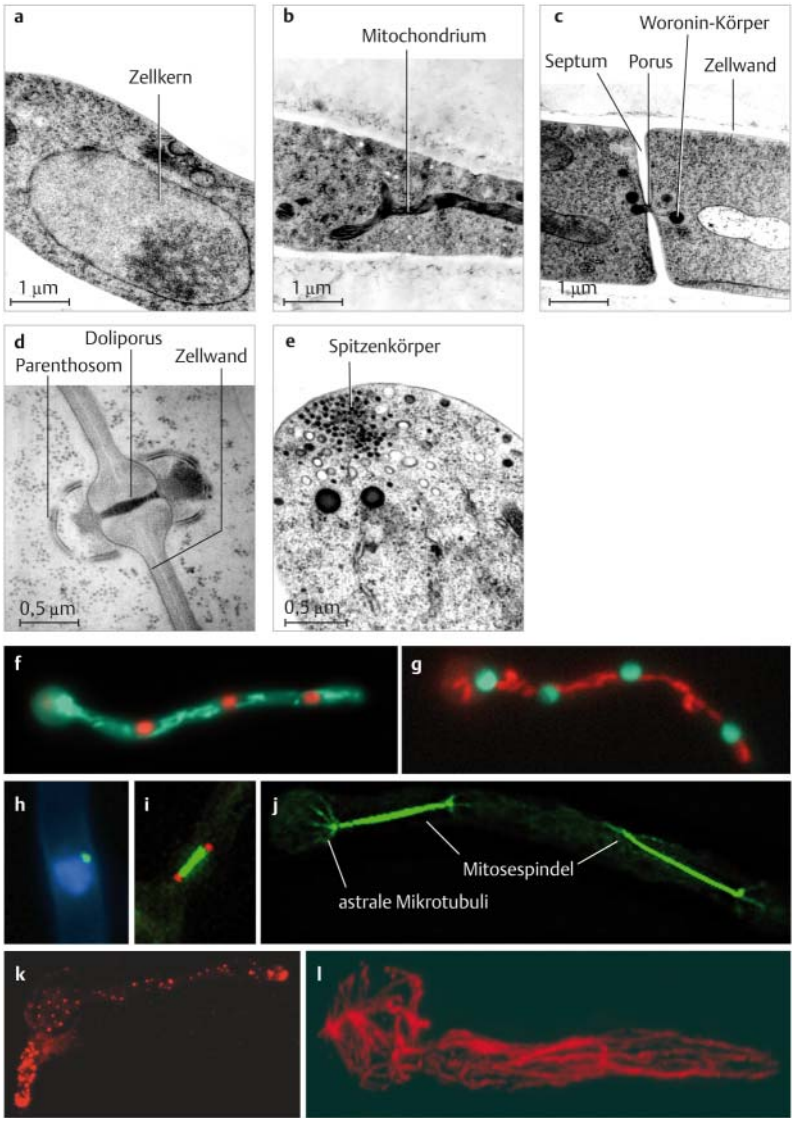


Abb. 5.2 **Der Aufbau der pilzlichen Zelle. a** Die Chromosomen sind, wie bei anderen Eukaryoten, im Zellkern organisiert. **b** Die Mitochondrien bilden ein dynamisches, tubuläres Netzwerk. Je nachdem wie die Mitochondrien angeschnitten wurden, erscheinen sie eher rundlich, elliptisch oder als tubuläres Organell. **c** In der Nähe des einfachen Ascomy-

ceten-Porus finden sich mehrere stark kontrastierte Woronin-Körper. **d** In dem Basidiomycet *Schizophyllum commune* sind die relativ komplex aufgebauten Septen durch das Parenthosom gekennzeichnet. **e** Eine Ansammlung von kleinen Vesikeln an der Hyphenspitze vieler filamentöser Pilze (Spitzenkörper) wird für das polare Wachstum dieser Organismen verantwortlich gemacht. **f, g** Darstellung der Zellkerne und und Mitochondrien. In **f** wurden die Zellkerne mit dem rot-fluoreszierenden RFP und die Mitochondrien mit GFP markiert. In **g** wurden die Zellkerne mit GFP und die Mirochondrien mit RFP sichtbar gemacht. **h** Der Spindelkörper (MTOC) ist hier als GFP-Signal am Zellkern sichtbar. **i** Eine junge Mitosespindel ist sichtbar durch GFP-markiertes Tubulin. Die Spindelkörper wurden durch ein RFP-Fusionsprotein sichtbar gemacht. **j** In dieser Hyphe sind zwei Mitosespindel sichtbar. Die Spindelpole polymerisieren nicht nur die Mikrotubuli der Mitosespindel sondern auch astrale Mikrotubuli, die in das Cytoplasma strahlen. Eine Hyphe misst 3–5 µm im Durchmesse. **k, l** Die Cytoskelettelemente in den Zellen einer gekeimten Spore wurden durch sekundäre Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. **k** Actin zeigt eine punktförmige Verteilung und kommt gehäuft an der Hyphenspitze vor. Actinaggreagate sind am Zellcortex zu sehen. Die Actinfilamente, die das Cytoplasma durchstrahlen, sind in dieser Abbildung nicht zu sehen. Das Präparat wurde von einer ausgekeimten Konidiospore angefertigt, die zwei Keimschläuche gebildet hat. **l** Die Mikrotubuli bilden in Längsrichtung ausgerichtete Filamente. An der Spitze des Keimschlauchs treffen sich die Mikrotubuli. (Aufnahmen: a, c, e von E. A. Richardson, Athens, GA, USA; b von M. Karos, Marburg und K. Tenberge, Münster; d von R. Bauer, Tübingen; f, g, h von D. Veith, Karlsruhe; i, j von N. Zekert, Karlsruhe; k, l von N. Sievers, Marburg)

schied betrifft die Zellkernmembran, die bei vielen Pilzen während der Mitose weitgehend intakt bleibt („geschlossene Mitose“, 🕮*Biochemie, Zellbiologie*). Demgegenüber wird die Zellkernmembran in höheren Eukaryoten vollständig aufgelöst, und die Chromosomen ordnen sich nach der Kondensation in der Metaphaseplatte an. Der eigentliche Mitoseapparat, die Verdopplung der DNA sowie wichtige Regulatoren der Mitose sind in Pilzen und in höheren Eukaryoten konserviert, sodass Pilze als Modellorganismen verwendet wurden, um die Vorgänge aufzuklären.

Die Zellkerne eines Myzels besitzen einen einfachen (**haploiden**) oder einen doppelten (**diploiden**) **Chromosomensatz**. Die Hefe *S. cerevisiae* und der Schimmelpilz *A. nidulans* können sowohl als haploide als auch als diploide Organismen wachsen. Diploide Hefezellen haben ein etwas größeres Zellvolumen als haploide und unterscheiden sich in ihrem Knospungsmuster (s. u.). Die humanpathogene Hefe *Candida albicans* wurde bisher nur im diploiden Stadium beobachtet. Neben Myzelien mit definierten **Kernphasen** zeichnen sich viele Pilze noch durch weitere Besonderheiten aus: Hyphen unterschiedlicher Individuen, die also genetisch verschieden sind, fusionieren sehr häufig miteinander, ohne dass die Zellkerne verschmelzen, und die Hyphenkompartimente enthalten dann Zellkerne verschiedener Herkunft. Dieser Zustand wird als **Heterokaryon** bezeichnet, er kann sehr stabil sein, sodass sich ein heterokaryotisches Myzel bildet. In Basidiomyzeten wird die Anzahl der Zellkerne in einem Hyphenkompartiment reguliert, und ein spezieller Zellteilungsmechanismus gewährleistet, dass in einem speziellen heterokaryotischen Myzel immer jeweils zwei Zellkerne

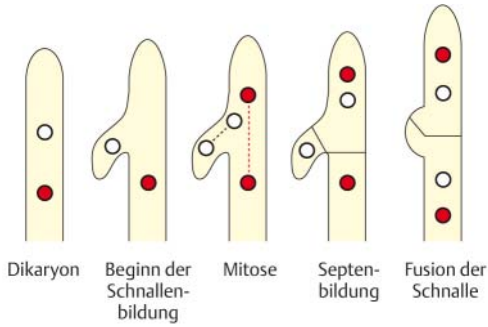


Abb. 5.**3** **Schnallenbildung während der Zellteilung eines Basidiomyceten.** Die Reihenfolge der beiden Zellkerne in einem neuen Hyphenkompartiment ist umgekehrt zum vorherigen Kompartiment.

unterschiedlicher Herkunft vorliegen. Dieses Stadium wird als **Dikaryon** bezeichnet und bleibt bei unseren Waldpilzen sehr lange erhalten. Erst während der Fruchtkörperbildung kommt es zur Zellkernverschmelzung und zur Bildung **diploider** Zellkerne. Zur Aufrechterhaltung der definierten Zellkernverteilung trägt ein besonderer Septierungsmodus bei, die **Schnallenbildung** (Abb. 5.**3**). Es kommt zunächst zu einer mitotischen Teilung der beiden Zellkerne. Während die mitotische Spindel des einen Zellkernpaares die Lage eines nachfolgenden Septums bestimmt, teilt sich der andere Zellkern gerichtet in eine kleine Hyphenausstülpung. Diese verlängert sich, und die Spitze verschmilzt jenseits des ersten Septums wieder mit der „Mutterhyphe". Der Tochterzellkern, der sich in der Schnalle befand, gelangt so wieder in die Zelle, die bereits einen genetisch verschiedenen Tochterkern enthält.

Neben den Zellkernen finden wir in der pilzlichen Zelle weitere **Organellen**, z. B. die Mitochondrien (Abb. 5.**2f**, **g**), das ER, den Golgi-Apparat, die Peroxisomen oder Vakuolen. Die Funktionen dieser Strukturen entsprechen den Funktionen in anderen Eukaryoten. Die Organisation der pilzlichen Zelle wird durch ein ausgeprägtes Cytoskelett (Abb. 5.**2k**, **l**) gewährleistet. Es besteht aus Mikrotubuli und Actinfilamenten. Intermediäre Filamente, die in anderen Eukaryoten vorkommen, wurden in Pilzen bisher noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen.

Das Verständnis der Organisation der pilzlichen Zelle ist in den letzten 10 Jahren enorm gewachsen. Wie auf vielen Gebieten der Biologie hat das **grün fluoreszierende Protein (GFP)** – und Derivate mit anderen spektralen Eigenschaften – dazu geführt, dass Organellen, Cytoskelett und Proteine in lebenden Pilzzellen mit all ihrer Dynamik studiert werden können. Proteine werden in den Zellen durch spezifische Signalsequenzen zu den einzelnen Organellen dirigiert, dazu gehören die N-terminalen Mitochondrienimportsignale, die innerhalb der Proteine gelegenen Zellkernlokalisierungssequenzen oder die am C-Terminus befindlichen Peroxisomenlokalisierungssignale (*Biochemie, Zellbiologie*). Mit diesen Signalsequenzen lassen sich fluoreszierende Proteine in das jeweilige Organell steuern und damit im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

5.1.3 Stoffwechsel der Pilze

Pilze sind hinsichtlich ihrer **physiologischen** und **biochemischen Leistungen** sehr vielseitig. Wenn die organischen Stoffe, die umgesetzt werden, von totem Material stammen, werden die entsprechenden Pilze als **Saprophyten** bezeichnet. **Parasiten** befallen dagegen lebende Organismen und ernähren sich auf Kosten dieser Wirte. Wenn die Pilze mit anderen Lebewesen zu beiderseitigem Nutzen in einer engen Gemeinschaft leben und dadurch mit organischen Molekülen versorgt werden, bezeichnet man sie als **Symbionten** (s. u.). Die meisten Pilze sind **aerobe Organismen**, die auf das Vorhandensein von molekularem Sauerstoff angewiesen sind. Als **Energiequelle** können Kohlenhydrate, Fette oder Aminosäuren dienen, deren Umsetzungen in der **Glykolyse**, dem **oxidativen Pentosephosphatweg**, dem **Citratzyklus** und der **Atmungskette** erfolgen (Kap. 8, *Biochemie, Zellbiologie*). Neben dem aeroben Stoffwechsel sind einige Pilze auch in der Lage, Gärungen durchzuführen. Die bekannteste Form der Gärung ist die **alkoholische Gärung** der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (S. 378, S. 556). Als **Reservestoffe** werden das „tierische" **Glykogen**, **Lipide** und die ansonsten in Insekten vorkommende **Trehalose**, gebildet. Das Disaccharid Trehalose wird vor allem in den Sporen gespeichert und dient als Energievorrat bei der Sporenkeimung.

Viele Pilze zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, auch auf **komplexen Stoffen** zu wachsen. Die wachsenden Pilzfäden sezernieren dann Enzyme, die polymere Verbindungen spalten und für die Aufnahme vorbereiten. So sind Pilze maßgeblich an der Umsetzung von Cellulose oder Lignin im Boden beteiligt. Pilze, die vornehmlich **Cellulose** abbauen, werden als **Braunfäulepilze** bezeichnet, weil verrottendes Holz durch das zurückbleibende Lignin rötlich erscheint. Umgekehrt werden Pilze, die **Lignin** eines Baumes abbauen, als **Weißfäulepilze** bezeichnet, weil das bewachsene Holz stark aufgehellt erscheint. Die Nutzung polymerer Substrate wie Lignin oder Cellulose verdeutlicht die Fähigkeit vieler Pilze, große Mengen von lytischen Enzymen zu sezernieren. Deshalb sind diese Organismen besonders gut für die industrielle Produktion von Proteinen und Enzymen geeignet.

5.1.4 Sekundärmetabolite

Neben den Stoffwechselwegen, die zur Energiegewinnung und zur Bildung neuer Zellmasse benötigt werden (**Primärstoffwechsel**), zeichnen sich viele Pilze durch ein großes Spektrum an metabolischen Kapazitäten aus, deren physiologische und ökologische Bedeutung noch weitgehend unverstanden ist. Diese biochemischen Leistungen werden als **Sekundärstoffwechsel** bezeichnet. Vermutlich sind die Verbindungen aber unter natürlichen Bedingungen für das Überleben und das Durchsetzen gegenüber Konkurrenten sehr wichtig. Am auffälligsten sind Sekundärmetabolite als Pigmente, die z. B. die Sporen von *A. nidulans* grün erscheinen lassen. Sie können auch eine Rolle in der Kommunikation der

Pilze spielen. Viele dieser Verbindungen haben für den Menschen große Bedeutung. Die **Antibiotika** Penicillin oder Cephalosporin, die durch *Penicillium chrysogenum* bzw. durch *Acremonium chrysogenum* gebildet werden, sind typische Endprodukte solcher Stoffwechselwege. Dazu gehören aber auch die von vielen Schimmelpilzen gebildeten **Aflatoxine** (benannt nach dem Toxin von ***Aspergillus flavus***), die kanzerogene Eigenschaften besitzen. Andere Pilzgifte wie das Muscarin der Risspilze (*Clitocybe*), das auch in geringen Mengen im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) vorkommt, oder die Amanitine des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) sind vor allem durch ihr Vorkommen in höheren Pilzen bekannt. Durch Verwechslungen dieser Pilze mit essbaren Vertretern kommt es jedes Jahr zu Todesfällen. Pilze der Gattung *Psilocybe* sind für ihre halluzinogene Wirkung bekannt und haben eine lange Tradition in alten Kulturen als sakrale oder als Zauberdrogen.

5

Chemisch gesehen sind Sekundärmetabolite eine heterogene Substanzgruppe. Eine sehr vielfältige und große Gruppe sind **Polyketidderivate**, die viele wirtschaftlich sehr bedeutende Verbindungen wie die **Mycotoxine**, **Aflatoxin** oder **Alternariol**, umfassen. Die Biosynthese ist am besten am Beispiel von Aflatoxin untersucht und benötigt mehr als 20 verschiedene Enzymaktivitäten, die aus Coenzym-A-aktivierten Acylgruppen das komplizierte Molekül herstellen. Ein Schlüsselenzym ist die Polyketidsynthase. Alle an der Aflatoxinbiosynthese beteiligten Enzyme werden interessanterweise koordiniert exprimiert. Die entsprechenden Gene sind in einem – für Eukaryoten ungewöhnlichen – **Gencluster** organisiert und durch einen zentralen Regulator, der selbst im Cluster organisiert ist, gesteuert (Abb. 5.**4**). Die Bildung von Aflatoxin ist von einer Reihe von Umweltfaktoren abhängig, die durch die Expression des Regulators integriert werden. Sobald der

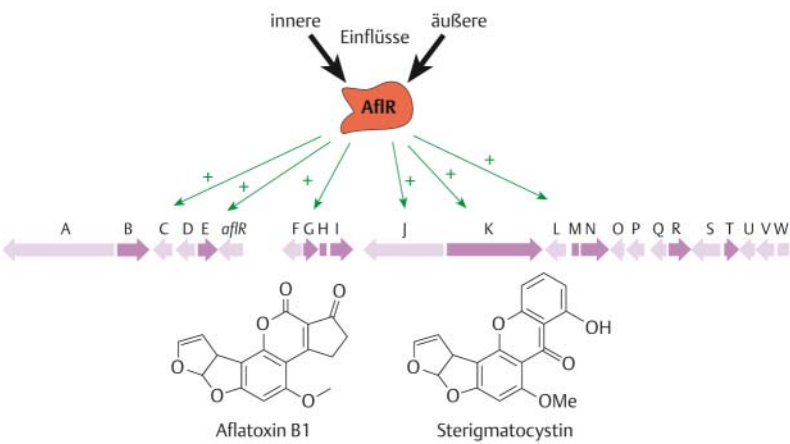


Abb. 5.**4** **Regulation der Aflatoxinbiosynthese.** Die Gene liegen in einem Gencluster vor und werden alle durch einen Regulator kontrolliert. Der Regulator, AflR, ist ebenfalls im Cluster kodiert. *A. nidulans* bildet nur eine Vorstufe von Aflatoxin, nämlich Sterigmatocystin.

Regulator induziert wird, werden alle anderen Gene des Clusters aktiviert. Warum diese Gene geclustert vorliegen, ist noch nicht bekannt. Aflatoxin wird von *A. flavus,* aber auch von vielen anderen Schimmelpilzen gebildet. Der langjährige Genuss von geringen Aflatoxinmengen mit unseren Nahrungsmitteln kann zu Leberschäden und auch zu Leberkrebs führen. Es kann zu akut-toxischen Erscheinungen kommen, wenn sehr hohe Konzentrationen von Aflatoxin in den menschlichen Körper gelangen.

Ein weiteres wichtiges Polyketidderivat stellt **Melanin** dar. Wie andere Pigmente auch, wird Melanin häufig in den Sporen synthetisiert, um die Sporen, die über den Luftweg verbreitet werden, vor dem DNA-schädigenden UV-Licht zu schützen. Mit Melanin werden aber auch Zellwandeigenschaften modifiziert: Bei dem phytopathogenen Pilz *Magnaporthe grisea* wird die Wand des Appressoriums durch Melanineinlagerung semipermeabel, wodurch die Appressorien enormen Druck aufbauen können, um in die Pflanzen einzudringen (s. u.). Melanindefiziente Stämme können nicht mehr in Pflanzen eindringen. Auch bei humanpathogenen Pilzen wie *C. neoformans* spielt Melanin als Pathogenitätsfaktor eine Rolle. Hier ist Melanin vermutlich an der Beseitigung von für den Pilz schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt.

Eine dritte Klasse von Sekundärmetaboliten sind **Peptide**, die an nicht ribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) hergestellt und damit nicht durch mRNAs codiert werden. Nicht nur die Synthese der Peptide unterscheidet sich von der Synthese gewöhnlicher Peptide an Ribosomen, sondern auch die Zusammensetzung ist charakteristisch. Sie enthalten neben proteinogenen auch andere Aminosäurederivate (z. B. D-Aminosäuren). Zu diesen Peptiden gehören die medizinisch bedeutsamen **Penicilline**.

Plektenchym: Hyphengeflecht, aus dem die Fruchtkörper von Pilzen bestehen.
Chytridiomycota: Meist einzellig, Vermehrung asexuell durch Zoosporen und sexuell durch Gameten, meist Saprophyten in feuchten Habitaten, häufig Exoenzymproduktion.
Zygomycota: Meist fädig ohne Septierung der Hyphen, Vermehrung asexuell durch Sporen in Sporangien und sexuell durch die Fusion von Gametangien zur Zygospore, Wachstum im Boden, auf Dung oder in Gemeinschaft mit Pflanzen.
Ascomycota: Einzellig oder fädig, Vermehrung asexuell und sexuell durch Sporenbildung im Ascus, Wachstum im Boden und in flüssigen Habitaten, auch pathogene Vertreter.
Basidiomycota: Meist Hyphenpilze, Vermehrung asexuell und sexuell durch Sporenbildung an der Basidie. Viele Speise- und Giftpilze, auch pathogene Arten.
Zellwand der Pilze: Hauptbestandteil meist Chitin, außerdem andere Polysaccharide und Proteine, häufig Melanineinlagerungen.
Hyphen: Fadenförmige Zellen, die nur an der Spitze wachsen, häufig durch Septen in Hyphenkompartimente unterteilt. Septen besitzen Poren, die in einigen Pilzen durch Pfropfen (Woronin-Körper) verschlossen werden können.
Syncytium: Zellen mit mehreren Zellkernen.
Heterokaryon: Zellkompartiment, das Zellkerne mit unterschiedlichem Genotyp enthält.

Dikaryon: Dauerhaftes, stabiles Vorhandensein zweier Zellkerne mit unterschiedlichem Genotyp in einem Hyphenkompartiment. Definierte Verteilung der Zellkerne wird durch Schnallenbildung bei der Zellteilung gesichert.
Saprophyten: Bauen totes organisches Material ab.
Parasiten: Leben auf Kosten eines lebenden Wirtsorganismus.
Symbionten: Leben in Gemeinschaft mit anderen Lebewesen zu beiderseitigem Nutzen.
Mycotoxine: Produkte des Sekundärstoffwechsels in vielen Pilzen mit kanzerogener Wirkung (z. B. Aflatoxin).

5.2 Molekularbiologie mit Pilzen

Vor einigen Jahrzehnten haben Pilze Einzug in die biochemisch und genetisch arbeitenden Forschungslaboratorien gehalten. Es waren zunächst die Bäckerhefe *S. cerevisiae* sowie die Schimmelpilze *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans*, die für grundlegende Untersuchungen der Biologie der Pilze aber auch als **Modellsysteme** für eukaryotische Zellen herangezogen wurden. Ihr schnelles Wachstum auf künstlichen Nährmedien, ihr haploides Genom, die Möglichkeit der **Mutagenese** von Einzelzellen oder einzelligen Sporen und – durch ihre sexuelle Vermehrung – die Anwendung genetischer Analysen prädestinieren diese Organismen dazu. Sie sind heute allen modernen molekularbiologischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden zugänglich.

5.2.1 Mutation und Selektion

Pilze werden heute sehr oft als **Modellorganismen** für eukaryotische Lebewesen betrachtet. So werden in Pilzen wie der Hefe *S. cerevisiae* oder dem Schimmelpilz *A. nidulans* so grundlegende Prozesse wie die Zellkernteilung, das Zellwachstum und die Zellteilung untersucht. Ein Durchbruch war die Einführung molekularbiologischer Methoden Ende der siebziger Jahre. Dadurch wurde es möglich, die an den Prozessen beteiligten Gene und die entsprechenden Proteine zu untersuchen. Die Methoden wurden kontinuierlich optimiert, sodass es heute möglich ist, einzelne Gene auszuschalten oder durch andere zu ersetzen, in den künstlich erzeugten Stämmen den Effekt zu analysieren und so auf die Funktion der entsprechenden Gene zurückzuschließen.

Vor der molekularen Analyse einzelner Genfunktionen war die Herstellung und Charakterisierung von Mutanten, die **ungerichtete Mutagenese**, eine wichtige genetische Methode (S. 220). Für Mutageneseexperimente sind Pilze wie *S. cerevisiae* oder *A. nidulans* hervorragend geeignet. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist **einzellig** und jede Zelle enthält nur einen **haploiden Zellkern**. Jede durch

mutagene Agenzien eingeführte Mutation, die zu einer Veränderung der Zelle oder des Stoffwechsels führt, ist direkt bei allen Nachkommen in einer Hefekolonie sichtbar. Der filamentöse Pilz *A. nidulans* ist mehrkernig, sodass eine Mutation in einem Zellkern in einem Hyphenkompartiment durch die anderen Zellkerne ausgeglichen und damit ihr Effekt verdeckt werden kann. Allerdings produziert dieser Pilz in seinem Lebenszyklus einzellige, einkernige Konidiosporen (s. u.), die hervorragend zur Gewinnung von Mutanten geeignet sind. Ein anschauliches Beispiel ist die Analyse der Konidiophorentwicklung in *A. nidulans*. Mutagenisierte Kolonien wurden durch **visuellen** Vergleich mit dem Wildtyp analysiert und interessante Mutanten isoliert (Abb. 5.**5**). Die entsprechenden Gene wurden anschließend kloniert und ihre Genprodukte teilweise als wichtige Transkriptionsfaktoren charakterisiert (s. u.).

Sollen Mutanten erzeugt werden, die einen Defekt in einem **Stoffwechselweg** haben, müssen die mutagenisierten Stämme hinsichtlich der Stoffwechselleistungen getestet werden. Um z. B. Mutanten herzustellen, die im Argininstoffwechsel blockiert sind, werden die Konidiosporen zunächst auf argininhaltiges Medium angeimpft und dann auf ein argininfreies Medium überführt. Stämme, die auf diesem Medium nicht wachsen können, haben einen Defekt in diesem Stoffwechselweg. Durch Messungen der Enzymaktivitäten kann anschließend genau bestimmt werden, welches Gen nicht mehr funktionsfähig ist. Solche **auxotrophen Mutanten** bieten hervorragende Selektionsmöglichkeiten für erfolgreiche Transformationen (s. u.).

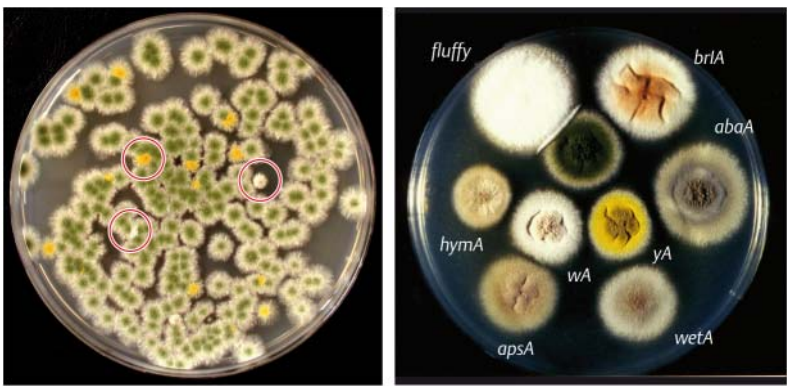
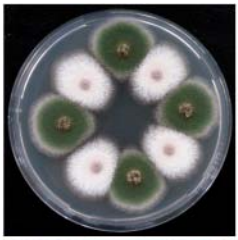
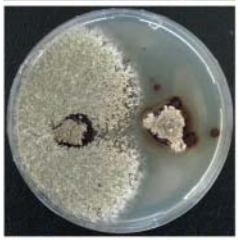
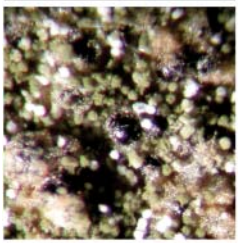


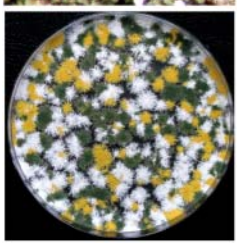
Abb. 5.**5** **Mutagenese von *A. nidulans*.** Links: Konidien eines grünen Stammes wurden mit UV-Licht mutagenisiert und ausplattiert. Es sind Mutanten zu sehen (mit einem Kreis markiert), bei denen die Sporenfarbe gelb oder weiß ist oder die nur sehr kleine Kolonien bilden. Rechts: Verschiedene Entwicklungsmutanten wurden auf einer Agarplatte vergleichend kultiviert.

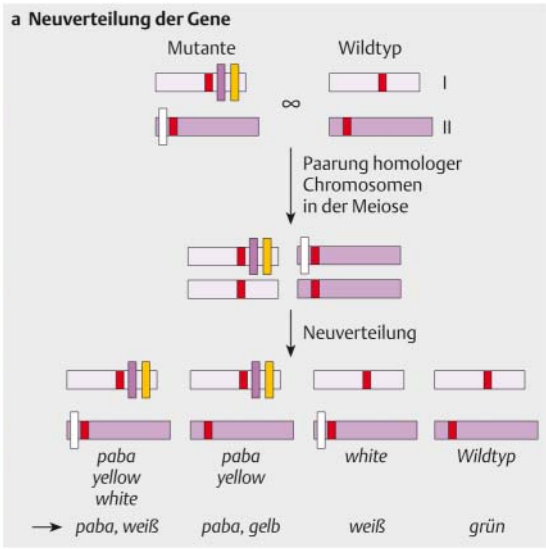


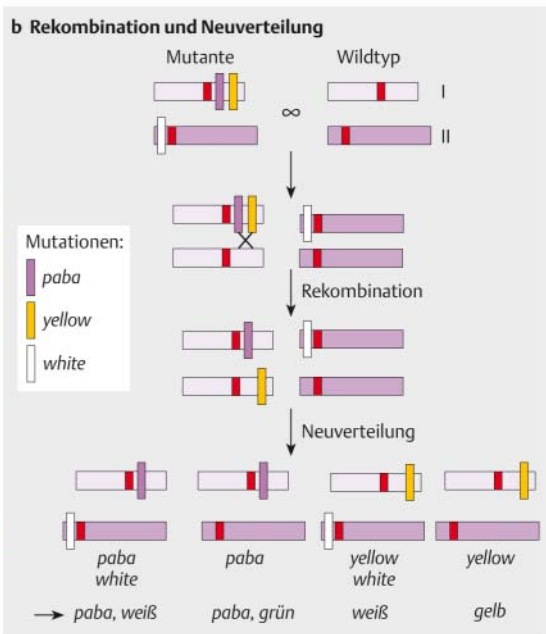









a Neuverteilung der Gene
Mutante
Wildtyp
I
II
Paarung homologer Chromosomen in der Meiose
Neuverteilung
paba yellow white
paba yellow
white
Wildtyp
paba, weiß
paba, gelb
weiß
grün


b Rekombination und Neuverteilung
Mutante
Wildtyp
I
II
Mutationen:
paba
yellow
white
Rekombination
Neuverteilung
paba white
paba
yellow white
yellow
paba, weiß
paba, grün
weiß
gelb

◀ Abb. 5.6 **Kreuzung zwischen einem Wildtyp (grün) und einer Pigmentmutante (weiß).** Dort wo die beiden Stämme zusammen gewachsen sind, wird ein kleines Myzelstück entnommen und auf Medium übertragen, auf dem die beiden Elternstämme nicht wachsen können. Einige der übertragenen Myzelstücke wachsen zu einem stabilen Heterokaryon aus, in dem die Zellkerne beider Eltern vorhanden sind (mittleres Bild, links). Im Heterokaryon sind grüne und weiße Konidiophore und reife, schwarze Kleistothecien zu sehen. Das unterste Bild zeigt ausplattierte Ascosporen, die grüne, weiße und durch Neukombination entstandene, gelbe Kolonien hervorgebracht haben. **a** Erbgang unter Berücksichtigung der Neuverteilung der Gene und (**b**) der Rekombination und Neuverteilung. Die Gene *yellow* und *white* codieren für Enyme, die aus einer farblosen Pigmentvorstufe ein gelbes und daraus das grüne Pigment herstellen. Wenn das *white*-Gen defekt ist, kann die gelbe Zwischenstufe nicht mehr synthetisiert werden und die Sporen bleiben weiß. Wenn das *yellow*-Gen defekt ist, unterbleibt die Umwandlung zum grünen Pigment und die Sporen sind gelb. Fallen beide Enzyme aus, sehen die Sporen weiß aus. Die Mutation *paba* bewirkt, dass der Stamm von p-Aminobenzoesäure im Medium abhängig ist. Während nur der weiße Elternstamm paba-auxotroph war, entstehen durch Neu- und Rekombination auch gelbe und grüne Stämme mit dieser Auxotropie. (Aufnahmen: J. Purschwitz, Karlsruhe)

Die Methode der Mutagenese stellt allerdings dann ein Problem dar, wenn Vorgänge untersucht werden sollen, die für die Zelle essentiell sind. Wird ein solches Gen mutiert, wächst der Organismus nicht mehr, d. h. entsprechende Mutanten können nicht isoliert werden. Einen Ausweg bieten **temperatursensitive Mutanten** (S. 215). Die Isolierung von temperatursensitiven Mutanten von *S. cerevisiae* und *S. pombe* hat wesentlich zur Aufklärung der Regulation des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen beigetragen und wurde 2001 mit dem Nobelpreis gewürdigt.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug, um die Funktion und das Zusammenspiel von Proteinen in einer Zelle zu verstehen, ist die **Suppressoranalyse** (S. 217). Mit dieser Methode wurde **γ-Tubulin** in *A. nidulans* entdeckt, das für die Polymerisation von Mikrotubuli in allen Eukaryoten wichtig ist (📖 *Biochemie, Zellbiologie*).

Die Methode der Mutation und Selektion wird nicht nur verwendet, um Stoffwechselvorgänge zu verstehen und zu analysieren, sondern auch zur **Stammverbesserung** (S. 552).

Die erste Analyse der isolierten Mutanten umfasst **klassisch-genetische Experimente**. Eine zentrale Frage ist, ob eine beobachtete Veränderung durch die Mutation eines einzigen Gens oder mehrerer Gene verursacht wurde. Dazu wird die Mutante mit einem Wildtypstamm gekreuzt und die Nachkommen analysiert. Da es sich um zwei haploide Stämme handelt, muss der Mutantenphänotyp im Vergleich zum Wildtyp, gemäß den **Mendel-Gesetzen**, im Verhältnis 1:1 auftauchen, da die haploiden Nachkommen entweder das intakte Gen oder das mutierte Gen erhalten (Abb. 5.**6**). Durch Kreuzungen mit anderen bekannten Mutantenstämmen kann durch die Ermittlung von Rekombinationsfrequenzen eine neue Mutation und damit das entsprechende Gen relativ zu bekannten Genen auf den Chromosomen lokalisiert werden. Zur genauen Lokalisierung ist eine **Dreifaktorenkreuzung** nötig. Mit diesen Methoden wurden in den Siebzigerjahren detaillierte **genetische Karten** der Modellorganismen erstellt. Von ähnlich großer Wichtigkeit für eine molekulare Analyse der Mutanten ist die

Information, ob es sich um eine **rezessive** oder eine **dominante Mutation** handelt. Für diese Analyse müssen diploide Stämme hergestellt werden, was sowohl in der Bäckerhefe als auch in *A. nidulans* möglich ist. Prägt sich das Mutantenmerkmal in dem diploiden Stamm aus, war die Mutation dominant, sieht der diploide Stamm wie der Wildtyp aus, war die Mutation rezessiv. Nur rezessive Mutanten können durch eine Wildtypgenbank komplementiert werden.

5.2.2 Transformation mit Pilzen

Eine wichtige Voraussetzung zur gezielten Veränderung des Erbguts ist die Einführung von DNA in den entsprechenden Organismus. Bereits in den 1960er Jahren gab es Berichte, dass Pilze DNA während des Wachstums aufnehmen. Dabei war die Rate der so transformierten Pilze sehr gering und die DNA-Konzentration in den Experimenten musste sehr hoch sein. Eine wesentlich verbesserte Aufnahme lässt sich erreichen, wenn man die Zellwand der Pilze mit hydrolytischen Enzymen entfernt und dann die Protoplasten mit DNA inkubiert. Die Protoplasten können auf osmotisch stabilisierten Medien regeneriert werden und wachsen teilweise wieder zu vollständigen Organismen heran. Um den Protoplasten, die tatsächlich DNA aufgenommen haben, einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, benutzt man **Selektionsmarker**. Diese Strategie ist bereits von den Bakterien bekannt, in denen der Transfer z. B. der β-Lactamase zu ampicillinresistenten Stämmen führt. Da Ampicillin das Wachstum der Pilze nicht hemmt, werden in Pilzen andere Hemmstoffe, wie **Hygromycin** oder **Phleomycin**, als Selektionsmarker benutzt. Da diese Verbindungen einem Wildtyprezipientenstamm einen

Tab. 5.**2** **Selektionsmarker in Pilzen.**

Genname	*Funktion, codiertes Enzym*	*Bemerkungen*
rezessive Marker		
trpC	trifunktionales Enzym im Tryptophanstoffwechsel	komplementiert Tryptophanauxotrophie
argB	Ornithin-Carbamoyltransferase	komplementiert Argininauxotrophie
pyrG	Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase	komplementiert Pyrimidinauxotrophie
niaD	Nitratreductase	Wachstum mit Nitrat als Stickstoffquelle möglich
dominante Marker		
benA	codiert für benomylresistente Variante von β-Tubulin	wichtiger Hemmstoff zur Untersuchung von Tubulinfunktionen
hph	Kinase, phosphoryliert und inaktiviert dadurch Hygromycin	Hygromycin ist ein Translationshemmstoff aus *Streptomyces hygroscopicus*
ble	codiert für ein Protein, das Phleomycin bindet und dadurch inaktiviert	Phleomycin ist ein Glycopeptidantibiotikum aus *Streptomyces verticillus*, Block in der S-Phase der Mitose

Wachstumsvorteil in Gegenwart der Substanzen verschaffen, werden diese Marker als **dominant** bezeichnet. Allerdings sind diese Marker nicht für alle Pilze geeignet. Deshalb werden oft auxotrophe Stämme benutzt, die z. B. einen Defekt in dem Ornithin-Carbamoyl-Transferase-Gen haben und deshalb nicht ohne Zugabe der Aminosäure Arginin wachsen können. Werden diese Mutanten mit einem Plasmid transformiert, das das entsprechende Gen enthält, kann eine positive Transformante auf einem Medium ohne Zugabe von Arginin wachsen und eine Kolonie bilden. Diese Marker werden als **rezessiv** bezeichnet. Ein anderes Beispiel sind Uracil-auxotrophe Stämme (Abb. 5.**7**). Selbstreplizierende Plasmide wurden bisher nur in einigen Pilzen gefunden, sodass in den meisten Fällen die transformierende DNA in das Genom des Pilzes integrieren muss, damit eine stabile Weitervererbung gewährleistet ist.

Anpassung an den pH-Wert: Viele filamentöse Pilze sind in der Lage unter sehr verschiedenen pH-Bedingungen zu leben. *A. nidulans* wächst sowohl bei pH2 als auch bei pH12. Obwohl der intrazelluläre pH-Wert konstant gehalten wird, ist eine Anpassung an verschiedene äußere pH-Werte erforderlich, wenn z. B. Exoenzyme mit verschiedenen pH-Optima sezerniert werden sollen oder es sich um membranständige Proteine handelt, deren aktives Zentrum auf der extrazellulären Seite liegt. In *A. nidulans* gibt es z. B. eine sezernierte Phosphatase, die ihr pH-Optimum im sauren Milieu hat, während eine andere besser im alkalischen funktioniert. Deshalb sollte die Expression der sauren Phosphatase nur unter sauren Bedingungen zugelassen werden. Das erfordert entweder zwei Regulationswege oder die gleichzeitige Hemmung des einen und Aktivierung des anderen Weges durch einen Regulator. Die Analyse von Mutanten ergab, dass in der Natur die letzte, elegantere Lösung gewählt wurde: *A. nidulans*-Stämme verhielten sich als seien sie im alkalischen Milieu gewachsen und exprimierten alkalische Phosphatase unter sauren Bedingungen. Die molekulare Analyse der Mutanten zeigte, dass es eine **Signalkas-**

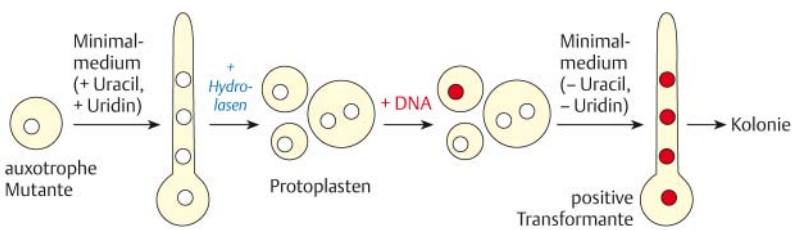


Abb. 5.**7** **Transformation von filamentösen Pilzen.** Uracil-auxotrophe Stämme mit einem Defekt in der Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase wachsen nur in Medien, die Uracil und Uridin enthalten. Werden diese Mutanten mit einem Plasmid transformiert, welches das Gen für eine intakte Decarboxylase enthält, kann eine positive Transformante auf einem Medium ohne Zugabe von Uracil und Uridin wachsen. Zusammen mit den Selektionsmarkergenen können andere Gene eingebracht werden, deren Effekte studiert werden sollen. Zunächst werden die Zellwände der Pilze durch hydrolytische Enzyme abgebaut, sodass einzellige Protoplasten entstehen, die von einer Membran und Zellwandresten umgeben sind. Durch Inkubation der Protoplasten mit DNA in Gegenwart von Polyethylenglycol wird die DNA in die Zellen aufgenommen und bis in die Zellkerne transportiert, wo sie sich in die Chromosomen integriert.

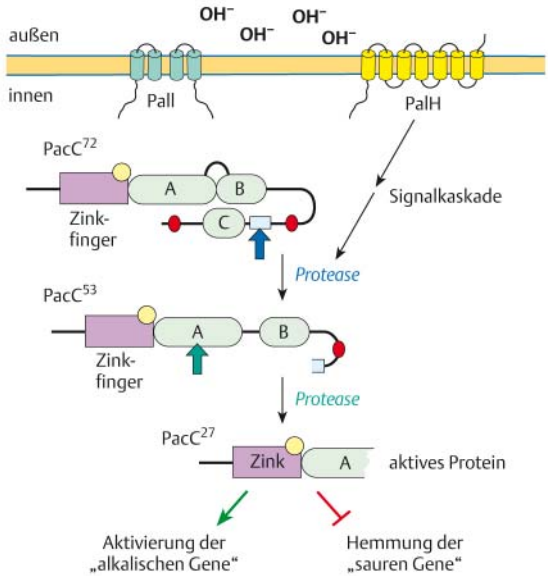


Abb. 5.8 **Regulation der Anpassung an verschiedene pH-Werte in *A. nidulans*.**

kade gibt, die durch **Hydroxidionen** stimuliert wird. Eine zentrale Komponente ist der Transkriptionsfaktor **PacC**, der zweimal durch Proteolyse prozessiert wird. Durch die Signalkaskade wird eine Protease aktiviert, die einen Teil des C-Terminus von PacC abschneidet. Dadurch wird eine zweite Schnittstelle im Protein freigelegt, an der eine weitere Protease schneidet. Das aktive Protein wird freigesetzt und wirkt im Zellkern als Aktivator der „alkalischen“ und als Repressor der „sauren“ Gene.

Die Etablierung gentechnologischer Methoden hatte nicht nur wichtige Konsequenzen für ein besseres Verständnis der Biologie von Pilzen, sondern erweiterte auch das Anwendungspotential. Während bisher nur die in Pilzen natürlich vorkommenden Prozesse oder Proteine genutzt wurden, wie die Gewinnung von Penicillin oder die Verwendung von *A. oryzae* in der Sakeherstellung, ist es jetzt möglich z. B. auch Proteine von anderen Organismen in Pilzen zur Expression zu bringen und von dort zu isolieren.

5.3 Alternative Wuchsformen: Hefe oder Hyphe?

Wenn Pilze wachsen, muss nicht nur das Cytoplasmavolumen und die Membran vergrößert werden, sondern die festen Zellwände müssen ebenso mitwachsen. Das **Wachstum** findet gleichmäßig an allen Stellen einer Zelle oder sehr lokal begrenzt statt. Während im ersten Falle rundliche Zellen entstehen, bilden sich im zweiten Falle die typischen langen Röhren der filamentösen Pilze. Das detaillierte Verständnis des Mechanismus und der

Kontrolle des Wachstums sind zentrale Fragen der modernen Zellbiologie. Forscher hoffen, mit dem Verständnis des pilzlichen Wachstums einen Schlüssel zur Kontrolle pathogener Pilze zu erhalten.

Es können zwei wesentliche **Wuchsformen** der Pilze unterschieden werden, das hefeartige und das bei mehr als 99 % aller Pilze vorkommende filamentöse Wachstum (Abb. 5.**9**).

Der Vorgang der Tochterzellenbildung bei **Hefen** wird auch **Knospung** oder **Sprossung** genannt und die entsprechenden Hefen als **Sprosshefen**. Beim Wachstum einer fast kugeligen Zelle der Bäckerhefe *S. cerevisiae* kommt es zunächst zu einer gleichmäßigen Zunahme des Volumens (**isotropes Wachstum**) bis eine kritische Größe erreicht ist. Dann wird das Wachstum nur noch an einer Stelle fortgesetzt und es bildet sich eine kleine Ausstülpung (**anisotropes Wachstum**). Diese kleine Knospe vergrößert sich dann zunehmend, der Zellkern teilt sich im Knospenhals, sodass sowohl die Mutter- als auch die Tochterzelle einen Zellkern erhalten. Auch die anderen Zellorganellen werden vermehrt und auf beide Zellen verteilt. Wenn die Tochterzelle eine bestimmte Größe erreicht hat, werden die beiden Zellen voneinander getrennt und der Vorgang beginnt von Neuem, wobei auch die Tochterzelle neue Nachkommen bildet. Die ursprüngliche Mutterzelle kann mehrere Male, aber nicht unbegrenzt, neue Tochterzellen produzieren und sich dadurch schnell vermehren. Unter günstigen Lebensbedingungen benötigt eine Zelle etwa 100 min zur Produktion einer Tochterzelle, sodass sich die Zahl der Hefezellen in einer Suspension nach 100 min verdoppelt. An der Stelle, an der die Tochterzelle freigesetzt wurde, bleibt eine **Narbe** zurück (Abb. 5.**1a**). Die Zahl der Narben auf der Oberfläche einer Hefezelle ist somit ein Zeichen dafür, wie viele Tochterzellen diese Zelle bereits hervorgebracht hat. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kann sowohl als haploider als auch als diploider Organismus leben und sich durch Sprossung vermehren. Allerdings unterscheidet sich das jeweilige Knospungsmuster. **Haploide** Hefezellen knospen **axial**, d. h. eine neue Knospe entsteht meistens in der Nähe der vorherigen Knospe an einem Pol der Zelle. Demgegenüber findet die Knospung bei **diploiden** Hefezellen mit unterschiedlichen Paarungstypen (a/α) **bipolar** statt, d. h. eine neue Knospe wird am zur vorigen Knospe gegenüberliegenden Pol der Zelle gebildet. Die Etablierung dieser Polarität der Hefezelle ist eine grundsätzliche Frage und wird von vielen Forschergruppen untersucht. Den Sprosshefen werden die **Spalthefen** gegenübergestellt, die sich ähnlich den Bakterien durch **Zweiteilung** einer Zelle vermehren. Zu dieser Gruppe gehört der Pilz *S. pombe*, der ebenso wie die Bäckerhefe in vielen Laboren zur Lösung zellbiologischer Fragen benutzt wird.

Anders als einzellige Hefezellen wachsen filamentöse Pilze durch kontinuierliche Verlängerung ihrer Hyphenspitze. In einiger Entfernung hinter der sich verlängernden Spitze werden Verzweigungen gebildet, so dass sich ein Myzel in alle

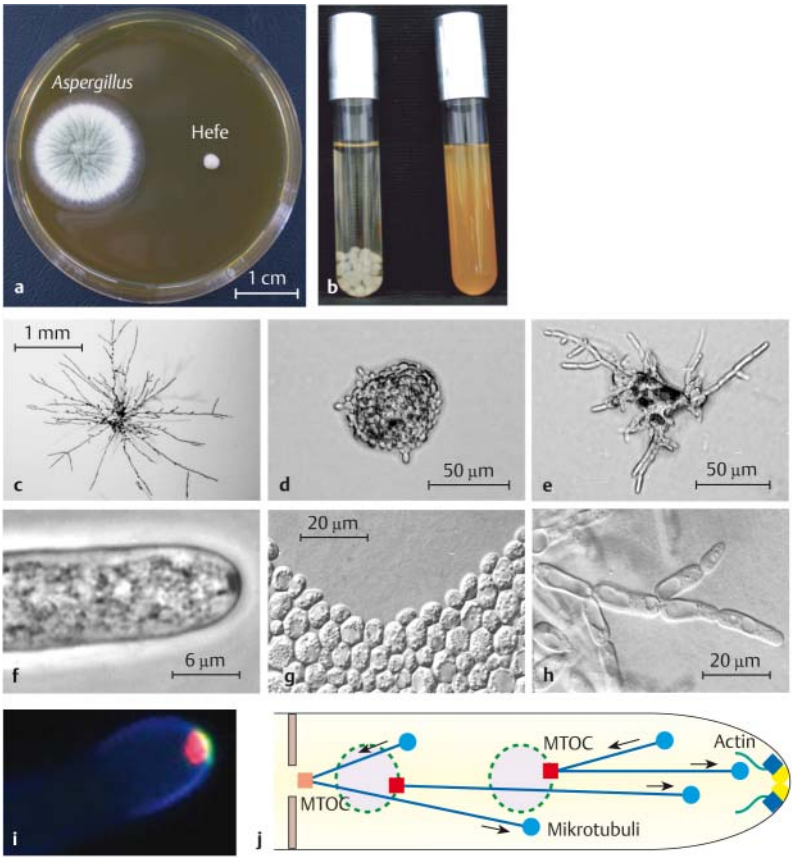


Abb. 5.9 **Vergleich des filamentösen Wachstums von *A. nidulans* mit dem Knospungswachstum der Bäckerhefe *S. cerevisiae*.** **a** Beide Organismen wurden auf einer Agarplatte inokuliert und 3 Tage bei 30°C bebrütet. Während die Kolonie des filamentösen Pilzes (links) einen Durchmesser von ca. 3 cm erreicht hat, ist die Hefekolonie viel kleiner geblieben. **b** Vergleich des Wachstums in einer Flüssigkultur für 20 Stunden bei 30°C. Der filamentöse Pilz hat kleine Myzelbällchen gebildet, während die Hefekultur zu einer homogenen Suspension herangewachsen ist. **c** Mikrokolonie von *A. nidulans* auf einer Agarplatte nach 16 Stunden Wachstum. **f** Die Hyphenspitzen verlängern sich kontinuierlich mit einer Rate von etwa 1 µm pro min. Der Spitzenkörper ist in dieser Zelle von *N. crassa* gut als lichtbrechende Struktur an der Spitze zu erkennen. **d** Im Vergleich bildet eine Hefezelle auf einer Agarplatte nach 16 Stunden nur eine wenige Mikrometer große Minikolonie. **g** Der Rand der Kolonie ist relativ glatt und besteht aus aneinanderstoßenden Hefezellen. **e, h** Unter bestimmten Bedingungen sind die Hefezellen in der Lage Pseudohyphen zu bilden. Dadurch erscheint der Kolonierand hyphenartig. **h** Bei höherer Vergrößerung ist zu erkennen, dass sich die Hefezellen nach der Knospung nicht voneinander getrennt haben.

i An der äußersten Hyphenspitze verankerte „Zellendmarkerproteine“ sind für die Richtung des Hyphenwachstums wichtig. Hier wurde ein Protein mit GFP und eins mit RFP sichtbar gemacht. **j** Cytoskelett und polares Wachstum in *A. nidulans*. Mikrotubuli werden von MTOCs am Zellkern und am Septum polymerisiert. Sie sind ständig im Umbau begriffen und wachsen vom MTOC weg oder schrumpfen. Die Plus-Enden der Mikrotubuli transportieren die Zellendmarkerproteine zur Hyphenspitze. Von dort ausgehend werden Actinfilamente gebildet, die für die Sekretion von Enzymen für die Zellwandsynthese wichtig sind. (Aufnahmen: a, b von S. Herrero de Vega, Karlsruhe; c von N. Sievers, Marburg; d, e, g, h von H. U. Moesch, Göttingen; f von M. Riquelme, Universität Riverside, CA, USA.; i von N. Takeshita, Karlsruhe)

Richtungen ausbreitet. Mit den beiden unterschiedlichen Wuchsformen, dem einzelligen Hefewachstum und dem **fädigen Hyphenwachstum**, sind die Pilze an unterschiedliche Lebensräume angepasst. Während Hefen vor allem auf Fruchtoberflächen und nach der Fruchtreife in den Fruchtsäften vorkommen, sind filamentöse Pilze hauptsächlich auf festen Substraten zu finden. Ihre oft viele Meter langen Hyphen würden durch Strömungen im Wasser leicht verletzt und sind deshalb auf das Bewachsen von festen Oberflächen spezialisiert. Filamentöse Pilze breiten sich durch ständige Verlängerung der Hyphenspitze in einem Substrat aus, sie durchwachsen ein Biotop und erschließen damit neue Nahrungsquellen. Die typischen Bodenbewohner können mehr als 90 % der mikrobiologischen Biomasse ausmachen.

Wie erfolgreich das Hyphenwachstum sein kann, wird durch einen Befund aus Kanada belegt. Hier wurde ein Myzel von *Armillaria bulbosa* (Hallimasch) gefunden, dass sich über eine Fläche von 15 Hektar mit einem Flächendurchmesser von bis zu 600 m im Boden ausgebreitet hatte. Da mit molekularen Methoden in diesem Falle alle Zellen auf eine einzelne Zelle zurückgeführt werden können, also alle Zellen genetisch identisch sind, ist dies das **größte Lebewesen auf Erden**. Die geschätzte Pilzmasse dieses Individuums beträgt mehr als 10 000 kg. Aus der Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphen und dem Radius des Myzels wurde ein Alter des Pilzes von 1500 Jahren berechnet.

Eine Voraussetzung des polaren Hyphenwachstums ist die Vergrößerung der Zellhülle, was wahrscheinlich ein „Aufweichen“ und eine Neusynthese der Zellwand erfordert. Enzyme, wie Chitinsynthasen, werden in der Zelle synthetisiert und in Vesikeln zur Hyphenspitze transportiert, die dort mit der Zellmembran verschmelzen. An der Spitze aktiv wachsender Pilzzellen ist eine Anhäufung solcher Vesikel zu sehen, die als **Spitzenkörper** bezeichnet und direkt mit der Hyphenverlängerung in Verbindung gebracht wird (Abb. 5.**2e**, Abb. 5.**9d**). Andere Organellen wie Zellkerne oder Mitochondrien werden ebenfalls aktiv in Wachstumsrichtung transportiert. An der intensiven Vesikel- und **Organellenwanderung** in Wachstumsrichtung sind Cytoskelettelemente beteiligt (Abb. 5.**2k**, **l**). Dabei werden vermutlich für den Langstreckentransport **Mikrotubuli** mit konventionellem **Kinesin** als Motorprotein verwendet, sodass die Vesikel zum Spitzenkörper transportiert werden. Von dort gelangen sie mit Hilfe von **Myosin** entlang von **Actinfilamenten** zur Zelloberfläche. Die Cytoskelettkom-

ponenten bilden gewissermaßen die Schienen für den Transport, Motorproteine wandeln die chemische Energie (ATP) in mechanische Energie um und katalysieren die Bewegung der Vesikel und Organellen entlang der Schienen. Organellenbewegung ist auch in anderen Eukaryoten von großer Bedeutung. Da in Pilzen jedoch viele analytische Methoden zur Verfügung stehen, die in höheren Eukaryoten nicht verwendet werden können, sind sie hervorragende Modellsysteme, um die Zusammenhänge zu erforschen.

5

Viele Forscher sind dem molekularen **Mechanismus des polaren Wachstums** auf der Spur. Einerseits ist es eine spannende grundlegende Frage, wie eine Zelle polarisiert wird, woher sie „weiß", wo sie wachsen muss und wo nicht. Andererseits erhofft man sich aber auch durch ein genaues Verständnis des Phänomens neue Angriffspunkte zu finden, um das Pilzwachstum pathogener Pilze oder Lebensmittel verderbenden Schimmelpilze zu verhindern. Die sekretorischen Vesikel, die die Moleküle zur Zellwandsynthese enthalten, werden entlang des Cytoskeletts zur Hyphenspitze transportiert. Eine zentrale Frage ist also, wie die Cytoskelette organisiert werden. Am besten ist das in *S. pombe* verstanden. Hier wurden sogenannte **Zellendmarkerproteine** isoliert, die am wachsenden Zellende lokalisiert sind und für das Wachstum benötigt werden. Ein zentrales Protein, **Mod5**, ist mit einem kovalent gebundenen Lipidrest in der Membran verankert und rekrutiert seinerseits mehrere Proteine, von denen eines die Bildung von Actinfilamenten katalysiert. Dieses Modell ist, neuesten Erkenntnissen zufolge, auch für filamentöse Pilze gültig. Die Frage, wodurch Mod5 wiederum die Membran an der Zellspitze „erkennen" kann, ist zwar noch ungelöst, aber es deutet sich an, dass es spezielle Membranbereiche gibt, die sich durch eine hohe Konzentration an Sterolen auszeichnen.

Das extrem polare Wachstum der filamentösen Pilze hat Konsequenzen. Während die einzelligen Hefezellen physiologisch sehr einheitlich sind, kann die Aktivität in Hyphenkompartimenten sehr unterschiedlich sein. Die apikale Hyphenzelle ist stoffwechselphysiologisch sehr aktiv, wohingegen ältere, weiter basal liegende Hyphenzellen von der Spitzenzelle sehr verschieden sein können. Ein zweites Problem wird beim Wachstum filamentöser Pilze in Flüssigmedium deutlich, wo sie keine homogene Zellsuspension, sondern Myzelbällchen bilden. Diese Myzelknäuel sind im Inneren relativ inaktiv, da die Nährstoffe nur langsam ins Innere diffundieren und auf dem Weg durch die äußeren Hyphen bereits aufgebraucht werden. Diese Eigenschaften erschweren den Einsatz filamentöser Pilze in der Biotechnologie.

Einige Pilze wachsen sowohl als einzellige Hefe als auch in einer Hyphen- oder hyphenähnlichen Form. Das Phänomen wird als **Dimorphismus** bezeichnet. Während sich die Bäckerhefe *S. cerevisiae* in flüssigen Habitaten durch Knospung vermehrt, bildet sie **Pseudohyphen** aus, wenn sie auf einem festen Substrat wächst und die Nahrungsressourcen das Wachstum limitieren (Abb. 5.**9**). Mit den polar wachsenden Pseudohyphen „erkundet" der Organismus die Umgebung und „sucht" nach neuen Nahrungsquellen. Bei dem Rostpilz *Ustilago maydis* ist die filamentöse Phase an das Wachstum in der Pflanze gekoppelt und damit ein Pathogenitätsfaktor. Das Gleiche gilt für den humanpathogenen Pilz *C. albicans*, der in der pathogenen Form als filamentöser Pilz wächst.

Isotropes Wachstum: Größenwachstum durch gleichmäßige Volumenzunahme der Einzelzelle.
Anisotropes Wachstum: Knospenbildung an der Mutterzelle führt zur Entstehung einer Tochterzelle.
Vermehrung von Hefezellen:
- **Sprosshefen:** Bilden Tochterzellen durch Knospung (Sprossung) an der Mutterzelle.
- **Spalthefen:** Vermehren sich durch Zweiteilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen.

Spitzenkörper: Anhäufung von Vesikeln an der Spitze wachsender Pilzhyphen, enthalten Enzyme für die Zellwandsynthese.
Organellenwanderung: Vesikel wandern zur Hyphenspitze und fusionieren dort mit der Cytoplasmamembran. Die ständige Verlängerung der Hyphen an der Spitze erfordert, die Wanderung der Zellkerne, der Mitochondrien und anderer Organellen in Wachstumsrichtung.
Dimorphismus: Wechsel zwischen Hyphenform und Wachstum als Einzelzellen bei einigen Pilzen.

5.4 Sporenbildung

Da Pilze unbewegliche, heterotrophe Organismen sind, haben sie Strategien entwickelt, um nach Verbrauch einer Nahrungsquelle neue Habitate zu besiedeln oder „schlechte", nahrungslose Zeiten zu überdauern. Beide Überlebensstrategien sind bei den Pilzen durch die Bildung verschiedener **Sporen** verwirklicht.

Obwohl sich filamentöse Pilze durch ihr Hyphenwachstum über weite Strecken ausbreiten können, sind die Distanzen doch von dem Vorhandensein von Nahrungsquellen „auf dem Weg" abhängig. Deshalb bilden viele filamentöse Pilze Sporen, mit denen sie sich über große Distanzen unabhängig von Nährstoffen effektiv ausbreiten können. Die Sporen werden in Fruchtkörpern gebildet, die aus dem Substrat heraus in den Luftraum wachsen und so gewährleisten, dass die Sporen durch Wind oder durch Wasser transportiert werden.

Pilzliche Sporen werden mitotisch (asexuell) oder meiotisch (sexuell) gebildet, und häufig ist ein Pilz sogar in der Lage, beide Sporenarten zu bilden. Die Produktion von Sporen erfolgt an speziellen Sporenträgern bzw. in Fruchtkörpern, die teilweise sehr komplex aufgebaut sein können. Die Morphogenese der Strukturen ist ein faszinierendes Beispiel eukaryotischer Entwicklungsvorgänge. Ein anschauliches Beispiel stellt der Schimmelpilz *A. nidulans* dar. Das Myzel dieses Pilzes wächst saprotroph im Boden und setzt organisches Material um. Durch das Hyphenwachstum breitet sich der Pilz im Boden aus. Gelangt das Myzel aber an die Bodenoberfläche, wird ein Entwicklungsprogramm angeschal-

tet als dessen Endprodukt **asexuelle Sporen** an speziellen morphologischen Strukturen, den **Konidiophoren**, gebildet werden (Abb. 5.**10**). Im Labor dauert diese Entwicklung etwa 20 h und kann leicht verfolgt werden. Zunächst wächst aus einem Hyphenkompartiment ein Stielchen aus, das sich senkrecht zum Substrat in den Luftraum erhebt, terminal anschwillt und an der Vesikeloberfläche eine Lage von Zellen, die **Metulae**, bildet. Diese produzieren die **Phialiden**, die

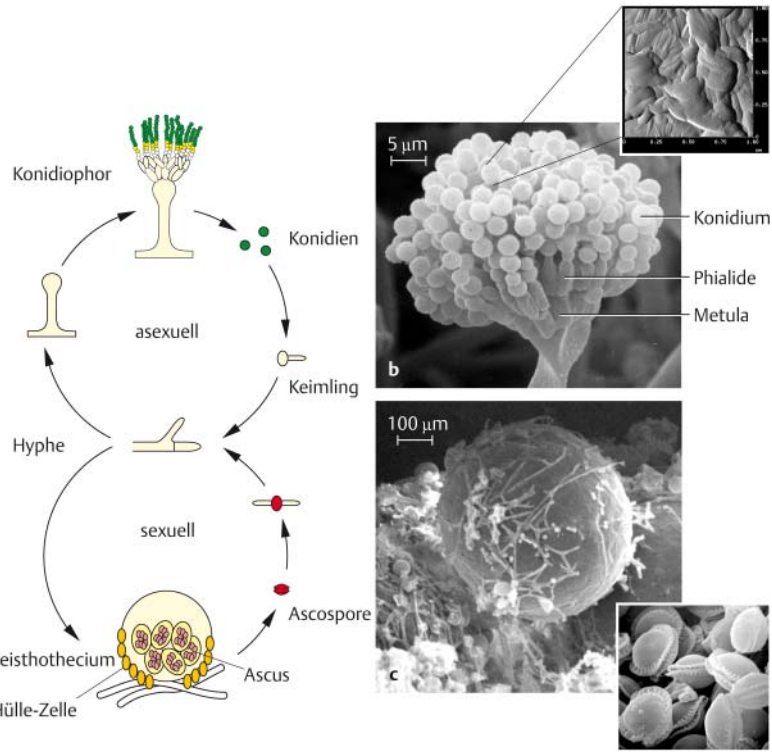


Abb. 5.**10** **Asexuelle und sexuelle Sporenbildung in *A. nidulans*. a** Während der asexuellen Entwicklung entsteht aus einem Hyphenkompartiment ein Konidiophor, der kontinuierlich asexuelle Sporen bildet. Bei dem sexuellen Entwicklungszyklus von *A. nidulans* werden die Kleistothecien gebildet, in denen die Zellkerne verschmelzen und meiotische Ascosporen entstehen. Die Kleistothecien sind von dickwandigen Hülle-Zellen umgeben. **b** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors und Darstellung des Hydrophobinbelages auf den Sporen. Diese Aufnahme wurde mit einem Kraftmikroskop gemacht. **c** Bild eines Kleistotheciums. Das kleine Bild zeigt reife Ascosporen. (Aufnahmen: b von D. Galetzka, Marburg und D. Veith, Karlsruhe; c von M. Krüger in Zusammenarbeit mit G. Kost, Marburg)

die eigentlichen sporenbildenden Zellen darstellen. Es werden schließlich lange Sporenketten, die **Konidien**, produziert, wobei die älteste Spore jeweils an der Spitze einer Kette zu finden ist. Die Konidien sind grün pigmentiert und verleihen den Schimmelpilzen das typische grüne Aussehen, wenn sie z. B. auf unseren Lebensmitteln wachsen. Das Einleiten des Entwicklungsprogramms erfolgt durch Licht und durch Exposition an einer Wasser-Luft-Grenzfläche. Das garantiert, dass die Sporen dem Wind ausgesetzt sind und leicht verbreitet werden können.

Regulation der asexuellen Sporenbildung in *A. nidulans*: Die Konidien von *A. nidulans* sind einkernig und haploid. Daher sind sie hervorragend für **Mutageneseexperimente** geeignet. Wenn eine Veränderung des Erbgutes einen sichtbaren Defekt in der Entwicklung des Konidiophors bewirkt, dann kann der Effekt der Mutation direkt an der sich entwickelnden Kolonie beobachtet werden (Abb. 5.**11**, 5.**5**). Deshalb wurde diese Strategie benutzt, um Defektmutanten zu isolieren, die keine vollständigen Konidiophore mehr bilden. Die *bristle*-Mutante initiiert zwar das Entwicklungsprogramm, aber nach der Bildung von Stielchen bleibt die weitere Entwicklung aus. Das borstenartige Aussehen verlieh der Mutante den Namen *bristle* (= Borste). In der *abacus*-Mutante differenzieren sich die Phialiden nicht, so dass auch keine Konidien entstehen. Das Erscheinungsbild der veränderten Phialiden erinnert an eine chinesische Rechenmaschine (= Abacus) was zur Namensgebung führte. In anderen Mutanten entstanden vollständige Konidiophoren, aber die Pigmentierung war verändert. Die Konidien waren gelb oder weiß. Nach Etablierung molekularbiologischer Techniken in *A. nidulans* war es möglich, die den Mutationen zugrunde liegenden Gene zu analysieren. Diese Untersuchungen ergaben Hinweise, dass die Entwicklung durch eine zentrale **Kaskade von Transkriptionsfaktoren**, wie *bristle* und *abacus,* gesteuert wird, die erst während der Differenzierung induziert werden und ihrerseits andere Gene, wie die Strukturgene für die Pigmentbiosynthese, in der Expression steuern.

A. nidulans kann neben dieser asexuellen Entwicklung auch einen **sexuellen Entwicklungszyklus** durchlaufen. Das kann nach einer erfolgten Kreuzung verschiedener Stämme durch **Hyphenfusion** oder auch durch **Selbstbefruchtung** in einem Stamm geschehen. Es werden spezielle morphologische Strukturen, die **Kleistothecien**, gebildet, in denen die Zellkerne zur diploiden Phase verschmelzen und anschießend meiotische **Ascosporen** entstehen. Dieser Entwicklungszyklus wird eingeleitet, wenn die Nahrungsquellen versiegen. Die widerstandsfähigen Ascosporen können jahrzehntelang im Boden überdauern und so „abwarten“ bis neue Nahrung in den Boden eingetragen wird. Aufgrund der sexuellen Fruchtform wird die Pilzgattung mit *Emericella* bezeichnet. Gebräuchlicher ist aber heute sowohl für die asexuelle als auch für die sexuelle Form der Name *Aspergillus*.

Anders als in *A. nidulans,* in dem es nach der Hyphenverschmelzung zur Heterokaryonbildung und in den Fruchtkörpern zur Diploidisierung kommt, gibt es in *Neurospora crassa* ein „weibliches“ Organ, das **Ascogon**, das mittels einer **Trichogyne** durch „männliche“ Sporen befruchtet wird. Ausgehend von der befruchteten Zelle wird der Fruchtkörper differenziert.

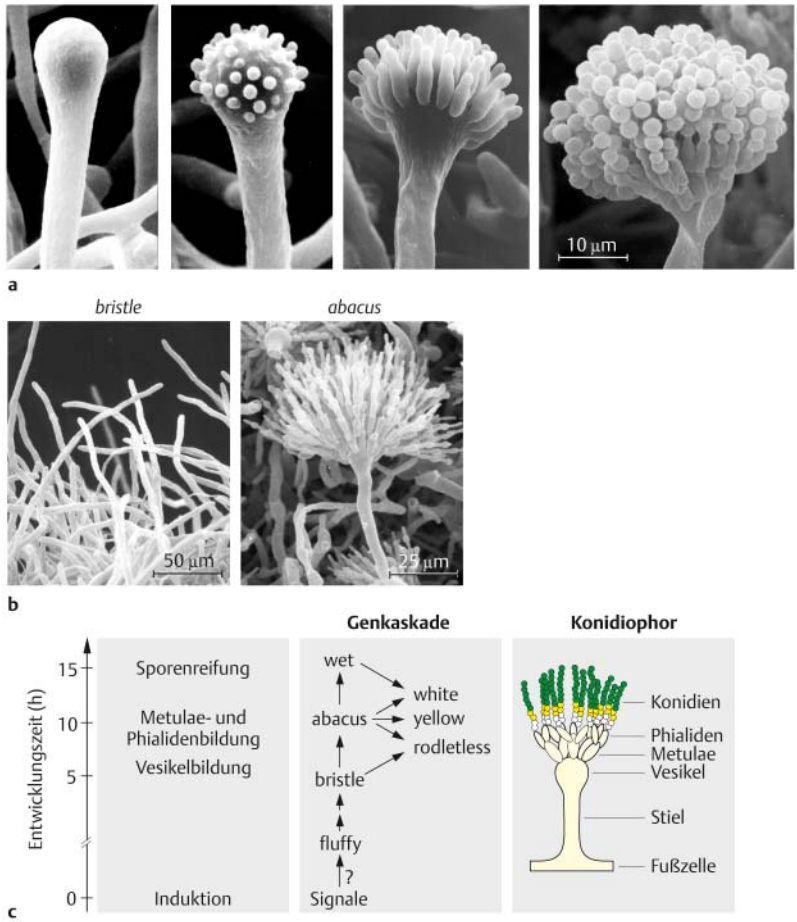


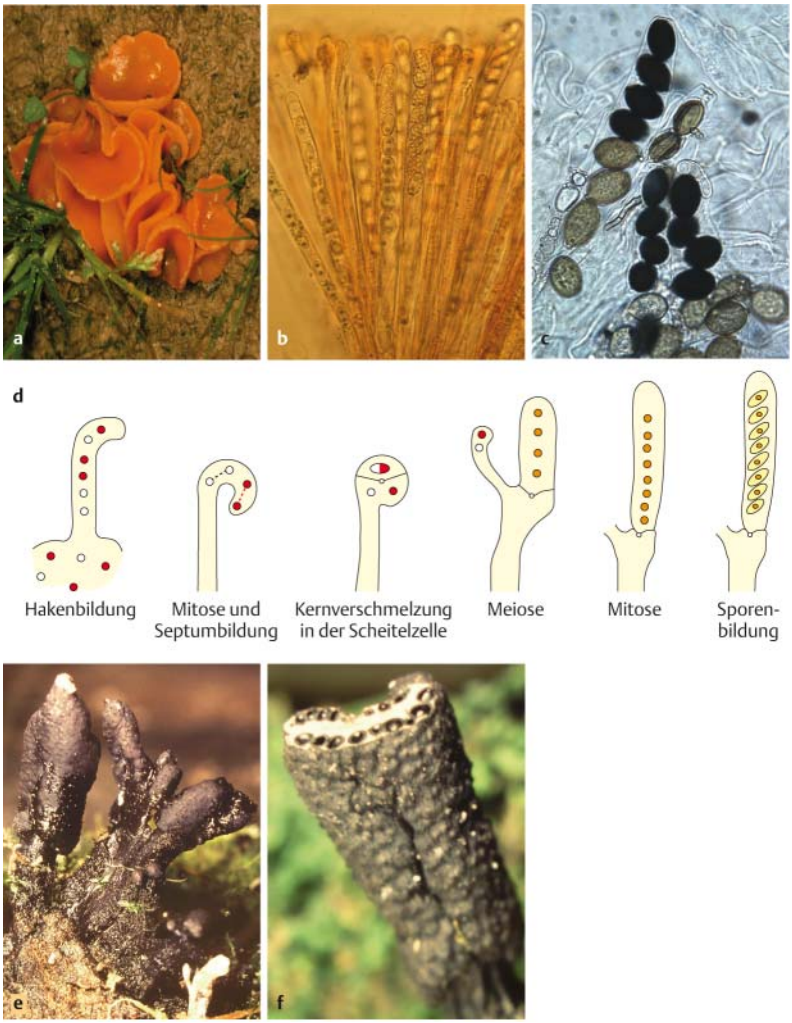
Abb. 5.**11** **Konidiophorentwicklung. a** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Konidiophorentwicklung von *A. nidulans*. Zunächst wächst eine Hyphe als Stielchen in den Luftraum und schwillt terminal zu einem Vesikel an (linkes Bild). In einem knospungsähnlichen Vorgang werden Metulae gebildet (mittlere beiden Bilder), die bis zu drei Phialiden produzieren (rechtes Bild). Diese schnüren kontinuierlich einkernige Konidiosporen ab. **b** In der *bristle*-Mutante werden nur Stielchen gebildet, während die *abacus*-Mutante sich bis zu den Phialiden weiter entwickelt. Die Phialiden differenzieren sich aber nicht und produzieren keine Sporen. **c** Regulation der Konidiophorbildung. Eine zentrale Kaskade von Transkriptionsfaktoren steuert Strukturgene, die für die Ausbildung des Konidiophors notwendig sind. (Aufnahmen: *bristle*-Mutante von M. Krüger, *abacus*-Mutante von M. Karos in Zusammenarbeit mit G. Kost, Marburg)

Die Bildung der Ascosporen in den Asci zeichnet alle Ascomyceten aus (Abb. 5.**12**). Allerdings können die Fruchtkörper der mehr als 30 000 bekannten Arten sehr verschieden ausgeprägt sein. Während sie in *A. nidulans* geschlossen sind und Kleistothecien genannt werden, haben sie beim orangeroten Becherling *Aleuria aurantia* ein scheibenförmiges Aussehen und werden als **Apothecien** bezeichnet. Einige weitere Vertreter der Ascomyceten sind die Hefe *S. cerevisiae*, aber auch die Herbstlorchel *Helvella crispa* und die Trüffel *Tuber macrosporum*.

Während bei den Ascomyceten die Sporen in einem Schlauch, dem **Ascus**, gebildet werden, entstehen die Sporen bei den Basidiomyceten als Ausstülpung einer Zelle, der **Basidie** (Abb. 5.**13**). Diese Struktur hat der Klasse der Basidiomyceten, zu der mehr als 13 000 Arten gezählt werden, den Namen gegeben. Die Basidie ist eine spezielle Zelle, in welcher der diploide Zellkern eine Meiose durchführt. An der Spitze der Basidie kommt es dann zu vier Ausstülpungen, auf denen schließlich je eine **Basidiospore** gebildet wird, in die jeweils ein haploider Zellkern einwandert. Die Basidien sind meistens zu vielen Tausenden in einer Fruchtschicht, dem **Hymenium**, angeordnet. Das Hymenium ist bei verschiedenen Pilzen unterschiedlich angeordnet und ein wichtiges Bestimmungsmerkmal. Bei den Lamellenpilzen, zu denen der Fliegenpilz *Amanita muscaria,* der rötliche Holzritterling *Tricholomopsis rutilans* oder der Speisechampignon *Agaricus bispora* gehören, ist die Fruchtschicht auf den Lamellen aufgelagert. Bei den Röhrenpilzen, zu denen der Steinpilz *Boletus edulis* oder der Maronenröhrling *Xerocomus badius* zählen, kleiden die sporentragenden Basidien die Wände der Röhren aus. Die Zahl der Sporen, die von den großen Basidiomyzeten gebildet werden, ist enorm. So produziert der Hallimasch *Armillaria bulbosa* an einem einzigen Fruchtkörper bis zu 10^6 Sporen pro Stunde und das über mehrere Tage.

5.4.1 Pilze können sehen – Lichtwahrnehmung

Für die Verbreitung der Sporen vieler Pilze ist es extrem wichtig, dass das Entwicklungsprogramm nur dann durchlaufen wird, wenn sich die Sporen auch in der Umwelt ausbreiten können. D. h. der Pilz muss wahrnehmen, ob er im Substrat oder auf einer Oberfläche wächst. Ein Umweltparameter, der dazu geeignet ist, ist Licht. In ***A. nidulans*** werden nur im Licht große Mengen von asexuellen Sporen gebildet, während im Dunkeln hauptsächlich sexuelle Sporen entstehen. Die Reaktion ist von **rotem Licht** abhängig und es wurde vor Kurzem berichtet, das **Phytochrom**, ein typischer pflanzlicher Lichtrezeptor, eine Rolle in der **Lichtwahrnehmung** spielt. Demgegenüber „sieht" ***N. crassa*** **blaues Licht** und steuert damit die Carotinoidbildung in den Hyphen oder die Anpassung der inneren Uhr (s. u.). Es wurden zwei Mutanten isoliert, die kein Licht wahrnehmen können. Die entsprechenden Gene, *WC-1* und *WC-2,* wurden kloniert. Interessanterweise codieren beide Gene für Transkriptionsfaktoren, wovon eines der beiden Pro-



teine ein **Flavin** als Chromophor besitzt (Abb. 5.**14**). Vermutlich bewirkt die Lichtanregung des Flavins kleine Konformationsänderungen im Protein, die ausreichen, um die Aktivität des Transkriptionsfaktors zu verändern und dadurch spezielle Gene in ihrer Aktivität zu steuern. Homologe Proteine existieren auch in *A. nidulans* und anderen Pilzen und werden dort auch als Blaulichtrezeptoren genutzt. Neben den WC-Proteinen besitzt *N. crassa* noch andere mögliche Photo-

◀ Abb. 5.12 **Ascosporenbildung a** Fruchtkörper von ***Aleuria aurantia*, dem orangeroten Becherling** und (**b**) Querschnitt durch das Hymenium des Pilzes. **b** Bei hoher Vergrößerung sind acht Ascosporen in jedem Ascus erkennbar. **c** In *Sordaria macrospora* gibt es Mutanten mit verschieden farbigen Ascosporen. Nach einer Kreuzung sind die Meioseprodukte in einem Ascus linear angeordnet. **d** Ascosporenbildung. Nach erfolgter Dikaryotisierung verschmelzen zwei unterschiedliche Kerne in der Scheitelzelle zu einem diploiden Stadium. Die Endzelle verschmilzt wieder mit der Basalzelle, sodass eine erneute Ascusbildung von dieser dikaryotischen Zelle ausgehen kann. Der Vorgang kann viele Male wiederholt werden, bis ein Büschel von Asci entstanden ist. Im Ascus erfolgt eine meiotische Teilung, die zur Bildung von vier Meioseprodukten führt. Eine anschließende mitotische Teilung verdoppelt die Kerne, bevor diese in die Ascosporen „eingepackt" werden. In einigen Arten erfolgt eine weitere Mitose, sodass die Ascosporen schließlich zwei haploide Zellkerne enthalten. Wenn nur ein Merkmal betrachtet wird, verteilt sich dieses zu 50 % auf die Nachkommen (z. B. helle und dunkle Sporen in *Sordaria*, **c**). **e, f** Die Fruchtkörper der Ascomyceten können sehr unterschiedlich aussehen. Schneidet man die Holzkeule (*Xylaria*), so werden die becherförmigen Hymenien (Fruchtkörper) sichtbar, in denen die Asci vorliegen (f).

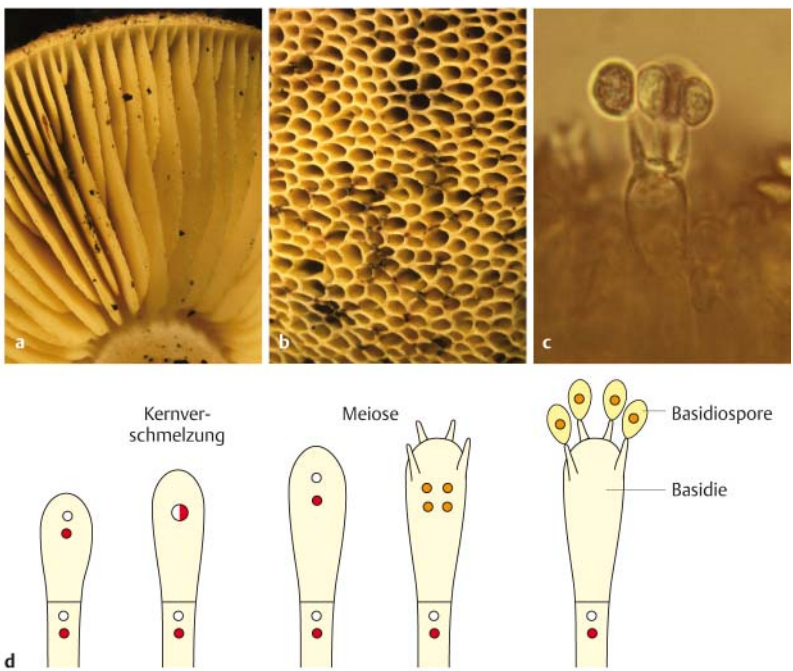


Abb. 5.13 **Basidiosporenbildung. a**, **b** Fruchtkörper eines Lamellen- und eines Röhrenpilzes von der Unterseite. **c** Bei hoher Vergrößerung sind einzelne Basidien mit vier Basidiosporen in den Hymenien zu erkennen. **d** Nach der meiotischen Teilung des diploiden Zellkerns bilden sich an der Spitze der Basidie vier Ausstülpungen. In die sich daraus bildende Basidiospore wandert jeweils ein haploider Zellkern ein.

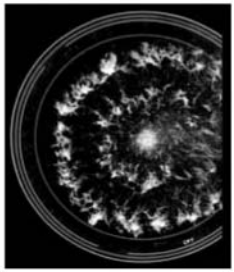
Ascomycota

Aspergillus nidulans



FphA (Phytochrom)
LreA (White-Collar-1 Homologes),
Cryptochrom*
NopA* (Opsin*)

Neurospora crassa



Phytochrom 1 & 2
White-Collar-1 (WC-1),
VIVID, Cryptochrom,
Nop1 (Opsin)

Zygomycota

Phycomyces blakesleeanus



MadA (WC-1 Homologes)

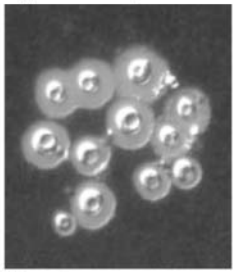
Basidiomycota

Coprinus cinereus



Dst1 (WC-1 Homologes)

Cryptococcus neoformans



Phytochrom
Bwc1 (WC-1 Homologes)
Nop1 (Opsin)

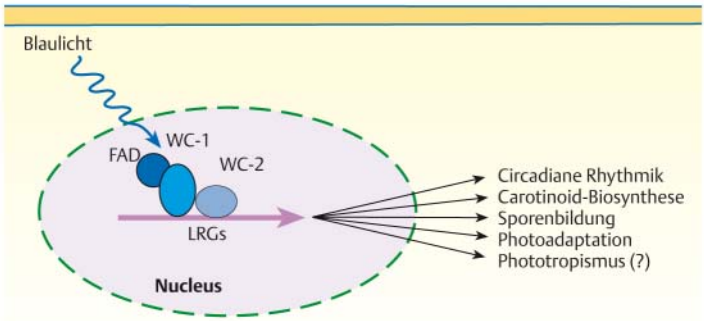
Myxomycota

Physarum polycephalum



Phytochrom

a



b

◀ Abb. 5.**14** **Lichtwahrnehmung in verschiedenen Pilzen. a** Das Vorhandensein verschiedener Photorezeptoren ist unter den Bildern angegeben. Vermutlich besitzen die meisten Pilze mehrere aktive Photorezeptoren. **b** Schema der Lichtregulation. Einer der beiden Transkriptionsfaktoren, WC-1, enthält ein Flavin (FAD) als sensorisches Pigment. Licht-regulierte Gene (LRGs) werden durch die Transkriptionsfaktoren reguliert (Purschwitz et al., 2006).

rezeptoren, die in seinem Genom codiert sind, ein weiteres flavinhaltiges Protein (**Vivid**), zwei **Phytochrome**, ein **Opsin** und ein **Cryptochrom**. Es gibt Hinweise, dass diese zusätzlichen Proteine auch als aktive Lichtrezeptoren fungieren.

5.4.2 Pilze haben eine innere Uhr

Die Rotation der Erde verursacht im 24-Stunden-Rhythmus Änderungen vieler Parameter (z. B. Licht, Temperatur), die für das Leben auf der Erde wichtig sind. Organismen, die in der Lage sind die Zeit zu messen, können sich physiologisch oder durch verändertes Verhalten, auf die zu erwartende Situation einstellen, bevor sie tatsächlich eintritt. Das verschafft ihnen einen großen Vorteil gegenüber Organismen, die die Zeit nicht messen können und immer von den wechselnden Bedingungen „überrascht" werden. Da sich die tageszeitlichen Rhythmen im Jahresverlauf ändern können, ist es nicht verwunderlich, dass die innere Uhr der Organismen durch äußere Einflüsse „angepasst" werden kann. Das Grundprinzip einer solchen **inneren Uhr** ist bereits in ***N. crassa*** verwirklicht. Dieser Pilz sporuliert im Tagesverlauf immer früh morgens, sodass sich vegetatives und sporulierendes Myzel auf einer Agarplatte abwechseln (Abb. 5.**15**). Wenn solch eine rhythmisch sporulierende Kultur unter konstant dunklen Bedingungen weiterkultiviert wird, bleibt das rhythmische Sporulationsmuster noch erhalten, was zeigt, dass die Sporulation durch eine innere Uhr und nicht nur durch das Tageslicht gesteuert wird.

Das zentrale Element jeder Uhr ist ein sogenannter **Oszillator**. Im Falle von *N. crassa* handelt es sich dabei um zwei Proteine namens **Frequency Frq** und **White Collar WC**. Diese Proteine werden transkriptionell und posttranskriptionell rhythmisch in der Aktivität durch negative Rückkopplung reguliert. WC-1 ist ein positiver Faktor und induziert die Transkription von Frq, das als negativer Faktor zum Abbau von WC-1 führt. Mit steigender Frq-Menge nimmt also die WC-1 Menge ab, wodurch die Aktivierung von Frq ausbleibt. Da das Frq-Protein nicht sehr stabil ist, nimmt dessen Menge jetzt rasch ab. Dadurch kann die WC-1-Konzentration wieder ansteigen. Die rhythmische Expression von Frq führt zur Induktion vieler nachgeschalteter Vorgänge. Im Dunkeln hat die freilaufende Uhr eine Periode von 22 h. Im natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus wird die Periode auf 24 h angeglichen. Diese Anpassung geschieht durch das WC-1 Protein, das als Lichtrezeptor fungiert. Die Molekularbiologie der inneren Uhr wird nicht nur in *N. crassa* sondern auch in *Drosophila melanogaster* und im Menschen untersucht.

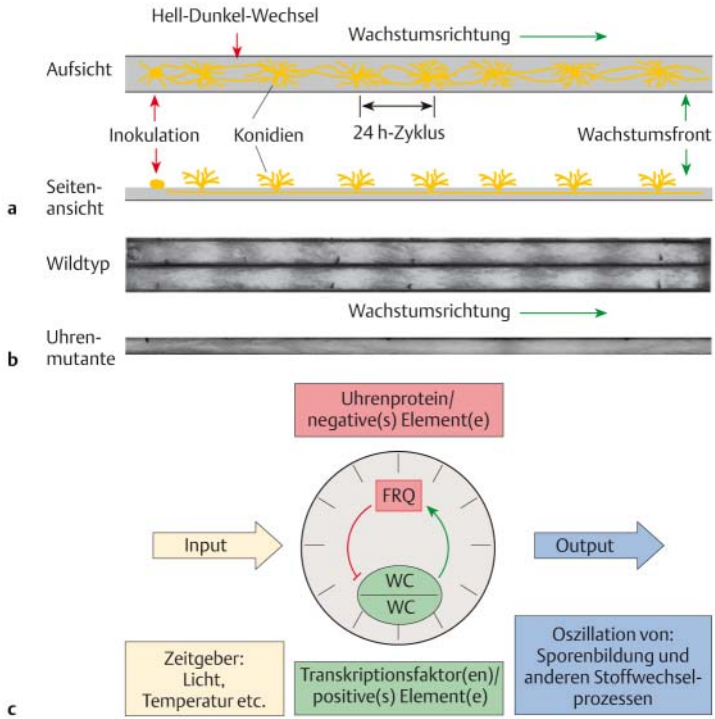


Abb. 5.**15** **Circadiane Rhythmik der Sporenbildung in *N. crassa*. a** In zwei Glasröhren, die zur Hälfte mit Agarmedium gefüllt sind, wird der Pilz inokuliert. **b** Immer morgens bildet er asexuelle Sporen, die als helle Zonen in den Röhren erkennbar sind. In einer Uhrenmutante sind diese Zonen nicht erkennbar. **c** Molekulare Prinzip einer inneren Uhr. (Nach M. Brunner und T. Schafmeier, Heidelberg)

5.4.3 Altersforschung bei Pilzen

Wenn eine Spore von *A. nidulans* oder von vielen anderen Pilzen auskeimt, wachsen die Hyphen solange weiter, bis keine Nährstoffe mehr verfügbar sind. Selbst nach Verbrauch der Nährstoffe stirbt der Pilz nicht gleich ab, sondern die vegetativen Hyphen können längere Zeit ohne Nährstoffe überdauern und wieder auskeimen. Die meisten Pilze verhalten sich so. Der Dungbewohner ***Podospora anserina*** bildet allerdings eine prominente Ausnahme. Keimen von diesem Pilz Ascosporen aus, wachsen die vegetativen Hyphen nicht unendlich lange, sondern nur für eine bestimmte Zeit: So beträgt bei einem Wildtypstamm die mittlere Lebensdauer 25 Tage. Mit zunehmendem Alter verlangsamt sich die Wachstums-

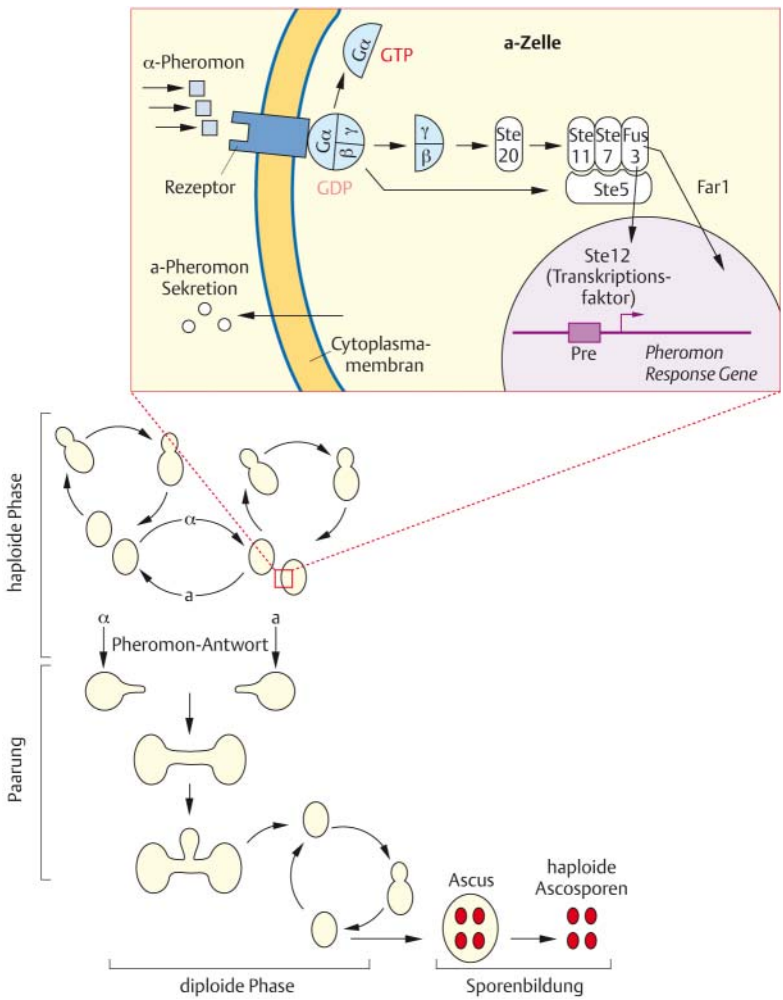
geschwindigkeit und der Pilz stirbt schließlich sogar ganz ab. Erst frisch gebildete Ascosporen wachsen wieder zu einer neuen Kolonie aus. Die Isolierung von Mutanten mit einer verkürzten oder verlängerten Lebensspanne deuteten schon vor einiger Zeit auf ein **genetisches Programm** hin. Allerdings sind auch nicht chromosomal vererbte Eigenschaften für die Länge der Lebensspanne verantwortlich. Die molekulare Analyse hat ergeben, dass die Funktion der **Mitochondrien** eine entscheidende Rolle spielt. Das Altern wird zurzeit in *P. anserina* und anderen Eukaryoten wie dem Fadenwurm, der Fruchtfliege und dem Menschen vergleichend untersucht.

5.4.4 Sex ja – Inzucht nein: Die Wahl des richtigen Partners

Der meiotischen Sporenbildung geht bei vielen Pilzen die Wahl eines geeigneten Partners voraus. Obwohl bei vielen Pilzen die Pilzhyphen genetisch verschiedener oder identischer Individuen miteinander verschmelzen und ein Heterokaryon bilden können, wird bei einigen Pilzen die Hyphenfusion und bei anderen die Einleitung des sexuellen Entwicklungszyklus nach erfolgter Zellverschmelzung auf molekularer Ebene reguliert und „selbst" von „nicht-selbst" unterschieden. Als Beispiele dieser **Geschlechtlichkeit** sollen die Bäckerhefe *S. cerevisiae* und der Rostpilz *U. maydis* vorgestellt werden. In diesen Organismen kommt es nur dann zu einer erfolgreichen sexuellen Vermehrung, wenn die **Paarungstypen** der Individuen unterschiedlich sind. Das gewährt, dass möglichst genetisch verschiedene Organismen eine sexuelle Vermehrung durchführen und damit alle Vorteile der Neu- und Rekombination während der Meiose ausgenutzt werden. Pilze, die zur erfolgreichen Vermehrung mittels eines sexuellen Zyklus einen Partner benötigen, werden als **heterothallisch**, Pilze, die ohne fremden Partner eine geschlechtliche Fortpflanzung durchführen können, werden als **homothallisch** bezeichnet. Interessanterweise wird das Geschlecht der Pilze nicht durch ein spezielles Geschlechtschromosom bestimmt.

S. cerevisiae bildet zwei verschiedene Paarungstypen, a und α, die mit männlich und weiblich bei den Tieren vergleichbar sind (Abb. 5.**16**). Eine a- und eine α-Hefezelle unterscheiden sich dabei nur in einem Locus, dem **Paarungstyplocus** (**MAT**). Hier werden regulatorische Proteine codiert, die die Expression von a- bzw. α-spezifischen Genen steuern. Wenn eine a- und eine α-Zelle aufeinandertreffen, wird der Zellzyklus unterbrochen und ein spezielles genetisches Programm angeschaltet. Das führt zu einer Reihe morphologischer Differenzierungen, wobei die haploiden Hefezellen einen Auswuchs (*shmoo*) bilden und aufeinander zuwachsen. Zunächst fusionieren die Zellen miteinander, bevor die Zellkerne aufeinander zuwandern und zum diploiden Stadium verschmelzen. Die gebildete Zygote kann sich nun vegetativ vermehren und diploide Tochterzellen bilden. Die Knospung erfolgt dabei oft an dem die beiden ursprünglich haploiden Zellen verbindenden Auswuchs. Die dort entstehenden diploiden Tochterzellen ähneln morphologisch den haploiden Hefezellen, sind allerdings

etwas größer. Wenn die Nahrungsressourcen im Medium abnehmen, wird in diploiden Zellen die Sporenbildung induziert. Dabei kommt es zu einer Meiose, in der vier haploide Tochterkerne entstehen. Um jeden Kern bildet sich eine Ascospore, die nach Auflösen der ursprünglichen Mutterzelle freigesetzt werden.



5.4.5 Kommunikation über Pheromone

Die Erkennung von möglichen Paarungspartnern und auch die Sporenbildung werden seit vielen Jahren auf molekularer Ebene intensiv erforscht und erlauben faszinierende Einblicke in die Regulationsnetzwerke einer Zelle. Die Signalkaskade, die dabei entdeckt wurde, ist weit über die Hefeforschung hinaus von großer Bedeutung, da an diesem Beispiel sehr detailliert die Abfolge und die Interaktion von Proteinen in Signalkaskaden erforscht werden. Bereits vor vielen Jahren wurde entdeckt, dass die Kommunikation zwischen **Hefezellen** unterschiedlichen Paarungstyps über diffusible Signalmoleküle vermittelt wird. Dabei handelt es sich um kleine Peptide, die von einer Hefezelle produziert und ins Medium abgegeben werden. Da diese Moleküle zwischen verschiedenen Zellen und nicht innerhalb eines Organismus wirken, werden sie als **Pheromone** bezeichnet. Die Expression der Pheromone wird durch den MAT-Locus reguliert. Die a-Zellen bilden den sogenannten **a-Faktor**, ein Peptid aus 12 Aminosäuren, während α-Zellen den 13 Aminosäuren langen **α-Faktor** sezernieren. Treffen die Peptide auf Zellen von unterschiedlichem Paarungstyp, d. h. α-Faktor auf a-Zellen und a-Faktor auf α-Zellen, kommt es zu einer Hemmung des vegetativen Wachstums und der Zellzyklus verharrt in der G1-Phase (Abb. 5.**16**). Außerdem kommt es zur Induktion einer Reihe von Genen, die für die Fusion der Zellen sowie der Zellkerne benötigt werden. Ein sehr erfolgreiches Werkzeug bei der Untersuchung der Vorgänge und der Aufklärung des Signaltransduktionsweges war die Verwendung von sterilen Hefestämmen. Die entsprechenden Mutanten sowie die zugehörigen Gene wurden deshalb mit *STE* (= steril) bezeichnet.

Die Signalweiterleitung von der Zelloberfläche, die zunächst mit dem Pheromon in Kontakt kommt, bis hin zu Transkriptionsfaktoren, die mit der DNA im Zellkern interagieren und Gene aktivieren oder reprimieren, erfolgt über eine Kaskade von Signalproteinen. Zunächst reagiert das Pheromon mit einem Rezeptor, der in die Cytoplasmamembran eingebettet ist. Dabei handelt es sich um einen Rezeptor, der sieben Transmembrandomänen aufweist und Ähnlichkeit zu vielen Rezeptoren in anderen Eukaryoten besitzt (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Diese Klasse von Rezeptoren findet man auch als Rhodopsin in den Sehzellrezep-

◀ Abb. 5.**16** **Lebenszyklus und Pheromonantwort der Bäckerhefe *S. cerevisiae*.** Haploide Hefezellen, die entweder vom Paarungstyp a oder α sind, vermehren sich durch Knospung. Beide Paarungstypen sind in der Lage, die Spezifität zu ändern, sodass in einer Hefekultur beide Typen vorkommen. Eine Paarung von zwei kompatiblen Stämmen wird durch die Kommunikation über Pheromone eingeleitet. Nach der Erkennung des Pheromons durch einen membranständigen Rezeptor wird das Signal über ein G-Protein und eine Kaskade von Phosphorylierungsschritten bis zum Zellkern weitergeleitet und führt zur Umschaltung des genetischen Programms und schließlich zur Paarung der Hefezellen. Die Kinasen und der Transkriptionsfaktor wurden durch die Untersuchung von sterilen Mutanten entdeckt und werden deshalb mit Ste abgekürzt. Nach erfolgter Zell- und Kernfusion kann sich das diploide Hefestadium wiederum durch Knospung vermehren. Sind die Umweltbedingungen nicht mehr zur vegetativen Fortpflanzung geeignet, wird die Sporulation eingeleitet, indem nach einer Meiose vier Ascosporen gebildet werden. Pre = pheromone response element.

toren oder dem Rezeptor für Epinephrine. In der Hefezelle kommt es nach Bindung des Pheromons durch den Rezeptor im Inneren der Zelle zur Signalweiterleitung zunächst zu einem membranständigen heterotrimeren G-Protein. Dieses G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α, β und γ), die durch die Aktivierung des Rezeptors dissoziieren. Die α, β-Untereinheit wird dadurch aktiviert und reagiert mit der nächsten Komponente der Signalkaskade, Ste20. Dieses Protein aktiviert eine sogenannte MAP-Kinase-Kaskade (Ste11, Ste7, Fus3), die schließlich dazu führt, dass der Zellzyklus angehalten wird (Far1) und durch den Transkriptionsfaktor (Ste12) eine Vielzahl von Genen reguliert wird (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Die Gene, die durch Ste12 reguliert werden, zeichnen sich durch ein gemeinsames Sequenzmotiv (Pre, pheromone response element) im Promotorbereich aus (Abb. 5.**16**).

5

Sowohl für die Erkennung von Hefepartnerzellen als auch für Differenzierungsvorgänge wie die Ascosporenbildung werden viele Gene induziert, die nur für diese Vorgänge, aber nicht für das „normale" vegetative Wachstum benötigt werden. Während bisher meistens einzelne Gene untersucht wurden, die durch verschiedene Methoden entdeckt worden waren, eröffnet die „**Genom-Forschung**" eine neue Dimension. Zur simultanen Untersuchung der Expression aller mehr als 5 000 Gene z. B. der Bäckerhefe wird ein Stück jedes einzelnen Gens auf eine Membran aufgetragen und diese Membran anschließend mit spezifisch markierten Sonden, die aus der RNA verschiedener Entwicklungsstufen gewonnen wurden, hybridisiert. Da in diesem Verfahren viele Tausend Gene auf einer sehr kleinen Membran (oder einer beschichteten Glasplatte) aufgetragen werden, also sehr viel Information auf kleinstem Raum untergebracht ist, werden diese Einheiten auch als „**Chips**" bezeichnet. Es wurde gefunden, dass für die Sporenbildung etwa 1000 Gene in ihrer Expression verändert werden. Wie diese 1000 Gene zusammenspielen und schließlich zu den beobachteten Veränderungen führen, ist jetzt Gegenstand der Forschung. Neben der genomweiten Transkriptanalyse, der **Transkriptomics**, wurde auch das Proteom untersucht sowie die Wechselwirkung tausender Proteine gegeneinander getestet und damit ein **Interaktom** erstellt. Nachdem die Pionierarbeit in der Bäckerhefe geleistet war, wurden die Techniken auch in anderen Pilzen und auch in anderen Eukaryoten bis hin zum Menschen etabliert. Nach wie vor hat aber *S. cerevisiae* eine Vorreiterrolle. ◀

Im Vergleich zur Hefe ist das Paarungsverhalten des **Basidiomyceten *U. maydis*** wesentlich komplexer (Abb. 5.**17**). Dieser Pilz gehört zu den Rostpilzen und infiziert Maispflanzen, die er zur Vollendung seines Lebenszyklus benötigt. Freigesetzte Basidiosporen wachsen als Einzelzellen saprotroph und vermehren sich durch Knospung, ähnlich wie die Bäckerhefe. In diesem Stadium kann der Pilz im Labor sehr gut kultiviert und vermehrt werden, er ist gut für molekularbiologische Methoden geeignet. Wenn in der Natur zwei solcher haploider Zellen in Nachbarschaft auf einer Blattoberfläche zu liegen kommen, wird die Paarung der beiden Individuen eingeleitet, sofern sie unterschiedliche Paarungstypen besitzen. Es kommt zur Zellfusion und damit zur Dikaryonbildung. Mit der Änderung der Anzahl der Zellkerne geht eine veränderte Wuchsform einher, der dika-

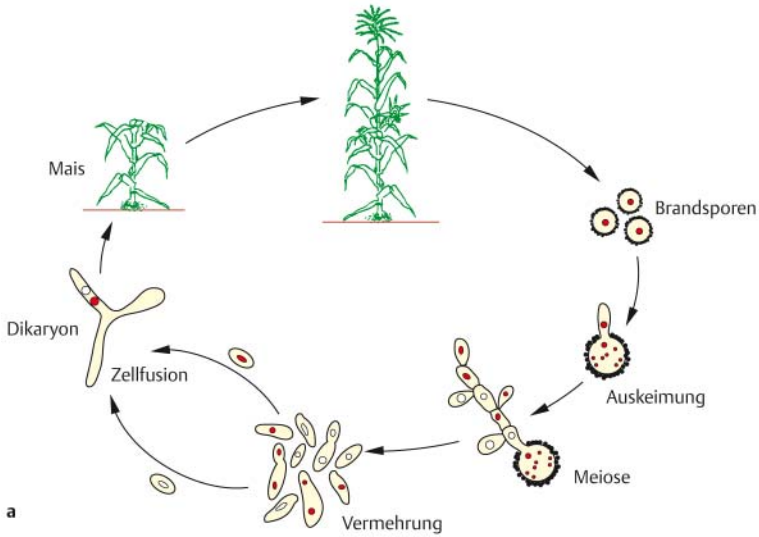






Abb. 5.**17** **Lebenszyklus des Brandpilzes *U. maydis*. a** Haploide Zellen des Pilzes können saprophytisch wachsen und sich durch Knospung vermehren. Treffen zwei kompatible Hefezellen aufeinander, kann es zur Paarung kommen, sodass eine dikaryotische Hyphe entsteht. Wenn die Paarung auf der Blattoberfläche einer Maispflanze geschieht, kann die dikaryotische Hyphe in das Blattgewebe eindringen und sich in der Pflanze stark ausbreiten. Als erstes Anzeichen einer Infektion entstehen kleine Tumore (**b**) und eine Anthocyanfärbung. **c** Später sind große Tumore an den Fruchtständen typisch, die aus angeschwollenen Maiskörnern bestehen und im Inneren mit schwarzen Brandsporen gefüllt sind. Die Brandsporen überdauern im Boden und keimen unter günstigen Bedingungen wieder aus. Nach der Keimung und einer Meiose bilden sie vier haploide Zellen. (Aufnahme c von R. Rösser, Marburg)

ryotische Pilz wächst als Hyphe. Die Pilzhyphen wachsen nur kurz auf Nährmedien, sie benötigen für ihre volle Entwicklung die Maispflanze. Die Pilzfäden dringen bevorzugt an Blattscheiden und durch die Blüten in die Pflanze ein und verbreiten sich dort. Äußerlich können infizierte Maispflanzen zunächst an einer verstärkten Anthocyanfärbung in der Nähe der Infektion, später an der Bildung von Pflanzentumoren erkannt werden. In den Tumoren verschmelzen die Zellkerne in den Hyphen und bilden die diploide Phase. Die Hyphenzellen fragmentieren und bilden die **Teliosporen**, die schwarz gefärbt sind. Da die Tumore später aufbrechen und die schwarze Sporenmasse freisetzen, wird *U. maydis* auch als Brandpilz und die Krankheit als Maisbeulenbrand bezeichnet. Die Teliosporen werden durch Wind und Regen verbreitet und überwintern vermutlich im Boden. Im Frühjahr kommt es zum Auskeimen der Spore, was sofort zur Bildung von Heterobasidien führt. Es werden nach erfolgter Meiose vier haploide Basidiosporen gebildet, die sich durch Knospung vermehren können und dann wieder neue Pflanzen infizieren.

Die Paarung von zwei kompatiblen Zellen ist im Falle von *U. maydis* also Voraussetzung für die Infektion der Wirtspflanze. Ähnlich wie bei der Bäckerhefe wird die Fusion der Zellen durch ein Pheromon-Rezeptorsystem gesteuert. Es gibt allerdings zwei verschiedene Allele des a-Kreuzungstyp-Locus, *a1* und *a2*, die jeweils für ein Peptid-Pheromon und einen Rezeptor, der das Pheromon des anderen Kreuzungstyps erkennt, codieren. Im Unterschied zur Bäckerhefe, bei der jede Zelle die Gene für beide Pheromone und Rezeptoren trägt, tragen die Zellen von Ustilago entweder die *a1*-Gene, oder die *a2*-Gene. Zusätzlich gibt es einen zweiten Kreuzungstyp-Locus, *b*, der einen Homeodomänentranskriptionsfaktor codiert und der ebenfalls für die Paarungsspezifität verantwortlich ist. Man spricht von einem tetrapolaren Kreuzungssystem, da sowohl der a- als auch der b-Locus für eine erfolgreiche Paarung unterschiedlich sein müssen, also statistisch nur ein Viertel der Population als Partner in Frage kommt. Der *b*-Locus von *U. maydis* kommt jedoch in multiplen Allelen vor (*b1* bis *b19*), so dass sich die einzelnen Zellen wieder mit nahezu 50 % der Population erfolgreich paaren können.

Bildung asexueller Sporen an Konidiophoren: Konidiophoren entstehen an Wasser-Luft-Grenzflächen unter Lichteinfluss, aus den Metulae entstehen am Konidiophor Phialiden, die Konidien (Sporen) bilden.
Bildung sexueller Sporen in Fruchtkörpern (z. B. Kleistothecien): Kleistothecien entstehen nach Paarung mit einem Kreuzungspartner oder durch Selbstbefruchtung, nach Verschmelzung der Zellkerne entstehen in den Kleistothecien meiotische Ascosporen. Bildung von speziellen weiblichen (Ascogon) und männlichen (Trichogyne) Strukturen bei einigen Arten (z. B. *Neurospora crassa*).
Ascus: Schlauch, in dem bei Ascomyceten die Ascosporen entstehen.
Basidie: Diploide Zelle der Basidiomyceten, an der nach der Meiose vier haploide Basidiosporen entstehen.

Hymenium: Fruchtschicht, die die Asci oder Basidien in charakteristischer Anordnung enthält. Anordnung ist ein wichtiges Bestimmungsmerkmal (Lamellen- oder Röhrenpilze).
Sexuelle Vermehrung bei Pilzen: Unterschiedliche Paarungstypen sind in der Regel Voraussetzung für die Bildung meiotischer Sporen, Paarungstyplocus definiert Paarungstyp (a oder α bei der Bäckerhefe), Steuerung der Partnererkennung durch Pheromone.
Heterothallisch: Sexueller Vermehrungszyklus erfordert zwei verschiedene Individuen.
Homothallisch: Sexueller Vermehrungszyklus erfolgt innerhalb eines Individuums.
Pheromone: Signalmoleküle zwischen zwei Organismen (z. B. Peptide), Bildung der Pheromone wird durch den Paarungstyplocus gesteuert, a-Zellen bilden a-Faktor, α-Zellen bilden α-Faktor, a-Faktor erkennt α-Zellen, α-Faktor erkennt a-Zellen.
Teliosporen: Diploide Sporen des Rostpilzes *Ustilago maydis*, Bildung erfolgt innerhalb des Tumors infizierter Maispflanzen.

5.5 Pilze als Lebenspartner

Eines der faszinierendsten Phänomene der Biologie ist die Ausbildung von Lebensgemeinschaften zu beiderseitigem Vorteil, die Symbiose. Zwei in der Natur weitverbreitete Assoziationen zwischen Pilzen und photosynthetisch aktiven Pflanzen sind die **Flechten** und die **Mykorrhiza**.

5.5.1 Flechten

Flechten sind Lebensgemeinschaften zwischen Pilzen (**Mycobiont**) und Algen oder Cyanobakterien (**Phycobiont**). Obwohl die Mehrzahl der Flechten von Ascomyceten gebildet wird, gibt es auch einige Vertreter, die einen Basidiomycetenpartner besitzen. Gegenüber der enormen Vielfalt der Pilzpartner sind nur einige Grünalgengattungen beschrieben worden, die in der Symbiose leben. Die Cyanobakterien beschränken sich auch auf wenige Gattungen. Während die photosynthetisch aktiven Partner **Assimilate** zur Verfügung stellen, trägt der Pilz zur **Mineralienversorgung** der Algen bei. In Form der **symbiontischen** Lebensweise wird es den Algen außerdem ermöglicht, sehr trockene Biotope wie Felswände zu besiedeln, die sie ohne den Pilzpartner nicht erobern könnten. Ein wesentliches Charakteristikum der echten Symbiosen ist die morphologische Einzigartigkeit des neu gebildeten Organismus. Die Flechten ähneln oft weder dem Pilz noch der Alge. Die morphologische Vielseitigkeit reicht von durch das Pilzmycel locker umwobenen Algenzellen über krustenartig Erde und Stein überwachsende Körper (**Krustenflechten**) bis zu blatt- oder strauchförmig differenzierten Thalli (**Blatt**- und **Strauchflechten**; Abb. 5.**18**).



Abb. 5.**18** **Flechten. a, b** Krustenflechen sind sehr eng mit dem Substrat verbunden. Die Landkartenflechte (**b**) findet man oft auf Steinen im Gebirge. **c** *Lecanora muralis* ist häufig auf Mauern zu finden. Die Flechte breitet sich sehr langsam radial aus und kann zur Altersbestimmung verwendet werden. **d** Die Lungenflechte ist eine große Blattflechte, die nur in Gebieten mit guter Luftqualität vorkommt. **e** Bartflechten hängen von Ästen in Reinluftgebieten. **f** *Cladonia macilenta* gehört zu den hoch differenzierten Strauchflechten. An der Spitze sind die Fruchtkörper des Pilzpartners zu sehen. Sie sind leuchtend rot gefärbt.

Die enge Lebensgemeinschaft erfordert, dass die **Vermehrung** der beiden Partner koordiniert wird. Viele Flechtenarten haben Mechanismen entwickelt, mit denen eine gleichzeitige, **vegetative** Reproduktion gewährleistet wird (Abb. 5.**19**). Es werden kleine Pakete von Algen mit Pilzhyphen umwoben und durch Wind oder Wasser verbreitet (**Soredien**) oder es werden kleine Fortsätze gebildet, die ebenfalls beide Partner enthalten und leicht abbrechen und dadurch verbreitet werden (**Isidien**). Neben dieser asexuellen Vermehrung beider Organismen verbreitet sich der Pilz sehr oft noch durch **sexuell gebildete Sporen**, die in für den Pilz typischen Fruchtkörpern gebildet werden. Wenn diese Sporen verbreitet werden, müssen sie erst einen neuen Lebenspartner finden, damit sie

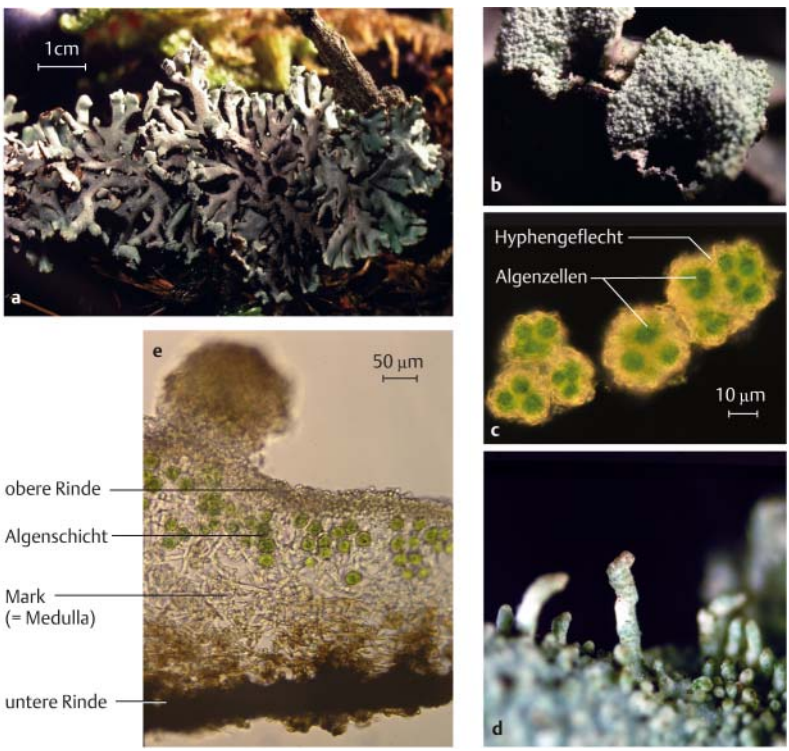


Abb. 5.**19** **Flechten, vegetative Vermehrung. a** Die Blattflechte *Hypogymnia physodes* zeichnet sich durch die schwarze Unterseite aus. **b** Die Vermehrung der Flechte geschieht über Soredien, die an aufgebrochenen Thallusenden gebildet werden und aus Pilzfäden und Algen bestehen (**c**). **d** Eine andere vegetative Vermehrung stellen die Soredien dar, kleine Auswüchse aus dem Thallus, die abbrechen und verbreitet werden können. **e** Im Querschnitt sind die beiden Symbiosepartner, der Pilz und die Alge, gut zu erkennen. Die Algen sind in einer Schicht angeordnet.

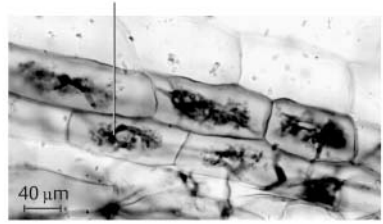
wieder eine Flechte bilden können. Obwohl diese Form der Lebensgemeinschaft sehr weit verbreitet ist und viele Sekundärmetabolite gebildet werden, hat sie aber bisher keine wirtschaftliche Bedeutung.

5.5.2 Die Mykorrhiza

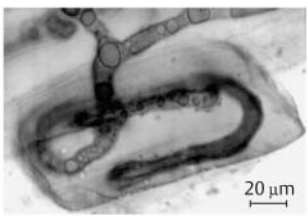
Eine weitere sehr erfolgreiche Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen ist die **Mykorrhiza**. Der eigentliche Kontakt der beiden Partner findet im Boden an den Wurzeln statt. Die Pflanzen versorgen die Pilze mit organischen Verbindun-



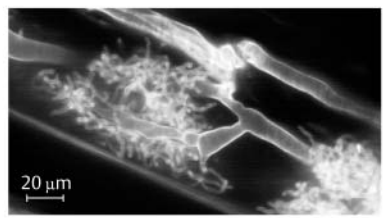
a



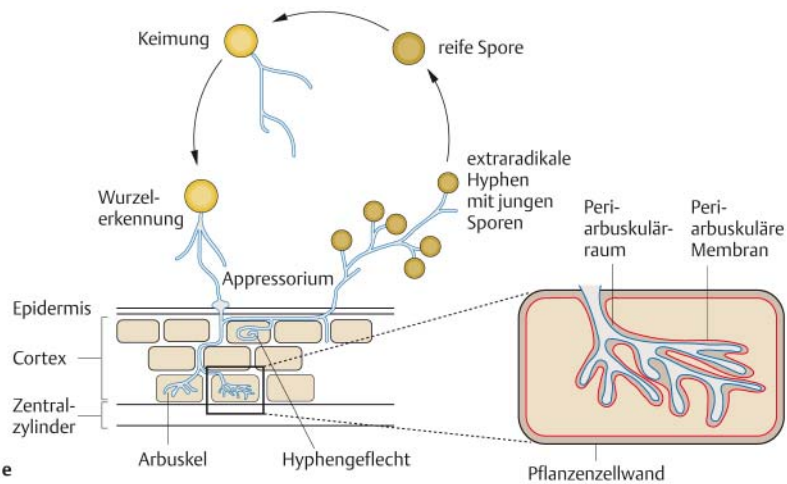
b



c



d



e

gen, während die Pilze mit ihren feinen Pilzhyphen den Boden durchwachsen und dadurch den Pflanzen Mineralien zugänglich machen. Die Pilze stellen eine enorme Vergrößerung des Wurzelsystems dar und sind vor allem an der Aufnahme von Phosphaten und Stickstoffverbindungen sowie Spurenelementen beteiligt. So kann pro m Wurzel etwa 1 km Pilzhyphen vorliegen. Neben der Nährstoffversorgung der Pflanze tragen die Pilze auch zu einer gestärkten Abwehr der Pflanzen gegenüber pathogenen Mikroorganismen bei.

Es gibt zwei wesentliche Gruppen der Mykorrhiza, die Endo- und die Ektomykorrhiza. Obwohl es mehrere Formen der **Endomykorrhiza** gibt, soll hier nur auf die **arbuskuläre Mykorrhiza** eingegangen werden. Diese Symbiose ist evolutionär sehr ursprünglich. Fossile Funde belegen, dass schon bei Pflanzen des Devons vor 300 Millionen Jahren diese Lebensgemeinschaft etabliert war. Heute gehen mehr als 80 % aller Landpflanzen die enge Assoziation mit den Pilzen, die Vertreter des Phylums der Glomeromycota sind, ein. Wenn Hyphen der Pilze auf Wurzeln von geeigneten Pflanzen treffen, wird zunächst ein **Appressorium** gebildet, das den Eintritt des Pilzes in die Pflanze einleitet (Abb. 5.**20**). In der Wurzel wachsen die Hyphen zunächst in den Interzellularräumen und breiten sich in der Wurzelrinde aus. Der Zentralzylinder wird nicht besiedelt. Die Pilzhyphen dringen in einzelne Wurzelrindenzellen ein, wobei allerdings die Cytoplasmamembran der pflanzlichen Zellen nicht durchbrochen wird. Der Pilz bildet innerhalb der pflanzlichen Zelle bäumchenartige Strukturen, die **Arbuskeln**, aus, die dem Stoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze dienen. Die Arbuskeln sind nur wenige Tage stoffwechselphysiologisch aktiv und werden dann abgebaut. Daneben werden Knäuel von Pilzhyphen in den Zellen beobachtet oder Anschwellungen (**Vesikel**) der Pilzzellen. Die Funktion dieser Strukturen ist noch nicht geklärt. Von der besiedelten Wurzel ausgehend bildet der Pilz neue Hyphen, die in das umgebende Erdreich auswachsen. Diese Hyphen können wieder neue Pflanzen besiedeln.

Eine besondere Spezifität einzelner Pilzarten hinsichtlich einiger Pflanzenarten wurde nicht beobachtet. Allerdings gehen einige Pflanzen, wie die Kreuz-

◀ Abb. 5.**20** **Die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose. a** Der wachstumsfördernde Effekt des Pilzes auf die Pflanze wird in diesem Experiment deutlich, in dem zwei Anthyllis-Pflanzen ohne (links) oder mit (rechts) Mykorrhizainokulum (*Glomus deserticola*) kultiviert wurden. **b** Innere Wurzelrindenzellen, die durch den Mykorrhizapilz besiedelt sind. Der Pilz wurde dunkel angefärbt. **c** Der Pilz hat ein Hyphenknäuel in der Pflanzenzelle gebildet. **d** Der Pilz wurde mit einem Farbstoff sichtbar gemacht, der die Zellwände anfärbt. Dadurch wird die bäumchenartige Struktur der Arbuskeln besonders deutlich. **e** Nach Keimung einer Spore ist der Pilz nur in der Lage für kurze Zeit zu wachsen und eine kurze Keimhyphe zu bilden. Trifft er auf eine kompatible Pflanzenwurzel, kann er die Symbiose eingehen. Die Arbuskeln sind von der Pilzcytoplasmamembran und der pflanzlichen Cytoplasmamembran umgeben. Es wird angenommen, dass an den Arbuskeln der Nährstoffaustausch stattfindet. Nach erfolgreicher Besiedlung der Pflanze, produziert der Pilz neue Hyphen, die aus der Wurzel ins Erdreich ausstrahlen und so die Oberfläche der Wurzel enorm vergrößern (extraradikale Hyphen). (Aufnahme d von P. Bonfante, Turin, Italien)

blütler, darunter z. B. *Arabidopsis thaliana,* keine Symbiose mit den arbuskulären Mykorrhizapilzen ein. An den im Boden wachsenden Hyphen von Mykorrhizapilzen werden Sporen gebildet, die als Dauerzellen angesehen werden. Wie eng die Lebensgemeinschaft zwischen Pilz und Pflanze ist, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass es trotz intensiver Bemühungen bisher nicht gelungen ist, den Pilz im Labor auf künstlichen Nährmedien zu kultivieren. Das bedeutet, dass diese Pilze **obligat biotroph** sind und der gesamte Kohlenstoff- und Energiebedarf durch die Pflanze gedeckt werden muss.

5

Die zweite wichtige Form der Mykorrhiza ist die **Ektomykorrhiza**, die wir bei vielen Bäumen finden (Abb. 5.**21**). Als Pilzpartner sind viele unserer als Speisepilze beliebten Waldpilze (also Basidiomycota) bekannt, z. B. der Steinpilz, der Maronenröhrling oder die Täublinge, aber auch giftige Vertreter wie der Fliegenpilz oder der Knollenblätterpilz. Wenn die Hyphen dieser Pilze auf die Feinwurzeln der Bäume treffen, wachsen sie ohne vorherige Bildung eines Appressoriums in die Wurzelrinde ein. Sie wachsen in den Interzellularen und bilden dort ein ausgeprägtes Netzwerk, das als **Hartigsches Netz** bezeichnet wird. Hier findet der Stoffaustausch statt. Der Pilz dringt nicht in die Wurzelzellen ein. Auf der Oberfläche der Wurzel bildet der Pilz ebenfalls ein dichtes Hyphengeflecht und es kommt zu einer Veränderung der Wurzelmorphologie. Die Wur-

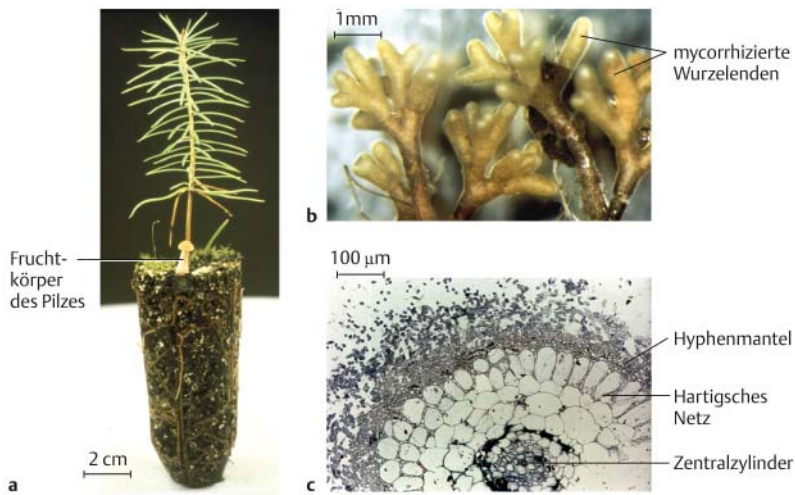


Abb. 5.**21** **Die Ektomykorrhizasymbiose am Beispiel von im Labor kultivierten Kiefernbäumchen und einem Pilzpartner. a** Ein kleiner Fruchtkörper des Pilzes zeigt die Symbiose des Baumes mit dem Basidiomyceten an. **b** Vergrößerung einer Wurzel, die aufgrund der Symbiose ein verkürztes und dickliches Wachstum zeigt. **c** Mikroskopische Aufnahme eines Wurzelquerschnitts. Der Hyphenmantel und das Hartigsche Netz sind zu sehen. (Aufnahmen von F. Martin, Lyon, Frankreich)

zeln bleiben kurz und dicklich und haben dadurch ein charakteristisches Aussehen. Die Tatsache, dass einige unserer Speisepilze immer unter bestimmten Bäumen zu finden sind, deutet an, dass die Ektomykorrhizapilze anders als die arbuskulären Mykorrhizapilze eine Wirtsspezifität aufweisen. Allerdings ist diese Spezifität oft nicht so streng, dass wirklich nur eine Baumspezies mit einer Pilzspezies eine Lebensgemeinschaft ausbilden kann. Wie die Erkennung der jeweiligen Partner stattfindet und wie diese Kommunikation auf molekularer Ebene verläuft, ist noch nicht bekannt, wird aber intensiv untersucht. Ein weiterer Unterschied zu den Pilzen der Endomykorrhiza ist, dass die Ektomykorrhizapilze auch **saprotroph** leben können und auch auf künstlichen Nährmedien im Labor kultivierbar sind.

Pilze als Endophyten: Neben den soeben besprochenen echten Symbiosen leben viele Pilze in mehr oder weniger enger Gemeinschaft mit Pflanzen. Pilze konnten aus allen Teilen von Pflanzen isoliert werden. Ob zwischen den beiden Partnern eine Abhängigkeit besteht bzw. welche Vorteile die Individuen von der Assoziation haben, ist in den meisten Fällen noch nicht geklärt. Da einige Pilze während des Wachstums in der Pflanze **Alkaloide** bilden, die für Pflanzenfresser toxisch sind, gewähren die Pilze in diesen Fällen den Pflanzen einen **Fraßschutz**.

Flechten: Symbiose aus Pilzen (Mycobiont) und Algen oder Cyanobakterien (Phycobiont); Mycobiont liefert Mineralien, Phycobiont Photosyntheseassimilate. Vegetative Reproduktion durch Isidien oder Soredien (enthalten jeweils beide Partner).
- **Krustenflechten:** Krustenartige Körper auf der Erde oder auf Steinen.
- **Strauch- oder Blattflechten:** Bestehen aus differenzierten Thalli.

Mykorrhiza: Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen. Pilz liefert Mineralien, Pflanze organische Verbindungen über die Wurzeln.
- **Endomykorrhiza (arbuskuläre Form):** Pilzfäden dringen in Wurzelrindenzellen der Pflanze ein, geringe Wirtsspezifität, Pilze sind obligat biotroph (kein Wachstum ohne Partner). Bildung des Appressoriums beim ersten Kontakt zwischen Hyphen und Wurzeln. Bildung spezieller Strukturen (Arbuskeln, Vesikel) innerhalb der Pflanzenzellen.
- **Ektomykorrhiza:** Pilz wächst in den Interzellularen, kein Eindringen in die Wurzelzellen, Wirtsspezifität vorhanden, keine Bildung eines Appressoriums, Stoffaustausch über Hyphennetzwerk (Hartigsches Netz). Pilz kann alternativ saprotroph leben.

5.6 Pathogene Pilze

Viele Pilze haben das große Potenzial an organischem Material erkannt, das in Form von lebender Materie vorliegt. Diese Pilze werden als **pathogene Pilze** bezeichnet. **Pilzkrankheiten** kommen sowohl bei **Mensch** (S. 537) und **Tier** als auch bei **Pflanzen** vor. Es gibt allerdings einen gravierenden Unterschied. Wäh-

rend sich pilzliche Infektionen beim Menschen nur in immunsupprimierten Patienten etablieren und dann auch zum Tode führen können, sind viele völlig gesunde Pflanzen Wirte für verschiedene Pilze.

Bei Pilzen, die sich auf Kosten der Pflanzen ernähren, wird die biotrophe Lebensweise, bei der der Pilz die Pflanze am Leben erhält, von der nekrotrophen unterschieden, bei der der Pilz zunächst die Wirtspflanze abtötet und dann auf dem toten Gewebe wächst. Die **biotrophe Lebensweise** ist besonders interessant, weil es zu einer **Kommunikation** zwischen Pilz und Pflanze kommen muss. Als Ergebnis dieser Kommunikation bildet der Pilz spezielle Strukturen aus, die nur für das Wachstum in der Pflanze nötig sind. Die wichtigste Struktur sind **Haustorien**, vergrößerte globuläre Hyphenspitzen, die innerhalb der pflanzlichen Zellen entstehen. Sie wachsen in die Pflanzenzellen hinein, ohne deren Cytoplasmamembran zu durchstoßen und dienen der Nahrungsaufnahme. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel für solch eine biotrophe Interaktion ist der Bohnenrost *Uromyces fabae* (Abb. 5.**22**).

Im Gegensatz zu biotrophen Pilzen, die ihre Partner möglichst lange am Leben erhalten, um kontinuierlich Nährstoffe abziehen zu können, verlaufen Infektionen durch **nekrotrophe Pilze** viel **aggressiver**. Der Pilz versucht die Pflanze möglichst schnell durch potente Gifte zu töten, um dann das organische Material zu verwerten. Spezielle Aufnahmestrukturen für die Nährstoffe sind nicht erforderlich. Pilze, die sich so ernähren produzieren in der Regel große Mengen von **hydrolytischen Enzymen**, die die Zellwände und andere Polymere der Pflanzen auflösen. Diese Pilz-Pflanze-Interaktion ist sehr gut im Falle von *Cochliobolus heterostrophus* untersucht, dem Erreger der **Maisbleiche**. Der Pilz produziert als Gift ein lineares Polyketid (T-Toxin), das die Funktion der Mitochondrien hemmt. Ein anderes Beispiel mit großer Bedeutung für die Landwirtschaft besonders in feuchten Jahren ist der Erreger des **Grauschimmels**, *Botrytis cinerea*, der Erdbeere und Himbeere, aber auch Tomate und Wein befallen kann.

Pilze, die zunächst eine biotrophe und erst später eine nekrotrophe Lebensweise aufweisen, bezeichnet man als **hemi-biotroph**. Beispiele hierfür sind *Magnaporthe grisea* oder *Colletotrichum*-Arten. *M. grisea* ist ein heterothallischer Ascomycet, der Reispflanzen befällt (**Reisbrand**) und dementsprechend im asiatischen Raum eine große landwirtschaftliche Bedeutung hat. Bis zu 50 % der Ernte können durch diesen Pilz verloren gehen. *M. grisea* befällt die Blätter der Pflanze, die dann nekrotische Läsionen aufweisen (Abb. 5.**22**). Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass der Pilz auch über die Wurzel in die Pflanze gelangen kann. *M. grisea* kann auch andere Monokotyledonen, wie Weizen oder Gerste befallen. Aufgrund der klimatischen Bedingungen in Europa spielt diese Krankheit hier aber keine Rolle. Die Magnaporthe-Infektion beginnt mit einer asexuellen Spore, die auf dem Reisblatt landet. Die Spore heftet sich mit einer Art Klebstoff fest an die Epidermis an und produziert einen kleinen Keimschlauch. Diese erste Hyphe erkennt die hydrophobe Oberfläche des Blattes und differenziert daraufhin ein **Appressorium**, dessen Zellwand verstärkt und durch Melaninein-

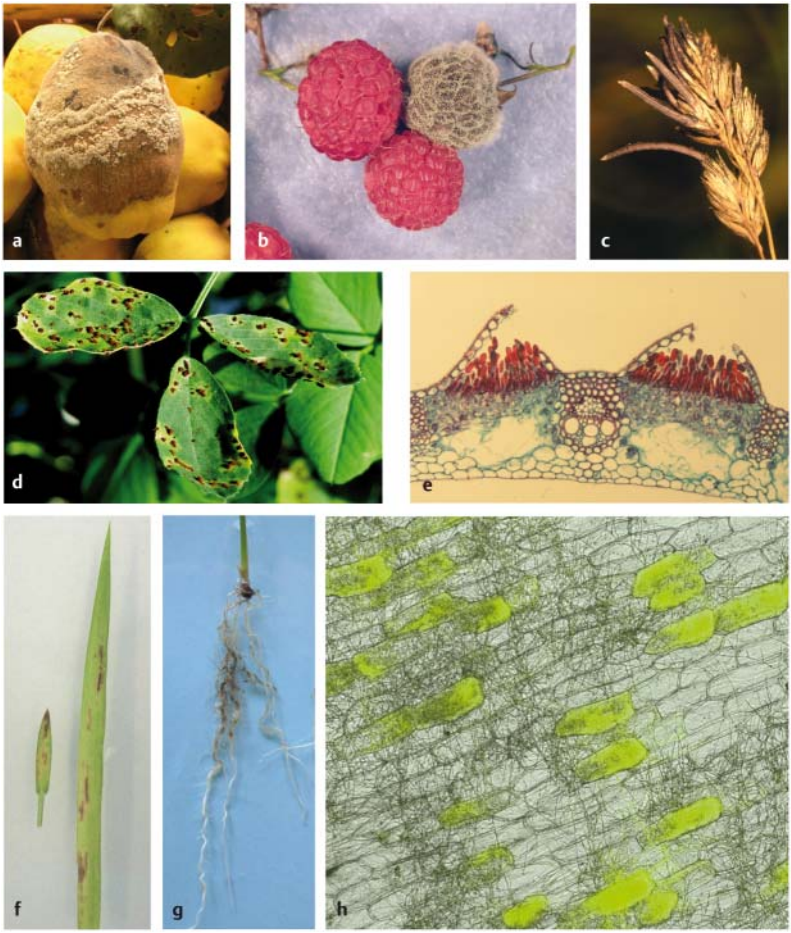


Abb. 5.**22** **Beispiele für pathogene Interaktionen. a** Quitten sind mit einem Schimmelpilz befallen. **b** *Botrytis cinerea* ist ein Pathogen von Himbeeren und Erdbeeren. **c** Der Mutterkornpilz, *Claviceps purpurea*, ist bei Gräsern und unserem Getreide leicht zu erkennen. Das gebildetete Toxin kann Getreide unbrauchbar machen. **d** Befall einer Pfanze durch einen Rostpilz. **e** Rostpilze bilden verschiedene Sporen, die durch Aufbruch der Blätter freigesetzt werden. Das Bild zeigt einen Blattquerschnitt. **e, f** *Magnaporthe grisea* befällt Blätter und Wurzeln von Reis. **g** *M. grisea* dringt in die Wurzelzellen ein. Hier wurde GFP im Pilz exprimiert, so dass der Pilzbefall in den Zellen durch grüne Fluoreszenz sichtbar wird. Einige Pflanzenzellen sind komplett mit Pilzmaterial ausgefüllt und erscheinen grün. (Aufnahmen: b, d von M. Hahn und A. Mosbach, Kaiserslautern; f–h von S. Heupel, Karlsruhe)

lagerung semipermeabel gemacht wird. Durch Anhäufung von Glycerin im Appressorium und anschließender Wasseraufnahme bildet der Pilz einen intrazellulären Druck von bis zu 80 bar aus. Da die Zellwand an der Kontaktstelle mit der Pflanze nicht verstärkt ist, führt der hohe Druck dazu, dass sich die Zelle ausstülpt und die Zellwand der Epidermiszellen durchbrochen wird. Die Cytoplasmamembran wird dabei nicht durchstoßen, sondern umgibt den Eindringling. Der Pilz bildet in der Pflanze sekundäre, dickere Hyphen, die sich von Zelle zu Zelle durch die Plasmodesmata ausbreiten. Nach einiger Zeit bildet *M. grisea* an der Blattoberfläche neue Sporen, die neue Reispflanzen befallen können. Die Infektion über die Wurzel geschieht über **Hyphopodien**, geschwollene Hyphenspitzen, die aber im Vergleich zu Appressorien keinen Druck aufbauen.

Da es durch einen Pilz- oder Bakterienbefall bei der Pflanze um Leben oder Tod gehen kann, ist es nicht verwunderlich, dass Pflanzen – ähnlich wie Tiere – verschiedene **Abwehrstrategien** entwickelt haben. Dazu gehören toxische Substanzen, die **Phytoalexine**. Ihre Bildung wird von einigen Pflanzen erst nach Pathogenbefall induziert, während andere Gifte permanent vorhanden sind. In anderen Fällen ist die Abwehrstrategie wesentlich komplizierter und beruht auf genetischen Determinanten. Die Wirtsspezifität vieler pathogener Pilze und die Tatsache, dass einzelne Gene für eine **Resistenz** einer Pflanze verantwortlich sein können, zeigt bereits eine spezifische Kommunikation zwischen den Organismen an. Wenn die Pflanze den Eindringling erkennt, wird ein Abwehrprogramm initiiert, das zum Absterben der unmittelbar attackierten Zelle führt. Dadurch kann sich der Pilz nicht weiter im pflanzlichen Gewebe ausbreiten und die Pflanze überlebt. Diese Interaktion wird als **inkompatible Interaktion** bezeichnet. Wird der Pilz nicht erkannt, kommt es zur Infektion und damit zu einer **kompatiblen Interaktion**. Der Schlüssel für die Erkennung liegt in pilzlichen Molekülen, sogenannten **Elicitoren**, und entsprechenden **Rezeptorproteinen** der Pflanze (📖 *Botanik*). Wenn ein Elicitor von dem entsprechenden Rezeptorprotein erkannt wird, kommt es innerhalb von 24 Stunden zu einer Kaskade von Ereignissen, der **hypersensitiven Reaktion** der Pflanze, wobei große Mengen an **reaktiven Sauerstoffspezies** gebildet werden, so dass die Zelle abstirbt. Die Gene, die die Elicitoren codieren, werden **Avirulenzgene** genannt, da der Pilz nicht virulent ist, wenn die Genprodukte von der Pflanze erkannt werden. Die rezeptorproteincodierenden Gene der Pflanzen heißen **Resistenzgene**, da bei ihrem Vorhandensein das Pathogen abgewehrt werden kann. Die Elicitoren der Pilze haben natürlich neben ihrer Funktion als Signal noch andere Funktionen. Einige sind sogar **Virulenzfaktoren** z. B. Proteasen, die bei einer erfolgreichen Infektion, wenn kein entsprechendes Reistenzgen der Pflanze vorhanden ist, wichtig sind. Ein solcher Pilz ist also dann im Vorteil, wenn er nicht von der Pflanze erkannt wird, so dass es in der Evolution einen Selektionsdruck gibt, Virulenzfaktoren hervorzubringen, die nicht mit einem Resistenzgen kompatibel sind. Andererseits gibt es bei der Pflanze einen Selektionsdruck für veränderte Resistenzgene, die die veränderten Virulenzfaktoren

erkennen. Dieses Phänomen wird als **Co-Evolution** bezeichnet. Da es sich bei der Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze um eine Interaktion eines pilzlichen mit einem pflanzlichen Gen handelt, spricht man von **Gen-für-Gen-Hypothese**. Das Phänomen, dass Pilze nur bestimmte Wirte befallen können und andere offensichtlich resistent sind, wird als **Basisresistenz** oder **Nicht-Wirt-Resistenz** bezeichnet. Die molekularen Mechanismen dieser Resistenz werden zur Zeit intensiv beforscht.

5.7 Kuriositäten

Das Reich der Pilze umfasst eine enorme Vielfalt an Organismen, die sich alle durch artspezifische Besonderheiten auszeichnen. Einige haben besonders kuriose Lebensweisen oder morphologische Besonderheiten entwickelt.

5.7.1 „Schießende" Pilze

Ein wesentliches Charakteristikum vieler Pilze ist ihre Fähigkeit Sporen zu bilden. Jeder, der im Herbst die Fruchtkörper unserer Speisepilze für den Kochtopf sammelt, kennt die faszinierende Vielfalt der Sporenträger. Während die Sporen vieler Pilze durch den Wind verbreitet werden, haben die Dungpilze der Gattung *Pilobolus* einen Schleudermechanismus entwickelt, um sporenenthaltende Sporangien aktiv vom Substrat „wegzuschießen". Sie bleiben an Pflanzenteilen kleben und werden so von Pflanzenfressern aufgenommen. Im Darm werden die Sporen freigesetzt und zusammen mit den Exkrementen ausgeschieden. Sie besiedeln damit den Dung sehr schnell und haben einen Vorteil gegenüber anderen Pilzen, deren Sporen erst durch den Wind zufällig auf das Substrat gelangen.

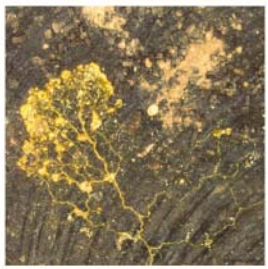
5.7.2 „Pilze" auf Wanderschaft

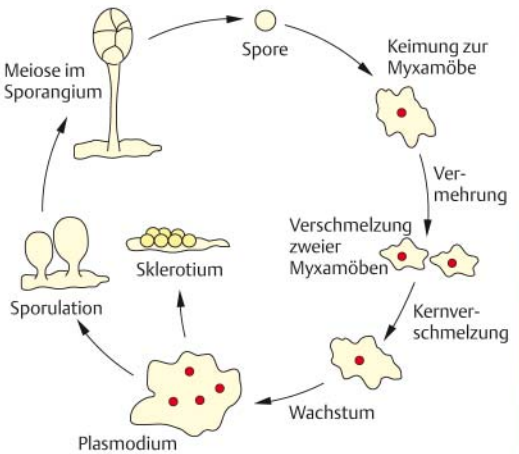
Obwohl **Schleimpilze** heute nicht mehr zum Reich der Pilze gezählt werden, haben sie in der Mykologie eine lange Tradition und sind in der Natur oft mit echten Pilzen vergesellschaftet. Deshalb sollen sie wenigstens in dieser Rubrik erwähnt werden. Wir haben bisher Pilze als sessile Organismen kennengelernt, die sich durch verschiedene Sporenarten verbreiten können. Die Schleimpilze zeichnen sich nun durch die Besonderheit aus, dass sie aktiv „kriechen" (Abb. 5.**23**). Die wandernde Form besteht bei einigen Schleimpilzen aus einer einzigen riesigen Zelle, die viele Tausend Zellkerne enthält. Diese Wachstumsform wird als **Plasmodium** bezeichnet. Das Plasmodium bewegt sich amöbenartig über das Substrat und nimmt dabei Bakterien, Hefezellen oder andere kleine Organismen als Nahrung auf. Der Organismus ist in diesem Stadium von schleimiger Konsistenz und kann sehr große Dimensionen erreichen. Er ist sehr austrocknungsgefährdet und kommt deshalb häufig auf totem Holz in feuchten Habitaten vor. Als Anpassung an widrige Umweltbedingungen differenzieren sich viele



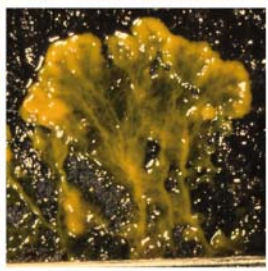
a






Spore
Keimung zur Myxamöbe
Ver-mehrung
Verschmelzung zweier Myxamöben
Kernver-schmelzung
Wachstum
Plasmodium
Sporulation
Sklerotium
Meiose im Sporangium





b

◀ Abb. 5.**23** **Lebenszyklus eines echten Schleimpilzes. a** Reife Fruchtkörper von *Arcyria denudata*. Die Hülle ist schon aufgebrochen, so dass ein Hyphenknäuel sichtbar wird, in dem die Sporen eingebettet sind. **b** Eine haploide Spore keimt zu einer Myxamöbe oder einem begeißelten Myxoflagellaten aus, die sich durch Teilung vermehren. Die Einzelzellen verschmelzen, wonach die Zellkerne diploid werden. Die Zelle wächst, es entsteht ein Plasmodium mit vielen Tausend Zellkernen. Unter widrigen Umweltbedingungen, z. B. Austrocknung, wird das Sklerotium gebildet. Bei Nahrungsmangel wird die Sporulation eingeleitet, in deren Verlauf haploide Sporen entstehen. Die Bilder neben dem Schema zeigen die Wanderung des Plasmodiums eines echten Schleimpilzes. Zum Größenvergleich wurde eine „Startlinie" mit Stecknadeln konstruiert. Nach 24 Stunden ist das Plasmodium weitergezogen. Die beiden letzten Bilder zeigen die Front des Plasmodiums und die Aggregation des Cytoplasmas kurz vor der Sporulation.

Schleimpilze: Vor allem bei Trockenheit werden Plasmodien in **Sklerotien** umgewandelt; wenn die Nahrung ausgeht, entstehen Sporenträger, in denen einzellige Sporen, nach einer erfolgten Meiose, gebildet werden. Die Sporen werden, wie bei echten Pilzen, durch Wind und Wasser verbreitet. Unter günstigen Bedingungen schlüpfen aus den Sporen **Schwärmzellen**, die sich durch Geißeln bewegen können. Sie vermehren sich durch Zweiteilung und können sich miteinander paaren. Die gebildete Zygote wandelt sich in das Plasmodium um, das durch Wachstum, aber auch durch Fusion mit anderen Plasmodien, immer voluminöser wird.

5.7.3 „Räuberische Pilze"

Pilze zeichnen sich durch ein enormes Substratspektrum aus. Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind sie allerdings in ihrer Substratwahl eingeschränkt und können ihre Beute nicht aktiv verfolgen. Allerdings haben einige Pilze das „Fallenstellen" gelernt. So bilden die Pilze der Gattung *Dactylaria* spezielle **Fanghyphen** aus, die sich durch einen kontraktilen Ring auszeichnen. Gelangt ein Nematode in diese Schlinge, kontrahiert der Ring und der Wurm sitzt in der Falle. Der Pilz dringt dann in den Nematoden ein und verdaut das tierische Material von innen.

Schleimpilze: Früher den Pilzen zugeordnete eukaryotische Mikroorganismen mit beweglichen Stadien.
Plasmodium: Vielkernige Riesenzelle, die aus der Paarung zweier Amöben oder Schwärmzellen (Zygotenbildung) entsteht und sich amöboid fortbewegt.
Sklerotium: Anpassungsform des Plasmodiums an Austrocknung.
Schwärmzellen: Entstehen aus meiotischen Sporen, beweglich durch Geißeln.

6 Mikrobielle Genetik

Petra Dersch, Dieter Jahn

6.1 Das genetische System der Mikroorganismen

Das genetische System der Prokaryoten besteht in der Regel aus einem ringförmigen DNA-Molekül, dem **prokaryotischen Chromosom**, das die gesamte genetische Information zum Leben und Reproduzieren trägt. Die chromosomale DNA liegt dabei generell als dicht geordnet verpacktes Knäuel im Cytoplasma vor (**Nucleoid**). Es besteht aus vielen superhelikalen Schleifen, die in komplexer Form durch **Nucleoid-assoziierte Proteine** zusammengehalten werden. Zudem besitzen Mikroorganismen häufig kleinere meist zirkuläre extrachromosomale genetische Elemente (**Plasmide**), die normalerweise für das Wachstum entbehrlich sind. Sie liefern wertvolle Zusatzinformationen, die den Mikroorganismen in bestimmten Lebensräumen Wachstumsvorteile verschaffen. Die auf dem Genom in Form der Gene gespeicherte Information wird bei der Zellteilung durch den Prozess der **Replikation** verdoppelt. Immer nur die benötigte Information wird durch Überschreiben der DNA eines Gens in eine **mRNA** im Rahmen der **Transkription** und schließlich deren **Translation** in ein Protein umgesetzt. Geregelte **Proteinfaltung** und wenn nötig **Proteinexport** oder **Abbau** schließen diesen Prozess ab.

Das genetische Material der pro- und eukaryotischen Zelle besteht aus Desoxyribonucleinsäure (DNA) und wird in seiner Gesamtheit als **Genom** bezeichnet. Alle Strukturen, die DNA enthalten, sind **genetische Elemente**. Zu diesen zählen die **Chromosomen**, die im Zellkern der Eukaryoten oder im Cytoplasma der Prokaryoten vorkommen. Es gibt aber auch **extrachromosomale genetische Elemente**. Eukaryoten besitzen extrachromosomales, genetisches Material in den Organellen (Mitochondrien, Plastiden), und Hefen können zusätzliche ringförmige DNA-Moleküle (**Plasmide**) im Nucleus mit sich führen. Auch bei den Prokaryoten können verschiedene Plasmide (S. 233) und Viren (S. 244) als extrachromosomale DNA-Moleküle in unterschiedlicher Kopienzahl (1–500) pro Zelle vorkommen.

6.1.1 Struktur der DNA

Die Grundbausteine der DNA sind Desoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die selbst aus drei Komponenten, einer Pyrimidin- (Cytosin, Thymin) oder Purinbase (Adenin, Guanin), einer Desoxyribose und einem Phosphatrest bestehen (Abb. 6.**1**).

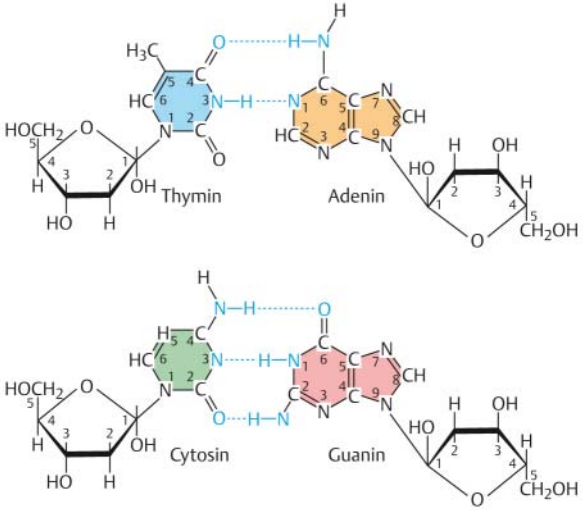


Abb. 6.**1** **Die Basenpaare der DNA.** Bei den beiden komplementären und antiparallelen DNA-Strängen erfolgen die Basenpaarungen zwischen Adenin und Thymin durch zwei und zwischen Guanin und Cytosin durch drei Wasserstoffbrücken.

In der DNA sind diese Desoxyribonucleotide durch Phosphodiesterbrücken kovalent miteinander verbunden. Dadurch entstehen lange unverzweigte Polynucleotidketten mit einem freien Phosphatrest am 5′-Ende und einer freien Hydroxylgruppe am entgegengesetzten 3′-Ende. Die erstmals von J. Watson und F. Crick (1953) postulierte **Doppelhelix** (Abb. 6.**2**) wird vor allem durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den innen liegenden Basen zusammengehalten, wobei jedem Adenin ein Thymin und jedem Guanin ein Cytosin gegenübersteht. Zur Stabilisierung tragen auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aufeinander folgenden Basenpaaren bei.

Ringförmig geschlossene DNA, wie sie häufig in prokaryotischen Genomen und Plasmiden vorkommt, liegt in der Regel nicht entspannt (relaxiert), sondern verdrillt als **Supercoil** oder **Superhelix** vor (Abb. 6.**3a**). Diese DNA-Supercoils werden ausgebildet, wenn die DNA-Doppelhelix um ihre eigene Achse verdrillt wird, ähnlich wie eine Telefonschnur, die um sich selbst gedreht ist. Man spricht von Supercoil, weil die Verdrillungen auf der Windung der DNA-Doppelhelix aufgelagert sind. Erfolgen die Umdrehungen im Sinne der Doppelhelixwindung also rechts herum, entsteht ein Supercoil mit positiven superhelikalen Windungen (**positiver Supercoil**). Die Einführung positiver Supercoils strafft die Struktur und erzeugt eine Drehungsspannung, die die DNA-Doppelhelix noch enger zusammendreht; die DNA ist dann überwunden. Erfolgen die Umdrehungen gegensinnig zur Doppelhelixwindung, resultieren Moleküle mit negativen superhelikalen Windungen (**negativer Supercoil**). Eine DNA mit negativem Supercoil ist unterwunden, wodurch im begrenzten Umfang sogar die Basenpaarung gelöst

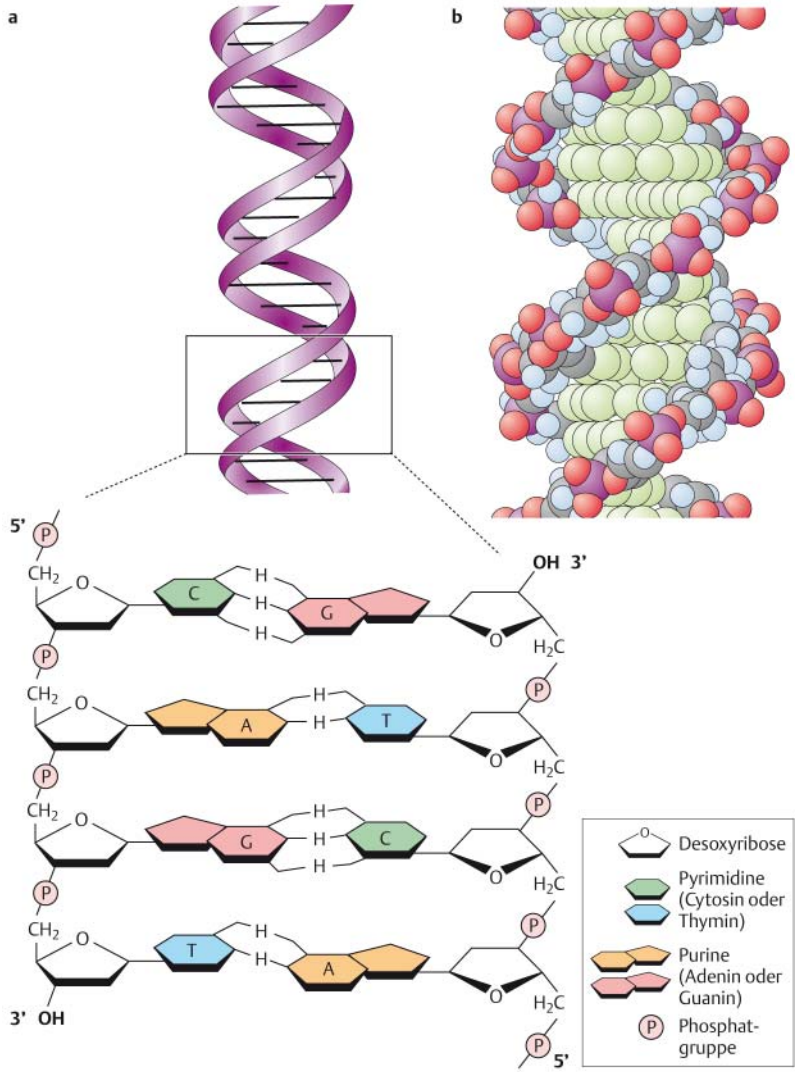


Abb. 6.2 **Die Struktur der DNA-Doppelhelix. a** Schema des DNA-Doppelstranges, das die 3′-5′-Bindung der Zucker zu den Phosphaten veranschaulicht. **b** DNA-Doppelhelix als Kalottenmodell. Phosphoratome: lila, Sauerstoffatome: rot, Wasserstoffatome: blau, Kohlenstoffatome der Dexoxyribose: grau. (Aus Weiler, Nover, Thieme, 2008)

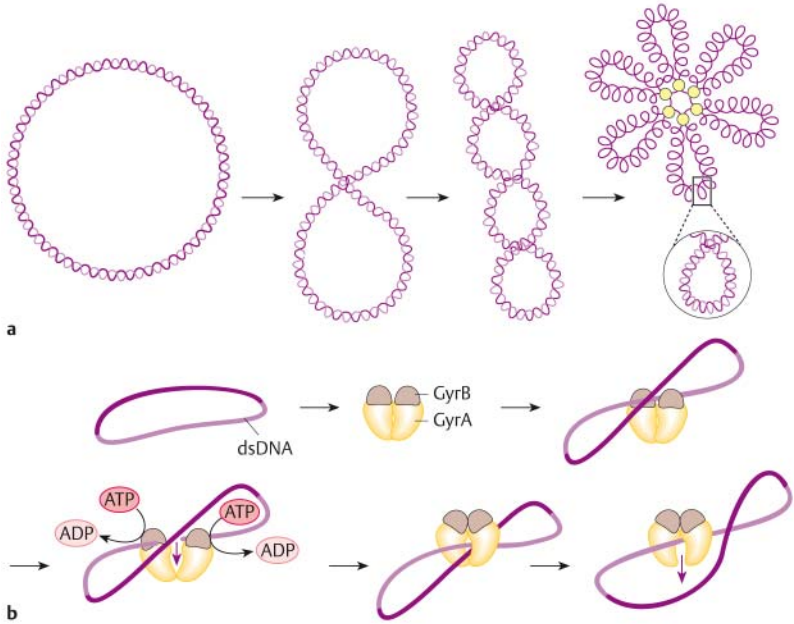


Abb. 6.**3** **DNA-Supercoiling von zirkulärer DNA und katalytische Aktivität der Gyrase.** **a** Relaxierte und superhelikale DNA mit einer und vier Supercoils. **b** Die aus beiden Untereinheiten GyrA und GyrB bestehende Gyrase lagert sich an die DNA an. Nach der Anlagerung führt sie einen Doppelstrangbruch ein, zieht den anderen Strang unter ATP-Verbrauch durch die Bruchstelle und schließt die Lücke im Anschluss wieder.

werden kann. DNA-Moleküle mit gleicher Größe und Folge von Basenpaaren, aber verschiedener Verdrillung, bezeichnet man als **Topoisomere**.

Natürlich vorkommende zirkuläre Chromosomen zeigen gewöhnlich ein negatives DNA-Supercoiling. Die chromosomale DNA von *E. coli* trägt eine negative superhelikale Umdrehung pro 100 bis 200 bp. Dadurch wird die Entwindung der Doppelhelix bei Replikation, Transkription und Rekombination erleichtert. In negativ superhelikalen DNA-Molekülen können aber auch positive Supercoils vorkommen. Sie treten aber meist nur vorübergehend in Teilen des Moleküls auf, unter anderem vor der Entwindung der DNA bei der Replikation (S. 201). Eine Ausnahme stellt die chromosomale DNA der Archaea dar, sie ist grundsätzlich positiv superhelikal.

Die superhelikale Struktur der DNA in einer Zelle ist keineswegs statisch, sondern verändert sich schnell. Bei genetischen Prozessen, wie bei der Replikation der DNA und der Transkription von Genen müssen Supercoils der DNA entwunden und dann wieder eingeführt werden. Der Grad des Supercoiling wird deshalb

durch **Topoisomerasen** genau kontrolliert (Tab. 6.**2**). Diese Enzyme führen Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche in die DNA ein und verändern so den Verdrillungsgrad. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die sogenannte **Gyrase**. Dieses bakterielle Enzym zählt zu den **Topoisomerasen der Klasse II**. Es verdreht die DNA, führt an der Stelle, an der die DNA-Stränge zusammenkommen einen Doppelstrangbruch ein, zieht den intakten DNA-Strang durch die Öffnung. Anschließend schließt die Topoisomerase II den Doppelstrangbruch wieder, wodurch negatives Supercoiling erzeugt wird (Abb. 6.**3b**). Die **Topoisomerase I** hingegen relaxiert negativ superhelikale DNA. Dazu wird durch das Enzym ein Einzelstrangbruch eingeführt und dann der eine Strang um den anderen Strang gedreht. Diese Entspannung der DNA ist vor allem bei der Replikation durch DNA-Polymerasen und bei der Transkription durch die RNA-Polymerasen zu beobachten.

Einige hyperthermophile Archaea, wie *Methanothermus fervidus*, mit positiv superhelikaler DNA, besitzen eine **reverse Gyrase**. Diese Topoisomerase ist in der Lage, positive Supercoils in die DNA einzuführen. Wahrscheinlich ist eine starke Überdrehung der DNA in hyperthermophilen Archaea vorteilhaft, um damit einer Hitze-bedingten Denaturierung der DNA entgegenzuwirken.

6.1.2 Mikrobielle Genome

Seit der Entschlüsselung des ersten bakteriellen Genoms von *Haemophilus influenzae* im Jahr 1995 ist die vollständige Sequenz von mehr als 650 mikrobiellen Genomen aus verschiedenen Gruppen der Bakterien und Archaea ermittelt worden und kann über öffentliche Datenbanken (http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi) abgerufen werden. In Tab. 6.**1** sind die Eigenschaften einiger bekannter mikrobieller Genome zusammengefasst.

Prokaryoten sind **haploid**, da sie typischerweise nur eine Kopie eines jeden Gens besitzen. Die genomische DNA der meisten Prokaryoten liegt in der Regel als ein geschlossenes, ringförmiges Molekül vor, das auch als „**Chromosom**“ bezeichnet wird. In einigen Prokaryoten findet man aber auch lineare Chromosomen, z. B. bei dem Erreger der Lyme Borreliose *Borrelia burgdorferi*. In manchen Bakterien und Archaea wurden zwei unterschiedliche zirkuläre Chromosomen identifiziert (z. B. bei *Vibrio cholerae*). Auffällig ist dabei die Genomstruktur von *Agrobacterium tumefaciens*, eines pflanzenpathogenen Bakteriums. Es besitzt ein lineares und ein zirkuläres Chromosom mit 2,84 Mb und 2,07 Mb.

Obwohl die Mikroorganismen in der Regel relativ kleine Genome besitzen, können ihre Größe und ihre Gendichte auf der DNA innerhalb dieser Organismengruppe sehr unterschiedlich sein. Die **Genomgrößen** der Bakterien variieren von 500 kb bis 13 Mb. Die **kleinsten** Genome besitzen in der Regel intrazelluläre, pathogene Bakterien oder Symbionten, in welchen die Genomreduktion sicherlich eine Anpassung an den **obligat intrazellulären** Lebensstil widerspiegelt. So bilden einige von ihnen keine Zellwände aus (Mycoplasmen) und/oder sind

Tab. 6.1 **Organisation mikrobieller Genome.**

Organismus	*Chromosomen*		*Plasmide*	
	Anzahl	Größe	Anzahl	Größe
Eubakterien				
Acaryochloris marina MBIC11 017	1 zirkulär	8,4 Mb	9	2–370 kb
Agrobacterium tumefaciens C58	**1 zirkulär** **1 linear**	2,8 Mb 2,1 Mb	2	214 kb zirkulär 542 kb zirkulär
Bacillus subtilis 168	1 zirkulär	4,2 Mb	–	–
Borrelia burgdorferi B31	1 linear	0,9 Mb	**21**	9 zirkuläre 9–30 kb, 12 lineare 5–54 kb
Bradyrhizobium japonicum USDA 110	1 zirkulär	9,1 Mb	–	–
Candidatus Carsonella ruddii PV	1 zirkulär	**0,16 Mb**	–	–
E. coli K-12 W3110	1 zirkulär	4,7 Mb	–	–
E. coli EHEC EDL933	1 zirkulär	5,6 Mb	1	92 kb zirkulär
Mycoplasma genitalium G37	1 zirkzulär	**0,6 Mb**	–	–
Myxococcus xanthus DK 1622	1 zirkulär	9,1 Mb	–	–
Salmonella typhimurium LT2	1 zirkulär	5,0 Mb	1	94 kb zirkulär
Sorangium cellulosum So ce 56	1 zirkulär	**13 Mb**	–	–
Streptomyces coelicolor A3(2)	1 zirkulär	8,7 Mb	2	**31 kb zirkulär** **365 kb linear**
Vibrio cholerae El Tor	**2 zirkuläre**	3,9 Mb 1,1 Mb	–	–
Yersinia pestis CO92	1 zirkulär	4,7 Mb	3	96 kb zirkulär 70 kb zirkulär 9,6 kb zirkulär
Archaea				
Archaeoglobus fulgidus	1 zirkulär	2,2 Mb	–	–
Halobacterium salinarum R1	1 zirkulär	2,7 Mb	4	284 kb zirkulär 194 kb zirkulär 148 kb zirkulär 41 kb zirkulär
Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661	1 zirkulär	1,8 Mb	2	58 kb zirkulär 16,5 kb zirkulär
Nanoarchaeum equitans Kin4-M	1 zirkulär	**0,49 Mb**	–	–
Pyrococcus horikoshii OT3	1 zirkulär	1,7 Mb	–	–
Thermoplasma acidophilum DSN1728	1 zirkulär	1,6 Mb	–	–
Eukaryota				
Cryptococcus neoformans	14	insg. 20 Mb		
Leishmania infantum JPCM5	36	insg. 32 Mb		
Plasmodium falciparum 3D7	14	insg. 22,9 Mb		
Trypanosoma brucei TREU927	11	insg. 25 Mb		

nicht mehr in der Lage bestimmte Zellbausteine, wie Aminosäuren, Nucleotide oder Lipide, selbst zu synthetisieren (Chlamydien, Rickettsien). Sie sind auf die Bereitstellung dieser Substanzen durch ihren Wirt oder assoziierten Partner angewiesen. Die **Gendichte** ihrer Genome, also der Anteil des Chromosoms, der Gene codiert, kann geringer als 51 % sein, im Gegensatz zu 95 % bei freilebenden Bakterien. Die kleinsten Genome **freilebender** Prokaryoten enthalten in etwa 1 bis 1,5 Mb, was etwa der minimalen Ausstattung einer selbstständig lebenden Zelle entspricht. Mit 9 bis 13 Mb die **größten** mikrobiellen Genome wurden bisher in **Myxobakterien** gefunden, die sehr komplexe Zelldifferenzierungs- und Zell-Zell-Assoziationsprozesse durchlaufen. Auch Streptomyceten, die sich durch die Produktion einer Vielfalt von Sekundärmetaboliten, wie Antibiotika auszeichnen, haben große Genome.

Durch Genomvergleiche wurde deutlich, dass ähnliche Gensequenzen in phylogenetisch nur wenig verwandten Mikroorganismen gefunden wurden. Dies legte den Schluss nahe, dass Prokaryoten über ihre Speziesgrenzen hinweg untereinander genetisches Material austauschen. Man spricht dann vom **horizontalen Gentransfer**. Heute weiß man, dass Gentransfer zwischen Mikroorganismen mittels Bakteriophagen, konjugativen Plasmiden und durch natürliche Transformation erfolgen kann (S. 242).

Eukaryotische Mikroorganismen haben in der Regel mehrere Chromosomen und diese sind im Gegensatz zu denen der Prokaryoten linear. Die Anzahl der Chromosomen variiert dabei je nach Organismus (Tab. 6.**1**). Das lineare eukaryotische Chromosom besitzt am Ende eine DNA-Sequenz, die **Telomer** genannt wird. Im zentralen Bereich liegt das **Centromer**. Beide spielen bei der DNA-Replikation und bei der Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen während der Zellteilung eine wichtige Rolle. Eukaryoten besitzen in der Regel größere Genome und haben deutlich mehr DNA als notwendig wäre, um alle Proteine der Zelle zu codieren. Während meist mehr als 90 % der prokaryotischen DNA Gene codiert, beträgt dieser Anteil im menschlichen Genom nur etwa 3 %. Bei den eukaryotischen Mikroorganismen ist der codierende Anteil des Genoms meist jedoch viel höher. Beispielsweise beträgt er bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* rund 80 %.

Nicht nur bei der generellen Größe des Genoms und der Anzahl der Chromosomen, sondern auch bei der **Organisation der Gene** auf der DNA gibt es deutliche Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryoten. Einer der wichtigsten Unterschiede besteht darin, dass Eukaryoten in der Regel zwei Kopien eines jeden Gens besitzen, sie sind **diploid**. Bei Eukaryoten wird in der Regel nur ein Gen in eine **monocistronische mRNA** umgesetzt, Prokaryoten können dagegen mehrere Gene in eine **polycistronische mRNA** umschreiben. Zudem sind viele eukaryotische Gene durch **Introns** unterbrochen. Das sind Sequenzen, die nicht in eine Aminosäureabfolge (im Protein) übersetzt werden und nach der Transkription (📖 *Genetik*) in der Boten-RNA (mRNA) durch **Spleißen** (splicing) aus dem Molekül ausgeschnitten werden. Nur einige wenige prokaryotische Organismen haben dagegen Introns

6.1.3 Mikrobielle Chromosomen

Die Organisation und die intrazelluläre Anordnung des Erbmaterials sind in Pro- und Eukaryoten sehr verschieden. Bei den Eukaryota sind die Chromosomen im Zellkern (**Nucleus**) lokalisiert. Dadurch wird eine örtliche Trennung der RNA-Synthese (Transkription) und Proteinsynthese (Translation) ermöglicht. Die chromosomale DNA der prokaryotischen Zelle ist hingegen nicht durch eine Membran vom Cytoplasma abgetrennt. Sie liegt aber in einer räumlich begrenzten Struktur im Cytoplasma vor, die 30 bis 50 % des Zellvolumens einnimmt und als **Nucleoid** bezeichnet wird (Abb. 6.**4a**). Prokaryoten sind daher in der Lage, die

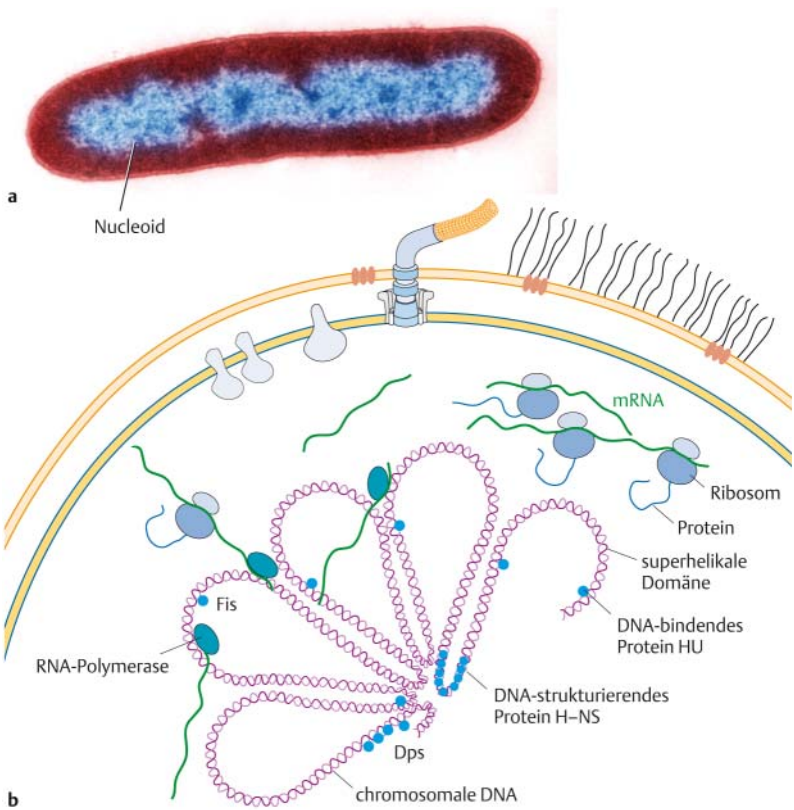


Abb. 6.**4** **Organisation des bakteriellen Nucleoids. a** Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer etwa 2 µm langen *E. coli-Zelle*, das Nucleoid mit der chromosomalen DNA ist an der hellen Kontrastierung zu erkennen (Aufnahme von M. Rohde, Braunschweig). **b** Die chromosomale DNA ist im Nucleoid in superhelikalen Schleifen organisiert, die durch bestimmte Nucleoid-organisierende, kleine Proteine fixiert werden.

Tab. 6.2 **Ausgewählte Nucleoid-assoziierte Proteine aus *E. coli*.**

Bezeichnung	*Gene*	*Struktur und Funktion*
Nucleoid-strukturierende Proteine		
HU (heat unstable nucleoid protein)	*hupA, hupB*	Heterodimer, Bildung der Supercoildomänenstruktur zur DNA-Kondensation
H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein)	*hns*	Homopolymer, Heterodimere mit StpA und Hha, Bildung der Supercoildomänenstruktur zur DNA-Kondensation, bindet an AT-reiche, gebogene DNA, globaler Regulator bakterieller, umweltgesteuerter Genexpression, Repression fremder, aufgenommener Gene (**Silencing**)
Dps (DNA-binding protein from starved cells)	*dps*	Homopolymer, beteiligt an der starken DNA-Kondensation im Nucleoid während der stationären Wachstumsphase, DNA-Schutz, gegen Hitze, oxidativen Stress und UV-Licht
IHF (integration host factor)	*himA, hip*	Heterodimer, bewirkt DNA-Beugung, stabilisiert DNA-Loops, hat DNA-Sequenzspezifität, kontrolliert die Genexpression
Lrp (leucine-responsive regulatory protein)	*lrp*	Homodimer, DNA-Topologie, stabilisiert DNA-Loops, DNA-Sequenzspezifität, kontrolliert die Genexpression
Fis (factor for inversion stimulation)	*fis*	Homodimer, beeinflusst DNA-Beugung, stabilisiert DNA-Loops, hat DNA-Sequenzspezifität, kontrolliert die Genexpression
StpA (suppression of td-phenotype)	*stpA*	Homodimer, Heterodimer mit H-NS, beeinflusst DNA-Topologie, kontrolliert die Genexpression
Hha/YmoA (higher haemolysin expression)	*hha*	Homodimer, Heterodimer mit H-NS, kontrolliert die Genexpression
Topoisomerasen		
Gyrase	*gyrA, gyrB*	Heterodimer, Topoisomerase II-Typ, einfügen negativer Supercoils
Topoisomerase I	*topA*	Einfügen positiver Supercoils
Chromosomensegregation		
MukBEF-Komplex (SMC-Proteine) (structural maintenance of chromosomes)		Aufrechterhalten der Chromosomenkondensation, Ausbildung von Loop-Strukturen durch DNA-Brückenbildung, Segregation der Chromosomen nach der Replikation auf die beiden Tochterzellen
Fts-Proteine		Verankerung der Chromosomen an der Cytoplasmamembran

von der DNA transkribierte Boten-RNA (mRNA) noch während ihrer Synthese in Proteine zu translatieren. Das typische **Bacteria-Chromosom**, wie das von *E. coli*, besteht in etwa aus $4{,}6 \cdot 10^6$ bp (4600 kb). Das DNA-Molekül hat eine Länge von etwa 1,5 mm und würde ausgestreckt niemals in die rund 1000fach kürzere *E. coli*-Zelle mit 2 mal 0,5 µm passen. Zudem besitzen exponentiell wachsende *E. coli*-Zellen oft zwei bis vier identische Chromosomen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die DNA als dicht gepacktes Knäuel im Nucleoid vorliegt. Obwohl die DNA sehr kompakt verpackt ist (Dichte: 20–50 mg/ml), muß sie dabei gut organisiert sein. Die Verpackung ist sehr **dynamisch**, um die Expression der Gene in dieser kompakten Struktur zu ermöglichen. Gleichzeitig muss die DNA auch so strukturiert sein, dass ihre Verdopplung vor jeder Zellteilung ermöglicht wird. In dem Knäuel liegt die chromosomale DNA in 50 bis 100 **superhelikalen Schleifen** (**Domänen**) vor, deren Enden in einer bisher unbekannten Art und Weise fixiert sind und in einer komplexen Form zusammengehalten werden (Abb. 6.**4b**).

Eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung dieser superhelikalen Domänen spielen verschiedene kleine Nucleoid-assoziierte Proteine (Tab. 6.**2**), die häufig eine starke aber wenig spezifische DNA-Bindekapazität haben.

Die Struktur der **Archaea-Chromosomen** unterscheidet sich wiederum von den eukaryotischen und bakteriellen Chromosomen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DNA des Archaeons *Halobacterium salinarium* zeigen Strukturen des Chromosoms, die den eukaryotischen Nucleosomen ähneln, aber deutlich kleiner sind. In Archaea findet man auch eng mit der DNA-assoziierte Proteine, die mit den **Histonen verwandt** sind, die die DNA in den eukaryotischen Chromosomen verpacken.

Zellen des hyperthermophilen *Methanothermus fervidus* enthalten große Mengen von **HMfA** und **HMfB**, die Sequenz- und auch strukturelle Übereinstimmungen mit den eukaryotischen Nucleosomen-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 aufweisen. Die HMf-DNA-Komplexe in vivo und in vitro ähneln den eukaryotischen Nucleosomen. Sie kondensieren die DNA und erhöhen den Schmelzpunkt der DNA, so dass bei hohen Wachstumstemperaturen das Aufschmelzen der chromosomalen DNA unterbunden wird.

Nicht nur Aufbau und Struktur der chromosomalen DNA, sondern auch die damit assoziierten Vorgänge wie Replikation, Transkription und Translation der Archaea (📖 *Genetik*) enthalten eukaryotische Merkmale. Diese Gemeinsamkeiten zeigen eine nähere Verwandtschaft der Archaea zu den Eukarya (S. 67, 📖 *Ökologie, Evolution*). In diesem Kapitel liegt der Fokus auf den Vorgängen in Bacteria.

Eukaryotische Chromosomen

Der **Zellkern** (**Nucleus**) nimmt bis zu 10 % des Zellvolumens in einer eukaryotischen Zelle ein. Die äußere Membran der Kernhülle ist dem Cytoplasma zu-

gewandt und mit dem endoplasmatischen Retikulum verbunden. Die innere Membran umgibt das **Nucleoplasma**. Die beiden Membranen verschmelzen an bestimmten Stellen zu Kernporen von etwa 9 nm Durchmesser, durch die ein selektiver und aktiver Transport von Makromolekülen zwischen Nucleoplasma und Cytoplasma stattfindet (📖Zellbiologie, Biochemie). Abhängig vom Zellzyklus liegt die DNA im Nucleus als **Chromatin** oder als Transportform während der Zellteilung stärker kondensiert in Form von **Chromosomen** vor (Abb. 6.**5**). Generell ist die eukaryotische DNA im Vergleich zur prokaryotischen viel dichter gepackt und viel intensiver mit Proteinen und RNA assoziiert.

Die DNA assoziierten Proteine werden in die basischen, positiv geladenen **Histone** und die sauren Nicht-Histone unterteilt. Die Histone enthalten große Mengen der positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin, wodurch sie an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden können. Es gibt fünf Haupttypen von Histonen, H1, H2A,

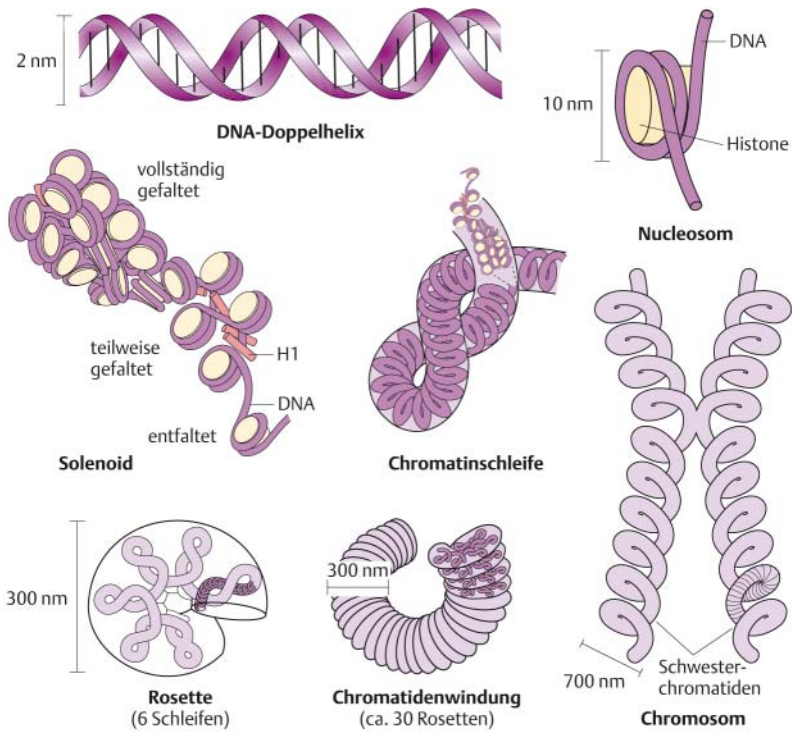


Abb. 6.**5** **Aufbau eukaryotischer Chromosomen.** Die DNA im Zellkern wird um einen Komplex aus verschiedenen Histonproteinen gewickelt. Diese Nucleoproteinkomplexe (Nucleosomen) werden bei der Zellteilung in weitere, übergeordnete Strukturen (Solenoide, Chromatinschleifen, Rosetten) in den Chromosomen angeordnet.

H2B, H3 und H4. Je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen Komplex aus acht Histonen, um den die DNA-Doppelhelix gewunden ist. Diese Aufwindung erzeugt eine diskrete Struktur, die als **Nucleosom** bezeichnet wird. Elektronenmikroskopisch sind die Nucleosomen der Chromatinfasern als eine lineare Anordnung von kugelförmigen Partikeln sichtbar, ähnlich einer Perlenkette (Abb. 6.**5**). Die überhängende DNA wird von einem Histon H1-Molekül flankiert. H1 ist auch daran beteiligt, dass die Nucleosomenfibrille zu übergeordneten röhrenförmigen Strukturen, den **Solenoiden** aggregiert. Schraubenförmig weiter aufgewundene Solenoide bilden dann große Schleifenstrukturen (**Chromatin-Schleifen**), übergeordnete **Rosetten** und **Chromatidenwindungen**, und es entsteht die kondensierteste Form, das mitotische **Chromosom** mit einem Durchmesser von ca. 700 nm (Abb. 6.**5**). Im Übergang von einer voll ausgestreckten Chromatinfaser zu dem extrem kondensierten Status des mitotischen Chromosoms entsteht ein Verpackungsverhältnis von ungefähr 10 000 zu 1.

6.1.4 DNA-Replikation

Die **Replikation** der DNA, ist der zeitlich limitierende Schritt bei der Vermehrung von Mikroorganismen. Organismen mit einer schnellen Replikation des Genoms haben einen Selektionsvorteil gegenüber anderen im Lebensraum, die langsamer sind. Die Strategie der schnellen Zellteilung als Selektionsvorteil unterscheidet Einzeller dabei deutlich von Vielzellern, in denen Zellteilung streng kontrolliert erfolgt und schnelle, unkontrollierte Zellteilung zu Krebs führen kann. Momentan bekannte Rekordhalter sind *Bacillus*-Spezies, die in heißen Quellen leben und sich in weniger als 15 Minuten duplizieren. Allerdings basieren solche **schnellen Verdopplungszeiten** auf der Präsenz und Vermehrung von mehreren Kopien des bakteriellen Chromosoms pro Zelle. Die bakterielle Replikationsmaschinerie ist dabei außergewöhnlich komplex.

Initiation. Im Unterschied zu Eukaryoten, wo die Replikation an diversen Stellen der zu replizierenden Chromosomen beginnt, gibt es in den meisten Bakterien und Archaea nur einen Replikationsstartpunkt auf dem Chromosom, genannt **Replikationsursprung** (***origin of replication***, ***oriC***). Von dort erfolgt die Replikation **bidirektional**, also in beide möglichen Richtungen (Abb. 6.**6**). DnaA-Proteine binden dazu auf einer Länge von 150 bp an mehrere sich wiederholende 9 bp DNA-Sequenzen des *oriC*. Unter ATP-Spaltung wird so ein Komplex gebildet, der dann am Zelläquator Membran gebunden vorliegt. Er ändert während des Replikationsprozesses je nach Bedarf seine Zusammensetzung, aber nicht seine Lokalisation. Von dort wird die neu gebildete DNA auf die beiden Teile der Zelle verteilt, aus denen dann die Tochterzellen entstehen.

An dem geöffneten Doppelstrang wird mit Hilfe von DnaC eine **DNA-Helicase** (DnaB) angelagert, um die DNA zu entwinden, bevor die DNA in den Replikationskomplex eintritt. Die Überspiralisierung der DNA wird zuvor von der **Topoisomerase I** herausgenommen. Der entstehende DNA-Einzelstrang wird durch Einzelstrang-bindende Proteine (SSB) stabilisiert und geschützt. Die Enyzme der DNA-Replikation sind **DNA-Polymerasen**. Sie bilden neue DNA an einem DNA-Einzelstrang als Matrize. Allerdings benötigen sie dazu ein freies 3′-Hydro-

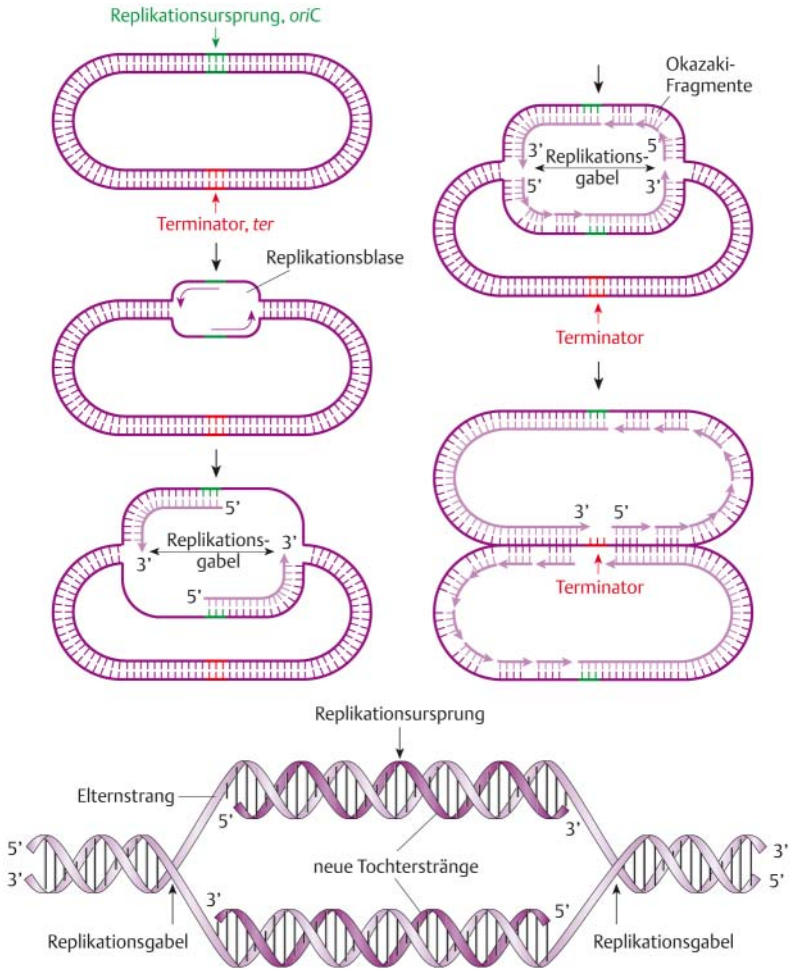


Abb. 6.**6** **Replikation der chromosomalen DNA von Bacteria**. Startpunkt ist *oriC*, von dem aus die Replikation bidirektional bis zu Terminationspunkten hin erfolgt (oben). An den zwei wandernden Replikationsgabeln werden die neuen Tochterstränge kontinuierlich gebildet (unten).

xylende an das sie Desoxyribonucleotide anlagern können. Deshalb bildet eine spezielle RNA-Polymerase, genannt **Primase** (DnaG), den weniger als 10 Nucleotide langen RNA-Primer. RNA-Polymerasen arbeiten ohne Primer.

Elongation. DNA-Polymerase III synthetisiert an den RNA-Primer DNA komplementär zum Matrizenstrang in 5′→3′-Richtung. Dieser neu gebildete DNA-

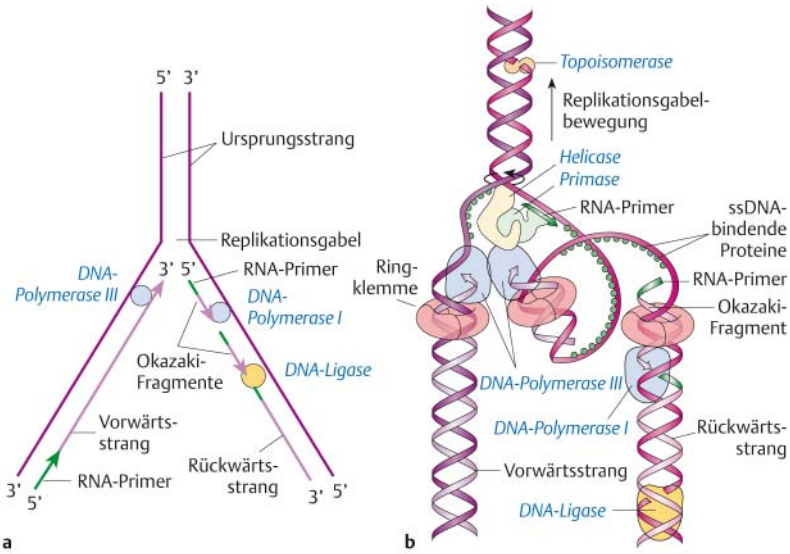


Abb. 6.**7** **Elongation der Replikation.** Die DNA Synthese erfolgt am Vorwärtsstrang (leading strand) und am Rückwärtsstrang (lagging strand) immer in 5′→3′-Richtung (nach Cooper/Hausmann, ASM press and Sinauer Associates 2006).

Strang wird **Vorwärtsstrang** (leading strand) genannt (Abb. 6.**7a**). Das zentrale Problem der Replikation ist die parallele Synthese am zweiten gegenläufigen Matrizenstrang. Dieser wird am zentralen **Replikasekomplex** in eine große Schleife gelegt (Abb. 6.**7b**). Das erlaubt das rückwärtige Einziehen dieses Stranges in die Synthesemaschinerie und dabei die Synthese des **Rückwärtsstranges** (lagging strand) in 5′→3′-Richtung. Natürlich können nur kurze Stücke so gebildet werden, bis die Schleife sich zuzieht und eine neue gebildet werden muss. Diese Stücke werden nach ihrem Entdecker **Okazaki-Fragmente** genannt und sind in Bakterien zwischen 1000 und 2000 bp lang. Die RNA-Primer-Entfernung wird anschließend durch eine auf RNA-DNA-Duplexe spezialisierte RNAse H durchgeführt. Das Auffüllen der entstandenen Lücken und ein **Kontrolllesen** (**proofreading**) der neu synthetisierten DNA-Stränge (leading und lagging) übernimmt die DNA-Polymerase I. Die entstehenden reinen DNA-Fragmente verbindet dann die DNA-Ligase. Trotz des komplexen Mechanismus der DNA-Synthese wird eine sehr hohe Geschwindigkeit und Genauigkeit der Replikation erreicht. Dies wird durch sogenannte **Ringklemmen** (**sliding clamps**) erreicht (Abb. 6.**7b**). Während am Vorwärtsstrang diese Ringklemme dauernd besteht und die DNA-Polymerase III bei ihrer Arbeit unterstützt, muss am Rückwärtsstrang diese Ringklemme bei jedem Einfädeln einer neuen Schleife neu gebildet werden. Deshalb existiert ein komplexer Klemmenbeladungsapparat aus einer Vielzahl von Proteinen.

Termination. Die beiden an der Membran fixierten Replikationskomplexe stoppen ihre Arbeit an definierten **Terminationssequenzen** (*ter*), an denen Tus-Proteine gebunden sind. Nun gilt es noch ein letztes Problem zu lösen, bevor die neu entstandenen Tochterchromosomen entlassen werden. Durch die bidirektionale Replikationsstrategie sind beide neuen Chromosomen ineinander verkettet. Durch eine Serie von durch die Proteine XerC und XerD katalysierten Schnitten und Verbindungen werden die Chromsomen voneinander gelöst. **Gyrasen** führen schließlich die Überspiralisierung wieder ein.

6.1.5 Transkription

RNA-Polymerasen katalysieren die Bildung der RNAs. Bakterien und Archaea besitzen üblicherweise einen Typ dieser Enzyme, sie bestehen bei Bacteria aus vier, bei Archaea aus 8–10 Untereinheiten (📖 *Genetik*). Eukaryoten haben drei verschiedene im Kern und jeweils eine in den Mitochondrien und Chloroplasten, die unterschiedliche Typen von RNA bilden. Wie bei der Replikation (s. o.) wird von den RNA-Polymerasen die doppelsträngige Natur der DNA genutzt, um nach Strangtrennung eine dem abzulesenden DNA-Strang komplementäre, einzelsträngige RNA-Kopie in 5′→3′-Richtung zu erstellen. Dabei wird von der RNA-Polymerase, anders als von der DNA-Polymerase, kein Primer mit 3′-Hydroxylende benötigt. Die **Transkription** besteht analog zur Replikation aus drei Phasen, der Initiation, der Elongation und der Termination.

Initiation. Die Bereiche mit Informationen für RNAs liegen verstreut über das Chromosom verteilt. Diese Bereiche müssen von der **RNA-Polymerase** erkannt und zum richtigen Zeitpunkt abgelesen werden. Dazu werden einerseits steuernde DNA-Sequenzen (**Promotor**) benutzt. Diese sind meist **stromaufwärts** der Gene lokalisiert. Andererseits verfügen die Organismen über ein breites Repertoire von regulatorischen Proteinen und RNAs, die die nötige Feinsteuerung der Genexpression vermitteln. Denn nicht jedes Protein und jede RNA wird dauernd in der Zelle benötigt (Kap. 10).

Die RNA-Polymerase der Bacteria besitzt eine spezielle Unterheit, den **Sigmafaktor**, der das Enzym zum Zielpromotor führt (Abb. 6.**8a**). Bakterien können verschiedene Sigmafaktoren für unterschiedliche Promotortypen haben und darüber unterschiedliche Sets an Genen aktivieren (Tab. 10.**1**, S. 449). Der Sigmafaktor leitet die RNA-Polymerase an den oft aus einer –10- und einer –35-Sequenz bestehenden Promotor. Die Zahlen im Namen der Promotorelemente geben deren Abstand zum Transkriptionsstart an. Dabei ist der Transkriptionsstart nicht mit dem Translationsstart, also dem Start eines Protein codierenden Gens am Startcodon gleichzusetzen. Zwischen Transkriptionsstart und Translationsstart liegt eine DNA-Sequenz, die dann auf Ebene der mRNA übersetzt die Ribosomenbindestelle, oft auch **Shine-Dalgarno-Sequenz** genannt, beinhaltet. Nachdem die RNA-Polymerase über den Sigmafaktor den Promotor und darüber die Transkriptionsinitiationsstelle gefunden hat, wird dort der **geschlossene**

Komplex (closed complex) gebildet. Dieser geschlossene Komplex wird zum **offenen Komplex** (open complex) indem die DNA-Doppelhelix aufgeschmolzen wird. Das erste Ribonucleotid, meist ein Purin, basenpaart mit dem Gegenstück in der DNA in Position +1.

Bei der weiteren **Elongation** diffundieren Ribonucleotide durch einen Kanal im Enzym zur ca. 17 bp langen Transkriptionsblase, in der die beiden DNA-Stränge getrennt sind. Nun wird jeweils von jedem weiteren eingebauten Ribonucleosidtriphosphat die Phosphoanhydridbindung gespalten, so Energie freigesetzt (Abb. 6.**8b**) und mit dieser das Ribonucleosidmonophosphat an den wach-

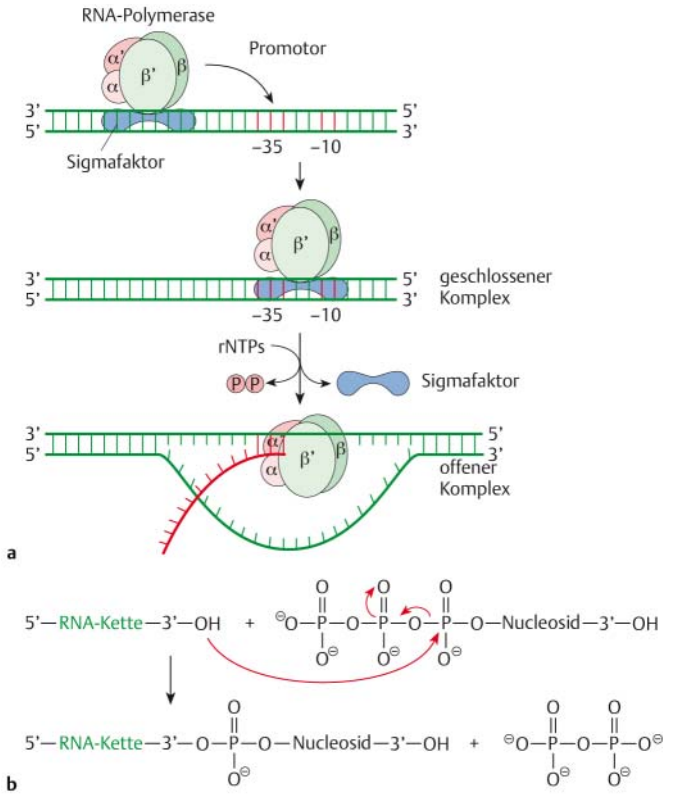


Abb. 6.**8** **Transkription bakterieller Gene. a** Gesteuert vom Sigmafaktor lagert sich die RNA-Polymerase an den Promotor an und bildet den geschlossenen Komplex. Nach Strangtrennung bildet sich der offene Komplex, der die RNA-Synthese in 5′→3′-Richtung an der DNA-Matrize bis zur Terminationssequenz durchführt. **b** Das 3′-Hydroxylende der gebildeten RNA-Kette greift während der Kettenverlängerung einen Phosphatrest des zu addierenden Ribonucleotids an. Unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) wird die Bindung geknüpft.

senden RNA-Strang angefügt. Die Polymerisationsrate beträgt zwischen 40 und 100 Nucleotide pro Sekunde.

Zwei generelle Mechanismen der **Transkriptionstermination** in Bakterien sind bekannt. Zum einen ist am 3′-Ende eines Gens eine DNA-Sequenz zu finden, an die in der gebildeten mRNA, das Terminationsprotein **Rho** bindet und die Transkription zum Abbruch bringt. Zum anderen wird nach dem Stoppcodon des jeweiligen Gens eine Haarnadelschleife mit bis zu zehn GC-Basenpaaren, gefolgt von vier bis acht Uridinnucleotiden codiert. Die Haarnadelschleife auf der RNA bringt die RNA-Polymerase zum Anhalten und die Uridine sorgen für die Dissoziation des RNA-Stranges. Diesen Mechanismus nennt man **Rho-unabhängige Termination**.

Ein nur wenig verstandener Teil des Genexpressionsprozesses ist die geregelte **Stabilität von RNA**, besonders von mRNA. Man weiß, dass einige mRNAs nur wenige Sekunden existieren, während andere eine Halbwertszeit von über einer halben Stunde haben. Der Durchschnitt für mRNA liegt bei ein bis zwei Minuten. Ribosomale RNAs und tRNAs können über Stunden hinweg stabil gegen RNAse-Abbau bleiben. Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNAs sowie die Bindung von Proteinen und von anderen RNAs bestimmen dabei die Lebensdauer.

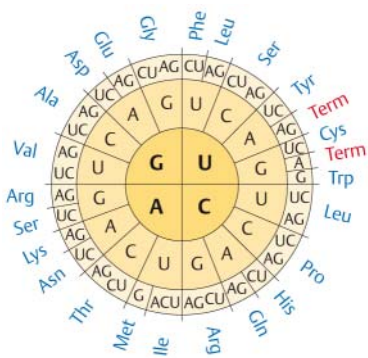


Abb. 6.**9** **Der genetische Code.** Jeweils drei Nucleotide, **Triplett**, codieren für eine bestimmte Aminosäure. Bei 4 Basen (A, C, G, U) sind 64 verschiedene Codons möglich. Damit existieren bei 22 Aminosäuren und 3 Codons (UAA, UAG, UGA), die das Ende eines Proteins anzeigen und als Stoppsignale für die Translation dienen, mehrere Codons für eine Aminosäure. Der genetische Code ist **degeneriert**. Für Serin und Arginin gibt es z. B. sechs Codons, für Methionin und Tryptophon nur eins. Das Codon AUG für Methionin dient bei 90 % der mRNAs gleichzeitig auch als Startcodon. Aber auch GUG (8,9 %), UUG (1 %) und CUG (0,1 %) können diese Funktion erfüllen. Selenocystein und Pyrrolysin fehlen, sie werden in einige seltene Proteine über die Stoppcodons UGA und UAG eingebaut. Dabei wird die Stoppfunktion dieser Codons durch eine spezielle Konformation der mRNA, zusätzliche Translationsfaktoren und besondere tRNAs ausgehebelt.

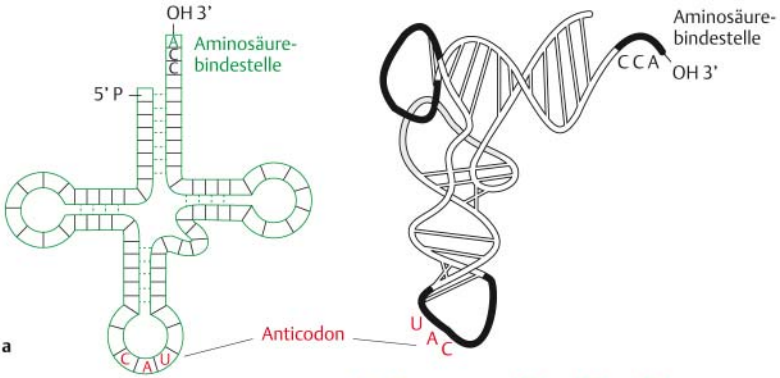
6.1.6 Translation

Der letzte Schritt bei der Genexpression ist die Übersetzung der im Gen niedergelegten und über die mRNA nun aktivierten Information in ein Protein (**Translation**). Die Beladung der als Bindeglied zwischen genetischem Code (Abb. 6.**9**) der mRNA und den codierten Aminosäuren dienenden Transfer-RNAs (tRNAs) ist ein zweistufiger Prozess (Abb. 6.**10**).

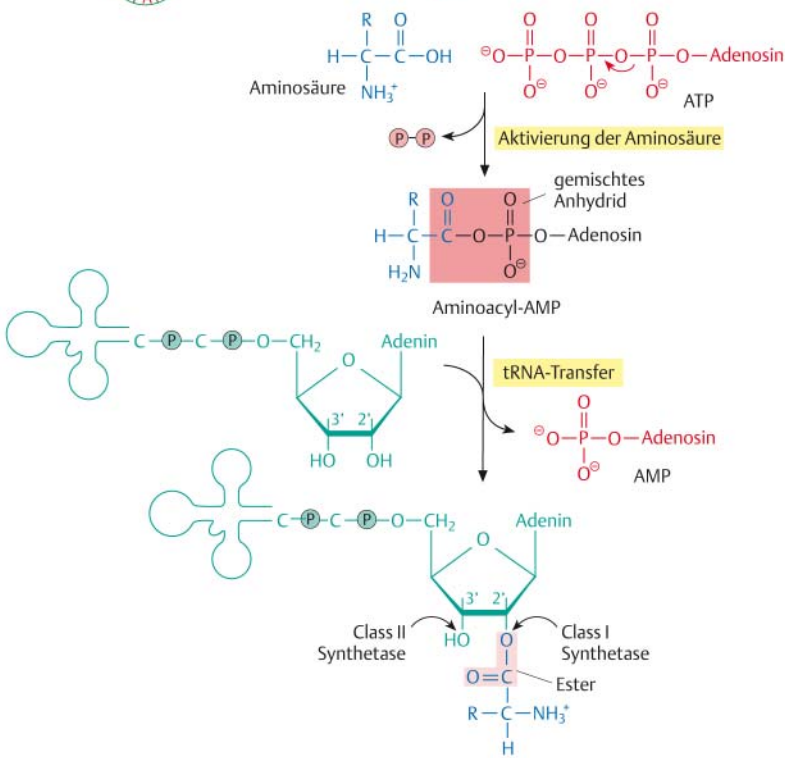
Viele Zellen besitzen 20 verschiedene **Aminoacyl-tRNA-Synthetasen**, jeweils eine pro Standardaminosäure. Einige besitzen weniger und nutzen die chemische Veränderung von bereits tRNA-gebundenen Aminosäuren, um das Spektrum der nötigen Aminoacyl-tRNAs zu erzeugen. Bakterien haben oft über 60 verschiedene tRNAs, so dass der genetische Code abgedeckt werden kann. Es gibt aber auch Fälle, wo deutlich weniger verschiedene tRNA-Moleküle pro Zelle zur Verfügung stehen. Dieses Problem wird gelöst, indem der dritten Base des Codons, der im degenerierten genetischen Code eine weniger bedeutende Rolle zukommt, Fehlpaarungen mit verschiedenen Nucleotiden der ersten Position des Anticodons erlaubt werden. Diese Wobble-Paarungen beinhalten G-U-, U-G-, A-I-, C-I- und U-I-Wechselwirkungen. Dabei steht „I" für das Purinnucleosid Inosin, das in manchen tRNAs vorkommt.

Initiation. Durch die in den Tripletts gespeicherte Information hat jede mRNA drei mögliche Leseraster. Die 5′-nicht translatierte Region einer mRNA enthält deshalb die Ribosomenbindestelle. Diese ist so vom Translationsstart entfernt lokalisiert, dass das Ribosom nach seiner Bindung am Startcodon anfängt (Abb. 6.**11**). Die RNA-Sequenz der Ribosomenbindestelle ist komplementär zum 3′-Ende der 16S-rRNA. Durch Basenpaarung wird so die 30S-Untereinheit an die zu translatierende mRNA gebunden. Dieser Prozess benötigt außerdem den Initiationsfaktor IF3. Als nächstes bindet IF1 und blockiert die A-Stelle. Dann geleitet IF2 in seiner GTP gebundenen Form die Initiator tRNA, eine N-Formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA), zum Startcodon, das in der P-Stelle lokalisiert ist. IF3 verlässt nun zuerst die 30S-Untereinheit und macht den Weg frei für die Bindung der 50S-Untereinheit. Nun haben auch IF1 und IF2 ihre Aufgabe erfüllt und verlassen unter GTP-Hydrolyse den nun fertigen Translationsinitiationskomplex.

Drei Schritte bestimmen den **Elongationsprozess**. Eine Aminoacyl-tRNA bindet in der **A-Stelle**, eine Peptidbindung wird erzeugt zwischen der neuen Aminosäure auf der tRNA in der A-Stelle und dem Peptidstrang auf der in der **P-Stelle** sitzenden tRNA (Abb. 6.**11**). Durch die Übertragung der wachsenden Pepidkette auf die neue tRNA in der A-Stelle rückt die mRNA ein Codon weiter und positioniert so diese tRNA in der P-Stelle. Die ursprünglich in der P-Stelle sitzende tRNA, hat nun keine Aminosäure mehr gebunden, rückt durch die mRNA-Bewegung in die **E-Stelle** und verlässt schließlich das Ribosom. Auch diese Schritte werden von zusätzlichen Translationsfaktoren begleitet und kontrolliert. So wird eine Aminoacyl-tRNA nach ihrer Bildung an EF-Tu-GTP gebunden, der sie dann auch in die A-Stelle geleitet und nach Erfüllung seiner Aufgabe unter GTP-Spal-


OH 3'
Aminosäure-
bindestelle
5' P
Aminosäure-
bindestelle
C C A
OH 3'
Anticodon
U
A
C
C A U

a


Aminosäure
ATP
Aktivierung der Aminosäure
gemischtes
Anhydrid
Adenosin
Aminoacyl-AMP
Adenin
tRNA-Transfer
AMP
Class II
Synthetase
Class I
Synthetase
Ester

b

◀ Abb. 6.**10** **Struktur der tRNAs. a** Die tRNAs besitzen eine hohe Stabilität durch ihre zweidimensionale Kleeblattstruktur, die wiederum in eine kompakte dreidimensionale Struktur gefaltet wird. Eine Vielzahl von über 100 verschieden modifizierten Basen trägt dazu bei, da sie ungewöhnliche intramolekulare Bindungen erlauben und gleichzeitig schlechte Substrate für abbauende RNAsen sind. **b** Bei der Beladung der tRNAs wird die Aminosäure durch Bildung einer Anhydridbindung zum AMP aktiviert. Die Energie stammt aus ATP und birgt letztlich auch die Energie zur Knüpfung der Peptidbindung am Ribosom. Im zweiten Schritt wird diese aktivierte Bindung auf entweder das 2′-Ende (Klasse I-Synthetasen) oder 3′-Ende (Klasse II-Synthetasen) der passenden tRNA unter Bildung eines Esters transferiert.

tung das Ribosom verlässt. Nach Knüpfen der Peptidbindung wird die Bewegung des Ribosoms um ein Codon auf der mRNA, die so genannte Translokation, durch EF-G-GTP vermittelt (Abb. 6.**11**). Auch er verlässt nach erfüllter Aufgabe unter GTP-Spaltung das Ribosom. Dieser Dreischrittmechanismus wiederholt sich so oft bis das Ribosom auf ein Stoppcodon trifft. Das gebildete Protein tritt durch einen Kanal aus dem Ribosom aus, wo die Proteinfaltungsmaschinerie (s. u.) wartet.

Termination. Wenn ein Stoppcodon erreicht wird, für das es keine passende tRNA gibt, rückt nach der Bildung der letzten Peptidbindung die Polypeptid-tragende tRNA in die P-Stelle und das Stoppcodon in die A-Stelle. Ein Proteinentlassungsfaktor (Protein Release Factor, RF1 oder RF2) bindet in der A-Stelle und sorgt dafür, dass die Peptidyltransferase den Peptidstrang von der tRNA in der P-Stelle abschneidet und dieser entlassen wird. Für das Recycling des Ribosoms sorgt RF3 dafür, dass RF1 oder RF2 das Ribosom verlassen, und der Ribosomen-Recycling-Faktor (RRF) bindet zusammen mit EF-G-GTP. Unter GTP-Spaltung werden die beiden Ribosomenuntereinheiten voneinander getrennt und IF3 bindet wieder an die 30S-Untereinheit, um eine Reassoziation mit der 50S-Untereinheit zu unterbinden. Die Translationsrate erlaubt den Einbau von 15 bis 20 Aminosäuren pro Sekunde in ein Protein.

In Prokaryoten ohne Zellkern ist Transkription und Translation direkt gekoppelt. Das bedeutet, dass bevor eine mRNA zu Ende transkribiert ist, bereits mit ihrer Translation begonnen werden kann. Prozesse der Genregulation, wie **Attenuation**, beruhen auf diesem Phänomen (S. 478). Da Transkriptionsrate und Translationsrate offensichtlich unterschiedlich sind, benutzt die Zelle Proteine, wie NusA und NusG, die Geschwindigkeit der RNA-Polymerase entsprechend anzupassen.

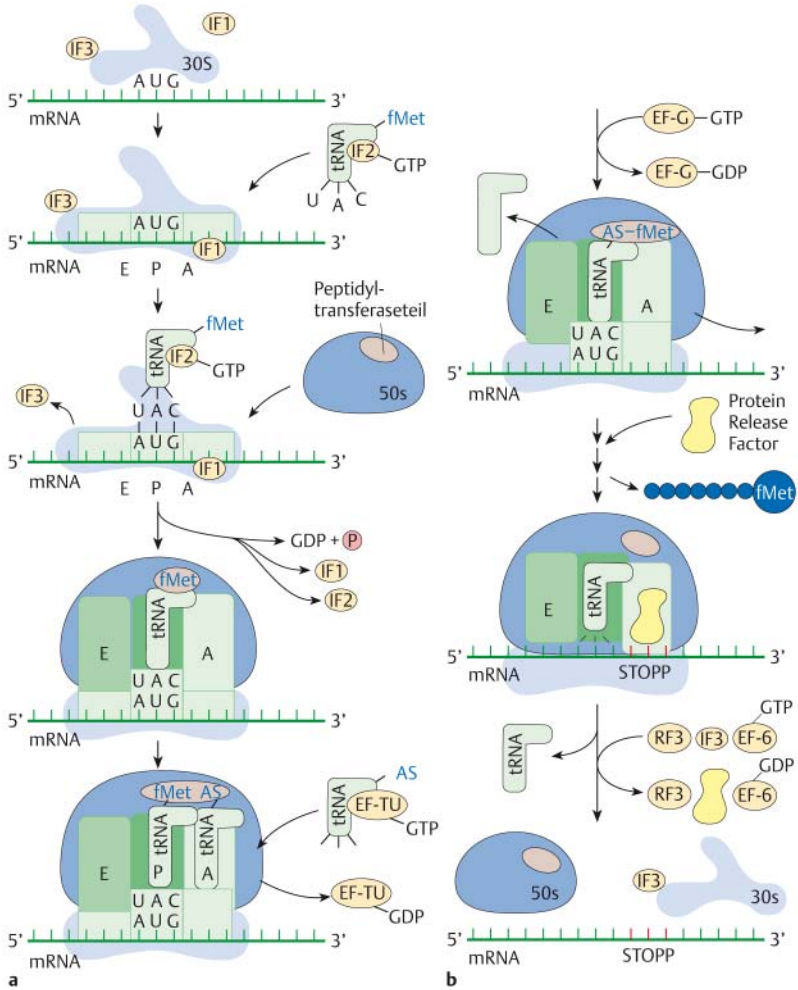


Abb. 6.**11** **Translation. a** Während der Initiation wird an der zu translatierenden mRNA durch diverse Translationsinitiationsfaktoren (IFs) zuerst die kleine, dann die große Untereinheit des Ribosoms angelagert. Es folgt die mit Formylmethionin beladene Initiator-tRNA als Startpunkt für die Polypeptidkette. An diese erste Aminosäure werden mit weiteren über tRNAs ans Ribosom transportierte Aminosäuren angehängt. Auch dieser Prozess wird durch eine Reihe von Elongationsfaktoren (EFs) gesteuert. **b** Am Stoppcodon schließlich kommt es zum Abbruch der Translation, dem Entlassen der Polypeptidkette und dem kontrollierten Zerlegen des Ribosoms über Terminationsfaktoren (RFs).

6.1.7 Proteinfaltung, Modifikation und Stabilität

Man geht davon aus, dass die Aminosäuresequenz eines Proteins alle Information für seine dreidimensionale Faltung beinhaltet. Trotzdem wurden bei der Analyse von zellulären Stressprozessen, wie dem Hitzeschock, Proteinfaltungshilfen, sogenannte **Chaperone** und **Chaperonine**, gefunden. Auch ohne Hitzeschock sind einige dieser Proteine essentiell zum Überleben:

So wird die naszierende Polypeptidkette beim Verlassen des Ribosoms zuerst vom Ribosom assoziierten Chaperon **Triggerfaktor** gebunden, das die wachsende Kette vor Proteaseangriff schützt. Zusammen mit einem weiteren Chaperon, dem **DnaJK-System**, wird die sich faltende Polypeptidkette stabilisiert. Nach Abschluss des Faltungsprozesses kann das Chaperon erkennen, ob die Faltung erfolgreich war und im Erfolgsfall das Protein entlassen (Abb. 6.**12**). Bei fehlge-

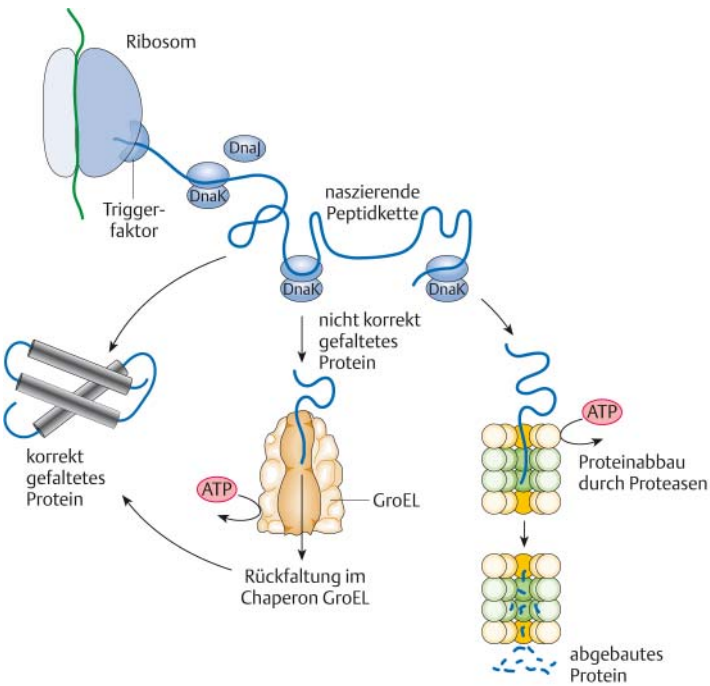


Abb. 6.**12** **Proteinfaltung und Abbau.** Nach Verlassen des Ribosoms faltet sich die über den Triggerfaktor stabilisierte Proteinkette normalerweise in ein funktionelles Protein. Fehlgefaltete Proteine werden zuerst von DnaJK gebunden und so in Lösung gehalten. Dann werden sie entweder über das Chaperon GroEL entfaltet und können so erneut ihre funktionelle dreidimensionale Struktur einnehmen. Alternativ werden sie von Proteasen abgebaut und die Aminosäuren recycelt.

falteten Proteinen werden zwei Wege beschritten. Entweder wird das Protein dem Rückfaltungschaperonsystem **GroEL** zugeführt, das unter ATP-Verbrauch das Protein teilweise entfaltet und damit eine neue Runde der Faltung erlaubt. Oder das Protein wird der Proteinabbaumaschinerie der Zelle zugeführt, wo es wiederum unter ATP-Verbrauch abgebaut wird. Einiger dieser **Proteasen**, wie ClpAP oder ClpXP, haben wie das Chaperon GroEL eine fassartige Struktur (Abb. 6.**12**).

In Bacteria schneidet nach der Translation eine Peptiddeformylase die Formylgruppe der Initiatoraminosäure Methionin ab, und oft wird durch eine Methioninaminopeptidase gleich das ganze Formylmethionin entfernt. In Eukaryoten existieren zahlreiche **posttranslationale Proteinmodifikationen**, wie Glykosylierungen. Dies hat man in Prokaryoten bisher weniger beobachtet.

Zahlreiche Proteine erfüllen ihre Funktionen außerhalb des Cytoplasmas in der Membran, im Periplasma oder außerhalb der Zelle. Extrazelluläre Enzyme dienen oft dem Abbau polymerer Nährstoffe wie Stärke, Cellulose, Proteine und Lipide, die nicht in die Zelle hineintransportiert werden können. Für ihren Export tragen sie Versandhinweise in Form von Leitpeptiden, eine Aminosäuresequenz von 10 bis 100 Aminosäuren, die normalerweise am Anfang eines Gens codiert ist und somit am Aminoterminus des Proteins auftaucht. Verlässt die Peptidkette das Ribosom, wird sie gleich von der entsprechenden **Exportmaschinerie** erkannt. Der Proteinexport ist für das grampositive Modellbakterium *Bacillus subtilis* besonders gut untersucht, da es viele **Exoenzyme** besitzt und diese von biotechnologischer Bedeutung, z. B. für die Waschmittelherstellung, sind (S 574, Abb. 6.**13**). Neben dem **SEC-System** zum Proteinexport gibt es noch eine Reihe weiterer Systeme, wie das **TAT-System**, das gefaltete Proteine mit gebundenem Cofaktor exportieren kann.

Genom: Gesamtheit aller DNA einer Zelle, dazu gehören Chromosomen und extrachromosomale Elemente z. B. Plasmide oder bei Eukarya die Organellengenome.
DNA-Supercoil: Zusätzliche Verdrillung der DNA-Doppelhelix; zusätzliche Rechtswindungen, d. h. im Sinne der Doppelhelixwindung (positiver Supercoil), zusätzliche Linkswindungen (negativer Supercoil).
Topoisomere: DNA-Moleküle gleicher Größe und Basenpaarabfolge, aber verschiedener Verdrillung.
origin of replication, oriC: Replikationsursprung, bei Bacteria und Archaea meist nur einmal vorhanden, von dem aus die Replikation bidirektional startet und an dem Proteine gebunden sind, die das Chromosom während der Replikation an der Cytoplasmamembran fixieren.
Horizontaler Gentransfer: Austausch von genetischem Material auch über Speziesgrenzen hinweg mittels Bakteriophagen, konjugativen Plasmiden und durch natürliche Transformation.

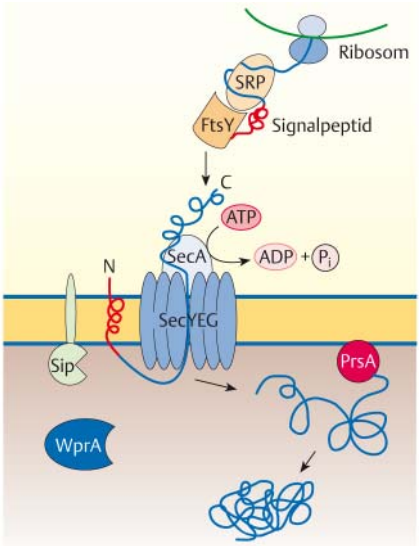


Abb. 6.13 **Proteinsekretion in *B. subtilis*.** Der Signal-Erkennungs-Partikel (SRP, signal recognition particle), bestehend aus RNA und Protein, bindet zusammen mit dem Chaperon FtsY die Leitsequenz, hält das Protein im ungefalteten Zustand und führt es zur Proteinsekretionspore. Dort wird es im ungefalteten Zustand mittels des ATP spaltenden Motorproteins SecA durch die Membranpore, bestehend aus SecE, SecG, und SecY, geleitet. Außerhalb der Zelle wird das Signalpeptid nach Eintauchen in die Membran von der Signalpeptidase Sip entfernt. Chaperone, wie PrsA, unterstützen die extrazelluläre Faltung, während Proteasen, wie WprA, falsch gefaltete Proteine wieder abbauen.

6.2 Veränderungen der Erbsubstanz durch Mutationen

Eine vererbbare Veränderung der Basenpaarsequenz im Genom eines Organismus wird als **Mutation** bezeichnet. Ein Stamm, der eine Mutation trägt, die **Mutante**, unterscheidet sich im **Genotyp** vom Elternstamm (**Wildtyp**). Eine beobachtbare Auswirkung auf die Eigenschaften des Organismus wird als **Phänotyp** bezeichnet. Der Mutationsort ist meist zufällig und ungerichtet, das Mutationsereignis spontan oder kann durch Umwelteinflüsse induziert werden. Substanzen, die die Mutationshäufigkeit erhöhen sind **Mutagene**. DNA-Schäden werden meist durch eine Reihe verschiedener **DNA-Reparatursysteme** wieder repariert.

Für die Erhaltung einer Art ist die Stabilität des Genoms von äußerster Wichtigkeit. Auf der anderen Seite sind Veränderungen des genetischen Materials die Ursache für die Entwicklung neuer Eigenschaften, die nach dem Prinzip der **Selektion** entweder eliminiert oder zur Etablierung einer neuen Spezies führen können. Sie sind so eine zentrale Grundlage der **Evolution**. In den meisten Fällen bleiben Änderungen im Genom ohne erkennbare Folgen. Sie können aber auch zur Synthese inaktiver oder in ihrer Funktion eingeschränkter Proteine führen, die sich oft nachteilig auf das Wachstum auswirken und manchmal den Tod

zur Folge haben. Um die Stabilität eines Genoms zu wahren, existieren daher oft sehr effektive DNA-Reparatursysteme, die spontan auftretende Veränderungen im genetischen Material, wie durch Fehler bei der DNA-Replikation ausgleichen. In manchen Fällen führt eine zufällige Veränderung aber auch zur Ausbildung neuer Eigenschaften, die für den Organismus von Vorteil sind, ihm einen Selektionsvorteil gegenüber seinen Artgenossen verschafft und die sich so in der Nachkommenschaft durchsetzen kann. Neben dem Auftreten von spontanen vererbbaren Veränderungen im Genom (**Mutationen**) stellt der Austausch und die Integration von neuem genetischen Materials aus anderen Organismen oder die Neukombination von Genen bei diploiden Genomen in eukaryotischen Zellen (**Rekombination**) eine weitere Möglichkeit dar, genetische Veränderungen zu erzeugen und an die Nachfolgegeneration weiterzugeben (S. 230). In der Regel bringen solche Rekombinationsereignisse weiterreichende Veränderungen mit sich, da ganze Gene, Genomsegmente oder sogar ganze Genome zwischen den Organismen übertragen und ausgetauscht werden können.

Obwohl sich prokaryotische Zellen üblicherweise vegetativ vermehren, existieren bei ihnen dennoch parasexuelle Prozesse, mit denen sie genetisches Material austauschen. Zu diesen Gentransfer-Prozessen zählt man die **Transformation**, bei der freie DNA aus der Umgebung aufgenommen wird, die **Konjugation**, bei der durch direkten Kontakt DNA von einer Zelle in die andere übertragen wird, und die **Transduktion**, bei der fremde DNA durch Viren in die prokaryotische Zelle eingeführt wird (S. 240). Um die Stabilität des genetischen Materials zu gewährleisten, ist der Austausch von DNA üblicherweise eingeschränkt. Andererseits ist die Aufnahme und Verwertung fremder DNA, **horizontaler Gentransfer**, eine weitere zentrale Triebfeder der Evolution.

6.2.1 Mutationen und Mutanten

Ein Stamm, der im Vergleich zum Elternstamm (**Wildtyp**) eine vererbare Veränderung (Mutation) trägt, ist eine **Mutante**. Demzufolge unterscheidet sich die Nucleotidsequenz des Genoms (**Genotyp**) der Mutante von der des Elternstammes. Veränderungen des Genotyps können die erkennbaren Eigenschaften eines Organismus (**Phänotyp**) verändern. Obwohl jede Mutation den Genotyp einer Zelle verändert, kann der Phänotyp unverändert bleiben, wenn das betroffene Gen beispielsweise nicht exprimiert wird oder das Genprodukt unverändert bleibt. Zudem kann ein bestimmter Genotyp verschiedene Phänotypen zur Folge haben, da sich die Auswirkungen einer Mutation unter verschiedenen Lebensbedingungen deutlich unterscheiden können. So kann eine *E. coli*-Mutante deren Transportsystem für Maltose durch eine Mutation ausgeschaltet ist, zwar nicht mehr auf Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, doch erfolgt uneingeschränktes Wachstum, wenn Glucose vorliegt.

Bei diploiden Organismen, bei welchen zwei Allele eines Genes vorliegen, wirken sich Mutationen in einem Allel in der Regel nur aus, wenn diese dominant

sind. Mutationen im haploiden Genom der prokaryotischen Zelle wirken sich hingegen direkt und daher sehr viel häufiger auf den Phänotyp aus. Durch die kurze Generationszeit und die hohe Populationsdichte können sich prokaryotische Zellen mit vorteilhaften Eigenschaften sehr schnell gegenüber anderen durchsetzen. Dies ermöglicht ihnen sich sehr erfolgreich an schnell verändernde Umweltbedingungen anzupassen und extrem unterschiedliche Lebensräume einzunehmen.

Arten der Mutationen

Je nachdem wie eine Mutation entstanden ist und welchen Umfang sie einnimmt, werden verschiedene Arten von Mutationen unterschieden. Mutationen, die zur Veränderung eines Basenpaares führen, sogenannte **Basenpaarsubstitutionen** werden **Punktmutationen** genannt. Wird dabei eine Purinbase durch eine andere Purinbase bzw. eine Pyrimidinbase durch eine andere ersetzt, dann spricht man von einer **Transition** (A⇔G; T⇔C). Erfolgt ein Austausch von einer Purin gegen eine Pyrimidinbase oder umgekehrt, so wird dies als **Transversion** (A⇒T/C, G⇒T/C, oder T⇒A/G, C⇒A/G) bezeichnet. Erfolgt eine solche Punktmutation in einer codierenden Sequenz, so kann dies je nachdem welches und wie das Codon betroffen wurde, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (Abb. 6.**14**).

Wird ein Codon durch eine Punktmutation in ein Codon überführt, das eine andere Aminosäure codiert (**Missense-Mutation**), so wird dies eine Änderung der Aminosäuresequenz (**Aminosäuresubstitution**) des Genprodukts zur Folge haben (Abb. 6.**14a**). Je nachdem, ob eine für die Struktur und Funktion entscheidende Aminosäure getroffen wurde oder nicht, kann dies zur vollständigen Inaktivierung des Proteins oder nur zu sehr geringfügigen Auswirkungen auf die Funktion führen. Wenn durch die Mutation eine polare Aminosäure durch eine ähnlich polare Aminosäure ersetzt wird, kann die Funktion des betroffenen Proteins nicht oder nur geringfügig betroffen sein. Eine Mutation kann zu einem **temperatursensitiven** Enzym führen, das bei moderaten Temperaturen zwar korrekt gefaltet ist, bei höheren Temperaturen aber nicht mehr stabil in seiner aktiven dreidimensionalen Struktur vorliegt und inaktiv ist.

Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes führen jedoch nicht alle Mutationen in codierenden Sequenzen zu Veränderungen der Aminosäuresequenz. Wird z. B. das Codon CGA zu CGG oder CGC verändert, so hat dies keine Auswirkung auf die Polypeptidsequenz, da all drei Codons die Aminosäure Arginin codieren (Abb. 6.**9**). Solche Mutationen werden **stille** oder **stumme Mutationen** genannt. Durch einen Nucleotidaustausch kann ein Sinn-Codon in eines der drei Stoppcodons TAA, TAG und TGA umgewandelt werden (**Nonsense-/Stoppmutation**), was zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und meist zum Verlust der Proteinfunktion führt (Abb. 6.**14b**). Werden zusätzliche Nucleotide in die Nucleotidabfolge eingefügt (**Insertion**) bzw. entfernt (**Deletion**), kann

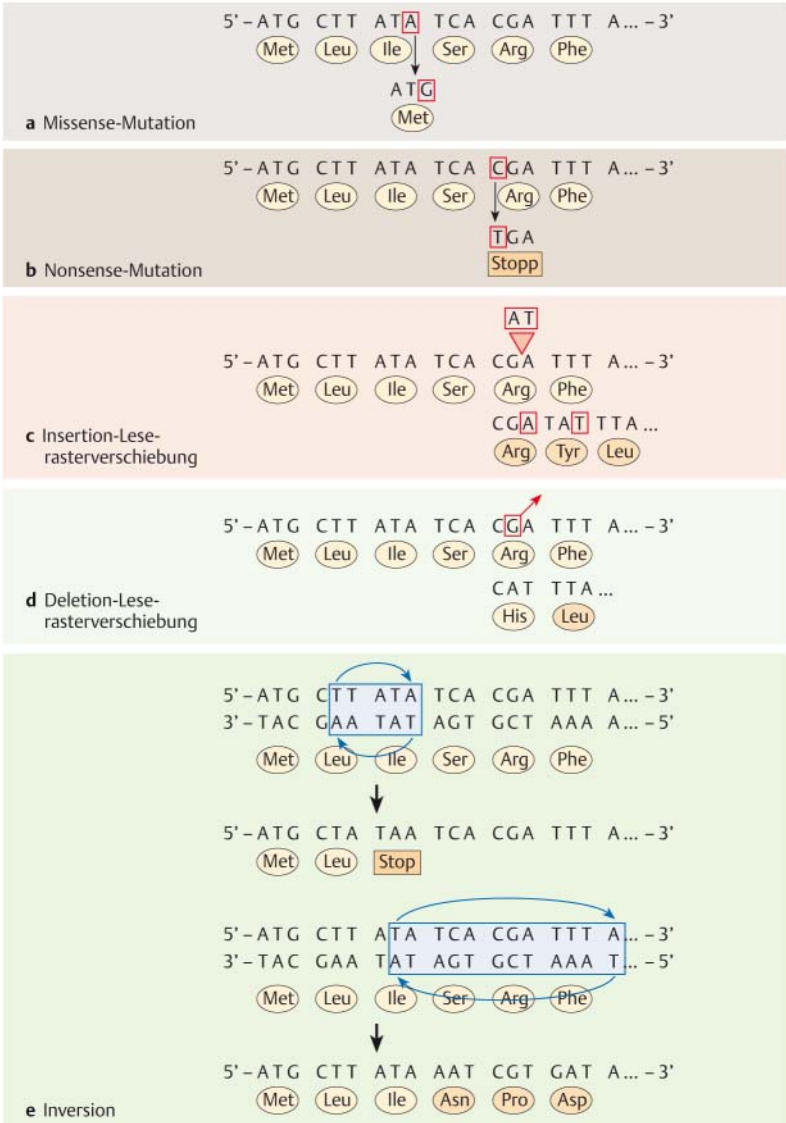


Abb. 6.**14** **Veränderungen in der DNA-Sequenz die zu verschiedenen Mutationen führen.** Basenpaarsubstitutionen können ein Aminosäurecodon zu einem anderen Aminosäurecodon oder Stoppcodon verändern. Weitere Veränderungen beinhalten eine Umkehrung der Nucleotidfolge, das Hinzufügen oder den Verlust von Basen.

es zu einer Veränderung der Codons in der DNA und damit zu einer **Leserasterverschiebung** (frame shift) kommen, die die Synthese von unsinnigen Proteinen zur Folge hat (Abb. 6.**14c, d**). Erfolgt durch die Leserasterverschiebung ein Stoppcodon in der neuen Abfolge, kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese. Die unsinnigen bzw. verkürzten Proteinderivate werden meist sehr schnell durch die Protease-Komplexe der Zelle abgebaut (S. 211; Abb. 6.**12**).

Punktmutationen sind durch weitere Mutationen normalerweise umkehrbar. Man spricht dann von **Reversion** und bezeichnet die Mutante als **Revertante**. Entsteht durch eine Mutation in einer Mutante wieder der Genotyp des Wildtyps, so spricht man von einer **Rückmutation** (**echte Revertante**). Wird der Phänotyp des Wildtyps durch eine zweite Mutation wieder hergestellt, die sich an einem anderen Ort, entweder innerhalb (**intragenisch**) oder außerhalb (**extragenisch**) des zuvor mutierten Gens befindet, dann handelt es sich um eine **Suppressormutation**. Es gibt hauptsächlich zwei Typen von Suppressormutationen. Die erste betrifft **Leserasterverschiebungen**, die durch die Insertion bzw. Deletion weiterer Basenpaare wieder aufgehoben werden können, so dass die Gesamtanzahl zusätzlicher oder deletierter Basenpaare ein Vielfaches von drei ist. In diesem Fall wird der ursprüngliche Leserahmen wieder hergestellt mit einer limitierten Anzahl unterschiedlicher Codons. Die zweite Form von Suppression betrifft **Stoppmutationen**, die zu einem Abbruch der Translation führen, da keine adäquate tRNA mehr durch das Codon erkannt wird. Es ist aber möglich dass Mutationen in einem Anticodon einer tRNA dazu führen, dass das entstandene Stoppcodon nun wieder erkannt und in eine Aminosäure übersetzt wird.

Beispielsweise kann ein Basenaustausch in einem Gen dazu führen, dass in der mRNA ein 5′-CAG-3′-Codon für die Aminosäure Glutamin zu 5′-UAG-3′-Codon, einem Codon für Stopp, wird. Durch eine Veränderung des Anticodons der Glutamin-spezifischen tRNA ($tRNA^{Gln}$) von 3′-CUC-5′ zu 3′-AUC-5 kann das 5′-UAG-3′-Stoppcodon der mRNA gebunden werden, wodurch nun die Aminosäure Glutamin in die wachsende Kette eingebaut wird. Da es mehrere $tRNA^{Gln}$-Gene gibt, verliert die Zelle dabei nicht per se die Möglichkeit Glutamin-Codons zu erkennen. Man würde auch annehmen, dass die Suppressor-tRNA nun die normale Kettentermination bei der Translation verhindern würde. Jedoch befinden sich oft mehrere Terminations-Codons am Ende der codierenden Sequenz. Zudem wird die Termination durch die Funktion von Entlassungsfaktoren verstärkt, so dass die Suppression bei weitem nicht absolut ist, sondern zwischen 10 bis 50 % für einen UAG-Suppressor variiert.

Ein Mutantenphänotyp kann auch wieder zum Wildtyp revertiert werden, indem ein Plasmid mit der funktionellen Version des betroffenen Gens in die Zelle eingebracht wird. In diesem Fall spricht man von der **Komplementation** des chromosomalen Defekts.

Im Gegensatz zu Punktmutationen sind Mutationen, die zu umfangreichen Veränderungen des Genmaterials führen in der Regel nicht umkehrbar. Solche **Segmentmutationen** sind umfangreiche Deletionen oder Insertionen sowie **Duplikationen** oder **Inversionen** (Abb. 6.**14e**), bei der die Reihenfolge bestimm-

ter Nucleotide verdoppelt oder umgedreht ist. Duplikationen sind häufig nicht sehr stabil, da sie leicht durch homologe Rekombination zwischen den identischen Basenabfolgen verloren gehen (S. 230). Neben der Aufnahme von Fremd-DNA durch horizontalen Gentransfer sind Duplikationen oder weitere Amplifikationen des vorhandenen Genmaterials die einzige Möglichkeit die Menge der zellulären DNA zu erhöhen, was bedeutende Auswirkungen für die Zelle haben kann. Beispielsweise sind die eng benachbarten Gencluster, die die ribosomale RNA in *E. coli* codieren durch Duplikationen auseinander hervorgegangen. Andere Varianten umfangreicher Mutationen stellen die **Translokationen** dar, bei welchen ein großer Teil chromosomaler DNA an einen neuen Ort verlagert wird. Ähnlich wie bei den Inversionen gehen diese Umstrukturierungen hauptsächlich auf Fehler bei homologen Rekombinationsprozessen zurück.

Genetische Nomenklatur: Um den Genotyp eines Bakteriums zu beschreiben, wird das betreffende Gen in drei Kleinbuchstaben, dem ein Großbuchstabe folgt, in kursiv beschrieben. Das Kürzel sagt oft etwas über die Genfunktion aus. Das Gen für Enzym β-Galactosidase wird als *lacZ* gekennzeichnet, das codierte Protein selbst wird als LacZ abgekürzt. Bei der Angabe eines Genotyps für einen *E. coli*-Stamm werden nur die defekten Gene gelistet, dort bedeutet *lacZ* also eine Defizienz in diesem Gen. Selten sieht man den hochgestellten Zusatz „plus“ oder „minus“, also $lacZ^+$ oder $lacZ^-$, der direkt auf ein intaktes oder zerstörtes Gen hinweist. Mutationen in *lacZ* werden mit bestimmten Allelnummern oder Symbolen bezeichnet, um die Art der Mutation näher zu charakterisieren. So kann eine Mutation in *lacZ* als *lacZ1* oder *lacZ2* bezeichnet werden. Eine am Anfang, Ende oder vollständig deletierte Version des *lacZ*-Gens wird als ´*lacZ*, `*lacZ* oder Δ*lacZ* dargestellt. Sind ganze chromosomale Bereiche deletiert, wird der entsprechende Bereich in Klammern dem Δ nachgestellt. So bedeutet Δ(*araABC-leu*) eine vollständige Deletion der DNA zwischen dem *araABC*-Operon und dem *leu*-Locus.

Insertionen von Transposons, Antibiotikaresistenz vermittelnden Genen oder anderen DNAs in Gene wird durch „::“ gekennzeichnet. So bedeutet *trpC22*::Tn*10* (Tet^r), dass ein Tn*10*-Transposon in das *trpC* integriert wurde und eine Tetracyclinresistenz durch das Transposon vermittelt wird. Dies erlaubt eine Selektion auf den Stamm, der dieses Transposon trägt. Die Integrationsposition eines Transposons auf dem *E. coli*-Chromosom kann auch durch einen Dreibuchstabencode angegeben sein. Dabei ist der erste Buchstabe immer ein kleines „*z*“, der zweite Buchstabe gibt die Minuten der chromosomalen Karte in zehn Minuten Abständen und der dritte in ein Minuten Abständen an. So bedeutet *zhg*::Tn*10* eine Tn*10*-Integration bei 87 Minuten.

Eine Stoppmutation wird hingegen in der Regel z. B. mit $lacZ23_{am}$ dargestellt, wobei die tiefgestellte Abkürzung die Art des eingeführten Stoppcodons („amber“ TAG), und die Zahl meist das betroffene Codon bezeichnet.

Das ϕ–Symbol zeigt Genfusionen an. So bedeutet ϕ(*ompC′-lacZ*$^+$), dass *ompC* mit *lacZ* fusioniert wurde. Der „′“ nach *ompC* bedeutet, dass das *ompC*-Gen eine Deletion im 3′-Bereich trägt. Das „+“ sagt, dass das gesamte *lacZ*-Gen fusioniert wurde.

Mutationen mit destinkten Phänotyp, aber ohne klare chromosomale Lokalisation bekommen einen Bindestrich zwischen Gennamen und Nummer. So bedeutet *met-2* eine Methioninauxotrophie, deren genetische Ursache unklar ist. Temperatursensitive Mutationen bekommen den Zusatz *ts*. Eine Mutation, die zur konstitutiven Expression eines Gens führt wird mit einem hochgestellten „q“ markiert, so bedeutet $lacI^q$, dass das Lac-Repressorgen permanent exprimiert wird. Eine solche Differenzierung ist notwendig, da die Mutationen auf unterschiedliche Weise auf die Funktion des betroffenen

Genproduktes Einfluss nehmen können. Der Phänotyp hingegen wird üblicherweise mit dem betroffenen Gen bezeichnet, das groß geschrieben wird, wobei durch ein hochgestelltes + oder – angedeutet wird, ob die jeweilige Funktion vorhanden ist oder fehlt. $LacZ^+$ bedeutet, der Stamm kann β-Galactosidase produzieren, während ein $LacZ^-$-Stamm unfähig ist, Lactose zu verwerten. Die Abkürzung Amp^r bzw. Amp^s bedeutet, der Stamm ist Ampicillin-resistent bzw. -sensitiv.

Diese Nomenklatur gilt hauptsächlich für Bakterien. In Bakteriophagen haben die Gene z. T. keinen Dreibuchstabencode, und die Bezeichnung und Schreibweise der eukaryotischen Gene ist sehr variabel.

Punktmutation: Veränderung in einem Basenpaar (Basenpaarsubstitution).
- **Transition:** Austausch eines Pyrimidins bzw. Purins gegen ein anderes Pyrimidin bzw. Purin.
- **Transversion:** Austausch eines Purins gegen ein Pyrimidin oder umgekehrt.

Stille/stumme Mutation: Mutation, die zu keiner Aminosäuresubstitution führt und den Phänotyp einer Zelle nicht verändert.
Missense-Mutation: Mutation, die zu einer Aminosäuresubstitution führt.
Nonsense-/Stoppmutation: Mutation, die einen Austausch eines Sinn- gegen ein Stoppcodon bewirkt.
Insertion: Mutation, in der zusätzliche Basen in die Basenabfolge der DNA eingefügt werden, z. B. durch transponierbare Elemente wie Phagen, Transposons und IS-Elemente.
Deletion: Mutation, in der Basen in der Basenabfolge verloren gegangen sind.
Leserasterverschiebung: Veränderung der Basentripletts einer Nucleinsäure, entsteht durch Einfügen oder Entfernen von Basen.
Reversion: Mutation, bei der der Phänotyp des Wildtyps wieder hergestellt wird.
Rückmutation: Mutation, durch die aus einer Mutante wieder der Genotyp des Wildtyps entsteht, Mutation findet am Ort der Ursprungsmutation statt.
Suppressormutation: Mutation, durch die aus einer Mutante wieder der Phänotyp des Wildtyps entsteht, Mutation findet an einem anderen Ort als die Ursprungsmutation statt. Sie kann intragenisch – innerhalb des betroffenen Gens, oder extragenisch – außerhalb des betroffenen Gens erfolgen.
Segmentmutationen: Mutationen, die eine größere Anzahl von Nucleotiden betreffen, entstehen durch umfangreichere Deletionen oder Insertionen, sowie Duplikation, Inversion und Translokation.
Translokation: Mutation, bei der ein Teil der chromosomalen DNA an einen anderen Ort verlagert wird.

Entstehung von Mutationen

Die meisten Mutationen entstehen **spontan** und **ungerichtet**.

Der entscheidende Beweis für diese Aussage wurde 1943 von **Luria** und **Delbrück** mittels sogenannter **Fluktuationstests** erbracht. Hierzu wurden Bakterien in mehreren Ansätzen in Streptomycin-haltigen Medien kultiviert. Obwohl die meisten Bakterien durch das Antibiotikum getötet wurden, überlebten die durch eine Mutation Streptomycin-resistent gewordenen Bakterien. Die Anzahl der resistenten Bakterien in den verschiedenen Ansätzen war jedoch sehr unterschiedlich, worauf sich schließen ließ, dass die Mutatio-

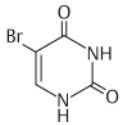
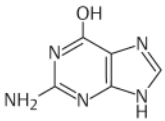
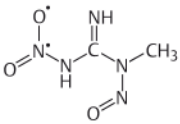
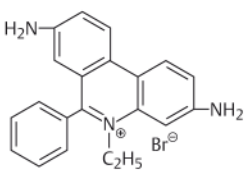
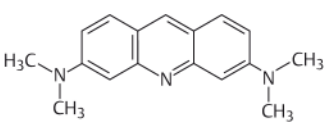
nen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten (d. h. Generationszeiten) entstanden sein mussten. Wäre die Mutation auf den Selektionsdruck hin erfolgt, hätte man in allen Ansätzen in etwa die gleiche Anzahl von Mutanten erwartet. Die Entstehung spontaner, ungerichteter Mutationen wurde später auch durch Versuche von **Lederberg** (1952) bestätigt, der zeigen konnte, dass spontane phagenresistente Bakterien entstehen, obwohl die entsprechende Kultur nie mit Phagen in Kontakt stand.

Wie entstehen nun aber spontane Mutationen? Bei den meisten spontanen Mutationen handelt es sich um den Austausch einzelner Nucleotide, die mit einer Häufigkeit von 10^{-9} bis 10^{-10} pro Basenpaar und Generation auftreten. Die Häufigkeit mit der eine spontane Mutation in einem prokaryotischen Gen von ungefähr 1000 bp stattfindet, liegt demnach bei 10^{-6} bis 10^{-7} pro Generation. In einer typischen Übernachtkultur von *E. coli* mit rund 10^{9} Zellen/ml befinden sich somit schon mehrere Mutanten für jedes Gen in jedem Milliliter der Kultur. Die Ursache für diese **Mutationsrate** sind Fehler, die bei der DNA-Replikation passieren und nicht durch die Reparaturmechanismen der Zelle (S. 227) ausgemerzt wurden. Eine weitere Ursache ist, dass Cytosin spontan durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil überführt wird, was wie Thymin mit Adenin basenpaart, und somit eine Transition bei der nächsten Replikationsrunde zur Folge hat (Abb. 6.**15**).

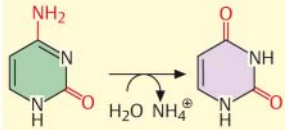
Die spontane Mutationsrate ist generell sehr niedrig, damit einerseits die Möglichkeit zur genetischen Optimierung des Systems bestehen bleibt, aber andererseits die genetische Stabilität des Organismus gesichert bleibt. Es gibt aber eine Reihe von biologischen, chemischen und physikalischen Wirkstoffen, die die Mutationsrate deutlich erhöhen können. Solche Wirkstoffe werden als **Mutagene** bezeichnet (Tab. 6.**3**).

Verschiedene Klassen von Mutagenen, wie die Nucleotidbasenanaloga, desaminierende, oxidierende oder alkylierende Agenzien, verändern die Basen der DNA und damit ihre Paarungseigenschaften (Tab. 6.**3,** Abb. 6.**15**). Chemische Veränderungen können auch die glykosidische Bindung zwischen Base und Desoxyribose betreffen, die zum Verlust der Base führen kann, was als **Depurinierung** bzw. **Depyrimidierung** bezeichnet wird (Abb. 6.**15**). Zu den stärksten Mutagenen gehören DNA-interkalierende Agenzien und Strahlung. Ultraviolette Strahlung (UV-Licht) kann die kovalente Vernetzung von zwei benachbarten Thyminbasen (**Thymindimere**, Abb. 6.**15**) verursachen, was häufig eine Konformationsänderung der DNA und eine fehlerhafte Replikation zur Folge hat. Durch die leichte Verabreichung und Dosierung wird UV-Strahlung mit am häufigsten zur Erzeugung von Mutationen (**Mutagenese**) in pro- und eukaryotischen Zellen eingesetzt. In der Praxis wird eine Strahlendosis verwendet, bei der etwa 80 bis 90 % der Organismen abgetötet werden, damit viele der Überlebenden auch eine Mutation tragen. Auch durch energiereichere Strahlung, wie Röntgen- und Gammastrahlung, wird eine mutagene Wirkung erzielt. Hier wird durch die Strahlung das Wasser ionisiert und Hydroxylradikale gebildet, die mit Makromolekülen wie der DNA reagieren und sie inaktivieren. Diese Strahlung ist jedoch

Tab. 6.**3 Entstehung von Mutationen.**

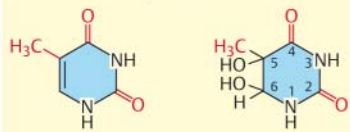
Mutagen	Struktur und Aktivität	Auswirkung
Nucleotidbasenanaloga		
5-Bromuracil		wird wie T eingebaut, Falschpaarung mit G Transition: A=>G
2-Aminopurin		wird wie A eingebaut, Falschpaarung mit C Transition: T=>C
Basen-modifizierende Agenzien		
Salpetrige Säure	HNO_2	desaminiert A, C Transitionen: AG, C=>T
Hydroxylamin	NH_2OH	hydroxyliert C Transition: G=>A
Ethylmethansulfonat (EMS)	$CH_3SO_3CH_2CH_3$	methyliert G Falschpaarung mit T Transition: G=>A
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) Mitomycin		alkyliert Basen
DNA-interkalierende Agenzien		
Ethidiumbromid		lagert sich in die DNA ein, Replikationsfehler, Insertion/Deletion von Nucleotiden, Leseraster-mutationen
Akridinorange		lagert sich in die DNA ein, Replikationsfehler, Insertion/Deletion von Nucleotiden, Leseraster-mutationen
Strahlung		
UV-Licht	UV-B (280–320 nm) UV-C (100–280 nm)	Pyrimidindimere (Photoprodukt), Fehler bei der Replikation
Ionisierende/Röntgen-Strahlung	Gammastrahlung Röntgenstrahlung	Hydroxylradikale, Fehler bei der Replikation von Einzel- und Doppelstrangbrüchen

hydrolytische Desaminierung



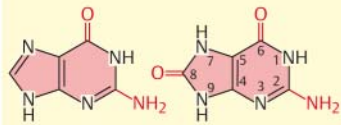
Cytosin Uracil

Oxidation von Thymin



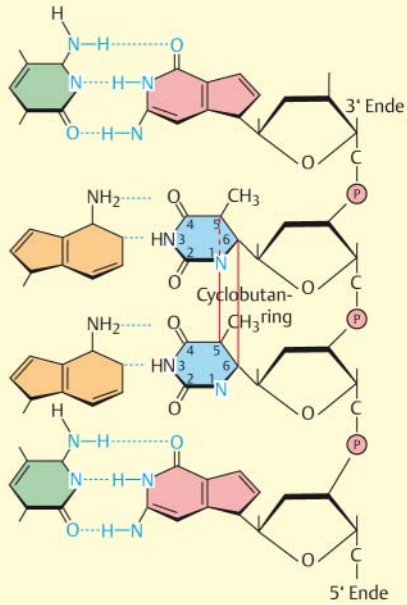
Thymin Thyminglycol

Oxidation von Guanin

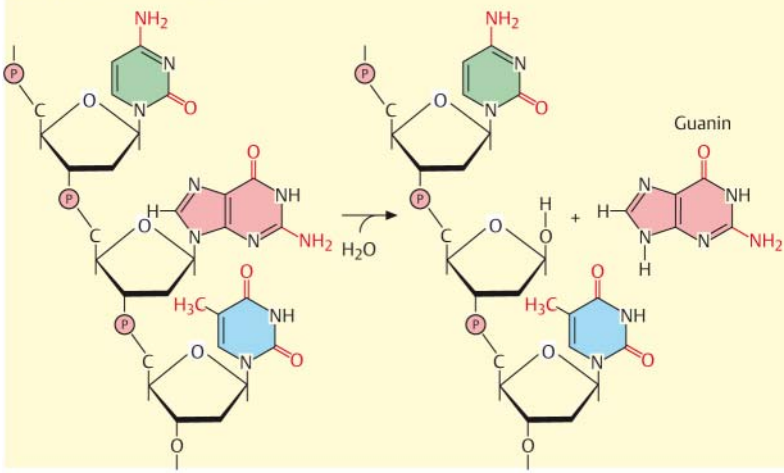


Guanin 8 - Oxoguanin

Thymin-Dimer



Abspaltung einer Puringruppe



◀ Abb. 6.**15** **Entstehung von Mutationen.** Die spontane Desaminierung von Cytosin zu Uracil führt zu einer Transition. Durch Oxidation von Thymin und Guanin entstehen Thyminglycol bzw. 8-Oxoguanin. Die absorbierte Energie des UV-Lichts kann zur Ausbildung eines Cyclobutanrings zwischen den Kohlenstoffatomen an Position 5 und 6 benachbarter Thymine führen. Durch einen spontanen Bruch der glykosidischen Bindung zwischen DNA und Purinen können apurinierte Stellen entstehen, die die Transkription und Replikation behindern.

viel gefährlicher und weniger leicht verfügbar, so dass sie für Mutagenesen eher weniger häufig eingesetzt wird.

Da mutagene Substanzen auf die DNA aller Organismen wirken, sind viele mutationsauslösende Wirkstoffe auch krebserregend (**carcinogen**) für Tiere und Menschen. Um die schädigende Wirkung verschiedener Substanzen abschätzen zu können, wird seit vielen Jahren ein von Bruce Ames entwickelter Test zur Bestimmung der Mutagenität von Chemikalien eingesetzt. Bei diesem **Ames-Test** wird die Auslösungsrate einer Rückmutation in der Gegenwart eines potentiellen Mutagens als Maß für die Mutagenität der Substanz herangezogen (Abb. 6.**16**).

▶ Beim **Ames-Test** wird ein *Salmonella typhimurium*-Stamm, der eine Punktmutation im Histidinoperon (His^-) trägt, in An- und Abwesenheit der Testsubstanz ohne Histidin im Wachstumsmedium kultiviert. Nur Salmonellen, in denen eine Reversion der Mutation stattgefunden hat, bilden sichtbare Kolonien auf Testplatten ohne Histidin. Hat der zugesetzte Wirkstoff eine mutationsauslösende Wirkung, dann wird sich die Anzahl der Revertanten deutlich erhöhen. Die Anzahl der His^+-Kolonien kann daher als **Maß für die Mutagenität** des Stoffes verwendet werden. Da verschiedene Chemikalien jedoch ihre carcinogene Wirkung erst entfalten, wenn sie nach der Nahrungsaufnahme durch verschiedene Enzyme des Verdauungstraktes und der inneren Organe z. B. bei normalen Entgiftungsreaktionen modifiziert werden, wird beim Ames-Test ein Enzympräparat aus der Rattenleber zugesetzt, um solche Reaktionen zu induzieren. Es ist auch erforderlich diesen Test mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz durchzuführen, da die mutagene Aktivität der Verbindungen schwanken kann und in hohen Konzentrationen oft tödlich ist. ◀

Obwohl spontane Mutationen in der Regel zufällig und ungerichtet sind, gibt es bestimmte DNA-Stellen an denen bevorzugt Mutationen entstehen. Solche „**hot spots**“ beinhalten Sequenzen, an denen der Replikationsapparat mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einen Fehler macht als an anderen. So kommt es bei längeren identischen Nucleotidabfolgen (z. B. GGGGGG) oder **Sequenzwiederholungen** (wie GCGCGC), wenn die DNA-Stränge während der Replikation, Transkription oder Reparatur Lücken aufweisen, zu einem Verrutschen einzelner Nucleotide, wodurch extrahelikale Bereiche entstehen, die dann bei der nächsten Replikation durch Auffüllen der Lücken zu Deletionen bzw. Insertionen und somit häufig zu **Leserasterverschiebungen** führen. Bevorzugte Stellen für Mutationen sind auch Cytosine, die durch Methyltransferasen der Modifikationssys-

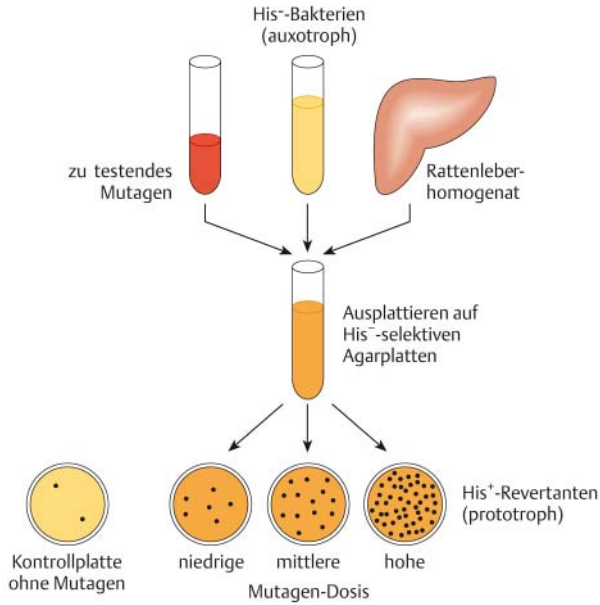


Abb. 6.**16** **Ames-Test.** Die potentiell mutagene Substanz wird mit einem His⁻-*Salmonella typhimurium*-Stamm und Rattenleberhomogenat gemischt und auf Histidin-freien Agarplatten ausplattiert. Ist eine Testsubstanz mutagen, so wird eine höhere Anzahl an His⁺-Revertanten als auf der Kontrollplatte (ohne mutagene Substanz) beobachtet.

teme zu 5-Methylcytosin umgebaut werden, um vor dem Angriff durch Restriktionsenzyme zu schützen (S. 254). Der Grund hierfür ist, dass eine Desaminierung von 5-Methylcytosin deutlich häufiger ist, als die von Cytosin, wodurch Thymin entsteht, das als normaler DNA-Baustein nicht durch Reparatursysteme erkannt und ersetzt wird.

Seit etwa 30 Jahren gibt es aber auch experimentelle Hinweise darauf, dass es nicht nur spontane, sondern auch **adaptive Mutationen** gibt, die gehäuft unter einem hohen Selektionsdruck, z. B. unter wachstumslimitierenden Umweltbedingungen auftreten. So findet man in einer hungernden Kultur von *lac*⁻-*E. coli*-Zellen mit einer Leserastermutation im *lac*-Operon in Lactosemedium überproportional häufig Lac⁺-Revertanten, die eine kompensatorische Leserastermutation oder Amplifikationen des sehr gering aktiven *lac*-Allels tragen. Die molekularen Mechanismen sind zurzeit noch unklar, aber es scheint so zu sein, dass die Mutationen aus einer unter Umweltstress deutlich gesteigerten Rate an genomischen Mutationen hervorgehen. Dieser **Mutator-Phänotyp** könnte eine spezielle Strategie sein, um sich schnell an ungünstige Umweltbedingungen zu adaptieren.

Isolierung und Charakterisierung von Mutanten

Die Identifikation von Mutanten ist einfach, wenn die genetische Veränderung dem Organismus einen Vorteil verleiht, woran diese Mutanten dann leicht zu identifizieren, sprich **selektionierbar** sind. Eine solche Mutation verleiht den Nachkommen gegenüber den Eltern unter bestimmten Umweltsituationen einen deutlichen Vorteil, so dass diese durch schnelles Wachstum andere verdrängen können. Um ein bakterielles Gen gezielt zu inaktivieren, tauscht man es häufig durch **Antibiotikaresistenzgene** aus. Die Mutanten können dann leicht selektiert werden, indem die Bakterien in Anwesenheit von Antibiotika angezogen werden, wodurch nur die Mutanten überleben. Diese Selektion wird genetisch häufig ausgenutzt, da so aus einer Population von Millionen von Bakterien die Isolierung einer einzelnen Mutante möglich wird.

In den meisten Fällen sind Mutationen aber nicht selektierbar, sondern müssen anhand der Veränderungen in ihrem Phänotyp erst heraussortiert werden, was man auch als „**Screening**“ bezeichnet. Als Beispiele seien hier Mutanten erwähnt, die nicht mehr motil sind, keine Kapseln mehr bilden oder ein Stoffwechselprodukt nicht mehr verarbeiten können. Für die Identifikation von Stoffwechselmutanten wendet man häufig die Technik der **Replikaplattierung** an. Als Beispiel sei hier die Isolierung von *E. coli*-Mutanten erwähnt, die nicht mehr Lactose als C-Quelle verstoffwechseln können, da sie die dazu nötigen Lactose-Transportsysteme oder abbauenden Enzyme nicht mehr produzieren. Eine solche Mutante wird Lactose **auxotroph** genannt, wogegen der ursprüngliche (Lac^+)-Stamm als **prototroph** bezeichnet wird. Um eine Lactose-auxotrophe *E. coli*-Mutante zu identifizieren, werden *E. coli*-Zellen auf einer Agarplatte mit Lactose als einziger C-Quelle im Nährmedium ausplattiert, dann mit einem sterilen Samttuch oder Filter von der Agarplatte einen Abdruck auf eine Nährmediumsplatte gemacht, der Lactose fehlt (Abb. 6.**17**). Kann eine Kolonie nur auf der Nährmediumsplatte mit Lactose, aber nicht auf der mit Minimalmedium ohne Lactose wachsen, dann handelt es sich um eine Lac^--Mutante. Eine weit verbreitete, einfachere Methode Lac^-- von Lac^+-Stämmen zu unterscheiden, basiert auf dem Indikatorfarbstoff X-Gal. Diese farblose Verbindung wird durch das Lactose abbauende Enzym β-Galactosidase (LacZ) gespalten, wodurch ein blaugefärbtes Produkt entsteht. Lac^+-Stämme bilden daher auf X-Gal-haltigen Platten blaugefärbte Kolonien, wohingegen Lac^--Stämme weiß sind. Bei der Selektion von Stoffwechsel-Mutanten wird in vielen Fällen noch eine Anreicherung von auxotrophen Mutantenstämmen vorangestellt. Hierzu werden die Bakterien in Anwesenheit von β-Lactamantibiotika, z. B. Penicillin, kultiviert, die die Zellwandsynthese wachsender Bakterien blockieren. Unter diesen Bedingungen werden nur die wachsenden Zellen abgetötet, wohingegen auxotrophe nicht wachsende Bakterien die Antibiotika-Behandlung überleben.

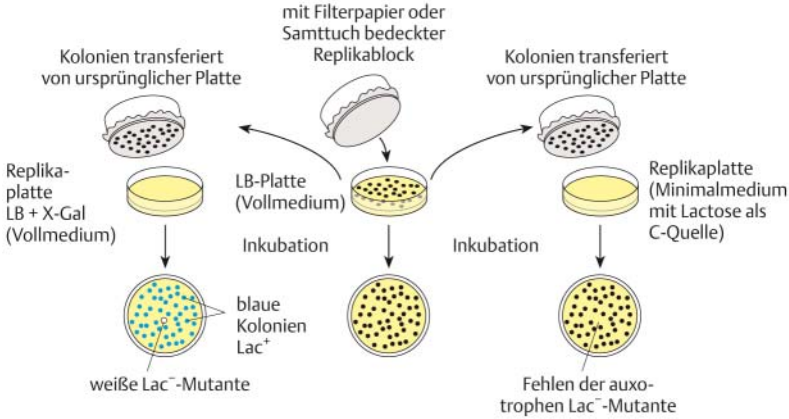


Abb. 6.**17** **Replikaplattieren zur Isolierung von *E. coli* Lac⁻-Mutanten.** Mit dem Replikablock werden Kolonien von einer Agarplatte mit Vollmedium in gleicher Anordnung auf eine Agarplatte mit Minimalmedium mit Lactose (rechts) transferiert. Die Kolonien, die nicht mehr auf dem Minimalmedium mit Lactose wachsen können, haben die Fähigkeit Lactose zu verstoffwechseln verloren. Lac⁻-Mutanten können auch durch Replikaplattierung auf Vollmedium mit X-Gal identifiziert werden. Der farblose Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) wird durch das Lactose-abbauende Enzym β-Galactosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl überführt woraus sich nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung der blaue Farbstoff 5,5′-Dibrom-4,4′-dichlor-indigo bildet.

Die Isolierung von Mutanten stellt ein größeres Problem dar, wenn Gene für eine Zelle zum Leben essentiell sind. Eine entsprechende Mutation, die die Produktion des entsprechenden Genproduktes verhindert, ist tödlich. Ein Ausweg ist die Erzeugung von sogenannten **konditional letalen Mutationen**, die nur unter ganz bestimmten Umständen zum Ausfall des codierten essentiellen Genproduktes führen. Ein Typ solcher Mutanten stellen die **temperatursensitiven** Mutanten dar. Meistens handelt es sich hierbei um den Austausch einzelner Nucleotide, die dazu führen, dass das Protein bei moderaten Temperaturen noch aktiv ist, weil die Wechselwirkungen noch ausreichen, um das Protein in der funktionellen dreidimensionalen Form zu halten. Bei höheren Temperaturen, kann das mutierte Protein jedoch nicht mehr stabil in der aktiven Form gehalten werden. Aufgrund dieser Tatsache können temperatursensitive Mutationen bei niedriger, der **permissiven** Temperatur isoliert und dann bei hoher, **restriktiver** Temperatur auf ihren Defekt hin untersucht werden.

6.2.2 DNA-Reparatur-Mechanismen

Obwohl Mutationen eine zentrale Grundlage der Evolution darstellen, ist es dennoch wichtig, unkontrollierte Veränderungen im Genom möglichst gering zu halten, damit eine stabile Weitergabe der Erbinformation über Generationen hinweg erfolgt. Zudem sind die meisten Mutationen nachteilig, wenn nicht sogar letal für den Organismus. Aus diesem Grund haben sich verschiedene **DNA-Reparatursysteme** entwickelt, die nach ihrer Funktionsweise und Art der behobenen Schäden in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden (Tab. 6.**4**).

Um Fehler der DNA-Polymerasen bei der Replikation schnell und effektiv zu reparieren, besitzen DNA-Polymerasen häufig eine Korrekturlesefunktion (**proofreading**), die fehlgepaarte Nucleotide durch eine 3′→5′-Exonucleaseakti-

Tab. 6.**4** **DNA-Reparatursysteme von *E. coli*.**

Reparaturenzym(e)	*Funktionstyp*
Reparatur von Fehlpaarungen	
DnaQ	ε-Untereinheit der DNA-Polymerase III
Dam MutH, MutL, MutS	DNA-Adenin-Methyltransferase „Mismatch"-Reparatur
MutY	Adenin-DNA-Glykosylase
Ung	Uracil-DNA-Glykosylase
Vsr	Endonuclease
Entfernung modifizierter Basen	
Ada	O6-Methylguanin-/O4-Methylthymin-DNA-Methyltransferasen
AlkA	3-Methyladenin-DNA-Glykosylase
AlkB	1-Methyladenin-/3-Methylcytosin-Demethylase
MutT	Nucleosidphosphatase
MutM	DNA-Glykosylase
Entfernen von Strahlungsschäden	
PhrB	DNA-Photolyase benötigt UV-Licht (320–400 nm) oder Blaulicht (400–500 nm) zur Aktivierung
Exzisionsreparatur: UvrA, UvrB, UvrC, UvrD, DNA-Polymerase I, DNA Ligase	komplexe Endonuclease
Postreplikationsreparatur: RecA	Enzyme für generelle Rekombination und Exzisionsreparatur
SOS-Antwort	
Pol II DinB UmuC, UmuD	DNA-Polymerase II DNA-Polymerase IV DNA-Polymerase V

vität gleich wieder entfernt. Zudem existiert ein Fehlpaarungs (**Mismatch**)-**Korrektursystem**, das aus Dam und dem MutHLS-Nuclease-Komplex besteht.

Dam (DNA-Adenosin-Methyltransferase) sowie Dcm (DNA-Cytosin-Methyltransferase) sind als Modifikationsenzyme Bestandteil eines **Schutzmechanismus**, um die eigene DNA vor dem Angriff von **Restriktionsenzymen** (S. 254) zu schützen. Dabei wird die zelleigene DNA durch die Übertragung einer Methylgruppe von Adenosyl-Methionin auf N4 und C5 von Cytosin (^{m4}C, ^{m5}C) bzw. N6 von Adenin in unterschiedlichen Erkennungssequenzen markiert.

Direkt nach der Replikation liegt die DNA aber **hemimethyliert** vor, d. h. nur der Eltern- und nicht der neusynthetisierte Tochterstrang ist methyliert. Das ermöglicht dem MutHLS-Reparaturkomplex den nichtmethylierten Strang bei Fehlpaarungen als den fehlerhaften zu identifizieren und zu reparieren. Dabei wird an beiden Seiten der fehlgepaarten Base geschnitten und die fehlerhafte Stelle entfernt, anschließend durch eine DNA-Polymerase die Lücke wieder aufgefüllt und durch die Ligase geschlossen. Weitere wichtige Reparatursysteme entfernen häufige C-T-Transitionen, die durch die Desaminierung von 5-Methylcytosin nach Dcm-Methylierung entstehen, oder sie eliminieren G-U-, A-G- oder A-C-Fehlpaarungen (Tab. 6.**4**).

Alkylierte Nucleotide werden in oder auch schon außerhalb der DNA durch verschiedene Glykosylasen entfernt, die entweder die Alkylgruppen abspalten oder die **modifizierte Base** ersetzen. Diverse Reparatursysteme existieren auch zur Beseitigung von **Strahlungsschäden** in der DNA. So werden die durch UV-Strahlung entstandenen Thymin-Dimere durch **DNA-Photolyasen** direkt gespalten. Die Spaltung ist lichtabhängig und erfolgt über einen komplexen radikalischen Mechanismus der zwei Coenzyme involviert, die für die Lichtabsorption und Erzeugung des Radikalzustandes notwendig sind. Bei der **Exzisionreparatur** werden Basenmodifizierungen, wie sie durch Strahlung, aber auch durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe erzeugt werden, erkannt, die defekten DNA-Strangabschnitte entfernt und neu synthetisiert. Der UvrABC-Endonuclease-Komplex spaltet den DNA-Strang vor und hinter der fehlerhaften Stelle und entfernt den Abschnitt auf einer Länge von etwa 10 bis 12 Basen. Die Lücke wird durch die DNA-Polymerase I wieder aufgefüllt und durch die DNA-Ligase kovalent geschlossen. UV- und andere weitreichende DNA-Schäden werden häufig auch durch **Postreplikationsreparatur** beseitigt. Darunter versteht man einen auf Rekombinationsprozessen basierenden Reparaturmechanismus. In diesem Fall werden die entstandenen Lücken in der DNA nach Replikationsstopps an geschädigten Stellen durch einen Austausch mit einem anderen intakten DNA-Strang vervollständigt. Der geschädigte Strang wird mit dem intakten Strang als Matrize durch den zuvor beschriebenen Exzisionsmechanismus repariert.

Das **SOS-System** wird aktiviert, wenn sehr große und weitreichende Schäden an der DNA erfolgt sind, die eine normale Replikation verhindern und eine einfache Reparatur meist unmöglich machen. Wie der Name schon verdeutlicht,

wird die SOS-Antwort demnach als Rettungssystem in der Not verstanden, bei dem DNA-Schäden die koordinierte Expression verschiedener zellulärer Funktionen induzieren, die zur DNA-Reparatur beitragen. Die Auslösung der SOS-Antwort wird normalerweise durch das LexA-Repressorprotein inhibiert. Als Konsequenz starker DNA-Schädigung entsteht einzelsträngige DNA, die durch das RecA-Protein gebunden wird. Diese Interaktion verursacht eine Konformationsänderung in RecA, wodurch das Protein nun mit LexA intergieren kann, wobei es als Co-Protease fungiert und die eigene Proteolyse von LexA stimuliert. Die Inaktivierung von LexA induziert die Transkription von den Exzisionsreparatur-Genen *uvrA* und *uvrB*, aber auch der DNA-Polymerase V-Gene *umuC* und *umuD*. Diese DNA-Polymerase hat eine sehr niedrige Sequenzspezifität und repariert die DNA ohne Matrizen-Vorlage, d. h. ohne Basenpaarung zum anderen DNA-Strang. Das ermöglicht eine kontinuierliche, schnelle DNA-Synthese über größere DNA-Schäden hinweg, jedoch führt dieser Vorgang zu vielen Fehlern (error-prone repair, Abb. 6.**18**). Diese Art Enzyme werden daher auch **DNA-Mutasen**

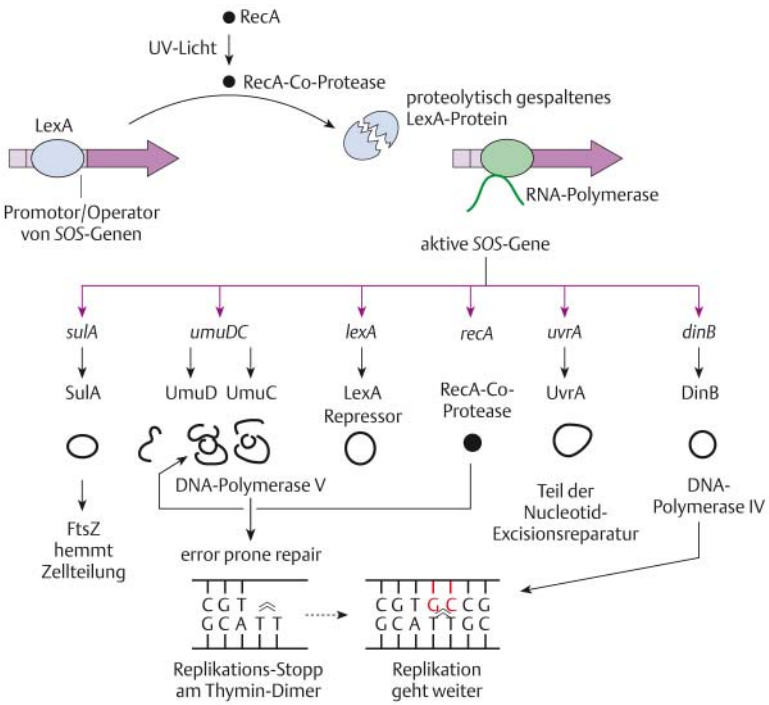


Abb. 6.**18** **Die SOS-Antwort in *E. coli*.** Dieses umfassende DNA-Reparatur-Notfallsystem wird nach massiven DNA-Schädigungen induziert. Es besteht aus mehreren verschiedenen Reparatursystemen die eng zusammenarbeiten, um die Bakterienzelle zu retten.

genannt. Ist der DNA-Schaden repariert, so wird die LexA-Proteolyse unterdrückt und die weitere Wirkung der alternativen Polymerasen wieder reprimiert.

Mutationsrate: Häufigkeit mit der Mutationen in der DNA pro Generation entstehen.
Mutagene: Substanzen, die die Mutationshäufigkeit erhöhen.
Depurinierung, Depyrimidierung: Spaltung der N-glycosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose.
Pyrimidindimer: Durch UV-Licht kovalent vernetzte, benachbarte Thyminbasen in der DNA.
Ames-Test: Test zur Bestimmung der Mutagenität einer bestimmten Substanz.
Screening: Testen von Bakterien auf einen bestimmten Phänotyp.
DNA-Reparatursysteme: Molekulare Mechanismen mit welchen Mutationen in der DNA wieder eliminiert werden.
SOS-System: Globales Notfallsystem, das mehrere DNA-Reparatursysteme einschließt, und bei massiven DNA-Schädigungen induziert wird.
DNA-Photolyasen: Enzyme, mit welchen Thymindimere gespalten werden.

6.3 Veränderungen der Erbsubstanz durch Rekombination

Die Rekombination ist von Bedeutung beim Einbringen fremder DNA in eine Zelle, wie es bei einer Transformation, Transduktion oder Konjugation auftritt. Man unterscheidet dabei Prinzipien, die sich in der Länge und Konservierung der zur Rekombination benötigten DNA-Sequenz unterscheiden. **Homologe Rekombination** braucht längere identische DNA-Abschnitte, während die nicht homologe, **ortsspezifische Rekombination** nur kurze Abschnitte homologer DNA-Sequenz benötigt und sich der Hilfe von Enzymen, wie Integrasen, bedient.

Unter **Rekombination** versteht man die Veränderung der in einer Zelle vorhandenen Erbsubstanz durch ihre Kombination mit neu in eine Zelle eingebrachter oder bereits vorhandener DNA.

Die **homologe Rekombination** kommt natürlicherweise bei allen Lebewesen vor. Dabei werden ähnliche oder identische Abschnitte auf der DNA ausgetauscht (Abb. 6.**19**). So können in einer Bakterienzelle bei schnellem Wachstum nach der Replikation mehrere Kopien des gleichen Chromosoms vorliegen. Bei diploiden Eukaroyten liegen diese sowieso vor. Austausch von DNA zwischen diesen Chromosomen sorgt so für eine Durchmischung des Erbgutes und ist gleichzeitig wichtig im Rahmen der DNA-Reparatur nach starker Beschädigung des Erbguts (Kap. 6.2). Durch Transformation, Transduktion oder Konjugation (Kap. 6.6) in die Zelle eingeschleuste DNA kann mit dem vorhandenen Erbgut rekombiniert

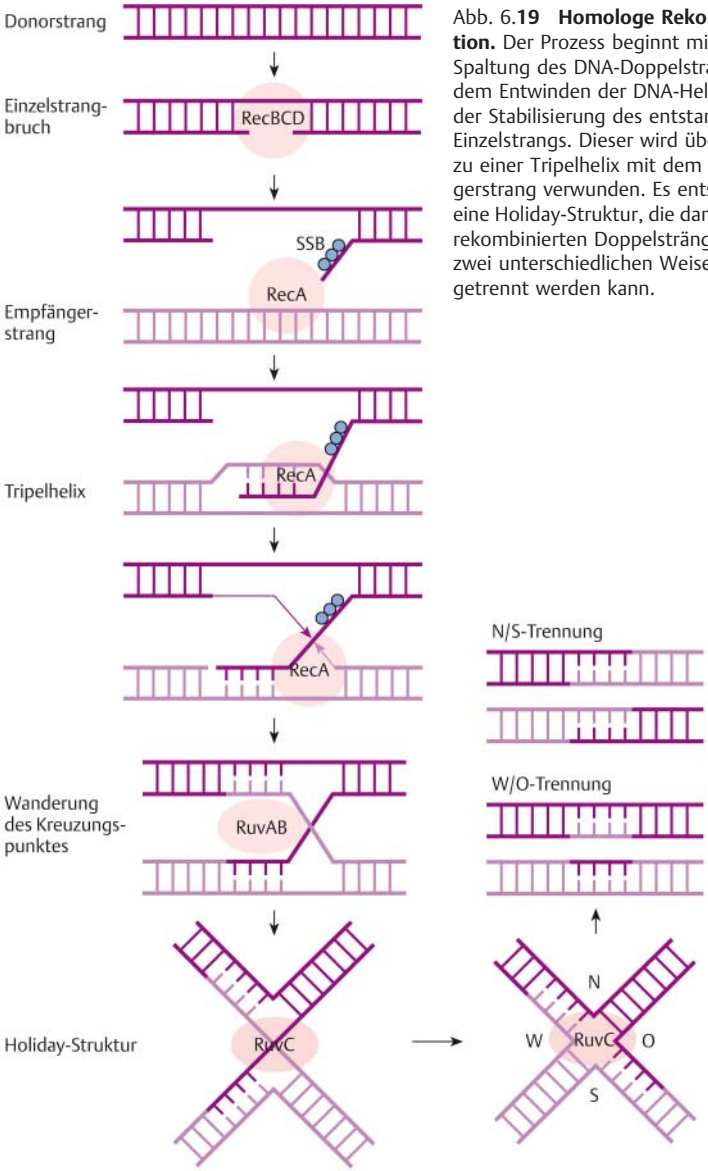


Abb. 6.**19 Homologe Rekombination.** Der Prozess beginnt mit der Spaltung des DNA-Doppelstrangs, dem Entwinden der DNA-Helix und der Stabilisierung des entstandenen Einzelstrangs. Dieser wird über RecA zu einer Tripelhelix mit dem Empfängerstrang verwunden. Es entsteht eine Holiday-Struktur, die dann zu neu rekombinierten Doppelsträngen in zwei unterschiedlichen Weisen getrennt werden kann.

werden. Die Rekombination ist damit auch die Basis des **horizontalen Gentransfers.**

Es gibt verschiedene Wege der homologen Rekombination mit unterschiedlichen beteiligten Proteinen. Rekombination in Bakterien findet hauptsächlich über den **RecBCD-Multienzymkomplex** statt (Abb. 6.**19**). Zuerst wird eine einzelsträngige DNA benötigt. Dazu spaltet die Endonuclease-Aktivität des RecBCD-Komplexes die doppelsträngige DNA, eine Helicase entwindet den DNA-Doppelstrang, eine Exonuclease-Aktivität baut einen Teil des gespaltenen Stranges ab und eine ATPase liefert die dazu nötige Energie. An auf bakterieller DNA gleichmäßig verteilten *chi*-Stellen kommt es dann zum eigentlichen Rekombinationsereignis. Der entstandene Einzelstrang des Donor-Doppelstranges wird durch Bindung von Einzelstrang-bindenden Proteinen (SSB) und RecA stabilisiert. RecA fördert auch die Tripelhelixbildung mit dem Empfänger-Strang. Der so entstandene Kreuzungspunkt kann mittels der RuvAB-Proteine bis zur Bildung der **Holiday-Struktur** wandern. Diese wird dann vom RuvC-Protein und einer DNA-Ligase durch Schneiden und Verknüpfen wieder aufgelöst. Je nach Schnittfolge entstehen unterschiedliche Produkte.

Die **nicht homologe Rekombination** wird mittels spezialisierter Enzyme, den Integrasen, vermittelt. Deshalb benötigt man dazu keine längeren Abschnitte homologer DNA. Die Rekombination wird dadurch integrativ und **ortsspezifisch**.

Prototyp für diesen Prozess ist die Integration des **Phagen Lambda** in das Genom von *E. coli*: Der Phage injiziert sein lineares Genom bei der Infektion in die *E. coli*-Wirtszelle. Dort wird es zuerst zyklisiert. Anschließend verbindet die phagencodierte Integrase zusammen mit dem *E. coli*-Integration Host Factor (IHF, S. 236) eine definierte, ungefähr 30 bp lange attachment site (*attB*) auf dem *E. coli*-Genom mit ihrem Gegenstück auf dem Phagen-Genom (*attP*). Die folgende Rekombination führt zur Integration des kompletten Phagen-Genoms in *attB* und folgend in der lysogenen Phase der Phagen zur Mitvermehrung mit dem *E. coli*-Chromosom. In der lytischen Phase wird die Phagen-DNA wieder ausgeschnitten, vermehrt, ihre Information zur Produktion des Phagen genutzt und am Ende die Wirtszelle lysiert.

Die ortsgerichtete Integration oder das Entfernen von DNA wird zur Regulation verschiedener Typen von Flagellen in Salmonellen (Phasenvariation), zur Organisation der Stickstofffixierungsgene in Heterocysten von Cyanobakterien und bei der Bildung von Sigmafaktoren während der Sporulation von *Bacillus subtilis* (S. 493) genutzt.

Homologe Rekombination: Austausch von DNA zwischen homologe DNA-Sequenzen tragende Bereiche von DNA. Der RecBCD-Enzymkomplex ist in vielen Bakterien daran beteiligt.
Nicht homologe Rekombination: Durch Integrasen vermittelte ortsspezische Integration von DNA in das Genom oder die Entfernung von DNA aus dem Erbgut.

6.4 Biologie der Plasmide

Man findet Plasmide sowohl in Prokaryoten, als auch in niederen Eukaryoten. Sie können linear oder zyklisch sein. Ihre Größe kann von einigen 1000 bis zu einigen 100 000 Basenpaaren vaiieren. Ihre Kopienzahl, ihre Verteilung auf die Tochterzellen und ihre **Kompatibilität** miteinander in einer Wirtszelle werden strikt reguliert. Plasmide sind die Grundlage moderner rekombinanter Proteinproduktion.

Plasmide sind natürlich vorkommende **extrachromosomale DNA-Elemente**, sie finden sich fast in allen Klassen der Bacteria, Archaea und eukaryotischen Mikroorganismen. Sie werden unabhängig vom Chromosom repliziert und auf die Tochterzellen verteilt.

Die **Namen** von Plasmiden beginnen normalerweise mit einem kleinem „p“, das für Plasmid steht. Dann kommen ein bis drei Buchstaben, die die Abkürzungen der Namen der Entdecker oder Konstrukteure darstellen oder Eigenschaften des Plasmids beschreiben. So steht pBR322 für Plasmid 322, das von Bolivar und Rodriguez beschrieben wurde.

Die **Größe** der Plasmide kann stark variieren. So ist pT181 aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* 4,4 kbp, pRN1 aus dem Archaeon *Sulfolobus islandicus* 5,4 kbp und das Plasmid 2 µm aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 6,3 kbp groß. Dagegen hat pWW0 aus *Pseudomonas putida* 117 kbp, pSOL1 aus *Clostridium acetobutylicum* 192 kbp und schließlich pSymB aus *Sinorhizobium meliloti* 1683 kbp.

Viele der bekannten Plasmide sind **zirkulär**. Es werden aber immer mehr **lineare** Plasmide gefunden. So wurden für den Borreliose Erreger *Borrelia burgdorferi* und für *Streptomyces coelicolor* lineare Plasmide verschiedener Größe beschrieben (Tab. 6.**5**). Einher mit diesen Befunden geht die Entdeckung von linearen Chromosomen in Prokaryoten (Tab. 6.**1**).

Plasmide bieten **Selektionsvorteile** für ihre Wirte in ihren Lebensräumen. Auf ihnen werden Gene für Antibiotika- und Schwermetallresistenzen, für Toxine, für Enzyme zur Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen oder für Schutzmechanismen, wie Restriktions/Modifikations-Systeme codiert. Da Plasmide oft von mehreren verschiedenen Mikroorganismen-Spezies repliziert werden (broad host range) und DNA-Aufnahme sowie horizontaler Gentransfer weit verbreitet sind, findet man plasmidcodierte Eigenschaften weit verbreitet bei Mikroorganismen.

6.4.1 Replikationsursprung, Kopienzahl und Kompatibilität

Plasmide werden parallel zum Chromosom vermehrt und kontrolliert auf die Tochterzellen im Zellzyklus verteilt. Mikroorganismen haben zur **Replikation** der Plasmid-DNA eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Strategien ent-

wickelt. **Replikon** nennt man dabei den Bereich des Plasmides, der die Information für den Replikationsprozess trägt. Zusätzlich wird auch die Replikationsmaschinerie des Wirtes genutzt. An die Replikation des Wirtes am engsten angelehnt, ist die Plasmidvermehrung mittels **Iterons** enthaltender Replikons. Das **Replikon** besteht dabei aus mehreren kurzen, direkt sich **wiederholenden DNA-Sequenzen**, den Iterons, einer Bindungsstelle für das DnaA-Protein des Wirtes und zusätzlich aus **AT-reichen** DNA-Sequenzen. Das vom Plasmid codierte Replikationsinitiationsprotein Rep bindet zur Replikationsinitiation an die Iteronsequenzen und rekrutiert dann DnaA zur Bindung. Zusammen bewirken sie das Schmelzen des DNA-Doppelstranges an der AT-reichen-Sequenz. Die eigentliche Replikation verläuft analog zu der des Wirtschromosoms. Über die Kinetik der Protein-DNA-Komplexbildung am Replikon wird die Kopienzahl des Plasmids gesteuert.

Das **ColE1-Replikon** aus *E. coli*, das die Basis vieler gebräuchlicher Klonierungs- und Expressionsvektoren bildet, wird völlig anders kontrolliert. **RNA-RNA-Wechselwirkungen** werden zur **Replikationsinitiation** und **Kopienzahlkontrolle** genutzt. Eine plasmidcodierte RNAII wird durch die RNA-Polymerase des Wirtes transkribiert, die dann an den Replikationsursprung bindet. Die für die Strangverlängerung nötige freie 3′OH-Gruppe wird durch RNaseH-Verdau erzeugt. Dann kann die RNAII als klassischer RNA-Primer der Replikation durch die DNA-Polymerase I des Wirtes dienen. Die Kopienzahl am ColE1-Replikationsursprung wird über eine zu RNAII komplementäre **Antisense-RNA** genannt RNAI reguliert. Dabei wird der Replikationsprozess durch eine Wechselwirkung von RNAI mit RNAII verhindert. Ein Gleichgewicht zwischen der DNA-RNAII- und der RNAI-RNAII-Wechselwirkung wird durch eine im Vergleich zu RNAII kürzere zelluläre Lebensdauer von RNAI eingestellt. Zwischen den Zellteilungen stabilisiert das ColE1-codierte Protein Rom (auch Rop) die RNAI-RNAII-Wechselwirkung und unterdrückt so die Replikation. Moderne ColE1-basierende Plasmide erreichen hohe Kopienzahlen, indem das Gen für Rom (Rop) aus dem Replikon entfernt oder zerstört wurde. Es sind somit modifizierte ColE1-Replikons (Tab. 6.**5**). Bisher beschriebene Strategien führten zur **bidirektionalen**

Tab. 6.**5** **Verschiedene *E. coli*-Plasmide.**

Plasmid	*Replikationsursprung*	*Anzahl pro Zelle*
R6K	Gamma-ori	15–30
pSC101	pSC101 ori, pMPP6 ori	5
pACYC	p15A	18–22
BAC	*oriC*	1
pBR322	Original ColE1	15–20
pUC	ColE1 modifiziert	500–700

Replikation der Plasmide ganz analog zum Chromosom (Abb. 6.**20a**). Man findet diese Plasmide oft in gramnegativen Bakterien.

Grampositive Bakterien und Archaea nutzen zur Replikation kleiner Plasmide unter 10 kbp das Prinzip des „**Rolling Circle**“ (Abb. 6.**20b**). Der *E. coli* Bakteriophage **M13** verwendet diese Strategie zur Genomverdopplung (S. 116). Der Replikationsprozess beginnt mit der Bindung eines Proteins an den Replikationsursprung. Dies führt zur Ausbildung einer kreuzförmigen, einzelsträngigen DNA-Region. Ungewöhnlicherweise wird dann an eine durch Einzelstrangbruch erzeugte 3′OH-Gruppe der Vorwärtsstranges durch die DNA-Polymerase III des Wirtes synthetisiert. Der Nicht-Matrizenstrang wird verdrängt und schließlich als zirkulärer Einzelstrang vollständig abgelöst. Dieses für die „Rolling Circle“-Replikation typische Zwischenprodukt enthält aber selbst einen Replikationsursprung, an dem nach RNA-Primer-Synthese eine Verlängerung erst durch DNA-Polymerase I und schließlich DNA-Polymerase III erfolgt. Durch diverse Variationen der aufgezeigten unterschiedlichen Replikationsverfahren kommt es zu unterschiedlichen Kopienzahlen (Tab. 6.**5**).

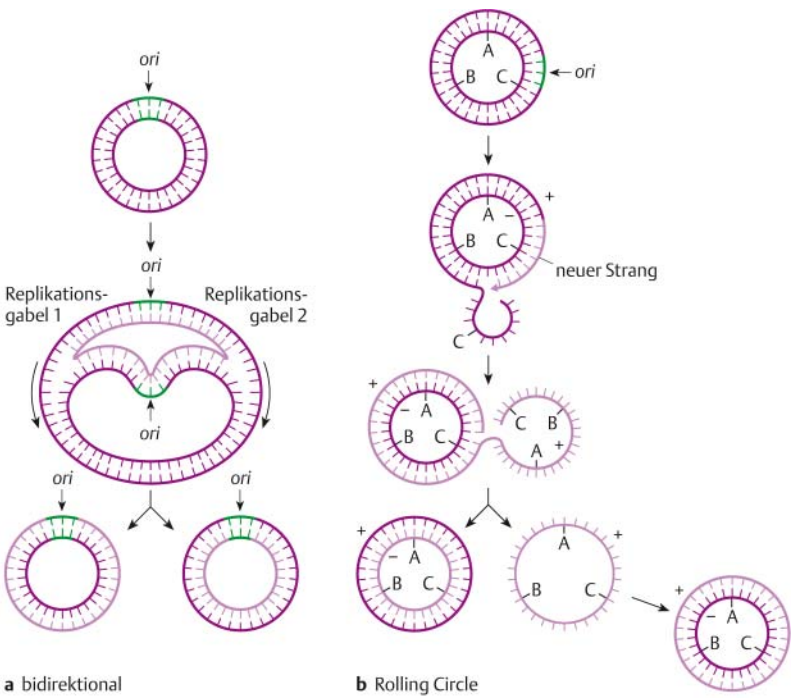


Abb. 6.**20** **Plasmidreplikation.**

Werden zwei unterschiedliche Plasmide parallel in einem Mikroorganismus repliziert, müssen diese miteinander **kompatibel** sein. Ausgestattet mit gleichem oder ähnlichem Replikationsursprung konkurrieren beide Plasmide um gemeinsame Komponenten des Replikations- und Verteilungssystems. Dies führt zum Verlust von Plasmiden. Kleinere Plasmide haben oft durch ihre Größe einen Vorteil im Replikationsprozess und verdrängen über den Kultivierungsprozess hinweg größere Plasmide mit gleichem Replikationsursprung. Daher teilt man Plasmide, die gemeinsam stabil in einer Wirtszelle vermehrt werden können, in unterschiedliche Kompatibilitätsgruppen ein. Die Plasmide einer Kompatibilitätsgruppe sind nicht miteinander kompatibel, während Plasmide unterschiedlicher Kompatibilitätsgruppe miteinander in einer Wirtszelle vermehrt werden. So können verschiedene ColE1-basierende Plasmide nicht miteinander auf Dauer in einer Zelle coexistieren. ColE1-Replikons sind dagegen kompatibel mit p15A- und R6K-basierenden Plasmiden.

Plasmide werden während der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, dieser Prozess wird als **Segregation** bezeichnet. Bei Plasmiden mit hoher Kopienzahl könnte die Bakterienzelle einfach durch statistische Verteilung und Diffusion eine ungefähre Gleichverteilung erreichen. Neueste Erkenntnisse zur strengen Kompartimentierung und Organisation der Bakterienzelle stehen einer diffusionsabhängigen Verteilung entgegen. Somit bleibt die mechanistische Grundlage der Verteilung von Plasmiden hoher Kopienzahl noch unklar. Plasmide geringer Kopienzahl dagegen bedienen sich aktiver Verteilungssysteme. Diese garantieren, dass jede Tocherzelle während der Zellteilung eine Kopie des Plasmides erhält. Für die Verteilung des *E. coli*-P1-Plasmids bilden die plasmidcodierten Proteine ParA und ParB mit einem Protein des Wirtes, dem Integration Host Factor (IHF, nicht homologe Rekombination, s. o.), einen Komplex an der Plasmid-DNA. Durch Wechselwirkung mit dem bakteriellen Cytoskelett steuert dieser Komplex Lokalisation und zeitlichen Ablauf des Verteilungsprozesses.

Für den momentan hauptsächlich zur **rekombinanten Proteinproduktion** benutzten Produktionswirt *E. coli* gibt es eine Vielzahl kommerziell erhältlicher, gentechnisch hergestellter Plasmide (Abb. 6.**21**). Ein ***E. coli*-Plasmid** besitzt üblicherweise einen Replikationsursprung für autonome Vermehrung und Kopienzahlregulation. Ein Antibiotikaresistenz vermittelndes Gen erlaubt die Selektion der Plasmid tragenden *E. coli*, indem es das Wachstum in Anwesenheit eines Antibiotikums erlaubt, das wiederum die Vermehrung von Bakterien ohne Plasmid verhindert. Ein regulierbarer Promotor sorgt für eine Transkription des Zielgens zum gewünschten Zeitpunkt. Eine DNA-Sequenz für eine optimierte Ribosomenbindestelle stellt die effiziente Translation der abgelesenen mRNA sicher. Eine vielfache Klonierungsstelle (**multiple cloning site**, **MCS**) mit Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, die nur einmal in dem Plasmid vorkommen, vereinfacht den gentechnischen Einbau des Zielgens.

Eine Alternative zum *E. coli*-System bietet das grampositive Bakterium *B. megaterium* oder diverse Hefen. Man nutzt dafür oft **Shuttle-Vektoren**, die in mindestens zwei verschiedenen Wirten repliziert werden und dafür alle nötigen Elemente tra-

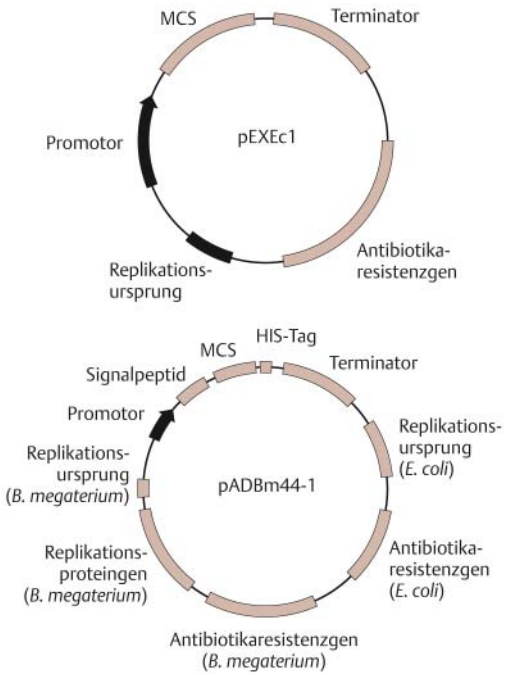


Abb. 6.**21** **Plasmid.** Aufbau eines typischen Plasmids (pEXEc1) zur Expression von Zielgenen in *E. coli*. Der *B. megaterium-E. coli* Shuttle-Vektor (pADBm44–1) eignet sich zur rekombinanten Produktion und zum Export von Zielproteinen als His-Tag-Fusionsproteine in *B. megaterium*. Das Plasmid enthält das Gen für den Xyloserepressor (*XylR*) aus *B. megaterium*, das Tetracyclinresistenzgen (*Tet*), das eine Selektion in *B. megaterium* ermöglicht und ein Ampicillinresistenzgen (*Amp*) für die Selektion in *E. coli*, weiterhin einen Replikationsursprung (*oriU*) und ein zugehöriges Gen (*repU*), für eine Replikation in *B. megaterium* sowie einen Replikationsursprung für *E. coli* (ColE1). DNA für einen Promotor, ein Exportsignal, eine multiple Klonierungsstelle (MCS) und einen Terminator sind ebenfalls auf dem Vektor zu finden.

gen. Bei der Konstruktion solcher Vektoren bleibt die Verwendung von *E. coli* als Klonierungswirt nicht erspart. Deshalb tragen sie jeweils einen Replikationsursprung und ein Antibiotikaresistenz vermittelndes Gen für *E. coli* und den eigentlichen Produktionswirt (Abb. 6.**21**). Die Transkription der Zielgene in *B. megaterium* erfolgt über den Repressor kontrollierten Promotor des *xyl*-Operons zur Xyloseverwertung, der durch Xylosegabe eine 200fache Induktion erfährt. Der Export des Zielproteins aus der Zelle ins Wachstumsmedium wird hier zusätzlich über eine plasmidcodierte Leitsequenz eines stark ausgeschleusten *B. megaterium*-Exoenzyms vermittelt (Abb. 6.**21**). Die einfache Isolation des Zielproteins wird schließlich durch ein gentechnisch fusioniertes **Affinitäts-Tag** stark vereinfacht, das die Grundlage für eine affinitätschromatographische Ein-Schritt-Reinigung bildet und später proteolytisch wieder entfernt werden kann (📖 *Biochemie, Zellbiologie*). ◀

Plasmide: Doppelsträngige ringförmige oder lineare extrachromosomale genetische Elemente, die unabhängig repliziert werden und für zusätzliche Eigenschaften codieren, kommen bei Bacteria, Archaea und eukaryotischen Mikroorganismen vor.

Replikon: Für die Replikation verantwortlicher Teil eines Plasmids, der Iterons, und DnaA bindende Bereiche enthalten kann.
Kompatibilität: Vom Replikationsursprung determinierte Eigenschaft gemeinsam mit anderen Plasmiden in einer Zelle vermehrt werden zu können.
Segregation: Kontrollierte Verteilung von Plasmiden auf Tochterzellen.
Kopienzahl: Über den Replikationsursprung vermittelte Anzahl eines Plasmids pro Zelle.

6.5 Transponierbare Elemente

Insertionselemente, **Transposons** und **Bakteriophagen** sind mobile genetische Elemente. Sie werden durch Transposition in das Erbgut integriert bzw. wieder herausgeschnitten.

Mobile genetische Elemente kommen in Bacteria, Archaea und Eukarya vor. Es sind DNA-Abschnitte, die durch besondere Formen der Rekombination von einem Ort eines Chromosoms oder Plasmids zu einem anderen wandern können. Durch ihr Ausschneiden und Integrieren in das Erbgut, genannt **Transposition**, kann es zu Insertionen, Deletionen und Inversionen kommen, die die Erbinformation verändern. Mobile genetische Elemente haben keinen eigenen Replikationsursprung und werden im Wirtsgenom integriert mitrepliziert. Daher tragen mobile genetische Elemente deutlich zur **Evolution** des Erbgutes bei.

Insertionselemente (**IS-Elemente**) sind mit meistens unter 2000 bp die **kleinsten** mobilen DNA-Elemente. Sie bestehen nur aus den **inverted Repeats** (**IR**) an beiden Enden des linearen DNA-Moleküls, die eine gegenläufige Wiederholung sehr ähnlicher, aber nicht unbedingt identischer DNA-Sequenzen von 10 bis 50 bp darstellen. Der zentrale Bereich codiert das für die Mobilität des IS-Elements verantwortliche Enzym Transposase (Abb. 6.**22**).

Es gibt eine Vielzahl verschiedener **Transposons** in allen Reichen der Lebewesen. Hier soll das Interessse auf zwei Typen von Bakterien spezifischen Transposons fokussiert werden. **Klasse I-Transposons** sind zusammengesetzt aus **zwei IS-Elementen** an den beiden Flanken der linearen DNA. Dazwischen ist meist ein Gen, das für eine **Antibiotikaresistenz** codiert und einem Bakterium einen Selektionsvorteil gegen dieses Antibiotikum vermittelt (Abb. 6.**22**). Dieser Transposontyp wird durch die Transposase aus dem Genom geschnitten. Auch das Erkennen des Insertionsortes und das dortige Einbauen erfolgt über die Transposase (cut and paste). Alle DNA-Schnitte und Ligationen werden durch sie katalysiert (Abb. 6.**22**). **Klasse II-Transposons** tragen zwischen **zwei inverted Repeats** Gene für eine **Transposase**, eine **Resolvase** und eine **Antibiotikaresistenz** (Abb. 6.**22**). Diese Transposons hinterlassen oft eine Kopie des Transposons am Ort des Ausschneidens, man nennt deshalb auch den Prozess der Verbreitung

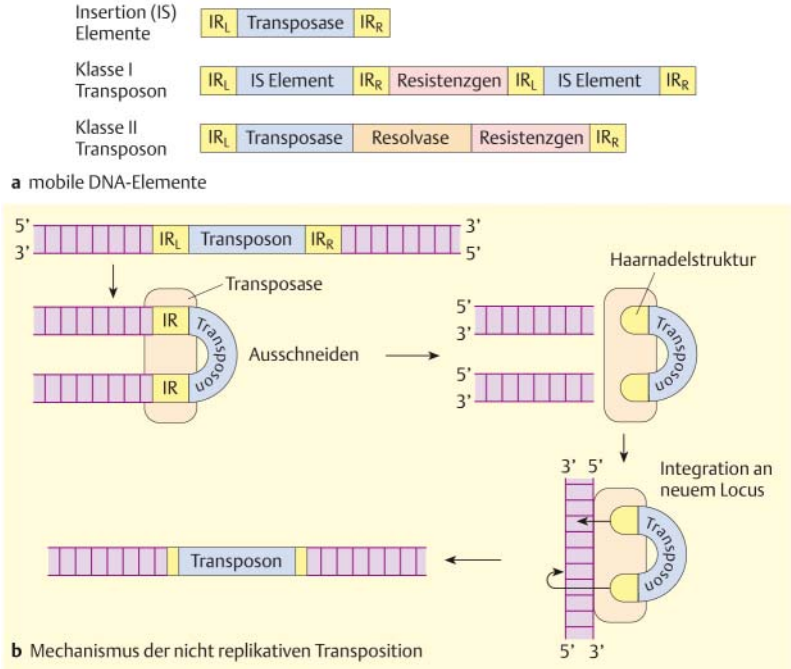


Abb. 6.**22** **Transponierbare Elemente. a** Struktur verschiedener mobiler DNA-Elemente. **b** Die Mobilisierung und die anschließende chromosomale Integration eines Transposons benötigen die Aktivität der auf dem Transposon codierten Transposase.

replikative Transposition. Für diesen Prozess wird zusätzlich die Resolvase benötigt. Eine Reihe von Transposons können über Konjugation auch auf andere Bakterien übertragen werden.

Bakteriophagen, wie der **Phage Mu** (für Mutator), können wie ein Riesentransposon während ihrer lysogenen Phase durch ein Bakterienchromosom hüpfen.

Transposition: Ausschneiden und Integrieren von mobilen DNA-Elementen in einem Organismus.
Insertions (IS)-Element: Ein ca. 2000 bp kleines mobiles DNA-Element, das von zwei inverted Repeats flankiert ist und für eine Transposase codiert.
Transposon: Größeres mobiles DNA-Element, das neben inverted Repeats und Transposase auch für Resolvasen und Antibiotikaresistenz vermittelnde Enzyme codieren kann.

6.6 Gentransfer

Die Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Organismen (**horizontaler Gentransfer**) bewirkt eine hohe Dynamik mikrobieller Genome und ermöglicht die schnelle Adaptation an variierende Umweltbedingungen durch den Erwerb neuer physiologischer und pathogener Eigenschaften. Die DNA kann durch die direkte Aufnahme freier DNA (**Transformation**), durch Transfer mittels Viren (**Transduktion**) und durch den direkten Kontakt zwischen zwei Zellen (**Konjugation**) übertragen werden.

Wenn Gene von einem Organismus zu den Nachkommen weitergeben werden, so spricht man von **vertikalem Gentransfer**. Mikroorganismen können ihre Gene jedoch auch lateral, d. h. an andere nah oder weniger verwandte Mikroorganismen der gleichen Generation übertragen. Dieser als **horizontaler Gentransfer** bezeichnete Vorgang kann über unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Bei all diesen Vorgängen ist immer ein Spender (**Donor**) beteiligt, der einen Teil seiner DNA an einen Akzeptor (**Rezipient**) weitergibt, wo sie in der Regel in dessen genomische DNA integriert wird. Die Rezipientenzelle, die die aufgenommene fremde DNA in die eigene DNA mittels Rekombination integriert, wird als **Rekombinante** bezeichnet. Dieser Gentransfer bewirkt eine hohe Dynamik mikrobieller Genome und spielt eine große Bedeutung für die Adaptation von Mikroorganismen an unterschiedliche Umweltbedingungen, da sie den Erwerb neuer physiologischer und pathogener Eigenschaften ermöglicht. Es gibt drei unterschiedliche Mechanismen mit welchen Mikroorganismen genetische Information austauschen können:

- die Aufnahme freier DNA aus der Umgebung (**Transformation**),
- der DNA-Transfer mittels Viren (**Transduktion**) und
- die direkte Übertragung von DNA von einer Donor- zu einer Akzeptorzelle durch engen Zellkontakt (**Konjugation**).

Diese Art des Gentransfers unterscheidet sich deutlich von der sexuellen Vermehrung, da kein direkter Zusammenhang zur Reproduktion besteht und die genetische Beteiligung beider Eltern sehr unterschiedlich sein kann. Die rekombinanten Nachkommen ähneln in den meisten Eigenschaften dem Rezipienten.

6.6.1 Transformation

Die Entdeckung der **Transformation**, also die Beobachtung, dass Bakterien freie „nackte“ DNA aufnehmen und in ihr Genom integrieren, bildete eine wesentliche Grundlage für die ersten molekularbiologischen Arbeiten.

Das erste Experiment dieser Art wurde 1928 von **F. Griffith** in England durchgeführt (Abb. 6.**23**). Er zeigte, dass unbekapselte *Streptococcus pneumoniae*-Stämme (R-Stämme), die wachsen, aber keine Lungenentzündung auslösen, wieder kapselbildend und krankheitsauslösend werden können, wenn man sie zuvor zusammen mit abgetöteten, bekap-

selten virulenten Bakterien (S-Stämme) inkubiert. Er schloss aus diesem Experiment, dass vererbbares Material von den toten auf die lebenden Bakterien übertragen wurde, wodurch diese sich so genetisch veränderten, dass ihre Nachkommen wieder mit einer Kapsel ausgestattet und virulent wurden. Sechzehn Jahre später haben dann Oswald T. Avery und seine Kollegen Colin M. MacLeod and Maclyn McCarthy herausgefunden, dass das übertragene „transformierende Agens" die DNA der Streptococcen ist. Diese Experimente erbrachten die ersten Beweise, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist.

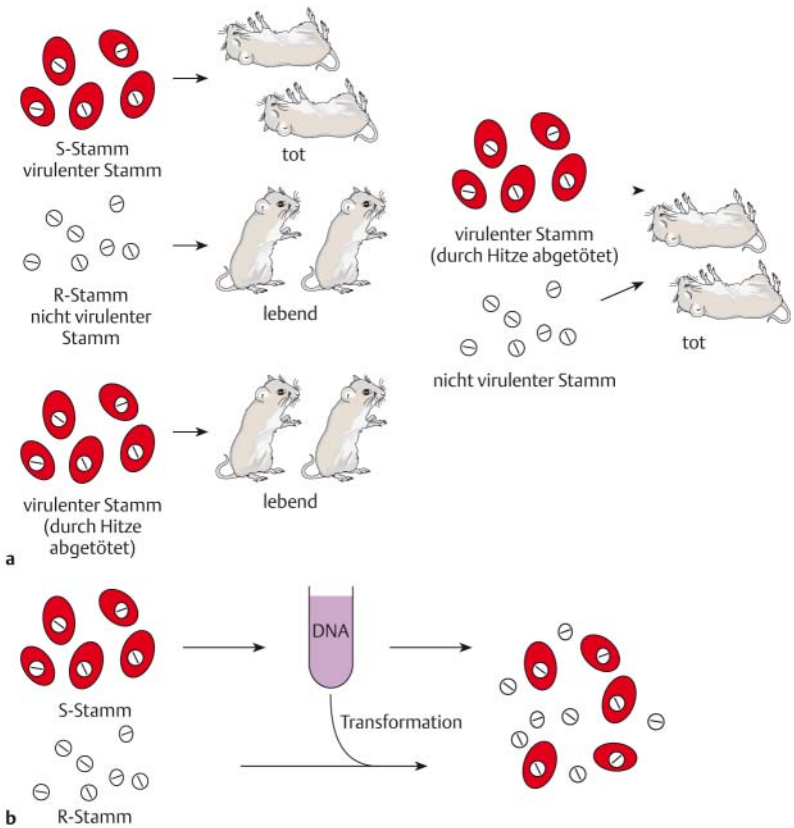


Abb. 6.**23** **Nachweis von DNA als Träger der Erbinformation durch Transformation von Streptococcen. a** Werden Mäuse mit einem kapselbildenden *Streptococcus pyogenes*-Stamm (S-Stamm) infiziert, so sterben sie. Eine Infektion mit einem kapsellosen Stamm (R-Stamm) überleben sie. Werden Mäuse mit einem durch Hitze abgetöteten Stamm und dem R-Stamm infiziert, sterben sie ebenfalls, obwohl beide Stämme alleine nicht virulent sind. **b** Durch Transformation von DNA aus einem *S. pyogenes* S-Stamm kann die Erbinformation für die Kapselbildung und Virulenz auf den nicht virulenten R-Stamm übertragen werden.

Von vielen Mikroorganismen wird DNA nach ihrem Tod durch Zelllyse in die Umgebung freigesetzt. Diese DNA kann dann wieder durch andere Bakterien in Abhängigkeit von deren Wachstumsbedingungen aufgenommen und in ihr Genom durch Rekombination (S. 230) integriert werden. Bakterielle Chromosomen brechen bei der Lyse von Bakterien leicht und liegen in Teilstücken von einigen kbp vor, die dann mehrere Gene enthalten. Eine Bakterienzelle nimmt normalerweise aber nur ein oder wenige DNA-Fragmente auf, so dass nur ein sehr kleiner Teil des bakteriellen Genoms auf die Rezipientenzelle übertragen wird.

Natürlich stattfindende Transformationsprozesse wurden bisher nur bei einigen Bakteriengattungen, wie *Bacillus, Haemophilus, Neisseria, Acinetobacter*, *Azotobacter,* verschiedene Spezies der Streptococcen und Staphylococcen, sowie einigen Archaea, wie *Thermus*-Arten gefunden. Es ist aber wahrscheinlich, dass diese Prozesse zu einem gewissen Grad auch in anderen Bakterien stattfinden. Die Details des Transformationsvorgangs variieren zwischen den verschiedenen Prokaryoten, aber einige Gemeinsamkeiten sind zu erkennen. Die Bereitschaft DNA aufzunehmen wird als **Kompetenz** bezeichnet. Diese Fähigkeit ist genetisch determiniert, sie entwickelt sich aber nur unter speziellen physiologischen Bedingungen. Bei Grampositiven, wie dem Bakterium *B. subtilis,* entwickelt sich die Kompetenz am Ende der logarithmischen Wachstumsphase, wenn die Nährstoffe limitiert sind und die Zelldichte angestiegen ist. Der Grund hierfür ist, dass die Bakterien kurze Peptide, sogenannte **Kompetenzfaktoren** produzieren und ins Medium sezernieren, die bei Überschreitung einer bestimmten Konzentration über ein Zweikomponentensystem (S. 447) die Expression von Genen stimulieren, die für die Ausprägung der Kompetenz verantwortlich sind. Solche zelldichte-abhängigen regulatorischen Systeme werden als **Quorum-Sensing** bezeichnet (S. 267). Bei *B. subtilis* werden rund 10 bis 20 % der Zellen kompetent, bei Streptococcen und *Haemophilus influenzae* liegt der Anteil weitaus höher und kann bis zu 100 % betragen. In der Regel liegt jedoch die erzielte Transformationshäufigkeit unter 1,0 %. Im Gegensatz zu *B. subtilis* und *Acinetobacter byalyi,* die jede Fremd-DNA akzeptieren, nehmen *Neisseria gonorrhoeae* und *H. influenzae* nur homologe DNA-Sequenzen auf, die sie an bestimmten häufig im Genom vorkommenden Nucleotidabfolgen von 11 bp bzw. 29 bp erkennen.

In **grampositiven Bakterien** bindet die DNA Kompetenzproteine (Com), die in der Zellhülle verankert sind (Abb. 6.**24**). Diese Proteine zeigen Ähnlichkeit zu Polypeptiden, die für den Zusammenbau und die Kontraktion von Typ IV-Pili verantwortlich sind. Die doppelsträngige DNA (dsDNA) wird dabei durch einen Pseudopilus aus dem Hauptpilin ComGB und den Nebenpiliproteinen ComGD, ComGE und ComGG mithilfe der NTPase ComGA remodelliert und die DNA dem membrangebundenen DNA-Akzeptor ComEA zugeführt. Ein Strang der DNA wird nun degradiert und der andere einzelne DNA-Strang (ssDNA) durch den Transporter ComEC mit Hilfe des ATP-bindenden Proteins ComFA in das Cytosol transportiert, wo er durch die Bindung von Einzelstrang-bindenden Proteinen (SSB) vor dem Angriff von Nucleasen geschützt wird.

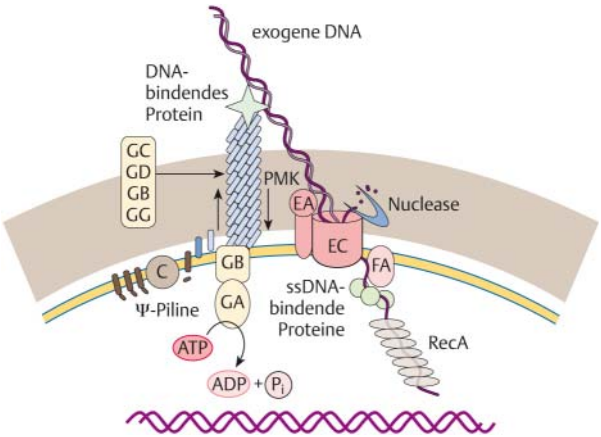


Abb. 6.**24** **Transformationsmechanismus in grampositiven Bakterien.** Die Übertragung von DNA erfolgt durch einen Pseudopilus unter der Beteiligung verschiedener Com-Proteine, die die DNA binden, einen Strang degradieren und den anderen DNA-Einzelstrang durch einen speziellen Transporter in das Cytoplasma der Zelle transportieren (nach Slonczewski/Foster, W. W. Norton Co. 2008).

In **gramnegativen Bakterien**, z. B. *Neisseria gonorrhoeae,* wird die DNA durch einen Kanal, der aus Multimeren des Secretins PilQ besteht, mit Hilfe von Hilfsproteinen durch die äußere Membran transportiert. Ähnlich wie bei grampositiven Bakterien sorgt dann ein Hauptpilus aus PilE, mit dem Nebenpiliprotein ComP mithilfe der NTPase PilT für den DNA-Transport ins Periplasma, wo ein DNA-Strang dann mittels ComE durch den Transporter ComA ins Cytoplasma transportiert wird und der zweite Strang abgebaut wird. Im Gegensatz hierzu verwenden die gramnegativen Bakterien *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* ein DNA-Transformationssystem das Ähnlichkeiten zum Typ IV-Sekretionssystem aufweist und zum DNA-Transport bei der Konjugation verwendet wird (S. 247).

Die Integration in das Genom der Rezipientenzelle erfolgt durch RecA-abhängige Rekombination nach Paarung der transferierten ssDNA mit homologen DNA-Bereichen (S. 232). Zwischen homologen Abschnitten können sich aber auch Bereiche sehr unterschiedlicher DNA-Sequenzen mit für den Organismus neuer genetischer Information befinden, die dann ins Genom mit integriert werden (**Transformanten**). Bei der Replikation des entstandenen **Heteroduplex**-Stranges entsteht wieder eine der Eltern-DNA entsprechende Genomkopie und ein rekombinantes DNA-Molekül mit der neu integrierten DNA, die nach der Segregation bei der Zellteilung in separaten transformierten Zellen vorliegen.

Schließlich können Bakterien freie DNA von Bakteriophagen aufnehmen, was als **Transfektion** bezeichnet wird. Entstammt die DNA aus einem lytischen Pha-

gen, dann kann die DNA-Aufnahme zur Produktion von Viruspartikel führen, was anhand des Phagenplaque-Assays sichtbar gemacht werden kann. Dieser Vorgang ist nicht mit dem Prozess der DNA-Aufnahme durch eukaryotische Zellen zu verwechseln, der ebenfalls als Transfektion bezeichnet wird.

Herstellung kompetenter Zellen: *E. coli* und viele andere Prokaryoten, die in vielen Laboratorien untersucht und zur Überexpression von Fremdproteinen herangezogen werden, haben natürlicherweise nicht die Fähigkeit freie DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, sie sind nicht **natürlich kompetent**. Durch geeignete Behandlungsmethoden kann jedoch eine Kompetenz **künstlich** induziert werden. Eine Möglichkeit ist, dass man *E. coli* Zellen abkühlt, mit hohen **Ca^{2+}-Konzentrationen** behandelt und dann einen kurzen Temperaturschock auf 37 bis 42 °C unterzieht. Durch diese Behandlung werden sie dann kompetent und nehmen doppelsträngige DNA auf. Auch die Zugabe anderer Ionen, wie **LiCl** kann eine ähnliche Wirkung erzielen. Die effizienteste Methode ist jedoch die **Elektroporation**. Hier werden Bakterien oder Hefen für eine sehr kurze Zeit einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch sich die Lipidanordnung in den Membranen verändert und die Zellhülle für doppelsträngige DNA durchlässig wird. ◀

6.6.2 Transduktion

Bei der **Transduktion** wird DNA durch Bakterien-Viren (**Bakteriophagen**) übertragen. Die wurde bereits 1951 durch J. Lederberg und N. D. Zinder bei *Salmonella enterica* entdeckt. Dieser Gentransfer erfolgt nach zwei unterschiedlichen Mechanismen:

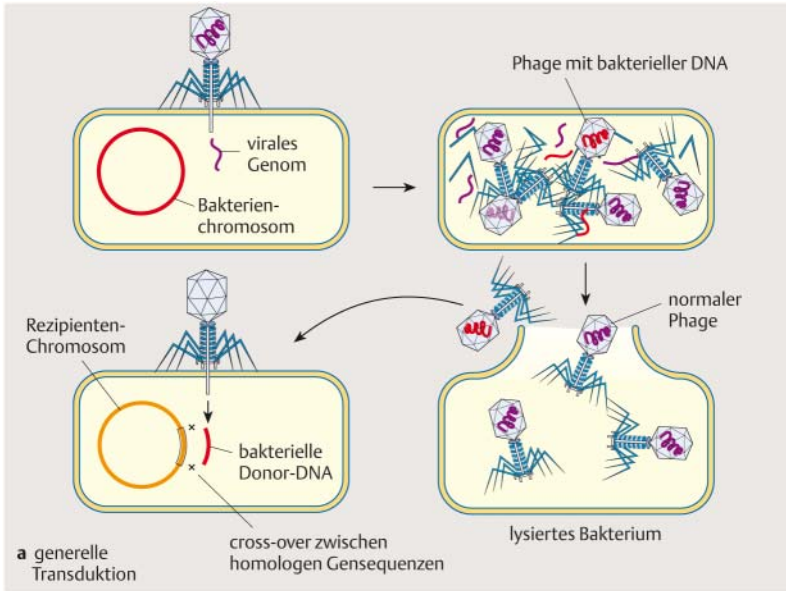
- Generelle (**allgemeine**) **Transduktion**, wobei jeder beliebige Abschnitt eines Bakteriengenoms anstelle der Virus-DNA durch Virenpartikel übertragen werden kann, oder
- spezielle (**ortsspezifische**) **Transduktion**, die ausschließlich durch temperente Phagen durchgeführt wird, wobei nur spezielle DNA-Abschnitte des Bakteriengenoms Teile des Virusgenom ersetzen und bei einer Neuinfektion in die Rezipientenzelle übertragen werden.

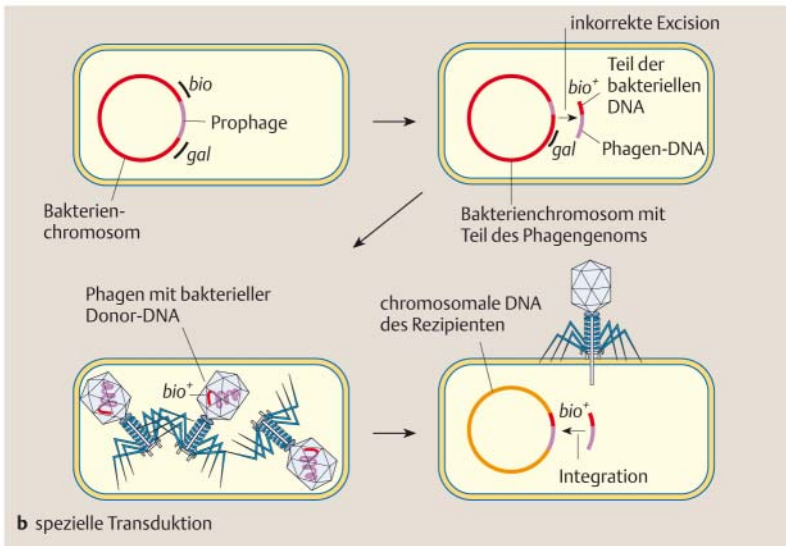
In beiden Fällen sind es aber Fehler bei der Verpackung der viralen DNA in die Viruspartikel, die zu transduzierenden Phagenpartikeln führen. Nicht alle Bakteriophagen übertragen DNA durch Transduktion und auch nicht alle Bakterien lassen sich transduzieren. Jedoch ist dieser Vorgang in der Natur unter grampositiven (*Staphylococcus*), gramnegativen Bakterien (*Escherichia, Pseudomonas, Salmonella*) und Archaea (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*) weit verbreitet.

Zu den **allgemein transduzierenden** Bakteriophagen zählen P1 bei *E. coli* (Abb. 6.**25**) und P22 bei *Salmonella*. In infizierten *E. coli*-Zellen wird die eingebrachte dsDNA des Phagen P1 durch den Rolling-Circle-Mechanismus (S. 235) repliziert, sodass linear aneinandergereihte Kopien (**Concatemere**) des Phagengenoms entstehen. Diese werden durch das Pac-Protein des Phagen in 100 kb

Fragmente zerlegt und in die Phagenköpfe verpackt, bis diese voll sind. Der Verpackungsmechanismus wird dementsprechend als „**Headful-packaging**“ bezeichnet. Während der Phagenreproduktion wird die bakterielle DNA durch Phagenenzyme zerlegt und die Monomere zur Synthese der eigenen viralen DNA genutzt. Da der Phage nicht zwischen seiner eigenen und der bakteriellen DNA unterscheiden kann, wird versehentlich auch Wirts-DNA in den Phagenkopf eingebaut. Es entsteht ein **transduzierender Phagenpartikel** mit einem bakteriellen DNA-Fragment von etwa 100 kb. Dieser Phagenpartikel kann sich natürlich nicht mehr reproduzieren. Er kann aber die bakterielle DNA in neue Wirtsbakterien injizieren, wo sie durch homologe Rekombination gegen die genomische DNA des Wirtes ausgetauscht werden kann. Da nur ein sehr kleiner Anteil der produzierten Phagenpartikel bakterielle DNA enthält, ist die Wahrscheinlichkeit mit der ein Phagenkopf ein bestimmtes DNA-Gen enthält sehr gering und nur eine von 10^7 bis 10^8 Zellen wird mit einem bestimmten Markergen transduziert. Um eine hohe Transduktionseffizienz zu erreichen, ist es daher am besten, das Verhältnis Phage zu Wirt (multiplicity of infection) sehr gering zu halten, so dass die Bakterien nicht alle durch die normalen Phagenpartikel lysiert werden.

Eine Voraussetzung für die Übertragung spezifischer Gene bei der **speziellen Transduktion** ist die Integration der Phagen-DNA in das bakterielle Genom. Das bedeutet, dass diese Form der Transduktion nur durch temperente Phagen, z. B. durch den Phagen Lambda durchgeführt wird (Abb. 6.**25**, S. 133). Lambda integriert durch einen ortsspezifischen Rekombinationsprozess mit einer Sequenz, die als *attachment-site* des Phagen ***attP*** beschrieben wurde, an einer komplementären Stelle, die *attB-site* im *E. coli*-Genom. Die ***attB***-Sequenz ist zwischen dem *galKTE*-Operon zur Galactoseverwertung und dem *bioABFC*-Operon zur Biotinsynthese auf dem *E. coli*-Chromosom lokalisiert. Bei der Excision des Prophagen, beim Übergang vom lysogenen in den lytischen Zyklus erfolgt der umgekehrte Rekombinationsprozess, wobei in der Regel die ursprüngliche *attB*-Sequenz wieder hergestellt wird. In wenigen Fällen ist der Excisionprozess inkorrekt, wobei spezifisch transduzierende Phagen entstehen, die den größten Teil des Virusgenoms inklusive der benachbarten Wirtsgenomsequenzen, z. B. das *bio*- oder das *gal*-Operon tragen, wogegen ein Teil der Phagen-DNA im Wirtsgenom verbleibt. Die neu entstandenen transduzierenden Lambda-Phagen werden als λ*bio*$^+$ bzw. λ*gal*$^+$ gekennzeichnet. Für eine erfolgreiche Transduktion kann aber nur ein begrenzter Teil der Phagen-DNA durch die Wirts-DNA ersetzt werden. Beispielsweise müssen die *cos*-sites zur Zirkularisierung der λ-DNA, der Replikationsursprung und die Gene zur Synthese der Phagenhülle erhalten bleiben. Bei einer Coinfektion mit einem intakten Phagen (**Helferphagen**) kann jedoch auf die Gene zur Synthese und dem Zusammenbau der Phagenpartikel verzichtet werden, da diese Funktionen durch die coinfizierte intakte λ-DNA übernommen wird.


Phage mit bakterieller DNA
virales Genom
Bakterien-chromosom
normaler Phage
Rezipienten-Chromosom
bakterielle Donor-DNA
cross-over zwischen homologen Gensequenzen
lysiertes Bakterium
a generelle Transduktion


inkorrekte Excision
bio
Prophage
gal
Bakterien-chromosom
bio+
Teil der bakteriellen DNA
gal
Phagen-DNA
Bakterienchromosom mit Teil des Phagengenoms
Phagen mit bakterieller Donor-DNA
bio+
chromosomale DNA des Rezipienten
bio+
Integration
b spezielle Transduktion

◀ Abb. 6.**25** **Generelle und spezielle Transduktion. a** Bei der Infektion von generell transduzierenden Phagen wird nach der Infektion die bakterielle DNA durch phagencodierte Enzyme in Teilstücke zerlegt, um die DNA-Bausteine für die Replikation der Phagen-DNA nutzen zu können. Bei der Verpackung der Phagen-DNA werden versehentlich auch Stücke der Wirts-DNA vergleichbarer Größe in die Phagenköpfe verpackt. Diese Phagenpartikel können bei der nächsten Infektion diese Bakterien-DNA in eine andere Bakterienzelle übertragen, wo sie dann durch homologe Rekombination in das Wirtsgenom eingebaut werden kann. **b** Bei der spezifischen Transduktion integriert der Phage an einer bestimmten Stelle in das Wirtsgenom. In wenigen Fällen wird der Prophage bei einer späteren Excision nicht korrekt, sondern inkorrekt aus dem Wirtsgenom wieder herausrekombiniert, wodurch benachbarte Genloci in die Phagen-DNA eingebaut und bei einer neuen Infektion durch homologe Rekombination in die Wirts-DNA integriert werden können.

Auf diese Weise kann man spezielle λ-Phagen konstruieren, die spezifische Teile des *E. coli*-Genoms abdecken oder Gene aus beliebigen anderen Organismen tragen. Infiziert der transduzierende Phage eine neue Wirtszelle werden die neuen Eigenschaften auf diese übertragen. Die Veränderungen, die durch die Integration von temperenten Phagen eingebracht werden, bezeichnet man als **Phagenkonversion**. Ein Beispiel beinhaltet die Konversion nicht toxigener *Corynebacterium diphteriae* bzw. *Vibrio cholerae*-Stämme. Sie erwerben das Diphteria- bzw. Choleratoxin durch die Infektion spezifischer *tox*$^+$-Phagen.

Neben den transduzierenden Phagen wurden zudem auch kleine phagenähnliche Partikel identifiziert, die als **Gentransfergene** (**GTA**) bezeichnet werden. Diese Partikel stellen wahrscheinlich eine degenerierte Form von Phagen da. Sie werden durch spezielle Bakterien, z. B. *Rhodobacter capsulatus* (RcGTA), *Bartonella* spp. (BLP), *Brachyspira hyodysenteriae* (VSH-1) oder *Methanococcus voltae* (VTA), produziert und können nach dem Zufallsprinzip beliebige chromosomale Fragmente und Plasmide mit einer Länge von rund 4,5–14 kb verpacken und in die Rezipientenzelle übertragen.

6.6.3 Konjugation

Als **Konjugation** wird der gerichtete Gentransfer von einer **Donor**- auf eine **Rezipientenzelle** bezeichnet, der durch direkten Kontakt zwischen den beiden teilnehmenden Zellen abläuft. Dieser DNA-Transferprozess wurde bereits 1947 durch J. Lederberg und E. Tatum bei *E. coli* entdeckt. Meist wird Plasmid-DNA, seltener aber auch chromosomale DNA transferiert. Im einfachsten Fall wird eine Konjugation sichtbar, wenn man zwei Stämme vermischt, die unterschiedliche Eigenschaften haben (z. B. Donor: His$^-$, Amp^r-Plasmid, Rezipient: Amp^s, His$^+$) und sie nach einer gewissen Inkubationszeit auf einem Selektionsmedium ausplattiert, auf welchem nur bestimmte **Transkonjuganten** (z. B. His$^+$, Amp^r) wachsen. Mittlerweile weiß man aber, dass Konjugation auch zwischen verschiedenen Bakterien, grampositiv (*Streptomyces, Staphylococcus, Enterococcus*) wie gramnegativ (*Vibrio, Pseudomonas, Enterobacteriaceae*), sowie bei Archaea (*Sulfo-*

lobus) stattfinden kann und DNA durch konjugative Systeme sogar von Prokaryoten in eukaryotische Rezipientenzellen transferiert wird. Als Beispiel sei hier das *Agrobacterium tumefaciens* erwähnt, das das Ti-Plasmid in verletzte Gewebe von Dicotyledonen überträgt. Da die Konjugation weit über die taxonomischen Grenzen reicht, ist diese Form der DNA-Übertragung sehr bedeutend für den **horizontalen Gentransfer**.

Eine Konsequenz ist beispielsweise, dass Plasmide die **Antibiotikaresistenzgene** codieren von harmlosen Darmbakterien auf pathogene Bakterien transferiert oder zwischen verschiedenen pathogenen Erregern ausgetauscht werden, die dann gegenüber den entsprechenden Antibiotika resistent werden. Solche **multiresistenten Stämme** stellen heute mit das größte Problem bei der Behandlung von Infektionskrankheiten dar. Auch Gene, die zur Virulenz eines Bakteriums beitragen, können innerhalb verschiedener Spezies ausgetauscht werden. Eine Gruppe von Virulenzgenen aus pathogenen *Yersinia*-Stämmen konnte auch in anderen Enterobacteriaceaen, einschließlich *E. coli* gefunden werden, wo sie ebenfalls zum Virulenzpotential der Erreger beitragen. ◀

Bei der DNA-Übertragung wird eine Kopie eines **konjugativen Plasmids** der Donorzelle an die Rezipientenzelle abgegeben, die kein konjugatives Plasmid dieser Art besitzt. Für die Übertragung des Plasmids ist ein enger Kontakt zwischen den beteiligten Zellen eine Grundvoraussetzung. Das bestuntersuchte Konjugationssystem ist die Übertragung des **F-Plasmids** in *E. coli* (Abb. 6.**26**).

Das **F-Plasmid** (**fertility factor**, Abb. 6.**27a**) liegt in ein bis zwei Kopien in der Bakterienzelle vor und wird bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Das F-Plasmid besteht aus etwa 100 kb und trägt zwei verschiedene Replikationsursprünge *oriS* und *oriV,* die in der *RepFIA*-Region codiert sind und für die Replikation des Plasmids bei der Zellteilung verantwortlich sind. Für den replikativen Vorgang beim Transfer der DNA wird der konjugative Replikationsursprung *oriT* genutzt, der sich in der sogenannten *tra*(transfer)-Region befindet. Die *tra*-Region codiert zudem mehr als 30 Proteine, die an der Übertragung des Plasmids in die Rezipientenzelle beteiligt sind. Darunter sind die Mpf (mating pair formation)-Proteine, die die Oberflächenstrukturen in der Zellmembran ausbilden und für den Zellkontakt und den DNA-Export verantwortlich sind. Die Dtr-Proteine (DNA transfer and relaxation) fügen beim *oriT* einen Einzelstrangbruch ein und führen anschließend die DNA zum Exportsystem im Aggregationskomplex an der Kontaktstelle zwischen den beiden konjugierenden Bakterien. Das F-Plasmid enthält weiterhin zahlreiche mobile genetische Elemente, wie die Insertionselemente IS2, IS3 und das Transposon Tn1000 (γδ), die für die Integration des F-Plasmids in das bakterielle Chromosom und damit für die Entstehung von Hfr (high frequency of recombination)-Stämmen verantwortlich sind (S. 251).

Eine F-Plasmid enthaltende Zelle wird als F^+ bezeichnet und agiert immer als Donor, wogegen eine F^- Zelle ohne F-Plasmid nur als Rezipient fungieren kann. Eine F^+-*E. coli*-Zelle produziert sogenannte **F-Pili** oder **Sexpili**, die aus vielen Untereinheiten des Proteins **Pilin** aufgebaut sind, die mit ihrer Spitze Kontakt mit der Oberfläche der Rezipientenzelle aufnehmen. Nach der Kontaktaufnahme werden die beiden Zellen durch die Depolymerisation des Pilus zueinander gezo-

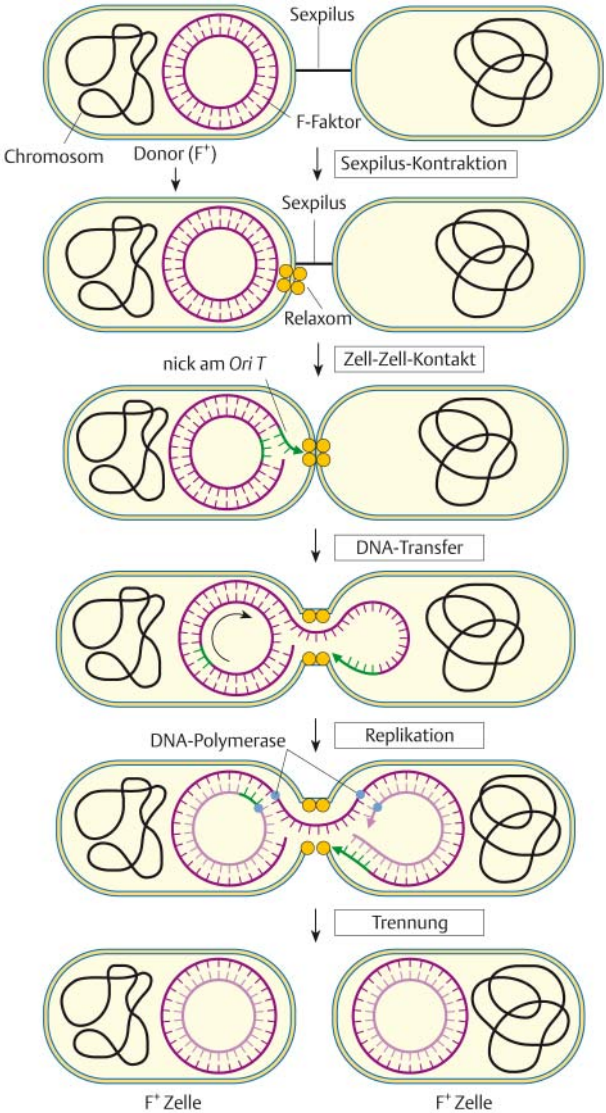


Abb. 6.**26** **Konjugation.** Beim konjugativen DNA-Transfer wird durch die F^+-Donor-Zelle mit Hilfe des kontrahierenden Sexpilus ein enger Kontakt zum F^--Rezipienten hergestellt und dann die F^--Plasmid-DNA mit Hilfe des am *oriT* angelagerten Relaxom-Komplexes nach Einführung eines Einzelstrangbruchs nach dem „Rolling-Circle"-Replikationsmechanismus in den Rezipienten übertragen.

gen und bilden nach der engen Paarung einen stabilen Aggregationskomplex aus, wenn die für *E. coli* charakteristischen Lipopolysaccharide und das OmpA-Protein in der Außenmembran des Rezipienten zu finden sind, und keine durch die *tra*-Region codierten Proteine vorhanden sind. Das als „**Surface Exclusion**" bezeichnete Phänomen verhindert, dass stabile Aggregationskomplexe zwischen zwei F^+-Zellen ausgebildet und mehrere F-Plasmide in eine Bakterienzelle übertragen werden.

Für den DNA-Transfers (Abb. 6.**26**) werden diverse Tra-Proteine an die *oriT*-Stelle angelagert. Dann führt ein als **Relaxase** bezeichnetes Enzym aus dem entstandenen Nucleoproteinkomplex (**Relaxom**) einen Einzelstrangbruch durch und wird dabei kovalent mit dem 5′-Ende der F-Plasmid-DNA verknüpft und der Doppelstrang entwunden. Der Nucleoproteinkomplex mit dem 5′-Ende der F-DNA wird dann zu dem aus den Mpf-Proteinen bestehenden Exportsystem transportiert und durch dieses in die Rezipientenzelle transferiert. Beim Transfer wird das F-Plasmid durch den **Rolling-Circle-Mechanismus** repliziert. Am in der Donorzelle verbleibenden 3′-Ende erfolgt eine kontinuierliche Verlängerung der ssDNA zum Doppelstrang, wohingegen am übertragenen 5′-Ende im Rezipienten die Synthese des komplementären Stranges diskontinuierlich verläuft. Bei der Termination der Replikation am *oriT* wird die entstehende Lücke abschließend wieder durch die Relaxase geschlossen. Dieser Vorgang ist sehr effizient und kann dazu führen, dass in kurzer Zeit konjugative Plasmide an viele Rezipienten weitergegeben werden, die dann wiederum als Donor fungieren können. Auf diese Weise können sich auf konjugativen Plasmiden codierte Eigenschaften sehr schnell verbreiten, wenn sie einer Bakterienpopulation einen selektiven Vorteil verschaffen. Eine F^+-Zelle muss aber nicht eine F^+-Zelle bleiben, denn sie kann das Plasmid spontan wieder verlieren. Man spricht dann vom **Plasmid-Curing** (Entfernen), was in der Regel, wenn kein spezieller Selektionsdruck anliegt, die Lebensfähigkeit einer Bakterienzelle nicht beeinflusst.

Der Konjugationsmechanismus hat viel gemeinsam mit dem **Typ IV-Sekretionssystem**, welches von pathogenen Bakterien dazu benutzt wird Effektor-Proteine in die Wirtszelle zu transferieren, die verschiedenste Signalmoleküle der Wirtszelle manipulieren und für ihre Zwecke umfunktionieren. Als Beispiel seien die Dot/Icm-Proteine aus *Legionella pneumophila* dem Verursacher der Legionärskrankheit erwähnt, die die Funktion der alveolären Makrophagen inhibieren und so eine Vermehrung von *Legionella* im Phagosom ermöglichen.

In **grampositiven Bakterien** erfolgt die Konjugation ähnlich, aber generell ist die Anzahl der Gene, die für den konjugativen Transfer benötigt werden, deutlich geringer als in gramnegativen Bakterien (mehr als 20 Gene). Ein Grund hierfür ist, dass sie wahrscheinlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Zellwandstruktur keine Pili synthetisieren müssen. *Enterococcus faecalis* z. B. sezerniert diffusible Peptide, die eine Pheromon-ähnliche Funktion haben und die Expression von *tra*-Genen auf konjugativen Plasmiden in Nachbarzellen induzieren. Das Pheromon-Peptid bindet an einen spezifischen Rezeptor auf der Donorzelle und wird dann

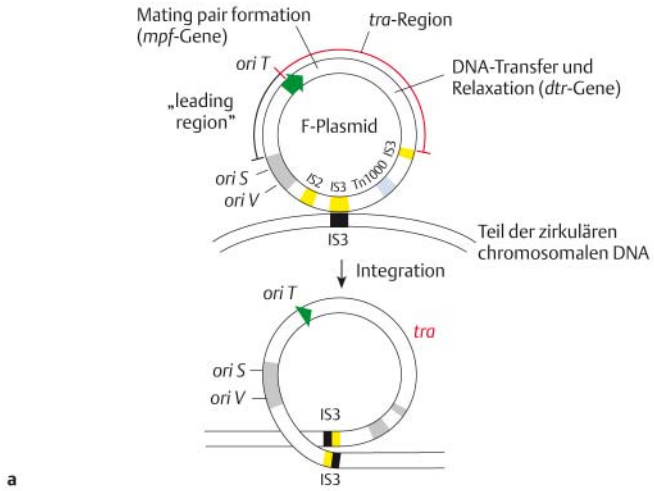
ins Cytoplasma transportiert, wo es mit dem Repressor TraA der *tra*-Gene interagiert und die Repression aufhebt. Daraufhin werden die Komponenten des Aggregationskomplexes synthetisiert und die Ausbildung des Mating-Aggregates eingeleitet.

Hfr-Stämme

Mit Hilfe des F-Plasmids können auch chromosomale Gene von einem zum anderen Mikroorganismus übertragen werden, da das F-Plasmid ein **Episom** ist, das in die chromosomale DNA von *E. coli* integrieren kann. Die Integration kann durch Rekombination an mehreren spezifischen Stellen erfolgen, an denen mobile genetische Elemente im bakteriellen Genom lokalisiert sind, die auch auf dem F-Plasmid codiert sind (Abb. 6.**27**). Nach der Integration kann der Bakterienstamm am *oriT* den DNA-Transfer auslösen. Da das Plasmid jetzt Teil der chromosomalen DNA ist, werden, nachdem ein Teil der F-DNA übertragen wurde, chromosomale Gene transferiert, die neben der Integrationsstelle des Plasmids lokalisiert sind. Verläuft der Transferprozess lange genug (rund 100 min), wird die gesamte chromosomale DNA und damit alle Gene vom Donor auf die Rezipientenzelle übertragen. Der übertragene chromosomale DNA-Abschnitt kann dann mit entsprechenden homologen Sequenzen der Rezipienten-DNA rekombinieren. Aus diesem Grund werden die Bakterienstämme, die ein integriertes F-Plasmid besitzen auch als **Hfr-Stämme** (high frequency of recombination) bezeichnet.

Da es verschiedene Integrationsstellen für das F-Plasmid gibt, können verschiedene Hfr-Stämme entstehen, mit welchen je nach Orientierung und Ort der Integration verschiedene Teile des *E. coli*-Chromosoms zuerst transferiert werden. Da es durch Schütteln der Kulturen häufig zu einem Abbruch der Paarung und der DNA-Übertragung kommt, wird nur ein Teil des Chromosoms transferiert, das verloren geht, wenn es nicht durch homologe Rekombination mit der DNA des Rezipienten ausgetauscht wird. Aus einer Hfr-F^--Konjugation entsteht dann der ursprüngliche Hfr-Stamm und eine F^--Variante mit einem veränderten Genotyp des Donorstamms. Dies hat man sich zur **Kartierung** des *E. coli*-Chromosoms zu Nutze gemacht. Um die Reihenfolge der Gene zu bestimmen, hat man verschiedene Hfr-Stämme herangezogen, die Gene in unterschiedlicher Reihenfolgen von verschiedenen Insertionsorten aus transferieren und Rezipienten verwendet, die Selektionsmarker und verschiedene Auxotrophien tragen.

Ein Donor-Hfr-Stamm könnte beispielsweise sensitiv für Chloramphenicol (Chl^s) sein, aber intakte Gene für die Synthese der Aminosäuren Phenylalanin und Threonin (Phe^+, Thr^+) und für die Verwertung von Galactose und Maltose (Gal^+, Mal^+) enthalten. Der Rezipient hingegen ist Chloramphenicol-resistent (Chl^r), kann aber die besagten Aminosäuren nicht mehr synthetisieren und die C-Quellen nicht mehr verwerten (Phe^-, Thr^-, Gal^-, Mal^-). Die Konjugation wurde dann nach unterschiedlichen Zeiten abgebrochen



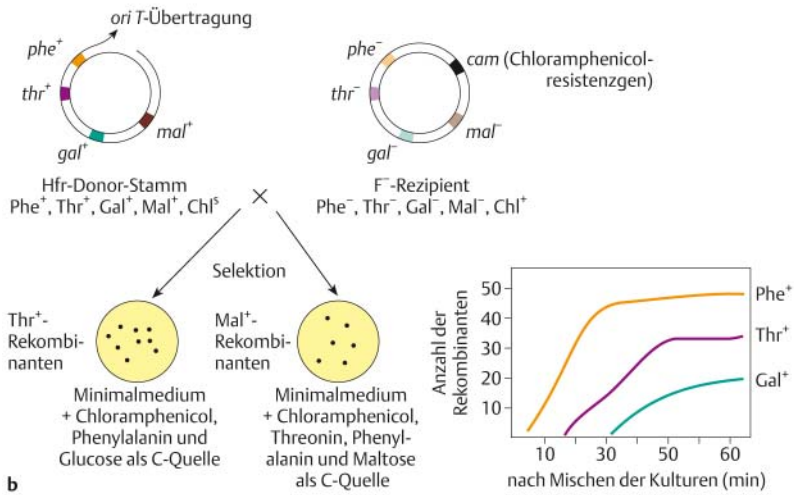


Abb. 6.**27** **Hfr-Stämme und Kartierung des *E. coli*-Chromosoms. a** Integration des F-Plasmids in die Wirts-DNA mittels des transponierbaren Elementes IS3. **b** Transfer der chromosomalen DNA mittels eines Antibiotika-resistenten Hfr-Donor-Stammes in einen F^- Rezipienten mit multiplen Resistenzen. Die Zeit die benötigt wird um bestimmte Auxotrophien zu komplementieren, ist von der Distanz der entsprechenden Gene vom *oriT* abhängig. (Thr: Threonin, Phe: Phenylalanin, Gal: Galaktose, Mal: Maltose). Der Donor und Rezipientenstamm können beide auf den entsprechenden verwendeten Selektivmedien zur Isolierung der Konjuganten nicht wachsen.

und durch die Verwendung bestimmter Selektivmedien die Häufigkeit bestimmt, mit welcher eine bestimmte Auxotrophie komplementiert wurde (Abb. 6.**27**).

Die Reihenfolge mit der die Gene auf dem Donorchromosom liegen und übertragen werden, kann man dann anhand der Kinetik des Transfers der entprechenden Marker/Auxotrophie ablesen. Durch diese Bestimmung wird die ***E. coli*-Genkarte** historisch von 0 bis 100 min unterteilt, gemäß der Zeit, die benötigt wird, um die entsprechenden Gene im Vergleich zueinander mittels Konjugation zu übertragen.

F-Plasmide können aus dem Genom auch wieder herausrekombinieren (**excisieren**). Dabei kann es ähnlich wie bei der speziellen Transduktion zu Fehler beim Rekombinationsvorgang kommen, so dass die benachbarte, chromosomale DNA mit in das F-Plasmid aufgenommen wird. Diese Plasmid werden als **F′-Plasmide** bezeichnet. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie die aufgenommenen Genfragmente schnell an andere Rezipienten weitergeben. Die Weitergabe chromosomaler Teilstücke führt auch dazu, dass von verschiedenen Genen neben der chromosmalen Kopie eine zweite plasmidcodierte Kopie in einem Stamm vorhanden sein kann. Diese partiell diploiden Stämme werden als **merodiploid** bezeichnet.

Mobilisierbare Plasmide

Alle **konjugativen Plasmide** können ihren eigenen Transfer in eine andere Zelle induzieren. Es ist ihnen aber auch möglich die Übertragung von normalerweise sogenannten **mobilisierbaren Plasmiden** zu vermitteln, die nicht von selbst aus transferiert werden, da sie keine *mpf*-Gene tragen und daher keine Kontaktpili ausbilden können. Mobilisierbare Plasmide besitzen plasmidspezifische *mob*-Gene, die die Relaxase codieren und einen *oriT*, an welchem die Relaxase durch die Einführung des Einzelstrangbruchs den Transfer initiiert.

Ein typisches konjugatives Plasmid ist das **Resistenz(R)-Plasmid** RP4 aus gramnegativen Bakterien, das der IncP-Gruppe angehört. Es enthält die Gene für die Resistenz gegenüber Ampicillin, Tetracyclin und Kanamycin, über 20 *tra*-Gene in zwei separaten Regionen, die am konjugativen Transfer beteiligt sind, einen vegetativen *oriV* und die *par*-Gene, die zur gleichmäßigen Verteilung der Plasmide auf beide Nachkommenzellen nach der Zellteilung verantwortlich sind sowie einen *oriT* für die Übertragung durch Konjugation. Ein vielfach verwendetes **mobilisierbares Plasmid** ist das pGP704, das eine Ampicillinresistenz, einen R6K *ori* (Tab. 6.**5**), eine *mob*-Region und einen *oriT* besitzt. Dieses Plasmid kann sich nur in speziellen gentechnologisch veränderten Bakterienstämmen replizieren, die das Pir-Protein codieren und es kann nur aus F^+-Stämmen übertragen werden, die die *tra*-Gene zur Ausbildung der Sexpili codieren. Bei gentechnologischen Experimenten werden aus Sicherheitsgründen hauptsächlich solche speziell zu mobilisierende und replizierende Plasmide zum DNA-Transfer zwischen Bakterien eingesetzt.

6.1.3 Einschränkung des Gentransfers durch Restriktion und Modifikation

Obwohl der DNA-Transfer in prokaryotischen Zellen ein häufiger und weitverbreiteter Prozess ist, haben Bakterien sogenannte **Restriktions/Modifikations (R-/M)-Systeme** entwickelt, die sie vor dem Eindringen von Fremd-DNA durch Transformation und bei einer Virusinfektion schützen bzw. die Integration deutlich reduzieren. Wird z. B. ein *E. coli* B-Stamm mit einem Plasmid aus einem *E. coli* K-12-Stamm transformiert, so werden erheblich (1000 bis 10 000fach) weniger Transformanten gefunden, als wenn das Plasmid wieder in einen *E. coli* K-12-Stamm retransformiert wird. Um die zelleigene DNA von der Fremd-DNA zu unterscheiden, werden innerhalb einer bestimmten Erkennungssequenz Cytosin- bzw. Adeninreste methyliert (s. o.). Fremd-DNA, die nicht methyliert ist, wird an der Erkennungssequenz durch spezifische **Restriktionsendonucleasen** geschnitten und dann abgebaut.

Nach der Funktionsweise unterscheidet man vier verschiedene Typen. Das Restriktionsenzym *Eco*K gehört zu dem **Typ I-Enzymen**, die zusammen mit den entsprechenden Methyltransferasen einen Komplex ausbilden. Diese erkennen spezifische Sequenzen aus 3–4 und 4–5 Nucleotiden, die durch 6–8 Nucleotide voneinander getrennt sind, z. B. bei *Eco*K **AAC**NNNNNN**GTGC** (N: kann jedes Nucleotid sein), sie schneiden jedoch an einer unspezifischen Stelle in einer gewissen Distanz zur Erkennungsstelle. Die **Typ II-Restriktionsenzyme** hingegen erkennen spezifische, kurze 4–8 bp **palindromische** Sequenzen und schneiden genau in dieser Nucleotidabfolge. Diese Eigenschaft hat sie mit zu den wichtigsten Werkzeugen der Molekularbiologie und Gentechnologie gemacht (Tab. 6.**6**). Schneidet das Enzym beide Stränge an gleicher Stelle entsteht eine **glatte** (blunt) Schnittstelle, die mit jedem anderen glatt geschnittenen DNA-Fragment durch die Ligase kovalent miteinander verknüpt werden kann. Wird die DNA an der

Tab. 6.**6** **Einige häufig verwendetet Restriktionsenzyme.**

Enzym	*Erkennungssequenz*	*Art der Restriktion*
*Eco*RI	$G^6AATT\ C$ $C\ TTAA_5G$	5′-überhängend (sticky)
*Bam*HI	$G^6GATC\ C$ $C\ CTAG_5G$	5′-überhängend (sticky)
*Pst*I	$C\ TGCA^6G$ $G_5ACGT\ C$	3′-überhängend (sticky)
*Eco*RV	$G^6ATAT\ C$ $C\ TATA_5G$	glatt blunt
*Sau*3a	^6GATC $CTAG_5$	5′-überhängend (sticky) kann an *Bam*HI geschnittene Restriktionsfragmente ligiert werden

Erkennungsstelle an versetzten Stellen geschnitten, so entstehen **überhängende** (sticky) Enden, die nur mit DNA-Fragmenten mit komplementären Enden verknüpft werden können. Die **Typ III-Restriktionsenzyme** erkennen hingegen 5 bis 7 nicht symmetrische Nucleotide und spalten die DNA an einer Stelle, die etwa 25 bis 27 bp von der Erkennungsstelle entfernt lokalisiert ist. Bei den Restriktionsenzymen vom **Typ IV** wird hingegen nur methylierte DNA abgebaut.

Die meisten in der Molekularbiologie benutzten *E. coli*-Stämme besitzen keine Restriktions/Modifikations-Systeme mehr. Dies erlaubt eine problemlose Vermehrung von rekombinanten Plasmiden und die Expression darauf codierter Gene.

Transformation: Direkte Aufnahme von freier DNA in die Zelle.
generelle Transduktion: Übertragung aller Wirtsgene mittels Viren.
spezielle Transduktion: Übertragung spezieller Wirtsgene mittels Viren.
Konjugation: DNA-Aufnahme durch Zellkontakt.
Kompetenz: Bereitschaft DNA aufzunehmen, natürliche Kompetenz wird unter bestimmten physiologischen Bedingungen durch Kompetenzfaktoren ausgelöst und durch zahlreiche Proteine vermittelt.
Phagenkonversion: Veränderungen, die durch die Integration von temperenten Phagen verursacht werden.
Hfr-Stämme: Bakterienstämme, die ein ins Chromosm integriertes F-Plasmid besitzen und chromosomale DNA dadurch mit einer höheren Frequenz übertragen können.
F′-Plasmid: Plasmid, das chromosomale DNA-Segmente codiert.
mobilisierbare Plasmide: Plasmide, die nicht von selbst transferiert werden, aber bei Anwesenheit der *tra*-Gene zur Übertragung gebracht werden können.
Restriktions/Modifikations-Systeme: Einheit aus Restriktionsendonuclease und Methyltransferase, die fremde DNA abbauen und die eigene DNA vor dem Abbau schützt.

7 Mikrobielles Wachstum

Regina Nethe-Jaenchen

7.1 Wachstumsansprüche von Mikroorganismen

Nährstoffansprüche und **Wachstumsbedingungen** von Mikroorganismen sind sehr unterschiedlich. **Makroelemente** sind die Hauptbestandteile der Makromoleküle, aus denen ein Großteil der Zellsubstanz besteht. **Mikroelemente** sind Bestandteile von Enzymen oder Cofaktoren, sie werden in deutlich geringeren Mengen gebraucht. Einige Mikroorganismen benötigen **Wachstumsfaktoren** als Biosynthesevorstufen. Je nach Nährstoffansprüchen unterscheidet man **prototrophe** und **auxotrophe** Mikroorganismen.

Nährmedien enthalten alle für das Wachstum eines Mikroorganismus notwendigen Substanzen. Mikroorganismen in Labor und Industrie werden je nach Fragestellung auf **festen oder flüssigen** Nährmedien kultiviert. Nach ihrer **chemischen Zusammensetzung** unterscheidet man verschiedene Kategorien von Nährmedien.

Mikroorganismen können aufgrund ihrer unterschiedlichen physiologischen Fähigkeiten nahezu jedes natürliche Habitat besiedeln. Selbst extreme Umweltbedingungen wie hoher hydrostatischer Druck, Temperaturen um den Gefrier- oder Siedepunkt, erhöhte Salzkonzentration oder ein stark saures bzw. alkalisches Milieu (Kap. 10) werden von entsprechenden Spezialisten toleriert oder sind sogar Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung. Auch in ihren Nährstoffansprüchen zeigen Mikroorganismen eine große Vielfalt: Wie alle lebenden Organismen benötigen sie für Wachstum und Zellteilung Energie, einige Mikroorganismen nutzen Sonnenlicht als Energiequelle, andere konservieren die Energie chemischer Reaktionen (Kap. 8). Ebenso benötigen sie geeignete Elektronendonoren und -akzeptoren (Kap. 8) sowie Ausgangsmaterialien für die Biosynthese der Zellsubstanz (Kap. 9). Dabei müssen mindestens alle Elemente, aus denen die Zellsubstanz aufgebaut ist, in verwertbarer Form vorhanden sein. Nur, wenn die Wachstumsbedingungen für einen bestimmten Mikroorganismus ideal sind, was in der Natur eher selten der Fall ist, wächst er mit maximaler Geschwindigkeit.

7.1.1 Makro- und Mikroelemente

Trotz der physiologischen und morphologischen Unterschiede sind bestimmte chemische Elemente in den Zellkomponenten aller Organismen enthalten. Die vier Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff machen mehr als 90 % der Trockenmasse einer Zelle von *Escherichia coli* aus, wobei 50 % auf

Kohlenstoff, 20 % auf Sauerstoff, 14 % auf Stickstoff und 8 % auf Wasserstoff entfallen. Phosphor stellt weitere 3 % und Schwefel 1 % der Zelltrockenmasse. Diese sechs Elemente, die wegen ihres relativ hohen Anteils an der Zelltrockenmasse als **Makroelemente** oder **Hauptelemente** bezeichnet werden, sind die Hauptbestandteile von Proteinen, Nucleinsäuren, Polysacchariden, Lipiden und zahlreichen kleineren Molekülen (Tab. 7.**1**). Mit einem Anteil an der Zelltrockenmasse jeweils zwischen 0,3 und 1 % gehören zu den Makroelementen außerdem Kalium, Magnesium, Calcium und Eisen. Elemente mit einem Anteil von unter 0,3 % werden als **Mikroelemente** oder **Spurenelemente** bezeichnet. Zu ihnen gehören Zink, Mangan, Molybdän, Selen, Kobalt, Kupfer, Nickel, Vanadium und

Tab. 7.**1** **Mikro- und Makroelemente.** Beispiele für Quellen und Funktionen.

Makroelement	*Symbol*	*Quelle*	*Funktion (Beispiele)*
Kohlenstoff	C	CO_2, organische Verbindungen	Bestandteil aller organischen Moleküle, CO_2
Sauerstoff	O	O_2, H_2O, CO, organische Verbindungen	Bestandteil aller organischen Moleküle, terminaler Elektronenakzeptor aerober Organismen
Wasserstoff	H	H_2, H_2O, organische Verbindungen	Bestandteil aller organischen Moleküle, Elektronendonor vieler Prokaryoten (z. B. Knallgasbakterien)
Stickstoff	N	NH_4^+, NO_3^-, N_2, organische Stickstoffverbindungen	Bestandteil von Proteinen, Nucleinsäuren und vielen Coenzymen
Schwefel	S	SO_4^{2-}, H_2S, S^0, $S_2O_3^-$, Metallsulfide (z. B. FeS), organische Schwefelverbindungen	Bestandteil von Proteinen, einigen Coenzymen und Vitaminen, je nach Reduktionsstufe Elektronendonor bzw. -akzeptor einiger Prokaryoten (z. B. Schwefeloxidierer, Sulfatreduzierer)
Phosphor	P	PO_4^{3-}	Bestandteil der Nucleinsäuren und der Nucleotide
Eisen	Fe	Fe^{2+}, Fe^{3+}, als Eisensalze	Cytochrome, Eisen-Schwefel-Proteine, Enzyme (z. B. Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Katalasen, Peroxidasen, Oxygenasen)
Natrium	Na	NaCl oder andere Natriumsalze	Zellwandstabilisierung bei halophilen Archaea, Kopplungsion von Na^+-ATPasen
Calcium	Ca	Calciumsalze	Cofaktor für Exoenzyme, Resistenz von Endosporen
Kalium	K	Kaliumsalze	Cofaktor für einige Enzyme, z. B. Proteinsynthese
Magnesium	Mg	Magnesiumsalze	Stabilisierung von Ribosomen, Zellmembranen, Nucleinsäuren, Chlorophylle, Cofaktor für viele Enzyme

Tab. 7.**1** **Fortsetzung.**

Mikroelement	*Symbol*	*Quelle*	*Funktion (Beispiele)*
Mangan	Mn	Mangansalze	Photosystem II (Photolyse von Wasser), einige Superoxid-Dismutasen
Kobalt	Co	Kobaltsalze	Vitamin B_{12}
Kupfer	Cu	Kupfersalze	Cytochrom-c-Oxidase, Plastocyanin, einige Superoxid-Dismutasen
Nickel	Ni	Nickelsalze	Faktor F_{430}, viele Hydrogenasen, Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Urease
Molybdän	Mo	Molybdänsalze	Molybdän-Nitrogenasen, Nitrat-Reductase, Sulfit-Oxidase, einige Formiat-Dehydrogenasen
Selen	Se	Selensalze	Selenocystein, Formiat-Dehydrogenase, einige Hydrogenasen
Zink	Zn	Zinksalze	Polymerasen, viele DNA bindende Proteine
Vanadium	V	Vanadiumsalze	Vanadium-Nitrogenase
Wolfram	W	Wolframsalze	Manche Enzyme, z. B. einige Formiat-Dehydrogenasen von Formiat verwertenden Bakterien

Wolfram, wobei nicht jedes Mikroelement von allen Mikroorganismen benötigt wird. Mikroelemente sind Metalle, die meist Bestandteile von Enzymen oder Cofaktoren sind (Tab. 7.**1** u. 🕮*Biochemie, Zellbiologie*).

Natrium wird von den meisten Mikroorganismen ebenfalls nur in sehr geringen Mengen benötigt, für das Wachstum von halophilen Archaea (S. 102, S. 460) sind jedoch deutlich höhere Mengen erforderlich. Spurenelemente sind häufig bereits in ausreichender Menge als Verunreinigungen der verwendeten Salze oder des Wassers vorhanden, sodass sie der Nährlösung nicht extra zugegeben werden müssen.

Abhängig von ihren physiologischen Fähigkeiten nutzen Mikroorganismen verschiedene **Quellen** für die benötigten Makro- und Mikroelemente (Tab. 7.**1**). Während als Quelle für Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Wasserstoff, Phosphor und Schwefel sowohl organische als auch anorganische Verbindungen genutzt werden können, werden die Mikroelemente meist als anorganische Salze aufgenommen. Da die meisten anorganischen Eisensalze unlöslich sind, ist die direkte Aufnahme von Eisen kaum möglich. Viele Mikroorganismen produzieren daher spezielle Eisentransportsysteme, die als **Siderophore** bezeichnet werden.

Bei vielen Bakterien fungieren Derivate von Hydroxamat, die mit hoher Affinität Fe^{3+} binden, als Siderophore, bei Darmbakterien wie *E. coli* und *Salmonella enterica* aromatische Verbindungen, die als Enterobactine bezeichnet werden. Eine ausreichend hohe Eisenkonzentration ist auch für die Ausprägung von Pathogenitätsfaktoren bei Krankheitserregern von Bedeutung (S. 533).

7.1.2 Wachstumsfaktoren

Mikroorganismen synthetisieren Makromoleküle aus kleineren Einheiten, die als **Biosynthesevorstufen** dienen. Viele Stämme des Darmbakteriums *E. coli* führen mit wenigen Grundbausteinen alle Biosynthesen durch; zum Aufbau ihrer Zellsubstanz benötigen sie nur anorganische Salze und eine einzige Kohlenstoffquelle wie Glucose. Diese Mikroorganismen werden als **prototroph** bezeichnet. Mikroorganismen, die wie Milchsäurebakterien bestimmte Biosynthesevorstufen nicht selbst synthetisieren können, sondern auf deren Verfügbarkeit angewiesen sind, werden als **auxotroph** bezeichnet, die benötigten Biosynthesevorstufen als **Wachstumsfaktoren**. Dazu gehören bestimmte Vitamine, Aminosäuren und Purine bzw. Pyrimidine. Vitamine (Tab. 7.**2**) sind häufig Bestandteile von Coenzymen und prosthetischen Gruppen von Enzymen (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Mikroorganismen sind meist auf Vitamine der B-Gruppe angewiesen: Thiamin (Vitamin B_1), Pyridoxin (Vitamin B_6) und Cobalamin (Vitamin B_{12}) sowie Biotin, gelegentlich auch Folsäure, Nicotinsäure und Pantothensäure. Welche und wie viele Wachstumsfaktoren ein auxotropher Mikroorganismus benötigt, ist unterschiedlich und auch nicht immer bekannt. Für die Kultivierung unbekannter Organismen werden deshalb komplexe Nährmedien (s. u.) verwendet. Besonders anspruchsvoll sind Milchsäurebakterien, die in Kultur nur wach-

Tab. 7.**2** **Von Mikroorganismen häufig benötigte Wachstumsfaktoren.** Oft sind die Substanzen lichtempfindlich und nicht hitzestabil. Sie werden deshalb sterilfiltriert.

Vitamin	*Coenzym*	*Funktion*
4-Aminobenzoesäure	Tetrahydrofolat	Übertragung von C1-Einheiten
D (+)-Biotin	kovalente Bindung an Carboxylasen	Carboxylierungen mit aktiviertem CO_2
Cobalamin (Vitamin B_{12})	Cobalamin-Coenzyme	intramolekulare Umlagerungen, Methylierungen, Reduktion von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden
Folsäure	Tetrahydrofolat	Transfer von C1-Einheiten
α-Liponsäure	Liponsäureamid	Übertragung von Acylgruppen
Nicotinsäure, Nicotinsäureamid	NAD^+	Übertragung von Elektronen bei Redoxreaktionen
D (+)-Pantothensäure	Coenzym A	Übertragung von Acylgruppen
Pyridoxin, Pyridoxal Pyridoxamin (Vitamin B_6)	Pyridoxalphosphat	Reaktionen von Aminosäuren (Transaminierungen, Decarboxylierungen, Dehydratisierungen)
Riboflavin (Vitamin B_2)	FAD^+ und FMN	Übertragung von Elektronen bei Redoxreaktionen
Thiamin (Vitamin B_1)	Thiaminpyrophosphat	Übertragung von Aldehydgruppen

sen, wenn sämtliche Aminosäuren, Purine und Pyrimidine sowie 10 verschiedene Vitamine vorhanden sind.

7.1.3 Nährmedien

Anhand ihrer **Konsistenz** werden **flüssige** und **feste Nährmedien** unterschieden. Das Festmedium enthält zusätzlich **Agar**, ein komplexes Polysaccharid aus Rotalgen, das sich bei Temperaturen über 82 °C verflüssigt und unter 44 °C fest wird. Die mit Agar versetzte Nährlösung wird autoklaviert (S. 279) und anschließend noch heiß unter sterilen Bedingungen in Kulturgefäße, z. B. Petri-Schalen bzw. Reagenzgläser, gegossen, wo sie beim Abkühlen zu einer geleeartigen, transparenten Masse erstarrt. Im Unterschied zu Gelatine, die von Robert Koch anfänglich zur Verfestigung der Nährmedien verwendet wurde, wird Agar nur von sehr wenigen Mikroorganismen durch Stoffwechselprozesse verflüssigt. Hinsichtlich der **chemischen Zusammensetzung** werden synthetische und komplexe Nährmedien unterschieden. Bei **synthetischen Nährmedien** sind die genaue Zusammensetzung und die Konzentration der einzelnen Bestandteile bekannt, sie werden daher auch als definierte Nährmedien bezeichnet. Ein definiertes Medium, das ausschließlich die für das Wachstum eines bestimmten Mikroorganismus essentiellen Bestandteile enthält, wird als **Minimalmedium** bezeichnet. **Komplexe Nährmedien** enthalten dagegen mindestens eine organische Komponente, die chemisch nicht genau definiert ist. Dabei handelt es sich entweder um Extrakte, die aus Fleisch, Hefe oder Malz hergestellt werden, oder um Hydrolysate und Peptone aus Fleisch, Gelatine, Sojamehl oder Casein. Hydrolysate werden durch chemische Behandlung mit Salzsäure gewonnen, Peptone durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen. Komplexe Nährmedien eignen sich nicht für stoffwechselphysiologische Untersuchungen, sondern werden vor allem für die Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen eingesetzt oder für solche, deren Wachstumsansprüche nicht vollständig bekannt sind. Ein komplexes Medium ist ein **Vollmedium**, da es immer auch Bestandteile enthält, die für den betreffenden Mikroorganismus nicht lebenswichtig sind. **Universalnährmedien** sind komplexe Nährmedien, deren Zusammensetzung für das Wachstum möglichst vieler verschiedener Mikroorganismen geeignet ist. Sie eignen sich z. B. für Keimzahlbestimmungen in einem bestimmten Lebensraum. **Selektivnährmedien** werden für die Anreicherung eines bestimmten Mikroorganismus oder einer stoffwechselphysiologischen Gruppe eingesetzt (S. 294), **Differentialnährmedien** zur Identifizierung eines bestimmten Mikroorganismus (S. 303).

Wasser ist Bestandteil aller Nährmedien und macht auch zwischen 80 und 90 % der Feuchtmasse einer Zelle aus. Für Laborwasser werden mehrere Reinheitsgrade unterschieden, die entsprechend den jeweiligen Anforderungen verwendet werden. Für das Ansetzen eines Nährmediums wird im Allgemeinen **einfach** oder **doppelt destilliertes** oder **demineralisiertes** Wasser benutzt. Für

spezielle Stoffwechseluntersuchungen, insbesondere die Abhängigkeit von bestimmten Spurenelementen, ist hochreines Wasser (**Reinstwasser**) notwendig, als Verunreinigungen anderer Salze eingebrachte Spurenelemente können durch die Zugabe von Chelatbildnern entfernt werden. Auch bei den verwendeten Materialien (Glas, Metall, Kunststoffe) muss darauf geachtet werden, dass sie während des Wachstums keine Spurenelemente an das Nährmedium abgeben.

Makroelemente, Hauptelemente: Hauptbestandteile der meisten Zellkomponenten, machen jeweils 0,3–50 % der Trockenmasse einer Zelle aus. Dazu gehören Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen, Kalium, Magnesium, Calcium und ggf. Natrium.
Mikroelemente, Spurenelemente: Häufig Bestandteile von Cofaktoren oder Enzymen, machen jeweils weniger als 0,3 % der Trockenmasse einer Zelle aus. Dazu gehören Mangan, Kobalt, Kupfer, Nickel, Molybdän, Selen, Zink, Vanadium, Wolfram.
Prototrophe Mikroorganismen: Benötigen nur eine einzige Verbindung als Kohlenstoffquelle zum Aufbau ihrer Zellsubstanz, Beispiel: *E. coli*.
Auxotrophe Mikroorganismen: Benötigen Wachstumsfaktoren zum Aufbau ihrer Zellsubstanz, Beispiel: Milchsäurebakterien.
Wachstumsfaktoren: Organische Verbindungen, die in geringen Mengen als Vorstufen für Biosynthesen benötigt werden. Dazu gehören Vitamine, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine.
Synthetische Medien, definierte Medien: Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Bestandteile ist bekannt.
Minimalmedium: Synthetisches Medium, das ausschließlich lebensnotwendige Bestandteile enthält.

7.2 Wachstum und Vermehrung

Die geringe Zellgröße und die meist einfachen Zellteilungsmechanismen ermöglichen Mikroorganismen ein schnelles **Wachstum** und die **Vermehrung** ihrer Population, die unter günstigen Bedingungen und bei ausreichendem Nährstoffangebot exponentiell verläuft. Im Rahmen der Vermehrung unterscheidet man verschiedene **Formen der Zellteilung**. Diese wird durch eine Vielzahl spezialisierter Proteine sehr präzise reguliert. Zellzahl und Zellmasse können mit **direkten** (Auszählen direkt oder nach Ausplattierung, Wiegen) und **indirekten Methoden** (Trübungsmessung) bestimmt werden.

Wachstum ist die irreversible Zunahme der lebenden Substanz einer einzelnen Zelle und führt zur Zunahme der Zellmasse. Bei Mikroorganismen führt Wachstum mit einer Größenzunahme der Einzelzelle zur Zellteilung und damit zum Anstieg der Zellzahl. Mit der **Vermehrung** der Einzelzellen durch Zellteilung wächst die gesamte Population. Obwohl die einzelnen Zellen einer Bakterien-

population grundsätzlich unabhängig voneinander existieren können, sind sie in der Lage, miteinander zu kommunizieren und ihr Verhalten abhängig von ihrer zahlenmäßigen Stärke zu koordinieren.

7.2.1 Zellteilung bei Mikroorganismen

Die häufigste **Form der Zellteilung** ist die **binäre Querteilung** durch Bildung eines Septums, aus der bei der Mehrzahl der Bakterienspezies, z. B. *E. coli,* zwei identische Tochterzellen hervorgehen. Morphologisch und funktionell unterschiedliche Tochterzellen entstehen dagegen aus der **asymmetrischen Zweiteilung**, z. B. einer gestielten Zelle von *Caulobacter crescentus* (S. 94). Einige Cyanobakterien (z. B. *Stanieria*) vermehren sich durch **multiple Spaltungen** einer großen, von einer dickwandigen Matrix umgebenen Zelle in zahlreiche kleine Tochterzellen (Baeocyten), die nachfolgend freigesetzt werden. Auch das parasitische Bakterium *Bdellovibrio bacteriovorus* vermehrt sich innerhalb der Wirtszelle durch multiple Spaltung (S. 93). Andere Bakterien vermehren sich durch **Knospung** (auch Sprossung, z. B. *Nitrobacter*), d. h. durch Bildung eines lokalen Auswuchses an der Mutterzelle, oder durch eine **ternäre Spaltung**, bei der durch die Teilung einer Zelle in drei Tochterzellen dreidimensionale Netze entstehen (*Pelodictyon*). Auch Hefen vermehren sich durch Sprossung (Sprosshefen) oder durch die Spaltung der Mutterzelle (Spalthefen, S. 157).

Die in einer Zelle zwischen zwei Zellteilungen stattfindende Folge von Ereignissen wird als **Zellzyklus** bezeichnet. In dessen Verlauf wächst eine Zelle auf etwa das Doppelte ihrer Größe an, bevor sie sich teilt. Die einzelnen Schritte der Zellteilung bei Mikroorganismen lassen sich am Besten bei einer Population untersuchen, in der sich alle Einzelzellen in derselben Zellzyklusphase befinden. Eine solche **synchrone Kultur**, die allerdings nur über wenige Generationen stabil ist, lässt sich z. B. durch Größenfiltration der Zellen oder andere äußere Einflüsse (z. B. Temperaturschock) herstellen.

Um zu gewährleisten, dass jede Tochterzelle bei der Zellteilung jeweils ein vollständiges Genom und eine ausreichende Anzahl aller sonstigen Zellbestandteile erhält, müssen Zellwachstum, Replikation und Septumbildung zeitlich und räumlich aufeinander abgestimmt werden. Diese **Koordination der Zellteilung** wird durch eine Vielzahl von Proteinen sichergestellt und erfordert die genaue **Regulation** aller am Zellteilungsprozess beteiligten Gene (*Genetik, Biochemie, Zellbiologie*). Interessanterweise zeigen Untersuchungen der Zellteilung in Bakterien, dass die beteiligten Proteine funktionell und auch strukturell den Bestandteilen des eukaryotischen Cytoskeletts sehr ähnlich sind (S. 51):

Die **Septumbildung** und damit die endgültige Teilung der Zelle wird durch **FtsZ**, ein bei Prokaryoten weit verbreitetes und hoch konserviertes Protein, eingeleitet (Abb. 7.**1**). Es lässt sich in zahlreichen Bacteria (z. B. *E. coli, Bacillus subtilis*) und auch in Archaea (z. B. *Halobacterium salinarum*) nachweisen. FtsZ sammelt sich vor der Teilung in der Zellmitte an und lagert sich dort als Z-Ring an die

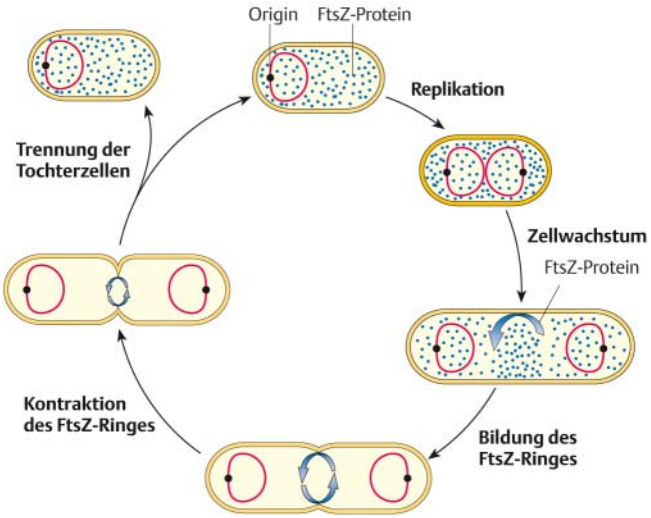


Abb. 7.1 **Septumbildung bei der Zellteilung.** Vor der Replikation des Genoms liegt der *origin of replication* an einem Zellpol. Nach der Replikation verdichtet sich das ursprünglich gleichmäßig verteilte FtsZ-Protein zu einem Ring in der Zellmitte.

Cytoplasmamembran an. Durch Einwachsen von Cytoplasmamembran, Zellwand und bei gramnegativen Bakterien auch der äußeren Membran kontrahiert sich der Z-Ring, was zur Einschnürung der Zellmitte und letztlich zur Trennung der beiden Tochterzellen führt. Röntgenstrukturanalysen zeigen die **Homologie** des prokaryotischen Proteins mit eukaryotischem Tubulin. Wie dieses besitzt auch FtsZ GTPase-Aktivität und bildet Filamente aus.

Die **Kontrolle** von Ringbildung sowie Zeitpunkt und Ort der Anlagerung erfolgt durch verschiedene Proteine, deren Wirkung sowohl stabilisierend als auch destabilisierend sein kann. In *E. coli* und in *B. subtilis* verhindern die Proteine des **Min**-Systems die Ansammlung von Z-Ringen an den Zellpolen. Das im Nucleoid lokalisierte **Noc**-Protein sorgt in *B. subtilis* dafür, dass die Anheftung des Z-Ringes an die Cytoplasmamembran in der Zellmitte erst dann stattfindet, wenn das Nucleoid sich auf die beiden Zellhälften aufgeteilt hat. Damit wird verhindert, dass eine willkürliche Septumbildung quer durch das Nucleoid erfolgt. Auch die Bildung zusätzlicher Z-Ringe in der Zelle wird durch Kontrollproteine unterdrückt. Die Aufteilung der Chromosomen nach der DNA-Replikation wird von Proteinen der **MreB**-Familie gesteuert. Diese Proteine zeigen in Röntgenstrukturanalysen deutliche Übereinstimmungen mit eukaryotischem Actin. Das Plasmid-codierte Protein **ParM** besitzt ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit mit Actin und ist an der Aufteilung von Plasmiden auf die Tochterzellen beteiligt.

Durchgehende Filamente aus **Crescentin**, die sich nur auf einer Längsseite der Zelle von *Caulobacter crescentis* befinden, sorgen beim Wildtyp für die gekrümmte Zellform, Crescentin-negative Mutanten sind stäbchenförmig. Dieses Protein hat große Ähnlichkeit mit den intermediären Filamenten eukaryotischer Zellen.

7.2.2 Wachstum bei Mikroorganismen

In ihrem natürlichen Lebensraum existieren viele Bakterien nicht als frei suspendierte Einzelzellen oder Einzelkolonien, sondern zahlreiche Zellen teilweise verschiedener Arten bilden Gemeinschaften in Form von **Biofilmen** (Abb. 7.**2c**) oder flockigen Ansammlungen (schwimmende Biofilme). Biofilme bilden sich auf allen natürlich vorkommenden Grenzflächen in wässrigen Systemen, aber auch in Wasserleitungen, Duschschläuchen oder in der Waschmitteldosierkammer einer Waschmaschine. Die Biofilmbildung kann positive oder negative Auswirkungen haben (s. u.).

In den Biofilmen sind die Mikroorganismen von einer schleimigen **Matrix** (EPS, **e**xtrazelluläre **p**olymere **S**ubstanzen, S. 438) umgeben, darin eingeschlossene anorganische Partikel sind häufig gefärbt. Dadurch sind Biofilme von Eisen oder Mangan oxidierenden Bakterien an den Einlagerungen aus Eisen- bzw. Manganoxid gut zu erkennen. Die Matrix aus Proteinen oder Exopolysacchariden schützt die Zellen vor **Austrocknung** und Angriffen von außen, ein Netzwerk von Kanälen sorgt für den Stofftransport. Mikrokonsortien aus unterschiedlichen Spezies ergänzen sich in ihren physiologischen Fähigkeiten, **komplexe Abbauprozesse** und **Biokonversionen** werden so schneller und effektiver durchgeführt als von isolierten Einzelorganismen in einer Suspension. Einzelne Zellen lösen sich aus dem Biofilm, dringen als **Schwärmer** aktiv in neue Lebensräume vor und werden dann erneut sesshaft. Ausbildung und interne Organisation eines Biofilms werden durch chemische Kommunikation gesteuert (s. u.).

▶ **Technische Anwendungen** nutzen die unterschiedlichen Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen in **Biofilmen**, beispielsweise werden **Bakterienflocken** in der biologischen Reinigungsstufe von **Kläranlagen** und bei der **Trinkwasseraufbereitung** genutzt.
Andererseits können Biofilme erhebliche technische und wirtschaftliche Schäden verursachen, z. B. durch die Verstopfung von Leitungen, durch **Korrosion** und als Bewuchs auf dem Rumpf von Schiffen. Auch bei vielen bakteriellen **Infektionen** spielen Biofilme eine entscheidende Rolle. Bei Lungenentzündungen oder Infektionen durch kontaminierte medizinische Produkte (weiche Kontaktlinsen, Katheter oder Implantate) schützt die Matrix die Bakterien vor dem Angriff phagocytierender Zellen der Immunabwehr oder durch Antibiotika. ◀

Kommunikation zwischen Mikroorganismen

Viele bakterielle Verhaltensweisen sind nur dann effektiv, wenn sie gleichzeitig von einer großen Anzahl von Bakterienzellen durchgeführt werden. Um ineffektive, Energie verschwendende Prozesse in Einzelzellen zu vermeiden, werden solche Verhaltensweisen in Abhängigkeit von der Populationsgröße reguliert. Die hierfür notwendige Koordination erfordert ein Kommunikationssystem zwischen den einzelnen Zellen einer Population. Bei vielen Mikroorganismen erfolgt diese **Kommunikation** mithilfe von spezifischen Signalmolekülen, die von jeder

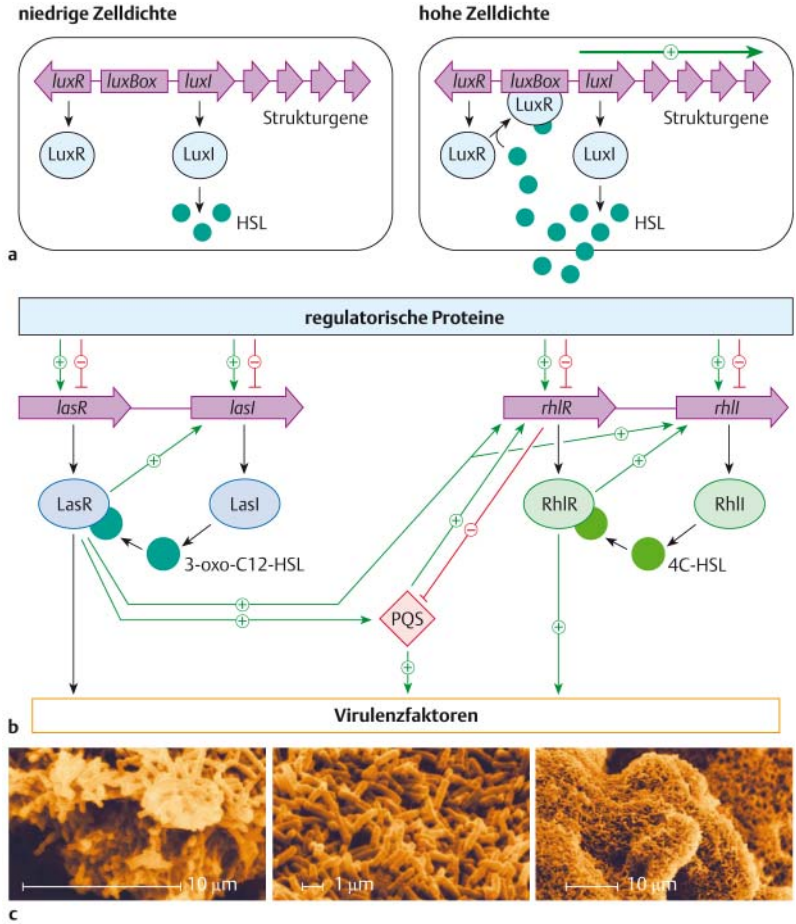


Abb. 7.2 **Quorum Sensing. a** Schematische Darstellung am Beispiel der Biolumineszenz in *Vibrio fischeri*. Bei wachsender Zelldichte erfolgt die Transkription von *luxI* (LuxI = HSL-Synthase), damit steigt die Konzentration des Signalmoleküls HSL. Der Komplex LuxR/HSL bindet spezifisch an die *lux*Box im Promotorbereich der Zielgene und induziert deren Transkription, gleichzeitig wird auch die Synthese des Signalmoleküls verstärkt. **b** Regulation der beiden Quorum-Sensing-Systeme in *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* besitzt die beiden QS-Systeme Las und Rhl, die aus den LuxR/LuxI-Homologen LasR und LasI bzw. RhlR und RhlI bestehen. LasI synthetisiert das Signalmolekül 3-oxo-C12-HSL, RhlI das Signalmolekül C4-HSL. 3-oxo-C12-HSL bindet an LasR, der so gebildete 3-oxo-C12-HSL/LasR-Komplex verstärkt die Transkription von *lasI* und damit die Synthese von 3-oxo-C12-HSL. Gleichzeitig wirkt der 3-oxo-C12-HSL/LasR-Komplex als positiver Regulator für das zweite QS-System Rhl, sodass hier eine hierarchische Regulation stattfindet. Durch

den 3-oxo-C12-HSL/LasR-Komplex wird außerdem die Synthese des extrazellulären Signalmoleküls PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) induziert. Auch PQS wirkt als positiver Regulator auf das Rhl-System und verknüpft so die beiden QS-Systeme. Die Regulation des Rhl-Systems erfolgt analog der des Las-Systems durch den RhlR/C4-HSL-Komplex. Die Komplexe LasR/3-oxo-C12-HSL, RhlR/C4-HSL sowie das Signalmolekül PQS wirken als positive Regulatoren für verschiedene Virulenzfaktoren. Beide QS-Systeme unterliegen zusätzlich der positiven bzw. negativen Kontrolle durch verschiedene Regulatorproteine in Abhängigkeit von Wachstumsphase, Umweltsignalen oder durch Alarmone. **c** EM-Aufnahme eines Biofilms von *P. aeruginosa* PAO1, aufgenommen nach 6-tägiger Inkubation in Vollnährmedium unter mikroaeroben Bedingungen (Aufnahme von M. Hasenberg, Braunschweig).

Zelle produziert und sezerniert werden. Wächst die Population, steigt entsprechend die Konzentration der Signalmoleküle. Zellen in der näheren Umgebung erhalten somit durch die frei über die bakterielle Cytoplasmamembran diffundierenden Signalmoleküle Informationen über die Anwesenheit benachbarter Zellen und deren Anzahl. Die Zelldichte, bei der die kritische Signalmolekülkonzentration erreicht wird, um eine Verhaltensänderung der gesamten Population auszulösen, bezeichnet man als **Quorum,** den gesamten Prozess als **Quorum Sensing** (engl. quorum: zur Beschlussfähigkeit erforderliche Teilnehmerzahl, to sense: fühlen, spüren). Quorum-Sensing-Systeme bestehen in der Regel aus einer Synthase und einem Rezeptor für die Signalmoleküle, die den Proteinfamilien LuxI bzw. LuxR zugeordnet werden. Die Bezeichnung Lux geht dabei zurück auf die Biolumineszenz des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* (s. u.), die über Quorum Sensing gesteuert wird. Andere QS-Systeme bestehen aus entsprechenden Homologen von LuxI und LuxR. Durch Aktivierung oder Blockierung des Quorum Sensing können Verhaltensweisen von Mikroorganismen beeinflusst werden (s. u.).

Bei **gramnegativen Bakterien** fungieren als Signalmoleküle meist **H**omo**s**erin**l**actone (HSL), häufig mit einem N-Acylrest (AHL), die sich meist nur durch die Länge der N-Acyl-Seitenkette unterscheiden und verschiedene Modifikationen an C3 aufweisen. Mit steigender Zelldichte nimmt die Konzentration des Signalmoleküls zu, das aus der Zelle in die Umgebung diffundiert und sich dort anreichert. Weil die Signalmoleküle frei durch die Cytoplasmamembran diffundieren, erhöht sich auch die intrazelluläre Konzentration. Wird in der Zelle eine bestimmte Schwellenkonzentration erreicht, bindet das Signalmolekül an ein Rezeptorprotein. Der Signalmolekül-Rezeptor-Komplex bindet direkt an DNA-Bereiche, wodurch sowohl die Expression der Signalmoleküle selbst verstärkt (**Autoinduktion**) als auch die der Zielgene induziert wird (Abb. 7.**2a**). *V. harveyi* und mehrere andere *Vibrio*-Spezies besitzen ein Zweikomponenten-System, bei dem neben einem N-Acyl-Homoserinlacton noch ein weiteres Signalmolekül sowie zwei in der Cytoplasmamembran lokalisierte Sensorkinasen beteiligt sind.

Bei **grampositiven Bakterien** sind die Signalmoleküle vorwiegend posttranslational modifizierte Peptide. Die Bindung dieser Peptide an ein Sensormolekül löst über mehrere Phosphorylierungen eine Signalkette aus, an deren Ende die Induktion der Zielgene steht.

Durch Quorum Sensing werden auch Verhaltensweisen gesteuert, die eine **Verständigung zwischen verschiedenen Spezies** voraussetzen. Tatsächlich werden in vielen Bakterien neben den artspezifischen Signalmolekülen auch solche gefunden, die über Artgrenzen hinaus erkannt werden und so als eine „internationale Sprache" fungieren.

Weitere Beispiele für Quorum Sensing: Neben der Biofilmorganisation werden auch weitere Vorgänge mithilfe des Quorum-Sensing-Systems reguliert. Entdeckt wurde Quorum Sensing (QS) Mitte der 1960er Jahre bei *Vibrio fischeri*, einem gramnegativen marinen Leuchtbakterium, das frei als Plankton lebt oder als Symbiont die Leuchtorgane verschiedener Fische und Kalmare besiedelt. Signalisiert das QS-System in den Leuchtorganen eine ausreichende Bakteriendichte, wird das **Luciferase-System** aktiviert und damit die Oxidation eines Aldehyds zum entsprechenden Alkohol katalysiert. Die dabei frei werdende Energie wird in Form von Licht emittiert. Das Leuchten (**Biolumineszenz**), das nur bei einer hohen Populationsdichte ausreichend intensiv ist, dient den Wirten zur Partnersuche, zur Abschreckung von Feinden oder zur Anlockung von Beute. Es liegt daher auch im Interesse des Wirtes, *V. fischeri* zu beherbergen und günstige Wachstumsbedingungen zu schaffen. Bei den frei lebenden *V. fischeri* tritt keine Biolumineszenz auf, für sie wäre die Aktivierung des Luciferase-Systems eine Verschwendung von Energie.

Bei **Infektionen** produzieren und sezernieren viele Erreger simultan große Mengen eines Toxins bzw. eines Exoenzyms, um zu verhindern, dass die Immunabwehr des Wirtsorganismus durch eine geringe Menge sensibilisiert und in die Lage versetzt wird, den Angriff abzuwehren. Diese Regulation von **Virulenzfaktoren** über Quorum Sensing wurde inzwischen in zahlreichen pflanzen- und humanpathogenen Bakterien nachgewiesen, darunter *Agrobacterium tumefaciens* (Tumorinduktion bei Pflanzen), *Salmonella typhi* (Typhus), *Borrelia burgdorferi* (Lyme-Borreliose), *Neisseria meningitidis* (Meningitis), *Streptococcus pneumoniae* (Lungenentzündung, Mittelohrentzündung), *Yersinia pestis* (Pest) und *Pseudomonas aeruginosa* (Wundinfektionen, insbesondere bei großflächigen Brandwunden, Nosokomialinfektionen bei abwehrgeschwächten Patienten). *P. aeruginosa* besitzt zwei QS-Systeme, die über ein komplexes Regulationsnetz miteinander verknüpft sind und zusätzlich durch weitere Faktoren kontrolliert werden, wodurch eine zielgerichtete Anpassung an äußere Bedingungen möglich wird, wie die Expression von Virulenzfaktoren oder die Biofilmbildung (Abb. 7.**2b**, **c**).

Um sich gegenüber Nahrungskonkurrenten einen Vorteil zu verschaffen, produzieren viele Bakterienspezies **Antibiotika**, gegen die sie selbst resistent sind. Auch hier findet über Quorum Sensing eine Koordination innerhalb der Population statt, um die gleichzeitige Abgabe großer Mengen des Antibiotikums in die Umgebung zu gewährleisten. In dem Pflanzen-assoziierten Bakterium *Serratia liquefaciens* werden neben der Antibiotikaproduktion auch die **Sekretion von Exoenzymen** und das Schwärmen der Zellen über Quorum Sensing gesteuert.

Die Beeinflussung der **Quorum-Sensing-Systeme** bietet zahlreiche **Anwendungsmöglichkeiten**, um unerwünschte bakterielle Verhaltensweisen zu unterbinden und erwünschte zu verstärken. Ansatzpunkte für eine solche Einflussnahme bieten die Signalmoleküle selbst oder die Rezeptoren. Maßgeschneiderte Strukturanaloga könnten Enzyme der Signalmolekül-Synthese inaktivieren oder Rezeptoren blockieren, um z. B. bei einer Infektion die Ausschüttung eines Toxins zu verhindern. Im Unterschied zur konventionellen Antibiotikatherapie werden durch **Quorum-Sensing-Blocker** keine essentiellen Stoffwechselprozesse der Bakterien beein-

trächtigt, sodass kein Selektionsdruck entsteht und daher auch keine Resistenzbildung zu erwarten ist. In biotechnologischen Anlagen könnte durch die **Aktivierung von Quorum-Sensing-Systemen** über die Zugabe künstlicher Signalmoleküle die Produktion von Antibiotika, Exoenzymen oder anderen Stoffwechselprodukten gesteigert werden.
Sowohl in Bakterien als auch in verschiedenen Pflanzen, Pilzen und auch bei einigen Tieren wurden inzwischen Substanzen nachgewiesen, die mit bakteriellen QS-Systemen interagieren: Als **natürliche QS-Blocker** wirken z. B. halogenierte Furanone der Alge *Delisea pulchra*. Für eine therapeutische Anwendung sind sie allerdings nicht geeignet, da sie cytotoxisch und zudem chemisch instabil sind. Knoblauchextrakt hat sich beim Screening von natürlichen QS-Blockern als besonders effektiv gegen die Ausprägung von Virulenzfaktoren erwiesen, bei *Pseudomonas aeruginosa* konnte er zudem die Biofilmbildung verhindern. ◀

Wachstumsparameter

In einer Population von Mikroorganismen, in der sich alle Zellen kontinuierlich teilen, steigt die Zellzahl exponentiell an und die Vermehrung entspricht einer geometrischen Reihe. Die Geschwindigkeit des Wachstums kann durch verschiedene Parameter definiert werden: Die **Teilungsrate** (**ν**) gibt die Anzahl der Zellteilungen pro Stunde an, die **Wachstumsrate** (**μ**) die Zunahme von Zellzahl oder Zellmasse pro Zeiteinheit. Wird das Wachstum durch ein bestimmtes Substrat limitiert, wächst eine Population mit ihrer **spezifischen Wachstumsrate**. Unter optimalen Wachstumsbedingungen kann ein Mikroorganismus seine **maximale spezifische Wachstumsrate** erreichen, sie wird nur von den Eigenschaften des Mikroorganismus und der Temperatur begrenzt. Die **Generationszeit** (**g**) entspricht der Zeit, die eine Zelle oder eine Population zur Verdopplung ihrer Zellzahl benötigt, die **Verdopplungszeit** ($\mathbf{t_d}$) ist die Zeit, in der die Zellmasse verdoppelt wird.

Wachstumsphasen

Im Labor werden Mikroorganismen häufig in flüssigem Medium kultiviert. Wird eine Kulturflasche angeimpft und kultiviert, ohne dass frisches Medium zugegeben oder Kulturflüssigkeit entnommen wird (statische Kultur, S. 290), verlaufen Wachstum und Vermehrung der Mikroorganismen in mehreren aufeinanderfolgenden **Wachstumsphasen**, in denen sich Zellzustand und Wachstumsgeschwindigkeit verändern (Abb. 7.**3a**). Die Dauer der Anlauf- oder **lag-Phase** (lag: Verzögerung), in der sich die Zellen an die neue Umgebung anpassen, hängt vom Zustand der zum Animpfen verwendeten Zellen und vom Ausmaß der Veränderung der Wachstumsbedingungen ab. Zu einer deutlichen lag-Phase kommt es z. B. dann, wenn die angeimpften Zellen ihr Wachstum in der vorherigen Kultur bereits eingestellt hatten. Diese Zellen müssen sich erst durch die Aktivierung der entsprechenden Gene auf die neuen Wachstumsbedingungen einstellen (Kap. 10, 🕮 *Genetik*). Werden dagegen Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur (s. u.) zum Animpfen verwendet und die Wachstumsbedin-

gungen beibehalten, kann die lag-Phase sehr kurz sein oder völlig entfallen. Am Ende der lag-Phase durchlaufen die Zellen eine kurze **Beschleunigungsphase**, in der die Wachstumsrate ansteigt. In der anschließenden **exponentiellen Phase** (**log-Phase**) wächst die Population exponentiell mit der unter den gegebenen Wachstumsbedingungen maximal erreichbaren Wachstumsrate. Sie bleibt so lange konstant, bis ein Substrat limitierend wird oder sich ein hemmendes Stoffwechselprodukt anhäuft (*Biochemie, Zellbiologie*, *Genetik*). Während der dann folgenden **Übergangsphase** sinkt die Wachstumsrate allmählich ab, bis kein Wachstum mehr stattfindet und die Population die **stationäre Phase** erreicht, in der Zellzahl und Zellmasse konstant bleiben. In der stationären Phase können die Zellen Speicherstoffe als Energiereserven nutzen.

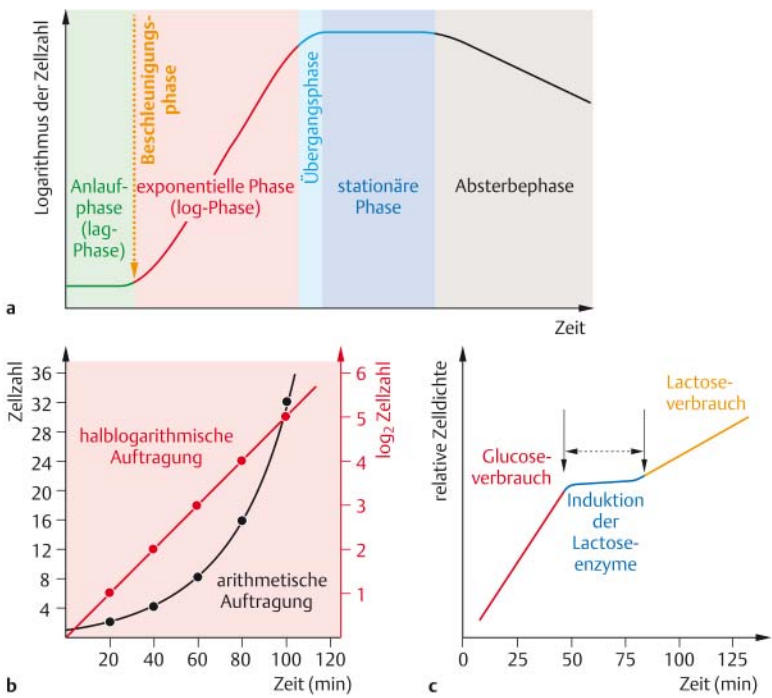


Abb. 7.3 **Wachstum. a** Wachstumsphasen einer statischen Kultur. **b** Exponentielles Wachstum in arithmetischer und halblogarithmischer Auftragung. Bei halblogarithmischer Auftragung (dualer Logarithmus der Zellzahl gegen die Zeit) erhält man eine Gerade, deren Steigung der Verdopplungszeit entspricht. **c** Diauxie bei Wachstum auf Glucose/Lactose.

Beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase sorgen spezielle Regulationsmechanismen für **Änderungen des Stoffwechsels** der Zellen: Während in der exponentiellen Phase der Stoffwechsel auf Energiegewinnung und den Aufbau von Zellsubstanz ausgerichtet ist, werden in der stationären Phase häufig spezielle Sekundärstoffwechselprodukte wie Antibiotika (S. 562) oder Exopolysaccharide (S. 438) synthetisiert, die vorrangig dem Schutz der Zellen dienen. Dabei wird die Transkription bestimmter Gene eingestellt, andere werden ausschließlich in der stationären Phase abgelesen (📖*Genetik*).

Bei *E. coli* wird während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase die Zusammensetzung von Cytoplasmamembran, Mureinschicht und äußerer Membran verändert. In die Cytoplasmamembran werden mehr Cyclopropan-Fettsäuren anstelle von ungesättigten Fettsäuren eingebaut, was zu einer verminderten Durchlässigkeit für Protonen und so zu einer höheren Säuretoleranz führt. Zur Verbesserung der mechanischen Stabilität wird die Anzahl der Peptidoglykanschichten auf 4–5 erhöht und vermehrt Lipoproteine zwischen äußerer Membran und Peptidoglykan (S. 30) eingebaut. Auch die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran verändert sich, weil z. B. viele Transportsysteme für Nährstoffe nicht mehr benötigt werden.

Bei endosporenbildenden Bacteria setzt in der stationären Phase die Sporulation ein (S. 493).

Auch mikroskopisch lassen sich Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase deutlich von Zellen unterscheiden, die sich in der stationären Phase befinden.

Wenn die Energiereserven vollständig aufgebraucht sind, beginnt die **Absterbephase**, in der die Lebendzellzahl exponentiell abnimmt.

Mit einer **Wachstumskurve** lassen sich die einzelnen Wachstumsphasen grafisch darstellen und verschiedene Wachstumsparameter ermitteln. Aufgetragen wird die Zellzahl oder -masse gegen die Zeit (Abb. 7.**3a, b**).

Enthält das Nährmedium zwei verschiedene Energiesubstrate, von denen eines bevorzugt metabolisiert wird, zeigt die Wachstumskurve ein **zweistufiges Wachstum**, das als **Diauxie** bezeichnet wird. In einem Medium mit Glucose und Lactose verbrauchen z. B. *E. coli*-Zellen nach Eintritt in die erste exponentielle Phase zunächst nur die Glucose, die über das energetisch günstigere Phosphotransferase-System (S. 399) aufgenommen wird und den Zellen ein schnelleres Wachstum ermöglicht. In dieser Wachstumsphase wird die Aufnahme von Lactose in die Zellen unterdrückt und die Gene der für den Lactoseabbau benötigten Enzyme werden reprimiert (Katabolitrepression, 📖*Genetik*). Nach Verbrauch der Glucose sinkt die Wachstumsrate, während im Verlauf einer zweiten lag-Phase die Gene für die Lactoseverwertung induziert werden. Anschließend wächst die Population erneut exponentiell, bis auch die Lactose verbraucht ist. Die Verdopplungszeiten in den beiden exponentiellen Phasen sind unterschiedlich (Abb. 7.**3c**).

7.2.3 Messung des Wachstums

Das Wachstum einer Bakterienpopulation wird mit verschiedenen Methoden gemessen: **Direkte Methoden** sind die Bestimmung der Zellzahl oder der Zellmasse durch Auszählen bzw. Wiegen, eine **indirekte** ist die Trübungsmessung

über die Änderung der optischen Dichte (S. 275). Die Wahl der Methode hängt von den Eigenschaften der untersuchten Mikroorganismen und der jeweiligen Fragestellung ab. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Genauigkeit der Methoden von der Populationsgröße abhängt. Die Zelltrockenmasse kann nur bei dicht gewachsenen Zellsuspensionen zuverlässig ausgewogen werden, während die Messung der Bakterientrübung bei hohen Zelldichten, d. h. Messwerten über 0,5, ungenau wird. Da die direkten Methoden zeitaufwändiger sind, wird für Routinemessungen des Wachstums meist die **Bestimmung der optischen Dichte** verwendet (s. u.).

Bestimmung der Zellzahl

Bei der Bestimmung der Zellzahl unterscheidet man zwischen Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl: Die Gesamtzellzahl erfasst alle in einer Probe vorhandenen Zellen unabhängig von Vitalitätszustand und Vermehrungsfähigkeit, während die Lebendzellzahl nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

Eine Methode zur Bestimmung der **Gesamtzellzahl** ist die mikroskopische Auszählung eines definierten Volumens in einer **Zählkammer**: Für die Zählung von größeren Zellen wie Hefen, Protozoen oder Erythrocyten verwendet man Zählkammern mit 0,1 mm Tiefe (Thoma-Kammer), für die kleineren Bakterienzellen Kammern mit 0,02 mm Tiefe (Helber-Kammer), damit keine Zellen übereinander liegen können, die dann beim Zählen nicht berücksichtigt werden (Abb. 7.**4**).

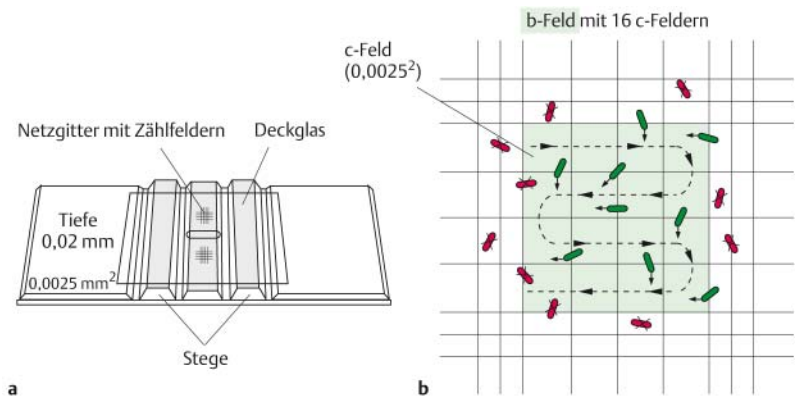


Abb. 7.**4** **Zählkammer. a** Gesamtansicht. **b** Ausschnitt. Ein Zählfeld ist 1 mm² groß und besteht aus 25 b-Feldern mit jeweils 16 c-Feldern. Um Doppelzählungen von Zellen auf den Begrenzungslinien zu vermeiden, werden pro c-Feld nur die Zellen mitgezählt, die auf der jeweils rechten und oberen Begrenzungslinie liegen. Die Auszählung erfolgt entlang der gestrichelten Linie. Nach Auszählung mehrerer b-Felder wird die durchschnittliche Zellzahl für ein c-Feld ermittelt und auf 1 ml hochgerechnet. Falls die Bakteriensuspension vor der Auszählung verdünnt wurde, ist der entsprechende Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen.

Eine alternative Methode insbesondere für **größere Einzeller** ist die automatische Auszählung in einem elektronischen Partikelzählgerät (z. B. **Coulter Counter**). Das Gerät besteht aus zwei mit einer Elektrolytlösung gefüllten, durch eine schmale Kapillaröffnung verbundenen Räumen, in denen sich jeweils eine Elektrode befindet. Fließt zwischen den beiden Elektroden ein Strom, wird durch die Kapillaröffnung ein elektrischer Widerstand erzeugt. Zur Bestimmung der Zellzahl suspendiert man die Zellen in Elektrolytlösung und lässt ein definiertes, sehr kleines Volumen der Suspension die Kapillaröffnung durchfließen. Der Durchtritt einer Zelle durch die Öffnung erhöht kurzzeitig den elektrischen Widerstand und erzeugt einen Spannungsimpuls, der durch das Gerät registriert wird. Die Anzahl der Impulse entspricht der Zahl der passierenden Zellen. Für die Genauigkeit dieser Messmethode muss sichergestellt werden, dass jeweils nur eine Zelle die Kapillaröffnung passiert. Für die Zählung von Bakterienzellen ist das Verfahren weniger gut geeignet, denn wegen der geringen Größe von Bakterien muss die Kapillaröffnung so klein sein, dass die Messung durch Blasenbildung oder Verstopfung der Kapillare gestört wird.

Bei der Zellzahlbestimmung in flüssigen Proben mit sehr **geringer Zellkonzentration**, z. B. Wasserproben, müssen die Zellen zunächst konzentriert werden, um ein aussagefähiges Zählergebnis zu erhalten. Dazu filtriert man ein bestimmtes Volumen der Probe durch einen **Membranfilter** mit geeigneter Porengröße. Anschließend wird der Filter getrocknet, die Zellen angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Alternativ kann man den Filter direkt nach der Filtration auf eine Petrischale mit einem geeigneten Nährboden auflegen, bebrüten und die gewachsenen Kolonien auszählen. In diesem Fall erhält man nicht die Gesamtzellzahl der Probe, sondern die Lebendzellzahl (s. u.).

Die **Lebendzellzahl** gibt die Anzahl der lebenden Zellen in einer Probe an. Dabei ist die Definition „lebend" nicht eindeutig, weil je nach Bestimmungsmethode entweder alle stoffwechselaktiven Zellen oder nur alle vermehrungsfähigen Zellen erfasst werden. **Stoffwechselaktive Zellen** können durch **Vitalfarbstoffe** sichtbar gemacht werden. Diese Substanzen werden in den Zellen durch Stoffwechselprozesse chemisch modifiziert, verändern ihre Farbe oder beginnen zu fluoreszieren. Die stoffwechselaktiven Zellen können anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

Die **vermehrungsfähigen Zellen** aus einer Probe werden durch **Ausplattierungsverfahren,** wie das Spatelplattenverfahren oder das Plattengussverfahren, in Kultur gebracht und anschließend gewachsene Kolonien ausgezählt (Abb. 7.**5**). Dabei wird vorausgesetzt, dass aus jeder Zelle eine Kolonie hervorgeht. Hierin liegt eine entscheidende Schwäche dieser Methode zur Zellzahlbestimmung, da die Zusammensetzung des Mediums und die Inkubationsbedingungen die tatsächliche Koloniebildung beeinflussen und daher selektiv wirken. Aus diesem Grund eignen sich die Ausplattierungsverfahren nicht für die Auszählung von Mischpopulationen. Auch Proben von Zellen, die zur Bildung von Zellverbänden neigen, werden meist zu niedrig ausgezählt. Das **Spatelplattenverfahren** ist für die Zählung **aerober Bakterien** geeignet. Dazu wird eine geringe Menge der zu bestimmenden Bakteriensuspension mit einem Drigalski-Spatel (Abb. 7.**8b**) gleichmäßig auf der

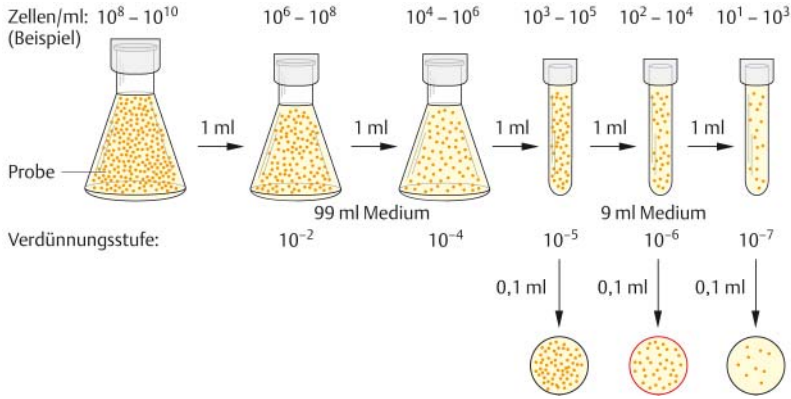


Abb. 7.**5** **Lebendzellzahlbestimmung.** Von der zu untersuchenden Probe wird eine Verdünnungsreihe angelegt und je 0,1 ml der drei letzten Verdünnungsstufen mit einem Drigalski-Spatel auf einer Agarplatte ausgespatelt. Aus der Zahl der gewachsenen Kolonien wird durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen in der Probe berechnet. Bei der Verdünnungsstufe von 10^{-6} (rot markiert) sind etwa 35 Kolonien gewachsen. Daraus errechnet sich für die Ausgangslösung eine Zelldichte von $35 \times 10^6 \times 10 = 3{,}5 \times 10^8$ Zellen/ml. In der Praxis werden mehrere Platten ausgezählt und ein Mittelwert ermittelt.

Agaroberfläche in einer Petri-Schale verteilt. Da die Zelldichte der Ausgangskultur in der Regel zu hoch zum direkten Ausplattieren ist, wird die Probe unter sterilen Bedingungen so verdünnt, dass man auf mindestens einer der letzten Verdünnungsstufen zählbare Einzelkulturen erhält (Abb. 7.**5**).

Die Auszählung der gewachsenen Kolonien erfolgt möglichst auf kontrastfarbenen Unterlagen und bei günstiger Beleuchtung. Gezählt wird entweder durch Markieren der Kolonien auf der Plattenunterseite oder mithilfe eines Handzählers.

Bei dem von Robert Koch entwickelten **Koch'schen Plattengussverfahren** werden die Bakterienproben in flüssigem, 45° warmem Nähragar suspendiert, der anschließend zum Erstarren in ein Kulturgefäß, z. B. eine Petri-Schale oder Glasröhrchen, ausgegossen und bebrütet wird. Dieses Verfahren eignet sich vor allem für **fakultativ anaerobe**, **aerotolerante Mikroorganismen** und wenig empfindliche Anaerobier. Die Bebrütung erfolgt abhängig von Sauerstoffbedarf oder Sauerstoffempfindlichkeit der Mikroorganismen an der Luft oder in einem Anaerobentopf. Sollen **strikte Anaerobier** ausgezählt werden, verwendet man Glasröhrchen und sorgt für eine sauerstofffreie Gasphase (**Hochschichtröhrchen**). Nachteil der Plattengussverfahren ist die kurzfristige Hitzebelastung der Zellen, die nicht von allen Bakterien toleriert wird. Auch sind die Wachstumsbedingungen wegen der ungleichmäßigen Verteilung der Zellen im bzw. auf dem Agar nicht für alle Zellen gleich. Auf dem Prinzip des Plattengussverfahrens

beruht auch der **Plaque-Test**, der zur Auszählung von Bakteriophagen verwendet wird (S. 136).

Bestimmung der Zellmasse

Die **Zellmasse** bezeichnet das Gewicht der gebildeten Zellsubstanz in einem bestimmten Volumen. Sie wird als Feuchtmasse oder Trockenmasse angegeben. In beiden Fällen werden die Zellen zunächst durch Zentrifugation oder Filtration von der Nährlösung abgetrennt, die verwendeten Zentrifugenröhrchen bzw. Filter zuvor gewogen. Die **Feuchtmasse** (auch Feucht- oder Frischgewicht) wird unmittelbar nach der Ernte der Zellen ausgewogen, zur Bestimmung der **Trockenmasse** (auch Trockengewicht) werden die Zellen über Nacht bei 80 °C getrocknet und erst dann gewogen. Abhängig von der in der Probe enthaltenen Restflüssigkeit schwankt der Wert der Feuchtmasse stark. Daher wird für quantitative Untersuchungen wie die Bestimmung von Zellerträgen oder Stoffwechselaktivitäten üblicherweise die Trockenmasse als Bezugsgröße verwendet. Alternativ kann auch eine chemische Komponente bestimmt werden, die während des Wachstums einen gleich bleibenden, relativ großen Anteil der Zellmasse ausmacht, z. B. Protein. Das Prinzip dieser Nachweismethoden ist die chemische Umsetzung des gesamten Proteins der Zellen zu einer farbigen Verbindung, deren Extinktion photometrisch gemessen werden kann. Für die Auswertung wird mit einer Proteinlösung bekannter Konzentration eine Eichkurve erstellt.

Trübungsmessung

Die ansteigende **Zelldichte** einer wachsenden Bakterienpopulation in Flüssigkultur führt zu einer zunehmenden **Trübung** der Suspension (s. Abb. 7.**7**), die in einem bestimmten Bereich proportional zur Zelldichte ist (s. o.). Sie kann daher zur indirekten Bestimmung der Zellmasse genutzt werden. Dazu wird ein bekanntes Volumen der Zellsuspension bzw. einer geeigneten Verdünnung in eine Küvette gegeben und im Strahlengang eines Photometers die optische Dichte gemessen. Gemessen wird entweder die Intensitätsabnahme der Primärstrahlung (**Turbidimetrie**) oder, seltener, die Intensität des Streulichtes (**Nephelometrie**). Die Wahl der Wellenlänge ist abhängig vom verwendeten Photometer, der eventuellen Extinktion der Suspensionslösung und der Zelldichte. Für die Auswertung ist die Erstellung einer Eichkurve für den jeweils untersuchten Mikroorganismus notwendig. Dabei müssen die verwendete Suspensionslösung und die Wachstumsbedingungen identisch mit denen des späteren Wachstumsversuchs sein.

Um die erhaltenen Werte direkt in die entsprechende Zelltrockenmasse umrechnen zu können, muss die **Korrelation** zwischen optischer Dichte und Zelltrockenmasse für den untersuchten Mikroorganismus bestimmt werden. Nur für den **linearen Bereich** kann eine direkte Umrechnung erfolgen. Entsprechendes gilt für die Korrelation von optischer Dichte und Gesamtzellzahl.

Wird in jeder Probe gleichzeitig der **Verbrauch eines bestimmten Substrates** gemessen, können aus den ermittelten Werten die pro Mol dieses Substrates gebildete Zelltrockenmasse und für Energiesubstrate entsprechend auch die ATP-Ausbeute berechnet werden; die quantitative Bestimmung von Zwischen- und Endprodukten ermöglicht Rückschlüsse auf Stoffwechselwege. Für diese Messungen verwendet man in der Regel enzymatische Testsysteme, die mit der Bildung bzw. dem Verbrauch von NAD(P)H verknüpft sind. Die daraus resultierende Extinktionsänderung lässt sich photometrisch messen (*Biochemie/Zellbiologie*).

Störfaktoren: Während des Wachstums können sich Faktoren ändern, die die optische Dichte beeinflussen, insbesondere Durchmesser, Gestalt und Brechungsindex der streuenden Teilchen. Auch die Produktion von Speicherstoffen oder Schleim sowie die Bildung von Sporen beeinflussen die optische Dichte, ohne dass tatsächlich eine Veränderung der Zellmasse stattfindet.

Wachstum: Irreversible Zunahme der Zellmasse, führt bei Mikroorganismen zu Zellteilung und Vermehrung.

Zellteilungsformen bei Mikroorganismen:

- **Binäre Querteilung:** Entstehung von zwei identischen Tochterzellen (symmetrisch) oder Entstehung von zwei unterschiedlichen Tochterzellen (asymmetrisch).
- **Multiple Spaltung:** Entstehung von zahlreichen Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle und nachfolgende Freisetzung.
- **Knospung:** Entstehung der Tochterzelle aus lokalem Auswuchs an der Mutterzelle.
- **Ternäre Spaltung:** Entstehung dreidimensionaler Netze durch Teilung der Mutterzelle in drei Tochterzellen.

Zellzyklus: Zwischen zwei Zellteilungen in einer Zelle ablaufende Folge von Ereignissen.

Biofilm: Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen einer oder verschiedener Arten auf Grenzflächen in wässrigen Systemen. Matrix aus Exopolysacchariden schützt die Zellen, unterschiedliche Arten ergänzen sich in ihren physiologischen Fähigkeiten.

Quorum Sensing: Über Signalmoleküle gesteuerte Kommunikation zwischen den Einzelzellen einer Gemeinschaft von Mikroorganismen. Die Überschreitung der kritischen Signalmolekül-Konzentration führt zur Verhaltensänderung aller Zellen.

- **Signalmoleküle:** Bei Gramnegativen Homoserinlactone (HSL), bei Grampositiven posttranslational modifizierte Peptide.

Teilungsrate: Anzahl der Zellteilungen pro Stunde.

Wachstumsrate: Zunahme der Zellzahl oder -masse pro Zeiteinheit.

- **Spezifische W.:** Zunahme unter Limitierung durch ein Substrat.
- **Maximale spezifische W.:** Zunahme unter optimalen Wachstumsbedingungen.

Generationszeit: Zeitraum, in dem sich die Zellzahl verdoppelt.

Verdopplungszeit: Zeitdraum, in dem sich die Zellmasse verdoppelt.

Wachstumsphasen einer statischen Kultur:
- **Lag-Phase, Anlaufphase:** Anpassung der Zellen an die neue Umgebung.
- **Beschleunigungsphase:** Anstieg der Wachstumsrate bis zum exponentiellen Wachstum.
- **Log-Phase, exponentielle Phase:** Wachstum mit konstanter, unter den gegebenen Bedingungen maximaler, Wachstumsrate.
- **Übergangsphase:** Absinken der Wachstumsrate, Beendigung des exponentiellen Wachstums.
- **Stationäre Phase:** Zellzahl und -masse bleiben konstant. Nutzung von Speicherstoffen als Energiereserve.
- **Absterbephase:** Exponentielle Abnahme der Lebendzellzahl nach Verbrauch der Energiereserven.

Wachstumskurve: Grafische Darstellung des Wachstumsverlaufs einer statischen Kultur. Aufgetragen wird die Zellzahl oder -masse gegen die Zeit.
Diauxie: Zweiphasiges Wachstum einer Kultur bei Vorhandensein von zwei Energiesubstraten, von denen eines bevorzugt metabolisiert wird.
Zellmasse: Gewicht der gebildeten Zellsubstanz in einem bestimmten Volumen.
Feuchtmasse: Gewicht der Zellmasse nach Abtrennung vom Medium.
Trockenmasse: Gewicht der Zellmasse nach Abtrennung vom Medium und Wasserentzug.

7.3 Sicherheit im Umgang mit Mikroorganismen

Abhängig vom gewünschten Grad der Entkeimung und der Empfindlichkeit der eingesetzten Materialien werden unterschiedliche Verfahren der **Desinfektion** und der **Sterilisation** angewendet. Bei der Desinfektion werden pathogene Mikroorganismen durch verschiedene physikalische oder chemische Methoden abgetötet oder inaktiviert. Die **Pasteurisierung** ist eine Teilentkeimung, es werden nur vegetative Zellen und keine Dauerformen abgetötet. Bei der Sterilisation werden alle vorhandenen Mikroorganismen, ihre Dauerformen sowie Viren und Nucleinsäurefragmente durch Hitze, Dampf, Strahlen, Chemikalien oder Filtration abgetötet oder inaktiviert. Die **Tyndallisierung** ist eine fraktionierte Sterilisation zur Abtötung von Sporen. Beim Umgang mit Mikroorganismen müssen bestimmte, gesetzlich festgelegte **Sicherheitsbestimmungen** beachtet werden, die der Einstufung des jeweiligen Mikroorganismus in eine von vier Sicherheitsstufen entsprechen.

Mikroorganismen verfügen über ein so großes Spektrum an physiologischen Fähigkeiten, dass sie praktisch alle belebten und unbelebten Bereiche unserer Umwelt besiedeln und auch durch sie verbreitet werden können. Um die Übertragung von pathogenen Organismen zu vermeiden, werden insbesondere bei der Herstellung und Verarbeitung von **Lebensmitteln**, die wegen ihres hohen

Nährstoffgehaltes meist besonders günstige Wachstumsbedingungen bieten, strikte Hygieneregeln angewendet. Trinkwasser und andere Produkte werden durch geeignete Methoden keimfrei oder zumindest keimarm gemacht. Im **Labor** oder in **industriellen Produktionsanlagen** können mikrobielle Verunreinigungen die Ergebnisse aufwendiger Versuchsreihen zunichte machen oder komplette Produktionschargen verderben. Hier dienen Sicherheitsvorkehrungen nicht nur dem Schutz von Mensch und Tier vor schädlichen Mikroorganismen, sondern auch der Qualitätssicherung.

7.3.1 Sterilisation und Desinfektion

Erst im Jahr 1861 widerlegte der französische Chemiker Louis Pasteur (1822–1895) die bis dahin anerkannte **Urzeugungstheorie**, nach der Kleinstlebewesen in geeigneter Umgebung spontan entstehen sollten. **Pasteur** füllte einen Glaskolben mit Nährlösung, zog dann den Hals des Kolbens in Form eines Schwanenhalses aus und sterilisierte die Nährlösung durch Erhitzen. Solange der Kolben weder gekippt noch zerbrochen wurde, erfolgte in der Nährlösung über Jahre kein Wachstum, obwohl die Öffnung des Schwanenhalses nicht verschlossen war, sodass ein Luftaustausch stattfand. John **Tyndall** (1820–1893), irischer Physiker und Zeitgenosse Pasteurs, beobachtete, dass Fleisch- oder Gemüsebrühen durch fünfminütiges Kochen sterilisiert werden konnten, für einen Aufguss von trockenem Heu jedoch Kochen über mehr als fünf Stunden nicht ausreichten. Tyndall erkannte, dass in dem Heuaufguss vorhandene **hitzeresistente Formen** durch einmaliges Kochen nicht abgetötet werden. Er entwickelte daraufhin eine Sterilisationsmethode, die nach ihm als **Tyndallisieren** bezeichnet und heute noch angewendet wird (s. u.).

Die wachsenden Kenntnisse über die mikrobielle Ursache zahlreicher Krankheiten, über neue oder sich verändernde Krankheitserreger und die zunehmenden Hygieneansprüche führten zur Entwicklung sehr unterschiedlicher Desinfektions- und Sterilisationsmethoden, die ständig den neuen Anforderungen angepasst werden.

Durch **Desinfektion** (Tab. 7.**3**) werden **gezielt pathogene Mikroorganismen** und Fäulniserreger auf Oberflächen, Gegenständen oder lebendem Gewebe abgetötet oder inaktiviert, um das Infektionsrisiko für Menschen und Tiere zu minimieren. Das behandelte Material ist anschließend keimarm. Desinfiziert wird mit verschiedenen **physikalischen oder chemischen Methoden**, dazu gehören UV-Strahlen und der Einsatz verschiedener chemischer Desinfektionsmittel, z. T. in Verbindung mit feuchter Hitze. Welche Verfahren am besten geeignet sind, hängt vom jeweiligen Anwendungsbereich ab. Flüssige Desinfektionsmittel, die als Wirkstoffe Alkohole, Aldehyde, Phenole, Oxidationsmittel oder Halogene enthalten, werden zur Hände-, Geräte- und Flächendesinfektion verwendet, Formaldehydgas für die Raumdesinfektion und für kontaminierte Sicherheitswerkbänke. UV-Strahler werden meist über Nacht zur Desinfektion von Räumen

Tab. 7.3 **Desinfektionsverfahren und ihre Anwendungsbereiche.**

Verfahrensart	*Methode*	*Anwendungsbereiche*
physikalisch-thermisch	Heißwasser (80–100 °C), strömender Dampf (100 °C, 10–30 min), Niederdruckdampf (105 °C, 1–15 min)	Leitungen, Gefäße, Wäsche, Matratzen, Decken, Lebensmittel, im Krankenhaus auch für Spülmaschinen, Instrumente, Laborglas und zahlreiche Gebrauchsgegenstände
physikalisch (nicht-thermisch)	UV-Strahlen	Raumluft, Oberflächen
chemisch	Alkohole, Aldehyde, Phenole, Oxidantien, Halogene, Tenside, Chlorhexidin, Schwermetalle	Haut, Schleimhäute, Hände, Flächen, Instrumente, Trink- und Badewasser, Wäsche, Geräte
chemisch-thermisch	Kombination von feuchter Hitze (40–60 °C) und chemischen Desinfektionsmitteln (in der Regel in Desinfektionsautomaten)	hauptsächlich für maschinelle Aufbereitung flexibler Endoskope

eingesetzt. In speziellen **Desinfektionsautomaten** können hitzeempfindliche Geräte mit einer Kombination aus feuchter Hitze bei niedriger Temperatur (40–60 °C) und einem chemischen Desinfektionsmittel behandelt werden.

Das nach Pasteur benannte **Pasteurisieren** stellt eine **Teilentkeimung** dar. Bei diesem Verfahren werden meist flüssige Lebensmittel **kurzzeitig erhitzt**. Dabei werden die meisten **hitzeempfindlichen Mikroorganismen** abgetötet, nicht jedoch Sporen. Man unterscheidet verschiedene Pasteurisierungsarten, meist kommt die Kurzerhitzung für 15–30 Sekunden auf 72–75 °C oder die Hocherhitzung auf 85 °C für 4–20 Sekunden zur Anwendung, um Geschmack und Inhaltsstoffe möglichst nicht zu beeinträchtigen.

Sterilisation (Tab. 7.4) umfasst die **vollständige Abtötung bzw. Inaktivierung sämtlicher vorhandener Mikroorganismen** und ihrer Dauerformen sowie die Inaktivierung von Viren und Nucleinsäuren auf Oberflächen, an Gegenständen und lebenden Geweben. Sterilisation ist ein Alles-oder-Nichts-Prozess, sterile Materialien sind absolut keimfrei. Auch hier gibt es verschiedene physikalische (Hitze, Filtration, γ-, β-Strahlen, Mikrowellen) und chemische Methoden. Die **Hitzesterilisation** durch trockene Hitze ist nur für sehr hitzestabile Materialien geeignet. Die **Dampfsterilisation** (feuchte Hitze) wird üblicherweise in einem **Autoklaven** durchgeführt. Unter diesen Bedingungen werden auch Sporen abgetötet.

Das **Prinzip des Autoklaven** entspricht dem eines Dampfkochtopfes: In der durch einen dichten Deckel verschlossenen Sterilisierkammer wird durch Erhitzen von Wasser bei Überdruck Wasserdampf erzeugt, der das Sterilisiergut durchströmt. Temperatur und Druck werden mithilfe eines Thermometers und eines Manometers kontrolliert, ein Sicherheitsventil verhindert zu starkes Ansteigen des Innendrucks. Die Ummantelung kann ein- oder doppelwandig sein.

Tab. 7.4 **Sterilisationsmethoden und ihre Anwendungsbereiche.**

Verfahrensart	*Methode*	*Anwendungsbereiche*
Hitzesterilisation	trockene Hitze (160–200 °C, 30–180 min)	Geräte aus Glas, Metall, Keramik, Teflon
Dampfsterilisation	feuchte Hitze (Autoklavieren: 121 °C, 2 bar, 15–30 min; 134 °C, 3 bar, 5–20 min)	Lösungen, Nährmedien, Gummi, einige Kunststoffe, infektiöses Material
Gassterilisation	Ethylenoxid, Formaldehyd	Kunststoff-Einwegmaterial, Räume
Strahlensterilisation	ionisierende Strahlen	hitzeempfindliches Material (medizinisches Verbrauchsmaterial, Kunststoff-Einwegmaterial, Lebensmittel), sterile Werkbänke, Raumluft
Sterilfiltration	Filtration durch Filter mit einer Porengröße von nominal 0,2 µm, für Mycoplasmen 0,1 µm, für Viren 0,02–0,05 µm	Impfstoffe, Seren, andere hitzelabile Lösungen, z. B. Vitamine, Gase
Plasmasterilisation	Wasserstoffperoxid-Plasma	hitzelabile und feuchtigkeitsempfindliche Materialien (z. B. Instrumente)

Bei der **fraktionierten Sterilisationsmethode**, dem **Tyndallisieren**, wird das zu behandelnde Gut zwei bis viermal auf eine Temperatur von 70 bis maximal 100 °C gebracht. Zwischen den einzelnen Erhitzungsperioden wird jeweils für 16–24 h bei 15–30 °C bebrütet. In dieser Zeit **auskeimende Sporen** werden während der nachfolgenden Heißphase wirksam abgetötet. Das Verfahren ist aufwändig und wird z. B. in der Pharmazeutik eingesetzt, wenn von sporenhaltigen Produkten ausgegangen werden muss, die keinen höheren Temperaturen ausgesetzt werden können.

Für **andere hitzeempfindliche Materialien** stehen verschiedene alternative Methoden zur Verfügung. Für thermolabile Lösungen und für Gase wird meist die **Sterilfiltration** angewendet, ihre Wirksamkeit ist jedoch abhängig von der Porengröße der verwendeten Filter im Verhältnis zum Durchmesser der abzutrennenden Mikroorganismen. Für die Abscheidung von Viren werden Filter mit einer Porengröße von 0,02–0,05 µm benutzt und die Sterilfiltration zur Sicherheit meist in Kombination mit anderen Methoden angewendet, für Nucleinsäurefragmente stehen absorptive Filtrationsverfahren zur Verfügung.

Die **Strahlensterilisation** mit ionisierenden Strahlen wird industriell für die Sterilisation wärmeempfindlicher Güter eingesetzt. Die chemische Sterilisation (**Gassterilisation**) mit mikrobioziden Gasen wie Ethylenoxid oder Formaldehyd in einem geschlossenen Raum wird nur für hitzelabile Gegenstände angewendet, vor allem Medizinprodukte. Nachteil ist die hohe Toxizität der eingesetzten Gase, insbesondere von Ethylenoxid. Ein schonendes und ungiftiges Verfahren ist die **Plasmasterilisation** mit Wasserstoffperoxid-Plasma, die sich besonders für hitzelabile und feuchtigkeitsempfindliche Gegenstände eignet.

Im **medizinischen Anwendungsbereich** stellt die **Inaktivierung von Prionen** eine besondere Herausforderung dar, weil sie gegenüber den üblichen Sterilisationsmethoden relativ widerstandsfähig sind. Für chirurgische Instrumente wird im Allgemeinen die Dampfsterilisation bei 134 °C und einem Druck von 3 bar (entspricht 304 kPa) für 5 bis 10 Minuten angewendet; zur Inaktivierung von Prionen wird empfohlen, nach vorhergehender alkalischer Reinigung der Instrumente die Sterilisationszeit auf 18 Minuten zu erhöhen. Eine neu entwickelte Methode beruht auf der Wirkung eines gentechnisch veränderten hitzestabilen Enzyms aus thermophilen Bakterien, das gezielt Prionenproteine spaltet.

7.3.2 Sicherheit im Labor

In einem mikrobiologischen Labor gilt es nicht nur störende Kontaminationen zu vermeiden, es wird auch mit potenziell pathogenen Mikroorganismen gearbeitet und einige Arbeitsschritte finden bei offener Flamme statt, teilweise unter Verwendung von Chemikalien, die brennbar oder toxisch sein können. Es ist daher notwendig, prinzipiell eine Reihe von Sicherheitsregeln zu beachten, die abhängig von der Risikobewertung einer bestimmten Tätigkeit noch ergänzt werden müssen (s. u. Sicherheitsstufen). Eine Liste der **Sicherheitsbestimmungen** und der zu treffenden Maßnahmen bei Unfällen sollte im Labor aushängen bzw. vor Arbeitsaufnahme ausgeteilt werden. Eine entsprechende Sicherheitsbelehrung von Mitarbeitern und Studierenden muss durch den Labor- oder Projektleiter erfolgen, zudem verfügt jedes Labor über einen speziell geschulten **Sicherheitsbeauftragten**. Allgemein gelten bestimmte Vorschriften über die Beschaffenheit der Laborräume, die verwendeten Materialien sowie die regelmäßige Reinigung und Desinfektion. Bestimmte **Verhaltensregeln** müssen eingehalten werden, beispielsweise darf im Labor grundsätzlich nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden, Lebensmittel und Garderobe müssen außerhalb des Labors aufbewahrt werden. Die Hände stellen eine potenzielle Kontaminations- und Infektionsquelle dar, sie werden vor der Arbeit mit Mikroorganismen mit Seife gewaschen und danach desinfiziert, nach der Laborarbeit umgekehrt zuerst desinfiziert und dann gereinigt. Kontaminierte Abfälle und nicht mehr benötigte Kulturen werden vor der Entsorgung autoklaviert. Um das Risiko von Kontaminationen möglichst gering zu halten, werden alle verwendeten Medien, Gefäße, Instrumente und sonstigen Gegenstände sterilisiert und ihr nachträglicher Kontakt mit unsterilen Bereichen vermieden. Die Verwendung von Sterilisationsindikatoren (Bänder oder Etiketten) dient als Kontrolle der korrekten Sterilisation und beugt Verwechslungen mit unsterilen Geräten vor. Zum Beimpfen oder zur Entnahme von Material werden alle Gefäße nur kurzzeitig neben der Flamme eines Bunsenbrenners geöffnet und abgeflammt, um am Gefäßrand haftende Mikroorganismen abzutöten. Das Risiko einer Verunreinigung durch Zellen oder Sporen aus der Luft wird durch das Arbeiten an einer Sterilbank reduziert. Beim Arbeiten mit pathogenen oder gentechnisch veränderten Mikroorganismen

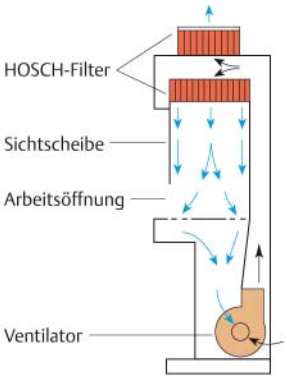


Abb. 7.**6** **Sterilbank.** Seitenansicht einer Sterilbank der Sicherheitsklasse 2 mit Darstellung des Luftflusses.

müssen besondere gesetzliche Vorschriften zum Schutz von Personen und Umwelt beachtet werden.

Zur Grundausstattung des Sterilbereichs in Laboren gehört die **Sterilbank** (clean bench). Dabei handelt es sich um eine belüftete Kabine, bei der Zu- und Abluft durch spezielle Filter (HOSCH-Filter = **Ho**chleistungs-**Sch**webstoff-Luftfilter) sterilisiert werden. Abhängig von den bearbeiteten Mikroorganismen und dem erforderlichen Schutz unterscheidet man drei Sicherheitsklassen: Eine Sterilbank der **Klasse 1** ist an der **Vorderseite offen**, der Luftstrom wird vom Experimentator weg in die Werkbank und über einen HOSCH-Filter wieder herausgeführt. Auf diese Weise ist die arbeitende Person geschützt und durch den Abluftfilter auch die Umgebung, die bearbeiteten Objekte jedoch nicht. Eine Sterilbank der **Klasse 2** (Abb. 7.**6**) besitzt eine **verstellbare Frontscheibe**, die nur den unteren Frontbereich für die Hände frei lässt. Eine gleichmäßige, vertikal ausgerichtete Luftströmung (laminar flow) sorgt dafür, dass keine Luftkeime in und keine Aerosole aus der Werkbank heraus gelangen können, so dass arbeitende Personen und Arbeitsbereich geschützt werden. Die Luft strömt dabei – im Gegensatz zu einem klassischen Abzug – von oben nach unten. **Klasse-3**-Sterilbänke sind dagegen **vollkommen geschlossen** und gasdicht, in ihre Frontscheibe sind zum Arbeiten im Innenraum armlange Gummihandschuhe eingelassen (glove box). Während des Betriebes herrscht Unterdruck, so dass Objektschutz und ein maximaler Personenschutz gewährleistet sind.

Risikobewertung von Mikroorganismen

Gemäß internationaler Übereinkunft werden Biostoffe (Mikroorganismen, Zellkulturen, Viren und Prionen) nach der Biostoff-Verordnung anhand des von ihnen ausgehenden Infektionsrisikos in **vier Risikogruppen** (R1–R4) eingeteilt (Tab. 7.**5**), denen entsprechend **vier Sicherheitsstufen** (S1–S4) für Labore zugeordnet sind. Für Arbeiten mit Mikroorganismen der Risikogruppen 2–4 benötigt man eine Genehmigung der zuständigen Behörde. Die Klassifizierung erfolgt durch das **Robert-Koch-Institut** in Berlin in Absprache mit der ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit) und in Abstimmung mit EU-Recht.

Tab. 7.5 **Risikogruppen.** Beispiele für die Eingruppierung von Mikroorganismen.

Risikogruppe/ Sicherheitsstufe	*Anforderungen (Auswahl)*	*Beispiel (Auswahl)*
1 kein oder sehr geringes Risiko für Mensch und Wirbeltiere	normale Hygieneregeln	*Bacillus subtilis* (seit Jahrzehnten Produktionsstamm für Waschmittelenzyme) *Lactobacillus bulgaricus* u. andere *Lactobacillus*-Arten (seit Jahrhunderten in der Milchwirtschaft und zur Gemüsekonservierung eingesetzt) *Escherichia coli* Stamm B und K12 *Saccharomyces cerevisiae* (Bäcker-/ Brauhefe) *Penicillium chrysogenum* (Antibiotika-Produktionsstamm)
2 geringes bis mäßiges Risiko für Mensch und Wirbeltiere	wie Stufe 1 plus Autoklav im Gebäude Arbeitsbereich abgetrennt Ausschluss betriebsfremder Personen Kennzeichnung der Räume (Warnzeichen „Biogefährdung“)	*Streptococcus mutans* (Bewohner der Mundhöhle, beteiligt an der Entstehung von Karies) *Clostridium tetani* (Wundstarrkrampf-Erreger, regelmäßiger Kontakt mit Sporen in der Umwelt) *Vibrio cholerae* (Cholera-Erreger, Infektion nur über hohe Keimdosis in Wasser) *Candida albicans* (Normalflora, kann Soorerkrankungen verursachen) Humanes Adenovirus, Herpes-simplex-Virus Typ 1 und 2
3 mäßiges bis hohes Risiko für Mensch und Wirbeltiere	wie Stufe 2 plus alle Arbeiten in Werkbänken Unterdruck im Raum Autoklav im Labor Zutritt nur über Schleuse Filterung von Zu- und Abluft kein infektiöses Material in Abwässer	*Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose-Erreger, Infektion über die Luft möglich) *Bacillus anthracis* (Milzbrand-Erreger, Sporenbildner, Impfstoff verfügbar) *Yersinia pestis* (Pest-Erreger, Infektion über die Luft möglich, Impfstoff verfügbar),*Histoplasma capsulatum* (dimorpher Pilz, verursacht Systemmykose) Gelbfiebervirus, Hepatitis B-Virus, HIV
4 hohes Risiko für den Menschen	wie Stufe 3 plus separates Gebäude oder abgetrennter Gebäudetrakt, deutlich gekennzeichnet isoliertes Belüftungssystem	nur bestimmte Viren, z. B. Marburg-Virus, Ebola-Virus (verursachen hämorrhagisches Fieber), Variola-Virus (Pocken)

Für die Risikobewertung wird das **Gefährdungspotenzial** eines Mikroorganismus in Bezug auf Arbeitssicherheit, Umweltsicherheit und Produktsicherheit anhand von systematischer Stellung, Stoffwechseleigenschaften, natürlichem

Standort und Lebensweise, Virulenz und Pathogenität für den Menschen, Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen, Übertragungsmechanismen und Verbreitungswegen, Epidemiologie sowie Widerstandsfähigkeit und Überlebensfähigkeit außerhalb des normalen Lebensraumes (Tenazität) beurteilt. Das entscheidende Kriterium für die Einstufung ist die Eigenschaft, bei gesunden Menschen **Infektionskrankheiten** hervorzurufen; allerdings sollen auch sensibilisierende (Allergien auslösende) und toxische Eigenschaften berücksichtigt werden. Die Einstufung von **gentechnisch veränderten Mikroorganismen** erfolgt anhand der Gesamtbewertung der relevanten Eigenschaften von Spender- und Empfängerorganismen, eventuell eingesetzten Vektoren sowie des rekombinanten Organismus selbst.

7

Gesetzliche Grundlagen für die Sicherheitsmaßnahmen in Laboren sind neben der **Biostoff-Verordnung**, das **Gentechnikgesetz** und die **Gentechniksicherheits-Verordnung** (📖*Genetik*) sowie die **Gefahrstoff-Verordnung**, die die Sicherheitsbestimmungen für Verpackung und Transport regelt, wenn biologisches Material zu Forschungszwecken oder für diagnostische Untersuchungen an andere Labore verschickt wird.

Für den Umgang mit Krankheitserregern gelten darüber hinaus das **Infektionsschutzgesetz** (S. 545), die **Tierseuchenerreger-Verordnung**, das **Pflanzenschutzgesetz** und das **Gesetz über die Kontrolle von Kriegswaffen**. Die **Gute Laborpraxis** (Anhang 1 zu § 19a Chem. G.) regelt den organisatorischen Ablauf und die Bedingungen für Planung, Durchführung und Überwachung von Laborprüfungen sowie deren Aufzeichnung und die Berichterstattung.

Desinfektion: Gezieltes Abtöten oder Inaktivieren von pathogenen Mikroorganismen, behandeltes Material ist keimarm.
Sterilisation: Vollständiges Abtöten aller vorhandenen Mikroorganismen bzw. die Inaktivierung von Viren, behandeltes Material ist keimfrei (steril).
Autoklav: Geschlossener ein- oder doppelwandiger Druckbehälter zur Dampfsterilisation.
Tyndallisieren: Fraktionierte Hitzesterilisation zur Abtötung von Sporenbildnern
Pasteurisieren: Teilentkeimung einer hitzeempfindlichen Lösung durch schonendes Erhitzen, Abhängig vom Anwendungsgebiet Dauer-, Kurzzeit- oder Hocherhitzung.
Sterilbank: Belüftete Kabine als Sterilarbeitsplatz, Zu- und Abluft gefiltert, drei Sicherheitsklassen:
- **Sicherheitsklasse 1:** Vorderseite offen, Luftstrom wird vom Experimentator weg geführt, Personenschutz.
- **Sicherheitsklasse 2:** Verstellbare Frontscheibe, vertikaler Luftstrom, Schutz von Personen und Arbeitsbereich.
- **Sicherheitsklasse 3:** Vollkommen geschlossen und gasdicht, Arbeit durch in die Frontscheibe eingelassene Gummihandschuhe bei Unterdruck, optimaler Schutz für Personen und Arbeitsbereich.

Risikobewertung von Biostoffen: Einteilung in vier Risikogruppen, denen vier Sicherheitsstufen für Labore zugeordnet sind.

7.4 Kultivierung von Mikroorganismen

Für eine erfolgreiche Kultivierung von Mikroorganismen müssen jeweils **günstige Wachstumsbedingungen** geschaffen und aufrechterhalten werden: Die Zusammensetzung des Mediums muss den Bedürfnissen der jeweiligen Mikroorganismen entsprechen (S. 260), ebenso sind der pH-Wert, die Bebrütungstemperatur und die richtige Gasphase für das Wachstum von entscheidender Bedeutung.

Die **Isolierung** eines bestimmten Mikroorganismus erfolgt meist nach Anreicherung auf Selektivmedien.

Für die Herstellung einer **Reinkultur** sind feste Nährböden geeignet, die Gewinnung **großer Mengen** an Zellen oder Wachstumsprodukten wird mit Flüssigkulturen durchgeführt, die als **statische oder kontinuierliche Kultur** betrieben werden. Das Volumen der dabei verwendeten Kulturgefäße reicht von wenigen Millilitern bis zu mehreren Hunderttausend Litern. Bei **industriellen Bioreaktoren** sorgt eine komplizierte Mess- und Regeltechnik für optimale pH- und Temperaturwerte sowie für eine ausreichende Begasung.

7.4.1 Kultivierung im Labormaßstab

Zu Forschungszwecken oder für die routinemäßige Identifizierung im Labor werden in der Regel nur **kleine Kulturvolumina** von 5 ml bis ca. 1 Liter verwendet. Die Kultivierung erfolgt entweder auf flüssigem oder auf festem Nährmedium. Abhängig vom benötigten Volumen und den Wachstumsbedürfnissen der bearbeiteten Mikroorganismen stehen unterschiedliche Kulturgefäße zur Verfügung (Abb. 7.**7**). Für kleine Mengen Flüssigkultur verwendet man Reagenzgläser oder Glasgefäße, z. B. Erlenmeyerkolben, die zur Vermeidung von Kontaminationen nach dem Animpfen mit sterilen Wattepfropfen oder Metallkappen abgedeckt werden. Die Kultivierung auf Festmedium erfolgt in sterilen Petrischalen aus Kunststoff oder in Reagenzgläsern.

Zum **Animpfen** wird im Luftstrom eines Bunsenbrenners oder an einer sterilen Werkbank das **Inokulum** (ca. 10^6–10^7 Zellen pro Milliliter) aus einer Vorkultur entnommen und z. B. mit einer ausgeglühten **Impföse** aus Platindraht oder einer sterilisierten **Glaspipette** auf das Fest- bzw. in das Flüssigmedium überführt (Abb. 7.**8**). Anschließend wird die Kultur bei entsprechender Temperatur und Sauerstoffatmosphäre bebrütet. Das Wachstum der Mikroorganismen in einer Flüssigkultur ist häufig schon durch die Trübung erkennbar, auf einer Agarplatte entstehen mit bloßem Auge sichtbare Zellanhäufungen, die als **Kolonien** bezeichnet werden. Eine einzelne Zelle eines schnell wachsenden Bakteriums kann über Nacht zu einer Kolonie von etwa 10^7 Zellen heranwachsen. Weil die Diffusion der Nährstoffe aus dem Agar nicht alle Zellen einer dicht gewachsenen



Abb. 7.7 **Kulturgefäße. a** Für anaerobe Bakterien, die kein oder nur wenig Gas bilden, eignen sich Schraubflaschen. **b** Kolben oder Röhrchen, die nur mit Metallkappen oder Wattestopfen verschlossen werden, eignen sich für aerobe Organismen, Schikanen verbessern die Durchmischung und damit die Sauerstoffversorgung der Kultur. **c** Zur gleichmäßigen Durchmischung dient ein Magnetrührer, der einen kleinen stäbchenförmigen Magneten im Medium dreht. **d** Alternativ werden die angeimpften Kolben auf einem Schüttler befestigt und zur besseren Sauerstoffversorgung der Zellen über einen Motor gleichmäßig bewegt. (Aufnahmen: a: R. Methe-Jaenchen; b–d: A. Brandis-Heep, Marburg)

Kolonie gleichmäßig erreicht, sind die Wachstumsbedingungen für die einzelnen Zellen einer Kolonie unterschiedlich, so dass die innen liegenden Zellen wegen des Nährstoffmangels ihr Wachstum einstellen. Ist die Dichte der Zellen so hoch, dass die einzelnen Kolonien ineinander übergehen, entsteht eine zusammenhängende Bakterienschicht, die als **Bakterienrasen** bezeichnet wird.

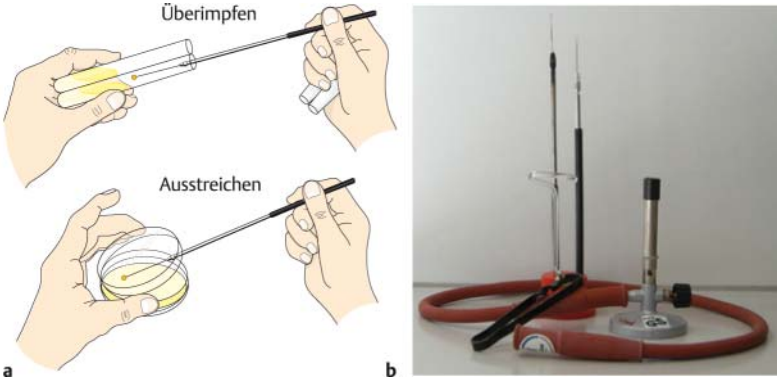


Abb. 7.**8** **Steriles Überimpfen. a** Nach Ausglühen der Impföse im Außenkegel einer Bunsenbrennerflamme und anschließender kurzer Abkühlung wird die Probe durch Eintauchen der Impföse aus dem Kulturgefäß entnommen und entweder in ein Röhrchen mit Flüssigmedium überimpft oder auf einer Petri-Schale mit Nähragar ausgestrichen. **b** Bunsenbrenner, Impföse, Impfnadel und gläserner Drigalski-Spatel. (Aufnahme: A. Brandis-Heep, Marburg)

Aerobe und anaerobe Kultivierung

Aerobe Mikroorganismen benötigen für optimales Wachstum eine ausreichende Sauerstoffversorgung. Auf Festmedien wachsen sie daher als **Oberflächenkultur** und nutzen vorwiegend den in der Gasphase vorhandenen Sauerstoff.

In stehendem Flüssigmedium können aerobe Mikroorganismen als Deckenkultur oder als Submerskultur wachsen. **Deckenkulturen** werden möglichst großflächig auf einer Nährlösung angelegt und während der Bebrütung nicht bewegt. Sie eignen sich für Pilze, die auf der Flüssigkeitsoberfläche ein Myzel ausbilden, das durch die Oberflächenspannung gehalten wird. Auch strikt aerobe, Schleim bildende Bakterien, z. B. Essigsäurebakterien (S. 87), können als Oberflächenkultur vermehrt werden, sie bilden dort einen Bakterienfilm, eine **Kahmhaut**. Nachteil sowohl der Oberflächenkultur als auch der Deckenkultur ist die Entstehung von Sauerstoff- und Nährstoffgradienten mit wachsender Zelldichte, sodass in der Kultur keine einheitlichen Wachstumsbedingungen vorherrschen. Bei der **Submerskultur** sind die Mikroorganismen in der gesamten Nährlösung suspendiert, sodass wegen der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in den Kulturmedien für eine gute Belüftung gesorgt werden muss.

Kulturansätze von geringem Volumen werden durch gleichmäßiges **Schütteln** ständig mit Luft durchmischt, wobei die Verwendung von Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Abb. 7.**7b**) den Sauerstoffeintrag verbessert. Bei steigender Zelldichte muss die Schüttelgeschwindigkeit erhöht werden. Bei größeren Volumina ist ein spezielles **Begasungssystem** zur Einleitung von Luft in die Kultur erforderlich, um auch in tieferen Schichten für ausreichende Mengen an gelöstem Sauerstoff zu sorgen.

Anaerobe Mikroorganismen werden, abhängig von ihrer Sauerstoffsensibilität, unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck oder unter komplettem Sauerstoffausschluss kultiviert. **Fakultativ anaerobe und aerotolerante** Bakterien werden wie aerobe Bakterien überimpft, da ein kurzzeitiger Kontakt mit Sauerstoff sie nicht abtötet, und erst anschließend in ein anaerobes Milieu überführt. **Obligat anaerobe** Bakterien werden schon durch geringe Mengen Sauerstoff abgetötet. Sie werden in einer geschlossenen **Anaerobenkammer** (Abb. 7.**9a**) überimpft. Die anschließende Kultivierung erfolgt unter völligem Sauerstoffausschluss: Um das Redoxpotential abzusenken und freie Sauerstoffradikale im Medium abzufangen, werden Reduktionsmittel wie Natriumthioglykolat, Cystein oder Dithionit zugesetzt. Redoxindikatoren, die meist in reduziertem Zustand farblos und in oxidiertem gefärbt sind, zeigen an, ob das Medium anaerob ist. Petri-Schalen mit Anaerobiern werden in gasdichten **Anaerobentöpfen** inkubiert (Abb. 7.**9b**), deren Gasphase durch Evakuieren und anschließende Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch ausgetauscht wird. Auch Kulturröhrchen mit anaerobem, flüssigem oder festem, Nährmedium können zur Kultivierung von anaeroben Bakterien verwendet werden. Der Zutritt von Luftsauerstoff wird dabei durch einen speziellen Verschluss verhindert, der alkalisches Pyrogallol enthält, das stark reduzierend wirkt. Anaerobier, die kein Gas bilden, können in randvoll mit sauerstofffreier Nährlösung gefüllten Glasflaschen mit Schraubverschluss kultiviert werden, anaerobe Gasbildner in einem verschlossenen Kulturgefäß mit Gasausgang, das permanent mit einem sauerstofffreien Gasgemisch begast wird.

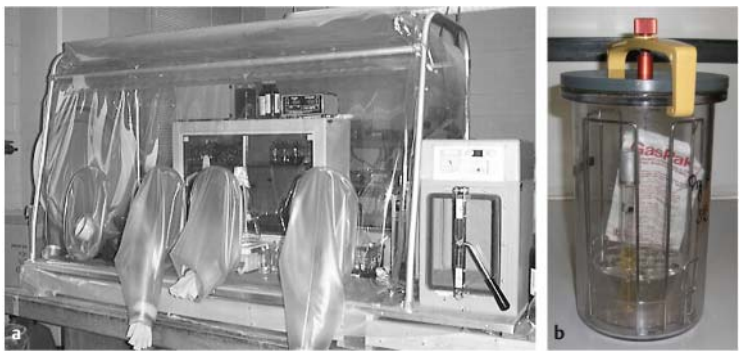


Abb. 7.**9** **Anaerobenkultivierung. a** Die Gasphase in der luftdichten Anaerobenkammer kann vollständig ausgetauscht und so ein Arbeiten unter anaeroben Bedingungen gewährleistet werden. **b** Die Kultivierung anaerober Mikroorganismen z. B. auf Nähragar in Petrischalen erfolgt in einem Anaerobentopf, der über ein Ventil im Deckel evakuiert und anschließend mit Stickstoff oder einem sauerstofffreien Gasgemisch begast werden kann. Wird von den Mikroorganismen Gas verbraucht oder produziert, muss die Gasphase regelmäßig erneuert werden. (Aufnahmen: a: R. Nethe-Jaenchen; b: A. Brandis-Heep, Marburg)

7.4.2 Kultivierung im industriellen Maßstab

Zur industriellen Nutzung, z. B. zur Produktion von Starterkulturen für die Lebensmittelindustrie, zur Produktion bestimmter Enzyme oder Antibiotika, werden die Mikroorganismen meist als **Submerskultur** in **Bioreaktoren** (auch: **Fermenter**) kultiviert. Ein Bioreaktor besteht aus dem eigentlichen Kulturgefäß, das bis zu 100 000 l fassen kann, einem Rührwerk zur Durchmischung der Kultur, einer Begasungsanlage**,** einer Beheizung und einer Probenentnahme. Um definierte Wachstumsbedingungen aufrechtzuerhalten, ist die Anlage mit einer entsprechenden Mess- und Regeltechnik ausgerüstet.

Industrielle Produktionsanlagen können, je nach verwendetem Mikroorganismus bzw. gewünschtem Produkt, **aerob oder anaerob** betrieben werden. Dabei besteht speziell bei aeroben Anlagen die Gefahr einer Unterversorgung der Kultur mit Sauerstoff, wenn das Volumen stark erhöht wird. Eine solche Unterversorgung würde das Wachstum und damit auch die Produktausbeute verschlechtern und muss daher möglichst vermieden werden. Um trotz des großen Volumens eine gute **Sauerstoffversorgung** der Kultur zu gewährleisten, wird sterile Druckluft von unten in das Kulturgefäß geleitet. Die einzelnen Luftblasen dürfen nicht zu groß sein, da sonst aufgrund des ungünstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses kein ausreichender Sauerstofftransfer zu den Zellen stattfindet. Die Luft wird deshalb mithilfe feiner Düsen in der Flüssigkeit verteilt. Ein Rührwerk, das meist in mehreren Ebenen mit vertikal angeordneten Propellerflügeln bestückt ist, sorgt über einen Motor für eine gute Durchmischung der Kultur. Dabei werden gleichzeitig die Nährstoffe verteilt.

Nach ihrer Bauweise teilt man Bioreaktoren in drei Klassen ein:
– **Blasensäulenfermenter:** Das Medium wird mit Druckluft oder einem anderen Gas von unten durchsprudelt und so durchmischt.
– **Rührkesselreaktoren** (stirred tank reactor, STR): Das Medium wird durch einen internen Rührer mechanisch durchmischt.
– **Airlift-** oder **Schlaufenreaktoren:** Von unten zugeführtes Gas strömt durch einen inneren Zylinder in das Medium, der dabei entstehende Sog versetzt das Medium in Zirkulation.

Blasensäulenfermenter werden vorwiegend im Labormaßstab zu Forschungszwecken, z. B. an Universitäten, eingesetzt, während Rührkessel- und Schlaufenreaktoren für Produktionszwecke im industriellen Maßstab verwendet werden.

Aus Gründen der Stabilität besteht ein Bioreaktor, der sich über mehrere Stockwerke eines Gebäudes erstrecken kann, nicht wie ein Laborfermenter aus Glas, sondern aus **Edelstahl**. Wegen der bei den Stoffwechselprozessen entstehenden Wärme besitzt der Bioreaktor entweder einen äußeren **Kühlmantel** oder eine Kühlschlange im Inneren. Um der durch die starke Begasung und das Rühren begünstigten Schaumbildung entgegen zu wirken, werden dem Medium **Entschäumer** zugesetzt. Die **Überwachung** von Substratkonzentration, Produktkonzentration, Temperatur, pH-Wert usw. geschieht in modernen Anlagen automatisch und wird mit Hilfe von Computern gesteuert. Diese Methode hat zudem den Vorteil, dass über Simulationsprogramme die Auswirkungen von Veränderungen beurteilt werden können, ohne dass tatsächlich kostenintensive Versuche durchgeführt werden müssen.

Scale up

Bei der industriellen Kultivierung von Mikroorganismen (S. 559) arbeitet man mit Kulturvolumina, die ein Vielfaches der im Labor üblichen Mengen betragen. Während die **Austestung** neuer Stämme und ihre **Optimierung** für eine bestimmte Nutzung noch in Kulturgefäßen stattfinden, deren Volumina dem üblichen Labormaßstab von maximal einem Liter entsprechen, haben industrielle Produktionsanlagen ein Volumen von 100 000 Litern oder mehr. Da sich bei der Erhöhung des Volumens das Oberflächen/Volumen-Verhältnis verringert, können die im kleinen Maßstab ermittelten optimalen Wachstumsbedingungen nicht ohne Weiteres auf den Produktionsmaßstab übertragen werden. Es hat sich in der Praxis bewährt, die als **Scale up** (engl. to scale up: heraufsetzen, vergrößern) bezeichnete Volumenerhöhung in mehreren Schritten durchzuführen: Ausgehend von der **Stammkultur** (5–10 ml) wird das Volumen schrittweise erhöht, bis eine Größenordnung von 10 000–500 000 Litern im **Produktionsreaktor** erreicht wird. Im **Versuchsreaktor** (1–10 l) werden die Wachstumsbedingungen für den Produktionsstamm optimiert und das neu entwickelte Herstellungsverfahren anschließend in der **Pilotanlage** (300–3000 l) getestet, bevor die endgültige Produktion beginnt.

7.4.3 Statische und kontinuierliche Kultur

Produktionsverfahren mit Mikroorganismen in Flüssigmedium können entweder als statische oder als kontinuierliche Kultur betrieben werden. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass die statische Kultur ein geschlossenes, die kontinuierliche dagegen ein offenes System darstellt. Welche Technik jeweils eingesetzt wird, ist abhängig von der Zielsetzung. Bei vielen Produktionsprozessen hat sich die kontinuierliche Kultur häufig als vorteilhaft erwiesen, während sich z. B. für Untersuchungen der verschiedenen Wachstumsphasen (S. 270) eine statische Kultur besser eignet.

Die statische Kultur

Bei einer **statischen Kultur**, die auch als diskontinuierliche Kultur oder **Batch-Kultur** (batch: Stapel, Ladung) bezeichnet wird, werden nach dem Animpfen weder neue Nährstoffe zugegeben noch Stoffwechselprodukte abgeführt (Abb. 7.**10**). Dadurch verändern sich im Verlauf des Wachstums die Bedingungen im Kulturgefäß, was zu den charakteristischen aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen führt (S. 269). In diesem **geschlossenen System** kann nur so lange Wachstum stattfinden, bis ein essentielles Substrat verbraucht ist.

Eine Sonderform der Batch-Kultur ist der **Fed-Batch-Prozess** (fed: gefüttert, batch: Stapel, auch: Zufütterungsbetrieb). Zunächst wird ein nur zum Teil mit Nährlösung befüllter Fermenter angeimpft und nach der Anlaufphase des Wachstums kontinuierlich oder in Intervallen die kritische Wachstumskomponente zugeführt. Da jedoch keine Nährlösung abgeführt wird, steigt das Volumen während dieser Zulaufphase bis zum maximalen

Füllstand des Bioreaktors an. Durch die Zugabe von Substrat lassen sich sowohl die **exponentielle als auch die stationäre Phase verlängern** und dadurch die Biomasse und die Menge der in der stationären Phase synthetisierten Stoffwechselprodukte erhöhen. Um eine Katabolitrepression, eine Substratüberschusshemmung oder eine Endproduktthemmung von Biosynthesewegen (*Genetik*) zu verhindern, wird der Substratverbrauch während des Wachstums kontinuierlich gemessen und die benötigten Nährstoffe entsprechend dosiert zugegeben. Die Messung erfolgt meist indirekt über Indikatoren, die mit dem Substratverbrauch gekoppelt sind, z. B. über die Bildung organischer Säuren, pH-Wert-Änderungen oder die Entstehung von CO_2. Fed-Batch-Kulturen erfordern eine genauere Überwachung und Steuerung als Batch-Kulturen und damit eine entsprechende Mess- und Regeltechnik.

Die statische Kultur wird für Produktionsprozesse dann eingesetzt, wenn die gewünschten mikrobiellen Produkte nur während bestimmter Wachstumsphasen synthetisiert werden, z. B. Sekundärstoffwechselprodukte, die nur während einer Übergangsphase des Wachstums gebildet werden (S. 553). Bei der Produktion von Antibiotika, beispielsweise Penicillin oder Cephalosporin, wird dem Kulturgefäß regelmäßig ein Teil der Kulturflüssigkeit entnommen, wodurch eine quasi-kontinuierliche Kultivierung erreicht wird.

Die kontinuierliche Kultur

Einer **kontinuierlichen Kultur** wird ständig eine bestimmte Menge frischer Nährlösung zugeführt und gleichzeitig Kulturflüssigkeit mit den darin enthaltenen Zellen über einen Überlauf abgeführt (Abb. 7.**10**). Da die Zulaufmenge der Ablaufmenge entspricht, bleibt im Unterschied zum Fed-Batch-Prozess das Volumen der Kultur bei diesem Verfahren konstant. Die Austauschrate von Nährlösung gegen Kulturflüssigkeit im Kulturgefäß bezeichnet man als **Verdünnungsrate D**. Sind in einer kontinuierlichen Kultur alle benötigten Substrate im Überschuss vorhanden und die Verdünnungsrate ist niedrig, wächst die Population, weil die Wachstumsrate die Verdünnungsrate übertrifft. Wird die Zuflussgeschwindigkeit so gewählt, dass die Verdünnungsrate der spezifischen Wachstumsrate entspricht, ist im Reaktor ein Gleichgewichtszustand (**Fließgleichgewicht**) erreicht, bei dem genau so viele Zellen neu gebildet werden wie über den Ablauf verloren gehen. Unter diesen Bedingungen befindet die Kultur sich ständig in der exponentiellen Wachstumsphase und die Zellzahl bleibt konstant. Wird die Zuflussgeschwindigkeit dann noch weiter erhöht, übertrifft die Verdünnungsrate die spezifische Wachstumsrate und die Zellkonzentration sinkt. Dieser Vorgang wird als **Auswaschen** (washout) bezeichnet.

Für eine kontinuierliche Kultur sind neben dem Kulturgefäß zusätzlich ein Vorratsgefäß mit frischem Medium und ein Auffanggefäß für die abgeführte Kulturflüssigkeit erforderlich, die beide mit dem Kulturgefäß verbunden sind. Zu- und Ablauf werden über eine Pumpe gesteuert.

Für die Kontrolle des Mediumzuflusses einer kontinuierlichen Kultur gibt es zwei Standardmethoden, die sich grundlegend unterscheiden. Bei einem **Chemostaten** bleibt das **Kulturvolumen konstant**, die Wachstumsrate wird durch

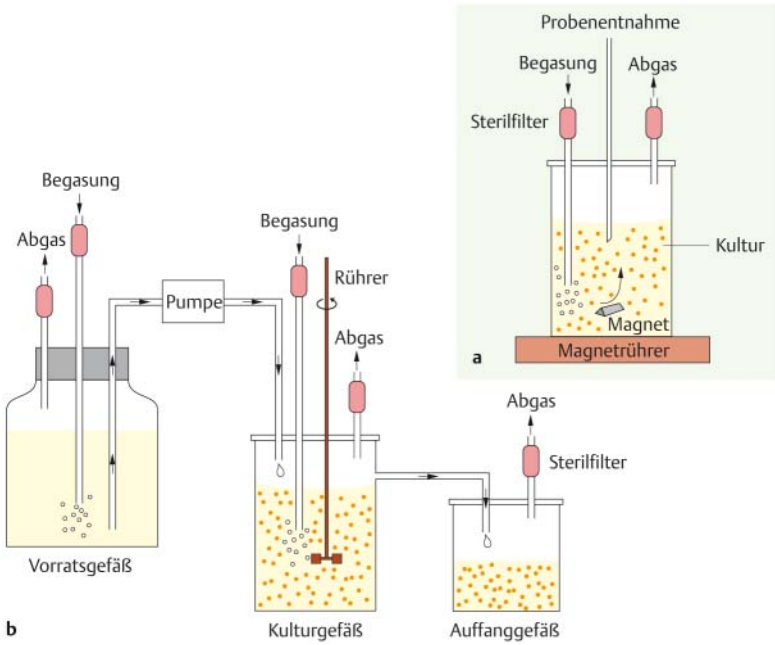


Abb. 7.**10** **Kulturen. a** Statische Kultur. Die Temperatur der Kulturgefäße wird bei Bedarf mithilfe eines Wasserbades konstant gehalten. Während des Wachstums wird die Kultur nur begast und das Abgas abgeführt, die Durchmischung wird durch Rühren mit einem Magnetrührer und einem im Kulturgefäß befindlichen Magneten erreicht. **b** Kontinuierliche Kultur. Im hier schematisch dargestellten Chemostaten wird ständig über eine Pumpe Nährlösung zugeführt und durch das entsprechende Abfließen von Kulturflüssigkeit das Volumen konstant gehalten, Temperatur und pH-Wert werden über Messeinrichtungen kontrolliert und reguliert.

ein **essentielles Substrat limitiert**. Sind alle anderen Substrate im Überschuss vorhanden, wird die Wachstumsrate von der Konzentration dieses einen Substrates bestimmt, die Zellen wachsen also mit der **spezifischen Wachstumsrate** (S. 269). Solange die Verdünnungsrate unterhalb der maximalen spezifischen Wachstumsrate liegt, ist die Konzentration des limitierenden Substrates im Kulturgefäß nahezu Null, bei Erreichen bzw. Überschreiten der maximalen spezifischen Wachstumsrate steigt die Konzentration des limitierenden Substrates im Medium rasch an. Mithilfe eines Chemostaten können Wachstumserträge und k_s-Werte für ein bestimmtes Substrat experimentell bestimmt werden.

Bei einem **Turbidostaten** wird die Zelldichte im Kulturgefäß ständig mithilfe einer Photozelle über die **optische Dichte** (S. 275) der Kultur gemessen und automatisch frisches Medium zugeführt oder Kulturflüssigkeit entfernt, um die

Zelldichte konstant zu halten. Im Unterschied zum Chemostaten sind hier alle Substrate im Überschuss enthalten. In einem Turbidostaten wachsen die Bakterien mit einer konstanten Wachstumsrate, die nahezu der **maximalen spezifischen Wachstumsrate** entspricht. Mithilfe einer kontinuierlichen Kultur lassen sich sehr unterschiedliche Probleme bearbeiten.

▶ Die **kontinuierliche Kultur** ist wirtschaftlicher als die entsprechende Batch-Kultur, denn sie liefert eine größere Ausbeute an Zellmasse oder Stoffwechselprodukten und wird daher häufig für **biotechnologische Anwendungen** genutzt, beispielsweise für die **Produktion von Hefen oder Aminosäuren** sowie zur **Abwasserreinigung** in Kläranlagen. Unter genau definierten Bedingungen kann eine kontinuierliche Kultur unter Entnahme beliebig großer Probemengen zeitlich unbegrenzt fortgeführt werden.
Auch populationsdynamische und populationsgenetische Prozesse können in einer kontinuierlichen Kultur untersucht und gesteuert werden. ◀

Wachstumsrate in statischer und kontinuierlicher Kultur: Die spezifische Wachstumsrate μ hängt von der Konzentration des limitierenden Substrats S, der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} sowie einer substratspezifischen Konstanten K_s ab. Die quantitative Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate μ einzelliger Mikroorganismen folgt dem von J. Monod aufgestellten **Monod-Modell**:

$$\mu = \mu_{max} S / (K_S + S).$$

Diese Gleichung entspricht formal der Michaelis-Menten-Gleichung $V = V_{max} S / (K_S + S)$ (*Biochemie, Zellbiologie*), die die Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer Enzymreaktion von der Substratkonzentration beschreibt. Wenn $S = K_S$ ist, entspricht die spezifische Wachstumsrate der Hälfte der maximalen spezifischen Wachstumsrate, es gilt: $\mu = ½ \mu_{max}$. Ist das Substrat im Überschuss vorhanden ($S >> K_S$), gilt $\mu = \mu_{max}$ und die Kultur erreicht die maximale Wachstumsgeschwindigkeit der logarithmischen Phase. In der Praxis ist der Wert von K_S oft so niedrig, dass die Substratkonzentration während des logarithmischen Wachstums selten bis auf K_S absinkt. Wenn sich die Kultur jedoch dem Ende der logarithmischen Phase nähert, ist das vorhandene Substrat fast aufgebraucht und die Substratkonzentration S kann sogar unter den K_S-Wert fallen. Unter Bedingungen, bei denen $S < K_S$ ist, erreichen die Mikroorganismen rasch die Übergangsphase. Wegen der hohen Zellpopulation am Ende der logarithmischen Phase kann das restliche Substrat jedoch so schnell umgesetzt werden, dass die Übergangsphase von so kurzer Dauer ist, dass sie nicht zu erkennen ist.

Ist bei einer **statischen Kultur** das Substrat im Überschuss vorhanden und das Wachstum wird nicht durch ein Stoffwechselprodukt gehemmt, ist die spezifische Wachstumsrate unabhängig von der Substratkonzentration. In diesem Fall entspricht die Zunahme der Biomasse X in der Zeit t (dX/dt) dem Produkt aus der spezifischen Wachstumsrate μ und der Konzentration der Biomasse X, es gilt:

$$dX/dt = \mu X$$

Entsprechend gilt für die Zunahme der Zellzahl:

$$dN/dt = \mu N$$

Bei einer **kontinuierlichen Kultur** wird dem Kulturgefäß frische Nährlösung mit der Zuflussrate F (ml h^{-1}) zugeführt. Gleichzeitig wird verbrauchtes Medium, das Stoffwechselprodukte und die Biomasse X (mg ml^{-1}) enthält, mit derselben Rate F (ml h^{-1}) abge-

zogen. Bei einer kontinuierlichen Kultivierung mit dem konstanten Arbeitsvolumen V gilt im Fließgleichgewicht für die Verdünnungsrate D:

$D = F / V$.

Für die Zunahme der Biomasse X gilt:

$dX/dt = (\mu - D)X$.

Die spezifische Wachstumsrate μ einer kontinuierlichen Kultur wird so lange durch die Zuflussrate der frischen Nährlösung bestimmt, wie diese geringer ist als die maximale spezifische Wachstumsrate. Wird die Zuflussrate so groß, dass die Verdünnungsrate D der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} entspricht, gilt im Gleichgewichtszustand $dX/dt = 0$. Unter diesen Bedingungen werden die entnommenen Zellen durch die neu entstehenden genau ersetzt, und die Zellzahl bleibt konstant. Übersteigt in einer kontinuierlichen Kultur die Verdünnungsrate D die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max}, so werden die Mikroorganismen mit der Rate $(D - \mu_{max})$ aus dem Fermenter ausgewaschen. Dieses Verfahren kann man zur Bestimmung von μ_{max} verwenden. Zu diesem Zweck misst man in geeigneten Zeitabständen die Abnahme der Zellkonzentration. Bei halblogarithmischer Auftragung der erhaltenen Werte gegen die Zeit erhält man eine Gerade mit der negativen Steigung $\mu_{max} - D$.

7.4.4 Anreicherung von Mikroorganismen

Zur optimalen Nutzung der vorhandenen Nährstoffe leben in einer **Mischpopulation** in einer natürlichen Umgebung Spezies mit verschiedenen Wachstumsansprüchen zusammen. Um die Eigenschaften eines bestimmten Mikroorganismus aus einer natürlichen Probe, z. B. aus einer Bodenprobe oder einem Patientenabstrich, untersuchen zu können, muss dieser daher erst mit geeigneten Methoden isoliert werden. Hierzu wählt man die Kulturbedingungen so, dass das Wachstum des gewünschten Mikroorganismus begünstigt wird, der Organismus einen **Selektionsvorteil** hat und das Wachstum anderer Arten gehemmt wird. Neben Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert und Bebrütungstemperatur ist dafür vor allem die Zusammensetzung des Nährmediums entscheidend. Die verwendeten flüssigen **Selektivmedien** sind so zusammengesetzt, dass nur besondere Stoffwechselfähigkeiten des Zielorganismus ein Wachstum ermöglichen. Meist werden die Wachstumsbedingungen so gewählt, dass mehrere Eigenschaften des gewünschten Organismus für seine Anreicherung genutzt werden. Selektivmedien enthalten häufig auch bestimmte **Hemmstoffe**, die gezielt das Wachstum unerwünschter Gruppen von Mikroorganismen unterdrücken (Gegenselektion), den Zielorganismus jedoch nicht beeinträchtigen (Tab. 7.**6**).

So kann man z. B. aus einem Gemisch von unterschiedlichen Mikroorganismen gezielt **frei lebende Stickstofffixierer** isolieren, indem man dem Nährmedium keine geeignete Stickstoffquelle zusetzt. Unter diesen Bedingungen können nur die Organismen wachsen, die molekularen Stickstoff (N_2) aus der Luft reduzieren können. Wird der Ansatz aerob im Dunkeln bebrütet, werden nur aerobe Stickstofffixierer wie *Azotobacter* angereichert, da unter diesen Bedingungen weder anaerobe noch phototrophe Stickstofffixierer wachsen können.

Tab. 7.6 **Auswahl selektiver Hemmstoffe.**

Hemmstoff	*Angriffsorganismus*	*Wirkungsmechanismus*
Nystatin	Pilze	bildet Poren in steroidhaltiger Membran
Benzimidazole	Pilze	hemmen die Mitose durch Reaktion mit Mikrotubuli
Cycloheximid	Pilze, Protozoen	inhibiert eukaryotische Ribosomen
Amphotericin B	Pilze (nicht z. B. Oomyceten)	bildet Poren in steroidhaltiger Membran
Polyoxin D	Pilze (nicht Oomyceten)	hemmt die Chitinsynthase
Polymyxin-B-sulfat	gramnegative Bakterien	zerstört die Semipermeabilität der Cytoplasmamembran durch Bindung an Phospholipide (Porenbildung)
Natriumazid	gramnegative Aerobier, aerobe Endosporenbildner	hemmt die Atmung

Endosporenbildner lassen sich anreichern, indem die Probe zunächst für ca. 5 Minuten auf 100 °C erhitzt wird, um alle vegetativen Zellen abzutöten. Allerdings ist es in diesem Fall wichtig, dass die gewünschten Zellen ausreichend sporuliert vorliegen.

Bei der nachfolgenden Kultivierung werden zur weiteren Anreicherung des Zielorganismus physiologische Eigenschaften genutzt, z. B. aerobes (*Bacillus*) oder anaerobes Wachstum (*Clostridium*), sowie die Verwendung spezieller Kohlenstoffquellen, z. B. Stärke (*Bacillus subtilis*). Für eine erfolgreiche Anreicherung ist es von Vorteil, die Probe von einem Standort zu entnehmen, an dem günstige Wachstumsbedingungen bereits für eine **natürliche Anreicherung** des Zielorganismus sorgen. Der Ort der Probenentnahme spielt vor allem dann eine entscheidende Rolle, wenn nicht eine bestimmte Spezies angereichert werden soll, sondern Mikroorganismen mit bestimmten physiologischen Eigenschaften, z. B. der Fähigkeit zum Abbau komplexer Kohlenwasserstoffe.

7.4.5 Isolierung von Mikroorganismen

Mikrobiologische Untersuchungen werden generell nicht an Individuen, sondern an Populationen aus Millionen von Einzelzellen durchgeführt. Um verlässliche und reproduzierbare Aussagen über Eigenschaften einer bestimmten Spezies von Mikroorganismen zu erhalten, muss daher sichergestellt werden, dass es sich bei der untersuchten Population um eine einheitliche Kultur handelt.

Die **Isolierung** eines bestimmten Mikroorganismus erfolgt in der Regel auf **festen Nährböden**, deren Zusammensetzung selektiv das Wachstum des gewünschten Organismus begünstigt. Falls der Zielorganismus am natürlichen Standort bereits angereichert vorliegt, kann auf die flüssige Anreicherungskultur (s. o.) verzichtet und eine **Direktisolierung** auf oder in einem selektiven Nähragar vorgenommen werden. Dazu wird die Ausgangsprobe oder, wie bei der Lebendzell-

zahlbestimmung, eine entsprechende Verdünnung auf einem geeigneten Agarmedium ausplattiert (S. 274). Auf diese Weise entstehen aus vermehrungsfähigen Zellen, die durch die gewählten Wachstumsbedingungen begünstigt werden, **einzelne Kolonien**, die dann überimpft und weiter kultiviert werden können. Bei der Isolierung kann, wie bei den flüssigen Anreicherungsmedien, durch die Zugabe von Hemmstoffen das Wachstum unerwünschter Organismen unterdrückt werden. Einige Bakterienarten besitzen spezielle Stoffwechseleigenschaften, die bei der Isolierung ausgenutzt werden. Dazu werden Nährböden mit speziellen Substraten versetzt, die nach ihrer Umsetzung durch die Mikroorganismen farbig werden oder fluoreszieren und so die Kolonien des Zielorganismus anzeigen.

7

Reinkulturen

Kultiviert man eine mithilfe selektiver Nährböden isolierte Kolonie wie oben beschrieben, kann man noch nicht von einer Reinkultur ausgehen. Eine **Reinkultur** ist eine Population von Mikroorganismen, die sämtlich von einer einzelnen Zelle abstammen, sie wird daher auch als **Klon** bezeichnet. Die völlige genetische Übereinstimmung aller Zellen ist dabei nicht unbedingt gegeben, da Spontanmutationen im Verlauf des Wachstums zu geringfügigen Veränderungen führen können. Um die Nachkommenschaft einer einzelnen Zelle zu erhalten, müssen die in einer Mischpopulation vorhandenen Mikroorganismen vereinzelt werden. Dazu kann man entweder eine Verdünnungsreihe herstellen und ausplattieren (Plattengussverfahren, Spatelplattenverfahren, S. 274) oder einen **Verdünnungsausstrich** anlegen (Abb. 7.**11**). Bei den meisten Mikroorganismen zeigen die daraus hervorgehenden Kolonien ein **einheitliches Aussehen** in Form, Farbe und Größe, anderenfalls müssen weitere Verdünnungsausstriche angelegt werden. Von mehreren der gewachsenen Einzelkolonien wird jeweils eine Flüssigkultur angelegt und die Zellen mikroskopisch auf Aussehen und einheitliches Gramverhalten (S. 300) überprüft. Um das Wachstum und damit die Entdeckung von eventuell vorhandenen **Kontaminationen** nicht zu unterdrücken, werden für die Vereinzelung und auch für die Reinheitskontrolle der isolierten Einzelkolonien keine Selektivmedien verwendet, sondern **Universalnährböden**.

Mikroorganismen, die zur Bildung von **Zellverbänden** neigen, lassen sich schwerer vereinzeln und sind auch anfälliger für Kontaminationen. Für eine möglichst gute Trennung ist hier eventuell eine Vorbehandlung der Zellsuspension mit einem Dispersionsmittel notwendig. Für **stark bewegliche Mikroorganismen**, die sich auf Agaroberflächen durch Schwärmen ausbreiten (z. B. *Proteus*), müssen möglichst trockene Nährböden verwendet und das Schwärmen eventuell durch spezielle Zusätze verhindert werden. Mikroorganismen, die **nicht auf festen Nährmedien** wachsen, lassen sich über eine Verdünnungsreihe in Flüssigkulturröhrchen vereinzeln. Um nur eine einzige Zelle pro Röhrchen anzuimpfen, muss die Ausgangsprobe stark verdünnt werden, sodass diese Methode nur erfolgreich ist, wenn der Zielorganismus den überwiegenden Anteil der Mischpopulation ausmacht. Für die Vereinzelung **anaerober Mikroorganismen** kann, je nach Sauerstoffempfindlichkeit, die Bebrütung in einem Anaerobentopf erfolgen, oder es müssen sämtliche Arbeitsschritte in einer Anaerobenkammer durchgeführt werden (Abb. 7.**9**).

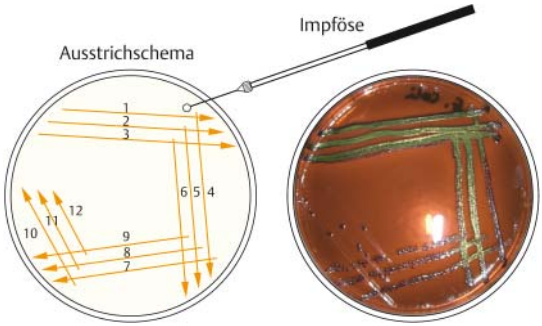


Abb. 7.**11** **Verdünnungsausstrich.** Links: Eine kleine Menge Zellsuspension wird mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in drei parallelen Strichen auf eine Agaroberfläche aufgebracht, die Impföse am Ende jeweils eines Striches neu angesetzt und erneut drei parallele Striche gezogen. Nach drei- bis viermaliger Durchführung liegen auf den letzten Strichen nur noch einzelne Zellen in so großem Abstand voneinander, dass aus ihnen Kolonien wachsen, die sich nicht berühren. Beim **fraktionierten Verdünnungsausstrich** wird die Impföse zusätzlich nach jeder Drei-Strich-Serie ausgeglüht, um anhaftende Mikroorganismen abzutöten. Mit den Einzelkolonien wird zur Sicherheit ein weiterer Verdünnungsausstrich durchgeführt. Rechts: Fraktionierter Ausstrich nach Wachstum von Kolonien (Aufnahme von A. Brandis-Heep, Marburg).

Dauerkulturen

Verschiedene Konservierungsmethoden ermöglichen die **Aufbewahrung** von Reinkulturen über einen kurzen, mittleren oder längeren Zeitraum (Tab. 7.**7**). Für **Gebrauchskulturen** wird die vorhandene Kultur regelmäßig in frisches Nährmedium überimpft, sodass ständig gut gewachsene Zellen als Arbeitsmaterial zur Verfügung stehen. Dieses Verfahren ist jedoch für die dauerhafte Stammhaltung zu aufwendig, außerdem erhöhen sich durch häufiges Überimpfen die Kontaminationsgefahr und die Wahrscheinlichkeit von genetischen Veränderungen der Stammkultur durch Spontanmutationen. **Mittelfristig** können verschiedene Mikroorganismen konserviert werden, indem sie in oder auf einem Trägermaterial getrocknet werden. Als Träger geeignet sind Tropfen aus Nährgelatine, in die Mikroorganismen eingeschlossen und anschließend getrocknet werden. Zur **langfristigen Aufbewahrung** werden die Zellen tiefgefroren und bei Temperaturen von unter –70 °C in einem speziellen Gefrierschrank oder bei unter –130 °C in Flüssigstickstoff gelagert. Dies wird von den meisten Mikroorganismen vertragen.

Eine häufig angewendete Methode ist die **Lyophilisation** (**Gefriertrocknung**) der Zellen. Bei diesem Verfahren wird in einem Lyophilisationsgerät die Zellsuspension eingefroren und das enthaltene Wasser unter Vakuum sublimiert. Zur Stabilisierung der Zellen beim Einfrieren werden bei beiden Verfahren Schutzstoffe, z. B. Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben, für Anaerobier auch Antioxidantien zum Schutz vor Sauerstoff.

Tab. 7.**7** **Einige Methoden zur Aufbewahrung von Mikroorganismen.**

Methode	*geeignet für*	*durchschnittliche Überlebensdauer*
Trocknen in Gelatine	heterotrophe Bakterien, sporenbildende Pilze	mehrere Monate bis Jahre
Vakuumtrocknung	grampositive Bakterien, sporenbildende Pilze	10 Jahre und länger
Gefriertrocknung (Lyophilisation)	ca. 95 % aller Bakterien, über 90 % der Sporen bildenden Pilze, die meisten Hefen	Bakterien 10–30 Jahre, Sporen bildende Pilze 10–20 Jahre, Hefen > 5 Jahre
Tiefgefrieren, Aufbewahrung bei unter –70 °C	viele Bakterien, einige Hefen	10 Jahre und länger
Tiefgefrieren, Aufbewahrung in Flüssigstickstoff bei unter –130 °C	die meisten Mikroorganismen	30 Jahre und länger

Das **Auftauen** zur Reaktivierung muss – im Unterschied zum Einfrieren, das bis ca. –30 °C schrittweise geschehen sollte – möglichst schnell erfolgen, um Schäden zu vermeiden.

Statische Kultur (Batch-Kultur): Kultivierungsform, bei der keine Nährstoffzuführung oder Entfernung von Stoffwechselprodukten erfolgt, dadurch verändern sich die Bedingungen im Kulturgefäß.
- **Fed-Batch-Kultur:** Sonderform der statischen Kultur, bei der während der Kultivierung Nährstoffkomponenten ergänzt werden, das Volumen nimmt zu, exponentielle und stationäre Phase sind verlängert.

Verdünnungsrate: Austauschrate von Nährlösung gegen Kulturflüssigkeit im Kulturgefäß, entspricht im Gleichgewicht der spezifischen Wachstumsrate der Kultur, sodass die Zellzahl konstant bleibt.
Auswaschen: Übersteigt die Verdünnungsrate die Wachstumsrate, nimmt die Zellzahl in der Kultur ab.
Kontinuierliche Kultur: Kultivierungsform, bei der frisches Medium zu- und Kulturflüssigkeit abgeführt wird.
Chemostat: Zu- und Abfluss erfolgen so, dass das Kulturvolumen konstant bleibt. Das Wachstum ist durch ein Substrat limitiert und erfolgt mit konstanter spezifischer Wachstumsrate.
Turbidostat: Zu- und Abfluss erfolgen so, dass die Zelldichte, gemessen über die optische Dichte, konstant bleibt. Die Substrate sind im Überschuss vorhanden, das Wachstum erfolgt mit konstanter maximaler Wachstumsrate.

7.5 Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen

Für die **Identifizierung** von Mikroorganismen werden an lebenden oder fixierten Zellen morphologische, physiologische oder molekulare Eigenschaften bestimmt. Verschiedene Färbetechniken, insbesondere die Gramfärbung, der Nachweis typischer Stoffwechselreaktionen, sowie seit einigen Jahren die Analyse von Nucleinsäuren sind häufig verwendete Verfahren.

Sowohl die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen und die kommerzielle Nutzung als auch die medizinische Diagnostik erfordern eine genaue und zweifelsfreie Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen. Morphologische Kriterien wie Größe, Form oder Beweglichkeit von Kolonien bzw. Zellen ermöglichen dabei meist nur eine grobe Zuordnung des fraglichen Mikroorganismus zu einer bestimmten Gruppe. Für die genaue Bestimmung der Spezies oder des Serotyps spielen physiologische und molekularbiologische Methoden die entscheidende Rolle; die Analyse von DNA-Sequenzen ermöglicht sogar die phylogenetische Einordnung (S. 63) von nicht kultivierbaren Mikroorganismen anhand von DNA-Isolaten aus natürlichen Habitaten.

7.5.1 Mikroskopische Untersuchungen

Um lebende Mikroorganismen zu betrachten, ist das **Phasenkontrastmikroskop** am besten geeignet. Für das **Lebendpräparat** wird eine Zellsuspension geringer Zelldichte auf einen Objektträger aufgebracht, ein Deckglas aufgelegt und vorsichtig angedrückt, überschüssige Flüssigkeit wird mit Filtrierpapier aufgesaugt. Um die schnelle Austrocknung des Präparates zu verhindern, wird das Deckglas mit Vaseline oder Nagellack abgedichtet. Im Phasenkontrast können **Zellform** und **Beweglichkeit**, Vorhandensein und Anordnung von Endosporen sowie Größe und Zusammenlagerungen von Zellen untersucht werden. Eine genaue Größenbestimmung erfolgt mit einem Messokular. Die Beweglichkeit von Mikroorganismen kann auch unter dem Hellfeldmikroskop in einem **Hängetropfen-Präparat** (Abb. 7.**12**) untersucht werden.

Endosporen lassen sich wegen ihrer starken Lichtbrechung unter dem Phasenkontrastmikroskop gut erkennen, um sie jedoch sicher von anderen lichtbrechenden Zelleinschlüssen unterscheiden zu können, wird eine Endosporenfär-

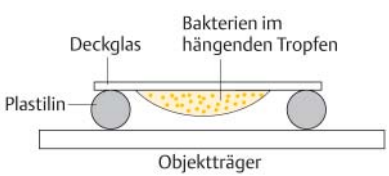


Abb. 7.**12** **Hängender Tropfen.** Ein Tropfen der suspendierten Kultur wird auf ein Deckglas getropft, das dann umgedreht auf einen Plastilinring auf einem Objektträger gelegt wird.

bung durchgeführt. Eine **Geißelfärbung** zeigt Anzahl und Anordnung der Geißeln von Bakterien. **Speicherpolysaccharide** in den Zellen werden durch Farbstoffe im Lebendpräparat sichtbar, **Speicherlipide** sind ohne Anfärbung erkennbar, weil sie stark lichtbrechend sind. Die von einigen Hefen und vielen pathogenen Bakterien gebildeten **Kapseln** lassen sich durch Zugabe von Tusche zum Präparat als heller Kontrast zum dunklen Umfeld darstellen. Für die meisten Nachweismethoden mithilfe von Anfärbungen müssen die Zellen zuvor fixiert werden (s. u.).

Bei den oben genannten Anwendungen, aber auch um die sehr kontrastarmen Mikroorganismen besser sichtbar zu machen, wird nur ein Farbstoff (**Einfachfärbung**, z. B. mit Methylenblau, Kristallviolett, Karbolfuchsin) eingesetzt. Die Auswahl des Farbstoffes ist dabei abhängig von den jeweils untersuchten Mikroorganismen bzw. Zelleinschlüssen. Färbungen mit mehreren Farbstoffen werden als **Differentialfärbungen** bezeichnet, weil mit ihnen verschiedene Bakterien anhand ihres Färbeverhaltens differenziert werden können. Der Arbeitsgang beinhaltet dabei immer eine Färbung mit dem ersten Farbstoff, eine anschließende Entfärbung und dann eine zweite Färbung (Gegenfärbung) mit einem anderen Farbstoff. Mikroorganismen, die nicht wieder entfärbt werden können, behalten dabei die Farbe des ersten Farbstoffes, entfärbte nehmen die Farbe des zweiten an. Die bekannteste Differentialfärbung ist die **Gramfärbung**, die von dem dänischen Bakteriologen Christian Gram 1884 entwickelt wurde (S. 33, Abb. 2.**9**).

Säurefeste Stäbchen der Gattung *Mycobacterium*, die sich mit der Gramfärbung nicht einordnen lassen, können mit der **Ziehl-Neelsen-Färbung** von anderen Bakterien (S. 39) unterschieden werden.

Für einen **Bakterienausstrich** werden wenige Milliliter einer Flüssigkultur mit Wasser so verdünnt, dass die Suspension nur eine leichte Trübung aufweist. Wird von einer Agarkolonie ausgegangen, suspendiert man eine kleine Menge Zellen in destilliertem Wasser. Ein Tropfen der **Zellsuspension** wird auf einen entfetteten **Objektträger** aufgebracht und durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Objektträgers („Breitschaukeln“) oder mithilfe einer Impföse gleichmäßig verteilt und der **Ausstrich** an der Luft vollständig getrocknet. Anschließend wird der Objektträger zur **Fixierung** drei Mal mit der Schichtseite nach oben durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Dabei muss die Flamme so eingestellt werden, dass sie weder leuchtet (kein blauer Innenkegel) noch prasselt. Nach dem Abkühlen kann das Präparat gefärbt werden. ◀

7.5.2 Untersuchung von Stoffwechselprozessen

Kultivierbare Mikroorganismen können häufig anhand ihres Sauerstoffbedarfs und ihrer physiologischen Fähigkeiten identifiziert oder zumindest einer physiologischen Gruppe zugeordnet werden. Der **Sauerstoffbedarf** lässt sich ermitteln, indem man die Mikroorganismen in halbflüssigem Nähragar suspendiert, dem ein Reduktionsmittel wie Thioglykolat zugesetzt wird, und die zähflüssige Sus-

pension dann in Reagenzröhrchen gießt. Weil durch das Reduktionsmittel der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Suspension sehr niedrig ist, verteilen sich die **Wachstumszonen** der Mikroorganismen im Röhrchen entsprechend ihrem Sauerstoffbedarf bzw. ihrer Sauerstofftoleranz (Abb. 7.**13**).

Für die Untersuchung der **physiologischen Fähigkeiten** verwendet man **Differentialnährböden** (auch: Indikatornährböden), die Indikatorfarbstoffe enthalten, mit denen eine bestimmte Stoffwechselleistung nachgewiesen werden kann.

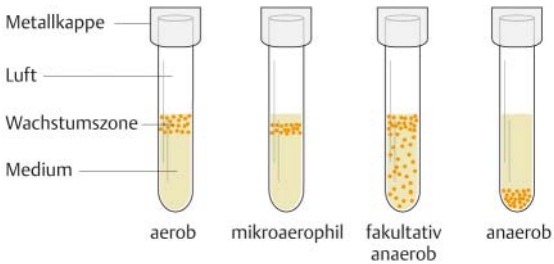


Abb. 7.**13** **Wachstumszonen verschiedener Bakterien in Kulturröhrchen.** Aerobe Organismen wachsen an der Oberfläche in der Zone mit der größten Sauerstoffkonzentration, mikroaerophile etwas unterhalb der Oberfläche in einer Zone geringerer Sauerstoffkonzentration. Fakultativ anaerobe Bakterien wachsen im gesamten Röhrchen, wobei der sauerstoffreiche obere Bereich bevorzugt wird, strikt anaerobe wachsen nur in der sauerstofffreien Zone am Boden des Röhrchens.

Tab. 7.**8** **Nachweis von Stoffwechselreaktionen durch Kultivierung von Mikroorganismen auf selektiven oder differenzierenden Medien.**

Stoffwechselweg	*Medium*	*Nachweis*	*positiv bei (Beispiel)*
selektive Medien			
Fixierung von Luftstickstoff	Minimalmedium ohne Stickstoffverbindungen	Wachstum	*Klebsiella pneumoniae*
Abbau von aromatischen Verbindungen	Minimalmedium mit Aromaten (z. B. p-Hydroxybenzoesäure) als einziger C-Quelle	Wachstum	*Pseudomonas putida*
differenzierende Medien			
Amylase-Produktion	Vollmedium mit Stärke	klare Höfe um die Kolonien	*Xanthomonas campestris*
Cellulase-Produktion	Vollmedium mit löslicher Cellulose	klare Höfe um die Kolonien	*Xanthomonas campestris*
Protease-Produktion	Minimalmedium mit Magermilch	klare Höfe um die Kolonien	*Xanthomonas campestris*
Hämolyse	Medium mit Blut	klare Höfe um die Kolonien	*Streptococcus*

Tab. 7.9 **Beispiele von biochemischen Identifizierungsmethoden für Mikroorganismen.**

Test auf	*Nachweis durch*	*Testprinzip*	*Beispiele*
β-Galactosidase (Lactose-Abbau)	ONPG (Orthonitrophenyl-β-Galactosid)	Hydrolyse des künstlichen Substrates ONPG führt zur Bildung von gelbem Orthonitrophenol	positiv: *Citrobacter* negativ: *Salmonella*
Acetoinbildung bei der Vergärung von Glucose	Voges-Proskauer-Test	Alkalisierung der Nährlösung und Zusatz von Kreatin und α-Naphtol führt bei Acetoinbildung zur Rotfärbung	positiv: *Enterobacter* negativ: *Escherichia*
Citratverwertung	Trübung, pH-Indikator (Bromthymolblau)	Wachstum (= Trübung) auf Citrat als einziger C-Quelle führt zu Alkalisierung der Nährlösung, Blaufärbung	positiv: *Enterobacter* negativ: *Escherichia*
H_2S-Bildung aus schwefelhaltigen Aminosäuren oder Thiosulfat	Wachstum auf Nähragar mit hoher Eisenkonzentration	Ausfällung von schwarzem Eisensulfid bei Anwesenheit von H_2S	positiv: *Salmonella* negativ: *Escherichia*
Tryptophanase (Indolbildung aus Tryptophan)	Ehrlichs Reagenz	Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd führt bei Anwesenheit von Indol zu roter Färbung	positiv: *Escherichia* negativ: *Enterobacter*
Gemischte Säuregärung	Methylrot (pH-Indikator)	starke Säurebildung führt zu Ansäuerung der Nährlösung, Farbumschlag von gelb nach rot bei pH-Wert $< 4{,}3$	positiv: *Escherichia* negativ: *Enterobacter*
Urease (Harnstoffabbau)	Wachstum auf Harnstoff-haltigem Nährmedium mit Phenolrot (pH-Indikator)	Harnstoffspaltung in 2 NH_3 + CO_2 führt zu Alkalisierung der Nährlösung, Rotfärbung	positiv: *Klebsiella* negativ: *Escherichia*
Katalase (Abbau von H_2O_2)	Zugabe von H_2O_2 zu dicht gewachsener Kultur	Abbau von H_2O_2 zu H_2O + O_2 Blasenbildung	positiv: *Bacillus* negativ: *Clostridium*
Cytochrom-c-Oxidase	Wursters Reagenz	Oxidation des künstlichen Elektronenakzeptors Tetramethyl-p-phenylendiamin führt nach 5 bis 10 Sekunden zu Blaufärbung	positiv: *Pseudomonas* negativ: *Escherichia*

Diese Verfahren werden häufig zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie oder für die medizinische Diagnostik eingesetzt. Man unterscheidet **nicht selektive Differentialnährböden**, die nur den Indikator enthalten, und **selektive Differentialnährböden**, die entweder noch einen zusätzlichen Hemmstoff enthalten wie die Selektivmedien zur Anreicherung von Mikroorganismen (S. 294), oder auf denen nur Mikroorganismen mit bestimmten physiologischen Fähigkeiten wachsen können (Tab. 7.**8**, Tab. 7.**9**). Flüssige Differentialmedien in miniaturisierter Form werden für die schnelle Unterscheidung von morphologisch sehr ähnlichen Bakterien, z. B. der verschiedenen Enterobacteriaceae, verwendet. Man impft dazu Reagenzgläser, die unterschiedliche Differentialmedien enthalten, gleichzeitig mit der Probe an und vergleicht das Ergebnis mit einer Referenztabelle. Wegen der in den meisten dieser Differentialmedien enthaltenen Farbindikatoren werden diese Systeme als **Bunte Reihen** bezeichnet.

7.5.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Zur **Identifizierung** und **taxonomischen Einordnung** von Mikroorganismen existieren verschiedene molekularbiologische Methoden. Dazu zählen vor allem in der medizinischen Diagnostik **immunologische Methoden**, mit denen bestimmte Antigene der Mikroorganismen nachgewiesen werden. Gängige Methoden für Untersuchungen der Nucleinsäuren sind die Bestimmung des **GC-Gehaltes** (S. 61, 🕮*Genetik*), **Hybridisierungen** (S. 63, 🕮*Genetik*) sowie der Vergleich von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsenzyme erzeugt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, **RFLP**, 🕮*Genetik*). **Sequenzanalysen** bestimmter Nucleinsäureabschnitte ermöglichen Rückschlüsse auf die Verwandtschaft von Mikroorganismen (S. 64).

Identifizierung von Mikroorganismen: Bestimmung von morphologischen, physiologischen und molekularen Eigenschaften an lebenden oder fixierten Zellen.
Mikroskopische Untersuchungen: Lebendbetrachtung von Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop, gefärbte Zellpräparate im Lichtmikroskop.
Färbetechniken: Einfachfärbung zur Darstellung von Geißeln, Kapseln und Speicherstoffen; Differentialfärbungen zur Unterscheidung verschiedener Bakterien, z. B. Gramfärbung.
Untersuchung von Stoffwechselprozessen: Ermittlung der physiologischen Fähigkeiten durch Kultivierung auf Differentialnährböden:
- **Nicht selektive Differentialnährböden:** Enthalten nur Indikator.
- **Selektive Differentialnährböden:** Enthalten Indikator und Hemmstoffe oder ermöglichen nur das Wachstum bestimmter Mikroorganismen.

Molekularbiologische Untersuchungen: Nachweis von Antigenen, Charakterisierung der Nucleinsäuren durch Bestimmung von GC-Gehalt, Hybridisierung, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), Sequenzanalysen.

8 Der Energiestoffwechsel der Mikroorganismen

Marcella Eikmanns, Bernd Eikmanns

8.1 Grundprinzipien des Energiestoffwechsels

Organismen sind Energiewandler. **Phototrophe Organismen** nutzen die Energie des Sonnenlichts, **chemotrophe Organismen** die Energie, die im Verlauf einer Redoxreaktion freigesetzt wird. Der Stoffwechsel aller Organismen umfasst **Energiestoffwechsel** und **Leistungsstoffwechsel**. **ATP**, **elektrochemische Potentialdifferenzen** an Membranen und **NAD(P)H** fungieren als Energiespeicher, die im Energiestoffwechsel aufgefüllt werden und Energie für den Leistungsstoffwechsel bereitstellen.

Alle Lebewesen, so auch Mikroorganismen, sind **Energiewandler**. Sie bilden Strukturen aus, mit deren Hilfe sie sich Energiequellen ihrer Umwelt erschließen und die Energie so umwandeln, dass sie in der Zelle zur Verrichtung von Arbeit nutzbar ist. Neben Energie entnehmen Lebewesen ihrer Umwelt auch stoffliches Material. Aus diesem synthetisieren sie dann unter Energieeinsatz zelleigene Strukturen. Dies ist die Grundlage für Zellwachstum und die Produktion von Nachkommen. In Form von Wärme und Stoffwechselendprodukten werden Energie und Materie wieder an die Umwelt abgegeben. Lebewesen stehen also im **Energie- und Stoffaustausch mit ihrer Umgebung**.

Die Energieumwandlung in allen Organismen beruht auf **Redoxreaktionen**, bei denen Elektronen von einem Elektronendonor mit hoher Reduktionskraft auf einen Elektronenakzeptor mit niedriger Reduktionskraft übertragen werden. Dieser Elektronenfluss liefert die Energie zur Verrichtung von Arbeit. In Organismen, die Licht als Energiequelle nutzen, entsteht der Elektronendonor mit hoher Reduktionkraft durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung aus einem Elektronendonor mit niedriger Reduktionskraft. Alle anderen Organismen oxidieren Elektronendonoren, die sie ihrer Umwelt entnehmen.

8.1.1 Energie- und Leistungsstoffwechsel und ihre Verknüpfung

Die Gesamtheit der Stoffumsetzungen in einem Organismus wird als **Stoffwechsel** bezeichnet. Dieser setzt sich aus dem Energie- und dem Leistungsstoffwechsel zusammen. Der **Energiestoffwechsel** umfasst alle Stoffwechselwege, über die Energie bereitgestellt wird. Der **Leistungsstoffwechsel** umfasst alle Stoffwechselwege zur Synthese der Zellbausteine (Baustoffwechsel) sowie Transport- und Bewegungsvorgänge. Für den Leistungsstoffwechsel muss Energie aufgewendet werden. Die **Verknüpfung** von Energie- und Leistungsstoffwechsel

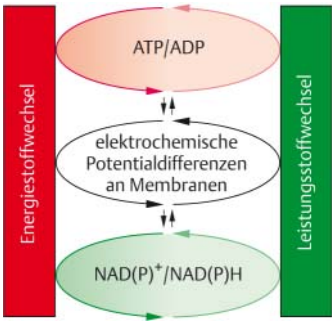


Abb. 8.**1** **Verknüpfung von Energie- und Leistungsstoffwechsel.** Alle Organismen verfügen über die intrazellulären Energiespeicher ATP, elektrochemische Potentialdifferenzen an Membranen und NAD(P)H), die durch den Energiestoffwechsel aufgeladen werden und aus denen der Leistungsstoffwechsel Energie zur Verrichtung von Arbeit entnimmt.

(Abb. 8.**1**) beruht auf zentralen **Energiespeichern**, die durch die energieliefernden Reaktionen des Energiestoffwechsels aufgefüllt werden und aus denen der Leistungsstoffwechsel Energie entnimmt. In allen Organismen übernehmen **Adenosintriphosphat** (**ATP**, Abb. 8.**2**), durch **elektrochemische Potentialdifferenzen** energetisierte Membranen und reduziertes **Nicotinamidadenindinucleotid**(**phosphat**) (**NAD**(**P**)**H**, Abb. 8.**3**) die Funktion der Energiespeicherung. Ihre zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel wird dadurch unterstrichen, dass Energie von einem der Speicher in einen anderen übertragen werden kann.

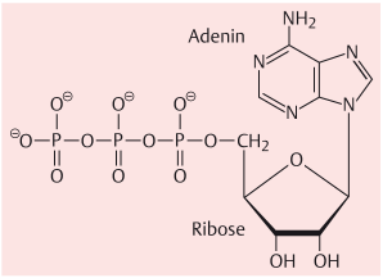


Abb. 8.**2** **Adenosintriphosphat (ATP).** ATP wird durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) gebildet. Für diese Reaktion muss Energie aufgewendet werden, sodass die ATP-Synthese nur gekoppelt an energieliefernde Reaktionen erfolgen kann. Im Leistungsstoffwechsel dient ATP durch Übertragung seiner terminalen Phosphatgruppe der Aktivierung einer Vielzahl von Verbindungen. Für diese werden dadurch Reaktionen ermöglicht, die ohne Aktivierung nicht erfolgen könnten. Eine Reihe von primären Transportsystemen (S. 398) nutzen die bei der hydrolytischen Abspaltung der terminalen Phosphatgruppe des ATPs frei werdende Energie zum Aufbau elektrochemischer Potentialdifferenzen an Membranen.

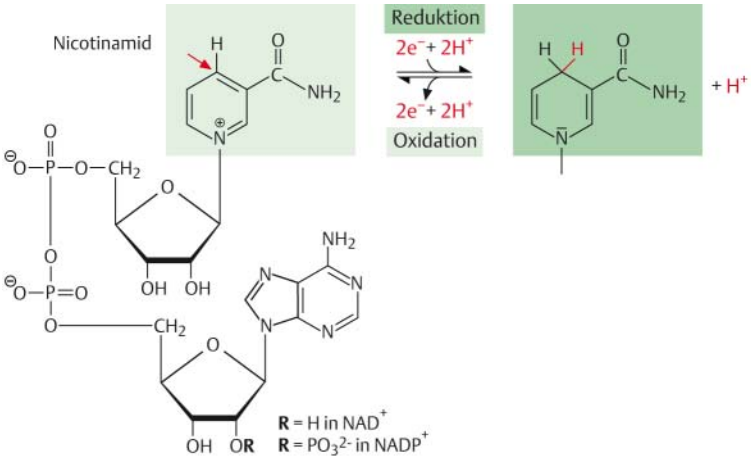


Abb. 8.3 **Nicotinamidadenindinucleotide NAD/H und NADP/H.** Die Nicotinamidadenindinucleotide fungieren als Elektronenüberträger bei Redoxreaktionen. Reduktion und Oxidation erfolgt am Nicotinamid. Sie übernehmen die Elektronen, die bei Oxidationsschritten im Energiestoffwechsel anfallen, und stellen Elektronen mit hoher Reduktionskraft für Reduktionsreaktionen bereit. NADPH liefert Elektronen für reduktive Schritte des Baustoffwechsels. Die Reoxidation von NADH ist Teil des Energiestoffwechsel, erfolgt häufig an Membranen und ist dann mit dem Transport von Ionen und daraus resultierend mit dem Aufbau elektrochemischer Potentialdifferenzen verknüpft. Die in Form elektrochemischer Potentialdifferenzen gespeicherte Energie kann zur Synthese von ATP genutzt werden. Durch Transhydrogenierung können Elektronen zwischen NAD/H und NADP/H ausgetauscht werden.

Stoffwechsel: Gesamtheit der Stoffumsetzungen eines Lebewesens.
Energiestoffwechsel: Stoffwechselwege, die der Energiebereitstellung in einer Zelle dienen.
Leistungsstoffwechsel: Baustoffwechsel (Stoffwechselwege zur Synthese neuen Zellmaterials); Transportvorgänge an Membranen; Bewegung.
ATP: Adenosintriphosphat.
Elektrochemische Potentialdifferenz: Energiespeicherung an Membranen.
NAD(P)H: Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat), stellt Elektronen mit hoher Reduktionskraft bereit.

8.1.2 Stoffwechselvielfalt der Mikroorganismen

Mikroorganismen und hier insbesondere die Bakterien haben vielfältige Mechanismen der Energie- und Stoffumwandlung entwickelt. Es können verschiedene **Stoffwechseltypen** beschrieben werden, die sich in Bezug auf die genutzte **Energiequelle**, die als **Elektronendonor** der energieliefernden Redoxreaktion bzw.

die zur Reduktion von $NADP^+$ genutzte Verbindung und die als **Kohlenstoffquelle** im Baustoffwechsel verwendete Verbindung unterscheiden. Als **phototroph** werden Organismen bezeichnet, die Licht als Energiequelle nutzen. **Chemotroph** sind dagegen Organismen, die sich die Oxidation eines in ihrer Umwelt vorgefundenen Elektronendonors zu Nutze machen. Verwendet ein Organismus einen anorganischen Elektronendonor wird er als **lithotroph**, bei Verwendung eines organischen Elektronendonors wird er als **organotroph** bezeichnet. Alle Organismen benötigen außerdem einen Elektronendonor für die Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH, um Elektronen für reduktive Schritte des Baustoffwechsels bereitzustellen. Bei den chemotrophen Organismen ist dieser Elektronendonor in der Regel identisch mit dem Elektronendonor der energieliefernden Redoxreaktion. Entsprechend der im Baustoffwechsel als Kohlenstoffquelle genutzten Verbindung wird zwischen **autotrophen** Organismen, die zur Synthese der Zellbausteine überwiegend CO_2 nutzen, und **heterotrophen** Organismen, die dazu überwiegend organische Verbindungen verwenden, unterschieden (Tab. 8.**1**).

Phototrophe Organismen wandeln Lichtenergie in chemische Energie um. Dabei wird die Energie letztlich in den Bindungen organischer Moleküle festgelegt. Dieser Prozess wird als **Photosynthese** bezeichnet. Phototrophe Organismen sind die primären Produzenten organischer Verbindungen, die chemoorganotrophen Organismen als Nahrung dienen. Zu den phototrophen Prokaryoten zählen die Cyanobakterien (früher Blaualgen), die Purpurbakterien, die Grünen Bakterien und die Heliobakterien. Die Cyanobakterien nutzen, wie auch alle phototrophen Eukaryoten, Wasser (H_2O) als Elektronendonor. Alle anderen phototrophen Prokaryoten beziehen Elektronen aus anderen Verbindungen, sie nutzen z. B. Schwefelwasserstoff (H_2S bzw. HS^-), molekularen Schwefel (S_0), molekularen Wasserstoff (H_2) oder auch organische Moleküle als Elektronendonor. Bei Verwendung anorganischer Verbindungen als Elektronendonor wird ein Organismus als **photolithotroph** bezeichnet, fungiert eine organische Verbindung als Elektronendonor, so handelt es sich um einen **photoorganotrophen** Organismus.

Chemotrophe Organismen katalysieren die kontrollierte Oxidation eines Elektronendonors und die Reduktion eines Elektronenakzeptors, also eine

Tab. 8.**1** **Stoffwechseltypen.**

Stoffwechseltyp	*Energiequelle*	*Elektronendonor*	*Kohlenstoffquelle*
photolithoautotroph	Licht	anorganische Verbindung	CO_2
photoorganoheterotroph	Licht	organische Verbindung	organische Verbindung
chemolithoautotroph	Redoxreaktion	anorganische Verbindung	CO_2
chemolithoheterotroph	Redoxreaktion	anorganische Verbindung	organische Verbindung
chemoorganoheterotroph	Redoxreaktion	organische Verbindung	organische Verbindung

Redoxreaktion, und nutzen die dabei freigesetzte Energie zum Aufbau eines Membranpotentials und zur Synthese von ATP.

Chemolithotrophe Organismen oxidieren anorganische Elektronendonoren wie H_2, Ammonium (NH_4^+), Nitrit (NO_2^-), H_2S, Fe^{2+}-Ionen oder Kohlenmonoxid (CO) in der Regel mit Sauerstoff (O_2) als Elektronenakzeptor. Einige Organismen können auch Nitrat (NO_3^-) oder Sulfat (SO_4^{2-}) als Elektronenakzeptor benutzen. Den Kohlenstoff für den Baustoffwechsel beziehen nahezu alle chemolithotrophen Organismen aus Kohlendioxid (CO_2), sie sind also autotroph. Chemolithotrophie ist eine ausschließlich von Prokaryoten entwickelte Lebensweise.

Chemoorganotrophe Organismen oxidieren einen organischen Elektronendonor und sind daher in Bezug auf ihre Nahrung auf die Biosyntheseleistung anderer Organismen angewiesen. Als Elektronenakzeptor können sowohl anorganische als auch organische Verbindungen verwendet werden. Die organische Verbindung, die als Elektronendonor im Energiestoffwechsel fungiert, dient in der Regel auch als Kohlenstoffquelle für den Baustoffwechsel. Chemoorganotrophe Organismen sind daher heterotroph. Wird im Energiestoffwechsel chemoorganotropher Organismen ein externer, also in der Umwelt vorgefundener Elektronenakzeptor verwendet, so spricht man von **Atmung** (Abb. 8.**4a**). Entsprechend ist auch der Energiestoffwechsel bei chemolithotropher Lebensweise (s. o.) als Atmung zu bezeichnen. Bei aerober Atmung ist Sauerstoff (O_2), bei anaerober Atmung NO_3^-, SO_4^{2-} oder Fumarat der Elektronenakzeptor. Als **Gärung** (Abb. 8.**4b**) bezeichnet man im Unterschied dazu den Energiestoffwechsel von chemoorganotrophen Organismen, die organische Verbindungen unter anaeroben Bedingungen oxidieren und ein organisches Zwischenprodukt als Akzeptor für

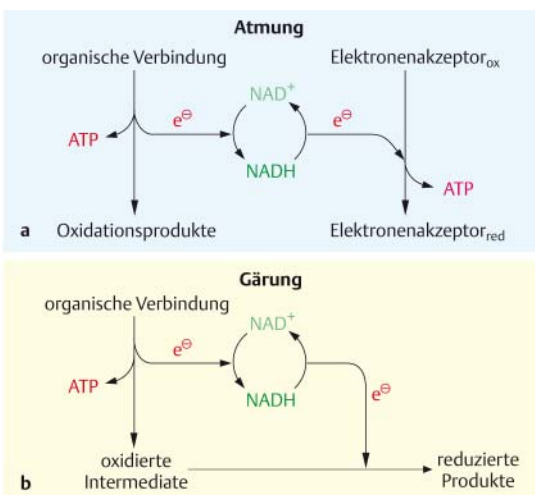


Abb. 8.**4** **Chemoorganotrophie: Vergleich Atmung und Gärung.** Wird im Energiestoffwechsel eine organische Verbindung oxidiert, so kann entweder eine extrazellulär vorgefundene Verbindung (**a**; Atmung) oder eine intrazellulär durch Oxidation aus dem Elektronendonor entstehende organische Verbindung (**b**; Gärung) als Elektronenakzeptor dienen. Bei der Gärung wird ATP durch lösliche Enzyme gebildet, bei der Atmung entsteht es in erster Linie durch die Aktivität einer membranständigen ATP-Synthase.

die bei der Oxidation anfallenden Elektronen verwenden. Der Abbau organischer Verbindungen im Energiestoffwechsel chemoorganotropher Organismen wird als **Katabolismus** bezeichnet. Als **Anabolismus** bezeichnet man dagegen in allen Organismen die Stoffwechselwege zur Synthese neuen Zellmaterials.

Phototrophie, phototrophe Lebensweise: Nutzung von Licht als Energiequelle.
Chemotrophie, chemotrophe Lebensweise: Nutzung der von einer Redoxreaktion gelieferten Energie.
Lithotrophie: Nutzung eines anorganischen Elektronendonors.
Organotrophie: Nutzung eines organischen Elektronendonors.
Autotrophie: Vorwiegende Nutzung von CO_2 als C-Quelle für die Neusynthese von Zellmaterial.
Heterotrophie: Vorwiegende Nutzung organischer Verbindungen als C-Quelle für die Neusynthese von Zellmaterial.
Photosynthese: Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie.
Katabolismus: Stoffwechselwege zum Abbau organischer Verbindungen im Energiestoffwechsel (chemoorganotrophe Lebensweise).
Anabolismus: Stoffwechselwege zum Aufbau von Zellmaterial.
Atmung: Nutzung eines externen, in der Umwelt vorgefundenen Elektronenakzeptors.
Gärung: Oxidation organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen, Nutzung eines organischen Zwischenprodukts als Elektronenakzeptor.

8.2 Bioenergetische Grundlagen

Chemische Reaktionen streben einem **Gleichgewichtszustand** zu. **Spontane Reaktionen** sind **exergon**. Sie sind mit einer Abnahme der Freien Energie ($\mathbf{\Delta G < 0}$) verbunden. Der ΔG-Wert gibt den Energiebetrag an, der Arbeit leisten kann. Eine Reaktion ist **endergon**, wenn sie mit einer Zunahme der Freien Energie ($\mathbf{\Delta G > 0}$) verknüpft ist. Eine solche Reaktion kann nur dann ablaufen, wenn dem Reaktionssystem Freie Energie von außen zugeführt wird. Die **Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen** ($\mathbf{\Delta G^0}$ bei pH 0, $\mathbf{\Delta G^{0\prime}}$ bei pH 7, in J mol^{-1}) bezieht sich auf die Standardbedingungen: Temperatur 25 °C, Druck 1 bar, Konzentration der Reaktionspartner 1 mol l^{-1}. **Redoxreaktionen** sind gekoppelte Reduktions-/Oxidationsreaktionen, bei denen ein **Elektronendonor** durch Elektronenabgabe oxidiert und ein **Elektronenakzeptor** durch Elektronenaufnahme reduziert wird. Die Fähigkeit einer Verbindung, Elektronen aufzunehmen bzw. abzugeben wird mit Hilfe des **Redoxpotentials** (Standard-Redoxpotential $\mathbf{E^0}$ bei pH 0, $\mathbf{E^{0\prime}}$ bei pH 7, in V) quantitativ beschrieben. Der Betrag Freier Energie, der von einer Redoxreaktion geliefert oder benötigt wird, ist direkt proportional zur **Differenz der Redoxpotentiale** ($\mathbf{\Delta E}$) der Reaktionspartner. Bei ungleicher Verteilung einer geladenden Verbindung, eines Ions, in zwei benachbarten Kompartimenten

existieren für dieses Ion ein **chemischer Gradient** und eine **elektrische Potentialdifferenz $\Delta\Psi$ (in V)**, die zusammen eine **elektrochemische Potentialdifferenz $\Delta\mu_{Ion}$ (in V)** bilden. Der Abbau von Konzentrations- und Ladungsunterschieden ist ein spontaner Prozess, der Freie Energie zur Verrichtung von Arbeit bereitstellt.

Jede bei konstanter Temperatur und konstantem Druck erfolgende Reaktion ist mit einer Änderung der **Freien Energie ΔG** (J mol^{-1}) verbunden (*Biochemie, Zellbiologie*). Der ΔG-Wert einer Reaktion gibt Auskunft darüber, ob eine Reaktion spontan erfolgen kann oder nicht. Bei einer spontan ablaufenden Reaktion kommt es zu einer Abnahme der Freien Energie des Systems. Die Reaktion besitzt einen negativen ΔG-Wert und wird als **exergon** bezeichnet. Der ΔG-Wert gibt den Energiebetrag an, den die Reaktion zur Arbeitsleistung bereitstellt. Besitzt eine Reaktion einen positiven ΔG-Wert, so wird sie als **endergon** bezeichnet. Bei einer derartigen Reaktion nimmt die Freie Energie des Systems zu. Sie läuft ohne Zuführung von Freier Energie von außen nicht ab.

Die Änderung der Freien Energie im Verlauf einer Reaktion ist mit einer Veränderung des Wärmegehalts und des Ordnungszustandes des Reaktionssystems verknüpft. Dieser Zusammenhang wird quantitativ durch die **Gibbs-Helmholtz-Gleichung** beschrieben:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad (8.1)$$

ΔH = Enthalpieänderung (J mol^{-1}); T = absolute Temperatur (K); ΔS = Entropieänderung (J mol^{-1} K^{-1}).

Die **Enthalpieänderung ΔH** gibt den Wärmeumsatz der Reaktion (bei konstantem Volumen) an. Reaktionen, die Wärme freisetzen ($\Delta H < 0$) werden als **exotherm** bezeichnet, solche bei denen Wärme aufgenommen wird ($\Delta H > 0$), als **endotherm**. Das Produkt aus absoluter Temperatur T und der **Entropieänderung ΔS** bei der Reaktion stellt ebenfalls einen Energieterm dar. Dieser beschreibt, ob eine Reaktion mit einer Zunahme ($\Delta S > 0$) oder einer Abnahme ($\Delta S < 0$) der Unordnung im betrachteten System verbunden ist. Erst die Summe aus Wärmeumsatz und Entropieänderung entscheidet darüber, ob ein Prozess spontan abläuft ($\Delta G < 0$) oder nicht ($\Delta G > 0$).

Organismen versorgen sich aus ihrer Umwelt mit Freier Energie und nutzen diese zum Aufbau und der Erhaltung ihrer Zellstrukturen, sowie zur Weitergabe von Strukturen und Informationen an ihre Nachkommen. Der Ordungszustand im Inneren der Organismen nimmt dabei zu (Abnahme der Entropie). Zugleich geben Organismen Wärme und Stoffwechselendprodukte an ihre Umwelt ab. Dadurch kommt es dort zu einer größeren Abnahme des Ordnungszustandes (Zunahme der Entropie). Die beiden **Hauptsätze der Thermodynamik** (1. Energie kann weder erschaffen noch vernichtet werden; 2. Energiewandlung ist stets mit

einer Zunahme der Entropie des Universums verbunden) werden also durch die Aktivitäten von Lebewesen nicht verletzt.

8.2.1 Änderung der Freien Energie im Verlauf einer chemischen Reaktion

Jede chemische Reaktionen strebt einem **Gleichgewichtszustand** zu. Ist dieser erreicht, erfolgen Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit und die Konzentrationen der Reaktanten verändern sich nicht mehr. Der Gleichgewichtszustand einer bestimmten Reaktion ist durch seine **Gleichgewichtskonstante K** charakterisiert. Diese gibt das Verhältnis der Konzentrationen der Produkte zu den Konzentrationen der Ausgangsverbindungen im Gleichgewichtszustand an.

Allgemeines Beispiel für eine chemische Reaktion ist die Bildung der Verbindungen C und D aus den Verbindungen A und B (Hinreaktion), bzw. die Bildung von A und B aus C und D (Rückreaktion):

$$A + B \leftrightarrow C + D$$

Die Gleichgewichtskonstante der Hinreaktion (Bildung der Produkte C und D aus den Ausgangsverbindungen A und B) wird durch folgende Gleichung angegeben:

$$K = \{[C]_{Gl}\,[D]_{Gl} / [A]_{Gl}\,[B]_{Gl} \qquad (8.2)$$

$[X]_{Gl}$: Gleichgewichtskonzentration der Verbindung X (mol l^{-1})

Weichen die tatsächlichen Konzentrationen der Verbindungen von den Gleichgewichtskonzentrationen ab, so findet ein **spontaner Nettoumsatz** statt, der mit einer **Abnahme der Freien Energie** (**ΔG**) verbunden ist. Der ΔG-Wert ist ein Maß für die Triebkraft, die das Reaktionssystem in Richtung des Gleichgewichts treibt. Wie stark die Freie Energie abnimmt, hängt von den Konzentrationen der Reaktionspartner, aber auch von Druck und Temperatur ab. Um verschiedene Reaktionen miteinander vergleichen zu können, gibt man für diese gewöhnlich die **Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen** (ΔG^0) in Joule pro Mol umgesetzter Verbindung an. Die **Standardbedingungen** sind definitionsgemäß: Temperatur T = 298 K (= 25 °C), Druck p = 1 bar, Konzentration der Reaktionspartner 1 mol l^{-1}. Wird zusätzlich ein pH-Wert von 7 festgelegt, so wird für die Änderung der Freien Energie der $\Delta G^{0\prime}$-Wert angegeben. Die entsprechende Reaktion besitzt dann eine als K′ bezeichnete Gleichgewichtskonstante, in die die Protonenkonzentration von 10^{-7} mol l^{-1} einbezogen ist.

Eine Möglichkeit zur **Bestimmung des ΔG^0-Wertes einer Reaktion** beruht auf der Verwendung der **Freien Standardbildungsenergien ΔG_B^0** der Reaktionspartner, die experimentell ermittelt werden können. Die Freie Standardbildungsenergie einer Verbindung gibt die Veränderung der Freien Energie bei ihrer Bildung aus den Elementen unter Standardbedingungen in Joule pro Mol gebildeter Verbindung an. Die Freie Energie der Elemente im Standardzustand ist dabei definitionsgemäß gleich Null. Der ΔG^0-Wert einer

Reaktion ergibt sich als Differenz der Freien Standardbildungsenergien der Reaktionsprodukte und der Freien Standardbildungsenergien der Ausgangsverbindungen.

Für die Hinreaktion der oben angegebenen Reaktion (A + B → C + D) errechnet sich der ΔG^0-Wert dann wie folgend:

$$\Delta G^0 = [\Delta G_B^0\,(C) + \Delta G_B^0\,(D)] - [\Delta G_B^0\,(A) + \Delta G_B^0\,(B)] \quad (8.3)$$

oder allgemein ausgedrückt

$$\Delta G^0 = \Sigma\, \Delta G_B^0\,(\text{Produkte}) - \Sigma\, \Delta G_B^0\,(\text{Ausgangsverbindungen}) \quad (8.4)$$

(Tabelle Freie Standardbildungsenergien biologisch relevanter Verbindungen siehe Anhang)

Berechnung des ΔG^0- und $\Delta G^{0\prime}$-Wertes der Bildung von Milchsäure aus Glucose (Grundlage des **Energiestoffwechsels der Milchsäurebakterien**) mittels der Freien Standardbildungsenergien ΔG_B^0 von Ausgangsverbindungen und Produkten:

8

Glucose → 2 Lactat + 2 H^+

ΔG_B^0 (Glucose) = –917 kJ mol^{-1}

ΔG_B^0 (Lactat) = –518 kJ mol^{-1}

ΔG_B^0 (H^+, pH 0) = 0

ΔG_B^0 (H^+, pH 7) = –40 kJ mol^{-1}

Für pH = 0:

$\Delta G^0 = 2\,(-518\text{ kJ mol}^{-1}) - (-917\text{ kJ mol}^{-1})$

$\Delta G^0 = -119\text{ kJ mol}^{-1}$

Für pH = 7:

$\Delta G^{0\prime} = [2\,(-518\text{ kJ mol}^{-1}) + 2\,(-40\text{ kJ mol}^{-1})] - (-917\text{ kJ mol}^{-1})$

$\Delta G^{0\prime} = -199\text{ kJ mol}^{-1}$

Die Reaktion ist also sowohl bei pH 0 als auch bei pH 7 exergon. Bei pH 0 liefert sie einen Betrag der Freien Energie von 119 kJ, bei pH 7 von 199 kJ pro Mol umgesetzter Glucose.

Liegen Ausgangsverbindungen und Produkte einer Reaktion nicht in Konzentrationen von 1 mol l^{-1} vor, so wird der ΔG-Wert unter diesen Bedingungen vom $\Delta G^{0\prime}$-Wert abweichen. In die Berechnung des ΔG-Wertes geht dann der Quotient der tatsächlich vorliegenden Konzentrationen von Endprodukten und Ausgangsverbindungen (Q) ein.

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + RT \ln [C][D]/[A][B] = \Delta G^{0\prime} + RT \ln Q \quad (8.5)$$

R = allgemeine Gaskonstante (8,314 J K^{-1} mol^{-1})

Bei Verwendung des $\Delta G^{0\prime}$-Wertes muss für den Quotienten Q die Protonenkonzentration nicht mehr berücksichtigt werden. Liegen alle Reaktionspartner in einer Konzentration von 1 mol l^{-1} vor, so ist $\Delta G = \Delta G^{0\prime}$. Beträgt das Konzentrationsverhältnis von Endprodukten zu Ausgangverbindungen 10:1 bzw. 1:10 so

ist der ΔG-Wert gleich dem um 5,7 kJ mol^{-1} (RT ln 10 bzw. RT ln 0,1) erhöhten bzw. erniedrigten $\Delta G^{0\prime}$-Wert

Berechnung des ΔG-Wertes der **Bildung von Milchsäure aus Glucose unter physiologischen Bedingungen** (pH 7; Glucose = 10^{-2} mol l^{-1}, Lactat = 10^{-2} mol l^{-1}) mit Hilfe von Gl. 8.5:

$Q = (10^{-2} \cdot 10^{-2})/(10^{-2})$

$\Delta G^{0\prime} = -199$ kJ mol^{-1}

$\Delta G = -199$ kJ $mol^{-1} + RT \ln 10^{-2}$

$\Delta G = -210$ kJ mol^{-1}

Befindet sich eine Reaktion im Gleichgewicht, so findet kein Nettoumsatz der Reaktionspartner mehr statt. Der Konzentrationsquotient Q ist dann identisch mit der Gleichgewichtskonstanten K′. Die Freie Energie des Systems verändert sich nicht mehr, der ΔG-Wert ist gleich Null. Mit Q = K′ und ΔG = 0 ergibt sich aus Gl. 8.5 dann folgender Zusammenhang zwischen dem $\Delta G^{0\prime}$-Wert und der Gleichgewichtskonstanten K′ einer Reaktion:

$$\Delta G^{0\prime} = -RT \ln K' \qquad (8.6)$$

Der $\Delta G^{0\prime}$-Wert einer Reaktion kann also auch aus der Gleichgewichtskonstante K′, die sich aus den experimentell bestimmbaren Gleichgewichtskonzentrationen der beteiligten Reaktionspartner ergibt, berechnet werden.

Gl. 8.6 macht deutlich, dass der $\Delta G^{0\prime}$-Wert einer Reaktion ein Ausdruck für deren Gleichgewichtslage ist. Reaktionen, deren Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Produkte liegt ($K' > 1$), sind unter Standardbedingungen, d. h. wenn die Reaktionspartner in einer Konzentration von 1 mol l^{-1} vorliegen, exergon. Die Reaktionen werden dann in Richtung der Produktbildung ablaufen und Freie Energie liefern ($\Delta G^{0\prime} < 0$). Reaktionen, deren Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Ausgangsverbindungen ($K' < 1$) liegt, sind dagegen endergon ($\Delta G^{0\prime} > 0$). Bei diesen Reaktionen wird unter Standardbedingungen die Rückreaktion zu den Ausgangsverbindungen spontan erfolgen.

Aus Gl. 8.5 und Gl. 8.6 kann für die Änderung der Freien Energie unter Nicht-Standardbedingungen (ΔG) abgeleitet werden:

$$\Delta G = -RT \ln K' + RT \ln Q = -RT \ln K'/Q \qquad (8.7)$$

Der ΔG-Wert einer Reaktion wird also vom Verhältnis des Konzentrationsquotienten im Gleichgewicht K′ zum vorliegenden Konzentrationsquotienten Q bestimmt.

$Q < K$: $\Delta G < 0$. Die Reaktion zur Produktbildung ist exergon, erfolgt also spontan und liefert Energie zur Verrichtung von Arbeit.

$Q = K$: $\Delta G = 0$. Die Reaktion ist im Gleichgewicht.

$Q > K$: $\Delta G > 0$. Die Reaktion zur Produktbildung ist endergon, kann also nur erfolgen, wenn dem System von außen Energie zugeführt wird.

$Q = 1$: $\Delta G = \Delta G^{0\prime}$

Die **ATP-Synthese** erfolgt in allen Organismen durch **Phoshorylierung von ADP**:

$ADP + P_i \rightarrow ATP$

Die Reaktion besitzt einen **$\Delta G^{0\prime}$-Wert von 32 kJ mol^{-1}**, sie ist also unter Standardbedingungen endergon. Mit Hilfe der intrazellulären Konzentrationen von ATP, ADP und Pi, die für einige Zellarten ermittelt wurden, kann der **ΔG-Wert** der Reaktion **unter physiologischen Bedingungen** abgeschätzt werden (Berechnung gemäß Gl. 8.5):

$[ATP] = 10^{-2}$ mol l^{-1}

$[ADP] = 10^{-3}$ mol l^{-1}

$[P_i] = 10^{-2}$ mol l^{-1}

$\Delta G^{0\prime} = 32$ kJ mol^{-1}

$\Delta G = 32$ kJ mol^{-1} + RT ln $[(10^{-2})/(10^{-3} \times 10^{-2})]$

$\Delta G = 32$ kJ mol^{-1} + (2,478 kJ mol^{-1} · ln 10^3)

$\Delta G = 49$ kJ mol^{-1}

Der Energiebetrag von **49 kJ mol^{-1}** muss in der Zelle aufgebracht werden, um dort die Phosphorylierung von ADP zu ATP zu ermöglichen. Die umgekehrte Reaktion, die Hydrolyse von ATP zu ADP, ist exergon und stellt den gleichen Betrag Freier Energie zur Verrichtung von Arbeit zur Verfügung.

8

8.2.2 Redoxreaktionen und das Redoxpotential

Redoxreaktion sind Reaktionen, in deren Verlauf es zur Übertragung von Elektronen von einem **Elektronendonor** auf einen **Elektronenakzeptor** kommt (*Biochemie, Zellbiologie*). Der Entzug von Elektronen wird als **Oxidation**, die Aufnahme von Elektronen als **Reduktion** bezeichnet.

Die Redoxreaktion

$A_{red} + B_{ox} \leftrightarrow A_{ox} + B_{red}$

kann in Form von zwei Halbreaktionen, einer Oxidation und einer Reduktion, formuliert werden:

$A_{red} \leftrightarrow A_{ox} + n_e$

Die Verbindung A wird oxidiert, sie dient als Elektronendonor

$B_{ox} + n_e \leftrightarrow B_{red}$

Die Verbindung B wird reduziert, sie dient als Elektronenakzeptor
n_e ist die Anzahl der übertragenen Elektronen.

A_{ox}/A_{red} und B_{ox}/B_{red} bilden jeweils ein **Redoxpaar**. Jedes Redoxpaar besitzt in unterschiedlich starker Ausprägung die Neigung, Elektronen aufzunehmen oder abzugeben. Mit Hilfe des **Standard-Redoxpotentials E^0** (V) wird die Stärke der Elektronenaffinität eines Redoxpaares quantitativ beschrieben, es bezieht

sich auf eine Konzentration von oxidierter und reduzierter Form von 1 mol l^{-1} und kann mit Hilfe einer **elektrischen Zelle** experimentell ermittelt werden.

Die **elektrische Zelle** besteht aus zwei Halbzellen, der Bezugszelle und der Messzelle: Die **Bezugszelle** wird von der **Normalwasserstoffelektrode** gebildet, einer Elektrode, die in eine wässrige Lösung mit einer Protonenkonzentration von 1 mol l^{-1} (pH-Wert 0) eintaucht und von molekularem Wasserstoff (gasförmig, 1 atm) umspült wird. Das Redoxpotential dieser Halbzelle ($E^{0\prime}$ von H^+/H_2, Halbreaktion: $2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow H_2$), wird als 0,0 V definiert. Die **Messzelle** wird von einer Elektrode gebildet, die in eine wässrige Lösung mit einer Konzentration der oxidierten und der reduzierten Form des zu untersuchenden Redoxpaares von 1 mol l^{-1} eintaucht. Das **Standard-Redoxpotential E^0** des Redoxpaares entspricht der Potentialdifferenz (V), die zwischen diesen beiden Elektroden gemessen werden kann. Werden die beiden Elektroden zu einem Stromkreis verbunden, so fließen Elektronen entweder von der Messelektrode zur Bezugselektrode oder umgekehrt: Das Redoxpotential eines Redoxpaares, das unter Standardbedingungen in der Lage ist, Elektronen an die Bezugselektrode abzugeben, erhält ein negatives Vorzeichen. Fließen die Elektronen dagegen von der Bezugselektrode zur Messelektrode, so wird dem Redoxpotential dieses Redoxpaares ein positives Vorzeichen zugewiesen. Bei pH 7 besitzt das Redoxpaar H^+/H_2 ein Redoxpotential von –0,42 V. ◀

Ist das Standard-Redoxpotential eines Redoxpaares auf einen pH-Wert von 7 bezogen, so wird es als $\mathbf{E^{0\prime}}$ bezeichnet.

Liegen oxidierte und reduzierte Form eines Redoxpaares nicht in der Standardkonzentration von 1 mol l^{-1} vor, so kann das Redoxpotential des Redoxpaares unter diesen abweichenden Bedingungen mit Hilfe der **Nernst-Gleichung** berechnet werden:

$$E = E^0 + (RT/n_eF)\ \ln\ (C_{ox}/C_{red}) \qquad (8.8)$$

n_e = Anzahl der pro Molekül übertragenen Elektronen
F = Faraday-Konstante (96,5 kJ V^{-1} mol^{-1})
C_{red} = Konzentration reduzierte Form der Verbindung
C_{ox} = Konzentration oxidierte Form der Verbindung

Bei Übertragung eines Elektrons führt die Veränderung des Konzentrationsverhältnisses von oxidierter zu reduzierter Form um einen Faktor von 10 zur Erhöhung oder Erniedrigung des Redoxpotentials um (RT/F) ln 10 = 59 mV.

Bei einer spontan erfolgenden **Redoxreaktion** zwischen zwei Verbindungen wird stets das Redoxpaar mit niedrigerem Redoxpotential als Elektronendonor und das Redoxpaar mit höherem Redoxpotential als Elektronenakzeptor fungieren. Die Größe der **Redoxpotentialdifferenz ΔE** der beiden Redoxpaare ist Ausdruck für den Druck, der die Elektronen vom Donor zum Akzeptor treibt. ΔE wird konventionsgemäß als Redoxpotential des Elektronenakzeptors minus Redoxpotential des Elektronendonors berechnet und besitzt für eine spontane Reaktion

also ein positives Vorzeichen. Der ΔG-Wert einer Redoxreaktion ist proportional zur Redoxpotentialdifferenz der beteiligen Redoxpaare:

$$\Delta G = -n\ F\ \Delta E \qquad (8.9)$$

bzw. $\Delta G^0 = -n\ F\ \Delta E^0$
$\Delta G^{0\prime} = -n\ F\ \Delta E^{0\prime}$

Redoxreaktionen, die so formuliert sind, dass die Redoxpotentialdifferenz der Redoxpaare negativ ist, sind endergon.

Die **Oxidation molekularen Wasserstoffes durch Sauerstoff** bildet die Grundlage des **Energiestoffwechsels der Knallgasbakterien**: $H_2 + ½\ O_2 \rightarrow H_2O$. Über die Standard-Redoxpotentiale der beteiligten Redoxpaare lässt sich die Freie Energie der Reaktion unter Standardbedingungen berechnen.

8

$2\ H^+/H_2$: $E^{0\prime} = -0{,}42$ V

$½\ O_2/H_2O$: $E^{0\prime} = 0{,}82$ V

$\Delta E^{0\prime} = 1{,}24$ V

$\Delta G^{0\prime} = -2 \cdot 96{,}5\ \text{kJ V}^{-1}\ \text{mol}^{-1} \cdot 1{,}24$ V

$\Delta G^{0\prime} = -239\ \text{kJ mol}^{-1}$

8.2.3 Das elektrochemische Potential

Liegt eine ungeladene Verbindung in zwei von einander abgetrennten Kompartimenten in unterschiedlicher Konzentration gelöst vor, so besteht ein **chemischer Gradient**. Der Transfer eines Moles der Verbindung von Kompartiment 1 in Kompartiment 2 ist mit einer Veränderung der Freien Energie verbunden, die sich nach Gl. 8.10 berechnet.

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1 \qquad (8.10)$$

C_1, C_2 = Konzentration der Verbindung in Kompartiment 1 bzw. 2

Ist die Konzentration der Verbindung in Kompartiment 2 niedriger als in Kompartiment 1, so ist $\Delta G < 0$ und der durch den ΔG-Wert angegebene Energiebetrag steht zur Arbeitsleistung zur Verfügung. Der Transfer der Moleküle ist dann ein spontaner Prozess. Soll die Verbindung dagegen von Kompartiment 1 in Kompartiment 2 entgegen ihrem Konzentrationsgradienten transferiert werden (Konzentration in Kompartiment 2 größer als in Kompartiment 1), so wird dieser Prozess nicht spontan erfolgen, da $\Delta G > 0$. Der durch den ΔG-Wert angegebene Energiebetrag muss von außen zugeführt werden.

Eine **elektrische Potentialdifferenz Δψ** (V) besteht, wenn eine ungleiche Verteilung von Ladungen zwischen Kompartiment 1 und 2 existiert. Die Veränderung der Freien Energie beim Transfer von einem Mol Elementarladungen von

Kompartiment 1 in Kompartiment 2 kann gemäß der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\Delta G = F\,\Delta\psi \tag{8.11}$$

Ist eine geladene Verbindung ungleich zwischen den Kompartimenten 1 und 2 verteilt, so existiert für dieses Ion sowohl eine chemische als auch eine elektrische Potentialdifferenz. Die Veränderung der Freien Energie beim Transfer eines Mols des Ions von Kompartiment 1 in Kompartiment 2 setzt sich dann aus den zwei ΔG-Beträgen von Gl. 8.10 und Gl. 8.11 zusammen:

$$\Delta G = m\,F\,\Delta\psi + RT\ln C_2/C_1 \tag{8.12}$$

m = Wertigkeit des Ions

Durch Division von Gl. 8.12 durch die Faradaykonstante F erhält man einen Ausdruck für die **elektrochemische Potentialdifferenz $\Delta\mu_{Ion}$** (V).

$$\Delta\mu_{Ion} = m\,\Delta\Psi + (RT/F)\ln C_2/C_1 \tag{8.13}$$

Analog zum beschriebenen Modellsystem bilden auch der von der Cytoplasmamembran umgebene Innenraum einer Bakterienzelle und der die Zelle umgebende Außenraum ein System aus zwei voneinander abgetrennten Kompartimenten (Kompartiment 1: extrazellulärer Raum, Kompartiment 2: intrazellulärer Raum). Bei einer lebenden Bakterienzelle besteht zwischen diesen Kompartimenten eine ungleiche Verteilung von Protonen, d. h. eine **elektrochemische Potentialdifferenz für Protonen** ($\Delta\mu_{H^+}$). Diese wird auch als **protonenmotorische Kraft** (proton motive force) bezeichnet. Die Membran selbst ist praktisch undurchlässig für Ionen, sodass $\Delta\mu_{H^+}$ nicht durch passive Diffusion von Protonen durch die Membran abgebaut werden kann. Entsprechend Gl. 8.13 setzt sich $\Delta\mu_{H^+}$ aus einer elektrischen und einer chemischen Komponente zusammen:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi + (RT/F)\ln [H^+]_i/[H^+]_e \tag{8.14}$$

$[H^+]_i$: intrazelluläre Protonenkonzentration in mol l^{-1}
$[H^+]_e$: extrazelluläre Protonenkonzentration in mol l^{-1}

Die elektrische Potentialdifferenz $\Delta\Psi$ repräsentiert die elektrische Aufladung der Cytoplasmamembran, also das **Membranpotential**. Der chemische Gradient der Protonen kann nach Umwandlung des natürlichen in den dekadischen Logarithmus durch die **Differenz zwischen intrazellulärem und extrazellulären pH-Wert** (**ΔpH**) ($pH_i - pH_e$) beschrieben werden. Für $\Delta\mu_{H^+}$ ergibt sich dann folgender Ausdruck:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\Psi - (2{,}3\,RT/F)\,\Delta pH \tag{8.15}$$

Die elektrochemische Potentialdifferenz für Protonen an der Cytoplasmamembran eines Bakteriums entsteht dadurch, dass Protonen über die Membran vom Cytoplasma nach außen transportiert werden und/oder dass auf der Innen-

seite der Membran Protonen verbraucht und auf ihrer Außenseite freigesetzt werden. Entsprechend gilt in der Regel $pH_i > pH_e$, $\Delta pH > 0$. $\Delta\Psi$ wird relativ zum extrazellulären Medium gemessen und trägt daher ein negatives Vorzeichen.

Strömen Protonen ihrer elektrochemischen Potentialdifferenz folgend vom extrazellulären Raum ins Cytoplasma, so ist dies ein exergoner Prozess, der mit einer Abnahme der Freien Energie verbunden ist. Pro Mol transferierter Protonen berechnet sich dieser ΔG-Wert gemäß:

$$\Delta G = F\,\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\Psi - 2{,}3\ RT\ \Delta pH \qquad (8.16)$$

Um bei bestehendem $\Delta\mu_{H^+}$ weiter Protonen von innen nach außen zu transferieren, muss dieser Betrag Freier Energie aufgewendet werden.

8

Standardbedingungen: 298K (25 °C), 1 bar, Konzentration der Reaktionspartner 1 mol l^{-1}.
ΔG (J mol^{-1}): Änderung der Freien Energie im Verlauf einer Reaktion (Druck und Temperatur konstant); ΔG^0 (J mol^{-1}): Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen; $\Delta G^{0\prime}$ (J mol^{-1}): Änderung der Freien Energie unter Standardbedingungen, zusätzlich pH 7.
ΔG_B^0 (J mol^{-1}): Freie Standardbildungsenergie einer Verbindung; Änderung der Freien Energie bei Bildung einer Verbindung aus den Elementen unter Standardbedingungen.
exergone Reaktion: Reaktion, bei der die Freie Energie des Systems abnimmt ($\Delta G<0$).
endergone Reaktion: Reaktion, bei der die Freie Energie des Systems zunimmt ($\Delta G>0$).
ΔH (J mol^{-1}): Enthalpieänderung; Wärmeumsatz einer Reaktion (exotherme Reaktion: Reaktion, die Wärme freisetzt; endotherme Reaktion: Reaktion, bei der Wärme aufgenommen wird).
ΔS (J $mol^{-1}K^{-1}$): Entropieänderung; Änderung der Unordnung eines Systems.
Gleichgewichtszustand: Zustand einer Reaktion, bei der es keinen Nettoumsatz der Reaktionspartner mehr gibt; Hin- und Rückreaktion erfolgen mit gleicher Geschwindigkeit.
Gleichgewichtskonstante: Quotient der Konzentrationen von Produkten und Ausgangsverbindungen im Gleichgewicht.
Redoxreaktion: Gekoppelte Reduktions- und Oxidationsreaktion.
Reduktion: Aufnahme von Elektronen.
Oxidation: Abgabe von Elektronen.
Elektronendonor: Wird im Verlauf einer Redoxreaktion oxidiert, stellt Elektronen bereit.
Elektronenakzeptor: Wird im Verlauf einer Redoxreaktion reduziert, nimmt Elektronen auf.
E (V): Redoxpotential; Maß für die Neigung einer Verbindung, Elektronen aufzunehmen oder abzugeben; E^0: Redoxpotential unter Standardbedingungen; $E^{0\prime}$: Standard-Redoxpotential, zusätzlich pH 7.

ΔE (V): Differenz der Redoxpotentiale der Reaktionspartner einer Redoxreaktion.
chemische Potentialdifferenz: Beruht auf ungleicher Verteilung einer ungeladenen Verbindung in zwei Kompartimenten.
ΔΨ (V): Elektrische Potentialdifferenz; Beruht auf ungleicher Verteilung von Ladungen in zwei Kompartimenten; Membranpotential.
$\Delta\mu_{Ion}$ (V): Elektrochemische Potentialdifferenz; Beruht auf ungleicher Verteilung eines Ions in zwei Kompartimenten.
Protonenmotorische Kraft (V): $\Delta\mu_{H^+}$, elektrochemische Potentialdifferenz von Protonen an Membranen; proton motive force.

8.3 Mechanismen der Energiekonservierung

Die Energiekonservierung in Lebewesen beruht auf der **Kopplung** zwischen einer exergonen Redoxreaktion und endergonen Reaktionen. Die **ATP-Synthese** und die **Translokation von Protonen** über Membranen sind die zentralen Reaktionen der Energiekonservierung. Bei der **Substratstufenphosphorylierung** entstehen im Verlauf der Oxidation einer organischen Verbindung energiereiche, phosphorylierte Intermediate, die ihre Phosphatgruppe auf ADP übertragen können. Die Substratstufenphosphorylierung wird von löslichen Enzymen katalysiert. Die **Elektronentransportphosphorylierung** erfolgt an Membranen. Die exergone Redoxreaktion wird von einer Elektronentransportkette katalysiert, die aus Oxidoreductasen und kleineren Redoxcarriern aufgebaut ist. Diese geben die Elektronen vom Donor zum Akzeptor weiter und verknüpfen dies mit dem Transfer von Protonen über die Membran. Energiereiches Intermediat bei der Elektronentransportphosphorylierung ist die **protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$**. Der Rückstrom von Protonen durch die Kanaldomäne (F_o-Domäne) der **ATP-Synthase** liefert die Freie Energie zur ATP-Synthese, die an der F_1-Domäne des Enzyms erfolgt.

Aufgabe des Energiestoffwechsels ist es, Freie Energie für die Verrichtung von Arbeit in der Zelle zur Verfügung zu stellen. Zu diesem Zweck verknüpfen Lebewesen exergone Reaktionen mit endergonen, zur Auffüllung ihrer Energiespeicher führenden Reaktionen. Diese **Kopplung von exergonen und endergonen Reaktionen** ist Grundlage der Energiekonservierung. Ohne sie würde die von einer exergonen Reaktion gelieferte Energie in Wärme und Entropiezunahme umgewandelt und stünde nicht zur Verrichtung von Arbeit zur Verfügung. Die Kopplung ist jedoch nur möglich, wenn der von der endergonen Reaktion benötigte Betrag Freier Energie den von der exergonen Reaktion gelieferten Betrag nicht übersteigt. Der **Wirkungsgrad**, d. h. das Verhältnis von konservierter zu maximal verfügbarer Freier Energie, liegt bei biologischen Prozessen in der Regel deutlich unter 100 %.

8.3.1 Substratstufenphosphorylierung

Die Oxidation komplexer organischer Verbindungen bildet die Grundlage des Energiestoffwechsels chemoorganotropher Organismen. Im Verlauf der Oxidation werden **phosphorylierte organische Zwischenprodukte** gebildet, die in der Lage sind, ihre Phosphatgruppe auf ADP zur Bildung von ATP zu übertragen. Diese direkte Verknüpfung des Abbaus einer organischen Verbindung mit der Synthese von ATP wird als **Substratstufenphosphorylierung** bezeichnet.

Obwohl es nicht zur Freisetzung von anorganischem Phosphat kommt, kann die Übertragung der Phosphatgruppe bei der Substratstufenphosphorylierung als **Summe zweier getrennter Schritte** angesehen werden: **1. Hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe; 2. Phosphorylierung von ADP zu ATP mit anorganischem Phosphat**.

organische Verbindung-P + H_2O → organische Verbindung + P_i

ADP + P_i → ATP + H_2O

Summe: organische Verbindung-P + ADP → organische Verbindung + ATP

Die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe ist eine exergone, die Phosphorylierung von ADP mit anorganischem Phosphat eine endergone Reaktion. Durch die direkte **Übertragung der Phosphatgruppe ohne Freisetzung von anorganischem Phosphat** wird verhindert, dass die Freie Energie der Hydrolyse ohne Arbeitsleistung verpufft. Stattdessen wird sie in Form von ATP konserviert.

ATP ist in allen Organismen die zentrale **energiereiche Verbindung**, die an vielen Stellen des Stoffwechsel zur Phosphorylierung und damit Aktivierung anderer Verbindungen eingesetzt wird. Unter Standardbedingungen liefert die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i –32 kJ mol^{-1} an Freier Energie. Als energiereich werden neben ATP auch alle phosphorylierten Verbindungen bezeichnet, die einen $\Delta G^{0\prime}$-Wert für die hydrolytische Abspaltung ihrer Phosphatgruppe aufweisen, der stärker negativ als –32 kJ mol^{-1} ist (Tab. 8.**2**). Diese Verbindungen besit-

Tab. 8.**2** **Phosphorylierte Verbindungen und Coenzym A-Verbindungen.**

Reaktion	*$\Delta G^{0\prime}$ der Hydrolyse (kJ mol^{-1})*
Phosphoenolpyruvat → Pyruvat + P_i	–62
1,3-Bisphosphoglycerat → 3-Phosphoglycerat + P_i	–49
Acetylphosphat → Acetat + P_i	–44
ATP → ADP + P_i	–32
Glucose-1-phosphat → Glucose + P_i	–21
PP_i → 2P_i	–19
Glucose-6-phosphat → Glucose + P_i	–16
Acetyl-CoA → Acetat + CoA-SH	–43
Succinyl-CoA → Succinat + CoA-SH	–43

zen ein ausreichend hohes **Gruppenübertragungspotential**, das die Synthese von ATP durch Substratstufenphosphorylierung erlaubt. Energiereiche Phosphatverbindungen tragen die Phosphatgruppe entweder als **Säureanhydrid** (1,3-Bisphosphoglycerat, Acetylphosphat, ATP) oder als **Enolester** (Phosphoenolpyruvat) gebunden. Einfache Esterbindungen wie in Zuckerphosphaten sind dagegen nicht energiereich. Einen stark negativen $\Delta G^{0\prime}$-Wert bei ihrer Hydrolyse besitzt die **Thioesterbindung** (Tab. 8.**2**), über die in Coenzym A-Derivaten eine Carbonsäure (Acetat, Butyrat, Succinat, Acetacetat) an Coenzym A geknüpft ist. Die energiereiche Thioesterbindung kann durch Übertragung der Carbonsäure auf Phosphat in die Säureanhydridbindung umgewandelt werden, die dann Substratstufenphosphorylierung erlaubt. Häufig liegen auch die ersten energiereichen Intermediate bei den Oxidationsschritten der Substratstufenphosphorylierung in Form enzymgebundener Thioester vor. Durch Übertragung auf Phosphat werden sie dann als energiereiche Phosphatverbindungen freigesetzt.

8.3.2 Elektronentransportphosphorylierung

Chemoorganotrophe Organismen, die organische Verbindungen mittels anorganischer Elektronenakzeptoren oxidieren, konservieren Energie nur zum Teil über Substratstufenphosphorylierung. Ein bedeutender Anteil der Freien Energie wird erst verfügbar, wenn die dem organischen Substrat entzogenen und zur Reduktion von NAD^+ verwendeten Elektronen auf den externen Elektronenakzeptor (z. B. O_2, NO_3^-, SO_4^{2-}) übertragen werden. Dabei treten keine organischen Phosphatverbindungen als energiereiche Intermediate auf. Auch bei strikt chemolithotrophen Organismen, die an Stelle organischer Verbindungen anorganische Elektronendonoren oxidieren, und bei strikt phototrophen Organismen erfolgt die Energiekonservierung nicht über phosphorylierte Intermediate. Hier fungiert die Energetisierung einer Membran durch die **protonenmotorische Kraft** ($\Delta\mu_{H^+}$) als **primäres energiereiches Intermediat** der Energiekonservierung. Eine in der Membran lokalisierte, aus mehreren Proteinkomplexen bestehende **Elektronentransportkette** katalysiert die Übertragung der Elektronen von NADH (chemoorganotrophe Organismen), von anorganischen Elektronendonoren (chemolithotrophe Organismen) oder von einem durch die Absorption von Licht bereitgestellten Elektronendonor (phototrophe Organismen) zum Elektronenakzeptor und verbindet dies mit dem Aufbau der protonenmotorischen Kraft, meist durch den Transport von Protonen über die Membran. Die protonenmotorische Kraft wird dann von einer ebenfalls membranständigen **ATP-Synthase** genutzt. Dieses Enzym verknüpft den Rückstrom der Protonen mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP. Bei der Elektronentransportphosphorylierung besteht daher eine **chemiosmotische Kopplung** zwischen exergoner Redoxreaktion und endergoner ATP-Synthese.

Die Elektronentransportphosphorylierung chemoorganotropher Organismen wird auch als **oxidative Phosphorylierung**, ihre Elektronentransportkette als

Atmungskette bezeichnet. Bei phototrophen Organismen werden Elektronentransport und ATP-Synthese unter dem Begriff **Photophosphorylierung** zusammengefasst.

In **Prokaryoten** befindet sich die Elektronentransportkette für die oxidative Phosphorylierung und die ATP-Synthase in der **Cytoplasmamembran**. Dort oder in intrazellulären Membransystemen, die durch Einstülpung der Cytoplasmamembran entstehen, findet auch der photosynthetische Elektronentransport phototropher Bakterien statt. Abb. 8.**5** skizziert das Prinzip der Elektronentransportphosphorylierung für ein chemotrophes Bakterium. Bei **Eukaryoten** ist die Atmungskette in der inneren **Mitochondrienmembran**, die photosynthetische Elektronentransportkette in den **Thylakoidmembranen** der Chloroplasten, die sich ebenfalls von der inneren Membran dieser Organellen herleiten, lokalisiert. Der durch die Elektronentransportkette katalysierte Transfer von Protonen erfolgt bei prokaryotischen Zellen aus dem Cytoplasma heraus in den extrazellulären Raum oder ins Lumen intrazellulärer Membransysteme, bei Mitochondrien in den Raum zwischen äußerer und innerer Membran und bei Chloroplasten ins Lumen der Thylakoidmembranvesikel. Die Lokalisation von Elektronentransportkette und ATP-Synthase und die Richtung der Protonentranslokation in den jeweiligen Membransystemen in Mitochondrien und Chloroplasten steht in Einklang mit der **Endosymbiontentheorie**, wonach sich diese Organellen von Prokaryoten ableiten, die von einer Urform der eukaryotischen Zellen als Endo-

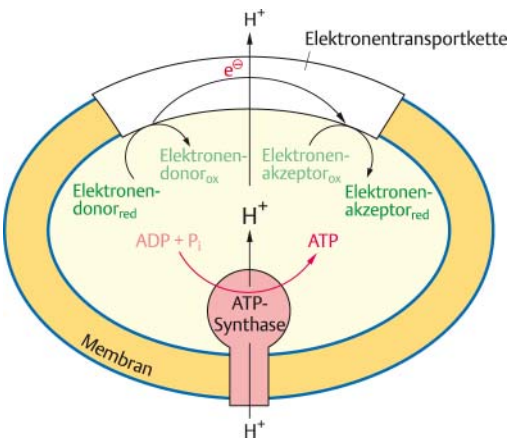


Abb. 8.**5** **Prinzip der Elektronentransportphosphorylierung.** Beim Transport der Elektronen vom Donor zum Akzeptor wird die Freie Energie der Redoxreaktion in Form der protonenmotorischen Kraft gespeichert. Diese treibt die ATP-Synthese durch die ATP-Synthase. Dargestellt ist die Situation für ein chemotrophes Bakterium. Die Bindungsstellen für Elektronendonor und -akzeptor sind auf der cytoplasmatischen Seite der Membran eingezeichnet, sie können sich jedoch je nach genutztem Elektronendonor und -akzeptor auch auf der extrazellulären Seite befinden.

symbionten aufgenommen und dadurch mit einer zweiten Membran umhüllt wurden (S. 19).

Der **Transport von Elektronen durch eine Elektronentransportkette** liefert Freie Energie, die zur **Synthese von ATP** genutzt wird.

Der **Energiebetrag**, der vom Elektronentransport bereitgestellt wird, ist proportional zur **Redoxpotentialdifferenz** zwischen **Elektronenakzeptor** und **-donor** (Gl. 8.9):

$\Delta G = -n_e \, F \, \Delta E$

$n_e = 2$; Übertragung eines Elektronenpaars vom Elektronendonor zum -akzeptor

Der **Transfer von Protonen durch die Membran** entgegen einer bestehenden elektrochemischen Potentialdifferenz für Protonen bedarf des Aufwands von Freier Energie:

$\Delta G = n_{H,ET} \, F \, \Delta\mu_{H^+}$

$n_{H,ET}$ = Anzahl der im Zuge des Transports eines Elektronenpaares durch die Membran transferierten Protonen (Gl. 8.16)

Unter der Annahme 100 %iger Energiekonservierung können die beiden Energiebeträge gleich gesetzt werden. Der **Quotient $\Delta E/\Delta\mu_{H^+}$** gibt dann an, wieviele Protonen maximal über die Membran transportiert werden können, wenn ein Elektronenpaar vom Elektronendonor zum Elektronenakzeptor weitergegeben wird.

$\Delta E/\Delta\mu_{H^+} = n_{H,ET}/n_e$

Für die **Oxidation von molekularem Wasserstoff** mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor ($H_2 + ½\ O_2 \rightarrow H_2O$; $\Delta E^{0\prime} = 1{,}24$ V), die von den Knallgasbakterien (S. 393) zur Energiekonservierung durch Elektronentransportphosphorylierung benutzt wird, errechnet sich unter der Annahme einer protonenmotorischen Kraft von 0,2 V so ein maximal möglicher $n_{H,ET}/n_e$-Quotient von ca. 12 $H^+/2\ e^-$. Der tatsächliche $n_{H,ET}/n_e$-Quotient eines Elektronentransports ist jedoch davon abhängig, wie die entsprechende Elektronentransportkette aufgebaut ist und welche $n_{H,ET}/n_e$-Stöchiometrie die einzelnen Proteinkomplexe aufweisen. So liegt der reale Wirkungsgrad der Elektronentransportphosphorylierung bei 50 – 60 %.

Der **Protonenrückstrom durch die ATP-Synthase** stellt die Freie Energie zur Bildung von ATP aus ADP und P_i zur Verfügung:

$\Delta G = n_{H,ATPase} \, F \, \Delta\mu_{H^+}$

$n_{H,ATPase}$: Anzahl der Protonen (mol), die zur Bildung eines Mols ATP die ATP-Synthase passieren müssen.

Geht man von einem Bedarf von drei bzw. vier Protonen pro gebildetem ATP und einem ΔG-Wert der ATP-Bildung unter physiologischen Bedingungen von ca. 50 kJ mol^{-1} aus, so würde eine **protonenmotorische Kraft** von ca. 0,17 V bzw. 0,13 V zur ATP-Bildung ausreichen.

Die chemiosmotische Kopplung zwischen Redoxreaktion und ATP-Synthese ermöglicht, dass auch solche Reaktionen zur Energiekonservierung genutzt werden können, die pro Molekül des im Zuge der Redoxreaktion oxidierten Elektronendonors einen geringeren Energiebetrag liefern als zur Synthese eines Moleküls ATP notwendig ist. Der von einer Reaktion bereitgestellte Energiebetrag muss jedoch ausreichen, um bei gegebener protonenmotorischer Kraft mindestens

ein Proton durch die Membran transportieren zu können. Für $\Delta\mu_{H^+}$ = 0,2 V muss die genutzte Redoxreaktion bei Übertragung von zwei Elektronen mindesten einen Energiebetrag von 19 kJ mol^{-1} bereitstellen, bzw. über eine Redoxpotentialdifferenz von 0,1 V verfügen.

Bereitstellung der Elektronen für den Elektronentransport

Chemolithotrophe, chemoorganotrophe und phototrophe Organismen stellen die Elektronen für den Elektronentransport auf unterschiedliche Weise bereit (Abb. 8.**6**). Die Oxidation des Elektronendonors erfolgt bei **chemolithotrophen Bakterien** häufig direkt an der Membran durch ein membranständiges Enzym. **Chemoorganotrophe Bakterien** oxidieren den organischen Elektronendonor

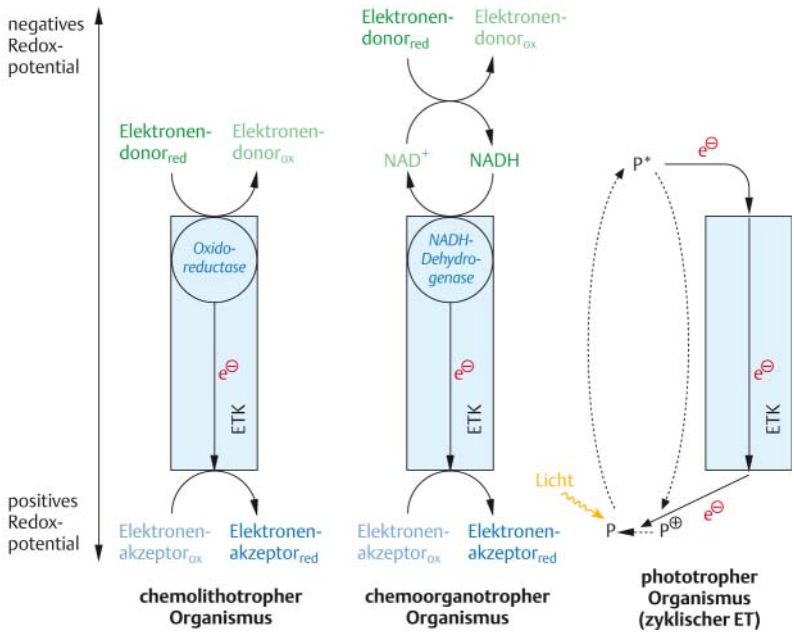


Abb. 8.**6** **Bereitstellung der Elektronen für den Elektronentransport in chemolithotrophen, chemoorganotrophen und phototrophen Organismen.** In chemolithotrophen Organismen wird der Elektronendonor in der Regel durch eine membranständige Oxidoreductase, die Teil der Elektronentransportkette ist, oxidiert. Chemoorganotrophe Organismen oxidieren organische Verbindungen mit Hilfe löslicher Dehydrogenasen, die Reduktionsäquivalente auf NAD^+ übertragen. Anschließend übernimmt die NADH-Dehydrogenase, der erste Komplex der Elektronentransportkette, die Elektronen. In phototrophen Organismen wird ein Pigmentmolekül P oxidiert, dessen Redoxpotential durch die Anregung mit Lichtenergie stark vermindert ist (Elektronendonor P^*). Nach seiner Oxidation besitzt das Pigmentmolekül wieder sein ursprüngliches Redoxpotential und kann als Elektronenakzeptor P^+ fungieren (zyklischer Elektronentransport).

dagegen im Cytoplasma mithilfe löslicher Enzyme. Die Oxidation erfolgt in Form einer **Dehydrogenierung**, bei der dem Elektronendonor zwei Elektronen und zwei Protonen, zwei sogenannte **Reduktionsäquivalente** (**2[H]**), entzogen werden. Enzyme, die Reduktionsäquivalente auf ihr Substrat übertragen oder sie ihm entziehen, werden als **Dehydrogenasen** bezeichnet. Die Dehydrogenasen der katabolen Stoffwechselwege chemoorganotropher Organismen übertragen die Reduktionsäquivalente in erster Linie auf das Coenzym NAD^+ (Abb. 8.**3**). Dieses wird dann durch eine membranständige **NADH-Dehydrogenase** reoxidiert, die den ersten Proteinkomplex der Atmungskette bildet (Komplex I, NADH-Ubichinon-Oxidoreductase, S. 362).

Phototrophe Organismen oxidieren zur Energiekonservierung ein spezielles, mit einem Proteinkomplex der photosynthetischen Membranen assoziiertes Pigmentmolekül. Dieses besitzt im Grundzustand niedrige Reduktionskraft, also ein hohes Redoxpotential. Nach Anregung durch die Absorption von Licht oder durch von benachbarten Pigmentmolekülen weitergeleitete Anregungsenergie sinkt sein Redoxpotential jedoch drastisch, sodass es dann als Elektronendonor mit hoher Reduktionskraft fungieren kann und seine Oxidation durch eine photosynthetische Elektronentransportkette Energie liefert. Nach der Oxidation besitzt das Pigmentmolekül wieder sein ursprüngliches, hohes Redoxpotential. Es wird durch Elektronen, die die Elektronentransportkette durchlaufen haben, wieder reduziert (**zyklischer Elektronentransport**) und steht dann zur erneuten Anregung zur Verfügung. Werden Elektronen für reduktive Schritte des Baustoffwechsels abgezogen, müssen Elektronen von einem externen Elektronendonor eingespeist werden (**nicht-zyklischer Elektronentransport**).

Komponenten der Elektronentransportketten

Elektronentransportketten sind aus **Oxidoreductasen** aufgebaut, integralen Membranproteinen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Durch verschiedene reduzier- und oxidierbare **Coenzyme** und **prosthetische Gruppen** in ihren aktiven Zentren sind diese Enzyme dazu in der Lage, Elektronen oder Reduktionsäquivalente aufzunehmen und abzugeben. In photosynthetischen Elektronentransportketten werden die Proteinkomplexe, die die nach Anregung oxidierbaren Pigmente tragen, als **Reaktionszentren** bezeichnet. Auch sie verfügen über entsprechende prosthetische Gruppen zur Weiterleitung von Elektronen. Zwischen den großen integralen Proteinkomplexen vermitteln kleinere Verbindungen oder Proteine die Elektronenübertragung: **Chinone** sind an nahezu allen Elektronentransportketten beteiligt. **Cytochrom c**, ein kleines, nur schwach membranassoziiertes Protein, ist Teil der Atmungskette in Mitochondrien und Bakterien, sowie der photosynthetischen Elektronentransportkette phototropher Bakterien. Ein ebenfalls lösliches, kupferhaltiges Protein, das **Plastocyanin**, fungiert in der photosynthetischen Elektronentransportkette der Chloroplasten als Elektronenüberträger. Die Reihenfolge der Komponenten einer Elektronentrans-

portkette ist durch deren Redoxpotential bestimmt. Der Elektronentransport erfolgt stets von Komponenten mit niedrigem zu solchen mit höherem Redoxpotential.

Unter den **prosthetischen Gruppen und Coenzymen** der Oxidoreductasen finden sich reine Elektronenüberträger und solche, die Elektronen plus Protonen, also Reduktionsäquivalente, aufnehmen und abgeben können. **NAD^+/NADH** und die Flavinnucleotide **Flavinmononucleotid** (**$FMN/FMNH_2$**) und **Flavinadenindinucleotid,** (**$FAD/FADH_2$**) übertragen Reduktionsäquivalente. NAD^+/NADH (Abb. 8.**3**) vermittelt als lösliches Coenzym die Übertragung von zwei Reduktionsäquivalenten von den löslichen Dehydrogenasen an die membranständige NADH-Dehydrogenase. Es besitzt ein Redoxpotential ($E^{0\prime}$) von –0,32 V. **Flavoenzyme** tragen ein Flavinnucleotid (Abb. 8.**7**) fest, zum Teil auch kovalent gebunden. Flavinnucleotide sind daher als prosthetische Gruppen zu bezeichnen. Ihr Redoxpotential ist abhängig von ihrer Umgebung im Protein. Das FAD des Membranenzyms Succinat-Dehydrogenase als Beispiel besitzt ein Redoxpotential von 0,0 V. Das Isoalloxazin der Flavinnucleotide kann ein bzw. zwei Reduktionsäquivalente aufnehmen, es entsteht dabei im ersten Schritt die Semichinon-, im zweiten Schritt die Chinolform.

8

Zu den **reinen Elektronenüberträgern** zählen die Eisen-Schwefel-Zentren und das Häm, die redoxaktiven Gruppen der Eisen-Schwefel-Proteine bzw. der Cytochrome. **Eisen-Schwefel-Zentren** (Abb. 8.**8**) können zwei oder vier Eisenionen (Fe_2S_2- und Fe_4S_4-Zentren) enthalten, die durch SH-Gruppen von Cysteinresten des Proteins und sulfidischem Schwefel gebunden sind.

Häm (Abb. 8.**9**) besteht aus einem Porphyrinring mit einem Eisenatom im Zentrum. In Cytochromen des *c*-Typs ist die Hämgruppe über Cysteinreste kova-

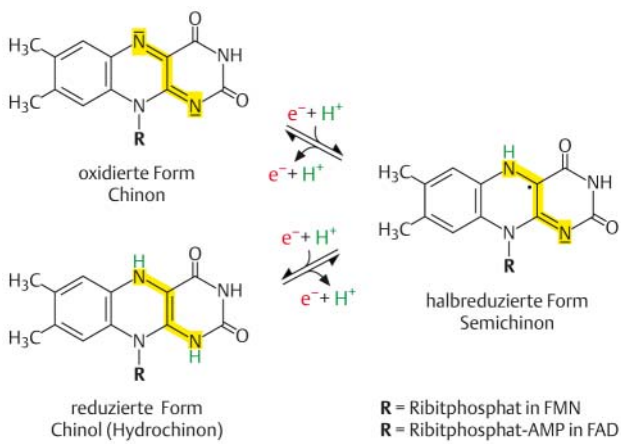


Abb. 8.**7** **Struktur der Flavinnucleotide FAD und FMN.** Die Reduktion bzw. Oxidation erfolgt am Isoalloxazin in zwei Schritten durch Übertragung von jeweils einem [H].

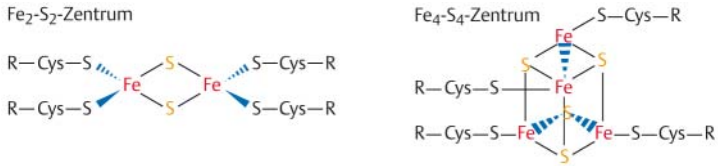


Abb. 8.**8** **Eisen-Schwefel-Zentren, die prosthetischen Gruppen der Eisen-Schwefel-Proteine.** Struktur eines Fe_2-S_2- und eines Fe_4-S_4-Zentrums. Die Eisenatome sind von anorganischem Schwefel und Schwefel-Atomen von Cysteinresten des Proteins gebunden. Zur Bezeichnung der Zentren werden nur die anorganischen Schwefelatome gezählt. Eisen-Schwefel-Zentren übertragen einzelne Elektronen, die Oxidation/Reduktion erfolgt an einem der Eisenatome (Fe^{3+}/Fe^{2+}).

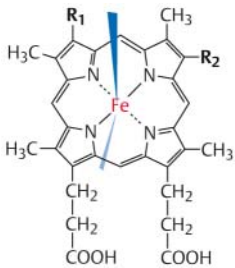


Abb. 8.**9** **Struktur des Häms.** Das Eisenatom im Zentrum des Porphyrinrings kann sechs Koordinationsbindungen ausbilden, vier Bindungen in der Ebene des Rings und zwei senkrecht zum Ring. In den Cytochromen sind alle Bindungen besetzt, die beiden senkrecht stehenden durch Aminosäurereste des Proteins.

lent an das Protein gebunden. Verschiedene Cytochrome unterscheiden sich voneinander durch die Seitenketten des Häms und dessen Bindung an das Protein. Reduktion/Oxidation beruht beim Häm wie auch bei den Eisen-Schwefel-Zentren auf einem Wertigkeitswechsel eines Eisenions (Fe^{2+}/Fe^{3+}). Das Redoxpotential des am Redoxgeschehen beteiligten Eisenions wird von der Proteinumgebung der prosthetischen Gruppen beeinflusst und unterscheidet sich bei den verschiedenen Cytochromen und Eisen-Schwefel-Proteinen. Das membranassoziierte **Cytochrom *c*** der aeroben Atmungskette von Bakterien und Mitochondrien besitzt ein Redoxpotential von $E^{0'}$ = +0,27 V.

Die niedermolekularen **Chinone** sind dank langer Isoprenseitenketten lipophil und können sich in Membranen frei bewegen. Dort liegen sie im Vergleich zu den anderen Komponenten des Elektronentransports in vielfachem Überschuss vor, sie bilden den sogenannten **Chinonpool**. An der von Benzol (Benzochinone: Ubichinon, Plastochinon) bzw. Naphtol (Naphtochinon: Menachinon) abgeleiteten Ringstruktur der Chinone erfolgt die Aufnahme und Abgabe von zwei Reduktionsäquivalenten wie bei den Flavinnucleotiden in zwei Schritten. **Ubichinon** (Abb. 8.**10**), das an der aeroben Atmungkette von Mitochondrien und gramnegativen Bakterien beteiligt ist, besitzt ein Redoxpotential von +0,11 V. Aerobe

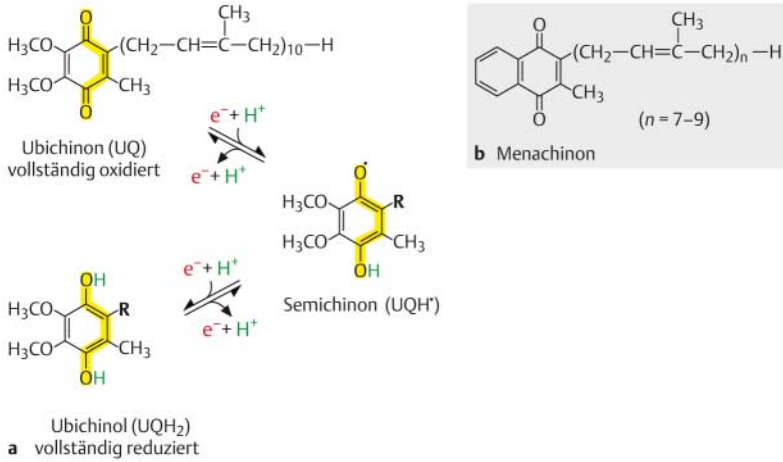


Abb. 8.**10** **Struktur des Benzochinons Ubichinon (a) und des Naphtochinons Menachinon (b).** Die Reduktion der Chinon- zur Chinolform erfolgt wie bei den Flavinnucleotiden in zwei Schritten durch Übertragung von jeweils einem [H] (Zwischenprodukt: Semichinon; Abb. 8.**7**).

grampositive Bakterien nutzen **Menachinon** ($E^{0\prime}$ = –0,08 V). **Plastochinon** ($E^{0\prime}$ = +0,11 V) fungiert als Redoxkomponente in photosynthetischen Elektronentransportketten.

Aufbau der protonenmotorischen Kraft

Elektronentransportketten, die die Übertragung der Elektronen vom Elektronendonor zum -akzeptor katalysieren, bestehen aus mindestens zwei großen Proteinkomplexen und zusätzlich aus kleineren, freibeweglichen Elektronenüberträgern, die die Weitergabe der Elektronen zwischen den Proteinkomplexen übernehmen. Diese Unterteilung der Elektronenübertragung in mehrere Abschnitte sorgt dafür, dass auch die Energiewandlung (Freie Energie der Redoxreaktion → Freie Energie gespeichert in $\Delta\mu_{H^+}$) in mehreren Schritten erfolgen kann. Der Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ (Abb. 8.**11**) ist das Ergebnis der Aktivität der einzelnen Oxidoreductasen. Einige Oxidoreductasen arbeiten als **Protonenpumpe**, indem sie die Elektronenübertragung mit dem Transport von Protonen durch eine Membran verknüpfen (Abb. 8.**11a**). Diese Oxidoreductasen sind **primäre Transporter** (S. 398): Sie nutzen die von einer chemischen Reaktion (Redoxreaktion) gelieferte Freie Energie, um ihr Substrat, die Protonen, aktiv entgegen ihrer elektrochemischen Potentialdifferenz durch die Membran zu befördern.

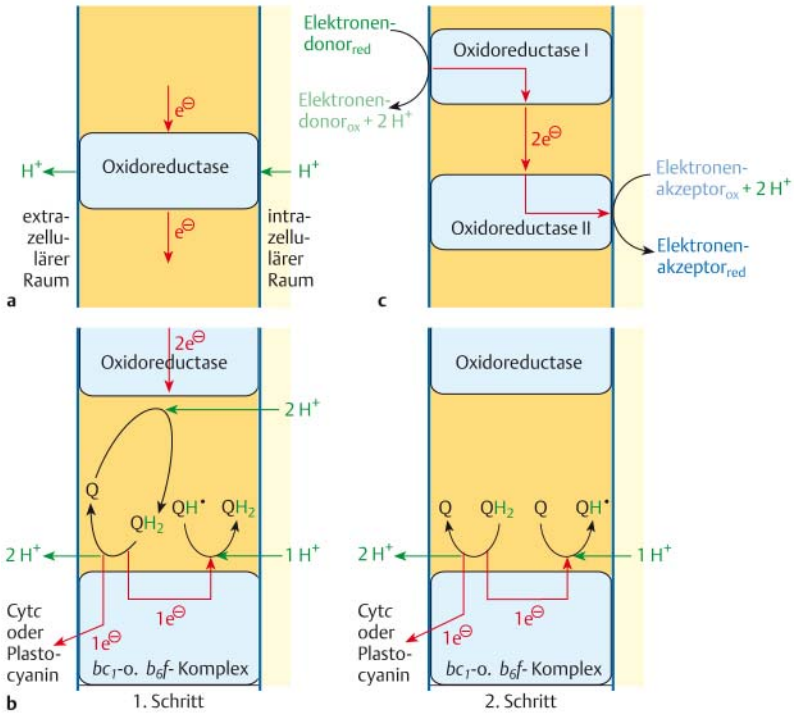


Abb. 8.**11** **Aufbau der protonenmotorischen Kraft. a Protonenpumpe:** Eine Oxidoreductase verbindet den Elektronentransport mit dem aktiven Transport von Protonen durch die Cytoplasmamembran. **b Protonentranslokation durch den Q-Zyklus** (Situation in einer Bakterienzelle): **Schritt 1**. Eine Oxidoreductase überträgt zwei Elektronen auf Chinon Q. Es werden zwei H^+ aus dem Cytoplasma aufgenommen. QH_2 wird an der zur extrazellulären Membranseite orientierten Q-Bindungsstelle des Cytochrom bc_1- bzw. des Cytochrom b_6f-Komplexes reoxidiert. Dabei werden zwei Protonen in den extrazellulären Raum abgegeben. Innerhalb des bc_1- bzw. des b_6f-Komplexes wird ein Elektron an das membranassoziierte Cytochrom *c* bzw. Plastocyanin weitergeleitet und ein Elektron an der zur intrazellulären Membranseite orientieren Q-Bindungsstelle des Komplexes auf ein Semichinon ($QH^\bullet$) übertragen. Es entsteht ein QH_2 und ein H^+ wird aus dem Cytoplasma aufgenommen. **Schritt 2**. Das am Ende von Schritt 1 gebildete QH_2 wird nun wiederum an der zur extrazellulären Membranseite orientierten Q-Bindungsstelle oxidiert. Dabei werden zwei H^+ in den extrazellulären Raum abgegeben. Von den beiden anfallenden Elektronen wird eines zur Reduktion eines weiteren Cytochrom *c* genutzt, das zweite Elektron wird an der zur intrazellulären Membranseite orientierten Q-Bindungsstelle auf ein Chinon übertragen, wodurch das zu Beginn von Schritt 1 vorliegende Semichinon ($QH^\bullet$) regeneriert wird. Dabei wird ein weiteres Proton aus dem Cytoplasma aufgenommen. Summe der Vorgänge: Übertragung von zwei Elektronen vom Chinon auf Cytochrom *c*, Translokation von vier H^+ über die Membran. **c** Freisetzung bzw. Verbrauch von Protonen auf Außen- bzw. Innenseite der Cytoplasmamembran resultierend aus der **Orientierung der Substratbindungsstellen** von oxidierender bzw. reduzierender Oxidoreductase bei chemolithotrophen Prokaryoten.

Zur Translokation von Protonen kommt es auch, wenn der Elektronentransport zwischen zwei Proteinkomplexen über ein **Chinon** erfolgt und vor und nach dem Chinon in den Proteinkomplexen Gruppen beteiligt sind, die nur Elektronen übertragen (Eisen-Schwefel-Zentren, Häm). Die Reduktion des Chinons mit zwei Elektronen ist mit der Aufnahme von zwei Protonen, die erneute Oxidation der Chinolform mit der Abgabe dieser Protonen verbunden, was, bei entsprechender Orientierung der Bindungsstellen auf den gegenüberliegenden Seiten der Membran, in der Translokation von Protonen resultiert. Wird bei der Reoxidation des Chinols im nachfolgenden Proteinkomplex nur eines der beiden Elektronen weiter transportiert, so kann das andere wieder in den Chinonpool zurückgeführt werden und erneut an Protonenaufnahme und -freisetzung teilnehmen. Ein solches Recycling von Elektronen kann die Anzahl der pro Elektronenpaar durch die Membran transferierten Protonen von zwei auf vier erhöhen und wird als Chinon- oder **Q-Zyklus** bezeichnet (Abb. 8.**11b**). Für dessen Funktion ist entscheidend, dass der die Elektronen vom Chinon übernehmende Proteinkomplex (Cytochrom-bc_1-Komplex oder Cytochrom b_6f-Komplex) ein Eisen-Schwefel-Protein (Rieske-Protein), ein *c*-Typ Cytochrom und zwei *b*-Typ-Cytochrome umfasst. Der Elektronentransport vom Chinon zum Cytochrom *c* bzw. zum Plastocyanin verläuft über das Eisen-Schwefel-Protein und das *c*-Typ-Cytochrom, am Recycling der Elektronen durch den Q-Zyklus sind die beiden *b*-Typ-Cytochrome beteiligt, die in den beiden Chinon-Bindungsstellen des Cytochrom-bc_1- bzw. des Cytochrom b_6f-Komplexes lokalisiert sind.

Bei Bakterien kommt es auch vor, dass die Oxidation eines Elektronendonors auf der extrazellulären Seite der Membran Protonen freisetzt und die Reduktion des Elektronenakzeptors auf der cytoplasmatischen Seite der Membran Protonen verbraucht. Der Aufbau der protonenmotorischen Kraft resultiert dann aus der unterschiedlichen **Ausrichtung der Substratbindungsstellen** des oxidierenden und des reduzierenden Enzyms (Abb. 8.**11c**).

ATP-Synthase

Die **ATP-Synthase** koppelt den Rückstrom von Protonen ins Cytoplasma eines Bakteriums bzw. in den Innenraum von Mitochondrien (📖*Zellbiologie, Biochemie*) und Chloroplasten (📖*Botanik*) mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP. Angetrieben wird der Transfer der Protonen über die Membran durch die elektrochemische Potentialdifferenz der Protonen, also die protonenmotorische Kraft. Dabei wird die darin gespeicherte Freie Energie in Form von ATP konserviert. Die ATP-Synthase arbeitet reversibel. Als **ATPase** kann sie durch Hydrolyse von ATP zu ADP den Aufbau eines Protonenpotentials betreiben. Bei dem Enzym handelt es sich wie bei den protonenpumpenden Oxidoreductasen um einen **primären Transporter**. Strikt gärende Bakterien, die nicht über eine Elektronentransportkette verfügen, nutzen die ATPase-Aktivität des Enzyms zum Aufbau

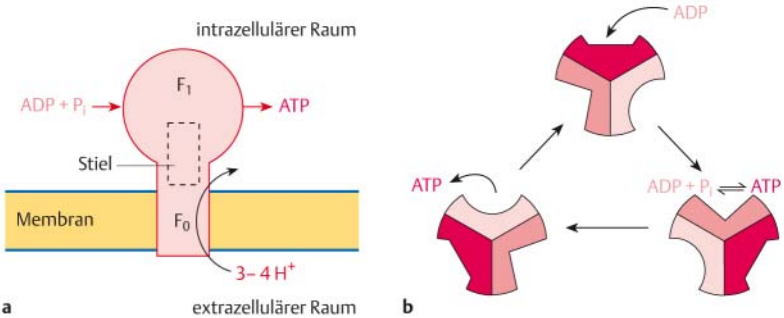


Abb. 8.**12** **ATP-Synthase.** **a** Aufbau des Enzyms. **b** Funktionsweise des Enzyms: Für eine der drei Bindungsstellen ist gezeigt, wie ATP über Bindung von ADP, Phosphorylierung zu ATP und dessen Freisetzung gebildet wird. Der dazu notwendige Konformationswechsel des Enzyms wird durch den Durchgang von Protonen durch die F_o-Domäne angetrieben.

8

von $\Delta\mu_{H^+}$ an ihrer Cytoplasmamembran, um so Energie für Transportprozesse und eventuell die Geißelbewegung bereitzustellen.

Aufbau und Funktionsweise des Enzyms (Abb. 8.**12**) ist bei allen Organismen identisch. Der Proteinkomplex besteht aus zwei Domänen. Der membranständige Teil, die **F_o-Domäne**, bildet den Kanal, durch den die Protonen die Membran passieren können. Bindung und Umsetzung von ADP und ATP erfolgt an der **F_1-Domäne**, die als hydrophiler Kopf ins Cytoplasma von Prokaryoten bzw. in die Matrix von Mitochondrien und das Stroma von Chloroplasten ragt. Die beiden Domänen sind durch einen Stiel miteinander verbunden. Gemäß seines Aufbaus wird das Enzym auch als **F_oF_1-ATPase** bezeichnet. Die F_1-Domäne trägt drei Bindungsstellen für die Substrate ATP bzw. ADP. Der Durchgang der Protonen durch die F_o-Domäne verursacht eine Drehung eines Teils des Proteins, was die Bindung von ADP, dessen Phosphorylierung zu ATP und schließlich die Freisetzung von ATP an jeder der drei Bindungsstellen bewirkt. Bei einer vollständigen Drehung werden drei ATP gebildet und es müssen dreimal drei bis vier Protonen die F_o-Domäne passieren.

Revertierter Elektronentransport

Einige chemolithotrophe Bakterien nutzen zur Elektronentransportphosphorylierung **Elektronendonoren** mit einem **Redoxpotential positiver als das von NAD^+/NADH** (HS^-, Thiosulfat, S_0, NO_2^-, Fe^{2+}). Auch bei manchen phototrophen Bakterien besitzt die Verbindung, die die vom Reaktionszentrum weitergegebenen Elektronen aufnimmt, ein Redoxpotential $>$ –0,32 V. Die Versorgung mit **Reduktionskraft für den Baustoffwechsel** stellt für diese Organismen, die zudem in der Regel autotroph sind, ein besonderes Problem dar. Sie müssen

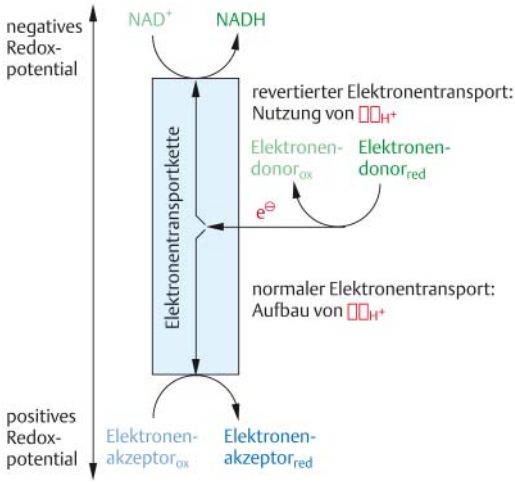


Abb. 8.**13** **Revertierter Elektronentransport.** Bei Verwendung eines Elektronendonors, dessen Redoxpotential positiver als das von $NAD(P)^+$/NAD(P)H ist, muss die protonenmotorische Kraft genutzt werden, um Elektronen entgegen der Redoxpotentialdifferenz auf NAD^+ zu übertragen. Der Aufbau der protonenmotorischen Kraft ($\Delta\mu_{H^+}$) erfolgt durch Elektronentranport in normaler Richtung.

Elektronen unter Energieaufwand entgegen dem Redoxpotentialgefälle auf NAD^+ übertragen (NADPH kann dann durch Transhydrogenierung aus NADH gebildet werden). Dieser Vorgang wird als **revertierter Elektronentransport** bezeichnet. Für den revertierten Elektronentransport wird eine vollständige Elektronentransportkette mit membranständiger NADH-Dehydrogenase benötigt. Die Elektronen werden vom Donor auf der Ebene des Chinons oder des Cytochrom *c* in die Kette eingeschleust. Der revertierte Elektronentransport verknüpft den Rückstrom von Protonen ins Cytoplasma mit der Reduktion von NAD^+, verbraucht also in Form der protonenmotorischen Kraft ($\Delta\mu_{H^+}$) gespeicherte Energie. $\Delta\mu_{H^+}$ wird durch Elektronentransport in normaler Richtung aufgebaut. Das Prinzip des revertierten Elektronentransports ist in Abb. 8.**13** skizziert.

Energiekonservierung: Speicherung der Energie von Licht oder einer Redoxreaktion in Form von ATP und/oder eines elektrochemischen Potentials an einer Membran.
Kopplung: Verknüpfung einer exergonen Redoxreaktion mit einer endergonen Reaktion.
Wirkungsgrad: Verhältnis von konserviertem Energiebetrag zu maximal verfügbarem Energiebetrag.
Gruppenübertragungspotential: $\Delta G^{0\prime}$-Wert der hydrolytischen Abspaltung eines Molekülteils (meist Phosphatgruppe); charakterisiert die Fähigkeit einer Verbindung, die Gruppe auf andere Moleküle zu übertragen.
Energiereiche Verbindung: Verbindung mit hohem Gruppenübertragungspotential (≤ -32 kJ mol^{-1}).

Substratstufenphosphorylierung (SSP): ATP-Synthese durch Übertragung einer Phosphatgruppe von einer energiereichen, phosphorylierten Verbindung auf ADP.
Chemiosmotische Kopplung: Verknüpfung zwischen exergoner Redoxreaktion und endergoner ATP-Synthese über die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ an einer Membran.
Elektronentransportkette: Weitergabe der Elektronen vom Donor zum Akzeptor einer Redoxreaktion über eine Kette von redoxaktiven, membranständigen oder membranassoziierten Proteinen und Verbindungen; mit dem Aufbau von $\Delta\mu_{H^+}$ an der Membran verbunden.
Elektronentransportphosphorylierung (ETP): ATP-Synthese, angetrieben durch $\Delta\mu_{H^+}$ an einer Membran.
Oxidative Phosphorylierung: ATP-Synthese über ETP bei chemotrophen Organismen.
Photophosphorylierung: ATP-Synthese über ETP bei phototrophen Organismen.
Reduktionsäquivalent: Ein Elektron plus ein Proton; [H].
Flavinnucleotide: Flavinadenindinucleotid (FAD) oder Flavinmononucleotid (FMN); prosthetische Gruppen der Flavoproteine; Überträger für 1 bzw. 2 Reduktionsäquivalente.
Eisen-Schwefel-Zentren: Prosthetische Gruppen der Eisen-Schwefel-Proteine; Elektronenüberträger.
Häm: Porphyrinringsystem mit zentralem Eisenatom; Elektronenüberträger.
Cytochrom: Protein mit Häm als prosthetischer Gruppe.
Chinone: Niedermolekulare, lipidlösliche Elektronenüberträger; übertragen 1 bzw. 2 Reduktionsäquivalente.
ATP-Synthase: = F_oF_1-ATPase; reversibel arbeitendes, membranständiges Enzym; nutzt $\Delta\mu_{H^+}$ zur Synthese von ATP bzw. ATP zum Aufbau von $\Delta\mu_{H^+}$; primärer Transporter.
Revertierter Elektronentransport: Elektronentransport in einer Elektronentransportkette entgegen dem Redoxpotentialgefälle der Komponenten; erfolgt unter Nutzung von $\Delta\mu_{H^+}$.

8.4 Phototrophie

Phototrophe Organismen konservieren die **Energie elektromagnetischer Strahlung** (**Licht**). Grundlage ihres Energiestoffwechsels ist eine Redoxreaktion, wobei die oxidierte Verbindung ein durch Lichtabsorption angeregtes Pigmentmolekül ist. Der photosynthetische Elektronentransport ist mit dem Aufbau der protonenmotorischen Kraft verknüpft. Diese wird zur Synthese von ATP genutzt (Photophosphorylierung). **Pigmente** ([Bakterio]chlorophylle, Carotinoide, Phycobiline) absorbieren elektromagnetische Strahlung des sichtbaren Spektralbereichs des Sonnenlichts. In einem **Antennensystem** geben sie Anregungsenergie untereinander weiter und führen sie dem **Reaktionszentrum** zu. Dort findet die **photochemische Energiewandlung** statt. Reaktionszentren sind integrale Membranproteinkomplexe. Sie verfügen

über ein Paar von Chlorophyllmolekülen, dessen Redoxpotential durch Anregung drastisch absinkt und das daraufhin oxidiert wird. In **Typ II (Chinon)-Reaktionszentren** ist der erste stabile Elektronenakzeptor ein Chinon, in **Typ I (Fe-S)-Reaktionszentren** ein Eisen-Schwefel-Zentrum. Phototrophe Bakterien (Ausnahme Cyanobakterien) verfügen nur über Reaktionszentren eines Typs und katalysieren in erster Linie einen **zyklischen Elektronentransport**. Dieser verläuft über den Chinonpool, den **bc_1-Komplex** und **Cytochrom c** zurück zum Chlorophyllpaar des Reaktionszentrums. Zur Reduktion von $NAD(P)^+$ aus der Transportkette abgezogene Elektronen werden von einem externen Elektronendonor, niemals jedoch aus Wasser ersetzt. Die Photosynthese verläuft daher **anoxygen**. Cyanobakterien und die eukaryotischen Pflanzen besitzen Reaktionszentren beider Typen, die hintereinander geschaltet arbeiten und einen **nicht-zyklischen Elektronentransport** katalysieren. Anregung setzt den Transport von Elektronen aus Typ II-Reaktionszentren über den Chinon-Pool, den **b_6f-Komplex** und **Plastocyanin**/Cytochrom c in Gang. Dabei wird Energie konserviert. Die Elektronen gelangen zum Chlorophyllpaar der Typ I-Reaktionszentren. Diese reduzieren nach Anregung über **Ferredoxin** schließlich $NAD(P)^+$. Die Typ II-Reaktionzentren füllen ihre Elektronenlücke aus Wasser. Dabei wird Sauerstoff freigesetzt, die Photosynthese verläuft **oxygen**. Ohne Beteiligung einer Redoxreaktion erfolgt die Energiekonservierung beim **Bakteriorhodopsin**, der Licht-getriebenen Protonenpumpe der Haloarchaea.

Die **elektromagnetische Strahlung der Sonne** umfasst das sichtbare Licht (Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm), daneben auch kurzwelligeres UV-Licht (Wellenlänge bis 225 nm) und langwelligeres Infrarotlicht (Wellenlängen bis 3200 nm). Beim Durchgang durch die Atmosphäre der Erde wird das Spektrum auf den Bereich von ca. 340–1100 nm eingeengt. Zur Nutzung von Licht als Energiequelle verfügen phototrophe Organismen über **Pigmente**, organische Verbindungen, die sich durch ausgedehnte Systeme konjugierter Doppelbindungen (Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einzelbindungen im Wechsel mit -Doppelbindungen) auszeichnen. Sie absorbieren Licht des sichtbaren Spektralbereiches und erscheinen daher farbig. Durch die Lichtabsorption wird ein Elektron eines der das Pigment bildenden Atome angeregt, d. h. vom Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben. Dem Elektron sind für das Molekül charakteristische, diskrete Energieniveaus erlaubt, sodass eine Anregung durch Licht nur dann erfolgt, wenn der Energiegehalt der auftreffenden **Photonen** (diskrete Energiepakete elektromagnetischer Strahlung) der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand entspricht (📖 *Biochemie, Zellbiologie*).

Der **Energiegehalt der Photonen** U (J mol^{-1} Photonen = J $Einstein^{-1}$) ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtes:

$$U = N\ h\ c/\lambda \qquad (8.17)$$

N = Avogadro-Zahl ($6{,}022 \cdot 10^{23}$ mol^{-1})
h = Planck'sches Wirkungsquantum ($6{,}626 \cdot 10^{-34}$ J s)
c = Lichtgeschwindigkeit ($2{,}998 \cdot 10^{8}$ m s^{-1})
λ = Wellenlänge (m)

$$N \cdot h \cdot c = 119{,}7 \cdot 10^{-3}\ J\ m\ mol^{-1}$$

Für sichtbares Licht ($\lambda = 380 \cdot 10^{-9} - 750 \cdot 10^{-9}$ m) ergibt sich somit ein Energiegehalt von 310–160 kJ pro Mol Photonen.

Pigmente sind in der Regel an Proteine gebunden, die in Membranen lokalisiert oder mit ihnen assoziiert sind und große **Antennensysteme** aufbauen. Innerhalb der Antenne kann ein angeregtes Pigment die absorbierte Energie auf benachbarte Pigmente übertragen, die dann ebenfalls angeregt werden. Auf diese Weise wird die Anregungsenergie weitergeleitet und gelangt schließlich in ein **Reaktionszentrum**, in dem die eigentliche **photochemische Energiewandlung** stattfindet. Reaktionszentrum und das ihm zugeordnete Antennensystem werden als **Photosystem** zusammengefasst. Die von Pigment zu Pigment übertragenen, diskreten Energiepakete werden als **Excitonen**, ihre Weitergabe als **Excitonentransfer** bezeichnet. Reaktionszentren sind integrale Membranproteine, die spezielle oxidierbare Pigmentmoleküle und darüber hinaus andere redoxaktive, prosthetische Gruppen tragen. Durch die Anregung sinkt das Redoxpotential des zentralen Pigments eines Reaktionszentrums drastisch ab und es wird durch eine benachbarte prosthetische Gruppe des Reaktionszentrums oxidiert.

Die **Redoxpotentialabsenkung des zentralen Pigments** eines Reaktionszentrums durch Anregung ergibt sich aus dem **Energiegehalt des absorbierten Photons**:

Beispiel: zentrales Pigment P_{870} im Reaktionszentrum von Purpurbakterien, Absorptionsmaximum bei Wellenlänge 870 nm.

Energiezufuhr bei Anregung (Gl. 8.17):

$$U = \Delta G = 119{,}7 \cdot 10^{-3}\ J\ m\ mol^{-1}/870 \cdot 10^{-9}\ m$$

$$\Delta G = 138\ kJ\ mol^{-1}$$

Redoxpotentialdifferenz zwischen Pigment im Grundzustand und in angeregtem Zustand (Gl. 8.9):

$\Delta E = \Delta G/(nF)$ F = 96,5 kJ V^{-1} mol^{-1} (Faradaykonstante)

n = 1

$$\Delta E = 138\ kJ\ mol^{-1}/96{,}5\ kJ\ V^{-1}\ mol^{-1}$$

$$\Delta E = 1{,}43\ V$$

Im Anschluss durchläuft das dem Pigment entzogene Elektron eine Kette von Elektronentransportkomponenten mit steigendem Redoxpotential. Die Redoxpotentialdifferenz zwischen dem angeregten Pigmentmolekül und dem terminalen Elektronenakzeptor stellt die Triebkraft für den Elektronentransport dar. Weitergabe des Elektrons über ein Chinon führt durch den Q-Zyklus zum Transport von Protonen über die photosynthetische Membran und so zum Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$, die von einer ATPase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt wird. Zur Reduktion von $NAD(P)^+$ können Elektronen aus der Elektronentransportkette abgezogen werden. Die abgezogenen Elektronen werden durch Elektronen ersetzt, die von einem externen Donor stammen.

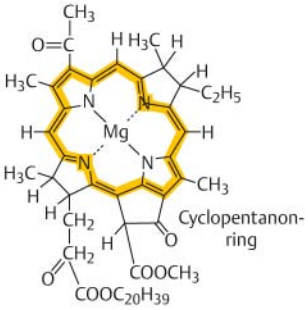
Der Begriff **Photosynthese** bezeichnet die lichtabhängige Synthese organischer Verbindungen. Die Bereitstellung von ATP erfolgt bei (strikt) phototrophen Organismen nur wenn Licht zugeführt wird. Entsprechend werden die Reaktionen zur Energiekonservierung bei den phototrophen Organismen unter dem Begriff der **Lichtreaktion** zusammengefasst. Die Nutzung des in der Lichtreaktion gebildeten ATPs für die Synthese organischer Verbindungen ist Teil des Baustoffwechsels und nicht direkt auf die Zufuhr von Licht angewiesen. Dieser Abschnitt der Photosynthese wird daher auch als **Dunkelreaktion** bezeichnet.

8.4.1 Photosynthetische Pigmente

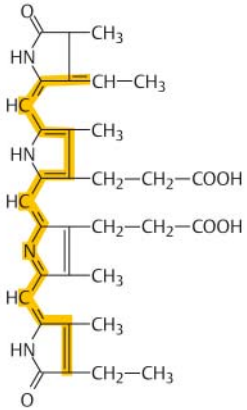
Chlorophylle und Bakteriochlorophylle

Chlorophylle und Bakteriochlorophylle (Abb. 8.**14a**) besitzen wie die Cytochrome einen Tetrapyrrolring, der im Zentrum jedoch kein Eisen- sondern ein **Magnesiumion** trägt (**Pheophytin**: Molekül ohne zentrales Magnesiumion). Ein langkettiger Terpenalkohol, der über eine Esterbindung angeknüpft ist, dient der Proteinverankerung. Der Tetrapyrrolring zeichnet sich durch ein System konjugierter Doppelbindungen aus, das für die Fähigkeit zur Absorption elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Spektralbereich verantwortlich ist. Die Lichtabsorption der (Bakterio)chlorophylle (Abb. 8.**14d**) ist besonders ausgeprägt im blauen ($\lambda < 480$ nm) und im roten bis infraroten Wellenlängenbereich ($\lambda > 600$ nm). Unterschiedliche Substituenten am Tetrapyrrolring sowie die Proteinbindung beeinflussen die Lage der Absorptionsmaxima. Zur Charakterisierung einzelner (Bakterio)chlorophyllspezies dient das Absorptionsmaximum im roten Wellenlängenbereich. Die schwache Lichtabsorption im Wellenlängenbereich zwischen 480 nm und 600 nm führt zur grünen Färbung der (Bakterio)chlorophylle und verleiht in vielen Fällen auch den phototrophen Organismen ihre grüne Farbe.

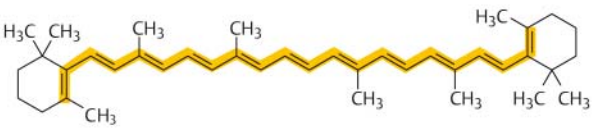
Chlorophylle (Chl*a*, Chl*b*) findet man bei denjenigen phototrophen Organismen, die im Verlauf der Photosynthese Sauerstoff freisetzen, also eine **oxygene Photosynthese** betreiben, während die Organismen, bei denen die Photosynthese **nicht** mit der Freisetzung von **Sauerstoff** verbunden ist, über **Bakteriochlorophylle** (BChl*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g*) ver-



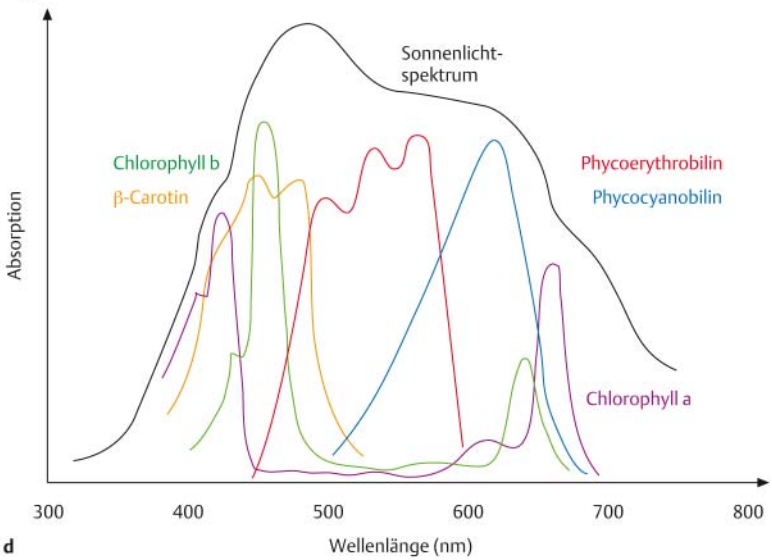
a Bacteriochlorophyll a



b Phycocyanobilin



c β-Carotin



d

Abb. 8.**14** **Pigmente phototropher Organismen. a** Chlorophyll: Bakteriochlorophyll *a* **b** Phycobilin: Phycocyanobilin. **c** Carotinoid: β-Carotin. **d** Absorptionsspektren verschiedener Pigmente (nach Nelson, Cox, Springer, 2001).

fügen. Die verschiedenen Chlorophyllspezies unterscheiden sich durch unterschiedliche Reste am Tetrapyrrolring.

Die photochemische Energiewandlung erfolgt in allen phototrophen Organismen an speziellen (Bakterio)chlorophyllmolekülen in den Reaktionszentren. Bei Pflanzen, Purpurbakterien, Grünen Schwefelbakterien und Schwefelfreien Grünen Bakterien sind (Bakterio)chlorophylle auch an der Lichtsammlung und -weiterleitung beteiligt.

Akzessorische Pigmente: Phycobiline und Carotinoide

Akzessorische Pigmente sind in den Antennensystemen lokalisiert und dort für die Lichtabsorption in großem Maßstab und die Weiterleitung der Anregungsenergie an die Reaktionszentren verantwortlich. Neben den Chlorophyllen übernehmen in verschiedenen Organismengruppen Phycobiline und Carotinoide diese Aufgabe. Diese Pigmente absorbieren Licht des von den Chlorophyllen nicht genutzten grünen Wellenlängenbereichs und sorgen daher für eine bessere Ausnutzung des Sonnenlichts.

Phycobiline (Abb. 8.**14b**, **d**), die Antennenpigmente der Cyanobakterien und der eukaryotischen Rotalgen, sind offenkettige Tetrapyrrole. Phycoerythrobilin absorbiert Licht der Wellenlängen von 480–570 nm und ist rot gefärbt, das blaue Phycocyanobilin absorbiert bei 550–650 nm und Allophycocyanobilin bei 600–680 nm. Die Phycobiline sind kovalent an Proteine gebunden, diese werden als **Phycobiliproteine** (Phycoerythrin, Phycocyanin) bezeichnet.

Carotinoide (Abb. 8.**14c**, **d**) sind aus acht Isopreneinheiten aufgebaute, hydrophobe Moleküle, die ebenfalls ausgedehnte Bereiche konjugierter Doppelbindungen aufweisen. Sie liegen in den photosynthetischen Membranen vieler phototropher Organismen vor und absorbieren bevorzugt Licht des blauen Wellenlängenbereichs. Bei den Purpurbakterien sind sie für deren rote, braune oder gelbe Farbe verantwortlich. Ihre Funktion ist es, den Photosyntheseapparat vor unerwünschter Oxidation durch Sauerstoff zu schützen. Sie sind aber auch an der Weiterleitung von Anregungsenergie beteiligt. Sauerstoff-freie Carotinoide werden als **Carotine**, davon abgeleitete Sauerstoff-haltige Derivate als **Xanthophylle** bezeichnet.

8.4.2 Antennensysteme und photosynthetische Membranen

Antennensysteme fassen eine Vielzahl von in der Regel proteingebundenen Pigmenten zu funktionellen Einheiten zusammen. Sie sind entweder in die photosynthetischen Membranen integriert oder als separate Strukturen an die in der Membran sitzenden Reaktionszentren angelagert. Durch die räumliche Fixierung in enger Nachbarschaft zueinander können die Pigmente die Energie absorbierter Photonen durch **Excitonentransfer** untereinander und an die Reaktionszentren weitergeben. In einem angeregten Pigmentmolekül geht durch interne

Umwandlung stets etwas Energie in Form von Wärme verloren, sodass der Excitonentransfer nur an ein Pigment erfolgen kann, das zur Anregung einen geringeren Energiebetrag benötigt (Absorptionsmaximum bei größerer Wellenlänge). Durch Anordung der Pigmente innerhalb eines Antennensystems entsprechend ihrer Absorptionsmaxima kann die Anregungsenergie daher kanalisiert und dem Reaktionszentrum zugeführt werden, das innerhalb eines Photosystems stets über das langwelligste Absorptionsmaximum verfügt. Ein Antennensystem funktioniert somit als **Lichtsammelfalle**.

Purpurbakterien besitzen ausgedehnte interne Membransysteme, die sich aus in sich geschlossenen Vesikeln, Tubuli oder Lamellen zusammensetzen und der Unterbringung des Photosyntheseapparates aus Antennen und Reaktionszentren dienen. Integrale, zahlreiche Bakteriochlorophyllmoleküle tragende Membranproteine bilden große **Lichternte**(**light harvesting**)**systeme**, die die Reaktionszentren ringförmig umgeben.

Auffällige Strukturen zur Lichtsammlung existieren bei den Cyanobakterien sowie den Grünen Schwefelbakterien und den Schwefelfreien Grünen Bakterien. In Cyanobakterien sind die photosynthetischen Membranen in Form von langgezogenen Vesikeln an der Peripherie des Cytoplasmas organisiert. Sie werden als **Thylakoide** bezeichnet. Ihnen sitzen auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite als **Phycobilisomen** bezeichnete Antennensysteme auf. Diese bestehen aus radial angeordneten Stapeln von **Phycoerythrin** (peripher) und **Phycocyanin** (zum Zentrum orientiert), die Anregungsenergie über ein terminales Pigment an die Reaktionszentren in den Membranen weiterleiten. Auch die eukaryotischen Rotalgen verfügen über Phycobilisomen. Grüne Schwefelbakterien und die mit ihnen allerdings nicht näher verwandten Schwefelfreien Grünen Bakterien besitzen keinerlei intrazelluläre Membransysteme. Die photosynthetischen Reaktionszentren dieser Organismen sind in der Cytoplasmamembran untergebracht und ihre Antennensysteme, die **Chlorosomen**, sind an diese auf der cytoplasmatischen Seite der Membran angelagert. Chlorosomen bestehen aus großen Aggregaten nicht proteingebundener Bakteriochlorophylle (BChl*c* und *d*), die von einer einzelnen Lipidschicht umgeben sind. Eine aus Bakteriochlorophyll *a* bestehende Basisplatte stellt die Verbindung zu den Reaktionszentren her.

Die Antennensysteme der eukaryotischen, phototrophen Organismen (Algen, mit Ausnahme der Rotalgen; höhere Pflanzen) befinden sich in den **Thylakoidmembranen**. Sie bestehen aus membranständigen Proteinkomplexen mit Chlorophyll *a* und *b* als Pigmenten. In Chloroplasten existieren zwei Typen von Photosystemen (S. 343) und jedem Typ ist ein spezifisches Antennensystem zugeordnet: Der **Lichterntekomplex LHC II** ist ein separater Proteinkomplex, der das Photosystem II mit Anregungsenergie versorgt. Photosystem I besitzt dagegen einen integrierten Lichterntekomplex (**LHC I**) (📖*Botanik*). Auch Rotalgen und Cyanobakterien betreiben eine Photosynthese mit zwei Photosystemen, sie verfügen jedoch mit den Phycobilisomen über ein anders organisiertes

Antennensystem und besitzen kein Chlorophyll *b* (Ausnahme bei den Cyanobakterien: Prochlorophyten, S. 343).

8.4.3 Reaktionszentren der Photosysteme

Reaktionszentren sind große Membranproteinkomplexe. Die photochemische Energieumwandlung erfolgt an einem Dimer aus zwei ähnlichen, jedoch nicht identischen Proteinen. Das Dimer trägt ein (**Bakterio**)**chlorophyllpaar** („**Special Pair**"), dessen Redoxpotential nach Anregung stark absinkt und das dann ein Elektron aus dem System konjugierter Doppelbindungen an eine eng benachbarte redoxaktive, prosthetische Gruppe abgeben kann. Das primäre Resultat dieser Photooxidation ist eine **Ladungstrennung**, da das (Bakterio)chlorophyllpaar mit einer positiven Ladung zurückbleibt und die das Elektron aufnehmende Gruppe eine negative Ladung erhält. So wie alle (Bakterio)chlorophylle besitzt auch das „Special Pair" eines Reaktionszentrums ein charakteristisches Absorptionsmaximum im roten Wellenlängenbereich. Durch den Verlust des Elektrons sinkt die Lichtabsorption bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums vorübergehend ab, d. h. es kommt zu einem **Ausbleichen** des Pigments, das durch die erneute Reduktion des Pigments wieder verschwindet.

Generell existieren zwei Typen von Reaktionszentren. Sie unterscheiden sich durch die prosthetischen Gruppen, über die sie verfügen und die das Elektron vom zentralen (Bacterio)chlorophyllpaar übernehmen. In Reaktionszentren des Typ I gelangt das Elektron über verschiedene Elektronen übertragende Gruppen zu einem Eisen-Schwefel-Zentrum des Proteins (**Typ I**: **Fe-S-Reaktionszentrum**). In Reaktionszentren des Typ II verläuft der Weg des Elektrons über ein Pheophytin zu einem an das Protein gebundenen Chinon (**Typ II**: **Chinon-Reaktionszentrum**).

8.4.4 Lichtgetriebener Elektronentransport mit einem Photosystem

In den phototrophen Bakterien mit Ausnahme der Cyanobakterien ist an der Lichtreaktion der Photosynthese nur **ein Photosystem**, mit einem Reaktionszentrum entweder von Typ I oder von Typ II beteiligt. Die zentralen Pigmente der Reaktionszentren sind Bakteriochlorophylle, die Absorptionsmaxima im Infrarotbereich des Sonnenlichtspektrums ($\lambda > 800$ nm) besitzen. Der photosynthetische Elektronentransport verläuft über die prosthetischen Gruppen des Reaktionszentrums, über ein Reservoir von in der Membran frei beweglichen Chinonen zu einem weiteren Membranproteinkomplex, dem **Cytochrom *bc*$_1$-Komplex**. Die Weitergabe der Elektronen zwischen Chinon und dem Cytochrom *bc*$_1$-Komplex ist über einen **Q-Zyklus** (S. 330) mit der Translokation von Protonen über die photosynthetische Membran, also dem Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ verbunden. Auf der Lumenseite intrazellulärer Membranvesikel bzw. der dem Außenraum zugewandten Seite der Cytoplasmamembran übernimmt ein

kleines, Membran-assoziiertes **Cytochrom *c*** die Elektronen vom Cytochrom c_1 des bc_1-Komplexes und leitet sie zum oxidierten Pigment des Reaktionszentrums zurück, sodass der Weg der Elektronen in sich geschlossen ist. Dieser **zyklische Elektronentransport** wird durch die Redoxpotentialdifferenz zwischen dem angeregten Pigment des Reaktionszentrums und dessen oxidierter Form angetrieben. Die dadurch bereitgestellte Freie Energie wird in Form der protonenmotorischen Kraft gespeichert und schließlich von einer ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu **ATP** genutzt. Zur Bereitstellung von **Reduktionsäquivalenten** für den **Baustoffwechsel** können Elektronen aus dem Elektronentransportzyklus abgezweigt und auf $NAD(P)^+$ übertragen werden. Die entnommenen Elektronen werden dem Zyklus dann aus einer externen Elektronenquelle wieder zugeführt. Als Elektronendonoren können bei den unterschiedlichen Organismen diverse organische oder anorganische Verbindungen dienen, Wasser kann jedoch nicht als Elektronendonor genutzt werden. Der Energiestoffwechsel mit nur einem Photosystem ist daher niemals mit der Freisetzung von Sauerstoff verknüpft. Die Organismen betreiben eine **anoxygene Photosynthese**.

Photosystem Typ II: Purpurbakterien und Schwefelfreie Grüne Bakterien

Purpurbakterien (Schwefelpurpurbakterien: z. B. *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*; Schwefelfreie Purpurbakterien: z. B. *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*) und Schwefelfreie Grüne Bakterien (z. B. *Chloroflexus*) verfügen über **Typ II-Reaktionszentren** (Abb. 8.**15a**). Das Standard-Redoxpotential des Pigments P_{870} in diesen Reaktionszentren („Special Pair", Bakteriochlorophyll *a* oder *b*) sinkt durch die Anregung von ca. +0,6 V auf –0,8 V ab. Nach Abgabe eines Elektrons kehrt das Pigment zu seinem ursprünglichen Redoxpotential zurück. Der erste **stabile Elektronenakzeptor** ist ein an das Reaktionszentrum gebundenes **Chinon**, dessen Standard-Redoxpotential etwa bei 0,0 V liegt. Aufgrund dieses hohen Redoxpotentials ist die **Reduktion von NAD(P)**$^+$ ($E^{0\prime}$ = –0,32 V) mit Elektronen, die der Elektronentransportkette auf der Stufe des Chinons entnommen werden, nur durch **revertierten Elektronentransport** möglich. Dieser Weg zur Versorgung mit Reduktionsäquivalenten wird von den photolithotrophen **Schwefelpurpurbakterien** beschritten. Sie übertragen Elektronen vom Chinon auf NAD^+ mit Hilfe einer NADH-Chinon-Oxidoreductase, die dem Komplex I der Atmungskette aerober, chemotropher Organismen entspricht, hier jedoch in umgekehrter Richtung arbeitet und die Freie Energie der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ nutzt. Reduzierte Schwefelverbindungen (H_2S) dienen als externe Elektronendonoren, um die aus der Elektronentransportkette abgezogenen Elektronen zu ersetzen. Dabei entsteht molekularer Schwefel, der intra- oder extrazellulär abgelagert wird. **Schwefelfreie Purpurbakterien** sind nicht darauf angewiesen, aus dem zur Energiekonservierung zyklisch arbeitenden Elektronentransport Elektronen abzuzweigen. Sie verwenden organische Verbindungen als Elektronendonoren. Diese liefern Elektronen mit ausreichend niedrigem

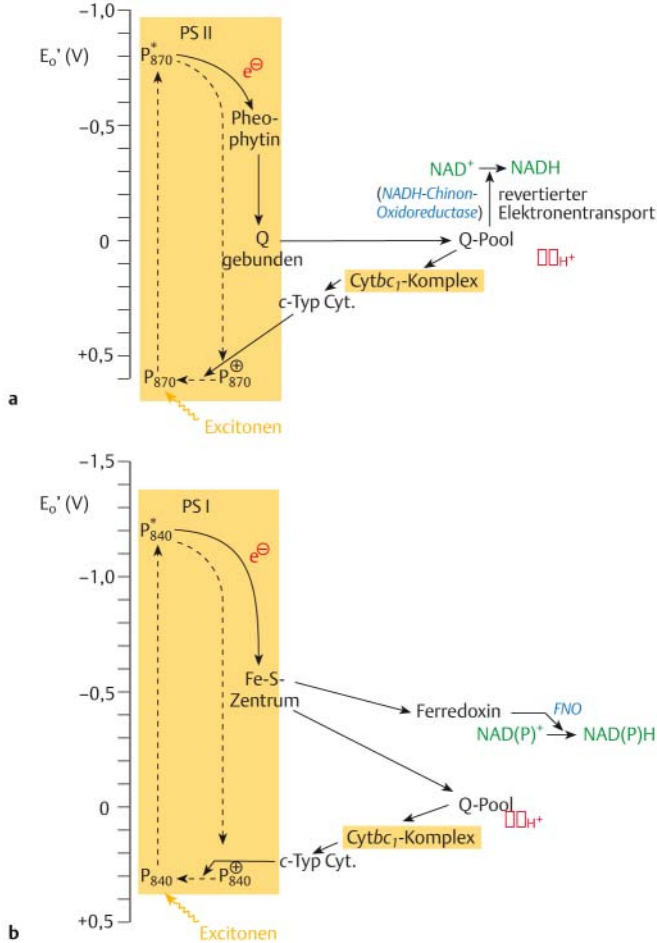


Abb. 8.**15** **Photosynthetischer Elektronentranport mit einem Photosystem. a** Typ II: Chinon-Reaktionszentrum: Purpurbakterien und Schwefelfreie Grüne Bakterien. **b** Typ I: Eisen-Schwefel-Reaktionszentrum: Grüne Schwefelbakterien und Heliobakterien. Zur Energiekonservierung verläuft der Elektronentransport zyklisch. Um $NAD(P)^+$ zu reduzieren, werden Elektronen aus dem Zyklus abgezweigt und durch Elektronen von externen Donoren ersetzt. Diese Elektronen werden meist über den Chinonpool eingespeist. Die $NAD(P)^+$-Reduktion erfolgt bei Beteiligung eines Typ II-Reaktionszentrums durch revertierten Elektronentransport über eine NADH-Chinon-Oxidoreductase. Bei Beteiligung eines Typ I-Reaktionszentrums wird $NADP^+$ ohne weiteren Energieaufwand über Ferredoxin und die Ferredoxin-$NADP^+$-Oxidoreductase (FNO) reduziert. PS: Photosystem, P: zentrales Pigment des Reaktionszentrums, Bakteriochlorophyllpaar, P^*: Pigment in angeregtem Zustand, P^+: Pigment in oxidiertem Zustand, Q: Chinon, $\Delta\mu_H$: protonenmotorische Kraft.

Redoxpotential zur Reduktion von $NAD(P)^+$. Schwefelfreie Purpurbakterien leben also photoorganotroph, können häufig aber auch einen chemoorganotrophen Stoffwechsel betreiben. Schwefelfreie **Grüne Bakterien** sind in der Lage, neben organischen Elektronendonoren (photoorganotropher Stoffwechsel), auch molekularen Wasserstoff ($\Delta E^{0\prime} = -0{,}42$ V) als Donor zu nutzen (photolithotropher Stoffwechsel); im Dunkeln können sie zusätzlich chemoorganotroph wachsen.

Photosystem Typ I: Grüne Schwefelbakterien und Heliobakterien

Grüne Schwefelbakterien (z. B. *Chlorobium*) und Heliobakterien (z. B. *Heliobacterium*) besitzen **Typ I-Reaktionszentren** (Abb. 8.**15b**). Das Standard-Redoxpotential des oxidierbaren Bakteriochlorophyllpaars dieser Reaktionszentren (Grüne Schwefelbakterien: P_{840}, BChl*a*; Heliobakterien: P_{798}, BChl*g*) liegt im nicht angeregten Zustand niedriger (ca. 0,3 V) als das Standard-Redoxpotential des Bakteriochlorophyllpaares eines Typ II-Reaktionszentrums (ca. 0,6 V). Nach Anregung sinkt das Standard-Redoxpotential auf ca. –1,2 V ab. **Eisen-Schwefel-Zentren** innerhalb des Reaktionszentrums sind die ersten **stabilen Elektronenakzeptoren** der sich anschließenden Elektronentransportkette. Zur Energiekonservierung erfolgt der Elektronentransport zyklisch, d. h. die dem Reaktionszentrum entzogenen Elektronen kehren nach Durchlaufen der Elektronentransportkette wieder zu diesem zurück. Aufgrund des niedrigen Standard-Redoxpotentials der Eisen-Schwefelzentren (ca. –0,5 V) können aus dem zyklischen Elektronentransport abgezweigte Elektronen jedoch ohne weiteren Energieaufwand auf $NADP^+$ übertragen werden. Die Weitergabe der Elektronen erfolgt über **Ferredoxin**, ein mit der cytoplasmatischen Seite der photosynthetischen Membranen assoziiertes Eisen-Schwefel-Protein ($E^{0\prime} = -0{,}42$ V) und das Flavoprotein **Ferredoxin-$NADP^+$-Oxidoreductase**. Um Elektronen, die der photosynthetischen Elektronentransportkette zur Reduktion von $NADP^+$ entzogen wurden, zu ersetzen, nutzen **Grüne Schwefelbakterien** Schwefelwasserstoff als Elektronendonor. Sie sind obligat photolithotroph. Durch CO_2-Fixierung über den reduktiven Citratzyklus sind sie zudem autotroph. **Heliobakterien** leben dagegen photoorganotroph und können im Dunkeln auch einen chemotrophen Energiestoffwechsel durch Vergärung organischer Verbindungen betreiben.

8.4.5 Lichtgetriebener Elektronentransport mit zwei Photosystemen

Cyanobakterien und die **Chloroplasten** der eukaryotischen, phototrophen Organismen verfügen über **Typ II- und Typ I-Reaktionszentren** und entsprechend auch über zwei Arten von Photosystemen (Abb. 8.**16**). In beiden Reaktionszentrumstypen findet sich als zentrales, oxidierbares Pigment ein Chlorophyll *a*-Paar mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 680 bzw. 700 nm. Photosystem II und I sind hintereinander geschaltet und katalysieren gemeinsam den Transfer von Elektronen aus Typ II-Reaktionszentren über Typ I-Reaktions-

zentren auf $NADP^+$. Angetrieben wird der Elektronentransport durch die Energie der in den Antennensystemen der beiden Photosysteme absorbierten Lichtquanten. Bei der Übertragung der Elektronen zwischen den beiden Reaktionszentren wird Energie in Form der protonenmotorischen Kraft konserviert. Die oxidierten Typ II-Reaktionszentren beziehen Elektronen aus Wasser. In der Summe findet ein **nicht-zyklischer Elektronentransport** von Wasser zu $NADP^+$ statt, bei dem die zellulären Speicher für Energie und Reduktionsäquivalente aufgefüllt werden. Durch die Nutzung von Wasser als Elektronendonor wird Sauerstoff freigesetzt. Cyanobakterien und Chloroplasten betreiben daher eine **oxygene Photosynthese**.

Im Typ II-Reaktionszentrum wird nach Excitonentransfer aus der Antenne das angeregte Chl*a*-Paar (**P_{680}**), analog zur Situation bei Purpurbakterien und Schwefelfreien Grünen Bakterien (S. 341), durch ein Pheophytin oxidiert und das Elektron zur Reduktion des Chinonpools in der Membran genutzt. An Stelle des bc_1-Komplexes übernimmt jedoch bei Cyanobakterien und Chloroplasten der in Aufbau und Funktion ähnliche ***b_6f*-Komplex** die Elektronen aus dem Chinonpool und leitet sie an **Cytochrom c** (Cyanobakterien) oder **Plastocyanin** (Chloroplasten) weiter. Dabei werden durch einen Q-Zyklus Protonen über die photosynthetische Membran transportiert. Die in Form der protonenmotorischen Kraft gespeicherte Freie Energie wird zur Synthese von ATP genutzt. Die mobilen Elektronenüberträger Cytochrom *c* bzw. Plastocyanin führen die Elektronen anschließend jedoch nicht zum $Pigment_{680}$ zurück, sondern nutzen sie zur Reduktion des Chl*a*-Paares der Typ I-Reaktionszentren (**P_{700}**), das ebenfalls nach Anregung oxidiert vorliegt. Das Standard-Redoxpotentialvon P_{700} sinkt durch die Anregung auf –1,3 V ab. Die dem P_{700} entzogenen Elektronen durchlaufen die prosthetischen Gruppen des Reaktionszentrums und werden schließlich auf Ferredoxin und von dort über die Ferredoxin-$NADP^+$-Oxidoreductase auf $NADP^+$ übertragen. Diese Sequenz wird analog auch bei den Grünen Schwefelbakterien und Heliobakterien beschritten, wenn diese durch nicht-zyklischen Elektronentransport Reduktionsäquivalente bilden (S. 343). P_{700} kehrt durch die Oxidation in den Grundzustand zurück und kann dann aufgrund seines verhältnismäßig hohen Standard-Redoxpotentials (+0,45 V) von Cytochrom c bzw. Plastocyanin ($E^{0\prime}$ = +0,37 V bzw. +0,27 V) reduziert werden. Das Standard-Redoxpotential von $Pigment_{680}$ eines Typ II-Reaktionszentrums sinkt durch Anregung auf –0,7 V ab und liegt nach Pigmentoxidation und damit Rückkehr in den Grundzustand bei +1,15 V. Aufgrund dieses extrem hohen Wertes ist P_{680} in der Lage seine Elektronenlücke dadurch zu schließen, dass es Wasser ($E^{0\prime}$ = +0,82 V) Elektronen entzieht. Diese werden über das **Wasserspaltungsenzym** bereitgestellt, ein Protein, das an die Typ II-Reaktionszentren auf der Lumenseite der von den photosynthetischen Membranen gebildeten Membranvesikel angelagert ist. Bei der Spaltung von zwei Wassermolekülen werden vier Elektronen auf den Mangan-Cluster des Enzyms (4 Mn-Atome) übertragen, aus dem P_{680} die Elektronen dann einzeln abzieht. Für jedes gespaltene Wassermolekül wer-

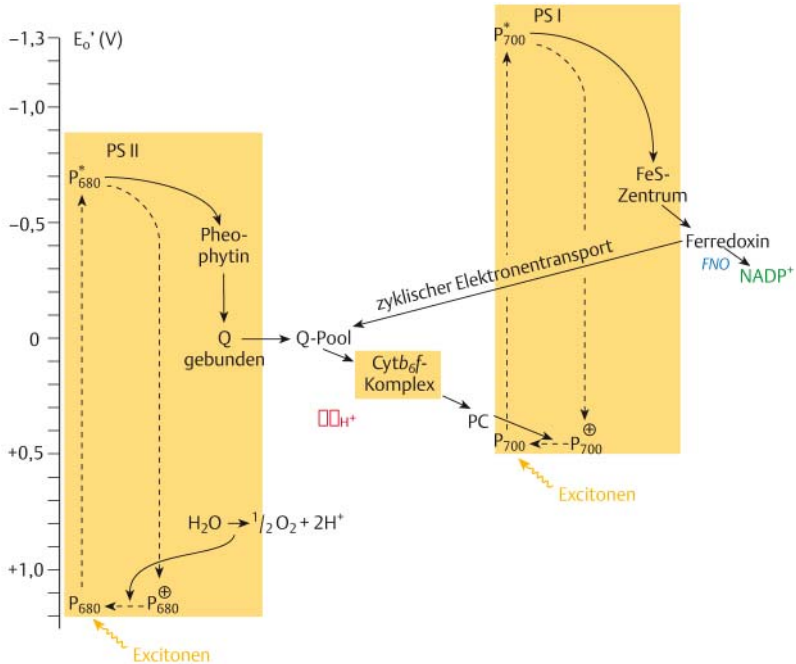


Abb. 8.**16** **Photosynthetischer Elektronentransport (ET) mit zwei Photosystemen (Typ I und Typ II).** Durch nicht-zyklischen ET wird sowohl die $\Delta\mu_{H^+}$ aufgebaut als auch NADP$^+$ reduziert. Die Elektronen werden aus der Wasserspaltung bereitgestellt. Beim zyklischen ET, der nur über Photosystem I und Cytochrom b_6f verläuft, wird Energie nur durch Aufbau der protonenmotorischen Kraft konserviert, jedoch kein NADP$^+$ reduziert. Als Elektronenüberträger zwischen dem b_6f-Komplex und P_{700} fungiert bei Chloroplasten Plastocyanin (PC, hier gezeigt) bei Cyanobakterien dagegen Cytochrom *c*. PS: Photosystem, P: zentrales Pigment des Reaktionszentrums, Bakteriochlorophyllpaar, P*: Pigment in angeregtem Zustand, P$^+$: Pigment in oxidiertem Zustand, Q: Chinon, FNO: Ferredoxin-NADP$^+$-Oxidoreductase, $\Delta\mu_{H^+}$: protonenmotorische Kraft.

den zwei Protonen ins Lumen der Membranvesikel freigesetzt, was zum Aufbau der protonenmotorischen Kraft beiträgt. Als Abfallprodukt der Wasserspaltung entsteht molekularer **Sauerstoff**. Purpurbakterien und Schwefelfreie Grüne Bakterien sind nicht in der Lage, Wasser Elektronen zu entziehen, da das Standard-Redoxpotential von Pigment$_{870}$ ihrer Typ II-Reaktionszentren mit 0,6 V zu niedrig ist.

In Abwandlung der oben beschriebenen Situation können Cyanobakterien und Chloroplasten bei ausreichender Versorgung mit NADPH auch einen **zyklischen Elektronentransport** katalysieren, an dem nur Photosystem I beteiligt ist und der ausschließlich der Protonentranslokation und damit der ATP-Synthese dient.

Von Ferredoxin werden dabei Elektronen über den Chinonpool und den b_6f-Komplex zu P_{700} zurückgeleitet. Die Energiekonservierung beruht auf dem Q-Zyklus.

Der **Wirkungsgrad der Energiekonservierung** beim nicht-zyklischen Elektronentransport von Cyanobakterien und Chloroplasten lässt sich abschätzen, wenn der durch Lichtabsorption aufgenommene Energiebetrag den energetischen Kosten für die Synthese von ATP und die Reduktion von $NADP^+$ gegenübergestellt wird:

Ein Sauerstoff (O_2) wird freigesetzt, wenn vier Elektronen von Wasser auf $NADP^+$ übertragen werden:

$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ \rightarrow O_2 + 2\ NADPH + 2\ H^+$$

Zugeführte Energie: Jedes der vier Elektronen durchläuft die Reaktionszentren von Photosystem I und II und bedarf daher der Anregung durch jeweils ein Photon der Wellenlänge 680 nm und ein Photon der Wellenlänge 700 nm.

8

λ = 680 nm 176 kJ mol^{-1} Photonen

λ = 700 nm 171 kJ mol^{-1} Photonen

$(4\times176) + (4\times171) = 1388$ kJ mol^{-1} O_2 gebildet

Konservierte Energie: Jedes der vier Elektronen überwindet durch die Arbeit der beiden Photosysteme die Redoxpotentialdifferenz zwischen Wasser und $NADP^+$.

$\Delta E^{0\prime} = (-0{,}32\ V) - (+0{,}82\ V) = -1{,}14\ V.$

Der dabei aufzuwendende Energiebetrag berechnet sich gemäß Gl. 8.9.

$$\Delta G^{0\prime} = -(4) \times (96{,}5\ kJ\ V^{-1}mol^{-1}) \times (-1{,}14\ V)$$
$$= +440\ kJ\ mol^{-1}\ \text{gebildetes}\ O_2$$

Die Oxidation von zwei Wassermolekülen setzt vier Protonen auf der Lumenseite der photosynthetischen Membranvesikel frei und über den Cytochrom b_6f-Komplex und den Q-Zyklus werden pro Elektronenpaar vier Protonen, pro gebildetem O_2 also acht Protonen über die Membran transferiert. Unter der Annahme, dass die ATP-Synthase mit einer Stöchiometrie von vier H^+ pro ATP arbeitet (S. 331) und die ATP-Synthese unter physiologischen Bedingungen einen ΔG-Wert von ca. 50 kJ mol^{-1} besitzt (S. 314), könnten drei Mol ATP gebildet und damit ein Energiebetrag von 150 kJ pro Mol O_2 in Form von ATP konserviert werden.

Das **Verhältnis von konserviertem zu zugeführtem Energiebetrag** ([440 kJ mol^{-1} + 150 kJ mol^{-1}]/1388 kJ mol^{-1} = 0,43) ergibt, dass bei der Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese etwa **40 %** der eingestrahlten Energie konserviert wird.

8.4.6 Die lichtgetriebene Protonenpumpe der Haloarchaea

Eine besondere Form der Nutzung des Sonnenlichts findet sich bei den **Haloarchaea**. Diese an hypersalinen Standorten vorkommenden Archaea leben unter aeroben Bedingungen chemoorganotroph, sie synthetisieren jedoch bei niedriger Sauerstoffkonzentration das Protein **Bakteriorhodopsin**, das ohne Beteiligung einer Redoxreaktion als **lichtgetriebene Protonenpumpe** arbeitet und so die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ an der Cytoplasmamembran der Zellen aufbaut. Das Bakteriorhodopsin ist ein weiteres Beispiel für einen **primären Transporter**,

der sich jedoch dadurch auszeichnet, dass er nicht die von einer chemischen Reaktion gelieferte Energie sondern die Energie elektromagnetischer Strahlung zum **aktiven Transport** seines Substrats, der Protonen, nutzt. Bakteriorhodopsin trägt als Pigment das purpurrot gefärbte Carotinoid **Retinal** und bildet in der Cytoplasmamembran der Zellen Areale, die ausschließlich aus Protein bestehen (**Purpurmembran**). Das Retinal ist kovalent mit dem Bakteriorhodopsin verbunden: Zwischen der Aldehydgruppe des Retinals und der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Bakteriorhodopsins ist eine als Schiff'sche Base bezeichnete Bindung ausgebildet. Licht setzt einen **photochemischen Zyklus** in Gang (Abb. 8.**17**): Durch Lichtabsorption kommt es im Retinal an der Doppelbindung zwischen C13 und C14 zum Wechsel von der *trans*- zur *cis*-Konfiguration. Zugleich verändert sich die Protonenaffinität der Schiff'schen Base (Proton am Stickstoffatom der Lysin-Aminogruppe). Im nicht angeregten Zustand ist das Stickstoffatom von der Membraninnenseite aus zugänglich und seine Protonierung erfolgt durch Aufnahme eines Protons aus dem Cytoplasma. Nach Anregung und Konfigurationswechsel hat das Stickstoffatom Zugang zur Membranaußenseite und aufgrund der verminderten Protonenaffinität verliert es das Proton nun nach außen. Schließlich kehrt das Retinal spontan in den Ausgangszustand zurück und kann erneut auf der Membraninnenseite protoniert werden. Durch diesen Zyklus wird an der Cytoplasmamembran der Bakterien die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ aufgebaut, die die Zellen entweder zur ATP-Synthese oder aber zum aktiven Export von Natriumionen nutzen können (Na^+/H^+-Antiporter).

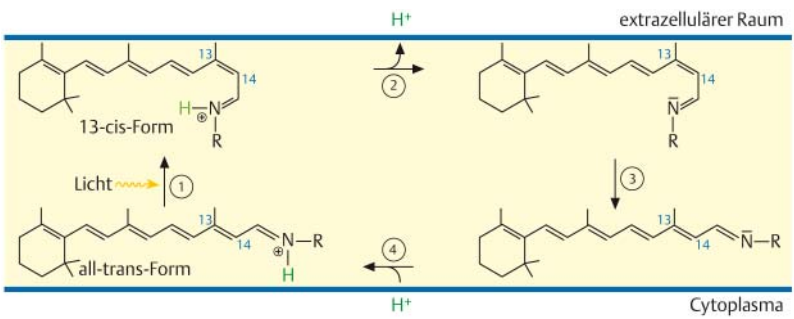


Abb. 8.**17** **Die lichtgetriebene Protonenpumpe von *Halobacterium salinarum*.** Retinal durchläuft einen von Licht angetriebenen Zyklus. Schritt 1: Isomerisierung der protonierten *all-trans*-Form zur protonierten 13-*cis*-Form. Schritt 2: Deprotonierung auf der extrazellulären Seite der Cytoplasmamembran. Schritt 3: In deprotoniertem Zustand Rückkehr zur *all-trans*-Form. Schritt 4: Erneute Protonierung durch Aufnahme eines Protons auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Resultat des Zyklus ist die Translokation eines Protons über die Cytoplasmamembran der Bakterien.

Pigment: Durch Absorption von Licht des sichtbaren Spektralbereichs des Sonnenlichts farbig erscheinende, organische Verbindung. Verfügt über zahlreiche, konjugierte Doppelbindungen.
Photon: Diskretes Energiepaket elektromagnetischer Strahlung.
Exciton: Diskretes Energiepaket, das zwischen Pigmenten (durch Excitonentransfer) weitergegeben wird.
Antennensystem: Gesamtheit von proteingebundenen Pigmenten, die absorbiertes Licht an ein Reaktionszentrum weiterleiten.
Reaktionszentrum: Membranproteinkomplex, an dem die photochemische Energieumwandlung stattfindet.
Photosystem: Funktionseinheit aus Antennensystem und Reaktionszentrum.
Lichtreaktion der Photosynthese: Reaktionen der lichtgetriebenen Energiekonservierung (Photophosphorylierung, lichtgetriebene Reduktion von $NAD(P)^+$).
Dunkelreaktion der Photosynthese: Reaktionen zum Aufbau organischer Verbindungen, für den die Produkte der Lichtreaktion (ATP, NADPH) benötigt werden.
(Bakterio)chlorophylle: Pigmente, die aus einem unterschiedlich substituierten Tetrapyrrolring mit zentralem Magnesiumatom und einem langkettigen Terpenalkohol aufgebaut sind.
Pheophytine: Chlorophylle ohne Magnesiumion.
Phycobiline: Pigmente mit offenkettigem Tetrapyrrol als Grundstruktur; Phycoerythrobilin (rot gefärbt), Phycocyanobilin (blau gefärbt).
Phycobiliproteine: Proteine mit kovalent gebundenem Phycobilin; Phycoerythrin, Phycocyanin.
Carotinoide: Hydrophobe Pigmente, aus acht Isopreneinheiten aufgebaut; Carotine, sauerstofffreie Carotinoide; Xanthophylle, sauerstoffhaltige Carotinoide.
Lichtsammelfalle: Antennensystem, in dem Excitonen gezielt zum Reaktionszentrum geleitet werden.
Lichternte(light harvesting)systeme: Antennensysteme der Purpurbakterien; bestehen aus zahlreichen pigmenttragenden, membranständigen Proteinen, die die Reaktionszentren umgeben.
Thylakoide: System interner Membranvesikel in Cyanobakterien und Chloroplasten.
Phycobilisomen: Antennensysteme von Cyanobakterien und Rotalgen.
Chlorosomen: Antennensysteme der Grünen Schwefelbakterien und Schwefelfreien Grünen Bakterien.
Lichterntekomplex (LHC) I und II: Antennensysteme der Photosysteme in höheren Pflanzen und vielen Algen, Membranproteinkomplexe.
„Special Pair“: Paar von (Bakterio)chlorophyllen; zentrales Pigment eines Reaktionszentrums; wird nach Anregung oxidiert, sodass es zu Ladungstrennung und damit dem Ausbleichen des Pigments kommt.
Typ I Fe-S-Reaktionszentrum: Reaktionszentrum, bei dem ein Eisen-Schwefelzentrum der erste stabile Akzeptor des dem „Special Pair“ entzogenen Elektrons ist.
Typ II Pheophytin-Chinon-Reaktionszentrum: Reaktionszentrum, bei dem das „Special Pair“ durch ein Pheophytin oxidiert wird und ein gebundenes Chinon des Reaktionszentrums der erste stabile Elektronenakzeptor ist.

Zyklischer Elektronentransport: Elektronentransport, bei dem das dem zentralen Pigment eines Reaktionszentrums entzogene Elektron nach Durchlaufen der Elektronentransportkette wieder zum oxidierten Pigment zurückkehrt.
Anoxygene Photosynthese: Photosynthese ohne Freisetzung molekularen Sauerstoffs; Wasser wird nicht als Elektronendonor zur Reduktion von $NAD(P)^+$ verwendet.
Nicht-zyklischer Elektronentransport: Linearer, durch Licht angetriebener Elektronentransport von einem externen Elektronendonor zu $NAD(P)^+$ als Elektronenakzeptor.
Oxygene Photosynthese: Photosynthese, die mit der Freisetzung molekularen Sauerstoffs verbunden ist; Wasser wird als Elektronendonor für die Reduktion von $NAD(P)^+$ verwendet.
Ferredoxin: Membranassoziiertes Eisen-Schwefel-Protein mit niedrigem Redoxpotential.
Ferredoxin-$NADP^+$-Oxidoreductase: Lösliches Redoxenzym, das Elektronen von Ferredoxin auf $NADP^+$ überträgt.
Wasserspaltungsenzym: Mit Typ II-Reaktionszentren assoziiertes Enzym, das Wasser oxidiert und die Elektronen an das zentrale Pigment der Reaktionszentren weiterleitet; Elektronen werden im Mangan-Cluster des Enzyms gespeichert.
Bakteriorhodopsin: Lichtgetriebene Protonenpumpe von *Halobacterium salinarum*.
Retinal: Carotinoid-Pigment des Bakteriorhodopsins.

8.5 Chemoorganotrophie: I. Zentrale Abbauwege zur Oxidation organischer Verbindungen

Die zentralen Stoffwechselwege zur **Oxidation von Zuckern** führen im ersten Abschnitt zur **Bildung von Pyruvat**. Dabei wird Energie durch Substratstufenphosphorylierung konserviert. Eukaryoten und viele Prokaryoten bauen Glucose über die **Glykolyse** ab. Bei aeroben Prokaryoten weit verbreitet ist der **Entner-Doudoroff-Weg**. Heterofermentative Milchsäurebakterien nutzen zum Glucoseabbau den **Phosphoketolase-Weg**. Steht einem Organismus Sauerstoff als Elektronenakzeptor für die bei der Zuckeroxidation anfallenden Reduktionsäquivalente zur Verfügung, so kann eine **vollständige Oxidation** von Zuckern bis zum CO_2 erfolgen. Pyruvat wird dann über den **Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex** durch oxidative Decarboxylierung zu **Acetyl-Coenzym A** umgesetzt. Dieses wird anschließend im **Citratzyklus** zu CO_2 oxidiert. Die **β-Oxidation der Fettsäuren** liefert als Abbauprodukt ebenfalls Acetyl-Coenzym A, das in den Citratzyklus eingeschleust wird.

Chemoorganotrophe Organismen oxidieren organische Verbindungen, die durch die Biosyntheseaktivität anderer Organismen entstanden sind, und konservieren die Energie, die dabei verfügbar wird. Der **Abbau komplexer organischer Verbindungen** erfolgt über vielfältige Stoffwechselwege und führt zur **Bildung einfacher Stoffwechselprodukte**, je nach Organismus und Umweltbedingungen kann es sich dabei auch um CO_2 handeln. Die bei den Oxidationsschritten anfallenden Elektronen werden auf einen Elektronenakzeptor übertragen.

In der Nahrung der chemoorganotrophen Organismen liegen die organischen Verbindungen zum großen Teil als **Polymere** vor. Mengenmäßig überwiegen dabei Kohlenhydratpolymere wie Cellulose, Hemicellulosen, Stärke, Glykogen oder auch Chitin. Polymere aus Aminosäuren, die Proteine, oder aus Nucleotiden, die Nucleinsäuren, machen nur einen geringen Anteil aus. Fette, ein weiterer wichtiger Bestandteil organischen Materials, bestehen aus Glycerin und mit diesem veresterten Fettsäuren (Triacylglyceride). Erster Schritt der Verwertung organischer Polymere durch chemoorganotrophe Bakterien ist die **Spaltung in Monomere**. Dies geschieht meist durch extrazelluläre, hydrolytische Enzyme, z. B. Cellulasen, Amylasen, Proteinasen oder Nucleasen. Fette werden durch Lipasen in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Dann folgt der **Transport** der Moleküle durch die Cytoplasmamembran in die Zelle, der in der Regel durch spezifische Transportproteine katalysiert wird (S. 395). Zucker werden im Cytoplasma durch Phosphorylierung aktiviert (beim Transport über ein Phosphotransferasesystem erfolgt die Phosphorylierung bereits bei der Aufnahme) und dann in **zentrale**, **katabole Stoffwechselwege** eingeschleust. In deren Verlauf gebildete energiereiche Verbindungen erlauben Energiekonservierung über **Substratstufenphosphorylierung** (S. 320). Oxidationschritte werden von löslichen Dehydrogenasen katalysiert. Über NADH werden Elektronen bzw. Reduktionsäquivalente an einen Elektronenakzeptor weitergeleitet und so für eine ausgeglichene **Redoxbilanz** gesorgt. Viele Organismen können Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen und organische Verbindungen dann **vollständig zu CO_2 oxidieren**. Eine **unvollständige Oxidation** organischer Verbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff tritt meist nur dann auf, wenn ein Organismus mit einem Überangebot an organischen Nährstoffen konfrontiert und die Energiekonservierung nicht sein primäres Ziel ist (Gluconsäurebildung aus Glucose durch *Gluconobacter*-Arten; Essigsäurebildung aus Ethanol durch *Acetobacter*-Arten).

8.5.1 Die Glykolyse: Der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg

Die **Glykolyse** (Abb. 8.**18**), auch Embden-Meyerhof-Parnas-Weg genannt, ist der für Eukaryoten typische und ein unter Prokaryoten weit verbreiteter Abbauweg für Glucose. Der glykolytische Glucoseabbau findet sich bei atmenden, strikt aeroben oder fakultativ anaeroben Bakterien und auch bei solchen, die ausschließlich anaerob atmen oder gären. Im Verlauf der Glykolyse entstehen aus einem Molekül **Glucose** (C_6) zwei Moleküle **Pyruvat** (C_3). Zunächst wird die

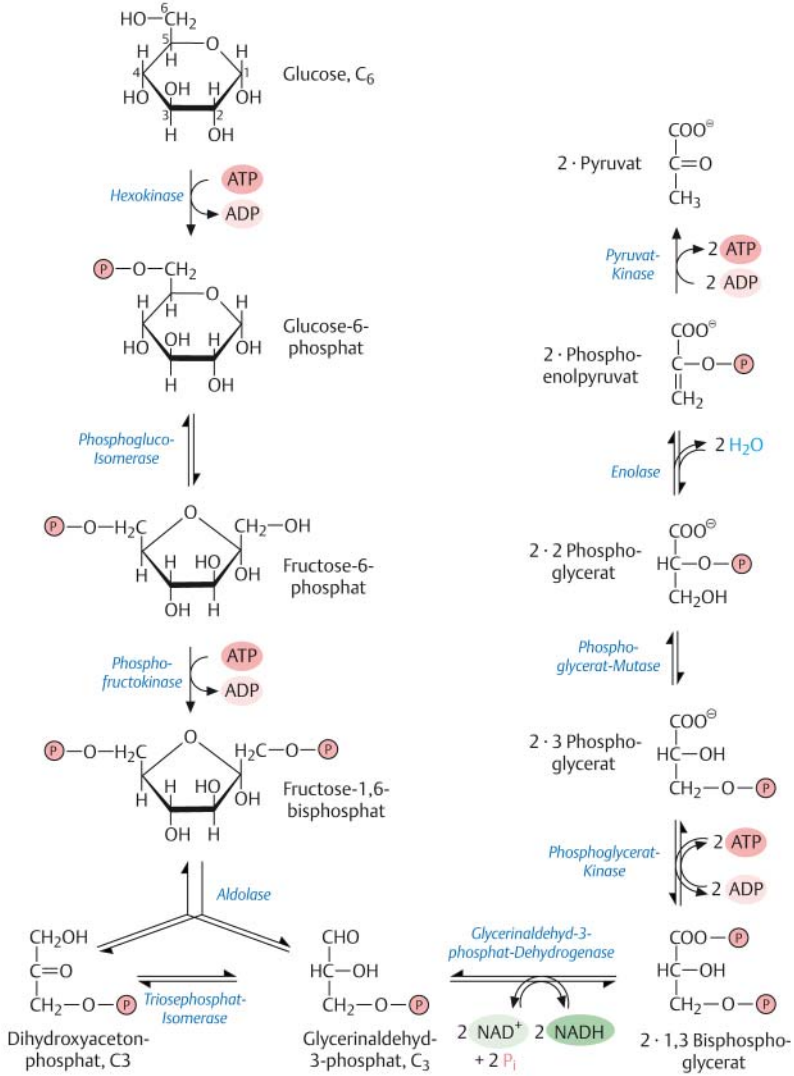


Abb. 8.**18** **Die Glykolyse.** Im Verlauf der Glykolyse wird Glucose (C_6) zu Pyruvat ($2 \cdot C_3$) abgebaut. Dabei werden in der Summe zwei Moleküle ATP pro Molekül Glucose durch Substratstufenphosphorylierung gebildet. Pro Molekül Glucose entstehen zudem zwei Moleküle NADH. Schlüsselenzym der Glykolyse ist die Aldolase.

Glucose ATP-abhängig zu Glucose-6-phosphat aktiviert und nach Isomerisierung dann ein zweites Mal phosphoryliert, es entsteht Fructose-1,6-bisphosphat. Diese Verbindung wird durch das Schlüsselenzym der Glykolyse, die **Aldolase**, in die beiden C_3-Verbindungen Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Letztere Verbindung wird zu einem zweiten Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat isomerisiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird dann durch die **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase** dehydrogeniert, als Produkt entsteht die energiereiche Verbindung **1,3-Bisphosphoglycerat**. Durch Übertragung einer Phosphatgruppe auf ADP synthetisiert die 3-Phosphoglycerat-Kinase mit Hilfe dieser Verbindung ein ATP. Als weitere energiereiche Verbindung entsteht im Anschluss **Phosphoenolpyruvat**, sodass über die sich anschließende Reaktion der **Pyruvat-Kinase** nochmals ATP durch Substratstufenphosphorylierung synthetisiert werden kann. Beim glykolytischen Abbau eines Moleküls Glucose müssen also zwei Moleküle ATP aufgewendet werden, es können dann jedoch vier Moleküle ATP gebildet werden. Der Dehydrogenierungsschritt liefert zwei Moleküle NADH pro Glucosemolekül.

Als **Bilanz** der Glykolyse ergibt sich:

Glucose + 2 NAD^+ + 2 ADP + 2 P_i → 2 Pyruvat + 2 NADH + 2 H^+ + 2 ATP

8.5.2 Der Entner-Doudoroff-Weg

Auch beim Glucoseabbau über den **Entner-Doudoroff-Weg** (Abb. 8.**19**) entstehen aus einem Molekül **Glucose** zwei Moleküle **Pyruvat**. Auf die Aktivierung der Glucose durch Phosphorylierung mit ATP als Phosphatgruppendonor folgt hier aber direkt ein Oxidationsschritt durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Es entsteht 6-Phosphogluconat, welches nach Wasserabspaltung **2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat** (**KDPG**) liefert, die für den Stoffwechselweg charakteristische Verbindung. Das Schlüsselenzym des Entner-Doudoroff-Weges, die **KDPG-Aldolase**, spaltet KDPG anschließend in Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Da nun nur ein Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat über die aus der Glykolyse bekannten Reaktionsschritte zu Pyruvat umgewandelt wird, entsteht im Entner-Doudoroff-Weg in der Summe nur ein Molekül ATP pro Molekül Glucose. Die **Bilanz** des Entner-Doudoroff-Weges sieht daher folgendermaßen aus:

Glucose + 2 $NAD(P)^+$ + ADP + P_i → 2 Pyruvat + 2 NAD(P)H + ATP

Entsprechend dieser **geringeren Energieausbeute** findet man den Entner-Doudoroff-Weg meist bei atmenden Bakterien, die in der Lage sind, weitere Energie über Elektronentransportphosphorylierung zu konservieren, wie Pseudomonaden und Rhizobien. Unter den fermentierenden Bakterien nutzen z. B. *Zymomonas*-Arten den Entner-Doudoroff-Weg, die darauf spezialisiert sind, bei hohen Zuckerkonzentrationen zu leben, sodass die Energieversorgung für sie kein Problem darstellt.

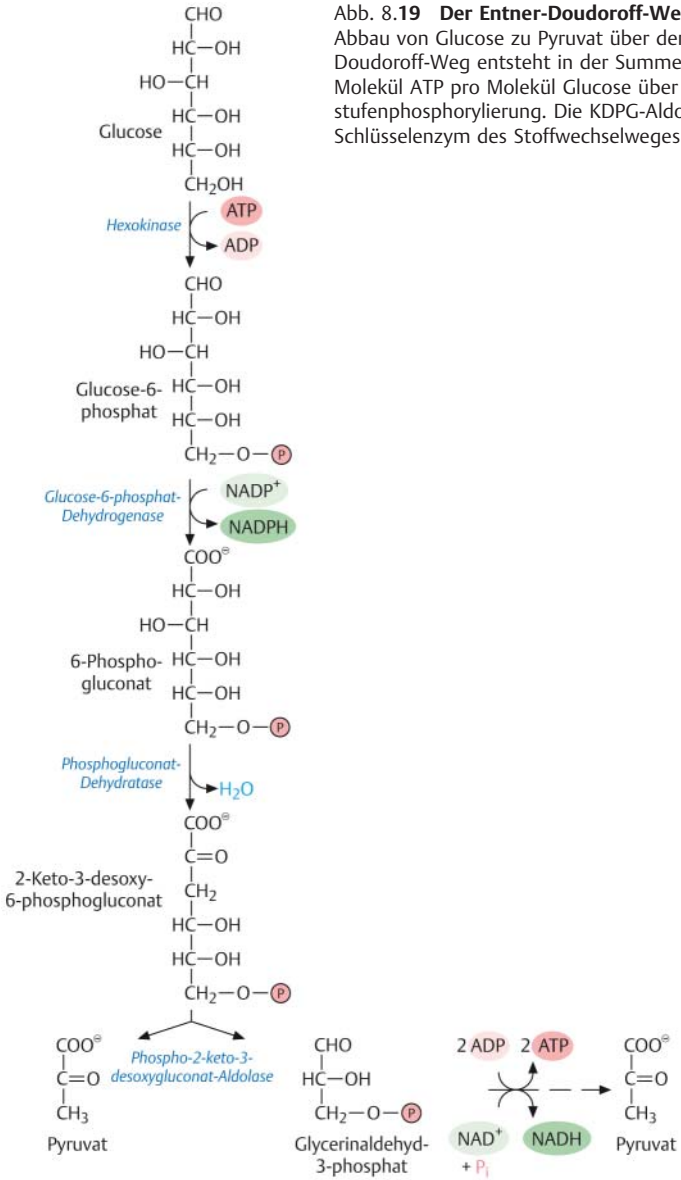


Abb. 8.**19** **Der Entner-Doudoroff-Weg.** Beim Abbau von Glucose zu Pyruvat über den Entner-Doudoroff-Weg entsteht in der Summe nur ein Molekül ATP pro Molekül Glucose über Substratstufenphosphorylierung. Die KDPG-Aldolase ist das Schlüsselenzym des Stoffwechselweges.

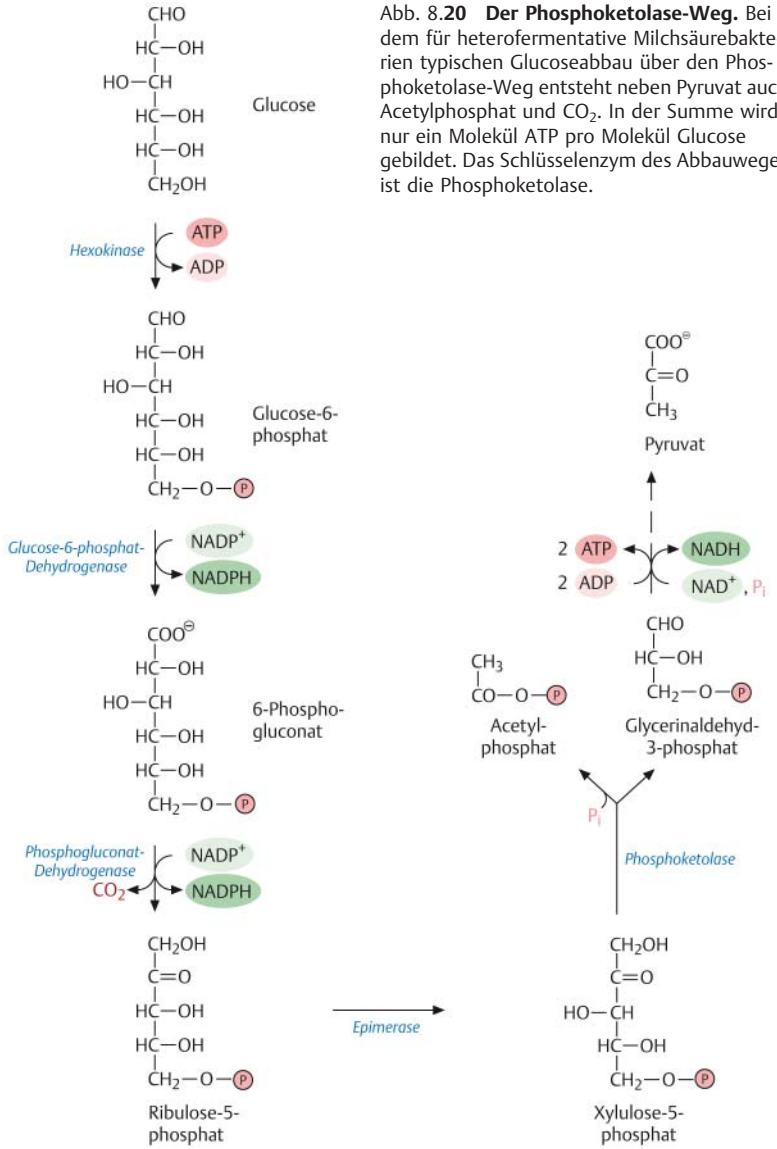


Abb. 8.**20** **Der Phosphoketolase-Weg.** Bei dem für heterofermentative Milchsäurebakterien typischen Glucoseabbau über den Phosphoketolase-Weg entsteht neben Pyruvat auch Acetylphosphat und CO_2. In der Summe wird nur ein Molekül ATP pro Molekül Glucose gebildet. Das Schlüsselenzym des Abbauweges ist die Phosphoketolase.

8.5.3 Der Phosphoketolase-Weg

Heterofermentative Milchsäurebakterien nutzen zum Glucoseabbau den **Phosphoketolase-Weg** (Abb. 8.**20**). Die ersten Schritte dieses Stoffwechselweges, Phosphorylierung und Oxidation der Glucose zu 6-Phosphogluconat, stimmen mit den Eingangsschritten des Entner-Doudoroff-Weges überein. Es schließt sich nun jedoch die oxidative Decarboxylierung des 6-Phosphogluconats durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase an. Es entsteht die C_5-Verbindung Xylulose-5-phosphat, das Substrat des Schlüsselenzyms des Stoffwechselweges, der **Phosphoketolase**. Dieses Enzym setzt Xylulose-5-phosphat zu Acetylphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat um. Aus letzterem entsteht über die aus der Glykolyse bekannten Schritte **Pyruvat**. So wird in der **Bilanz** wiederum nur ein Molekül ATP pro Molekül umgesetzter Glucose gebildet:

$$\textbf{Glucose} + 3\ \textbf{NAD(P)}^+ + \textbf{ADP} + \textbf{P}_i \rightarrow \textbf{Pyruvat} + \textbf{Acetylphosphat} + \textbf{CO}_2 + 3\ \textbf{NAD(P)H} + \textbf{ATP}.$$

8.5.4 Oxidation des Pyruvats

Atmende Organismen, die NADH mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor reoxidieren können, setzen Pyruvat durch den **Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex** um. Dieser **Enzymkomplex** ist bei Prokaryoten im Cytoplasma, bei Eukaryoten in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert und katalysiert die oxidative Decarboxylierung des Pyruvats mit NAD^+ als Akzeptor der Reduktionsäquivalente:

$$\textbf{Pyruvat} + \textbf{Coenzym A} + \textbf{NAD}^+ \rightarrow \textbf{Acetyl-Coenzym A} + \textbf{NADH} + \textbf{H}^+ + \textbf{CO}_2$$

Es handelt sich dabei um einen Multienzymkomplex mit drei Funktionseinheiten, an dem das Pyruvat nach seiner Bindung decarboxyliert und anschließend oxidiert wird. Die entstandene Acetylgruppe wird auf Coenzym A transferiert und es entsteht die energiereiche Verbindung **Acetyl-Coenzym A**.

8.5.5 Der Citratzyklus

Die Reaktionen des **Citratzyklus** (Abb. 8.**21**) laufen bei Prokaryoten im Cytoplasma, bei Eukaryoten in der Matrix der Mitochondrien ab. Der Citratzyklus dient der **vollständigen Oxidation** der durch die Reaktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes entstandenen **Acetylgruppe** und zusätzlich der Bereitstellung verschiedener Vorstufen für den Baustoffwechsel (S. 403). Die Acetylgruppe wird durch Verknüpfung mit einer C_4-Verbindung in den Zyklus eingeschleust. Im Verlauf des Zyklus werden dann **zwei CO_2-Moleküle** freigesetzt und anschließend die als Akzeptor dienende C_4-Verbindung regeneriert. Die **Citratsynthase**, das Eingangsenzym des Citratzyklus, katalysiert die Bildung der C_6-Verbindung Citrat durch Übertragung der Acetylgruppe (C_2) auf Oxalacetat (C_4). Es folgt die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat (Aconitase). Die **Isocitrat-Dehydrogenase**

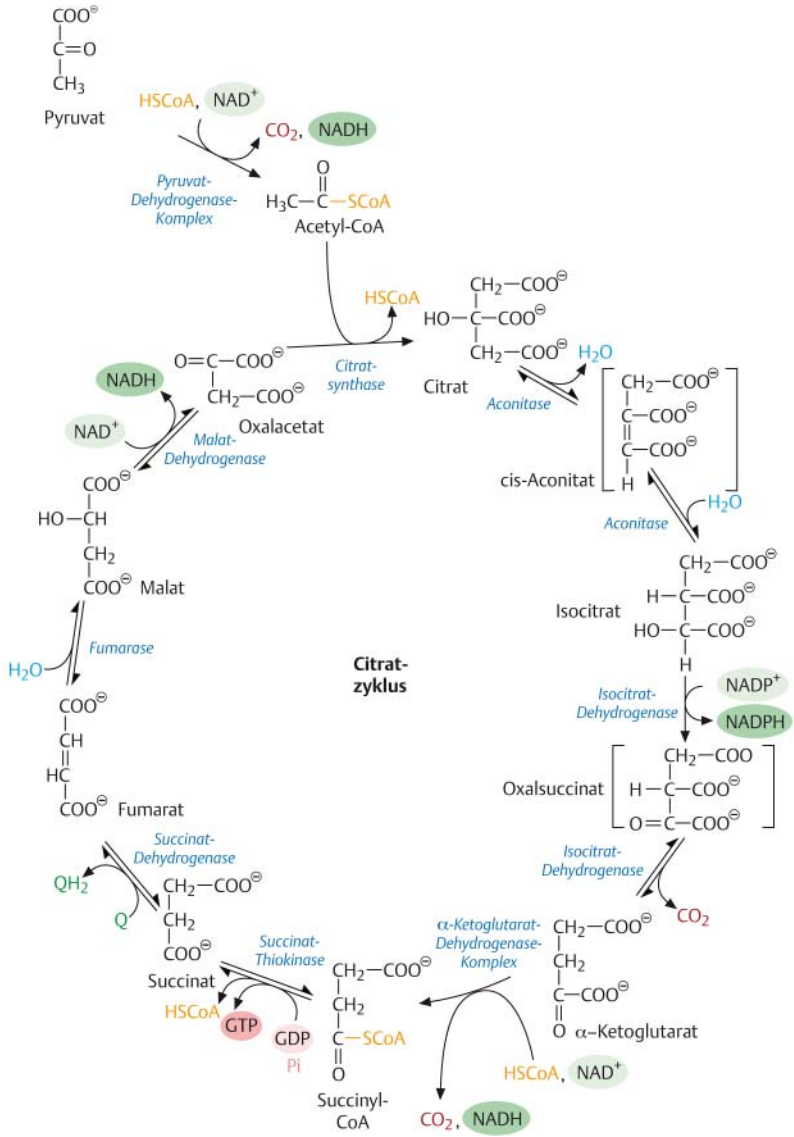


Abb. 8.**21** **Der Citratzyklus.** Über den Citratzyklus erfolgt die vollständige Oxidation der Acetylgruppe (C_2) zu zwei Molekülen CO_2. Oxalacetat, der Akzeptor der Acetylgruppe wird im Verlauf des Zyklus regeneriert. Voraussetzung für das Funktionieren des Zyklus ist die Verfügbarkeit eines Akzeptors für die bei den Dehydrogenierungsschritten anfallenden Reduktionsäquivalente.

katalysiert die Oxidation der Hydroxylgruppe des Isocitrats zur Ketogruppe und die Decarboxylierung der dabei entstehenden Verbindung. Produkt ist α-Ketoglutarat. Diese Verbindung wird durch den **α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex** oxidativ decarboxyliert, in einer Reaktion, die analog zu derjenigen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes verläuft. Dabei entsteht die energiereiche Verbindung **Succinyl-Coenzym A**, die mittels des Enzyms Succinat-Thiokinase zur Energiekonservierung über **Substratstufenphosphorylierung** genutzt werden kann. Durch die beiden beschriebenen Decarboxylierungen sind zwei Kohlenstoffatome in Form von CO_2 abgeführt worden. Anschließend wird Succinat durch die **Succinat-Dehydrogenase** zu Fumarat oxidiert. Durch Wasseranlagerung, katalysiert durch die Fumarase, entsteht Malat, das im letzten Schritt durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert wird. Damit ist der Akzeptor für die Acetylgruppe wiederhergestellt.

α-Ketoglutarat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase übertragen die ihrem Substrat entzogenen Reduktionsäquivalente auf NAD^+, die Isocitrat-Dehydrogenase überträgt die Reduktionsäquivalente in Bakterien meistens auf $NADP^+$. Die Succinat-Dehydrogenase ist ein Membranproteinkomplex mit FAD als prosthetischer Gruppe, der die bei der Dehydrogenierung des Succinats anfallenden Elektronen über den Chinonpool in die Elektronentransportkette einführt (Komplex II der Atmungskette). Die von **Citratsynthase**, **Isocitrat-Dehydrogenase und α-Ketoglutarat-Dehydrogenase** katalysierten Reaktionen verlaufen unter physiologischen Bedingungen **irreversibel**.

8.5.6 Die β-Oxidation der Fettsäuren

Der Abbau von Fettsäuren findet in Bakterien im Cytoplasma, in Eukaryoten in der Matrix der Mitochondrien und gewöhnlich nur unter aeroben Bedingungen statt. Da der Reduktionsgrad der Kohlenstoffatome in den langen Kohlenstoffketten der Fettsäuren hoch ist, kann eine ausgeglichene Redoxbilanz bei ihrer Oxidation nur erzielt werden, wenn ein externer Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Durch Dehydrogenierung und Spaltung in C_2-Einheiten entsteht im Verlauf der **β-Oxidation der Fettsäuren** Acetyl-Coenzym A (Abb. 8.**22**). Dieses wird anschließend in den Citratzyklus eingeschleust. Freie Fettsäuren werden zuerst über die **Acyl-Coenzym A-Synthetase** (**Schritt 1**) aktiviert. Dazu bedarf es des Aufwands von zwei energiereichen Bindungen: ATP wird in AMP und Pyrophosphat (PP_i) gespalten und letzteres anschließend in zwei P_i. Erster Oxidationsschritt ist die Einführung einer Doppelbindung zwischen den beiden zur Carboxylgruppe benachbarten Kohlenstoffatomen (α- und β-Kohlenstoffatom). Aufgrund des relativ hohen Redoxpotentials des Redoxpaares Fettsäure/α-β-ungesättigte Fettsäure (ca. 0,0 V) fungiert im dehydrogenierenden Enzym, der **Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase** (**Schritt 2**), FAD als Akzeptor der Reduktionsäquivalente. Durch ein Elektronen übertragendes Flavoprotein werden diese dann an den Chinonpool in der Membran weitergegeben. Die sich anschließende

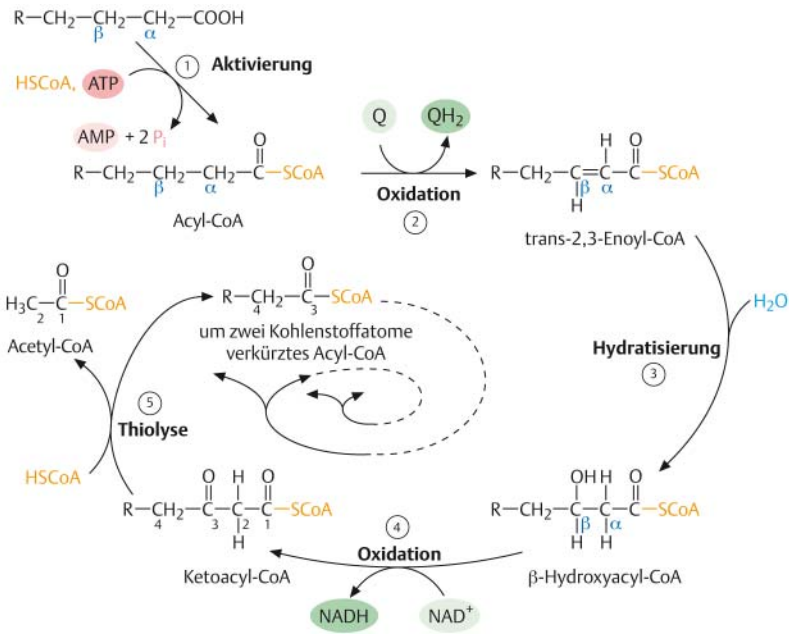


Abb. 8.**22** **Die β-Oxidation der Fettsäuren.** Die Oxidation langkettiger Fettsäuren führt zur Zerlegung der Kohlenstoffkette in C_2-Einheiten. Das so gebildete Acetyl-Coenzym A kann anschließend im Citratzyklus zu CO_2 oxidiert werden.

Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung (**Schritt 3**) erfolgt so, dass das β-Kohlenstoffatom die Hydroxylgruppe trägt. Es folgt die Oxidation dieser Gruppe zur Ketogruppe (**Schritt 4**) (Übertragung der Elektronen auf NAD^+) und es entsteht eine β-Ketosäure, die thiolytisch zu Acetyl-Coenzym A und dem um zwei C-Atome verkürzten Acyl-Coenzym A gespalten wird (**Schritt 5**). Durch weitere Runden der beschriebenen Reaktionsfolge können Fettsäuren mit gerader Anzahl von Kohlenstoffatomen vollständig in Acetylgruppen zerlegt werden. Bei Fettsäuren mit ungeradzahliger Anzahl von C-Atomen entsteht zum Schluss Propionyl-Coenzym A.

Redoxbilanz: Bilanz von Elektronen/Reduktionsäquivalente, die bei der Oxidation einer Verbindung im Energiestoffwechsel anfallen, und Elektronen/Reduktionsäquivalente, die zur Reduktion des Elektronenakzeptors aufgewendet werden.
Vollständige Oxidation: Oxidation einer organischen Verbindung zu CO_2.

Unvollständige Oxidation: Bildung nicht vollständig oxidierter Abbauprodukte organischer Verbindungen, bei Anwesenheit eines externen Elektronenakzeptors (O_2); Gärung: unvollständige Oxidation aufgrund fehlenden externen Elektronenakzeptors.
Glykolyse: Abbauweg für Glucose in Eukaryoten und vielen Prokaryoten; Schlüsselenzym: Aldolase.
Entner-Doudoroff-Weg: Abbauweg für Glucose in zahlreichen aeroben Prokaryoten; Schlüsselenzym: 2-Keto-3-desoxy-6-Phosphogluconat(KDPG)-Aldolase.
Phosphoketolase-Weg: Glucose-Abbauweg in heterofermentativen Milchsäurebakterien; Schlüsselenzym: Phosphoketolase.
Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex: Enyzmkomplex, der Pyruvat oxidativ zu Acetyl-Coenzym A decarboxyliert.
Citratzyklus: Zyklischer kataboler Stoffwechselweg, in dessen Verlauf die Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A zu zwei CO_2 oxidiert und der Akzeptor der Acetylgruppe (Oxalacetat) regeneriert wird.
β-Oxidation der Fettsäuren: Abbau von Fettsäuren zu Acetyl-Coenzym A.

8.6 Chemoorganotrophie: II. Aerobe und anaerobe Atmung

Atmende chemoorganotrophe Organismen übertragen die bei der Oxidation organischer Verbindungen anfallenden Elektronen auf einen **externen Elektronenakzeptor**. Dabei wird ATP durch **Elektronentransportphosphorylierung** synthetisiert. Neben Sauerstoff (**aerobe Atmung**) können auch Nitrat, Fumarat oder Sulfat (**anaerobe Atmung**) als Elektronenakzeptor dienen. Der Elektronentransport von NADH zu **Sauerstoff** verläuft häufig über die **NADH-Dehydrogenase** (NADH-Ubichinon-Oxidoreductase, Komplex I), den **Cytochrom bc_1-Komplex** (Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreductase, Komplex III) und eine **Cytochrom *c*-Oxidase** (Komplex IV). Die **Succinat-Dehydrogenase** (Komplex II) überträgt Elektronen direkt auf Ubichinon. Fakultativ anaerobe Bakterien können häufig auch **Nitrat** oder **Fumarat** als Elektronenakzeptor nutzen und reduzieren diese Verbindungen durch ein membranständiges Enzym (**Nitratreductase** bzw. **Fumaratreductase**) zu Nitrit bzw. Succinat. Die Übertragung weiterer Elektronen auf Nitrit führt bei Nitratatmern zur Bildung von molekularem Stickstoff (**Denitrifikation**) oder Ammonium (**Ammonifikation**). Die strikt anaeroben, sulfatreduzierenden Bakterien oxidieren neben organischen Gärungsprodukten auch molekularen Wasserstoff. **Sulfat** kann erst reduziert werden, nachdem es ATP-abhängig zu **Adenosinphosphosulfat** (**APS**) aktiviert wurde. Auch **methanogene Archaea**, die Methan aus Acetat, Methanol, methylierten C_1-Verbindungen oder CO_2 bilden, betreiben eine anaerobe Atmung. Sie generieren an ihrer Cytoplasmamembran eine elektrochemische Potentialdifferenz für Protonen und Natriumionen und nutzen

diese zur ATP-Bildung. Die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ wird von einer Elektronentransportkette aufgebaut, die der **Reduktion eines Heterodisulfids** aus zwei Coenzymen (CoM, CoB) dient. Die elektrochemische Potentialdifferenz der Natriumionen entsteht durch die Aktivität eines primären Na^+-Transporters (**Methyltransferase**).

Die Reduktionsäquivalente, die bei der **Oxidation organischer Verbindungen** im Verlauf kataboler Stoffwechselwege anfallen, werden in der Regel durch das Coenzym NAD^+ ($E^{0'} = -0{,}32$ V) bzw. im Falle von Succinat-Dehydrogenase (Citratzyklus, S. 355) und Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (Fettsäureoxidation, S. 357) durch die prosthetische Gruppe FAD übernommen. Die Redoxspanne zwischen diesen redoxaktiven Gruppen und einem extern vorgefundenen Elektronenakzeptor wird im Zuge einer **Atmung** von chemoorganotrophen Organismen zur Energiekonservierung über **Elektronentransportphosphorylierung** (S. 321) genutzt.

8

Verschiedene Verbindungen können in atmenden chemoorganotrophen Organismen als **Elektronenakzeptor** fungieren (Abb. 8.**23**). Bevorzugter Akzeptor ist **Sauerstoff** ($\mathbf{O_2}$), da aufgrund seines hohen Redoxpotentials ($E^{0'} = +0{,}82$ V) bei seiner Reduktion der höchste Betrag an Freier Energie verfügbar wird. Die **aerobe Atmung** ist weit verbreitet. Sie bildet die Grundlage des Energiestoffwechsels aerober Pro- und Eukaryoten. In Anwesenheit von O_2 sind der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und alle Enzyme des Citratzyklus vorhanden und funktionsfähig, sodass zuvor zu Pyruvat abgebaute Verbindungen vollständig zu CO_2 oxidiert werden können.

Viele fakultativ anaerobe Prokaryoten können unter anoxischen Bedingungen extrazellulär vorgefundenes **Nitrat** ($\mathbf{NO_3^-}$) als Elektronenakzeptor nutzen und so eine ebenfalls mit Elektronentransportphosphorylierung gekoppelte **anaerobe Atmung** betreiben. Allerdings ist der durch die Nitratreduktion gelieferte Betrag an Freier Energie geringer als bei der aeroben Atmung und die Elektronentransportkette entsprechend verkürzt. Anaerobe Atmung ist auch mit der organischen Verbindung **Fumarat** oder mit oxidierten Metallionen wie $\mathbf{Fe^{3+}}$ und $\mathbf{Mn^{4+}}$ als Elektronenakzeptoren möglich. Eine Gruppe von spezialisierten, strikt anaeroben Prokaryoten ist in der Lage, die Reduktion von **Sulfat** ($\mathbf{SO_4^{2-}}$), die nur einen vergleichsweise geringen Betrag Freier Energie liefert, zur Energiekonservierung zu nutzen. Die Reduktion von NO_3^- und SO_4^{2-} zum Zweck der Energiekonservierung wird auch als **dissimilatorische Reduktion** bezeichnet. Sie erfolgt über membranständige Enzyme und ist von der **assimilatorischen Reduktion** zu unterscheiden, die von löslichen Enzymen katalysiert wird und dem Einbau von Stickstoff und Schwefel in neues Zellmaterial dient.

Methanogene Archaea verstoffwechseln nur einige wenige organische Verbindungen wie Acetat, Methanol und andere methylierte C_1-Verbindungen, z. B. Methylamine. Ihr Energiestoffwechsel beruht darauf, diese organischen Verbin-

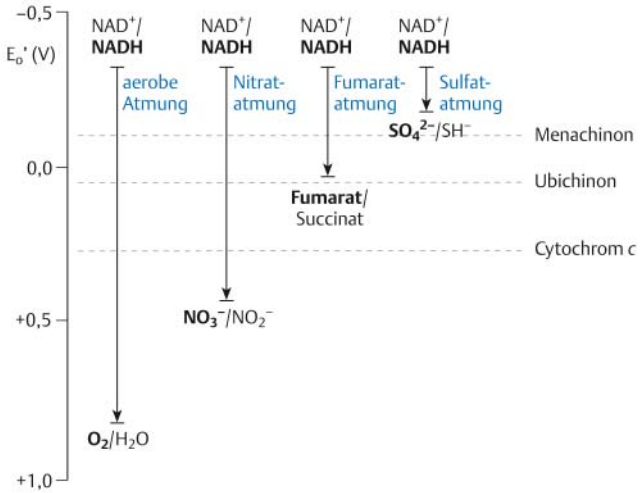


Abb. 8.**23** **Atmung chemoorganotropher Organismen.** Die Redoxpotentialdifferenz von dem als Elektronendonor fungierenden NADH (bei der Oxidation organischer Verbindungen durch Reduktion von NAD^+ gebildet) und dem jeweiligen Elektronenakzeptor bestimmt, wieviel Energie bei einer Atmung durch die NADH-Oxidation verfügbar wird. Aerobe Atmung (Reduktion von O_2 zu H_2O) und anaerobe Atmung mit Nitrat (Nitratatmung: Reduktion von Nitrat zu Nitrit), Fumarat (Fumaratatmung: Reduktion von Fumarat zu Succinat) oder Sulfat (Sulfatatmung: Reduktion von Sulfat zu Sulfid) als Elektronenakzeptor. Für jeden der dargestellten Atmungstypen existieren auch fakultativ oder strikt chemolithotrophe Organismen, die molekularen Wasserstoff ($E^{0\prime}$ = −0,42 V) als Elektronendonor verwenden können (S. 390, Abb. 8.**34**).

dungen oder auch CO_2 zu Methan umzusetzen. Auch bei der **Methanogenese** handelt es sich um eine **anaerobe Atmung**. Ihr liegt eine Redoxreaktion zugrunde, da stets ein Kohlenstoffatom des Substrats zu Methan reduziert wird, wobei die Reduktionsäquivalente dafür von molekularem Wasserstoff (H_2) oder durch teilweise Oxidation der Substrate bereitgestellt werden. Methanogene Archaea sind genau wie Sulfatreduzierer und **acetogene Bakterien** strikt anaerob. Sie verwerten an anaeroben Standorten die Produkte der Verstoffwechselung organischer Verbindungen durch gärende, chemoorganotrophe Bakterien (S. 374). Acetogene Bakterien können ihren Energiestoffwechsel einzig mit der Bildung von Acetat aus CO_2 und H_2 bestreiten.

8.6.1 Aerobe Atmung

Um bei aerober Atmung möglichst effizient Energie zu konservieren, erfolgt in Mitochondrien und verschiedenen Bakterien (z. B. *Paracoccus denitrificans*) die **Elektronenübertragung von NADH auf O_2** in drei Reaktionsabschnitten, die

von spezifischen Membranproteinkomplexen katalysiert werden (Abb. 8.**24**). Die Elektronen durchlaufen dabei innerhalb der Komplexe verschiedene redoxaktive, prosthetische Gruppen und werden zwischen den Komplexen durch die mobilen Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom *c* weitergegeben. Die Weitergabe erfolgt dabei stets von Elektronenüberträgern mit niedrigerem zu solchen mit höherem Redoxpotential (Abb. 8.**24a**).

Die **NADH-Dehydrogenase** (**NADH-Ubichinon-Oxidoreductase**, **Komplex I**) überträgt die Elektronen von NADH auf das in der Membran in großem Überschuss vorliegende Ubichinon. Dabei sind in dem Proteinkomplex ein FMN-haltiges Flavoprotein und mehrere Eisen-Schwefel-Proteine beteiligt. Für die Über-

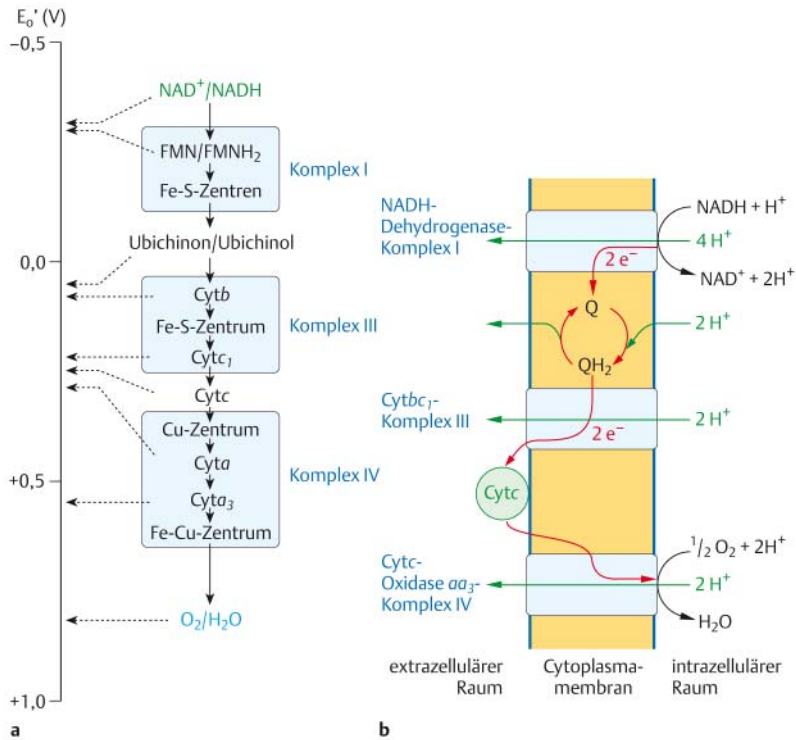


Abb. 8.**24** **Die aerobe Atmungskette in Mitochondrien und verschiedenen Bakterien: Elektronenübertragung von NADH auf O_2. a** Abfolge von Elektronenüberträgern (Ubichinon, Cytochrom *c*) und der prosthetischen Gruppen von Komplex I (NADH-Dehydrogenase), Komplex III (Cytochrom bc_1-Komplex) und Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase aa_3) in der Elektronentransportkette und deren Standard-Redoxpotentiale. **b** Anordnung der Atmungskettenkomponenten in der Membran: Verknüpfung von Elektronentransport und Protonentranslokation über die Membran.

tragung der Elektronen von Ubichinol auf das lösliche, membranassoziierte Cytochrom *c* ist der **Cytochrom *bc*$_1$-Komplex** (**Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreductase**, **Komplex III**) verantwortlich. Er verfügt über zwei *b*-Typ-Cytochrome und das Cytochrom c_1. Die Oxidation von Cytochrom *c* und Weiterleitung der Elektronen an den terminalen Elektronenakzeptor O_2 wird von der **Cytochrom *c*-Oxidase** (**Komplex IV**) katalysiert und erfolgt über Cytochrom *a* und a_3 und zwei Kupferzentren. Reduktionsäquivalente, die bei der Oxidation von Succinat (Citratzyklus, S. 355) und von Acyl-Coenzym A (β-Oxidation der Fettsäuren, S. 357) anfallen, müssen auf der Stufe des Chinons in die Elektronentransportkette eingeschleust werden. In den dehydrogenierenden Enzymen ist ein FAD am Elektronentransfer beteiligt. Die **Succinat-Dehydrogenase** ist selbst ein integrales Membranprotein (**Komplex II** der Elektronentransportkette), die Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase ist ein lösliches Enzym, von dem aus die Elektronen letztlich über eine FAD-haltige, membranassoziierte Oxidoreductase in den Chinonpool gelangen.

Die membranständigen Oxidoreductasen verknüpfen die Weitergabe von Elektronen mit dem **Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$** (Abb. 8.**24b**). Diese Energetisierung der Cytoplasmamembran atmender Bakterien bzw. der inneren Mitochondrienmembran der Eukaryoten stellt den Energiespeicher dar, der im Anschluss von der ATP-Synthase zur ATP-Bildung genutzt wird. Die NADH-Dehydrogenase ist eine **Protonenpumpe**, die pro transportiertem Elektronenpaar vier Protonen über die Membran transferiert. Über einen **Q-Zyklus**, der aus dem Zusammenspiel der beiden *b*-Typ Cytochrome des *bc*$_1$-Komplexes mit dem in der Membran frei beweglichen Ubichinon resultiert (S. 330, Abb. 8.**11**), werden weitere vier Protonen pro Elektronenpaar in den extrazellulären Raum (Prokaryoten) bzw. in den Intermembranraum (Mitochondrien) transportiert. Die Cytochrom *c*-Oxidase pumpt bei der Elektronenübertragung auf O_2 pro Elektronenpaar nochmals zwei Protonen über die Membran. In der Summe ist also die Oxidation von NADH mit O_2 als terminalem Elektronenakzeptor mit dem Transfer von zehn Protonen verknüpft. Wird an Stelle von NADH das Chinol oxidiert, wie es bei den von Succinat-Dehydrogenase und Acyl-CoA-Dehydrogenase angelieferten Elektronen der Fall ist, so werden nur sechs Protonen pro Elektronenpaar von der einen Membranseite auf die andere transferiert.

Die **Gesamtenergieausbeute der vollständigen Oxidation von Glucose zu CO_2 bei Nutzung von O_2 als Elektronenakzeptor** in Mitochondrien kann mit Hilfe der beschriebenen Protonenstöchiometrie des Elektronentransports abgeschätzt werden (alle Angaben pro Mol umgesetzte Glucose).

$$(C_6H_{12}O_6) + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -2870\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Bereitgestellte Reduktionsäquivalente:

Glykolyse: 2 NADH

Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex: 2 NADH

Citratzyklus: 6 NAD(P)H, 2 QH_2

Summe: 10 NADH + 2 QH_2

Bei der Elektronenübertragung auf O_2 transferierte Protonen: $(10 \cdot 10) + (2 \cdot 6) = 112$

Synthetisiertes ATP:

Elektronentransportphosphorylierung (Annahme: Rückfluss von 4 Protonen pro synthetisiertem ATP durch ATP-Synthase): 112 : 4 = 28 ATP

Substratstufenphosphorylierung (Glykolyse, Citratzyklus): 4 ATP

Summe: 32 ATP

In Form von ATP konservierte Energie (Energieaufwand für Synthese eines Mols ATP unter physiologischen Bedingungen: ca. 50 kJ, S. 314): $32 \cdot 50$ kJ = 1600 kJ

Energieausbeute: $1600/2870 = 0{,}56 \Rightarrow 56\,\%$

Im Gegensatz zur Situation in Mitochondrien verfügt *Paracoccus denitrificans* zur Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff über zwei Endoxidasen. Diese unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Sauerstoff und erlauben es dem Organismus, seine Atmungskette an unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen anzupassen. Zusätzlich besitzt *Paracoccus denitrificans* auch eine **Chinoloxidase**, die Elektronen direkt von Ubichinol auf Sauerstoff überträgt. Viele Bakterien, darunter *Escherichia coli*, besitzen grundsätzlich kein Cytochrom *c* und keinen Cytochrom bc_1-Komplex. Die Reoxidation des Ubichinols wird stets von einer Chinoloxidase katalysiert. *E. coli* verfügt dabei über zwei Chinoloxidasen, ein Cytochrom *o*-haltiges Enzym (niedrige O_2-Affinität, pumpt zwei Protonen pro Elektronenpaar über die Membran) und ein Cytochrom *d*-haltiges Enzym (hohe O_2-Affinität, kein Beitrag zum Aufbau von $\Delta\mu_{H^+}$). Im **Oxidase-Test** liefern Organismen, die kein Cytochrom *c* besitzen, ein negatives Ergebnis.

8.6.2 Nitratatmung

Die Fähigkeit, **NO_3^- als Elektronenakzeptor** einer Atmungskette zu verwenden, ist bei fakultativ anaeroben Bakterien weit verbreitet. Die Reduktion von NO_3^- zu Nitrit (NO_2^-) ($E^{0\prime}$= +0,43 V) wird von einer membranständigen **Nitratreductase** katalysiert. Elektronen werden von der NADH-Dehydrogenase durch Reduktion des Chinonpools in der Membran zur Verfügung gestellt. Chinol dient als direkter Elektronendonor für die Nitratreductase. Die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ entsteht durch die als Protonenpumpe arbeitende NADH-Dehydrogenase und die mit Protonenaufnahme an der Innen- bzw. Protonenfreisetzung an der Außenseite der Membran erfolgende Chinonreduktion bzw. Chinoloxidation (S. 328). Das aktive Zentrum der Nitratreductase ist dem Cytoplasma

zugewandt. Daher muss NO_3^- in die Zellen aufgenommen werden. Dies geschieht meist über einen Antiporter, der die Aufnahme von NO_3^- mit dem Export von NO_2^- koppelt.

Da NO_2^- in höheren Konzentrationen toxisch ist, wird es in der Regel ebenfalls als Elektronenakzeptor benutzt und zu molekularem Stickstoff (N_2) oder Ammonium (NH_4^+) weiter reduziert. Auch dabei wird Energie konserviert. Die Bildung von N_2 wird als **Denitrifikation** bezeichnet, da diese gasförmige Verbindung von Organismen gewöhnlich nicht als Stickstoffquelle zur Biosynthese organischer Stickstoffverbindungen verwendet werden kann. Viele *Pseudomonas*- und auch eine Reihe von *Bacillus*-Arten betreiben Nitratatmung über Denitrifikation. Die Reduktion des NO_2^- erfolgt in drei Schritten, wobei die gasförmigen Verbindungen Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffoxid (N_2O) als Zwischenprodukte gebildet werden. Die beteiligten Enzyme Nitritreductase, Stickstoffmonoxid-Reductase und Distickstoffoxid-Reductase sind in der Cytoplasmamembran der Bakterien lokalisiert, ihr Reaktionszentrum befindet sich jeweils auf der Außenseite der Membran. Bei der **Nitratammonifikation**, die bei Enterobakterien und einigen grampositiven Bakterien zu finden ist, wird NO_2^- durch die Übertragung von sechs Elektronen direkt zu NH_4^+reduziert.

8.6.3 Fumaratatmung

Verschiedene chemoorganotrophe Bakterien wie *E. coli* und *Wolinella succinogenes* aber auch einige niedere Tiere sind unter anaeroben Bedingungen in der Lage, die organische Verbindung **Fumarat als Elektronenakzeptor** für eine anaerobe Atmung zu verwenden. Dabei kann extrazellulär vorgefundenes Fumarat (Aufnahme im Antiport gegen das Produkt Succinat oder im Symport mit Protonen) genauso wie intrazellulär gebildetes Fumarat genutzt werden. Die Elektronenübertragung auf Fumarat (Fumarat/Succinat: $E^{0\prime}$ = +0,03 V) wird von einer membranständigen **Fumaratreductase** katalysiert. Die Elektronen für die Reduktion werden von der NADH-Dehydrogenase oder auch von einer ebenfalls membranständigen Formiat-Dehydrogenase geliefert, die Formiat zu CO_2 ($E^{0\prime}$= –0,43 V) oxidiert. Als Elektronenüberträger zwischen Dehydrogenase und Reductase fungiert **Menachinon**, das ein niedrigeres Standard-Redoxpotential als Ubichinon besitzt und daher hier besser geeignet ist (Ubichinon: $E^{0\prime}$ = +0,11 V; Menachinon: $E^{0\prime}$ = –0,08 V). Der Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$, d. h. die Energiekonservierung, beruht auf Protonentranslokation durch die NADH-Dehydrogenase oder auf der an der Außenseite der Cytoplasmamembran der Bakterien erfolgende und mit der Freisetzung von Protonen verbundenen Formiat-Oxidation (Formiat $\rightarrow CO_2 + 2\ e^- + 2\ H^+$).

8.6.4 Sulfatatmung

Im Gegensatz zu den in der Regel fakultativ anaeroben Nitrat- und Fumaratatmern sind Bakterien, die **SO_4^{2-} als Elektronenakzeptor** nutzen, strikt anaerobe Spezialisten. Sie oxidieren organische Verbindungen, die von anderen anaeroben (gärenden) Bakterien als Stoffwechselprodukte gebildet werden (z. B. Lactat, Pyruvat, Malat, Acetat), nicht jedoch komplexere Verbindungen wie Zucker. Auch H_2 kann als Elektronendonor genutzt werden. Man unterscheidet zwischen Organismen, die organische Verbindungen vollständig zu CO_2 oxidieren und solchen, die **Acetat** als Endprodukt bilden. Die **vollständige Oxidation** erfolgt über einen modifizierten Citratzyklus oder auch über die in revertierter Richtung durchlaufenen Reaktionen des reduktiven Acetyl-Coenzym A-Weges (S. 371). SO_4^{2-} wird über Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (HS^-) reduziert. Sulfatreduzierer werden daher auch als **Sulfidogene Bakterien** oder **Desulfurikanten** bezeichnet. Das Redoxpaar SO_4^{2-}/HS^- besitzt ein vergleichsweise niedriges Standard-Redoxpotential von $E^{0\prime} = -0{,}22$ V, sodass die Energieausbeute der Sulfatatmung grundsätzlich gering ist. Die Aufnahme von SO_4^{2-} in die Zellen erfolgt in Symport mit Protonen oder Natriumionen. Aufgrund des extrem niedrigen Redoxpotentials des Redoxpaares SO_4^{2-}/SO_3^{2-} ($E^{0\prime} = -0{,}52$ V) kann die Reduktion von SO_4^{2-} zu SO_3^{2-} nicht direkt, sondern erst nach Aktivierung des SO_4^{2-} mittels ATP erfolgen (Abb. 8.**25**). Das dabei gebildete **Adenosinphosphosulfat** (**APS**; APS/SO_3^{2-}: $E^{0\prime} = -0{,}06$ V) wird dann durch Übertragung von zwei Elektronen zu SO_3^{2-} reduziert.

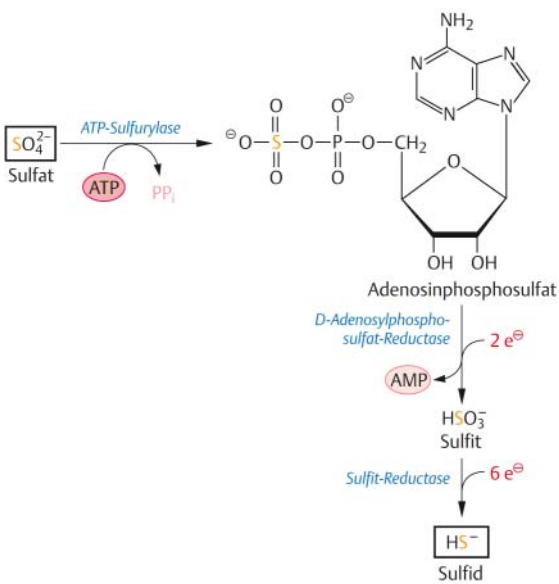


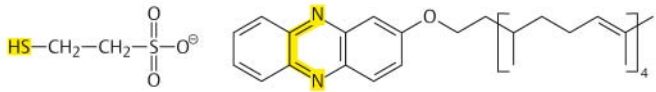
Abb. 8.**25 Sulfatatmung.** Enzymatische Umsetzung von SO_4^{2-} über Adenosinphosphosulfat (APS) und SO_3^{2-} zu HS^- bei der dissimilatorischen Sulfatreduktion.

Zur Reduktion von SO_3^{2-} zu HS^- ($E^{0\prime} = -0{,}12$ V) bedarf es sechs weiterer Elektronen. Bei Nutzung von H_2 als Elektronendonor werden diese Elektronen von einer Hydrogenase durch die Oxidation von H_2 bereitgestellt. Zwischen der außerhalb der Zelle im Periplasma lokalisierten Hydrogenase und den cytoplasmatischen Enzymen **APS-Reductase** und **Sulfitreductase** vermittelt ein periplasmatisches Cytochrom (c_3), ein Membranproteinkomplex (Hmc-Komplex; hmc: hochmolekulares Cytochrom) und ein cytoplasmatisches Eisen-Schwefel-Protein die Elektronenübertragung. Die protonenmotorische Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ entsteht durch die bei der Hydrogenasereaktion außerhalb der Zelle freigesetzten Protonen.

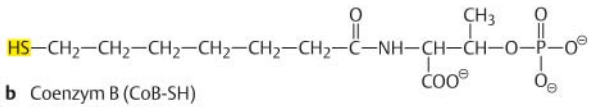
8.6.5 Methanogenese

Methan wird an anoxischen Standorten durch methanogene Archaea gebildet. Es stellt das Endprodukt des Energiestoffwechsels dieser Organismen dar. An der Synthese des Methans ist eine membranständige Elektronentransportkette beteiligt, die eine Energetisierung der Cytoplasmamembran bewirkt, sodass über eine membranständige ATP-Synthase ATP gebildet werden kann. Es sind zwei Gruppen von methanogenen Archaea zu unterscheiden: Vertreter der Ordnungen Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales und Methanopyrales nutzen als **Substrat zur Methanbildung** nur **CO_2** oder **Formiat** und reduzieren diese Verbindungen mit Hilfe von H_2 als Elektronendonor zu Methan. Bei niedriger H_2-Konzentration liefern diese Redoxreaktionen nur einen geringen Betrag Freier Energie. *Methanosarcina* kann zusätzlich auch **Methanol**, **methylierte C_1-Verbindungen** (z. B. Methylamin) und **Acetat** zur Methanbildung verwenden. Als Elektronendonor für die Reduktion eines Kohlenstoffatoms dieser Verbindungen zu Methan dient dann nicht H_2. Alle methanogenen Bakterien verfügen über eine Reihe von **Coenzymen/Cofaktoren**, die in anderen Organismen nicht vorkommen und denen eine spezifische Funktion als Überträger von Elektronen/Reduktionäquivalenten (im Cytoplasma und in der Membran) oder als Carrier von C_1-Gruppen verschiedener Redoxstufen zukommt (Abb. 8.**26**).

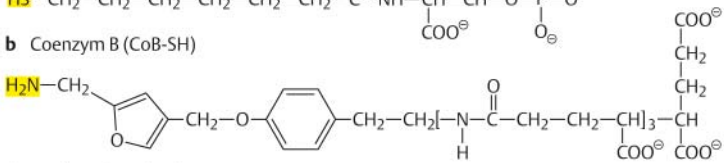
Zentrales Intermediat des zu Methan führenden Stoffwechselweges (Abb. 8.**27**) ist Methyl-Coenzym M. Unabhängig davon, ob CO_2, eine methylierte C_1-Verbindung oder Acetat umgesetzt wird, entsteht Methan durch **Reduktion einer an Coenzym M gebundenen Methylgruppe**. Die **Methyl-CoM-Reductase** (Cofaktor des Enzyms: F_{430}, ein Nickel-Tetrapyrrol) nutzt für diese Reaktion als Reduktionsmittel Coenzym B (CoB-SH). Neben Methan entsteht als Produkt das **Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B** (CoM–S–S–CoB). Bei der Reduktion des Disulfids zu freiem Coenzym M und Coenzym B (CoM–SH, CoB–SH) wird Energie konserviert, sie erfolgt an der Cytoplasmamembran durch die oben erwähnte Elektronentransportkette. Das hydrophobe, die Rolle eines Chinons übernehmende **Methanophenazin** vermittelt die Weitergabe von Elektronen/Reduktionsäquivalenten zwischen einer membranständigen Oxidoreductase, die die Reduktionsäquivalente bereitstellt, und der ebenfalls membranstän-



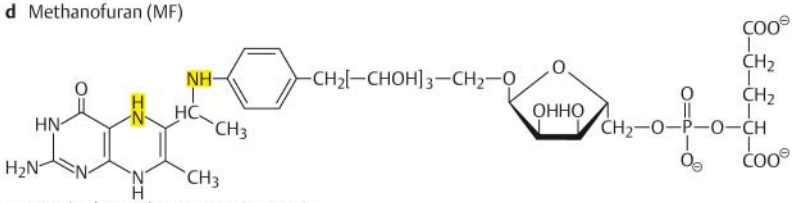
a Coenzym M (CoM-SH) **c** Methanophenazin



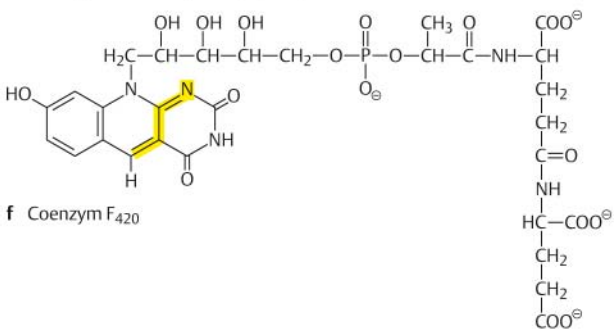
b Coenzym B (CoB-SH)



d Methanofuran (MF)



e Tetrahydromethanopterin (H_4MPT)



f Coenzym F_{420}

Abb. 8.**26** **Coenzyme der methanogenen Bakterien:** Strukturen, die an Elektronenaufnahme/abgabe bzw. Übertragung einer C_1-Gruppe beteiligt sind, sind farbig dargestellt. **a** Coenzym M (CoM-SH): Carrier für Methylgruppe; die Reduktion von Methyl-Coenzym M (CoM-S-CH_3) durch die Methyl-Coenzym M-Reductase setzt Methan frei. **b** Coenzym B (CoB-SH): Elektronendonor für die Reduktion von Methyl-Coenzym M; als Produkt der Reduktion entsteht neben Methan das Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B (CoM-S-S-CoB). **c** Methanophenazin (MP): hydrophober Elektronenüberträger in der Cytoplasmamembran methanogener Archaea (Rolle analog zu Chinon in Bacteria und Eukarya); überträgt Elektronen zwischen den Membranproteinkomplexen der Elektronentransportkette zur Reduktion des Heterodisulfids **d** Methanofuran (MFR): Carrier für Formylgruppe; an MFR erfolgt Bindung von CO_2 und Reduktion zur Formylgruppe (Methan aus CO_2) bzw. Oxidation der Formylgruppe zu CO_2 (Methan aus methylierten Verbindungen). **e** Tetrahydromethanopterin (H_4MPT): Carrier für C_1-Gruppen verschiedener Redoxstufen; an H_4MPT

erfolgt die Umsetzung von Formyl- zur Methenylgruppe und die Reduktion von Methenyl- über Methylen- zur Methylgruppe (Methan aus CO_2) bzw. die umgekehrten Reaktionsschritte (Methan aus methylierten Verbindungen). **f** Deazaflavin-Adenosin-Dinucleotid (F_{420}): löslicher Elektronenüberträger ($E^{0\prime}$ = –0,36 V); spielt im Cytoplasma methanogener Archaea bei verschiedenen Reaktionen eine zu NAD/H analoge Rolle.

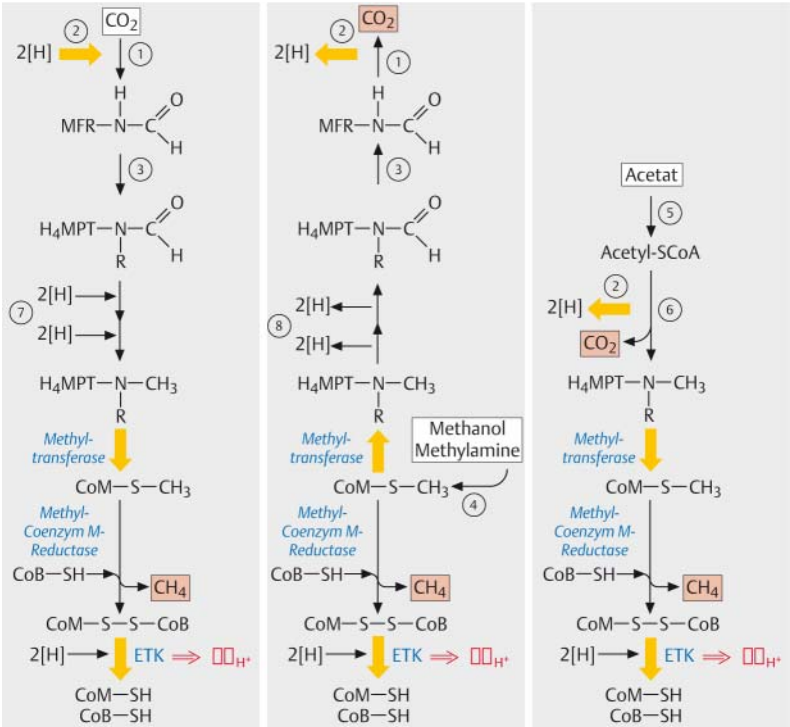


Abb. 8.27 **Methanogenese aus (a) CO_2 (H_2 als Elektronendonor), (b) methylierten Verbindungen oder (c) Acetat.** Schwarze Pfeile: Reaktionen, die von löslichen Enzymen katalysiert werden; gelbe Pfeile: Reaktionen, die von membranständigen Enzymen katalysiert werden. **1** Formyl-MFR-Dehydrogenase; **2** Hydrogenase; **3** Formyltransferase (MFR ↔ H_4MPT); **4** substratspezifische Methyltransferasen; **5** Acetat-Thiokinase oder Acetat-Kinase + Phosphotransacetylase; **6** Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-Coenzym A-Synthase; **7** Elektronendonor $F_{420}H_2$, über F_{420}-reduzierende Hydrogenase bereitgestellt; **8** Elektronenakzeptor F_{420}. Aufbau der Elektronentransportkette (ETK) in der Cytoplasmamembran: elektronenbereitstellende Oxidoreductase + Methanophenazin als Elektronenüberträger + Heterodisulfid-Reductase; elektronenbereitstellende Oxidoreductase: (a) Hydrogenase (F_{420}-nonreducing), (b) $F_{420}H_2$-Dehydrogenase; (c) Hydrogenase. (Nach Deppenmaier)

digen **Heterodisulfid-Reductase**, die die Reduktionsäquivalente zur Reduktion des Heterodisulfids verwendet. Der Elektronentransport ist mit dem Transfer von Protonen über die Cytoplasmamembran verknüpft und $\Delta\mu_{H^+}$ wird aufgebaut. Woher die Reduktionsäquivalente zur Reduktion des Heterodisulfids stammen und damit auch, welches Enzym in der Elektronentransportkette für ihre Bereitstellung verantwortlich ist, hängt davon ab, welche Kohlenstoffverbindung als **Substrat für die Methanogenese** dient.

Wird **Methan aus CO_2** gebildet ($CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$; $\Delta G^{0\prime} = -131$ kJ pro mol CH_4) (Abb. 8.**27a**), so ist H_2 der Elektronendonor bei allen vier Reduktionsschritten und entsprechend ist an jedem dieser Schritte eine Hydrogenase beteiligt. Das Methanophenazin reduzierende Enzym in der Membran ist dann die membranständige „**F_{420}-nonreducing hydrogenase**". Der erste Schritt der Methanbildung aus CO_2, die Bindung des CO_2 an **Methanofuran** (**MFR**) und seine Reduktion zur Formylgruppe, wird durch die lösliche **Formyl-MFR-Dehydrogenase** katalysiert und ist endergon. Die Reduktionsäquivalente für die Reaktion werden ebenfalls durch eine membranständige Hydrogenase bereitgestellt. Die elektrochemische Potentialdifferenz von Protonen $\Delta\mu_{H^+}$ oder Natriumionen $\Delta\mu_{Na^+}$ an der Membran liefert die Energie für die Reaktion. Nach Übertragung der Formylgruppe auf **Tetrahydromethanopterin** (**H_4MPT**) wird diese dann in zwei Schritten zur Methylgruppe reduziert. Die diese beiden Reaktionen katalysierenden Enzyme beziehen die Reduktionsäquivalente aus reduziertem **Coenzym F_{420}** ($F_{420}H_2$), das durch die lösliche **F_{420}-reduzierende Hydrogenase** bereitgestellt wird. Für die Übertragung der Methylgruppe von H_4MPT auf CoM-S-H ist die **H_4MPT:HS-Coenzym M-Methyltransferase** verantwortlich.

Bei der Bildung von **Methan aus methylierten C1-Verbindungen** (z. B. $4\ CH_3OH \rightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O$; $\Delta G_0{}' = -106$ kJ pro mol CH_4) (Abb. 8.**27b**) entsteht das für die Heterodisulfid-Reduktion benötigte Reduktionsmittel dadurch, dass die Methylgruppe des Substrates auch zu CO_2 oxidiert wird. Nach Übertragung der Methylgruppe aus dem Substrat auf Coenzym M durch eine substratspezifische, lösliche Methyltransferase werden dafür die bei der Methanbildung aus CO_2 beschriebenen Reaktionsschritte in umgekehrter Richtung durchlaufen. Bei den Oxidationsschritten am H_4MPT wird Coenzym F_{420} zu $F_{420}H_2$ reduziert und entsprechend dann die Heterodisulfid-Reductase von einer membranständigen **$F_{420}H_2$-Dehydrogenase** mit Reduktionsäquivalenten versorgt. Die bei der Oxidation der Formylgruppe zu CO_2 anfallenden Reduktionsäquivalente werden von einer membranständigen Hydrogenase (über Ferredoxin) zur Wasserstoffbildung verwendet. Die Reaktion könnte zur Energetisierung der Membran beitragen. Da pro Methylgruppe, die zu CO_2 oxidiert wird, drei Paare von Reduktionsäquivalenten anfallen und zur Reduktion einer Methylgruppe zu Methan ein Paar benötigt wird, können pro oxidierter Methylgruppe drei Moleküle Methan gebildet werden.

Die Bildung von **Methan aus Acetat** ($CH_3COO^- H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$; $\Delta G_0{}' = -36$ kJ pro mol CH_4) (Abb. 8.**27c**) beruht auf der **Acetatspaltung**. Zentrales Enzym ist die **Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-Coenzym A-Synthase,** ein Nickel-Enzym. Nach der energieabhängigen Aktivierung des Acetats zu Acetyl-Coenzym A (Acetat-Thiokinase oder Acetat-Kinase + Phosphotransacetylase) katalysiert das Enzym die Spaltung der C-C-Bindung des Acetats. Es entstehen enzymgebundene Methyl- und Carbonylgruppen. Die Methylgruppe wird auf H_4MPT übertragen und über die bereits oben beschriebenen Reaktionen von H_4MPT:HS-CoM-Methyltransferase und Methyl-CoM-Reductase zu Methan umgesetzt. Das enzymgebundene CO wird zu CO_2 oxidiert. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden zur Reduktion des Heterodisulfids benutzt: Primärer Akzeptor der Reduktionsäquivalente ist **Ferredoxin** (**Fd**). Eine membranständige Hydrogenase ver-

wendet Fd_{red} zur H_2-Bildung und dieses dann direkt zur Reduktion von Methanophenazin in der Cytoplasmamembran. Letzteres fungiert schließlich als Elektronendonor für die Heterodisulfid-Reductase.

Die **H_4MPT:HS-CoM-Methyltransferase**, ein Corrinoid(B12)-Enzym, ermöglicht bei der Methanogenese aus CO_2 und aus Acetat weitere Energiekonservierung. Das Enzym ist membranständig und verknüpft die Übertragung der Methylgruppe von H_4MPT auf Coenzym M mit dem Export von Natriumionen. An der Membran methanogener Archaea existiert also eine **elektrochemische Potentialdifferenz für Natriumionen $\Delta\mu_{Na^+}$** neben der von der Heterodisulfid-Reductase generierten Potentialdifferenz für Protonen $\Delta\mu_{H^+}$. Wahrscheinlich kann die ATP-Synthase methanogener Archaea Protonen und Natriumionen als Kopplungsion für die ATP-Synthese nutzen. Die H_4MPT:HS-CoM-Methyltransferase ist der Grund dafür, dass die Methanogenese strikt Na^+-abhängig ist. Aufgrund der zur Acetataktivierung aufzubringenden Energie wird bei der Methanbildung aus Acetat in der Summe erst durch die energiekonservierende Methyltransferase ein Wachstum der Organismen möglich. Bei der Methanbildung aus methylierten C_1-Verbindungen erfolgt der Methylgruppentransfer in umgekehrter Richtung und die Methyltransferase muss Energie aus $\Delta\mu_{Na^+}$ beziehen. Der Aufbau von $\Delta\mu_{Na^+}$ könnte auf Kosten der protonenmotorischen Kraft durch Na^+/H^+-Antiport erfolgen.

8.6.6 Acetogenese

Acetogene Bakterien können Energie aus der **Reduktion von CO_2 zu Acetat** mit **Wasserstoff als Elektronendonor** beziehen (Abb. 8.**28**).

$$2\ CO_2 + 4\ H_2 \leftrightarrow \text{Acetat} + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -95\ \text{kJ pro mol Acetat}$$

Der zur Acetatsynthese beschrittene Stoffwechselweg wird als **Wood-Ljungdahl-Weg** oder reduktiver Acetyl-Coenzym A-Weg bezeichnet. Wie die methanogenen Archaea sind die acetogenen Bakterien strikt anaerob und stehen am Ende der anaeroben Nahrungskette. Die acetogenen Bakterien gehören jedoch zu den Bacteria. Sie knüpfen die C-C-Bindung im Acetat mit der **Kohlenmonoxid(CO)-Dehydrogenase/Acetyl-Coenzym A-Synthase**, einem Enzym, das in Aufbau und Funktionsweise dem Enzym der acetatspaltenden, methanogenen Archaea entspricht. Die acetogenen Bakterien verfügen jedoch über keines der Coenzyme/Cofaktoren, die bei der Methanogenese als Überträger für C1-Gruppen oder Reduktionsäquivalente fungieren. Die acetogenen Bakterien verwenden **Tetrahydrofolat** (**THF**) als Carrier für C1-Gruppen. Nach Reduktion eines CO_2-Moleküls zu Formiat und energieabhängiger Übertragung auf Tetrahydrofolat wird an diesem Coenzym in zwei weiteren Reduktionsschritten die Methylgruppe des Acetats gebildet. Es folgt die Übertragung der Methylgruppe durch eine **Methyltransferase** (B12-Enzym) auf die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase. Dort findet die Reduktion eines zweiten Moleküls CO_2 zur enzym-

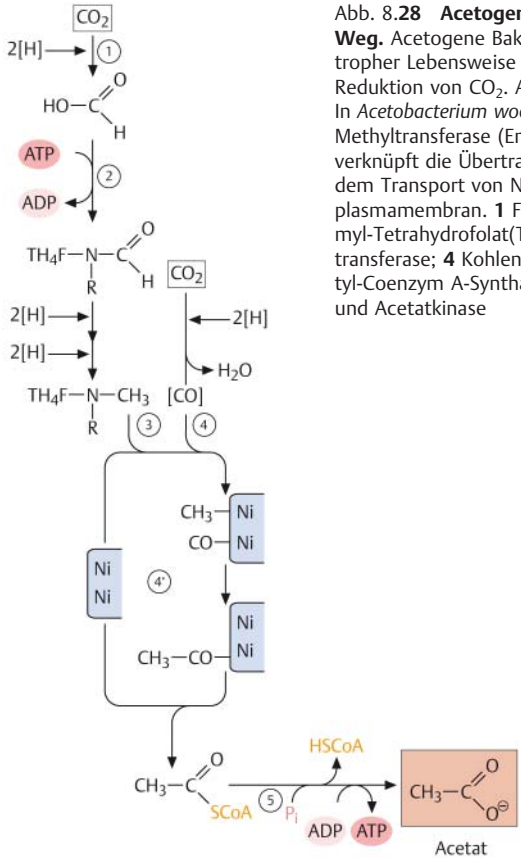


Abb. 8.**28** **Acetogenese: Der Wood-Ljungdahl-Weg.** Acetogene Bakterien bilden bei chemolithotropher Lebensweise Acetat ausschließlich durch Reduktion von CO_2. Als Reduktionsmittel dient H_2. In *Acetobacterium woodii* ist wahrscheinlich die Methyltransferase (Enzym 3) membranständig und verknüpft die Übertragung der Methylgruppe mit dem Transport von Natriumionen über die Cytoplasmamembran. **1** Formiat-Dehydrogenase; **2** Formyl-Tetrahydrofolat(THF)-Synthetase; **3** Methyltransferase; **4** Kohlenmonoxid-Dehydrogenase/Acetyl-Coenzym A-Synthase; **5** Phosphotransacetylase und Acetatkinase

gebundenen CO-Gruppe, die Knüpfung der C-C-Bindung zwischen Methyl- und CO-Gruppe und schließlich die Bildung von Acetyl-Coenzym A statt. Das ATP, das mit Hilfe von Acetyl-Coenzym A synthetisiert werden kann, muss für die Übertragung von Formiat auf Tetrahydrofolat am Beginn des Stoffwechselweges aufgewendet werden. Verschiedene acetogene Bakterien können auch **chemoorganotroph** wachsen. Sie setzen Glucose zu Acetat als einzigem Stoffwechselprodukt um, wobei pro Molekül Glucose drei Moleküle Acetat entstehen (**Homoacetatgärung**). Der Glucoseabbau zu zwei Molekülen Acetat über Glykolyse und oxidative Decarboxylierung (Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase) erlaubt die Synthese von ATP durch Substratstufenphosphorylierung. Die bei den Oxidationsschritten anfallenden Elektronen werden auf Protonen übertragen (H_2-Bildung). Das dritte Acetatmolekül entsteht durch den Wood-Ljungdahl-Weg aus

zwei Molekülen CO_2 mit Nutzung des H_2 als Elektronendonor. Leben acetogene Bakterien **chemolithotroph** mit CO_2 und H_2, sind sie auf ATP-Synthese über einen chemiosmotischen Mechanismus angewiesen. Einige über Cytochrome und Chinone verfügende acetogene Bakterien (z. B. *Moorella thermoautotrophica*, früher *Clostridium thermoautotrophicum*) nutzen dabei Protonen als Kopplungsion. Bei diesen Organismen wird angenommen, dass elektronenübertragende Enzyme membranständig sind und eine Elektronentransportkette bilden, durch die $\Delta\mu_{H^+}$ aufgebaut werden kann. Andere acetogene Organismen (z. B. *Acetobacterium woodii*) besitzen keine Cytochrome und Chinone, aber membranassoziierte Corrinoid-haltige Proteine. Die Acetogenese ist bei diesen Organismen strikt Na^+-abhängig und es wird ATP durch eine ebenfalls Na^+-abhängige ATP-Synthase gebildet. Es wird angenommen, dass eine membranständige Methyltransferase als Pumpe für Natriumionen arbeitet.

Aerobe Atmung: Nutzung von O_2 als terminalem Elektronenakzeptor einer Elektronentransportkette; Energiekonservierung über ETP.
Anaerobe Atmung: Energiekonservierung durch ETP in Abwesenheit von O_2, Nutzung anderer, extrazellulär vorgefundener terminaler Elektronenakzeptoren.
Dissimilatorische Reduktion: Reduktion von NO_3^- bzw. SO_4^{2-} zum Zweck der Energiekonservierung; erfolgt an Membranen.
Assimilatorische Reduktion: Reduktion von NO_3^- bzw. SO_4^{2-} zur Biosynthese neuen Zellmaterials, erfolgt im Cytoplasma.
NADH-Ubichinon-Oxidoreductase: NADH-Dehydrogenase, Komplex I der aeroben Elektronentransportkette chemoorganotropher Organismen.
Ubichinol-Cytochrom *c*-Oxidoreductase: Cytochrom bc_1-Komplex; Komplex III der aeroben Elektronentransportkette chemoorganotropher Organismen.
Cytochrom *c*-Oxidase: Komplex IV der aeroben Elektronentransportkette chemoorganotropher Organismen.
Succinat-Dehydrogenase: Komplex II der aeroben Elektronentransportkette chemoorganotropher Organismen, führt Reduktionsäquivalente auf Stufe des Chinons in die Elektronentransportkette ein.
Chinoloxidase: Atmungskettenkomplex, der die direkte Oxidation des Chinols mit O_2 als Elektronenakzeptor katalysiert.
Nitratatmung: Anaerobe Atmung mit NO_3^- als Elektronenakzeptor; dissimilatorische Nitratreduktion.
Denitrifikation: Dissimilatorische Reduktion von NO_3^- zu N_2.
Nitratammonifikation: Dissimilatorische Reduktion von NO_3^- zu NH_4^+.
Fumaratatmung: Anaerobe Atmung mit Fumarat als Elektronenakzeptor.
Sulfatatmung: Anaerobe Atmung mit SO_4^{2-} als Elektronenakzeptor; Sulfatatmer = sulfidogene Bakterien oder Desulfurikanten.
Methanogenese: Bildung von Methan aus Acetat, methylierten C_1-Verbindungen oder CO_2, Energiestoffwechsel der methanogenen Archaea.
Überträger für C_1-Gruppen in methanogenen Archaea: Coenzym M (CoM-SH); Tetrahydromethanopterin (H_4MPT); Methanofuran (MFR).

Überträger für Reduktionsäquivalente in methanogenen Archaea: Coenzym B (CoB-SH); Deazaflavin-Adenosin-Dinucleotid (F_{420}, löslich, übernimmt Rolle von NAD^+/NADH); Methanophenazin (MP, hydrophob, übernimmt Rolle von Chinon).
F_{430}: Nickel-Tetrapyrrol-Cofaktor der Methyl-Coenzym M-Reductase.
Heterodisulfid: Aus Coenzym B und Coenzym M gebildetes Disulfid.
Heterodisulfid-Reductase: Membranständiges Enzym, katalysiert die Reduktion des Heterodisulfids mit reduziertem Methanophenazin als Elektronendonor, am Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ beteiligt.
H_4MPT:HS-CoM-Methyltransferase: Membranständiges Corrinoid(B12)-Enzym, verknüpft den Transfer einer Methylgruppe von H_4MPT auf CoM-HS mit Na^+-Transport.
Kohlenmonoxid(CO)-Dehydrogenase/Acetyl-Coenzym A-Synthase: Zentrales Enzym bei der Methanbildung aus Acetat und der Acetogenese (Reduktion von CO_2 zu Acetat); katalysiert Spaltung bzw. Knüpfung der C-C-Bindung des Acetats.
Acetogenese: Reduktion von CO_2 zu Acetat mit H_2 als Elektronendonor (**Wood-Ljungdahl-Weg**: zentraler Stoffwechselweg des Energiestoffwechsels der acetogenen Bakterien).
Homoacetatgärung: Verstoffwechselung von Glucose zu Acetat (3 Acetat/1 Glucose) durch einige acetogene Bakterien.

8.7 Chemoorganotrophie: III. Gärung

Der Begriff **Gärung** bezeichnet den Energiestoffwechsel anaerober, chemoorganotropher Organismen, die organische Verbindungen oxidieren, jedoch keinen externen Elektronenakzeptor reduzieren. Der **oxidative Abschnitt** einer Gärung umfasst die Oxidationsschritte und führt zur Bildung organischer Zwischenprodukte. Im **reduktiven Abschnitt** dienen diese als **interne Elektronenakzeptoren** und es entstehen reduzierte Gärungsprodukte. ATP wird über Substratstufenphosphorylierung gebildet. Die Vergärung von Zuckern zu Lactat (**Milchsäuregärung**) wird von homofermentativen Milchsäurebakterien (Hauptgärungsprodukt Lactat) und heterofermentativen Milchsäurebakterien (Gärungsprodukte neben Lactat auch Ethanol oder Acetat) durchgeführt. *Saccharomyces* (Hefe) und einige Bakterien vergären Zucker zu **Ethanol**. Eine Reihe verschiedener Gärungsprodukte (Acetat, Lactat, Formiat, Succinat, Ethanol, CO_2, H_2) entsteht bei der für Enterobakterien typischen **gemischten Säuregärung**, mit der Pyruvat-Formiat-Lyase als charakteristischem Enzym. CO_2 und H_2 entsteht aus Formiat durch die Formiat-Hydrogen-Lyase. Die Bildung von Propionat als Gärungsprodukt (**Propionsäuregärung**) erfolgt in der Regel über den Methylmalonyl-Coenzym A-Weg. Saccharolytische Clostridien vergären Zucker zu Butyrat und Acetat (**Buttersäuregärung**). Sie setzen Pyruvat durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase um. Proteolytische Clostridien vergären Aminosäuren einzeln oder in Paaren (**Stickland-Gärung**). Die **Decarboxylierung einer Dicarbonsäure** kann von einigen, anaeroben Bakterien zum Aufbau von $\Delta\mu_{Na^+}$ genutzt werden.

Die Oxidation organischer Verbindungen zum Zweck der Energiekonservierung erfolgt in Abwesenheit geeigneter externer Elektronenakzeptoren, d. h. unter anaeroben Bedingungen, durch **Gärung**. Gärende Organismen synthetisieren ATP in der Regel ausschließlich über **Substratstufenphosphorylierung**. Die vollständige Oxidation organischer Verbindungen ist durch das Fehlen eines externen Elektronenakzeptors jedoch nicht möglich. Stattdessen muss intern ein Akzeptor für die bei den Oxidationsschritten anfallenden und von NAD^+ übernommenen Elektronen generiert werden, um den **Ausgleich der Redoxbilanz** zu gewährleisten. Im Verlauf einer Gärung entstehen so in einem oxidativen Abschnitt des Stoffwechsels **oxidierte Zwischenprodukte**, die im Anschluss in einem reduktiven Stoffwechselabschnitt zu den **Gärungsprodukten** reduziert werden. Die Benennung eines Gärungsstoffwechsels erfolgt in der Regel durch Nennung des überwiegend gebildeten Gärungsprodukts.

Prinzipiell kann eine Vielzahl organischer Verbindungen vergoren werden. Mengenmäßig überwiegen jedoch an den meisten anaeroben Standorten Zucker als Gärungssubstrate. Viele Gärer sezernieren Exoenzyme, die für die Aufspaltung der Polymere in Monomere verantwortlich sind. Die **Vergärung von Zuckern** beginnt in der Regel mit dem Abbau des Zuckers über die Glykolyse, in einigen Gärern auch über den Entner-Doudoroff-Weg oder den Phosphoketolase-Weg, und führt zu Pyruvat. Dabei wird über die Reaktionen von Phosphoglycerat-Kinase und Pyruvat-Kinase ATP synthetisiert. NAD^+ wird bei den von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase oder Phosphogluconat-Dehydrogenase katalysierten Dehydrogenierungsschritten zu NADH reduziert. Weiteres NADH wird nicht gebildet, da der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex und die Enzyme des Citratzyklus in strikten Gärern nicht existieren bzw. in fakultativen Gärern nicht gebildet werden oder nicht aktiv sind. Aus Pyruvat können als Gärungsprodukte **Lactat**, **Acetoin**, **2,3-Butandiol** und **Ethanol** entstehen. Ein **oxidativer Umsatz von Pyruvat** kann **in gärenden Organismen** durch zwei Enzyme erfolgen:

Die **Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase** katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat mit dem Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin als Elektronenakzeptor:

$$\text{Pyruvat} + 2\ Fd_{ox} + \text{Coenzym A} \rightarrow \text{Acetyl-Coenzym A} + 2\ Fd_{red} + CO_2 + H^+$$

Die **Pyruvat-Formiat-Lyase** katalysiert die Spaltung von Pyruvat in Acetyl-Coenzym A und **Formiat** (Ameisensäure):

$$\text{Pyruvat} + \text{Coenzym A} \rightarrow \text{Acetyl-Coenzym A} + \text{Formiat}$$

Bei dieser Reaktion wird die Carboxylgruppe des Pyruvats reduziert (Bildung von Formiat), das dazu benachbarte Kohlenstoffatom oxidiert (Bildung von Acetyl-Coenzym A). Dank des niedrigen Standard-Redoxpotentials von Ferredoxin (Fd_{ox}/Fd_{red}: $E^{0\prime} = -0{,}42$ V) bzw. Formiat (CO_2/Formiat: $E^{0\prime} = -0{,}43$ V) kann im Anschluss $\mathbf{H_2}$ ($E^{0\prime} = -0{,}42$ V) gebildet werden. Dies geschieht durch Übertragung der Elek-

tronen von Fd_{red} auf Protonen, katalysiert von einer **Hydrogenase** bzw. durch Spaltung von Formiat in CO_2 und H_2 durch die **Formiat-Hydrogen-Lyase** (Oxidation des Kohlenstoffatoms von Formiat zu CO_2, Reduktion von Protonen zu Wasserstoff). Die Absenkung des Wasserstoffpartialdrucks durch wasserstoffoxidierende Organismen (Sulfat-Reduzierer, methanogene Archaea und acetogene Bakterien) begünstigt die Entsorgung der aus der Pyruvat-Oxidation stammenden Elektronen durch Wasserstoffbildung. Die aus Pyruvat gebildete, energiereiche Verbindung Acetyl-Coenzym A erlaubt über die Reaktionen von Phosphotransacetylase und Acetatkinase die Synthese eines weiteren ATPs über Substratstufenphosphorylierung, es wird dann **Acetat** gebildet. Als weitere Gärungsprodukte können aus Acetyl-Coenzym A aber auch **Ethanol**, **Butanol**, **2-Propanol** und **Butyrat** entstehen. In gärenden Bakterien findet in der Regel keine Elektronentransportphosphorylierung statt und die Energetisierung der Cytoplasmamembran muss durch die in Richtung ATP-Hydrolyse arbeitende und dabei protonenexportierende ATP-Synthase erfolgen.

An sulfatreichen Standorten können die organischen Verbindungen, die durch die Vergärung von Zuckern entstehen, sulfatreduzierenden Bakterien als Elektronendonoren für ihre anaerobe Atmung dienen (S. 366). Ist kein SO_4^{2-} verfügbar, so schließt sich der Zuckervergärung durch die **primären Gärer** die weitere Vergärung der Gärungsprodukte zu Acetat und CO_2 durch **sekundäre Gärer** an. Diese Bakterien, die häufig auch kurzkettige Fettsäuren anaerob abbauen können, konservieren Energie durch Substratstufenphosphorylierung im Zuge der **Acetatbildung** (Phosphotransacetylase, Acetatkinase). Die interne Bildung eines organischen Akzeptors für die bei den Oxidationsschritten anfallenden Elektronen ist bei den von ihnen genutzen organischen Verbindungen nicht möglich, sodass die **Übertragung der Elektronen auf Protonen**, also die **Wasserstoffbildung**, die einzige Möglichkeit zum Ausgleich der Redoxbilanz darstellt. Nur bei niedriger Wasserstoffkonzentration ergeben die Reaktionen des Energiestoffwechsels dieser sekundären Gärer in ihrer Summe einen exergonen, Freie Energie bereitstellenden Prozess. Sekundäre Gärer sind daher auf die enge Assoziation mit methanogenen Archaea oder sulfatreduzierenden Bakterien angewiesen, die den gebildeten Wasserstoff als Elektronendonor nutzen und die Wasserstoffkonzentration niedrig halten. Die Kooperation zwischen sekundären Gärern und wasserstoffzehrenden Bakterien wird als **Syntrophie** bezeichnet. Sie ist die Grundlage für die Bildung von Methan und CO_2 als Endprodukte des Abbaus organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen.

8.7.1 Milchsäuregärung

Milchsäurebakterien (z. B. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus, Streptococcus*, *Leuconostoc*) sind obligate Gärer, die ausschließlich Zucker vergären und daraus Lactat bilden. Wie auch einige Enterobakterien verfügen sie über die **β-Galactosidase**, ein Enzym, das das Disaccharid **Lactose** (Milchzucker) in **Glucose** und

Galactose spaltet. Durch die Milchsäurebildung säuern sie ihre Umgebung an und hemmen so das Wachstum von Nahrungskonkurrenten. Milchsäurebakterien besitzen keine Cytochrome. Sie sind an anaeroben Standorten mit reichem Nahrungsangebot zu finden.

Je nachdem, ob der Abbau von Hexosen über die Glykolyse oder den Phosphoketolase-Weg erfolgt, unterscheidet sich das Spektrum der von den Milchsäurebakterien gebildeten Produkte. Entsprechend wird zwischen homo- und heterofermentativen Milchsäurebakterien unterschieden. **Homofermentative Milchsäurebakterien** (Abb. 8.**29a**) bauen **Hexosen** über die **Glykolyse** (S. 350) ab und reoxidieren das bei der Dehydrogenierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat entstehende NADH durch Reduktion von Pyruvat zu **Lactat** mit der Lactat-Dehydrogenase; Lactat ist dann einziges Gärungsprodukt. Pro Molekül umgesetzter Hexose entstehen im Verlauf der Glykolyse zwei Moleküle ATP. **Heterofermentative Milchsäurebakterien** (Abb. 8.**29b**) verstoffwechseln **Hexosen** über den **Phosphoketolase-Weg** (S. 355), in dessen Verlauf das C_1-Atom der Hexose als CO_2 abgespalten wird. Zur Aktivierung der Glucose muss zunächst ein ATP aufgewendet werden. Durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Phosphogluconat-Dehydrogenase entstehen pro Zuckermolekül zwei Moleküle NADH. Diese können durch die Reduktion von Acetylphosphat zu Ethanol (beteiligte Enzyme: Phosphotransacetylase, Coenzym A-abhängige Alkohol-Dehydrogenase) reoxidiert werden. Acetylphosphat entsteht ebenso wie Glycerinaldehyd-3-phosphat durch die Phosphoketolasereaktion aus Xylulose-5-phosphat. Bei der Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Pyruvat werden zwei ATP synthetisiert und das gebildete Pyruvat wird durch Aufnahme der bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasereaktion auf NAD^+ übertragenen Elektronen zu Lactat reduziert. Die Vergärung von Glucose durch heterofermentative Milchsäurebakterien führt also zur Bildung von je einem Molekül **Lactat**, **Ethanol** und **CO_2** und liefert den Organismen dabei netto nur ein Molekül ATP pro Molekül Glucose.

Pentosen werden von heterofermentativen Milchsäurebakterien nach ATP-abhängiger Aktivierung in Xylulose-5-phosphat, das Substrat der Phosphoketolase, umgewandelt. Da dabei keine oxidativen Schritte erfolgen, muss das durch die Phosphoketolase gebildete Acetyl-Coenzym A nicht als Elektronenakzeptor eingesetzt werden, sondern kann zur Substratstufenphosphorylierung über die Acetatkinase genutzt werden, während Glycerinaldehyd-3-phosphat wie bei der Hexosevergärung zu Lactat umgesetzt wird. Bei der Vergärung von Pentosen entsteht neben **Lactat** also **Acetat** und es können pro Zuckermolekül zwei Moleküle ATP synthetisiert werden. Auch **Bifidobakterien** betreiben eine Milchsäuregärung. Sie zeichnen sich durch ein sehr großes Zuckersubstratspektrum aus und bauen Hexosen über einen spezifischen Abbauweg (**Fructose-6-phosphat-Phosphoketolase-Weg** oder „**Bifidus Pathway**“) ab. Sie setzen dabei zwei Moleküle Glucose zu drei Molekülen Acetat und zwei Molekülen Lactat um und synthetisieren fünf ATP über Substratstufenphosphorylierung.

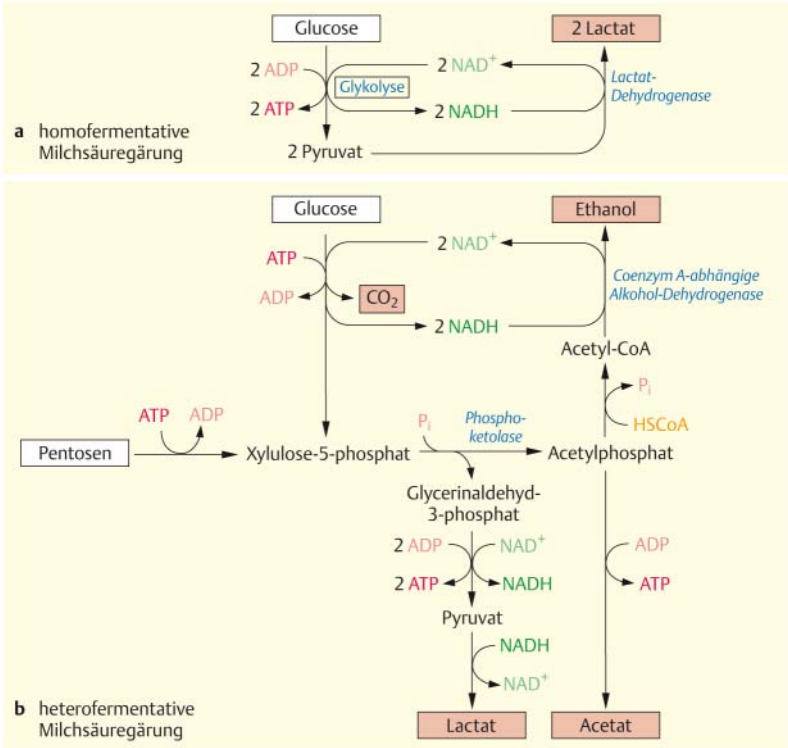


Abb. 8.**29** **Milchsäuregärung. a** Homofermentative Milchsäuregärung: Abbau von Hexosen über die Glykolyse. Pyruvat wird zu Lactat reduziert und Lactat ist einziges Gärungsprodukt. Energieausbeute: 2 ATP/Hexose. **b** Heterofermentative Milchsäuregärung: Bei der Vergärung von Hexosen (Glucose) muss durch die Reaktion der Phosphoketolase entstandenes Acetylphosphat als Elektronenakzeptor genutzt werden. Als Gärungsprodukte entstehen CO_2, Lactat und Ethanol. Energieausbeute: 1 ATP/Hexose. Bei der Vergärung von Pentosen kann Acetylphosphat zur ATP-Synthese verwendet werden. Als Gärungsprodukte entstehen CO_2, Lactat und Acetat. Energieausbeute: 2 ATP/Pentose.

8.7.2 Ethanolgärung

Die Vergärung von Zuckern zu **Ethanol** ist charakteristisch für das Bakterium *Zymomonas mobilis* sowie für die eukaryotische Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Zymomonas* verstoffwechselt Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg (S. 352), *Saccharomyces* dagegen über die Glykolyse (S. 350). Beide Organismen setzen jedoch gebildetes Pyruvat im Anschluss über eine **Pyruvat-Decarboxylase** zu CO_2 und Acetaldehyd um. Durch Übertragung der bei den oxidativen Schritten

des Zuckerabbaus anfallenden Elektronen durch eine Alkohol-Dehydrogenase auf Acetaldehyd wird Ethanol gebildet. In der Bilanz entstehen pro Glucosemolekül je zwei Moleküle Ethanol und CO_2. Aufgrund der unterschiedlichen zum Hexoseabbau genutzten Stoffwechselwege kann *Zymomonas* pro Glucose nur ein ATP, *Saccharomyces* dagegen zwei ATP bilden.

8.7.3 Gemischte Säuregärung

Die Bildung eines Gemisches verschiedener organischer Verbindungen (Acetat, Formiat, Succinat, Lactat, Ethanol, Acetoin, 2,3-Butandiol) sowie der Gase CO_2 und H_2 in je nach Organismus und Umweltsituation variierendem Mengenverhältnis ist kennzeichnend für die **gemischte Säuregärung** (Abb. 8.**30**). Sie wird von den fakultativ anaeroben Enterobakterien und fakultativ anaeroben *Bacillus*-Arten durchgeführt. Der Abbau von Hexosen erfolgt über die Glykolyse zum **Pyruvat**. Schlüsselenzym der gemischten Säuregärung ist die **Pyruvat-Formiat-Lyase**, die nur unter anoxischen Bedingungen gebildet wird. **Formiat** wird primär von den Bakterien ausgeschieden. Ist extrazellulär ein geeigneter Elektronenakzeptor verfügbar, so kann Formiat als Elektronendonor einer anaeroben Atmung fungieren. Die Elektronen werden dann durch eine membranständige Formiat-Dehydrogenase dem Chinonpool der Membran zugeführt. Wird Formiat nicht umgesetzt, so führt die Ansäuerung des extrazellulären Raumes zur Induktion der **Formiat-Hydrogen-Lyase**, durch die Formiat in **CO_2** und **H_2** gespalten wird. Die Reoxidation des im Verlauf der Glykolyse anfallenden NADHs kann durch die Reduktion von Pyruvat zu **Lactat** erfolgen. Auch das durch die Pyruvat-Formiat-Lyase gebildete Acetyl-Coenzym A kann als Elektronenakzeptor dienen. Die Übertragung von $2 \cdot 2$ Elektronen durch eine Coenzym A-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (Acetaldehyd als Zwischenprodukt wird nicht frei) führt zur Bildung von **Ethanol**. Ein weiterer möglicher Akzeptor für Elektronen von NADH ist Oxalacetat, das durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat gebildet wird. Die Reduktion von Oxalacetat verläuft über Fumarat zum Gärungsprodukt **Succinat**, wobei der letzte Schritt von einer membranständigen Fumaratreductase katalysiert wird und daher mit Energiekonservierung über Elektronentransportphosphorylierung verknüpft ist. Da ohne die Carboxylierungsreaktion Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zur ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung genutzt werden würde, erbringt die Fumaratatmung netto jedoch keine Steigerung der Energieausbeute. Die Bildung der Gärungsprodukte Ethanol und Succinat reoxidiert jeweils zwei NADH. Daher kann pro gebildetem Ethanol bzw. Succinat ein Acetyl-Coenzym A zur Substratstufenphosphorylierung über Phosphotransacetylase und Acetatkinase zu **Acetat** umgesetzt werden.

Einige Enterobakterien (bekanntestes Beispiel: *Enterobacter aerogenes*) bilden als weitere Gärungsprodukte **Acetoin** und **2,3-Butandiol**, dabei aber weniger organische Säuren und mehr CO_2. Acetoin entsteht aus zwei Molekülen Pyruvat.

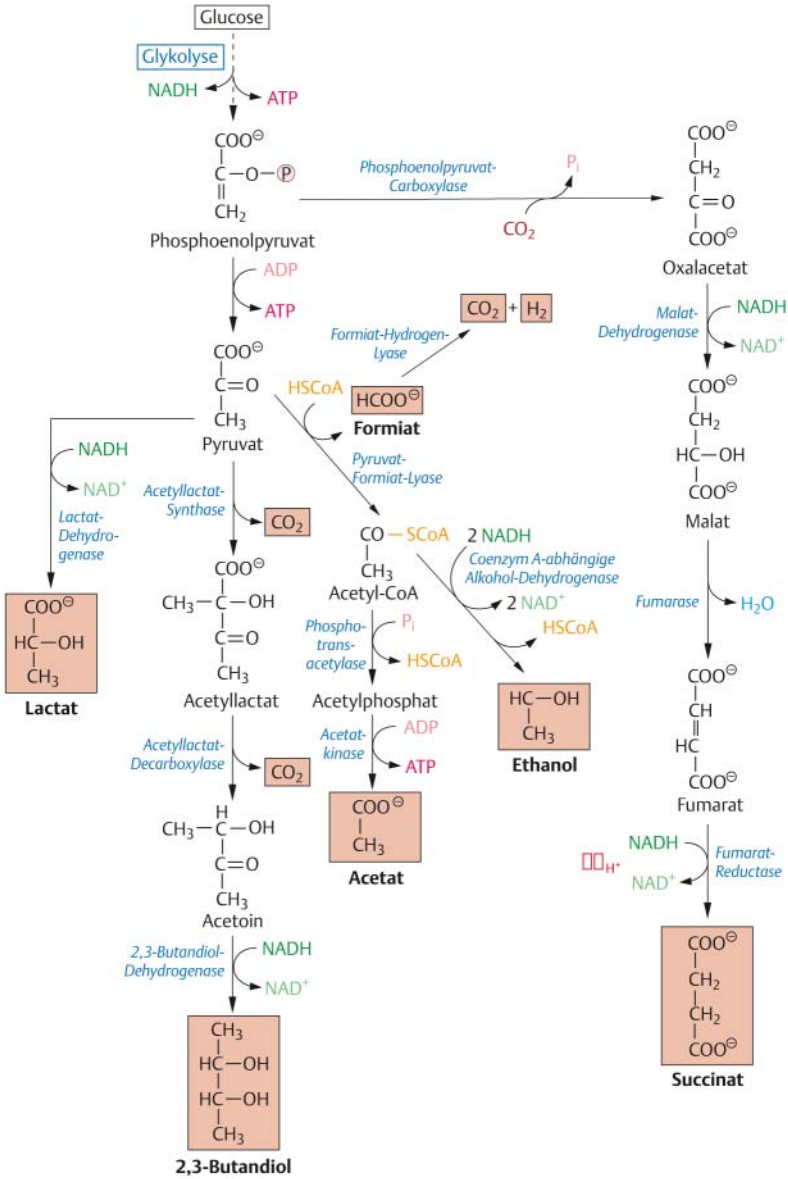


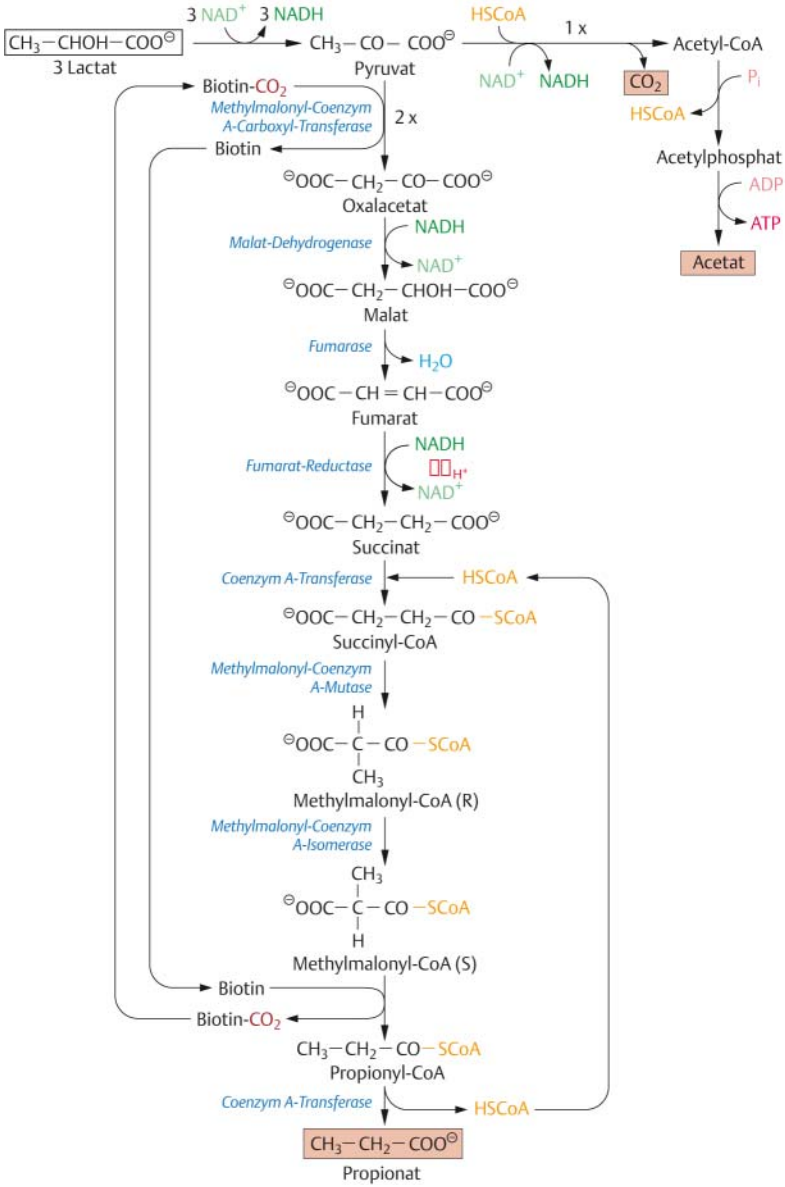
Abb. 8.**30** **Gemischte Säuregärung.** Übersicht über mögliche Gärungsprodukte und die zu ihrer Bildung beschrittenen Reaktionen; MQ: Menachinon.

Verbunden mit der Abspaltung eines CO_2 entsteht zunächst Acetyllactat, das nochmals CO_2 abspaltet und dann Acetoin liefert. Durch dessen Reduktion ensteht 2,3-Butandiol. Da jedoch hier nur zwei Elektronen benötigt werden, ist die Bildung von 2,3,-Butandiol zum Ausgleich der Redoxbilanz mit der Reduktion von Acetyl-Coenzym A zu Ethanol verbunden.

8.7.4 Propionsäuregärung

Die Vergärung von Kohlenhydraten und Lactat, aber auch von Malat, Glycerin und verschiedenen Aminosäuren zu Propionsäure bildet die Grundlage des Energiestoffwechsels der Bakterien der Gattung *Propionibacterium* und von einigen Vertretern der Gattungen *Selenomonas* und *Veillonella*. Diese Bakterien leben im Pansen der Wiederkäuer und sind dort am mikrobiellen Abbau von Cellulose zu Propionsäure und Acetat beteiligt.

Propionibakterien bauen Glucose über die Glykolyse zu Pyruvat ab. Dient Lactat als Substrat wird dieses im ersten Schritt durch die Lactat-Dehydrogenase ebenfalls zu Pyruvat umgesetzt. Unabhängig davon, ob Glucose oder Lactat vergoren wird, fällt pro gebildetem Pyruvat ein NADH an. Im oxidativen Ast der Gärung wird Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A oxidiert (Reduktion eines weiteren NAD^+ zu NADH). Dessen anschließende Umwandlung zu Acetylphosphat erlaubt über die Reaktion der Acetatkinase ATP-Synthese durch Substratstufenphosphorylierung. Das Produkt dieser Reaktionen ist **Acetat**. Um den Ausgleich der Redoxbilanz zu erreichen, setzen Propionsäuregärer im reduktiven Ast der Gärung für jedes zu Acetat verstoffwechselte Pyruvatmolekül zwei weitere Pyruvatmoleküle zu **Propionsäure** um. In der Regel geschieht dies über den **Methylmalonyl-Coenzym A-Weg** (Abb. 8.**31**). Charakteristisches Enzym des Stoffwechselweges ist die **Methylmalonyl-Coenzym A-Carboxyl-Transferase** oder **Transcarboxylase**. Dieses Biotin-Enzym überträgt eine Carboxylgruppe von Methylmalonyl-Coenzym A, einer im weiteren Verlauf des Stoffwechselweges entstehenden Verbindung, auf Pyruvat. Das so gebildete Oxalacetat wird in zwei Reduktionsschritten zu Succinat umgewandelt. Beim Umsatz von zwei Pyruvat-Molekülen werden so vier NADH reoxidiert, genauso viele wie bei der Bildung von drei Molekülen Pyruvat und dem Umsatz eines Moleküles Pyruvat zu Acetat anfallen. Die Reduktion von Fumarat erlaubt zudem Energiekonservierung über Elektronentransportphosphorylierung. Succinat ist jedoch nicht Produkt der Gärung. Durch eine weitere Transferase, die **Coenzym A-Transferase**, wird von dem erst im weiteren Verlauf des Stoffwechselweges gebildeten Propionyl-Coenzym A das Coenzym A auf Succinat übertragen. Aus Succinyl-Coenzym A wird durch die Vitamin B12-abhängige **Methylmalonyl-Coenzym A-Mutase** Methylmalonyl-Coenzym A gebildet, die Verbindung, die als Carboxylgruppendonor für die Transcarboxylase dient. Durch die Entfernung der freien Carboxylgruppe entsteht aus Methylmalonyl-Coenzym A Propionyl-Coenzym A, die Verbindung, die das von der Coenzym A-Transferase übertragene


3 NAD+
3 NADH
CH3–CHOH–COO⊖
3 Lactat
CH3–CO–COO⊖
Pyruvat
HSCoA
1 x
NAD+
NADH
Acetyl-CoA
CO2
Pi
HSCoA
Acetylphosphat
ADP
ATP
Acetat
Biotin-CO2
Methylmalonyl-Coenzym A-Carboxyl-Transferase
2 x
Biotin
⊖OOC–CH2–CO–COO⊖
Oxalacetat
Malat-Dehydrogenase
NADH
NAD+
⊖OOC–CH2–CHOH–COO⊖
Malat
Fumarase
H2O
⊖OOC–CH=CH–COO⊖
Fumarat
Fumarat-Reductase
NADH
H+
NAD+
⊖OOC–CH2–CH2–COO⊖
Succinat
Coenzym A-Transferase
HSCoA
⊖OOC–CH2–CH2–CO–SCoA
Succinyl-CoA
Methylmalonyl-Coenzym A-Mutase
H
⊖OOC–C–CO–SCoA
CH3
Methylmalonyl-CoA (R)
Methylmalonyl-Coenzym A-Isomerase
CH3
⊖OOC–C–CO–SCoA
H
Methylmalonyl-CoA (S)
Biotin
Biotin-CO2
CH3–CH2–CO–SCoA
Propionyl-CoA
Coenzym A-Transferase
HSCoA
CH3–CH2–COO⊖
Propionat

8

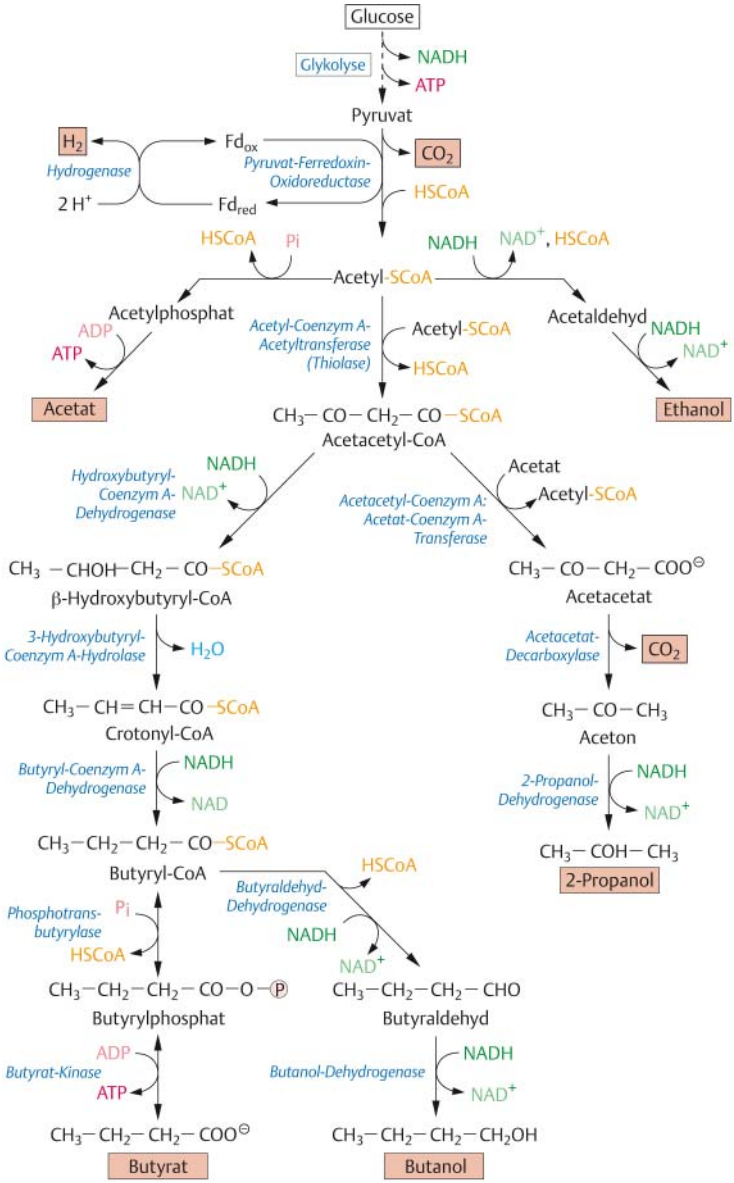
◀ Abb. 8.**31** **Propionsäuregärung über den Methylmalonyl-Coenzym A-Weg.** Energiekonservierung erfolgt durch Substratstufenphosphorylierung im Zuge der Acetatkinasereaktion sowie durch Fumaratatmung. Eine ausgeglichene Redoxbilanz resultiert, wenn die Gärungsprodukte Propionsäure und Acetat im Verhältnis 2:1 gebildet werden.

Coenzym A bereitstellt. Als Ergebnis des Coenzym A-Transfers wird das Gärungsprodukt Propionsäure frei. Durch das Recycling von Carboxylgruppe und Coenzym A wird der Energieaufwand vermieden, der zur erneuten Herstellung der energiereichen Bindung der beiden Gruppen notwendig würde, wenn sie zuvor freigesetzt worden wären.

Clostridium propionicum und einige andere Organismen bilden Propionat aus Lactat über einen anderen, einfacheren Weg, den **Acrylyl-Coenzym A-Weg**. Dabei wird Lactat zuerst zu Lactyl-Coenzym A aktiviert. Aus diesem wird durch Wasserabspaltung Acryloyl-Coenzym A (CH_2=CH–CO–Coenzym A) gebildet und dieses anschließend zu Propionyl-Coenzym A reduziert. Die Freisetzung von Propionsäure wird ebenfalls durch eine Transferase katalysiert, die Coenzym A auf Lactat überträgt.

8.7.5 Buttersäuregärung und Lösungmittelgärung

Saccharolytische Clostridien, wie alle Clostridien strikt anaerob, vergären Zucker und bilden dabei als charakteristisches Gärungsprodukt **Buttersäure**. Buttersäuregärer sind auf einen alkalischen oder neutralen pH-Wert ihrer Umgebung angewiesen, in saurem Milieu wachsen sie nicht. Einige Vertreter, gut untersucht bei *Clostridium acetobutylicum*, wechseln daher bei Ansäuerung ihrer Umgebung von der Buttersäuregärung zur **Lösungsmittelgärung**, bei der in erster Linie neutrale Verbindungen an Stelle von Säuren gebildet werden. Es entstehen dann die Lösungsmittel **Butanol**, **Aceton** und **2-Propanol** als Gärungsprodukte. Der Abbau von Zuckern erfolgt über die Glykolyse. ATP wird ausschließlich über Substratstufenphosphorylierung im Verlauf der Glykolyse, sowie über die energiereichen Verbindungen Acetylphosphat bzw. Butyrylphosphat durch die Enzyme Acetatkinase bzw. Butyratkinase gebildet. Pyruvat oxidieren Buttersäuregärer durch die **Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase**, sodass sie sich der dabei anfallenden Reduktionsäquivalente mittels einer **Hydrogenase** durch Bildung von **Wasserstoff** entledigen können. Die Bildung der organischen Gärungsprodukte geht von Acetyl-Coenzym A aus (Abb. 8.**32**) und ist mit Ausnahme der Acetatbildung mit der Reoxidation des aus der Glykolyse stammenden NADHs verbunden. Die Synthese von **Butyrat** beginnt mit der Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-Coenzym A zu Acetacetyl-Coenzym A. Dessen Reduktion, ein Hydratisierungs- und ein weiterer Reduktionsschritt führt zur Bildung von Butyryl-Coenzym A, aus dem dann, verknüpft mit ATP-Synthese, Butyrat entsteht. Da durch die Butyratbildung zwei NADH reoxidiert werden, so viele wie beim Abbau eines Glucosemoleküls entstehen, ist eine **reine Butter-**


Glucose
Glykolyse
NADH
ATP
Pyruvat
H2
Hydrogenase
2 H+
Fdox
Fdred
Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase
CO2
HSCoA
HSCoA
Pi
NADH
NAD+, HSCoA
Acetyl-SCoA
Acetylphosphat
ADP
ATP
Acetat
Acetyl-Coenzym A-Acetyltransferase (Thiolase)
Acetyl-SCoA
HSCoA
Acetaldehyd
NADH
NAD+
Ethanol
CH3–CO–CH2–CO–SCoA
Acetacetyl-CoA
Hydroxybutyryl-Coenzym A-Dehydrogenase
NADH
NAD+
Acetat
Acetacetyl-Coenzym A: Acetat-Coenzym A-Transferase
Acetyl-SCoA
CH3–CHOH–CH2–CO–SCoA
β-Hydroxybutyryl-CoA
CH3–CO–CH2–COO⊖
Acetacetat
3-Hydroxybutyryl-Coenzym A-Hydrolase
H2O
Acetacetat-Decarboxylase
CO2
CH3–CH=CH–CO–SCoA
Crotonyl-CoA
CH3–CO–CH3
Aceton
Butyryl-Coenzym A-Dehydrogenase
NADH
NAD
2-Propanol-Dehydrogenase
NADH
NAD+
CH3–CH2–CH2–CO–SCoA
Butyryl-CoA
CH3–COH–CH3
2-Propanol
HSCoA
Butyraldehyd-Dehydrogenase
NADH
NAD+
Phosphotrans-butyrylase
Pi
HSCoA
CH3–CH2–CH2–CO–O–Ⓟ
Butyrylphosphat
CH3–CH2–CH2–CHO
Butyraldehyd
ADP
Butyrat-Kinase
ATP
NADH
Butanol-Dehydrogenase
NAD+
CH3–CH2–CH2–COO⊖
Butyrat
CH3–CH2–CH2–CH2OH
Butanol

◀ Abb. 8.**32** **Buttersäure- und Lösungsmittelgärung.** Bei neutralem/alkalischem pH-Wert werden Zucker zu Butyrat als Hauptgärungsprodukt umgesetzt. Acetat und Ethanol sind Nebenprodukte. CO_2 und H_2 entstehen bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat (Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase, Hydrogenase). Die extrazelluläre Anhäufung des Butyrats führt durch Ansäuerung in einigen Organismen zur Umstellung des Stoffwechsels auf Lösungsmittelgärung. Bereits gebildetes Butyrat wird zu Butanol weiterreduziert. Aus Acetacetyl-Coenzym A werden zusätzlich Aceton und 2-Propanol gebildet.

säuregärung, zu beobachten etwa bei *Clostridium pasteurianum*, entsprechend folgender Bilanz möglich:

$$\text{Glucose} + 3\ \text{ADP} + 3\ P_i \rightarrow \text{Butyrat} + 2\ CO_2 + 2\ H_2 + 3\ \text{ATP}$$

Als Nebenprodukte der Buttersäuregärung treten in geringen Mengen Acetat und Ethanol auf. Einige saccharolytische Clostridien wie *Clostridium acetobutylicum* bilden nur in einer ersten Wachstumsphase Butyrat. Der Abfall des pH-Wertes im Kulturmedium führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels auf **Lösungsmittelgärung**. Gebildetes Butyrat wird erneut zu Butyryl-Coenzym A aktiviert und dieses dann in zwei Schritten zu **Butanol** reduziert. Aus Acetacetyl-CoA bzw. aus Acetacetat entsteht durch Decarboxylierung **Aceton**, das noch zu **2-Propanol** reduziert werden kann.

8.7.6 Vergärung von Aminosäuren

Proteolytische Clostridien hydrolysieren Proteine und vergären die freigesetzten **Aminosäuren**. Verbreitet ist die gemeinsame Vergärung eines Aminosäurepaares. Dabei fungiert eine der beiden Aminosäuren als Elektronendonor und die zweite als Elektronenakzeptor. Dieser Gärungstyp wird als **Stickland-Gärung** bezeichnet und läuft in der Regel nach folgendem Schema ab: Die **als Elektronendonor fungierende Aminosäure** wird deaminiert und zur entsprechenden 2-Ketosäure oxidiert, welche anschließend oxidativ decarboxyliert wird. In beiden Fällen übernimmt NAD^+ die anfallenden Elektronen. Neben CO_2 entsteht der Coenzym A-Ester einer Fettsäure, deren Kohlenstoffgerüst demjenigen der eingesetzten Aminosäure entspricht, jedoch um ein C-Atom verkürzt ist. Durch Übertragung der Coenzym A-Gruppe auf Acetat durch eine Coenzym A-Transferase wird die Fettsäure freigesetzt und Acetyl-Coenzym A gebildet, das zur ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung genutzt wird. Zur Reoxidation des NADHs wird die zweite, **als Elektronenakzeptor fungierende Aminosäure** am α-Kohlenstoffatom reduziert, ihre Aminogruppe freigesetzt. Als Gärungsprodukt entsteht eine Fettsäure, deren Kohlenstoffgerüst mit demjenigen der eingesetzten Aminosäure identisch ist. Die Aminosäurevergärung gemäß der Stickland-Reaktion mit Alanin als Elektronendonor und Glycin als Elektronenakzeptor ist in Abb. 8.**33** gezeigt. Hier liefert die oxidative Deaminierung von Alanin und die anschließende oxidative Decarboxylierung des entste-

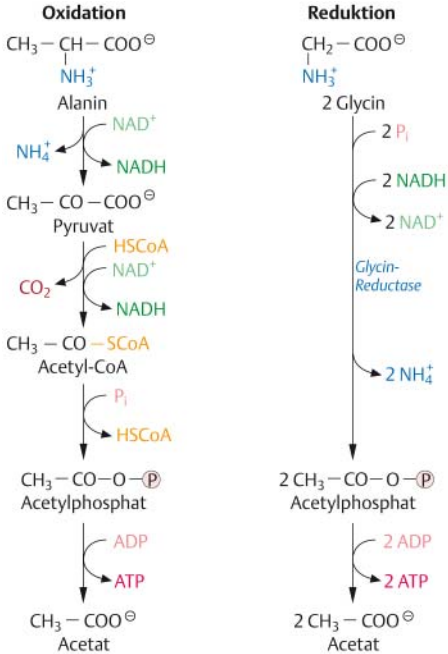


Abb. 8.33 **Stickland-Gärung des Aminosäurepaares Alanin/Glycin.** Um zu einer ausgeglichenen Redoxbilanz zu gelangen, müssen pro Molekül der als Elektronendonor fungierenden und also oxidierten Aminosäure (Alanin) zwei Moleküle der als Elektronenakzeptor dienenden Aminosäure (Glycin) reduziert werden. Wie für Gärungen typisch wird im oxidativen Abschnitt ATP durch Substratstufenphosphorylierung gebildet. Da als Produkt der Glycinreductase jedoch auch im reduktiven Abschnitt der Gärung Acetylphosphat entsteht, kann auch hier weiteres ATP synthetisiert werden.

8

henden Pyruvats direkt Acetyl-Coenzym A. Außerdem kann bei Nutzung von Glycin als Elektronenakzeptor ausnahmsweise auch im reduktiven Ast der Gärung Energie durch Substratstufenphosphorylierung konserviert werden: Die reduktive Eliminierung der Aminogruppe des Glycins stellt einen ausreichenden hohen Betrag freier Energie zur Verfügung, sodass katalysiert durch die Selen- bzw. Selenocystein-enthaltende **Glycinreductase** primär Acetylphosphat gebildet werden kann, das durch die Acetatkinase zur ATP-Synthese genutzt wird. Neben **CO_2** entsteht bei der Vergärung des Aminosäurepaares Alanin/Glycin ausschließlich **Acetat**.

8.7.7 Vergärung von Citrat

Einige Enterobakterien (*Klebsiella*, *Enterobacter*) sind in der Lage, **Citrat** zu vergären. Dabei wird Citrat zunächst in Acetat und Oxalacetat gespalten, letzteres dann zu Pyruvat decarboxyliert. Wie für Enterobakterien typisch erfolgt der Umsatz des Pyruvats durch die Pyruvat-Formiat-Lyase, sodass Elektronen durch Wasserstoffbildung entsorgt werden können und kein NADH anfällt, das reoxidiert werden müsste. Aus Pyruvat entstehendes Acetyl-Coenzym A ermöglicht ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung. Bemerkenswert ist der

Energiestoffwechsel der **Citrat-vergärenden Bakterien** dank der **Oxalacetat-Decarboxylase** und der von diesem Enzym katalysierten Reaktion. Als Reaktionsprodukte entstehen **CO_2**, dessen Kohlenstoffatom stärker oxidiert ist als in der Ausgangsverbindung, und **Pyruvat**, bei dem das Kohlenstoffatom der Methylgruppe stärker reduziert ist als in der Ausgangsverbindung. Die Freie Energie $\Delta G^{0\prime}$ der Decarboxylierung der Dicarbonsäure liegt bei etwa –20 kJ mol^{-1} und ist damit zu niedrig, um die Bildung einer energiereichen Verbindung mit ausreichend hohem Gruppenübertragungspotential zur Phosphorylierung von ADP zu ATP zu erlauben. Trotzdem sind die Bakterien in der Lage, die Oxalacetat-Decarboxylierung zur **Energiekonservierung** zu nutzen, allerdings beruhend auf einem **chemiosmotischen Mechanismus**. Die Oxalacetat-Decarboxylase ist in der Cytoplasmamembran der Bakterien lokalisiert und verknüpft die Decarboxylierung mit dem Transport von Natriumionen aus dem Cytoplasma nach außen, sie arbeitet also als primärer Transporter. Die an der Membran aufgebaute elektrochemische Potentialdifferenz $\Delta\mu_{Na^+}$ kann als Energiequelle für sekundäre Transportvorgänge und nach Umwandlung in $\Delta\mu_{H^+}$ durch einen Na^+-Protonen-Antiporter zur ATP-Synthese genutzt werden.

Ein weiteres Beispiel für den Aufbau von $\Delta\mu_{Na^+}$ angetrieben durch die Decarboxylierung einer Dicarbonsäure ist die **Methylmalonyl-Coenzym A-Decarboxylase** des Bakteriums ***Propionigenium modestum***. Dieses Bakterium lebt von der Verstoffwechselung von Succinat zur Propionat. Die Decarboxylierungsreaktion ist die einzige energiebereitstellende Reaktion des Stoffwechselweges.

Gärung: Oxidation organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen; Nutzung eines organischen Zwischenprodukts als Elektronenakzeptor; ATP-Synthese ausschließlich oder überwiegend über Substratstufenphosphorylierung.
- **Primäre Gärer:** Organismen, die aus Polymeren freigesetzte Monomere (Zucker, Aminosäuren) vergären.
- **Sekundäre Gärer:** Organismen, die die Gärungsprodukte primärer Gärer zu Acetat, CO_2 und H_2 weitervergären.

Syntrophie: Assoziation von H_2-bildenden sekundären Gärern und H_2-zehrenden methanogenen Archaea und sulfatreduzierenden Bakterien.
Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase: Katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat; von Ferredoxin können Elektronen auf Protonen übertragen werden.
Pyruvat-Formiat-Lyase: Enzym, das Pyruvat in Acetyl-Coenzym A und Formiat spaltet.
Formiat-Hydrogen-Lyase: Enzym, das Formiat in CO_2 und H_2 spaltet.
Milchsäuregärung: Vergärung von Zuckern zu Lactat.
- **β-Galactosidase:** Enzym, das das Disaccharid Lactose in Glucose und Galactose spaltet.
- **Homofermentative Milchsäurebakterien:** Zuckerabbau über Glykolyse; Bildung von Lactat als einzigem Gärungsprodukt.
- **Heterofermentative Milchsäurebakterien:** Zuckerabbau über Phosphoketolase-Weg; Produkte bei Vergärung von Hexosen: Lactat und Ethanol; Produkte bei Vergärung von Pentosen: Lactat und Acetat.

Ethanolgärung: Vergärung von Zuckern zu Ethanol; Pyruvat umsetzendes Enzym: Pyruvat-Decarboxylase.
Gemischte Säuregärung: Zuckerabbau über Glykolyse; Pyruvat umsetzendes Enzym: Pyruvat-Formiat-Lyase; H_2-Bildung durch Formiat-Hydrogen-Lyase; mögliche Gärungsprodukte: Lactat, Formiat, Acetat, Succinat, Ethanol, CO_2, H_2, Acetoin und 2,3-Butandiol.
Propionsäuregärung: Vergärung von Zuckern oder Lactat zu Propionat und Acetat über Methylmalonyl-Coenzym A-Weg (Schlüsselenzym: Methylmalonyl-Coenzym A-Carboxyl-Transferase = Transcarboxylase) oder Acrylyl-Coenzym A-Weg.
Buttersäuregärung: Vergärung von Zuckern zu Butyrat; Zuckerabbau über Glykolyse; Pyruvat-umsetzendes Enzym: Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase; H_2-Bildung durch Hydrogenase.
Lösungsmittelgärung: Bildung von Butanol, Aceton und 2-Propanol durch Buttersäuregärer nach Ansäuerung des Kulturmediums.
Saccharolytische Clostridien: Vergären Zucker; Buttersäuregärer.
Proteolytische Clostridien: Vergären Aminosäuren.
Stickland-Gärung: Gekoppelte Vergärung eines Aminosäurepaares; eine Aminosäure fungiert als Elektronendonor, die andere als Elektronenakzeptor.
Oxalacetat-Decarboxylase: Membranständiges Enzym, das die Decarboxylierung der Dicarbonsäure Oxalacetat mit dem Transport von Natriumionen durch die Membran verbindet.

8.8 Chemolithotrophie

Die **Oxidation reduzierter anorganischer Verbindungen** in erster Linie mit **Sauerstoff als Elektronenakzeptor** bildet die Grundlage des Energiestoffwechsels der meist autotrophen chemolithotrophen Bakterien. Die Energiekonservierung erfolgt über **Elektronentransportphosphorylierung**. Bei Verwendung eines Elektronendonors mit hohem Redoxpotential muss NAD(P)H durch **revertierten Elektronentransport** gebildet werden. **Nitrosobakterien**, die Ammonium zu Nitrit oxidieren, und **Nitrobakterien**, die Nitrit zu Nitrat oxidieren, bewirken gemeinsam die **Nitrifikation** (Oxidation von Ammonium zu Nitrat) und werden als Nitrifikanten bezeichnet. **Sulfurikanten** (farblose Schwefelbakterien) oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen wie Schwefelwasserstoff, elementaren Schwefel oder Thiosulfat zu Sulfat. **Eisenoxidierende Bakterien** verwenden Fe^{2+}-Ionen als Elektronendonor und oxidieren diese zu Fe^{3+}-Ionen. Zu den Eisenoxidierern zählen auch viele **acidophile Sulfurikanten**. Wasserstoff wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Bakteriengruppen als Elektronendonor zur Reduktion anorganischer Verbindungen genutzt. **Knallgasbakterien** reduzieren mit Hilfe einer membranständigen Hydrogenase Sauerstoff zu Wasser. **Carboxidobakterien** verwenden Kohlenmonoxid als Elektronendonor und oxidieren es zu Kohlendioxid.

Chemolithotrophe Organismen, zu denen ausschließlich Prokaryoten zählen, versorgen sich durch die **Oxidation einer anorganischen Verbindung** mit Freier Energie. Der Elektronentransport vom Elektronendonor zum Elektronenakzeptor erfolgt über Membranproteinkomplexe, sodass Energie primär durch den Aufbau der protonenmotorischen Kraft $\Delta\mu_{H^+}$ an der Cytoplasmamembran der Bakterien konserviert und ATP dann über **Elektronentransportphosphorylierung** gebildet wird. Als **Elektronenakzeptor** dient eine Verbindung, die die Organismen extrazellulär vorfinden (**häufig Sauerstoff**), sodass der Energiestoffwechsel der chemolithotrophen Bakterien als **Atmung** zu bezeichnen ist. Die als **Elektronendonoren** genutzten, **reduzierten anorganischen Verbindungen** (NH_4^+, NO_2^-, HS^-, Fe^{2+}-Ionen, H_2 oder Kohlenmonoxid) entstehen genauso wie Methan an anoxischen Standorten durch den Energiestoffwechsel chemoorganotropher Organismen als Produkt anaerober Atmungen oder (im Fall von H_2) als Produkt von Gärungen. Die chemolithotrophen Bakterien siedeln sich häufig dort an, wo die genannten Verbindungen durch Diffusion aus anoxischen in oxische Bereiche gelangen und nun mit O_2 als Elektronenakzeptor oxidiert werden können. Aerobe methanoxidierende Bakterien (**methanotrophe Bakterien**) sind zu den chemoorganotrophen Organismen zu rechnen, da Methan als organische Verbindung gilt. Sie sind jedoch in Bezug auf ihre Rolle im Ökosystem sinnvollerweise den aeroben chemolithotrophen Bakterien an die Seite zu stellen.

Die **Redoxspanne zwischen Elektronendonor und Elektronenakzeptor** bestimmt, welchen Betrag Freier Energie die von einem chemolithotrophen Organismus katalysierte Redoxreaktion liefert (Abb. 8.**34**). Wieviel davon in Form von ATP konserviert wird, hängt davon ab, wie die Elektronentransportkette des Organismus zusammengesetzt ist und wie die Verknüpfung mit dem Transfer von Protonen über die Cytoplasmamembran erfolgt. Aufbau und Funktionsweise der Elektronentransportkette ist bei vielen der chemolithotrophen Bakterien noch nicht abschließend geklärt. Der Elektronendonor der Redoxreaktion wird zudem nicht nur zum Zweck der Energiekonservierung oxidiert, er stellt auch die Elektronen bereit, die im Baustoffwechsel der in der Regel autotrophen Organismen für reduktive Schritte bei der Synthese von Zellsubstanz aus CO_2 benötigt werden. Die Standard-Redoxpotentiale von **Wasserstoff** (H^+/H_2) und **Kohlenmonoxid** (CO_2/CO) sind so niedrig, dass prinzipiell die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für den Baustoffwechsel in Form von NAD(P)H direkt möglich ist. Dank seines niedrigen Standard-Redoxpotentials wird besonders Wasserstoff auch von verschiedenen anaeroben Organismen mit anderen Elektronenakzeptoren als O_2 oxidiert. Elektronendonoren wie **reduzierte Schwefelverbindungen**, **NH_4^+**, **NO_2^-** oder auch **Fe^{2+}-Ionen** weisen Standard-Redoxpotentiale auf, die zum Teil deutlich über dem von NAD(P)H liegen. Die Oxidation dieser Verbindungen mit O_2 als Elektronenakzeptor stellt entsprechend geringere Energiebeträge bereit. Vom Donor können die Elektronen dann nur auf Höhe des Chinons oder eines *c*-Typ-Cytochroms in die Elektronentransportkette eingeführt werden und die Reduktion von $NAD(P)^+$ kann nicht direkt,

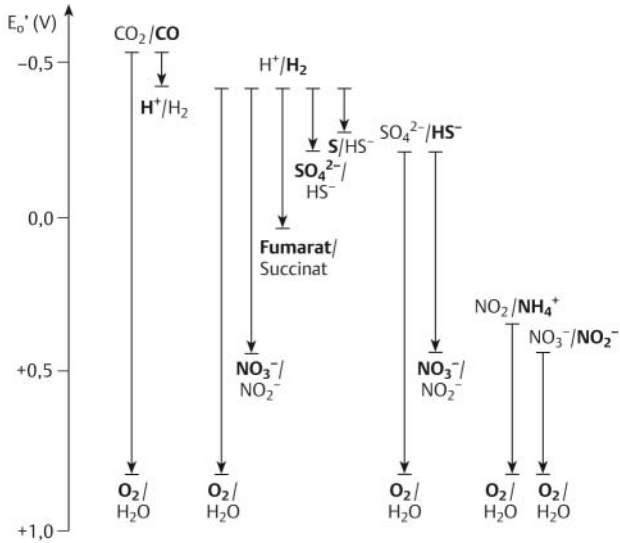


Abb. 8.**34** **Atmung chemolithotropher Organismen.** Der Energiestoffwechsel chemolithotropher Bakterien basiert auf der Oxidation reduzierter anorganischer Verbindungen mit O_2 oder einer anderen extrazellulär vorgefundenen Verbindung als Elektronenakzeptor. Dargestellt ist die Standard-Redoxpotentialspanne zwischen Elektronendonor und -akzeptor, die den durch die Redoxreaktion bereitgestellten Betrag an Freier Energie bestimmt.

sondern nur über **revertierten Elektronentransport** erfolgen. Bei geringen Energieausbeuten der im Zentrum des Energiestoffwechsels stehenden Redoxreaktion müssen chemolithotrophe Bakterien, zusätzlich zu den energetischen Kosten der Autotrophie, so noch weitere Energie für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten aufbringen. Charakteristisch für diese Organismen ist daher ein hoher Umsatz der Energiesubstrate, wobei trotzdem in vielen Fällen nur geringe Zelldichten erreicht werden.

Auch die Reduktion von CO_2 mit H_2 als Elektronendonor (**Methanogenese und Acetogenese aus CO_2 und H_2**) sind Beispiele einer chemolithotrophen Lebensweise. Allerdings sind methanogene Archaea und acetogene Bakterien, im Gegensatz zu den zuvor besprochenen, aeroben Chemolithotrophen, strikt anaerobe Organismen, die am Ende der anaeroben Nahrungskette stehen und mit H_2 und CO_2 Stoffwechselprodukte chemoorganotropher Gärer in ihrem Energiestoffwechsel verwenden. Methan entsteht jedoch nur zu einem kleinen Teil aus CO_2 und H_2, der überwiegende Teil entsteht aus Acetat. Die Darstellung der Methanogenese erfolgt daher im Rahmen der anaeroben Atmungen von chemoorganotrophen Organismen (S. 367). Im Anschluss wird dort auch die Acetogenese dargestellt (S. 371), da einige der dabei beschrittenen Reaktionen große Ähnlichkeit zu Reaktionen der Methanogenese aufweisen.

8.8.1 Nitrifikanten: Ammonium- und nitritoxidierende Bakterien

Die Oxidation von NH_4^+ zu NO_2^- mit O_2 als Elektronenakzeptor wird von den **Nitrosobakterien** (Beispiel: *Nitrosomonas*) zur Energiekonservierung genutzt. **Nitrobakterien** (Beispiel: *Nitrobacter*) oxidieren dagegen, ebenfalls mit O_2 als Elektronenakzeptor, NO_2^- zu NO_3^-. Die Oxidation von NH_4^+ zu NO_3^-, die **Nitrifikation** ist also das Ergebnis der Stoffwechselaktivität beider Bakteriengruppen. Die Mitglieder beider Gruppen treten in der Natur stets vergesellschaftet auf und werden als **Nitrifikanten** bezeichnet. Sie sind in der Regel obligat chemolithoautotroph und assimilieren CO_2 über den Calvin-Zyklus. Es sind keine Organismen bekannt, die NH_4^+ durchgehend bis zu NO_3^- oxidieren können. Nitrifikanten besitzen ausgedehnte intrazelluläre Membransysteme, die die Enzymkomplexe der Elektronentransportkette tragen. Beide Bakteriengruppen verfügen über eine **terminale Oxidase**, die die Elektronenübertragung auf O_2 katalysiert und pro Elektronenpaar zwei Protonen über die Membran pumpt.

NH_4^+ wird als Produkt der Nitratatmung gebildet (**Ammonifikation**), entsteht aber auch bei der Zersetzung organischen Materials. Die **NH_4^+-Oxidation** im Energiestoffwechsel der **Nitrosobakterien** wird durch die **Ammonium-Monooxygenase** eingeleitet. Dieses Enzym führt ein aus O_2 stammendes Sauerstoffatom in sein Substrat ein, sodass Hydroxylamin entsteht. Es benötigt jedoch zur Reduktion des zweiten Sauerstoffatoms zwei weitere Elektronen, die es aus der Oxidation des Hydroxylamins zu NO_2^-, katalysiert durch die **Hydroxylamin-Oxidoreductase**, erhält. Bei der Hydroxylaminoxidation fallen vier Elektronen an, die von einem *c*-Typ-Cytochrom übernommen werden und von denen zwei an die Ammonium-Monooxygenase und und zwei an die terminale Oxidase zur Reduktion von O_2 weitergegeben werden.

Für die **Oxidation von NO_2^- zu NO_3^-** bei den **Nitrobakterien** ist eine **Nitrit-Oxidoreductase** verantwortlich. Es ist unklar, welcher Elektronenüberträger die Weiterleitung der Elektronen von dieser Oxidoreductase zur Oxidase übernimmt.

8.8.2 Sulfurikanten: Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen

Sulfurikanten oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen wie **Schwefelwasserstoff** (H_2S), **elementaren Schwefel** (S^0) und **Thiosulfat** ($S_2O_3^{2-}$). Während die phototrophen Schwefelbakterien (Schwefelpurpurbakterien, S. 341; Grüne Schwefelbakterien, S. 343) Schwefelwasserstoff (HS^-) als Elektronendonor für die lichtgetriebene Reduktion von $NAD(P)^+$ nutzen, oxidieren die Sulfurikanten, auch **farblose Schwefelbakterien** genannt, Schwefelverbindungen in erster Linie mit O_2 als Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung. Die Reduktion von $NAD(P)^+$ erfolgt bei diesen Organismen durch revertierten Elektronentransport mit Elektronen, die letztlich auch von den Schwefelverbindungen stammen. Zu den Sulfurikanten zählen sowohl Archaea als auch Bacteria, neben strikt chemolithotrophen gibt es auch fakultative Vertreter. Einige wenige Organismen betreiben anstelle der aeroben Atmung eine anaerobe Atmung mit NO_3^- als Elektronenakzeptor (Beispiel: *Thiobacillus denitrificans*). Es sind zwei große Gruppen von Organismen zu unterscheiden: **Acidophile Sulfurikanten**, die bei pH-Werten

von 1–3 optimal wachsen und große Mengen Schwefelsäure bilden (Beispiel: *Acidithiobacillus thiooxidans*), und **neutrophile Sulfurikanten**. Einige Vertreter oxidieren neben Schwefelverbindungen auch Fe^{2+}- oder Mn^{2+}-Ionen (Beispiel: *Acidithiobacillus ferrooxidans*).

Schwefelverbindungen treten **in der Natur** als Metallsulfide in Boden und Gestein auf. An Schwefelquellen austretendes Schwefelwasserstoffgas wird in Kontakt mit Luft zu S^0 und $S_2O_3^{2-}$ oxidiert. HS^- entsteht außerdem an anaeroben Standorten durch sulfatreduzierende Bakterien.

Die **Enzymatik der Oxidation von Schwefelverbindungen** ist nicht vollständig aufgeklärt. In verschiedenen Organismen werden offensichtlich unterschiedliche Wege beschritten. Bei der Oxidation von HS^- entsteht S^0 bzw. Polysulfid (H-S-S-S-.....) als Zwischenprodukt. Im Anschluss gebildetes SO_3^{2-} wird entweder über ein membranständiges Enzym oder aber im Cytoplasma weiter zu SO_4^{2-} oxidiert. Die Oxidation von $S_2O_3^{2-}$ erfolgt offensichtlich membrangebunden. Die Elektronen aus Sulfit- und Thiosulfatoxidation werden der Elektronentransportkette zugeführt und letzlich von einer Oxidase zur Reduktion von O_2 eingesetzt. Sulfitoxidation über die **Adenosinphosphosulfat(APS)-Reductase** eröffnet die Möglichkeit, Energie durch Substratstufenphosphorylierung zu konservieren. Das lösliche Enzym verknüpft die Oxidation von SO_3^{2-} zu SO_4^{2-} mit der Ausbildung einer energiereichen Bindung zwischen Sulfatgruppe und der Phosphatgruppe von AMP im **Adenosinphosphosulfat**-Molekül (Struktur von APS, Abb. 8.**25**). Durch die ADP-Sulfurylase wird SO_4^{2-} und ADP frei. Zwei Moleküle ADP kann die Adenylat-Kinase zu ATP und AMP umsetzen.

8

8.8.3 Eisenoxidierende Bakterien

Eisenoxidierende Bakterien oxidieren **Fe(II)** zu **Fe(III)** mit O_2 als Elektronenakzeptor.

$$2\ Fe^{2+} + ½\ O_2 + 2\ H^+ \rightarrow 2\ Fe^{3+} + H_2O$$

Das Redoxpaar Fe^{3+}/Fe^{2+} besitzt mit $E^{0\prime}$= +0,77 V ein hohes Standard-Redoxpotential, sodass die Redoxpotentialdifferenz zum Elektronenakzeptor O_2 gering ist. Bei neutralem pH-Wert ist Eisen in zweiwertigem Zustand vergleichsweise instabil, d. h. es wird schnell spontan zu Fe(III) oxidiert. Bei niedrigem pH-Wert ist die spontane Oxidation von Fe(II) vermindert. Zudem weist das schwer lösliche Eisensulfid (FeS), in dessen Form Eisen(II) in der Natur vorkommt, im Sauren eine höhere Löslichkeit auf. Entsprechend sind Eisenoxidierer bevorzugt an extrem sauren Standorten anzutreffen. In vielen Fällen sind sie auch in der Lage, HS^- zu oxidieren und sorgen dann durch die Bildung von Schwefelsäure selbst für die Ansäuerung ihrer Umgebung.

Thiobacillus ferrooxidans ist das am besten untersuchte eisenoxidierende Bakterium. Es betreibt die Oxidation der Fe^{2+}-Ionen im Periplasma, wo ein kupferhaltiges Protein, das **Rusticyanin**, die Elektronen von Fe^{2+}-Ionen übernimmt. An der Weiterleitung der Elektronen an die Oxidase sind in der Membran Cytochrome beteiligt. Die Oxidase pumpt Protonen aus der Zelle hinaus und durch die von ihr auf der Innenseite der Membran katalysierte Reduktion von O_2 zu Wasser werden im Cytoplasma zusätzlich Protonen verbraucht. Auf diese Weise wird dem zur ATP-Synthese notwendigen Einstrom von Pro-

tonen durch die F_oF_1-ATPase entgegengearbeitet und die Energetisierung der Cytoplasmamembran, die bei niedrigem Außen-pH in erster Linie in einer extrem hohen pH-Differenz zwischen Außen- und Innenraum besteht (interner pH-Wert: 5,5–6,0), aufrecht erhalten.

8.8.4 Wasserstoffoxidierende Bakterien

Molekularer Wasserstoff (H_2) entsteht an anaeroben Standorten durch die Stoffwechselleistung gärender Organismen (S. 374). Dank seines niedrigen Redoxpotentials ist er ein hervorragendes Reduktionsmittel und wird bereits unter anaeroben Bedingungen von vielen unterschiedlichen Organismen (**anaerobe Wasserstoffoxidierer**) als Elektronendonor eingesetzt. Viele fakultativ anaerobe, chemoorganotrophe Bakterien können H_2 alternativ zu organischen Verbindungen als Elektronendonor im Zuge einer anaeroben Atmung (S. 366) nutzen, sie sind also fakultativ chemolithotroph. Auch die Reduktion von CO_2 zu Methan bzw. Acetat durch die strikt anaeroben methanogenen Archaea bzw. die acetogenen Bakterien erfolgt zu einem beträchtlichen Anteil bzw. vollständig mit H_2 als Elektronendonor (S. 370 bzw. 373). H_2, der aus anaeroben Sedimenten in aerobe Bereiche gelangt, kann dort mit O_2 als Elektronenakzeptor oxidiert werden.

$$H_2 + ½\ O_2 \rightarrow H_2O \qquad \Delta G^{0\prime} = -237\ kJ\ mol^{-1}$$

Diese sogenannte **Knallgasreaktion** liefert einen beträchtlichen Betrag Freier Energie. **Aerobe Wasserstoffoxidierer**, also Bakterien, die die Knallgasreaktion als Grundlage ihres Energiestoffwechsels nutzen, werden auch als **Knallgasbakterien** bezeichnet. Sie sind meist fakultativ chemolithotroph, wenn verfügbar, nutzen sie organische Verbindungen als Elektronendonor und Kohlenstoffquelle für den Baustoffwechsel. Für die Einschleusung der bei der Wasserstoffoxidation anfallenden Elektronen in die Elektronentransportkette ist eine **membranständige Hydrogenase** zuständig. Die Elektronen werden in der Membran von einem Chinon übernommen und über cytochromhaltige Membranproteinkomplexe an Sauerstoff weitergeleitet. Auch die für reduktive Schritte des Baustoffwechsels benötigten Elektronen werden aus H_2 bezogen. Sie können über eine **cytoplasmatische Hydrogenase** bereitgestellt werden, die die direkte Reduktion von $NAD(P)^+$ zu NAD(P)H mit H_2 katalysiert. Fehlt dieses Enzym, so muss NAD(P)H unter Energieaufwand durch revertierten Elektronentransport (ausgehend von Chinol) gebildet werden.

8.8.5 Kohlenmonoxidoxidierende Bakterien

Kohlenmonoxid kann durch biologische Prozesse unter anaeroben und aeroben Bedingungen entstehen. Es besitzt mit $E^{0\prime} = -0{,}54$ V ein noch niedrigeres Standard-Redoxpotential als molekularer Wasserstoff. Die Oxidation von Kohlenmonoxid wird von den **Carboxidobakterien** in erster Linie mit O_2 als Elektronenakzeptor durchgeführt. Es kann jedoch auch NO_3^- verwendet werden. Selbst die

Verknüpfung der Kohlenmonoxidoxidation mit der Reduktion von Protonen zu H_2 kann bei niedriger Wasserstoffkonzentration einen ausreichend großen Betrag Freier Energie liefern, um die ATP-Synthese durch Elektronentransportphosphorylierung zu ermöglichen.

Die **Kohlenmonoxid-Dehydrogenase** der aeroben Carboxidobakterien unterscheidet sich stark von derjenigen der strikt anaeroben, wasserstoffbildenden Carboxidobakterien. Das Enzym der **aeroben Carboxidobakterien** trägt in seinem aktiven Zentrum ein Molybdän- und ein Kupferatom und überträgt Elektronen auf ein b-Typ-Cytochrom. Im Enzym der **anaeroben Carboxidobakterien** ist ein Nickel-Eisen-Schwefel-Zentrum an der Kohlenmonoxidoxidation beteiligt und Empfänger der Elektronen ist eine wahrscheinlich protonenpumpende Hydrogenase.

Chemolithotrophe Bakterien: Bakterien, die extrazellulär vorgefundene, reduzierte, anorganische Verbindungen meist mit O_2 als Elektronenakzeptor oxidieren; Energiekonservierung über ETP.
Nitrosobakterien: Chemolithotrophe Bakterien, die NH_4^+ zu NO_2^- oxidieren; wichtige Enzyme der Ammoniumoxidation: Ammonium-Monooxygenase, Hydroxylamin-Oxidoreductase.
Nitrobakterien: Chemolithotrophe Bakterien, die NO_2^- zu NO_3^- oxidieren; wichtiges Enzym der Nitritoxidation: Nitrit-Oxidoreductase.
Nitrifikation: Durch Bakterien katalysierte Oxidation von NH_4^+ zu NO_3^-; unter dem Begriff Nitrifikanten werden gewöhnlich Nitroso- und Nitrobakterien zusammengefasst.
Sulfurikanten: Chemolithotrophe Bakterien, die reduzierte Schwefelverbindungen (H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$) zu SO_4^{2-} oxidieren.
Rusticyanin: Kupferhaltiges Protein aus dem Periplasma eisenoxidierender Bakterien; leitet Eisen(II)-Ionen entzogene Elektronen an die Elektronentransportkette in der Cytoplasmamembran weiter.
Knallgasreaktion: Reaktion von H_2 und O_2 zu Wasser; Redoxreaktion.
Knallgasbakterien: Chemolithotrophe Bakterien, deren Energiestoffwechsel auf der Knallgasreaktion beruht.
Carboxidobakterien: Chemolithotrophe Bakterien, die CO zu CO_2 oxidieren. Wichtiges Enzym der Kohlenmonoxid-Oxidation: Kohlenmonoxid-Dehydrogenase.

9 Biosyntheseleistungen von Mikroorganismen

Regina Nethe-Jaenchen (9.1–9.4), Marcella Eikmanns (9.5)

9.1 Stoffaufnahme und Transport

Für die Verwertung von Stoffen aus der Umgebung besitzen viele Mikroorganismen spezielle **Transportsysteme**. Der Transport eines Substrates erfolgt über **kanalbildende Proteine** oder über **Carrier**. Transportprozesse können **passiv** oder **aktiv** sein. In Mikroorganismen werden viele Zucker über **Gruppentranslokation** in die Zelle transportiert. Für den Export von Proteinen besitzen Mikroorganismen spezielle **Translokasen**. In gramnegativen Bakterien existieren verschiedene **Sekretionssysteme** für den Transport von Proteinen, Protein/DNA-Komplexen oder DNA durch die äußere Membran.

Die Bakterienzelle ist von der Zellhülle und der Cytoplasmamembran umgeben, die für die meisten Moleküle eine Barriere darstellen (S. 530, 🕮 *Biochemie, Zellbiologie*). Nur sehr kleine hydrophile Verbindungen wie Wasser, Ethanol oder Harnstoff und einige Gase (Sauerstoff, Wasserstoff, Kohlendioxid) können biologische Membranen durch passive Diffusion überwinden. Für die Aufnahme benötigter Stoffwechselsubstrate und die Ausschleusung von Endprodukten besitzen die Zellen daher spezielle **Transportsysteme**. Bei den membranständigen **Transportproteinen** unterscheidet man kanalbildende Proteine (Kanalproteine) und Carrier, die auch als Permeasen bezeichnet werden.

Kanalbildende Proteine lassen durch die Ausbildung einer wassergefüllten Pore bestimmte Substanzen entsprechend ihrem **Konzentrationsgradienten** passieren, d. h. der Transport mithilfe von kanalbildenden Proteinen ist immer passiv (s. u.). Anhand ihres Steuerungsmechanismus werden kanalbildende Proteine in drei Klassen unterteilt: über den Druck gesteuerte mechanische Kanäle, über das Membranpotential gesteuerte spannungsabhängige Kanäle und ligandengesteuerte Kanäle, die durch die Bindung eines spezifischen Signalmoleküls kontrolliert werden (🕮 *Biochemie, Zellbiologie*).

Porine (🕮 *Biochemie, Zellbiologie*) sind kanalbildende Proteine in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. Sie bestehen aus Aminosäureketten, die eine charakteristische **β-Fass-Struktur** ausbilden (**β-barrel**, Abb. 9.**1a**). In der Membran lagern die Porine sich zu **Trimeren** zusammen (Abb. 9.**1b**) und bilden schmale, **wassergefüllte Kanäle**, die den Austausch von kleineren hydrophilen Molekülen zwischen dem Periplasma (S. 537) und der Umgebung der Bakterienzelle ermöglichen. Bestimmte Porine zeigen eine Spannungsabhängigkeit, wenn sie in künstliche Membranen eingebaut werden. Allerdings ist fraglich, ob diese Eigenschaft physiologisch von Bedeutung ist. **Unspezifische** Porine werden konstitutiv gebildet und lassen alle hydrophilen Moleküle bis zu einer Masse

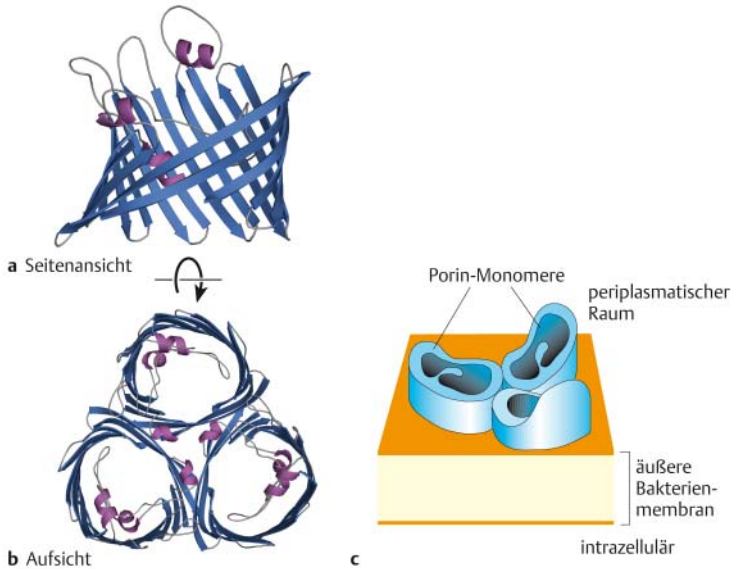


Abb. 9.**1** **Struktur eines Porins aus *Rhodobacter capsulatus*. a** Das Protein bildet eine β-Barrel-Struktur aus 16 antiparallelen Aminosäureketten in β-Faltblatt-Struktur aus. **b** Charakteristisch für die unselektiven Porine ist eine lange, in die Pore hinein ragende Schlaufe, die die Porenöffnung verengt. (pdb: 2por) **c** In der Membran lagern sich die Porine zu Trimeren zusammen.

von ca. 600 Da passieren. Bei Bedarf synthetisieren einige Bakterien **spezifische** Porine, über die nur bestimmte Verbindungen wie verwertbare Kohlenhydrate oder Nucleoside aus der Umgebung der Zellen aufgenommen werden. Beispielsweise wird Maltodextrin, ein Abbauprodukt von Stärke, in *Escherichia coli* über das Maltoporin ins Periplasma aufgenommen. Dieses Porin ist gleichzeitig der Rezeptor für den Bakteriophagen λ und wird deshalb auch als LamB bezeichnet. Bei Phosphatmangel induziert *E. coli* das Phosphat-spezifische Porin PhoE (S. 492).

Aquaporine sind spezielle Wasser transportierende Kanäle in prokaryotischen und eukaryotischen Membranen.

Carrier (**Permeasen**) binden ihr Substrat stöchiometrisch und transportieren es mithilfe von **Konformationsänderungen** durch die Membran (📖*Biochemie, Zellbiologie*), der Transport kann passiv oder aktiv sein (s. u.). Abhängig von der Anzahl der transportierten Substrate und der Richtung des Transportes unterscheidet man drei verschiedene Carriertypen (Abb. 9.**2**): **Uniporter** transportieren ein einziges Substrat durch eine Membran, z. B. wird Glucose in *Zymomonas mobilis*, in dessen Lebensraum die Glucosekonzentration sehr hoch ist, durch die Glucose-Permease in die Zelle transportiert. Weil die aufgenommene Glucose im

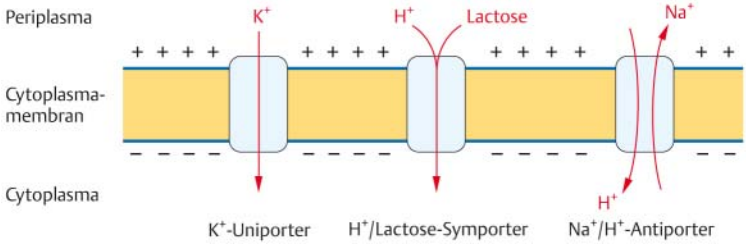


Abb. 9.**2** **Die Funktion verschiedener Transportsysteme in Mikroorganismen:** Uniporter, Symporter und Antiporter.

Energiestoffwechsel umgehend zu Ethanol reduziert wird, bleibt das Konzentrationsgefälle zwischen Umgebung und Zellinnerem erhalten und ermöglicht die erleichterte Diffusion (s. u.) der Glucose. **Co-Transporter** transportieren gleichzeitig oder nacheinander zwei verschiedene Substrate, man unterscheidet Symporter und Antiporter. **Symporter** transportieren Substrat und Co-Substrat in die gleiche Richtung, meist wird der Transport eines Substrats mit dem von Protonen gekoppelt. Beispiele sind Phosphat- und Sulfat-Symporter sowie die Lactose-Permease in *E. coli*, die ihr jeweiliges Hauptsubstrat zusammen mit einem Proton transportieren. **Antiporter** transportieren ein Substrat nach innen und das andere nach außen, z. B. besitzen viele Bakterien Na^+/H^+-Antiporter, über die Natriumionen im Austausch gegen Protonen aus der Zelle ausgeschleust werden.

Als **Ionophore** wirken einige Polypeptidantibiotika, die von bestimmten Bakterien zur Abwehr eukaryotischer und prokaryotischer Zellen synthetisiert werden und über zwei unterschiedliche Mechanismen selektiv Ionen durch die Cytoplasmamembran transportieren. Dadurch kommt es zum Zusammenbruch des Membranpotentials und letztlich zum Zelltod. Das lineare **Gramicidin A** aus *Bacillus brevis* bildet durch die Zusammenlagerung von zwei Gramicidin-A-Molekülen einen Kanal in der Membran, durch den K^+-Ionen in Richtung des elektrochemischen Konzentrationsgradienten fließen (Abb. 9.**3a**). Ringförmige Polypeptidantibiotika wie **Valinomycin** aus *Streptomyces fulvissimus* fungieren dagegen als mobile Ionen-Carrier, indem sie Kationen komplexieren und durch die Membran transportieren (Abb. 9.**3b**).

Die verschiedenen Ionophore transportieren jeweils bestimmte ein- und zweiwertige Kationen und werden in der Forschung eingesetzt, um Membranen für bestimmte Ionen durchlässig zu machen. Der therapeutische Einsatz ist wegen der auch für eukaryotische Membranen toxischen Wirkung auf lokale Anwendungen beschränkt.

Erfolgt der Transport einer Substanz **in Richtung** ihres Konzentrationsgradienten, bezeichnet man diesen Vorgang als **passiven Transport** oder **erleich-**

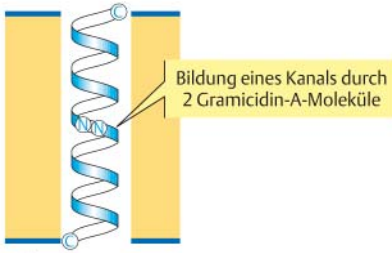


Abb. 9.3 **Ionophore. a** Im Valinomycin-K^+-Komplex ist ein K^+-Ion im Inneren des Valinomycin-Moleküls mit den sechs Carbonyl-Sauerstoffatomen koordiniert, sodass die Hydrathülle des K^+-Ions durch Valinomycin ersetzt wird. Die Seitenketten (R) der einzelnen Valinomycin-Bausteine sind nach außen orientiert und verleihen dem Komplex eine hydrophobe Oberfläche, die den Transport durch die Lipiddoppelschicht der Membran begünstigt. **b** Schematische Darstellung der Assoziation zweier Gramicidin-A-Moleküle über ihre N-Termini innerhalb der Membran, wodurch ein die gesamte Membran durchspannender Kanal gebildet wird.

9

terte Diffusion. Der Transport eines Substrates **entgegen** seinem Konzentrationsgradienten ist ein **aktiver Transport** und erfordert die **Zufuhr von Energie** (📖*Biochemie, Zellbiologie*); dabei wird das Substrat chemisch nicht verändert. In Abhängigkeit von der verwendeten Energiequelle wird zwischen primär aktivem und sekundär aktivem Transport differenziert. **Primäre Transporter** nutzen Lichtenergie oder chemische Energie direkt für den Transport. Beispiele sind **Bakteriorhodopsin**, eine lichtgetriebene Protonenpumpe in der Purpurmembran von *Halobacterium salinarum* (S. 347), und die an die Hydrolyse von ATP gekoppelten **ABC-Transporter** (ATP-binding-cassette-Transporter, 📖*Biochemie, Zellbiologie*) für verschiedene Zucker, Aminosäuren, Peptide und anorganische Ionen in vielen Bakterien. Dabei bindet ein extrazelluläres Bindeprotein spezifisch an das Substrat und ändert dadurch seine Konformation. Erst diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung des Bindeprotein-Substrat-Komplexes an das membranständige Transportprotein. Das Substrat wird vom Transportprotein übernommen und anschließend unter ATP-Verbrauch durch die Membran transportiert. Auch die **membranständigen Decarboxylasen**, die an der Fermentation von Citrat durch *Enterobacter* und *Klebsiella* (S. 386) oder von Oxalacetat durch *Propionigenium modestum* beteiligt sind, können als primär aktive Transporter aufgefasst werden. Diese Decarboxylasen katalysieren die Biotin-abhängige Decarboxylierung einer Dicarbonsäure zu einer Monocarbonsäure und koppeln diese Reaktion mit dem Export von Na^+ bzw. H^+. Der dabei aufgebaute transmembranale Na^+- bzw. H^+-Gradient wird nachfolgend zur ATP-Synthese genutzt. **Sekundäre Transporter** nutzen als Energiequelle für den

Transport einen von einem primären Transporter generierten elektrochemischen Gradienten wie den durch die Redoxreaktionen der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten. Beispielsweise transportiert die Lactose-Permease in *E. coli* Lactose im Symport mit Protonen ins Cytoplasma.

Bei der **Gruppentranslokation**, einem speziellen aktiven Transportmechanismus in Mikroorganismen, wird die Substanz, die in die Zelle aufgenommen werden soll, während des Transports chemisch modifiziert (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Die Modifizierung bewirkt, dass die außen aufgenommene und die innen abgegebene Substanz nicht identisch sind, sodass die äußere Konzentration der zu transportierenden Substanz gegenüber der inneren hoch bleibt. Auf diese Weise wird der Transport vieler Zucker in die Bakterienzelle ermöglicht. Beim **Phosphotransferase-System** (**PTS**, S. 484, Abb. 10.**17**) besteht die chemische Modifizierung in der Übertragung einer Phosphorylgruppe von PEP in mehreren Schritten über eine Kette von Enzymen auf den zu transportierenden Zucker, z. B. Glucose. Die Gesamtreaktion lautet:

$$\text{PEP + Zucker}_{\text{(außerhalb der Zelle)}} \Leftrightarrow \text{Pyruvat + Zucker-}\mathbf{P}_{\text{(innerhalb der Zelle)}}$$

Welchen Vorteil bietet die Verwendung von PEP als Phosphorylgruppen-Donor? Die Aufnahme von Glucose über das PTS liefert mit Glucose-6-phosphat direkt ein frühes Intermediat der Glykolyse, sodass keine weitere Energie in Form von ATP für die Aktivierung der Glucose in der Eingangsreaktion der Glykolyse benötigt wird. Da im Verlauf der Glykolyse durch Umsetzung von PEP ein ATP synthetisiert wird, entspricht die Phosphorylierung der Glucose durch PEP beim PTS einem Energieverbrauch von einem ATP-Äquivalent, das jedoch durch die direkte Einschleusung des gebildeten Glucose-6-phosphats in die Glykolyse wieder eingespart wird. Insgesamt arbeitet das PTS daher energieneutral. Im Unterschied dazu müssen für einen Zucker, der nicht über das PTS in die Zelle aufgenommen wird, z. B. Lactose, mindestens ein Proton für den Transport und ein ATP für die Aktivierungsphosphorylierung aufgewendet werden.

Neben Transportsystemen für Ionen und Stoffwechselsubstrate besitzen Bakterien auch **Translokasen** für **Proteine** und **DNA**. Da die Proteinbiosynthese an den Ribosomen im Cytoplasma stattfindet, müssen sämtliche Proteine mit Funktionen außerhalb der Cytoplasmamembran exportiert werden. Dazu gehören Exoenzyme, Exotoxine und andere Virulenzproteine von Pathogenen sowie bei Gramnegativen auch alle periplasmatischen und für die äußere Membran benötigten Proteine. Funktionsfähige Proteine besitzen eine charakteristische räumliche Struktur, sie sind gefaltet. Für den Transport über eine Membran ist diese Faltung meist hinderlich, daher werden viele **Proteine** in **entfaltetem** Zustand über das **Sec-Translokationssystem** (secretion) exportiert (Abb. 6.**13**, S. 213). Das Sec-System besteht aus mehreren Proteinkomponenten: Einem aus mindestens drei Proteinen (SecYEG) zusammengesetzten Membrankomplex, einem mit diesem Komplex assoziierten peripheren Protein SecA mit ATPase-Aktivität und einem löslichen **Chaperon** SecB, das an das ungefaltete Substratprotein bindet

und es so stabilisiert. Mithilfe einer Signalsequenz am N-Terminus des Substratproteins wird der Komplex aus SecB und Substratprotein anschließend zum Transportsystem dirigiert und interagiert dort mit SecA. SecA übernimmt das Substratprotein, integriert sich unter ATP-Verbrauch in die Membran und übergibt das Substratprotein an den Membrankomplex SecYEG, der eine Transportpore ausbildet. Durch diese Pore wird das Protein nach außen transportiert, die benötigte Energie liefert das elektrochemische Membranpotential (S. 316). Auf der Außenseite der Cytoplasmamembran spaltet eine Signalpeptidase die Signalsequenz des Proteins ab, das sich anschließend spontan in seine native Form faltet.

Das **Tat-Translokationssystem** (twin arginine transporter) transportiert im Unterschied zum Sec-System bereits **gefaltete Proteine**, die eine N-terminale Signalsequenz mit zwei Argininresten tragen. Das Tat-System besteht aus den Komponenten TatABC. Nach Erkennen des charakteristischen Signalpeptids durch TatC wird das Substratprotein von TatB und TatC gebunden. Dieser Komplex assoziiert mit TatA und bildet eine Transportpore aus, durch die das Substratprotein durch die Cytoplasmamembran transportiert wird. Auf der Außenseite wird das Signalpeptid von der Signalpeptidase des Sec-Systems entfernt. Auch dieser Transportprozess ist abhängig vom Membranpotential.

Gramnegative Bakterien benötigen zusätzlich **Sekretionssysteme**, um Proteine durch die äußere Membran zu transportieren. Man unterscheidet **Sec-abhängige Sekretionssysteme** (Typ II und V), die für den Transport durch die Cytoplasmamembran das Sec-Translokationssystem nutzen, und **Sec-unabhängige Sekretionssysteme** (Typ I, III, IV).

Bei **Typ II-Sekretionssystemen** erfolgt der Transport durch die äußere Membran über einen spezifischen Proteinkomplex, ein Beispiel ist das Exoenzym Pullulanase von *Klebsiella oxytoga*, mit dessen Hilfe die Bakterien das von Pilzen synthetisierte Polysaccharid Pullulan spalten. **Typ V-Sekretionssysteme** sind Autotransporter; sie enthalten eine Proteaseaktivität, die den Transport des Proteins durch die äußere Membran autokatalytisch steuert. Auf diese Weise wird z. B. die IgA-Protease von *Neisseria* exportiert.

Sec-unabhängige Sekretionssysteme sind Proteinkomplexe, die den gesamten Transportprozess durch Cytoplasmamembran und äußere Membran vermitteln. Komponenten in der Cytoplasmamembran und in der äußeren Membran sind dabei über Proteine verbunden, die das Periplasma durchspannen, sodass eine durchgehende Pore entsteht. Bei **Typ I-Sekretionssystemen**, über die Toxine, z. B. die Hämolysine von *Serratia* und bestimmten pathogenen *E. coli*-Stämmen, exportiert werden, wird das Substratprotein von einem ABC-Transporter in einem Schritt durch Cytoplasmamembran und äußere Membran transportiert. **Typ III-Sekretionssysteme** sind insbesondere bei pathogenen Bakterien von Bedeutung: Cytotoxische Enzyme werden durch eine Pore, die Cytoplasmamembran, Periplasma und äußere Membran durchspannt, auf die Außenseite der äußeren Membran transportiert und über eine sich anschließende Pilus-artige

Struktur unter ATP-Verbrauch direkt in die Wirtszelle injiziert. Für die Öffnung der Pore in der äußeren Membran ist der Kontakt zur Wirtszellmembran erforderlich. Auch bei der Synthese bakterieller Flagellen ist ein Typ III-Sekretionssystem beteiligt, es transportiert das Flagellenprotein Flagellin an die Spitze der neu entstehenden Flagelle (S. 46). **Typ IV-Sekretionssysteme** haben vielfältige Funktionen und transportieren neben Proteinen auch DNA/Protein-Komplexe und DNA. Über Typ IV-Sekretionssysteme werden Effektorproteine in eukaryotische Zellen transportiert, z. B. von symbiontischen Rhizobien in Leguminosenwurzeln oder von intrazellulären Humanparasiten wie Rickettsien oder Legionellen. Der Transfer eines ssDNA/Protein-Komplexes über ein Typ IV-Sekretionssystem durch *Agrobacterium tumefaciens* induziert Wurzelhalsgallen bei Pflanzen. Auch der DNA-Transfer von der Donor- in die Rezipientenzelle während der Konjugation von Bakterien erfolgt als DNA/Protein-Komplex über ein Typ IV-Sekretionssystem. Bei *Neisseria gonorrhoeae* wird DNA über ein Typ IV-Sekretionssystem gezielt aus der Zelle freigesetzt, umgekehrt wird bei den humanpathogenen Bakterien *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni* freie DNA aus der Umgebung (Transformation) über Typ IV-Systeme importiert, auch über Typ II-Sekretionssysteme nehmen viele Bakterien freie DNA auf.

▶ Wegen ihrer großen Flexibilität werden **Typ IV-Sekretionssysteme** einerseits technisch genutzt, z. B. um gezielt bestimmte Gene über *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen einzuschleusen, andererseits stellen sie häufig einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor dar, sodass die Entwicklung spezifischer Inhibitoren medizinisch von Interesse ist. ◀

Transportproteine: Membranständige Proteine, die als Transportsysteme fungieren. Zwei Klassen: Kanalbildende Proteine und Carrier.
Kanalbildende Proteine: Bilden wassergefüllte Pore, durch die bestimmte Substanzen ihrem elektrochemischen Gradienten folgend passieren können, Transport ist passiv.
Porine: Kanalbildende Transportproteine in der äußeren Membran gramnegativer Bacteria, Porine können unspezifisch oder Substrat-spezifisch sein.
Carrier (Permeasen): Binden ein Substrat stöchiometrisch und transportieren es mittels Konformationsänderungen über die Membran, Transport kann aktiv oder passiv sein.
- **Uniporter:** Transportieren ein einzelnes Substrat.
- **Antiporter:** Transportieren gleichzeitig zwei Substrate in entgegengesetzter Richtung.
- **Symporter:** Transportieren gleichzeitig zwei Substrate in die gleiche Richtung.

Passiver Transport: Erleichterte Diffusion, Transport einer Substanz in Richtung ihres elektrochemischen Gradienten.
Aktiver Transport: Transport eines Substrates entgegen seinem Konzentrationsgradienten, erfordert Energiezufuhr.
Primär aktiver Transport: Energie wird direkt für Transport genutzt, Energiequelle ist Licht oder chemische Energie.

Sekundär aktiver Transport: Energiequelle für den Transport ist ein von einem primären Transporter erzeugter elektrochemischer Gradient.
Gruppentranslokation: Transport einer Substanz in chemisch modifizierter Form (Beispiel PTS).
Phosphotransferase-System (PTS): Transportsystem über Gruppentranslokation für verschiedene Zucker in vielen Bakterien, schrittweise Übertragung einer Phosphorylgruppe über mehrere Transportkomponenten auf den Zucker.
Translokasen: Transportieren Proteine abhängig vom Membranpotential über die Cytoplasmamembran, Substratproteine besitzen charakteristische Signalsequenzen, Sec-System und Tat-System.
Sec-Translokationssystem: Translokationssystem für ungefaltete Proteine, Komponenten sind ein lösliches Chaperon, ein Membrankomplex und ein peripheres Protein, ATP-abhängig.
Tat-Translokationssystem: Translokationssystem für gefaltete Proteine, Komponenten sind drei Proteine, die eine Transportpore ausbilden, Signalsequenz der Substratproteine enthält zwei Arginin.
Sekretionssysteme: Transportsysteme für Proteine über die äußere Membran bei Gramnegativen, Typ II und V sind Sec-abhängig, Typ I, III und IV sind Sec-unabhängig; Typ II und IV transportieren auch DNA oder DNA/Protein-Komplexe.

9.2 Das Netzwerk des Stoffwechsels

Der Stoffwechsel jeder Zelle besteht aus Energie liefernden und Energie konsumierenden Prozessen. Sämtliche Biosynthesen finden im Baustoffwechsel (**Anabolismus**) statt, die benötigte Energie liefert der **Energiestoffwechsel**. Unterschiedliche Kohlenstoffquellen werden über Intermediate des Zentralstoffwechsels (in der Regel Glykolyse und Citratzyklus) eingeschleust. Diese Intermediate sind gleichzeitig Ausgangssubstrate für Biosynthesen und stellen daher Verknüpfungspunkte zwischen Energie- und Baustoffwechsel dar. Um den Citratzyklus mit Zwischenprodukten aufzufüllen, die für Biosynthesen entnommen wurden, besitzen alle Organismen **anaplerotische Reaktionen**. **Autotrophe** Mikroorganismen gewinnen den benötigten Kohlenstoff überwiegend aus CO_2 und haben dazu verschiedene Wege der **CO_2-Fixierung** entwickelt.

Die Stoffwechselprozesse in einem Mikroorganismus lassen sich, wie bei allen Organismen, zwei Bereichen mit gegensätzlichen Funktionen zuordnen: Im **Energiestoffwechsel** wird Energie aus Sonnenlicht oder der Oxidation verschiedener energiereicher Substrate konserviert (S. 304) und den Energie verbrauchenden Prozessen des **Leistungsstoffwechsels** zur Verfügung gestellt. Neben **Bewegung** und **Transport** ist das vor allem der **Baustoffwechsel** (**Anabolismus**), der die Aufgabe hat, alle notwendigen Zellbausteine zu synthetisieren. Dabei

werden zunächst **Monomere** (Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren, Nucleotide) synthetisiert (S. 414), aus denen dann in weiteren Syntheseschritten **Polymere** gebildet werden (S. 427).

Zwischenprodukte von Glykolyse, Pentosephosphatweg und Citratzyklus, die gleichzeitig Ausgangssubstrate für die verschiedenen Biosynthesen sind (Abb. 9.**4**), stellen Verknüpfungspunkte zwischen Energiestoffwechsel und Baustoffwechsel dar. Von Glucose-6-phosphat ausgehend werden Hexosephosphate und Pentosephosphate gebildet, die für die Biosynthesen von Polysacchariden bzw. Nucleotiden und Nucleinsäuren benötigt werden. Von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) aus startet die Synthese der Glycerolipide (S. 431). Die Kohlenstoffskelette der Aminosäuren liefern 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat (PEP), Pyruvat, Oxalacetat, α-Ketoglutarat, Ribose-5-phosphat und Erythrose-4-phosphat (S. 417, Abb. 9.**14**). PEP fungiert außerdem als Energielieferant des Phosphotransferase-Systems (PTS, S. 399). Acetyl-CoA ist das Startermolekül für die Fettsäuresynthese, in α-Proteobakterien werden Porphyrine von Succinyl-CoA ausgehend synthetisiert. Umgekehrt werden organische Verbindungen, die als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden, zu Intermediaten von Glykolyse und Citratzyklus abgebaut und so in den Zentralstoffwechsel eingeschleust (Abb. 9.**5**).

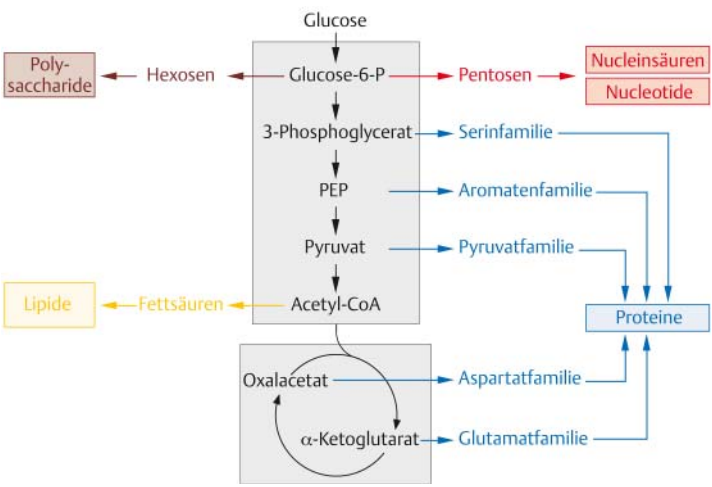


Abb. 9.**4** **Glykolyse und Citratzyklus.** Glykolyse und Citratzyklus liefern die meisten Startermoleküle für die Synthese der Zellbausteine. Bei der Synthese der aromatischen Aminosäuren wird neben Phosphoenolpyruvat (PEP) noch Erythrose-4-phosphat aus dem Pentosephosphatweg benötigt.

9.2.1 Anaplerotische Reaktionen

Durch die ständige Entnahme von Intermediaten des Citratzyklus für Biosynthesen steht Oxalacetat nicht mehr in ausreichender Menge als Akzeptormolekül für Acetyl-CoA zur Verfügung. Um den Zusammenbruch des Energiestoffwechsels zu vermeiden, existieren daher in allen Organismen verschiedene **anaplerotische Reaktionen** (anaplerotisch = auffüllend) zur Regeneration von Oxalacetat. Substrate bzw. Produkte anaplerotischer Enzyme sind in der Regel Pyruvat, PEP und Oxalacetat, daher wird das Dreieck PEP-Pyruvat-Oxalacetat auch als **anaplerotischer Knotenpunkt** bezeichnet.

Bei Wachstum auf Glucose oder anderen Zuckern wird Oxalacetat durch Carboxylierung der C_3-Verbindungen Pyruvat oder PEP gebildet.

Die **Pyruvat-Carboxylase** wurde in Bakterien und Hefen, aber auch in höheren Organismen wie Pilzen, Pflanzen, Invertebraten und Vertebraten nachgewiesen. Das Enzym enthält Biotin als prosthetische Gruppe und katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat:

$$\text{Pyruvat} + HCO_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Pyruvat-Carboxylase}} \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + P_i$$

E. coli besitzt anstelle der Pyruvat-Carboxylase die **PEP-Carboxylase**:

$$\text{PEP} + HCO_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP-Carboxylase}} \text{Oxalacetat} + P_i$$

Einige Bakterien, z. B. *Corynebacterium glutamicum*, besitzen beide Enzyme.

Glucose wird normalerweise über die Glykolyse zu Pyruvat oxidiert; um NADPH und Pentosephosphate für Biosynthesen zu regenerieren, kann Glucose alternativ auch über den Pentosephosphatweg (S. 415) abgebaut werden (Abb. 9.**5**).

Bei aerobem Wachstum auf C_3-Verbindungen wie Pyruvat oder Lactat, das zu Pyruvat oxidiert wird, werden weitere Enzyme benötigt, um PEP und Zuckerphosphate zu synthetisieren. In Bakterien, die eine Pyruvat-Carboxylase besitzen, wird Oxalacetat wie oben beschrieben durch Carboxylierung von Pyruvat gebildet. Aus Oxalacetat wird anschließend unter ATP-Verbrauch PEP synthetisiert, katalysierendes Enzym ist die **PEP-Carboxykinase**, ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese (S. 415):

$$\text{Oxalacetat} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{PEP-Carboxykinase}} \text{PEP} + HCO_3^- + \text{ADP}$$

Von PEP ausgehend werden über die Gluconeogenese Hexosephosphate für Biosynthesen gebildet.

Die PEP-Carboxykinase-Reaktion ist reversibel. Bei einigen strikt anaeroben Bakterien und Würmern, die in einem Milieu mit hoher Kohlendioxidkonzentration leben, katalysiert das Enzym umgekehrt die Synthese von Oxalacetat aus PEP und HCO_3^-, als Coenzym fungiert entweder ADP oder GDP.

In Bakterien, die keine Pyruvat-Carboxylase besitzen, ist bei Wachstum auf Pyruvat oder Lactat die Synthese von PEP aus Pyruvat erforderlich. Diese ATP-abhängige Reaktion wird bei *E. coli* von der **Pyruvat-Wasser-Dikinase** (auch **PEP-**

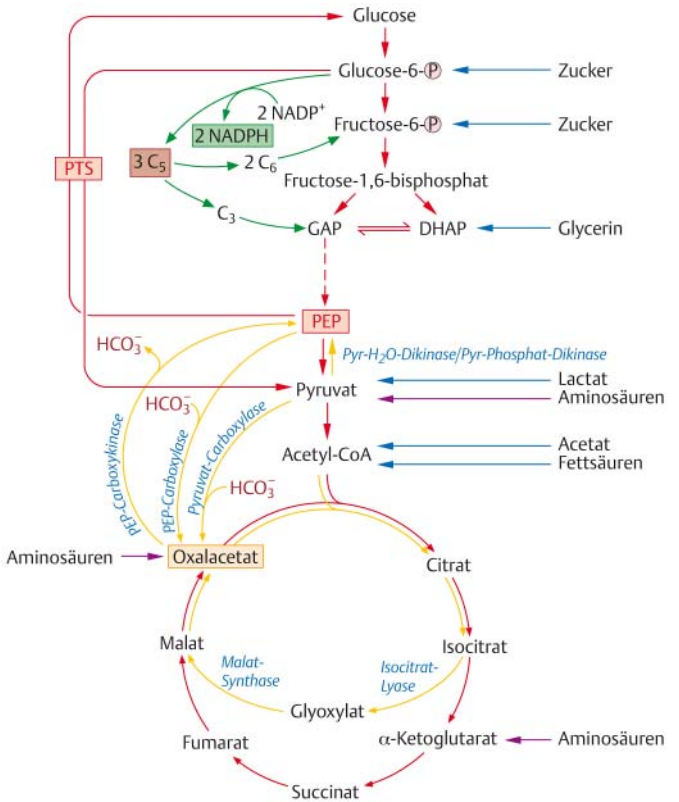


Abb. 9.5 **Anaplerotische Reaktionen** (Übersicht). Verschiedene Organismen besitzen jeweils unterschiedliche anaplerotische Enzyme und Reaktionswege (gelb), um Oxalacetat für den Citratzyklus zu regenerieren.

Synthetase) katalysiert. Dabei werden zwei Phosphorylgruppen von ATP auf zwei verschiedene Substrate übertragen: die γ-Phosphorylgruppe auf Wasser und die β-Phosphorylgruppe auf Pyruvat:

$$\text{Pyruvat} + H_2O + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Pyruvat-Wasser-Dikinase}} \text{PEP} + \text{AMP} + P_i$$

Alternativ katalysiert in zahlreichen Bakterien, z. B. *Chloroflexus aurantiacus*, die **Pyruvat-Phosphat-Dikinase** eine sehr ähnliche Reaktion, bei der die γ-Phosphorylgruppe jedoch nicht auf Wasser, sondern unter Bildung von Pyrophosphat auf Orthophosphat übertragen wird:

$$\text{Pyruvat} + P_i + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Pyruvat-Phosphat-Dikinase}} \text{PEP} + \text{AMP} + PP_i$$

Das gebildete Pyrophosphat wird sofort hydrolysiert, wodurch die reversible Reaktion in Richtung der PEP-Synthese verlagert und praktisch irreversibel wird.

$$PP_i \xrightleftharpoons{\text{Pyrophosphatase}} 2\ P_i$$

Anschließend wird aus PEP durch die PEP-Carboxylase Oxalacetat synthetisiert (s. o.).

Pyruvat-Phosphat-Dikinase und PEP-Carboxylase sind auch an der CO_2-Fixierung im Verlauf der Photosynthese tropischer C_4-Pflanzen beteiligt (*Botanik*).

Bei Wachstum auf Acetat oder anderen organischen Substraten, die über Zwischenprodukte des Citratzyklus in den Stoffwechsel eingeschleust werden, z. B. Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren oder Poly-β-Hydroxybuttersäure (S. 433) als einziger Kohlenstoffquelle sind für die Bildung von Zuckerphosphaten zusätzliche Enzyme erforderlich. Die Aktivierung von Acetat findet in Bakterien auf zwei unterschiedlichen Wegen statt: In *Corynebacterium glutamicum* wird Acetat durch **Acetatkinase** und **Transacetylase** über Acetylphosphat zu Acetyl-CoA umgesetzt, in *E. coli* direkt durch die **Acetyl-CoA-Synthetase**.

$$\text{Acetat} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Acetatkinase}} \text{Acetylphosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Acetylphosphat} + \text{CoA} \xrightleftharpoons{\text{Transacelytase}} \text{Acetyl-CoA} + P_i$$

$$\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightleftharpoons{\text{Acetyl-CoA-Synthetase}} \text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + P_i$$

In *E. coli* katalysieren Acetatkinase und Transacetylase umgekehrt die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA, wenn überschüssiges Acetyl-CoA nicht veratmet werden kann.

Aus zwei Acetyl-CoA synthetisieren viele Bakterien, aber auch Pflanzen und Pilze über den **Glyoxylatzyklus** (*Biochemie, Zellbiologie* und *Botanik*) eine C_4-Einheit (Succinat bzw. Malat). Bis zum Isocitrat ist der Glyoxylatzyklus identisch mit dem Citratzyklus (Abb. 9.**5**). Durch zwei zusätzliche Enzyme werden jedoch die Decarboxylierungsreaktionen umgangen: Isocitrat wird durch die **Isocitrat-Lyase** in Succinat und Glyoxylat gespalten. Das entstandene Succinat durchläuft anschließend die weiteren Reaktionen des Citratzyklus, aus Glyoxylat und einem weiteren Molekül Acetyl-CoA synthetisiert die **Malat-Synthase** Malat, das dann wie im Citratzyklus zu Oxalacetat oxidiert wird. Das gebildete Oxalacetat wird durch die PEP-Carboxykinase zu PEP decarboxyliert, aus dem nachfolgend über die Gluconeogenese (S. 415) Hexosephosphate für Biosynthesen gebildet werden. Alternativ kann in vielen Bakterien Malat durch das **Malat-Enzym** zu Pyruvat decarboxyliert werden, als Coenzym fungiert $NAD(P)^+$:

$$\text{L-Malat} + NAD(P)^+ \xrightleftharpoons{\text{Malat-Enzym}} \text{Pyruvat} + NAD(P)H + CO_2$$

Die industrielle **Produktion essentieller L-Aminosäuren** als Lebensmittel- und Tierfutterzusätze erfolgt nahezu ausschließlich mithilfe von Bakterien und Enzymen. Detaillierte Kenntnisse der Stoffwechselwege in den jeweiligen **Produktionsstämmen** und die Analyse der Stoffflüsse mithilfe von ^{13}C-markierten Substraten ermöglichen durch **Metabolic Engineering** die gezielte Beeinflussung des Kohlenstoffflusses mithilfe gentechnischer Methoden. *Corynebacterium glutamicum*, ein grampositives Stäbchen aus der Gruppe der Actinomyceten, wird u. a. zur industriellen Produktion von Lysin eingesetzt, das sich ebenso wie Isoleucin, Threonin und Methionin von Oxalacetat ableitet (Abb. 9.**6**). Für eine möglichst hohe Lysinausbeute wird an verschiedenen Punkten in den Stoffwechsel eingegriffen: Ein Angriffspunkt ist das erste Enzym der Lysinbiosynthese, die **Aspartat-Kinase**, die allosterisch reguliert wird. Durch gezielte Mutationen wurde das allosterische Zentrum so verändert, dass der Inhibitor nicht mehr binden kann

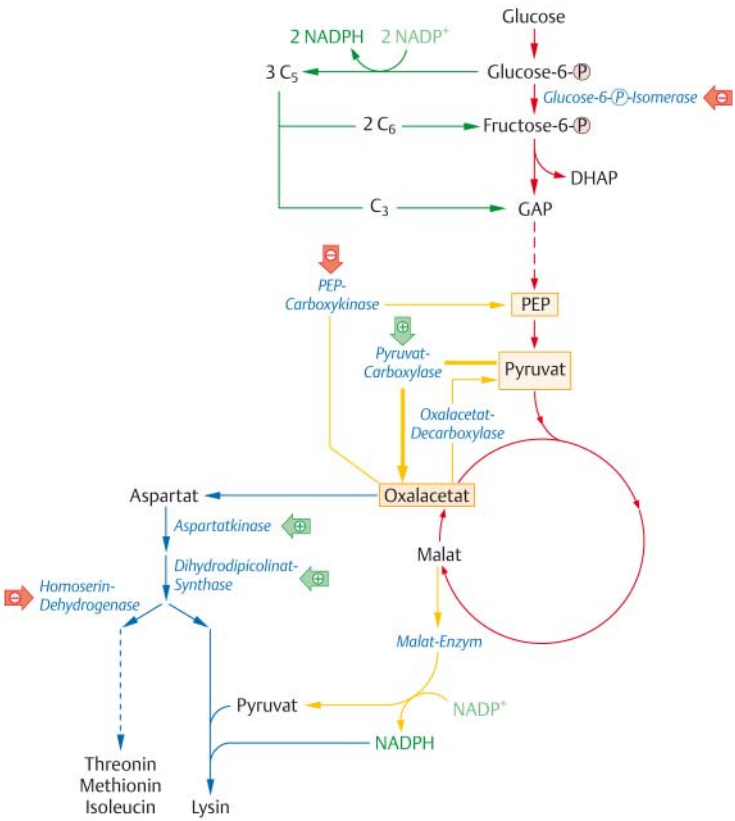


Abb. 9.**6** **Lysinbiosynthese.** Gezielte gentechnische Veränderungen beteiligter Enzyme oder Transporter führen zu einer höheren Ausbeute.

und so die Lysinsynthese dereguliert wird. Das zweite Ziel ist die konkurrierende Biosynthese von Isoleucin, Threonin und Methionin. Die Erhöhung der spezifischen Aktivität der Dihydrodipicolinat-Synthase gegenüber der Homoserin-Dehydrogenase durch gezielte Mutation steigerte den Kohlenstoffffluss in die Lysinbiosynthese. Eine entscheidende Voraussetzung für die Lysinproduktion ist die Verfügbarkeit von Oxalacetat, Pyruvat und NADPH, die durch den Zentralstoffwechsel bereitgestellt werden. *C. glutamicum* besitzt neben PEP-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase und PEP-Carboxykinase (s. o.) zwei weitere anaplerotische Enzyme: Die **Oxalacetat-Decarboxylase** katalysiert die Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat und das **Malat-Enzym** die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. Durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens wurde die Oxalacetatbildung gesteigert, durch Ausschaltung der PEP-Carboxykinase die unerwünschte Decarboxylierung von Oxalacetat zu PEP verhindert. Insgesamt resultiert daraus eine gesteigerte Lysinsynthese. NADPH wird größtenteils im Pentosephosphatweg erzeugt, durch Ausschalten der Glucose-6-phosphat-Isomerase (Phosphogluco-Isomerase) der Glykolyse wird der Abbau von Glucose in den Pentosephosphatweg geleitet und so für die nötige NADPH-Bildung gesorgt. Für die Ausscheidung des gebildeten Lysins ist ein spezifisches Exporter-Protein zuständig, das durch die intrazelluläre Lysinkonzentration induziert wird. Durch Überexpression des zugehörigen Synthesegens konnte auch die Ausscheidung von Lysin deutlich gesteigert werden.
Insgesamt wurde die Lysinausbeute durch diese Maßnahmen deutlich verbessert, die Entschlüsselung des gesamten Genoms von *C. glutamicum* eröffnet weitere Möglichkeiten für die **Stammoptimierung** durch gezielte gentechnische Eingriffe. ◀

9.2.2 CO_2-Fixierung in Prokaryoten

Autotrophe Bakterien sind in der Lage, **CO_2** als überwiegende Kohlenstoffquelle zu verwenden und sämtliche Kohlenstoffverbindungen daraus zu synthetisieren. Dazu haben sie verschiedene Wege der **CO_2-Fixierung** entwickelt. Ziel ist die Knüpfung einer Bindung zwischen dem Kohlenstoff des CO_2 und einem C-Atom des Akzeptormoleküls, um auf diese Weise CO_2 in die Biosynthesewege einzuschleusen, eine Reaktion, die als Carboxylierung bezeichnet wird. Neben dem Calvin-Zyklus, über den auch phototrophe Eukaryoten (Algen und höhere Pflanzen) CO_2 fixieren, kommen in Prokaryoten mehrere alternative Wege der CO_2-Fixierung vor, der reduktive (auch: reverse = rückläufige) Citratzyklus, der Hydroxypropionatzyklus und der reduktive Acetyl-CoA-Weg. Der exakte Ablauf dieser Wege und die beteiligten Enzyme und Coenzyme sind z. T. noch nicht vollständig bekannt.

Die Fixierung von anorganischem Kohlenstoff in organischen Verbindungen durch autotrophe Organismen ist eine wichtige Voraussetzung für den Kohlenstoffkreislauf, da sie die Kohlenstoffquellen für alle heterotrophen Organismen bereitstellt (S. 513).

Der Calvin-Zyklus

Bereits 1945 untersuchten Melvin Calvin und seine Mitarbeiter, auf welche Weise in der Dunkelreaktion der oxygenen Photosynthese das CO_2 in Zellmaterial umgewandelt wird. Für ihre Versuche verwendeten sie die einzellige Grünalge *Chlorella*, ihre Befunde führten zur Aufklärung einer zyklischen Abfolge von Reaktionsschritten, die nach ihren Entdeckern als **Calvin-Benson-Bassham-Zyklus** (kurz: **Calvin-Zyklus**) bezeichnet wurden (Abb. 9.**7**). Er fungiert als Weg der **CO_2-Fixierung** in allen phototrophen Eukaryoten (📖*Botanik*) und in vielen aeroben und fakultativ anaeroben Bacteria mit autotropher Lebensweise, darunter auch die phototrophen Cyanobakterien.

Im ersten Reaktionsschritt wird zunächst ein Molekül CO_2 an das Akzeptormolekül, den C_5-Körper Ribulose-1,5-bisphosphat, gebunden. Diese Carboxylierungsreaktion wird vom ersten Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, der **Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase** (Rubisco), katalysiert. Der entstehende C_6-Körper bleibt enzymgebunden und wird sofort unter Anlagerung eines Moleküls H_2O in zwei C_3-Körper (3-Phosphoglycerinsäure) gespalten. Diese beiden C_3-Körper werden anschließend über die gleichen Reaktionen wie in der Gluconeogenese (S. 415, 📖*Biochemie, Zellbiologie*) zu einem C_6-Körper (Fructose-6-phosphat) umgesetzt. Um den Reaktionsablauf als Zyklus zu vervollständigen, muss das Akzeptormolekül für CO_2, Ribulose-1,5-bisphosphat, regeneriert werden. Die Synthese eines C_5-Körpers aus C_6- und C_3-Körpern erfordert eine Serie von Umlagerungen, bei denen als Zwischenprodukte C_3-, C_4-, C_5-, C_6- und C_7-Körper entstehen (Abb. 9.**8**). Diese Umlagerungsreaktionen laufen in umgekehrter Reihenfolge im nicht oxidativen Teil des Pentosephosphatweges ab (📖*Biochemie, Zellbiolo-*

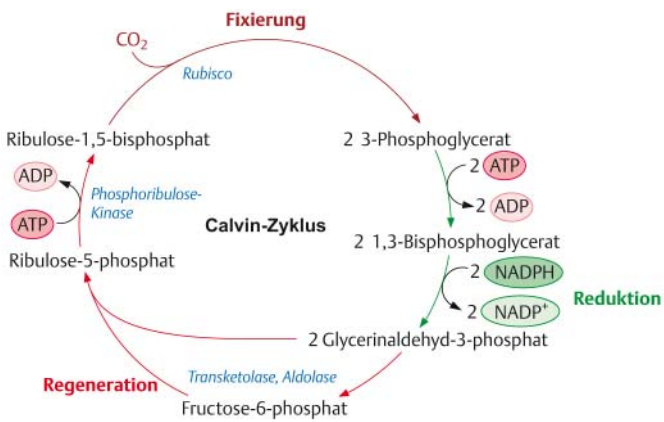


Abb. 9.**7** **CO_2-Fixierung über den Calvin-Zyklus.** Der Ablauf des Calvin-Zyklus gliedert sich in die drei Bereiche Fixierung, Reduktion und Regeneration. Für die Fixierung eines Moleküls CO_2 werden jeweils drei ATP und zwei NADPH benötigt.

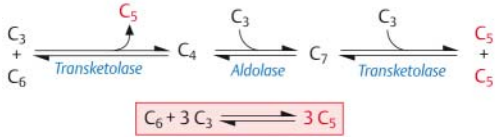


Abb. 9.8 **Die Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat (C_5-Körper)**, dem Akzeptormolekül des Calvin-Zyklus, aus C_6- und C_3-Körpern. Die Umlagerungen von C_2-Einheiten werden von Transketolasen, die Aldolkondensation wie in der Glykolyse von der Aldolase katalysiert.

gie), daher wird dieser Teil des Calvin-Zyklus auch als reduktiver Pentosephosphatweg bezeichnet. Im letzten Schritt des Calvin-Zyklus wird der gebildete C_5-Körper, Ribulose-5-phosphat, zu Ribulose-1,5-bisphosphat phosphoryliert. Diese Reaktion wird vom zweiten Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, der **Phosphoribulose-Kinase**, katalysiert. Da der Zyklus zwei Funktionen erfüllen muss, die Einschleusung von CO_2 in den Baustoffwechsel einerseits und die Regeneration des Akzeptormoleküls andererseits, ist die Fixierung von insgesamt 6 CO_2 notwendig, um einen C_6-Körper (Fructose-6-phosphat) für die Biosynthese bereitzustellen. Alle anderen C-Atome verbleiben zur Regeneration des Akzeptors (Ribulose-1,5-bisphosphat) im Kreislauf. In den Zellen sind sehr große Mengen an Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase vorhanden, die bei Cyanobacteria und einigen anoxygenen photosynthetischen Prokaryoten semikristallin in Form von **Carboxysomen** (S. 53, *Biochemie, Zellbiologie*) vorliegen.

$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NADPH \rightarrow \text{Fructose-6-phosphat} + 18\ ADP + 17\ P_i + 12\ NADP^+$$

Der reduktive Citratzyklus

Die strikt anaeroben Chlorobiaceae (Grüne Schwefelbakterien) fixieren CO_2 über den **reduktiven Citratzyklus** (Abb. 9.**9**). Ausgehend von Oxalacetat werden in einer Reihe von reduktiven Schritten die Zwischenprodukte des Citratzyklus in umgekehrter Richtung bis zum Citrat durchlaufen, daher wird dieser zyklische CO_2-Fixierungsweg auch als reverser (= rückläufiger) Citratzyklus bezeichnet. Dabei finden zwei Carboxylierungsreaktionen statt, bei denen CO_2 eingebaut wird. Das entstandene Citrat wird durch ein spezielles Enzym, die **ATP-Citratlyase**, in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Während Oxalacetat für die nächste Runde des Zyklus zur Verfügung steht, wird Acetyl-CoA zu Pyruvat carboxyliert, wobei ein drittes Molekül CO_2 fixiert wird. Diese Reaktion wird von der Ferredoxin-abhängigen **Pyruvat-Synthase** katalysiert und ähnelt der reduktiven Carboxylierung von Succinyl-CoA zu α-Ketoglutarat, die von der Ferredoxin-abhängigen **α-Ketoglutarat-Synthase** katalysiert wird. Insgesamt werden für die Bildung von Pyruvat aus drei CO_2 zwei ATP verbraucht. Aus Pyruvat entsteht nachfolgend in mehreren Schritten unter Verbrauch von drei weiteren ATP ein

Triosephosphat. Der reduktive Citratzyklus wurde auch in weiteren anaeroben und mikroaerophilen Bacteria und in dem Archeaon *Thermoproteus neutrophilus* nachgewiesen.

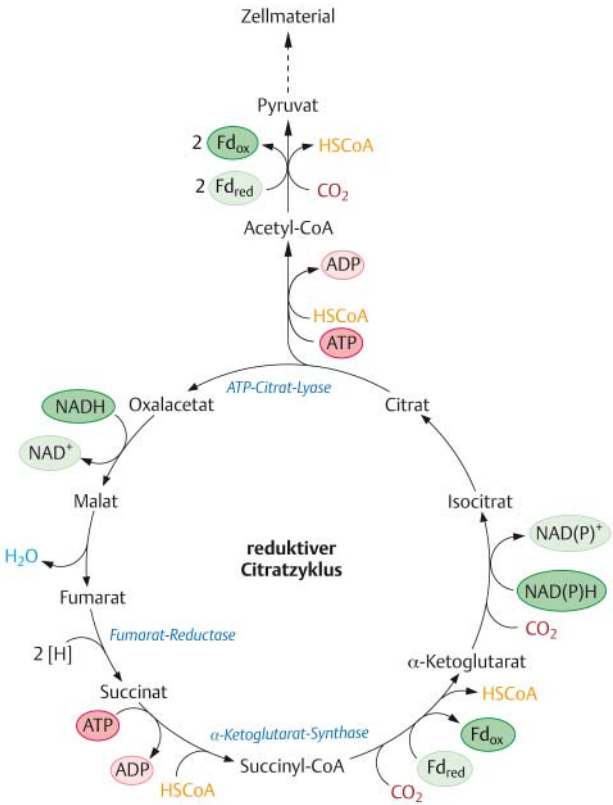


Abb. 9.**9** **Autotrophe CO_2-Fixierung über den reduktiven Citratzyklus.** Ausgehend von Oxalacetat entstehen in Umkehrung der entsprechenden Schritte des oxidativen Citratzyklus Malat, Fumarat, Succinat und Succinyl-CoA, das dann in einer Ferredoxin-abhängigen Reaktion zu α-Ketoglutarat carboxyliert wird. Im anschließenden zweiten Carboxylierungsschritt entsteht aus α-Ketoglutarat Isocitrat, das dann zu Citrat umgesetzt wird. Citrat wird nachfolgend durch die ATP-Citrat-Lyase in Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten. Oxalacetat tritt anschließend in eine neue Runde des Zyklus ein, Acetyl-CoA wird in einer weiteren Ferredoxin-abhängigen Reaktion zu Pyruvat carboxyliert, das in den Baustoffwechsel eingeschleust wird.

Der 3-Hydroxypropionatzyklus

Ein besonders ungewöhnlicher Weg der CO_2-Fixierung ist der **3-Hydroxypropionatzyklus**, bei dem zwei CO_2 fixiert werden und Glyoxylat synthetisiert wird (Abb. 9.**10**). **Acetyl-CoA** ist der Akzeptor für das erste CO_2-Molekül (**Bicarbonat**, **HCO_3^-**). Bei diesem Carboxylierungsschritt, der von der ATP-abhängigen **Acetyl-CoA-Carboxylase**, einem Biotin-haltigen Enzym, katalysiert wird, entsteht Malonyl-CoA, das anschließend zu 3-Hydroxypropionat reduziert wird. Nach Umwandlung von 3-Hydroxypropionat zu Propionyl-CoA erfolgt die zweite Carboxylierung, die von der **Propionyl-CoA-Carboxylase** katalysiert wird. Auch dieses Enzym ist ATP-abhängig, das entstandene Methylmalonyl-CoA wird nachfolgend zu Succinyl-CoA umgelagert. Aus Succinyl-CoA wird in mehreren Schritten Malyl-CoA gebildet, das anschließend von der Malyl-CoA-Lyase in Acetyl-CoA und Glyoxylat gespalten wird. Aus dem gebildeten Glyoxylat wird über einen erst kürzlich entdeckten zweiten Zyklus **Pyruvat** als Vorläufer für den Baustoffwechsel synthetisiert, dabei findet ein weiterer Carboxylierungsschritt statt. Die autotrophe CO_2-Fixierung über den Hydroxypropionatzyklus wurde bisher in schwefelfreien Grünen Bakterien der Gattung *Chloroflexus* und in modifizierter Form in thermophilen Archaea der Gattungen *Sulfolobus, Acidianus* und *Metallosphaera* gefunden.

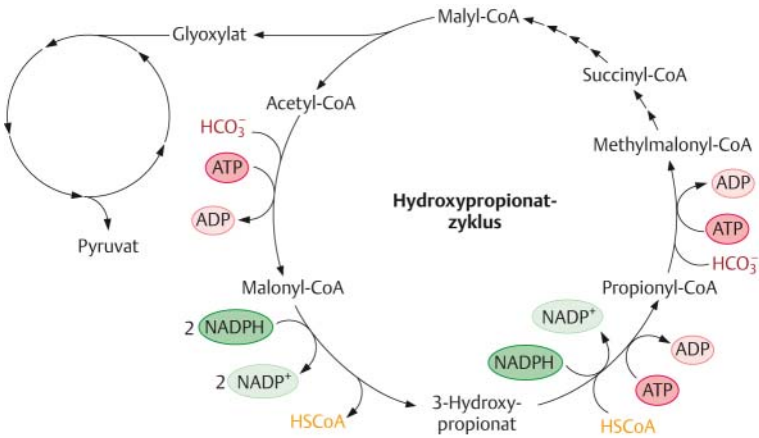


Abb. 9.**10** **Autotrophe CO_2-Fixierung über den Hydroxypropionatzyklus in *Chloroflexus aurantiacus*.** Akzeptor für das erste Molekül CO_2 ist Acetyl-CoA, aus dem entstandenen Malonyl-CoA wird über 3-Hydroxypropionat Propionyl-CoA gebildet. Propionyl-CoA wird anschließend zu Methylmalonyl-CoA carboxyliert, das in mehreren Schritten zu Malyl-CoA umgesetzt wird. Durch Spaltung von Malyl-CoA entsteht Acetyl-CoA für die nächste Runde des Zyklus und Glyoxylat als primäres Fixierungsprodukt. Dabei werden unter Verbrauch von drei ATP zwei Moleküle CO_2 fixiert. Glyoxylat wird in einen zweiten Zyklus eingeschleust, in dessen Verlauf ein weiteres Molekül CO_2 gebunden und Pyruvat gebildet wird, dabei werden zwei ATP verbraucht. Pyruvat wird anschließend unter Verbrauch von mindestens drei ATP zu Triosephosphat umgesetzt.

Der reduktive Acetyl-CoA-Weg

Eine ganze Reihe von Prokaryoten, zu denen alle methanogenen und sulfatreduzierenden Archaea sowie alle homoacetogenen und viele sulfatreduzierende Bacteria zählen, fixieren CO_2 über den **reduktiven Acetyl-CoA-Weg** (auch Wood-Ljungdahl-Weg). Schlüsselenzym ist die **Kohlenmonoxid-Dehydrogenase** (CO-Dehydrogenase, Acetyl-CoA-Synthase), die unter Beteiligung von Tetrahydrofolsäure (THF) und Vitamin B_{12} die reduktive Bildung von Acetyl-CoA aus zwei Molekülen **CO_2** katalysiert. Zur Bildung der beiden kohlenstoffhaltigen Gruppen des Acetylrestes im Acetyl-CoA wird ein Molekül CO_2 zur Carbonylgruppe reduziert, ein weiteres zur Methylgruppe. Das komplex aufgebaute Enzym enthält die Metalle Nickel, Zink und Eisen als Cofaktoren und katalysiert die Reduktion eines Moleküls CO_2 zu CO, das über den Eisen-Cofaktor am Enzym gebunden bleibt. Anschließend wird der in einem THF- und B_{12}-abhängigen Reaktionsschritt aus dem zweiten Molekül CO_2 gebildete Methylrest auf den Nickel-Cofaktor der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase übertragen und dort mit der Carbonylgruppe zum Acetylrest verknüpft. Im letzten Schritt katalysiert die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase die Synthese von Acetyl-CoA aus dem gebildeten Acetylrest und Coenzym A. Acetyl-CoA wird anschließend wie im reduktiven Citratzyklus durch die Ferredoxin-abhängige **Pyruvat-Synthase** zu **Pyruvat** umgesetzt, dabei findet eine weitere reduktive Carboxylierung statt. Insgesamt wird aus drei CO_2 unter Verbrauch von nur einem ATP Pyruvat gebildet, das nachfolgend mit drei ATP zu Triosephosphat umgesetzt wird. Damit ist der reduktive Acetyl-CoA-Weg energetisch gesehen der günstigste Weg der CO_2-Fixierung. Im Unterschied zu den anderen bekannten Wegen der autotrophen CO_2-Fixierung ist dieser Weg insgesamt kein Zyklus, er enthält aber mehrere kleine Zyklen zur Regeneration der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und der benötigten Coenzyme B_{12} und THF.

In homoacetogenen Bakterien dient der Acetyl-CoA-Weg auch der Energiegewinnung, dabei katalysieren Phosphotransacetylase und Acetatkinase die Bildung von Acetat und ATP aus Acetyl-CoA über Acetylphosphat. Gleichzeitig wird ein Na^+-Gradient über der Membran aufgebaut, der zur Synthese von weiterem ATP genutzt wird (S. 372, Abb. 8.**28**).

Biosyntheseleistungen: Energie verbrauchende Stoffwechselprozesse zur Synthese von Monomeren und Polymeren.
Anaplerotische Reaktionen: Auffüllende Synthesewege für Zwischenprodukte des Citratzyklus, die als Vorstufen für Biosynthesen genutzt werden.
Anaplerotische Enzyme: Pyruvat-Carboxylase, PEP-Carboxylase, PEP-Carboxykinase, Pyruvat-Wasser-Dikinase, Pyruvat-Phosphat-Dikinase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase im Glyoxylatzyklus.
CO_2-Fixierung in Prokaryoten: Calvin-Zyklus, reduktiver Citratzyklus, Hydroxypropionatzyklus und reduktiver Acetyl-CoA-Weg.

Calvin-Zyklus: Zyklischer CO_2-Fixierungsweg in Pflanzen, Algen, Cyanobakterien, Purpurbakterien und vielen chemolithotrophen Bakterien, primärer CO_2-Akzeptor: Ribulose-1,5-bisphosphat.
Reduktiver Citratzyklus: Zyklischer CO_2-Fixierungsweg in Chlorobiaceae, einigen anderen Bacteria und einem Archaeon, primärer CO_2-Akzeptor: Succinyl-CoA.
Hydroxypropionatzyklus: Zyklischer CO_2-Fixierungsweg in *Chloroflexus* und einigen Archaea, primärer CO_2-Akzeptor: Acetyl-CoA.
Reduktiver Acetyl-CoA-Weg: Nicht zyklischer CO_2-Fixierungsweg, in vielen Bacteria (homoacetogene und autotrophe Sulfatreduzierer) und Archaea (sulfatreduzierende und methanogene), primärer CO_2-Akzeptor: H_2.

9.3 Die Biosynthese von Monomeren in Mikroorganismen

Monosaccharide, vor allem **Hexosen** und **Pentosen**, sind die Bausteine für zahlreiche Makromoleküle. Sie werden entweder aus der Umgebung aufgenommen oder aus anderen Substraten über spezielle Biosynthesewege von den Mikroorganismen gebildet. Die meisten **Aminosäuren** werden ausgehend von Zwischenprodukten kataboler Stoffwechselwege synthetisiert und anschließend an den Ribosomen zu Polypeptidketten verknüpft. **Nucleotide** bestehen aus einer Pentose, einer Purin- oder einer Pyrimidinbase und einem Phosphatrest. Sie bilden in der Zelle die Bestandteile von Nucleinsäuren, Vitaminen, Coenzymen und energiereichen Verbindungen. Ein wichtiger Grundbaustein von Lipiden sind **Fettsäuren**, deren Synthese aus C_2-Einheiten in sich wiederholenden Zyklen abläuft.

Die Biosyntheseleistungen von Mikroorganismen sind sehr unterschiedlich (S. 260). Während autotrophe Mikroorganismen ihren Kohlenstoff vorwiegend aus CO_2 gewinnen (S. 408), benötigen **heterotrophe** als Ausgangssubstrate für die Synthese ihrer Zellsubstanz eine organische Kohlenstoffquelle. Dabei sind heterotrophe Bakterien mit geringen biosynthetischen Fähigkeiten, z. B. Milchsäurebakterien, darauf angewiesen, zahlreiche Verbindungen (Aminosäuren, Vitamine, Nucleotide) als Wachstumsfaktoren aus der Umgebung aufzunehmen, ihre Nährstoffansprüche sind relativ hoch. Andere Bakterien, z. B. die meisten *E. coli*-Stämme, sind in der Lage, ihr gesamtes Zellmaterial aus anorganischen Salzen, Spurenelementen und einer einzigen organischen Kohlenstoffquelle, z. B. Glucose, selbst zu synthetisieren. Dazu verfügen sie über eine enzymatische Ausstattung, die es ihnen ermöglicht, alle notwendigen Reaktionsschritte durchzuführen.

9.3.1 Monosaccharide

Hexosen und **Pentosen** dienen als Energiesubstrate (S. 349), sind aber auch Vorstufen für die Biosynthese wichtiger Biomoleküle und verschiedener Gerüst- und Speicherpolymere. Stehen Hexosen als Substrat nicht zur Verfügung, synthetisieren Bakterien Zuckerphosphate über die **Gluconeogenese**, z. B. aus organischen Säuren. Pentosen, z. B. für die Synthesen von Nucleinsäuren und Nucleotid-Coenzymen, werden über den **Pentosephosphatweg** synthetisiert. Transketolasen und Transaldolasen ermöglichen die reversible Umwandlung von Pentosephosphaten und Hexosephosphaten ineinander und gewährleisten so die Anpassung der Zelle an den jeweiligen Bedarf.

Die Gluconeogenese

Die **Gluconeogenese** ist ein universeller Stoffwechselweg in den meisten Lebewesen, über den **Glycerinaldehyd-3-phosphat** und **Glucose-6-phosphat** aus Substraten synthetisiert werden, die auf der Stufe von Pyruvat oder auf der Stufe von Citratzyklus-Zwischenprodukten in den Zentralstoffwechsel eingeschleust werden (📖 *Biochemie, Zellbiologie*). Prinzipiell finden in der Gluconeogenese die bei der Glykolyse ablaufenden Reaktionen in umgekehrter Richtung statt (Abb. 9.**11**). Doch obwohl die Gluconeogenese rein formal betrachtet als Umkehr der Glykolyse erscheint, können nicht alle erforderlichen Reaktionsschritte von den Enzymen der Glykolyse durchgeführt werden. Da die Glykolyse-Reaktionen der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase irreversibel sind, benötigt die Zelle für die Gluconeogenese spezielle Enzyme, um diese Reaktionen in umgekehrter Richtung ablaufen zu lassen. Pyruvat wird in zwei Reaktionen durch die **Pyruvat-Carboxylase** und die **PEP-Carboxykinase** zu PEP umgesetzt, Fructose-1,6-bisphosphat durch die **Fructose-1,6-Bisphosphatase** zu Fructose-6-phosphat dephosphoryliert. Damit gesichert ist, dass sowohl die Glykolyse als auch die Gluconeogenese ihren jeweiligen Zweck erfüllen können, sind die beiden Wege reziprok (entgegengesetzt) reguliert, d. h. bei Wachstum auf Zuckern werden die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, bei Wachstum auf Acetat und anderen Gluconeogenese-Substraten die Schlüsselenzyme der Glykolyse gehemmt bzw. die entsprechenden Gene reprimiert.

Die Synthese von Pentosen

Pentosen werden meist durch die Decarboxylierung einer Hexose gebildet. So entsteht Ribulose-5-phosphat aus Glucose-6-phosphat über den **oxidativen Pentosephosphatweg** (Abb. 9.**12**). Nach Oxidation von Glucose-6-phosphat zu **6-Phosphogluconat** (gekoppelte Reaktionen von **Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase** und **Gluconolactonase**) wird 6-Phosphogluconat durch die **Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenase** oxidativ zu Ribulose-5-phosphat decarboxyliert. In einer anschließenden Reaktion wird Ribulose-5-phosphat zu Ribose-5-phosphat isomerisiert. Dieser Schritt folgt demselben Prinzip wie die Umwandlungen von

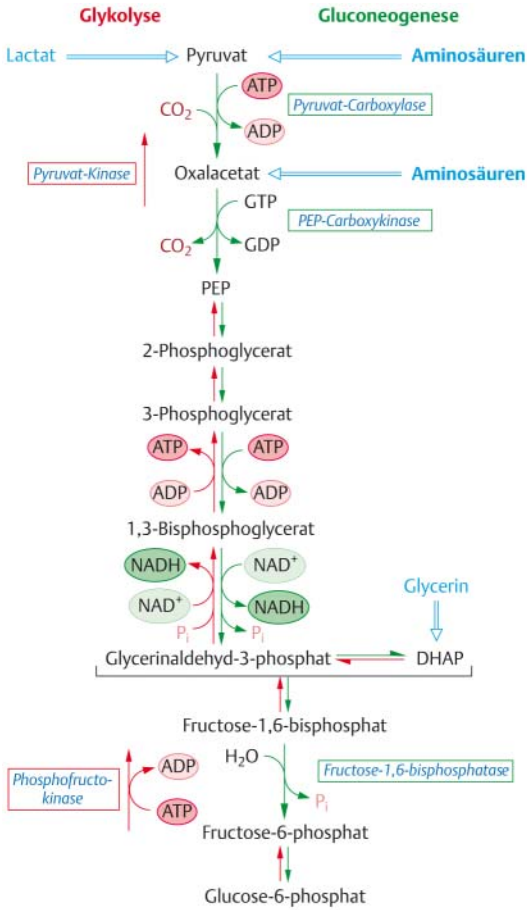


Abb. 9.**11** **Gegenüberstellung der einzelnen Reaktionen von Glykolyse (rot) und Gluconeogenese (grün).** Die für beide Wege unterschiedlichen Enzyme sind entsprechend farbig hervorgehoben.

Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat und von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat in der Glykolyse: Bei allen drei Reaktionen findet eine reversible Umwandlung zwischen der **Aldose**- und der **Ketose**form statt, die jeweils durch eine **Isomerase** katalysiert wird. Das entstandene Ribose-5-phosphat steht dann für die Synthese von Ribonucleotiden zur Verfügung, aus denen die verschiedenen RNAs synthetisiert werden. Für die Synthese von DNA werden die Ribonucleotide in einem nachfolgenden Reaktionsschritt durch die Ribonucleotid-Reductase zu Desoxyribonucleotiden reduziert. Neben der Bereitstellung von Pentosen liefert der oxidative Pentosephosphatweg auch Reduktionsäquivalente in Form von **NADPH** für Biosynthesen (📖*Biochemie, Zellbiologie*).

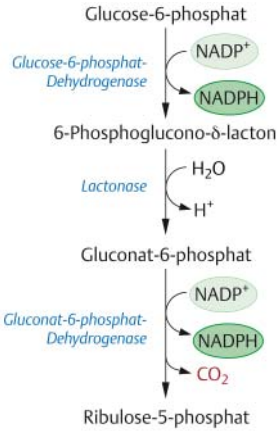


Abb. 9.**12** **Der oxidative Zweig des Pentosephosphatweges.**

9.3.2 Aminosäuren

Aminosäuren besitzen als funktionelle Gruppen immer eine **Carboxylgruppe** und eine **Aminogruppe**, die neben einem Wasserstoffatom und einer variablen Seitenkette an ein zentrales C-Atom gebunden sind. Die Proteine aller Lebewesen sind aus 20 bzw. 22 (mit Selenocystein und Pyrrolysin) Standardaminosäuren aufgebaut, die über **Peptidbindungen** kovalent miteinander verbunden sind (📖 *Biochemie, Zellbiologie*). Dabei handelt es sich immer um die L-Form der entsprechenden Aminosäure. D-Aminosäuren, die durch Isomerisierung aus der entsprechenden L-Aminosäure gebildet werden, kommen bei Prokaryoten in einigen nicht ribosomal synthetisierten Kapselpolypeptiden, in bestimmten natürlichen Antibiotika, z. B. Gramicidin, sowie in der Zellwand der Bacteria vor (S. 30, S. 436). Die chemischen Eigenschaften einer Aminosäure werden insbesondere durch die sehr unterschiedlichen aliphatischen, aromatischen, polaren oder unpolaren Seitenketten bestimmt (Abb. 9.**13**).

Die Synthese der Aminosäuren

Anhand ihrer Kohlenstoffskelette werden die Aminosäuren in **Aminosäurefamilien** unterteilt, die von gemeinsamen Vorläufern aus synthetisiert werden (Abb. 9.**14**). Die Ausgangssubstrate, die das Kohlenstoffgerüst für die benötigten Aminosäuren liefern, sind Zwischenprodukte der Glykolyse, des Citratzyklus oder des Pentosephosphatweges.

In den Aminogruppen der Aminosäuren liegt der Stickstoff in reduzierter Form vor. Als **Stickstoffquelle** verwenden die meisten Mikroorganismen **organisch gebundenen Stickstoff** oder **Ammonium** ($\mathbf{NH_4^+}$), dessen Redoxgrad demjenigen der organischen Aminogruppen entspricht, und das in Form von Salzen

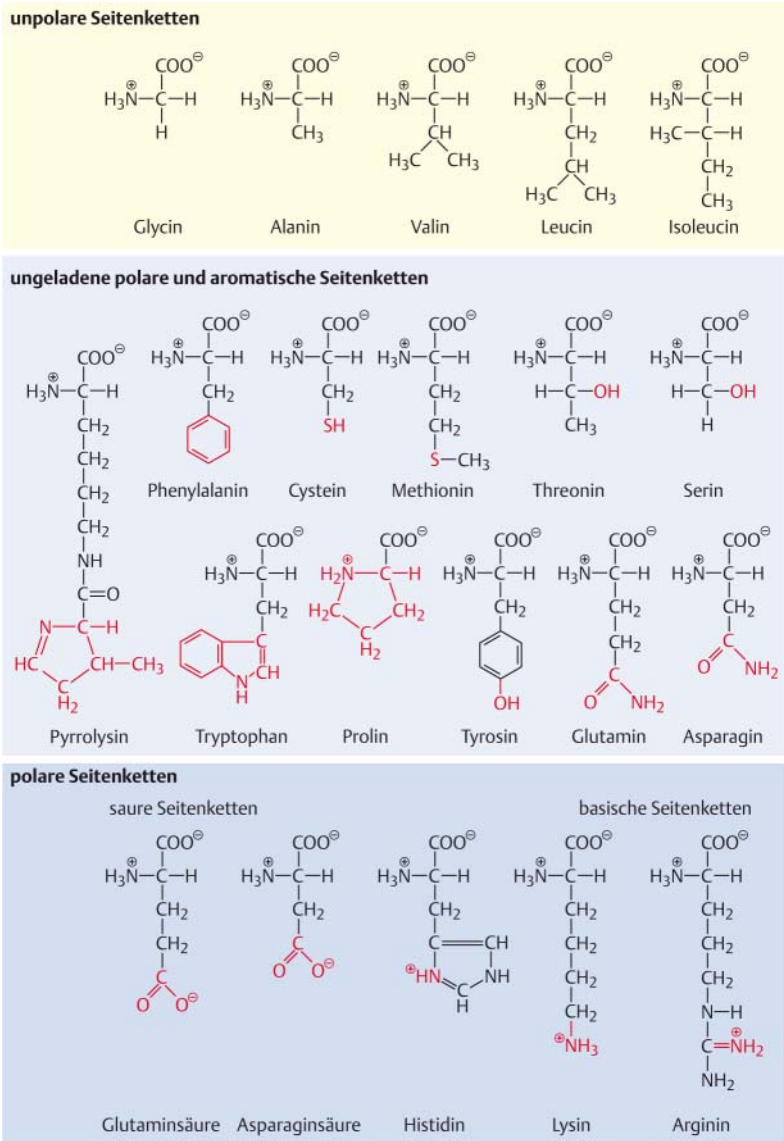


Abb. 9.**13** **Die Struktur der Standardaminosäuren.** Selenocystein enthält anstelle von Schwefel Selen.

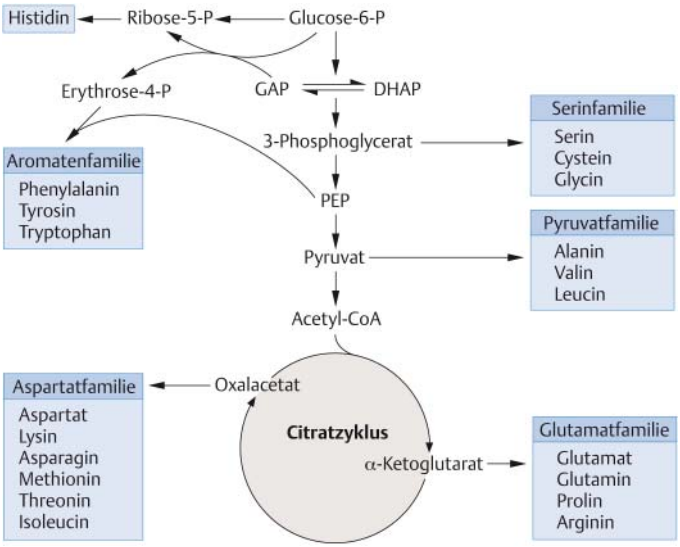


Abb. 9.**14** **Die Synthesefamilien der Aminosäuren:** Die Kohlenstoffgerüste stammen von Zwischenprodukten der Glykolyse, des Pentosephosphatweges und des Citratzyklus.

wie $(NH_4)_2SO_4$ oder NH_4Cl vorkommt. Einige Mikroorganismen sind wie Pflanzen und Pilze zu einer **assimilatorischen Nitratreduktion** in der Lage. Dabei wird **Nitrat** zunächst zu **Nitrit**, dann weiter auf die Oxidationsstufe des **Ammoniums** reduziert und anschließend in organische Moleküle eingebaut. Die Nitratassimilation findet im Cytoplasma statt und unterscheidet sich in Funktion und Regulation von der dissimilatorischen Nitratreduktion, die der Energiegewinnung dient und deren Enzyme membrangebunden sind (S. 364). Die dissimilatorische Nitratreduktion ist ebenso auf Prokaryoten beschränkt wie die Fähigkeit einiger Bakterien, **molekularen Stickstoff** (N_2) aus der Luft zu **fixieren** und als Stickstoffquelle für organische Moleküle zu nutzen (*Biochemie, Zellbiologie*). Alle drei Prozesse sind Bestandteile des Stickstoffkreislaufs (S. 517).

Die Einführung der **Aminogruppe** kann entweder am Anfang der Aminosäuresynthese stattfinden, oder als letzter Schritt, wenn die Modifikation des Kohlenstoffskeletts bereits abgeschlossen ist. Die Aminogruppe kann dabei direkt aus **NH_4^+** stammen oder in einer Transaminierungs-Reaktion von einer anderen Aminosäure übertragen werden. Der Einbau von NH_4^+ wird von Dehydrogenasen katalysiert, die eine α-Ketosäure mit NADPH reduzieren und dabei die Ketogruppe durch die Aminogruppe ersetzen. In den meisten Mikroorganismen wird die erste Assimilierungsreaktion von der **Glutamat-Dehydrogenase** durchgeführt, die aus α-Ketoglutarat und NH_4^+ die Aminosäure Glutamat synthetisiert

(Abb. 9.**15a**). Anschließend kann die Aminogruppe des Glutamats über **Transaminasen** auf eine andere α-Ketosäure, z. B. Oxalacetat, übertragen werden. Dabei entsteht eine neue Aminosäure (Aspartat) und der NH_4^+-Akzeptor α-Ketoglutarat wird regeneriert. Wenn die Reaktionen der Glutamat-Dehydrogenase und einer Transaminase im Wechsel ablaufen, entsteht ein zyklischer NH_4^+-Assimilierungsweg, der zur Produktion verschiedener Aminosäuren führt (Abb. 9.**15b**). Alternativ können Transaminasen auch die Aminogruppe von Alanin auf eine α-Ketosäure übertragen. Da die Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion **relativ hohe NH_4^+-Konzentrationen** benötigt, besitzen die meisten Organismen einen weiteren Assimilationsweg für NH_4^+. Das Enzym **Glutamin-Synthetase** katalysiert den Einbau von NH_4^+ in Glutamat bei wesentlich **geringeren Konzentrationen** (Abb. 9.**15c**). Dabei entsteht Glutamin, das Amid des Glutamats. Im

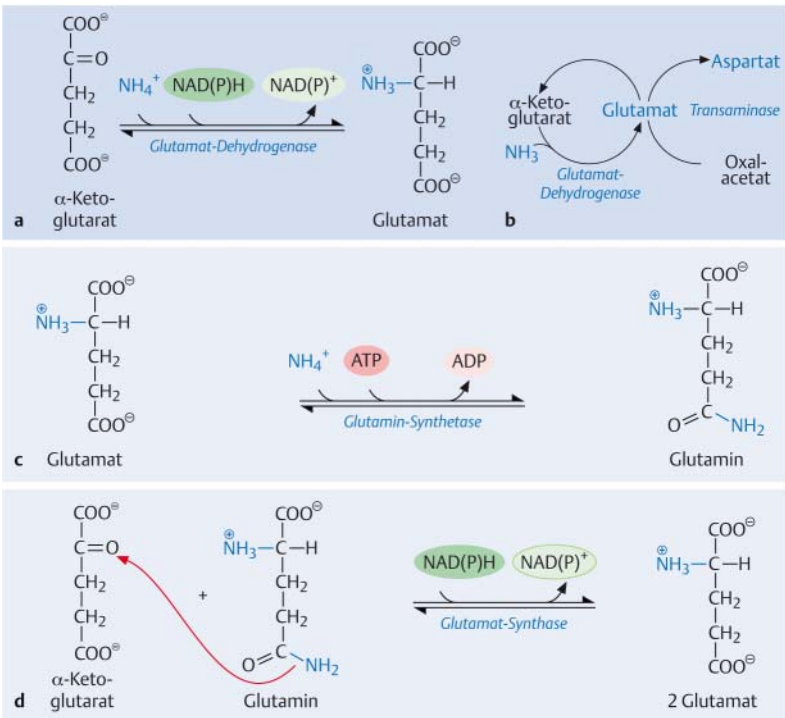


Abb. 9.**15** **Der Einbau von Ammoniak (als NH_4^+) in Aminosäuren. a** Die Bildung von Glutamat durch die Glutamat-Dehydrogenase bei hoher NH_4^+-Konzentration. **b** Zyklische NH_4^+-Assimilierung durch Glutamat-Dehydrogenase und Transaminase. **c**, **d** Der NH_4^+-Einbau in Aminosäuren durch die Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase (GOGAT) bei niedriger NH_4^+-Konzentration.

Unterschied zur Glutamat-Dehydrogenase benötigt diese Assimilierungsreaktion die Hydrolyse einer energiereichen Verbindung (ATP). In einem zweiten Schritt, der in den meisten Prokaryoten von der **Glutamat-Synthase** (früher GOGAT, **G**lutamin-2-**O**xo-**G**lutarat-**A**mino-**T**ransferase) katalysiert wird, überträgt das Glutamin seine Amidgruppe auf α-Ketoglutarat. Dabei entstehen zwei Moleküle Glutamat (Abb. 9.**15d**). Steigt die NH_4^+-Konzentration an, wird dieser energieverbrauchende Syntheseweg abgeschaltet und stattdessen die Glutamat-Dehydrogenase aktiviert.

9.3.3 Nucleotide

Nucleotide bestehen jeweils aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einem Zuckerrest (Ribose oder Desoxyribose) und einem Phosphatrest. Zu den **Purinen** gehören Adenin und Guanin, zu den **Pyrimidinen** Thymin, Cytosin und Uracil (Abb. 9.**16**). Nucleotide sind in Nucleinsäuren (*Genetik*), Vitaminen, Coenzymen und in energiereichen Verbindungen wie ATP enthalten (*Biochemie, Zellbiologie*). Cytosin, Guanin und Adenin kommen sowohl in DNA als auch in RNA vor, Thymin nur in DNA und Uracil nur in RNA. Bei der Synthese von Purin- und Pyrimidinnucleotiden fungiert jeweils Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) als Überträger der Ribosephosphat-Einheit. Dabei wird der Purinring am bereits gebundenen Ribosephosphat aufgebaut, während bei der Synthese von Pyrimidinnucleotiden zuerst das freie Pyrimidin Orotat entsteht, das anschließend mit PRPP zum Pyrimidinnucleotid reagiert.

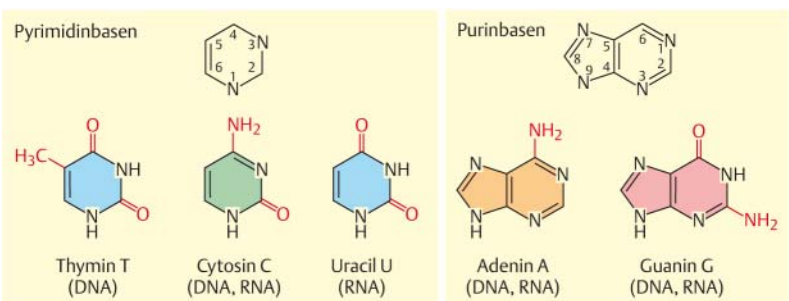


Abb. 9.**16** **Die Struktur der Purin- und Pyrimidinbasen.**

Die Synthese der Purinnucleotide

Purine bestehen aus zwei miteinander verbundenen Heterozyklen aus Kohlenstoff- und Stickstoffatomen, die durchgehend nummeriert werden und verschiedene Seitenketten tragen können. Die Synthese dieses Ringsystems erfolgt schrittweise durch den Einbau von Formylgruppen, die durch **Tetrahydrofolsäure** (**THF**, *Biochemie, Zellbiologie*) und Aminogruppen, die von Aminosäuren übertragen werden. Ein Kohlenstoffatom stammt aus CO_2. Der größte zusammenhängende Baustein stammt von der Aminosäure Glycin, die in einem Schritt zwei Kohlenstoffatome und ein Stickstoffatom für den Aufbau des Purinringes liefert (Abb. 9.**17a**). Die Purinsynthese startet mit der Reaktion zwischen der Aminosäure Glutamin und **Phosphoribosylpyrophosphat** (PRPP), einem Ribosemolekül, das insgesamt drei Phosphatgruppen trägt (Abb. 9.**17b**). Die Amidgruppe des Glutamins wird an die Ribose gebunden und Pyrophosphat freigesetzt. Alle weiteren Syntheseschritte erfolgen an dem so gebildeten Phosphoribosylamin und führen zur Bildung von Inosinmonophosphat (IMP). Aus diesem Vorläufer entstehen dann AMP bzw. GMP.

9

Die Synthese der Pyrimidinnucleotide

Pyrimidine besitzen als Grundgerüst einen Ring aus 4 Kohlenstoff- und 2 Stickstoffatomen, die aus **Carbamoylphosphat** und **Aspartat** stammen (Abb. 9.**17a**). Im ersten Schritt der Pyrimidinsynthese werden Carbamoylphosphat und die Aminosäure Aspartat miteinander verknüpft. Die Phosphatgruppe wird dabei abgespalten. Das entstandene **N-Carbamoylaspartat** wird unter Wasserabspaltung zum Ring geschlossen und anschließend zu **Orotat** reduziert. Im letzten Schritt reagiert Orotat mit PRPP zum Pyrimidinnucleotid Orotidylat, aus dem durch weitere Modifikationsschritte die für die Nucleinsäuren benötigten Pyrimidinnucleotide mit den Basen Uracil, Cytosin und Thymin synthetisiert werden.

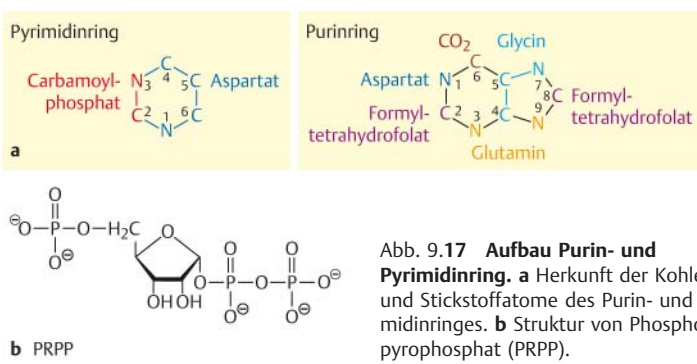


Abb. 9.**17** **Aufbau Purin- und Pyrimidinring. a** Herkunft der Kohlenstoff- und Stickstoffatome des Purin- und des Pyrimidinringes. **b** Struktur von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP).

Tetrahydrofolsäure (**THF**) ist als Coenzym an der Synthese von Nucleotiden, der Bildung von dTMP aus dUMP (Thymidinsynthesezyklus), der Synthese einiger Aminosäuren, z. B. Methionin, bei der Wiederverwertung von Purinen aus abgebauten Nucleinsäuren (salvage pathway) und einigen anderen Reaktionen beteiligt. THF ist die reduzierte Form der Folsäure und besteht aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoesäure und speziesabhängig einem oder mehreren Glutamatresten (Abb. 9.**18**). Im Unterschied zu Säugern sind viele Mikroorganismen in der Lage, THF über eine Reihe von Reaktionsschritten von GTP ausgehend selbst zu synthetisieren (Abb. 9.**18**). Diese Fähigkeit wird bei der Bekämpfung pathogener Bakterien mit Folsäure-Antagonisten ausgenutzt. Ziel der Folsäure-Antagonisten sind dabei zwei Enzyme des Biosyntheseweges für THF.

Typ 1-Folsäure-Antagonisten, die **Sulfonamide**, besitzen eine so große strukturelle Ähnlichkeit mit **p-Aminobenzoesäure**, einem Substrat der **7,8-Dihydropteroat-Synthase**, dass sie anstelle des natürlichen Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden werden. Bei hoher Sulfonamidkonzentration kann durch diesen Verdrängungswettbewerb (kompetitive Hemmung, *Biochemie, Zellbiologie*) das Enzym nahezu vollständig gehemmt und so die THF-Synthese blockiert werden. Das therapeutische Potential der Sulfonamide wurde bereits 1932 von Gerhard Domagk entdeckt, als er die Wirksamkeit verschiedener Chemikalien auf

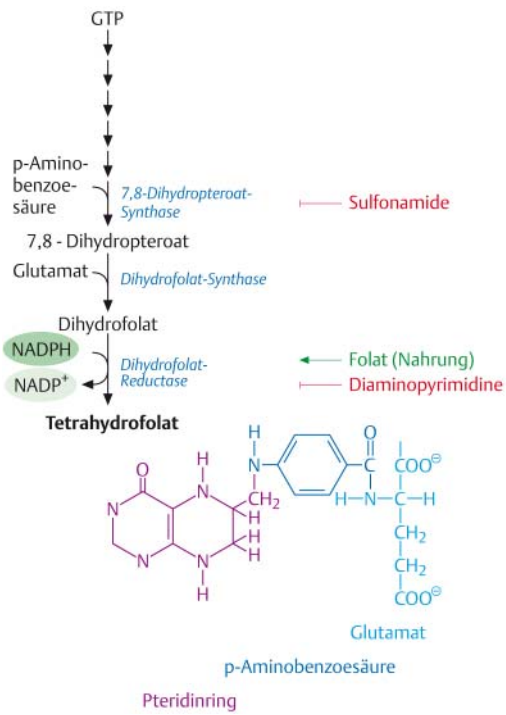


Abb. 9.**18** **Tetrahydrofolatsynthese in Mikroorganismen.** Ausgangssubstrat der THF-Synthese ist GTP, das in sechs Schritten zu 7,8-Dihydropteroat umgesetzt wird. Den letzten Schritt katalysiert die 7,8-Dihydropteroat-Synthase, die durch Sulfonamide kompetitiv gehemmt wird. Im nächsten Schritt katalysiert die Dihydrofolat-Synthase die Bildung von Dihydrofolat aus 7,8-Dihydropteroat und Glutamat. Dihydrofolat wird anschließend von der Dihydrofolat-Reductase mit NADPH zu Tetrahydrofolat reduziert. Diaminopyrimidine hemmen die Dihydrofolat-Reductase kompetitiv. Über die Nahrung aufgenommenes Folat kann ebenfalls von der Dihydrofolat-Reductase zu Tetrahydrofolat reduziert werden.

Streptokokken-Infektionen bei Mäusen testete. Die Wirkung von Sulfonamiden kann durch die externe Gabe von Folsäure aufgehoben werden.
Typ 2-Folsäure-Antagonisten, **Diaminopyrimidine** wie **Trimethoprim**, sind Strukturanaloga des Pteridinringes von Dihydrofolat und konkurrieren mit diesem um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum der **Dihydrofolat-Reductase**. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat (und ebenso von extern zugesetzter Folsäure) zu Tetrahydrofolat. Diaminopyrimidine bewirken eine kompetitive Hemmung des letzten Schritts der THF-Synthese. Um der schnellen Resistenzbildung entgegen zu wirken, wurden Kombinationspräparate aus Typ1- und Typ2-Folsäureantagonisten entwickelt. ◀

9.3.4 Fettsäuren

Fettsäuren sind in verschiedener Hinsicht für Zellen von Bedeutung. Sie spielen zum einen im katabolen Teil des Stoffwechsels eine Rolle, da sie für viele Chemoorganotrophe (S. 349) als Energiequellen dienen können und viele Organismen **Energiespeicher** in Form von Fett oder Fettsäurepolymeren (z. B. Poly-β-Hydroxybutyrat) anlegen. Auf der anderen Seite sind Fettsäuren die Hauptbestandteile von **Membranlipiden** (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Fettsäuren besitzen eine Carboxylgruppe und eine Kohlenwasserstoffkette von unterschiedlicher Länge. Man unterscheidet **gesättigte** und **ungesättigte** sowie **verzweigte** und **unverzweigte** Fettsäuren. In gesättigten Fettsäuren sind alle Kohlenstoffatome mit Wasserstoff abgesättigt, während ungesättigte Fettsäuren eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Verzweigte und ungesättigte Fettsäuren erhöhen die Fluidität der Membranen bei niedrigen Umgebungstemperaturen. Daher ist ihr Anteil in den Membranen psychrophiler Organismen deutlich höher als in denen mesophiler (S. 454).

Die Biosynthese der Fettsäuren

Die Synthese der Fettsäuren benötigt als Baustein **Acetyl-CoA**, aus dem schrittweise die Kohlenwasserstoffkette aufgebaut wird. Dabei wird die wachsende Fettsäure immer um eine C_2-Einheit verlängert. Im ersten Schritt wird Acetyl-CoA mit HCO_3^- zu **Malonyl-CoA** carboxyliert; die erforderliche Energie wird durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Diese Reaktion wird von der **Acetyl-CoA-Carboxylase** katalysiert, einem **Biotin-**haltigen Enzym. Anschließend wird durch eine **Transacylase** der Malonylrest von Coenzym A auf die SH-Gruppe des Phosphopantethein-Arms am Acyl-Carrier-Protein (**ACP**) übertragen; bei Hefen katalysiert eine zweite Transacylase die Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-CoA auf eine SH-Gruppe des **kondensierenden Enzyms**, während in den meisten Bakterien Acetyl-CoA direkt mit Malonyl-ACP kondensiert wird (Abb. 9.**19**).

ACP fungiert als langer beweglicher Arm, der die Substrate an die aktiven Zentren der beteiligten Enzyme weiterreicht. Im nächsten Schritt der Fettsäuresynthese kondensieren Acetyl- und Malonylrest am ACP unter Bildung einer C_4-Ein-

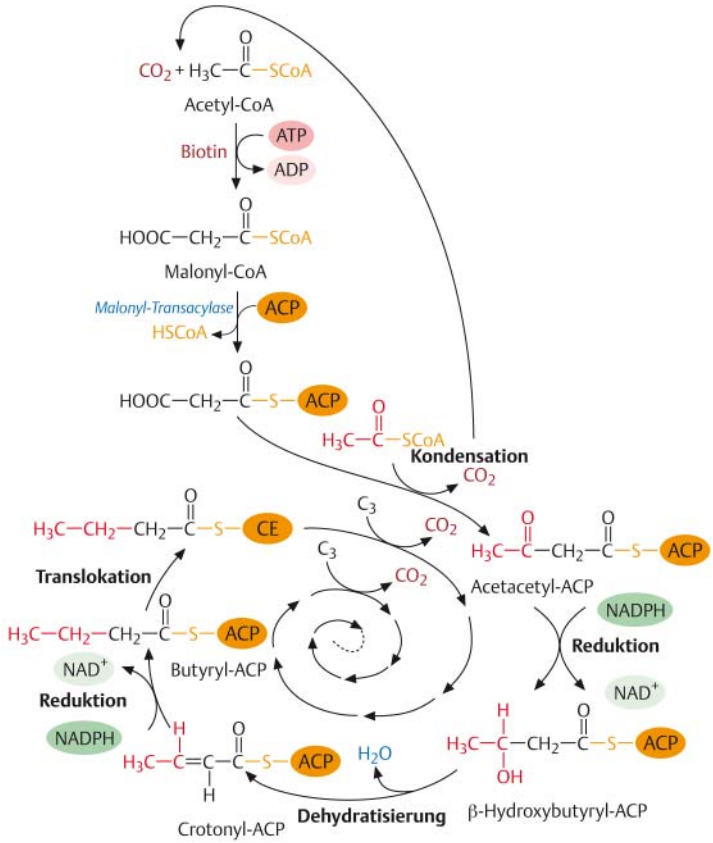


Abb. 9.**19** **Ablauf der Reaktionsschritte in der ersten Runde der Fettsäuresynthese in *E. coli*.** Die Übertragung der Malonylreste von Malonyl-CoA auf das Acyl-Carrierprotein (ACP) erfolgt durch eine Transacylase. Vor der zweiten Kondensationsreaktion wird der Butyrylrest auf die SH-Gruppe des kondensierenden Enzyms (CE) übertragen, sodass die SH-Gruppe von ACP für die Übertragung des zweiten Malonylrestes zur Verfügung steht.

heit zu **Acetacetyl-ACP** (Abb. 9.**19**). Diese Kondensationsreaktion wird durch die gleichzeitige Decarboxylierung des Malonylrestes angetrieben. Die Abspaltung der Carboxylgruppe verlagert das Gleichgewicht dieser Reaktion auf die Seite von Acetacetyl-ACP. Die hierzu erforderliche Energie stammt letztlich aus dem ATP, das bei der Carboxylierung im ersten Reaktionsschritt hydrolysiert worden ist. Die Carboxylierung von Acetyl-CoA im ersten Schritt der Fettsäuresynthese ist also eine vorbereitende Reaktion, um die spätere Kondensation energetisch zu begünstigen und HCO_3^- ist ein notwendiges Hilfssubstrat für die Fettsäure-

synthese, obwohl sein Kohlenstoff nicht in die Kette eingebaut wird. Nach der Kondensation folgen am ACP-gebundenen Acetacetylrest nacheinander drei Reaktionsschritte (**Reduktion**, **Wasserabspaltung** und erneute **Reduktion**, Abb. 9.**19**), um die β-Ketogruppe des Acetacetylrestes zu reduzieren. Das so entstandene **Butyryl-ACP** kann nach Translokation des Butyrylrestes auf die SH-Gruppe des kondensierenden Enzyms in eine neue Verlängerungsrunde eintreten und einen Malonylrest von Malonyl-CoA übernehmen, der anschließend unter CO_2-Freisetzung mit dem Butyrylrest kondensiert. Die weiteren Schritte erfolgen dann an der ACP-gebundenen neuen C_6-Einheit. Auf diese Weise können am ACP Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen (**Palmitinsäure**) synthetisiert werden. Die Gesamtheit der an der Synthese beteiligten eng assoziierten Enzyme wird auch als **Fettsäure-Synthase** (in Eukaryoten sind sie zu einem Multienzym-Komplex zusammengefasst) bezeichnet. Die Verlängerung der Kette um weitere Kohlenstoffatome oder die Einführung von Doppelbindungen bei ungesättigten Fettsäuren wird von zusätzlichen Enzymen durchgeführt. Verzweigte Fettsäuren werden ausgehend von einem verzweigten Startermolekül (z. B. Isobutyryl-CoA) synthetisiert, weitere C_2-Einheiten werden wie bei den unverzweigten angefügt. Da die Fettsäuresynthese mit Acetyl-CoA einen Baustein benötigt, der auch für die Energiegewinnung über den Citratzyklus von Bedeutung ist, sind diese Stoffwechselprozesse entsprechend den Bedürfnissen der Zelle reguliert. Die Aktivierung oder Hemmung der Fettsäuresynthese erfolgt dabei auf der Ebene des Schlüsselenzyms Acetyl-CoA-Carboxylase. Ähnlich wie bei Glykolyse und Gluconeogenese sind Fettsäuresynthese und Fettsäureabbau (β-Oxidation, S. 357) entgegengesetzt reguliert (📖*Biochemie, Zellbiologie*).

Monosaccharide: Einfachzucker, Bestandteile zellulären Makromolekülen oder anderen Biomolekülen sind meist Hexosen (z. B. Glucose) und Pentosen (z. B. Ribose).
Aminosäuren: Bausteine der Proteine und Polypeptide, enthalten eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, ein Wasserstoffatom und eine variable Seitenkette, gebunden an ein zentrales C-Atom.
Aminosäuresynthese: Aminosäurefamilien leiten sich von gemeinsamen Vorläufern ab, Vorläufer sind Zwischenprodukte der Glykolyse, des Citratzyklus und des Pentosephosphatzyklus, die Aminogruppe wird von Transaminasen übertragen.
Glutamat-Dehydrogenase: Katalysiert die NAD(P)H-abhängige reversible Synthese von Glutamat aus α-Ketoglutarat und NH_4^+ bei hoher NH_4^+-Konzentration.
Transaminasen: Katalysieren die Übertragung der Aminogruppe von Glutamat oder Alanin auf eine α-Ketosäure.
Glutamin-Synthetase: Katalysiert die ATP-abhängige Synthese von Glutamin aus Glutamat und NH_4^+ bei niedriger NH_4^+-Konzentration.
Glutamat-Synthase: Katalysiert die NADPH-abhängige Synthese von zwei Glutamat aus α-Ketoglutarat und Glutamin, Synonym: GOGAT (**G**lutamin-2-**O**xo-**G**lutarat-**A**mino-**T**ransferase).

Nucleotide: Bestehen aus einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose), einer Purin- oder Pyrimidinbase und einem Phosphatrest, Purinbasen: Adenin und Guanin, Pyrimidinbasen: Cytosin, Thymin und Uracil.
Fettsäuren: Besitzen eine Carboxylgruppe und eine verzweigte oder unverzweigte Kohlenwasserstoffkette, gesättigte Fettsäuren haben keine Doppelbindung, ungesättigte Fettsäuren haben eine oder mehrere Doppelbindungen, Bausteine von Lipiden.
Acetyl-CoA-Carboxylase: Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese, katalysiert die Biotin-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA.
Acyl-Carrier-Protein (ACP): Flexibles Trägermolekül für die Acylreste bei der Fettsäuresynthese, funktionelle Gruppe ist die SH-Gruppe des Phosphopantethein-Arms.
Fettsäure-Synthase: Enzymsystem zur Synthese gesättigter C_{16}-Fettsäuren, bei Eukaryoten Multienzymkomplex, bei Prokaryoten 7 eng assoziierte Einzelenzyme.

9.4 Die Synthese von Polymeren in Mikroorganismen

Die zellulären Polymere, **Polysaccharide**, **Nucleinsäuren** und **Proteine**, sind aus zahlreichen, kovalent miteinander verbundenen Zuckern, Nucleotiden oder Aminosäuren aufgebaut. Sie bestehen aus identischen oder aus unterschiedlichen **Monomeren** und können zusätzlich noch weitere chemische Gruppen tragen, z. B. Phosphatreste. Die unterschiedliche Zusammensetzung verleiht jedem Polymer charakteristische Eigenschaften, die für seine jeweilige Funktion wichtig sind. **Lipide** sind eine heterogene Gruppe von hydrophoben Verbindungen. Anhand ihrer chemischen Struktur werden einfache Lipide, komplexe Lipide und Isoprenoide unterschieden. Die unterschiedlichen Polysaccharide und Lipide fungieren in den Zellen als Struktur- bzw. Membrankomponenten oder als Energiespeicher.

Zu den **Polymeren** jeder Zelle gehören **Polysaccharide**, **Nucleinsäuren** (📖*Biochemie, Zellbiologie*, 📖*Genetik*) und **Proteine** (📖*Biochemie, Zellbiologie*), die jeweils aus zahlreichen, kovalent miteinander verbundenen Monomeren von Zuckern, Nucleotiden oder Aminosäuren aufgebaut sind und wegen ihrer Molekularmassen von 5000 bis über 10^6 Da auch als **Makromoleküle** bezeichnet werden. Die **Lipide** werden nicht zu den Makromolekülen gezählt, da ihre Molekularmassen (750–1500 Da) wesentlich geringer sind. Allerdings lagern sich viele Lipidmoleküle nicht kovalent zusammen und bilden so Strukturen wie die Zellmembran.

9.4.1 Polysaccharide

Polysaccharide bestehen aus identischen oder unterschiedlichen Zuckereinheiten und ihren Derivaten. Ihre Synthese geht von aktivierten Vorstufen, den **Nucleosiddiphosphat-Zuckern** aus (S. 436). Polysaccharide dienen in der Zelle entweder als Strukturelemente oder als Speicherstoffe. Charakteristisch für alle Polysaccharide ist die glykosidische Bindung zwischen den einzelnen Zuckern des Makromoleküls. Eine glykosidische Bindung wird unter Wasserabspaltung zwischen der Hydroxylgruppe am C1 des einen Zuckermoleküls und einer Hydroxylgruppe am C4 oder am C6, seltener auch am C3, des zweiten Zuckers ausgebildet (Abb. 9.**20**). Je nachdem, ob die Hydroxylgruppen sich stereospezifisch in der α- oder in der β-Stellung befinden, spricht man von einer α-glykosidischen bzw. einer β-glykosidischen Bindung.

Zu den **Strukturpolysacchariden** gehört das **Peptidoglykan** der Zellwände der Bacteria, einige Archaea enthalten **Pseudopeptidoglykan** als Strukturelement (S. 34). Eine weitere wichtige Gruppe von Polysacchariden sind die **Lipopolysaccharide**, die bei gramnegativen Bakterien auf der Außenseite der äußeren Membran den Großteil der Lipidkomponenten bilden, und die **Teichonsäuren** der grampositiven Bakterien (S. 36, S. 38). Bei einigen der in Zellaggregaten lebenden Bakterienarten werden die einzelnen Zellen durch Cellulose zusammengehalten (z. B. *Sarcina*), andere (z. B. *Sphaerotilus*) bilden Scheiden aus **Heteropolysacchariden**, die aus verschiedenen Monosacchariden zusammengesetzt sind.

Als **Speicherpolysaccharide** besitzen viele Bakterien **Glykogen** und **Stärke**, die auch in Tieren bzw. Pflanzen vorkommen. Bakterielles Glykogen wird auch als **Polyglucose** bezeichnet. Die Synthese erfolgt durch bakterielle Glykogen-Synthasen, als Glykosylgruppendonor fungiert in der Regel UDP-Glucose, in einigen Fällen auch ADP-Glucose (*Biochemie, Zellbiologie*). **Dextrane** sind Spei-

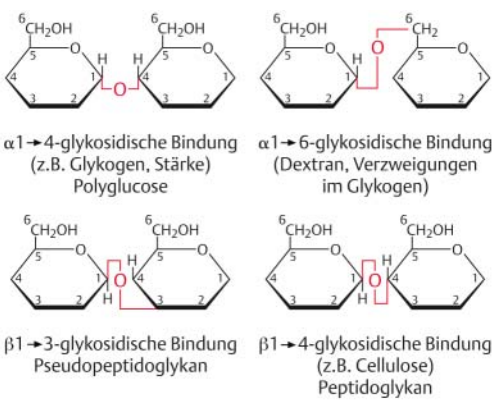


Abb. 9.**20** **Verschiedene glykosidische Bindungen in Polysacchariden.** In der Regel liegen in Speicherpolysacchariden (Stärke, Glykogen, Dextran) α-glykosidische und in Strukturpolysacchariden (Cellulose, Peptidoglykan, Pseudopeptidoglykan) β-glykosidische Bindungen vor. Eine Ausnahme bilden die pflanzlichen Pektine, die größtenteils aus α1→4-glykosidisch miteinander verknüpften Galacturonsäure-Monomeren bestehen.

cherpolysaccharide in Bakterien und Hefen aus Glucoseeinheiten in α1→6-Bindung mit Verzweigungen, die speziesabhängig in α1→2-, α1→3- oder α1→4-Form vorliegen. Dextrane gehören zu den **Exopolysacchariden**, aus denen viele bakterielle Kapseln und Schleime bestehen. Exopolysaccharide werden entweder durch spezielle Enzyme außerhalb der Bakterienzelle synthetisiert oder im Zellinneren synthetisierte Monomere werden ausgeschleust und extrazellulär polymerisiert, einige Exoplysaccharide werden industriell genutzt (S. 40).

In **Glykoproteinen** sind längere Zuckerketten durch eine glykosidische Bindung mit einer Polypeptidkette verknüpft. Bei einer **O-glykosidischen Bindung** ist der Zucker über eine Hydroxylgruppe des Polypeptids gebunden, bei einer **N-glykosidischen Bindung** über eine Aminogruppe. Glykoproteine spielen vor allem eine wichtige Rolle als Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z. B. vermitteln bakterielle Lektine die Anheftung vieler Bakterien an spezifische Zellen ihres Wirtsorganismus.

9.4.2 Lipide

Lipide sind eine sehr heterogene Gruppe von Verbindungen unterschiedlicher biologischer Funktion, die sich von Acetyl-CoA ableiten und in Wasser nahezu unlöslich, in organischen Lösungsmitteln jedoch gut löslich sind. Man unterscheidet einfache und komplexe Lipide sowie Isoprenoide (Terpenoide). **Einfache Lipide** sind Triacylglyceride und Wachse. **Triacylglyceride** (Neutralfette), Dreifachester des C_3-Alkohols Glycerin mit langkettigen Fettsäuren (Abb. 9.**21a**), dienen in höheren Eukaryoten und in eukaryotischen Mikroorganismen als **Energiespeicher**. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch einige grampositive Bakterien der Gattungen *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces* und *Mycobacterium* große Mengen Triacylglyceride, deren Zusammensetzung sich stark von pflanzlichen und tierischen unterscheidet, synthetisieren und als unlösliche Einschlüsse im Cytoplasma einlagern. In dem gramnegativen Bakterium *Acinetobacter baylyi* (früher: *A. calcoaceticus*) wurden als Speicherlipide **Wachsester** gefunden, die durch Veresterung einer Fettsäure mit einem Fettalkohol entstehen (Abb. 9.**21e**). Viele Bakterien synthetisieren Polymere aus β-Hydroxyfettsäuren (PHA, s. u.) als Speicherstoffe.

Komplexe Lipide sind **membranbildende Lipide**, dazu gehören die **Phospholipide** und die **Glykolipide**, die jeweils ein hydrophiles und ein hydrophobes Ende besitzen. Dieser amphipathische Charakter ist ausschlaggebend für ihre Zusammenlagerung zur Lipiddoppelschicht (bilayer) in biologischen Membranen (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Innerhalb der Phospholipide, die als hydrophile Kopfgruppe eine Phosphorylgruppe enthalten (Abb. 9.**21c**), wird zwischen **Glycerolipiden**, die als Grundgerüst Glycerin enthalten, dessen Hydroxylgruppen mit Fettsäuren verestert sind, und **Sphingolipiden** unterschieden, die als Grundgerüst den langkettigen, ungesättigten Aminoalkohol Sphingosin enthalten. **Gly-**

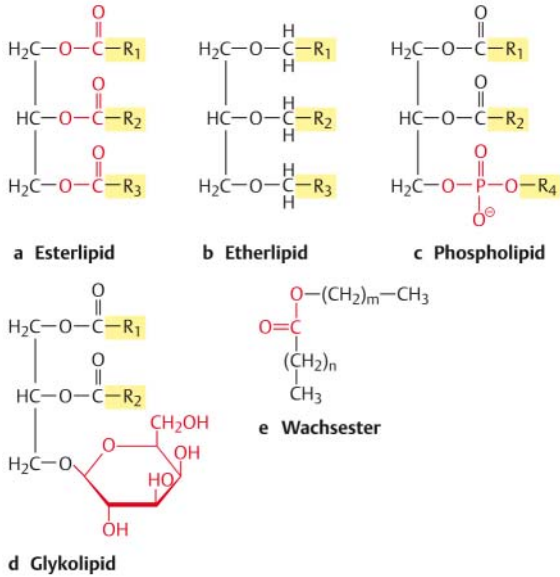


Abb. 9.**21** **Grundstrukturen verschiedener Lipide. a** Esterlipide: Ein Alkohol (Glycerin) ist über Esterbindungen mit drei Fettsäuren verbunden. **b** Etherlipide: Ein Alkohol (Glycerin) ist über Etherbindungen mit drei Isoprenoidalkoholen verbunden. **c** Phospholipide: Ein Alkohol (Glycerin) ist mit zwei Fettsäuren (R_1, R_2) und einem Phosphatrest verestert, der mit einem weiteren Alkohol (R_4) verestert ist. **d** Glykolipide: Ein Alkohol (Glycerin) ist mit zwei Fettsäuren verestert und trägt an C3 einen oder mehrere Zuckerreste. e Wachsester: Eine Fettsäure ist mit einem Fettalkohol verestert.

kolipide enthalten als Grundgerüst Glycerin, in tierischen Zellen auch Sphingosin, besitzen jedoch anstelle eines Phosphatrestes einen oder mehrere Zuckerreste (Abb. 9.**21d**). Die Synthese der Glycerolipide geht in Bacteria und Eukarya von *sn*-Glycerin-3-phosphat, in Archaea von *sn*-Glycerin-1-phosphat aus, das jeweils durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gebildet wird, einem Zwischenprodukt der Glykolyse (Abb. 9.**22**).

Für die Bezeichnung von Lipiden gibt es verschiedene Systeme, sodass für dieselbe Verbindung mehrere unterschiedliche Namen existieren. Die chiralen Verbindungen *sn*-Glycerin-3-phosphat und *sn*-Glycerin-1-phosphat sind Enantiomere, d. h. sie verhalten sich zueinander wie Bild und Spiegelbild. Die Vorsilbe „*sn*“ steht für „stereospezifische Nummerierung“. Nach einer alternativen Nomenklatur, die die Zuordnung einer Verbindung zur optischen Reihe hervorhebt, wird *sn*-Glycerin-3-phosphat als D-Glycerin-1-phosphat (oder L-Glycerin-3-phosphat) und *sn*-Glycerin-1-phosphat als L-Glycerin-1-phosphat (oder D-Glycerin-3-phosphat) bezeichnet. Offensichtlich ist die Stereospezifität der Enzyme, die am Membranaufbau in Archaea beteiligt sind, entgegengesetzt zur Stereospezifität der entsprechenden Enzyme in Bacteria und Eukarya.

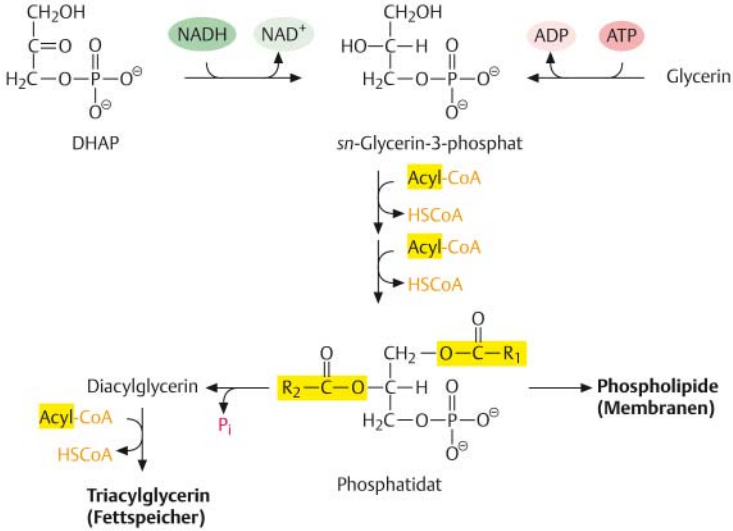


Abb. 9.**22** **Glycerolipidsynthese.** *sn*-Glycerin-3-phosphat, das aus der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat durch die *sn*-Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase mit NADH entsteht, ist das Startmolekül der Glycerolipdsynthese in Bacteria und Eukarya. Nacheinander werden zwei Fettsäurereste (Acylgruppen) von Coenzym A auf C1 und C2 von *sn*-Glycerin-3-phosphat übertragen. Dabei entsteht Phosphatidat, ein zentrales Zwischenprodukt der Lipidsynthese. Für die Synthese eines Triacylglycerins wird anschließend die Phosphatgruppe am C3 abgespalten und durch einen weiteren Fettsäurerest ersetzt. Phospholipide werden in mehreren Schritten aus Phosphatidat und einem Alkohol synthetisiert. In Archaea wird die Eingangsreaktion von der *sn*-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase katalysiert, das Produkt ist dementsprechend *sn*-Glycerin-1-phosphat.

Bei der Synthese der Sphingolipide entsteht aus Serin und Palmitoyl-CoA Sphinganin, das anschließend acyliert und weiter modifiziert wird (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Phospholipide und Glykolipide sind **Esterlipide** (Abb. 9.**21a**).

Zu den membranbildenden Lipiden gehören auch die **Etherlipide**, in denen keine Fettsäuren über eine Esterbindung mit dem Glycerin verknüpft sind, sondern Isopreneinheiten über eine Etherbindung (Abb. 9.**21b**). Sie können als **Glycerin-Diether** oder als **Glycerin-Tetraether** vorliegen (S. 26). Bei den Glycerin-Tetraethern, die vorwiegend in methanogenen und hyperthermophilen Archaea vorkommen, sind die Phytylreste der Seitenketten kovalent miteinander verbunden, sodass sie eine Lipid-Monolayer-Membran bilden, die besonders stabil ist (Abb. 2.**3**, S. 26). Da Archaea oft in Lebensräumen mit extremen Temperatur- und/oder pH-Werten leben, sind die stabileren Etherlipide vorteilhafter als Esterlipide, die unter diesen Bedingungen hydrolysieren würden. Etherlipide sind wie Esterlipide amphipathische Moleküle und lagern sich entsprechend zu Membra-

nen zusammen. Einige hyperthermophile Bacteria besitzen neben Esterlipiden auch Etherlipide.

Zu den **Isoprenoiden**, deren Grundgerüst aus Isopreneinheiten aufgebaut ist, zählen die **Steroide**, z. B. Cholesterin, die **Hopanoide** der Bacteria und die pflanzlichen Carotinoide. Hopanoide und Steroide stabilisieren prokaryotische bzw. eukaryotische Membranen (S. 27, *Biochemie, Zellbiologie*).

Poly-β-Hydroxybuttersäure

Viele Prokaryoten enthalten stark lichtbrechende, von einer aus Lipiden und Proteinen bestehenden Membran umgebene Granula aus **Poly-β-Hydroxybuttersäure** (**PHB**). PHB ist ein lineares **Poly-β-Hydroxyalkanoat** (**PHA**) aus zahlreichen Molekülen β-Hydroxybuttersäure, die über Esterbindungen miteinander verknüpft sind. PHB wird als intrazellulärer Kohlenstoff- und Energiespeicher synthetisiert, wenn das extrazelluläre Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis hoch ist, und kann unter geeigneten Wachstumsbedingungen bis zu 90 % der Zelltrockenmasse ausmachen. Untersuchungen an verschiedenen Bakterien, z. B. *Cupriavidus necator* (frühere Namen: *Alcaligenes eutrophus, Wautersia eutropha, Ralstonia eutropha)*, zeigten, dass die PHB-Synthese von Acetyl-CoA ausgeht (Abb. 9.**23**). Neben β-Hydroxybuttersäure können auch andere β-Hydroxycarbonsäuren zu PHA polymerisiert werden, die Kettenlänge der Monomere variiert dabei zwischen C_4 und C_{18}, die Polymere können linear oder verzweigt sein.

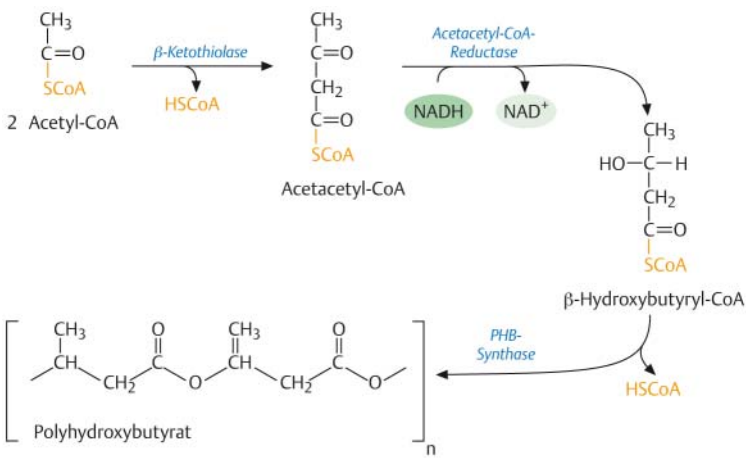


Abb. 9.**23** **Poly-β-Hydroxybuttersäure.** Ausgehend von Acetyl-CoA verläuft die Synthese von PHB in drei Reaktionsschritten: Im ersten Schritt katalysiert das Enzym β-Ketothiolase die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA, das durch die Acetacetyl-CoA-Reductase mit NADH zu β-D-Hydroxybutyryl-CoA reduziert wird. Die PHB-Synthase katalysiert nachfolgend die Polymerisation zu PHB.

Wenn keine externe Kohlenstoffquelle mehr zur Verfügung steht, erfolgt in PHB speichernden Bakterien die Mobilisierung des Polymers durch spezifische intrazelluläre Depolymerasen (i-Depolymerasen), die meist in oder auf der Granulamembran lokalisiert sind. Sie bauen native PHB-Granula, in denen die Polymerketten ungeordnet vorliegen, in der Regel zunächst zu Dimeren ab. Diese werden anschließend in Monomere gespalten und in den Zentralstoffwechsel eingeschleust. Unter mechanischem Stress, z. B. beim Zellaufschluss, werden PHA-Granula denaturiert, dabei ordnen die Polymerketten sich parakristallin an. Viele Bakterien und Pilze sind in der Lage, aus lysierten Zellen freigesetzte Polyhydroxyalkanoate als Kohlenstoffquellen zu nutzen. Sie bilden und sezernieren extrazelluläre PHA-Depolymerasen (e-Depolymerasen) , die spezifisch denaturierte PHA zu löslichen Oligo- oder Monomeren hydrolysieren, die dann aufgenommen und verstoffwechselt werden.

PHB und andere Poly-β-Hydroxyalkanoate sind **Polyester**, eine Substanzklasse, die als Kunststoffe industrielle Verwendung findet. Traditionelle Kunststoffe werden aus Erdöl hergestellt, einem rasch zur Neige gehenden Rohstoff. Sie sind sehr haltbar, als Konsequenz aber auch nur schwer abbaubar. **Biokunststoffe** lassen sich dagegen aus **nachwachsenden Rohstoffen** gewinnen und nach ihrer Nutzung ohne die Entstehung toxischer Abbauprodukte von Mikroorganismen wieder abbauen. Wie die herkömmlichen Kunststoffe Polyethylen und Polyamid sind auch PHB und zahlreiche andere **Biopolymere** **Thermoplasten**, d. h. sie können innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches reversibel verformt und so gut verarbeitet werden. Durch Variation der Monomere lassen sich physikalische und chemische Eigenschaften von Biopolymeren wie Elastizität, Reißfestigkeit oder Schmelzpunkt für unterschiedliche Anwendungsbereiche, z. B. als **medizinische Einmalartikel**, **Implantate** oder **Verpackungen**, anpassen. Durch das Substratangebot und die Wachstumsbedingungen kann die Synthese des Biopolymers entsprechend gesteuert werden, beispielsweise wird ein Copolymer aus Poly-β-Hydroxybuttersäure und Poly-β-Hydroxyvaleriansäure als Material für Kunststoffverpackungen verwendet. Durch weitere Veränderungen lassen sich Biopolymere noch stärker modifizieren und so für weitere Anwendungen erschließen, beispielsweise durch Einschluss von Medikamenten in Implantate oder durch Kopplung an mikrobizide Substanzen zur **Oberflächenimprägnierung**. Die Enzyme für die Synthese von PHB werden von drei Genen codiert, die inzwischen in Pflanzen kloniert wurden. Diese **rekombinanten Organismen** bieten ökonomische Vorteile für die Produktion des Biopolymers, da sie keine externe Kohlenstoffquelle benötigen und keine Gene für den Abbau von PHB besitzen. ◀

9.4.3 Nucleinsäuren und Proteine

Nucleinsäuren sind Polymere aus Purin- und Pyrimidinnucleotiden. **DNA** ist in allen lebenden Zellen Träger der Erbinformation, **verschiedene RNA-Arten** nehmen unterschiedliche Funktionen bei Translation und Transkription wahr, RNA-Moleküle können auch katalytisch oder regulatorisch wirken (📖 *Genetik*).

Proteine spielen eine Schlüsselrolle in allen biologischen Systemen. Dabei unterscheidet man unterschiedliche Klassen von Proteinen. **Enzyme** sind katalytische Proteine, die für den Ablauf aller Stoffwechselprozesse notwendig sind. **Strukturproteine** dagegen sind Bestandteile von Zellstrukturen, z. B. der Membranen (*Biochemie, Zellbiologie*) oder der Ribosomen. Proteine sind Polymere aus Aminosäuren, die über eine **Peptidbindung** zwischen der Carboxylgruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe der benachbarten Aminosäure kovalent verbunden sind (*Biochemie, Zellbiologie*). Je nach der Anzahl der miteinander verknüpften Aminosäuren entstehen Proteine von unterschiedlicher Länge. Die Proteinbiosynthese (Translation) findet an den Ribosomen statt (*Genetik*).

Polymere: Moleküle aus zahlreichen miteinander verknüpften identischen oder unterschiedlichen Monomeren.
Makromoleküle: Polymere mit einer Molekularmasse von mindestens 5000 Dalton, Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren.
Polysaccharide: Polymere aus glykosidisch verbundenen identischen oder unterschiedlichen Zucker-Monomeren, Funktion als Speicherstoffe oder Strukturelemente, Synthese geht von Nucleosiddiphosphat-Zuckern aus (z. B. UDP-Glucose).
Glykoproteine: Polymere aus Zuckern und einer Peptidkette, Glykosidische Bindung: O-glykosidisch oder N-glykosidisch, Funktion als Oberflächenrezeptoren.
Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB): Polymer aus β-Hydroxybuttersäure, Reservestoff bei vielen Prokaryoten.
Biopolymere: Von lebenden Zellen synthetisierte Polymere aus identischen oder unterschiedlichen Monomeren, dienen meist als Speicherstoffe, Nutzung als biologisch abbaubare Kunststoffe.
Lipide: Heterogene Gruppe von Verbindungen, die in Wasser unlöslich und in organischen Lösungsmitteln löslich sind und sich von Acetyl-CoA ableiten. Einfache und komplexe Lipide, Isoprenoide.
- **Einfache Lipide:** Triacylglyceride und Wachse, Funktion als Energiespeicher
- **Komplexe Lipide:** Membranbildende Lipide, besitzen eine hydrophile Kopfgruppe und ein hydrophobes Ende. Phospholipide und Glykolipide.

Phospholipide: Besitzen Phosphorylgruppen als hydrophile Kopfgruppe, Glycerophospholipide enthalten Glycerin, Sphingophospholipide Sphingosin.
Glykolipide: Besitzen einen oder mehrere Zuckerreste als hydrophile Kopfgruppe. Glykoglycerolipide enthalten Glycerin, Glykosphingolipide (bei Tieren) Sphingosin.
Isoprenoide: Besitzen Grundgerüst aus Isopreneinheiten, Steroide, Hopanoide und Carotinoide: Steroide stabilisieren eukaryotische Membranen, Hopanoide die Membranen der Bacteria.
Etherlipide: Besitzen Etherbindungen mit Isopreneinheiten anstelle von Esterbindungen mit Fettsäuren, kommen bei Archaea und einigen thermophilen Bacteria vor.
Nucleinsäuren: Polymere aus Nucleotiden, DNA und RNA. Funktionen als Träger der Erbinformation, katalytisch und regulatorisch.
Proteine: Polymere aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen verknüpft sind, Funktionen als Enzyme oder Strukturproteine, Translation findet an Ribosomen statt.

9.5 Die Synthese der bakteriellen Zellwand

Peptidoglykan, das Zellwandpolymer der Bacteria, wird außerhalb der Zelle, an der Außenseite der Cytoplasmamembran, aus **Disaccharid-Peptid-Blöcken** polymerisiert, die zuvor im Cytoplasma und an der Innenseite der Cytoplasmamembran synthetisiert wurden. Ausgehend vom **Zuckernucleotid UDP-Glucose** werden im Cytoplasma die beiden Saccharidbausteine **UDP-N-Acetylglucosamin** und **UDP-N-Acetylmuraminsäure** gebildet. Der Aufbau des Disaccharid-Peptid-Blocks aus Saccharidbausteinen und Aminosäuren erfolgt am membranständigen **Undekaprenylphosphat**. Gebunden an diesen Membrananker werden die Blöcke auf die Außenseite der Cytoplasmamembran transportiert. Außerhalb der Zelle erfolgt durch **Transglykosylierung** die Verknüpfung der Disaccharide zum Glykanstrang und durch **Transpeptidierung** die Vernetzung der Glykanstränge zum eigentlichen Peptidoglykan oder Murein. An der Erweiterung eines bestehenden Mureinsacculus sind neben den Syntheseenzymen auch **Peptidoglykan-Hydrolasen** beteiligt, die Bindungen im bestehenden Peptidoglykan lösen, um den Einbau neuen Materials zu erlauben. Die Erweiterung des Mureinsacculus erfolgt von innen nach außen nach dem Prinzip „**make before break**“, d. h. es wird zuerst neues Wandmaterial kovalent an den bestehenden Sacculus gebunden, bevor Bindungen in letzterem gelöst werden. An der **Steuerung der Peptidoglykansynthese** bei Zellwachstum und -teilung sind Strukturen des **Cytoskeletts** beteiligt.

9.5.1 Die Biosynthese des Peptidoglykans

Bereitstellung der Zuckerbausteine im Cytoplasma

Glucose wird in den meisten Organismen sowohl katabol zur Energiekonservierung als auch anabol zur Synthese von Speicherpolysacchariden und Strukturpolysacchariden verstoffwechselt. In jedem Fall wird die Glucose erst durch einen ATP-abhängigen Schritt in ein **Glucosephosphat** überführt und damit aktiviert. Glucosephosphate, die für Biosynthesen genutzt werden sollen, werden in allen Organismen in einem irreversiblen Schritt in **Glucosenucleotide** überführt (Abb. 9.**24**) und durch diese Markierung dem Pool der Glucosephosphate entzogen. Durch die Verknüpfung der Glucosephosphate mit unterschiedlichen Nucleotiden können diese gezielt in verschiedene Biosynthesewege eingeschleust werden.

Zur Synthese der Polysaccharidkette des Peptidoglykans nutzen die Bacteria **UDP-Glucose** (Uridindiphosphat-Glucose) als Ausgangsverbindung. Diese wird in einer Reihe von Reaktionsschritten von cytoplasmatischen Enzymen in **UDP-N-Acetylglucosamin** (UDP-G) bzw. **UDP-N-Acetylmuraminsäure** (UDP-M) über-

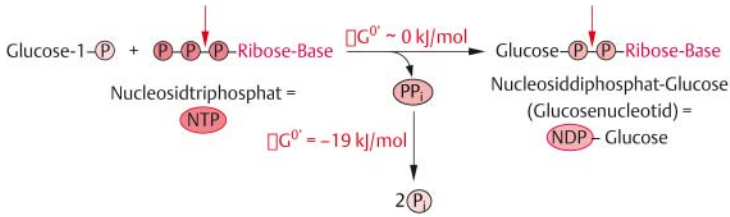


Abb. 9.**24** **Bildung eines Glucosenucleotids.** Bei der Bildung eines Glucosenucleotids wird die Phosphorsäureanhydridbindung im Nucleosidtriphosphat (Pfeil) durch eine gleichartige Bindung in der Nucleosiddiphosphat-Glucose (Pfeil) ersetzt. Durch die exergone Hydrolyse des abgespaltenen Pyrophosphats in zwei P_i wird das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Biosynthese des Glucosenucleotids verschoben. Die Gesamtreaktion ist irreversibel.

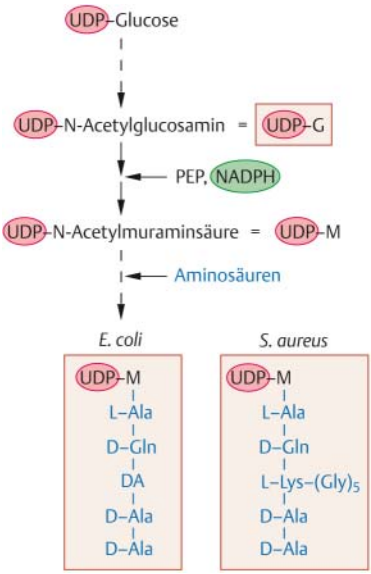


Abb. 9.**25** **Aufbau der Monosaccharidbausteine für die Peptidoglykansynthese.** Die Monosaccharidbausteine der Peptidoglykansynthese (eingerahmt) werden im Cytoplasma synthetisiert. Die Diaminosäure des an UDP-N-Acetylmuraminsäure angehängten Peptids (Diaminopimelinsäure DA in *E. coli* bzw. Lysin plus Pentaglycin in *Staphylococcus aureus*, S. 31) dient später außerhalb der Zelle der Vernetzung der Glykanstränge. Bei der Ausbildung der Peptidbrücken geht das terminale D-Alanin verloren.

führt. An die Lactylgruppe von UDP-M wird ebenfalls im Cytoplasma das Peptid angeknüpft, das später zur Vernetzung der Glykanstränge im Mureinsacculus dienen wird (Abb. 9.**25**).

Reaktionsschritte an der Cytoplasmamembran

Die Monosaccharidbausteine für die Peptidoglykanbiosynthese werden nun an der Cytoplasmamembran zu einem **Disaccharid-Peptid-Block** zusammengesetzt

und dieser durch die Membran nach außen transportiert. Als **Membrananker** für die Intermediate der Peptidoglykanbiosynthese dient **Undekaprenylphosphat**. Dabei handelt es sich um einen Isoprenoid-Alkohol, der mit seiner hydrophoben, aus 11 Isopreneinheiten bestehenden Kohlenstoffkette in die Cytoplasmamembran eingelagert ist und dessen Alkoholfunktion mit Phosphorsäure verestert ist. Auf diese hydrophile Gruppe des Zuckercarriers können Zuckerphosphate übertragen werden (Abb. 9.**26**).

Im Fall der Peptidoglykansynthese wird Undekaprenylphosphat mit N-Acetylmuraminsäure-1-phosphat (+ Peptid) beladen. Am Zuckercarrier erfolgt dann die Anknüpfung von N-Acetylglucosamin an das C4 der N-Acetylmuraminsäure (β1→4-glykosidisch). Damit ist der Disaccharid-Peptid-Block fertig, der im Anschluss über die Membran verlagert wird (Abb. 9.**27**). Nach Verknüpfung der Bausteine zum fertigen Peptidoglykan (s. u.) kehrt der Zuckercarrier, der dann keine Zuckerbausteine, aber noch die ursprünglich von der UDP-N-Acetylmuraminsäure stammende Phosphatgruppe trägt, auf die Membraninnenseite zurück. Energie für den Zyklus des Carriers liefert die hydrolytische Abspaltung dieser Phosphatgruppe (Pyrophosphathydrolyse). Diese Reaktion wird durch **Bacitracin**, ein von einigen *Bacillus*-Arten gebildetes Antibiotikum, gehemmt. Der genaue Mechanismus für den Transport der an Undekaprenylpyrophosphat geknüpften hydrophilen Zuckerbausteine durch die hydrophobe Membran ist nicht bekannt. In einigen Organismen sind jedoch Proteine identifiziert worden, die diesen Transport katalysieren könnten.

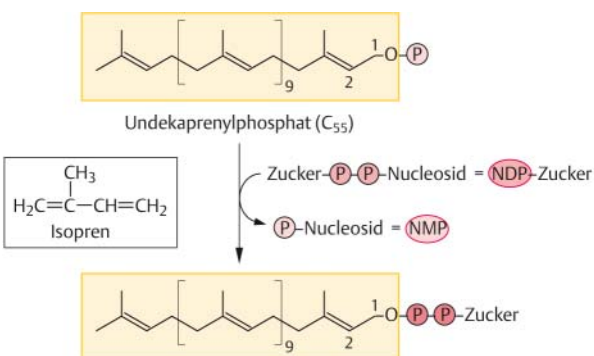


Abb. 9.**26** **Beladung von Undekaprenylphosphat mit einem Zuckerphosphat.** Das Zuckerphosphat (Zucker-1-Phosphat) wird in Form eines Zuckernucleotids (NDP-Zucker) angeliefert. Bei der Übertragung auf den Zuckercarrier Undekaprenylphosphat wird die Phosphorsäureanhydridbindung im UDP-Zucker durch eine ebensolche Bindung im beladenen Zuckercarrier ersetzt.

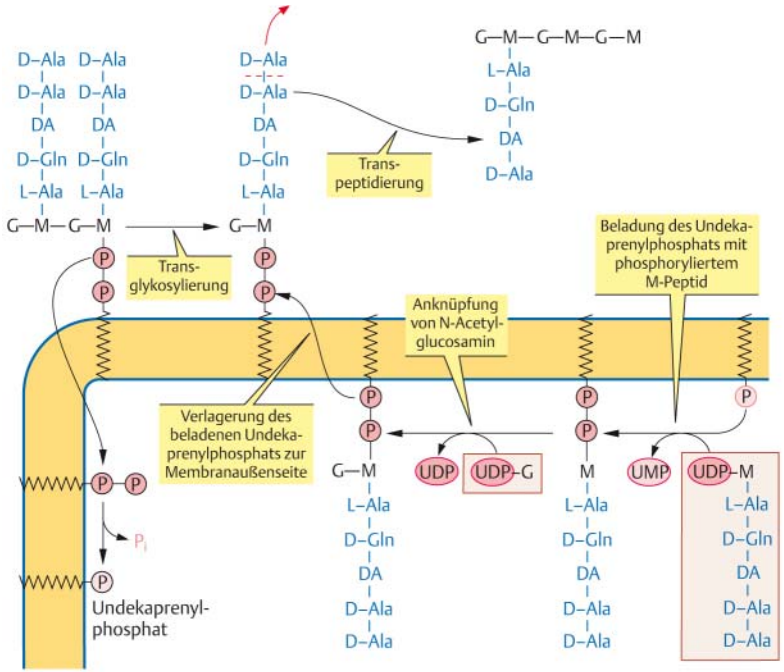


Abb. 9.**27** **Membran-gebundene Schritte der Peptidoglykansynthese.** Die im Cytoplasma synthetisierten Monosaccharidbausteine UDP-N-Acetylmuraminsäure-Peptid (UDP-M-Peptid) und UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-G) sind eingerahmt. Die Aminosäureabfolge des Peptids und die Ausbildung der Peptidbrücke zeigt die Situation in *E. coli*.

Auch für andere komplexe Polysaccharide, die außerhalb des Cytoplasmas zu finden sind, z. B. das Lipopolysaccharid der äußeren Membran gramnegativer Bacteria, die Teichonsäuren der grampositiven Bacteria und einige Kapsel-, Schleim- und Exopolysaccharide, ist eine Beteiligung des Zuckercarriers Undekaprenylphosphat bekannt. So wird **Xanthan**, das Exopolysaccharid von *Xanthomonas campestris*, aus Baublöcken von fünf Zuckern zusammengesetzt, die ausgehend von Zuckernucleotiden am Zuckercarrier an der Innenseite der Cytoplasmamembran synthetisiert werden, dann nach außen transportiert und schließlich dort zum fertigen Polysaccharid zusammengesetzt werden.

Beim **Lipopolysaccharid** der gramnegativen, äußeren Membran (LPS) muss in Bezug auf die Biosynthese des Polysaccharidanteils zwischen Kernoligosaccharid und O-spezifischer Seitenkette unterschieden werden. Beide Teile werden auf der Innenseite der Cytoplasmamembran synthetisiert. Das Kernoligosaccharid wird jedoch direkt an das in die Membran eingelagerte Lipid A (Lipidteil des LPS) angehängt, das also den eigenständigen Membrananker des Kernoligosaccharids darstellt und durch den Wechsel vom inneren ins äußere Blatt der Membran das Kernoligosaccharid zum Periplasma orientiert. Die O-spezifische Seitenkette wird jedoch erst im Periplasma angeknüpft. Die Blöcke aus vier oder fünf Zuckern, die sich in der fertigen O-spezifischen Seitenkette in

variabler Anzahl wiederholen, benötigen daher das Undekaprenylphosphat als Membrananker. An diesem werden die Blöcke ausgehend von Zuckernucleotiden zusammengesetzt, zur Außenseite der Membran transferiert und zur O-spezifischen Seitenkette verknüpft, die schließlich auf Lipid A/Kernoligosaccharid übertragen wird. Über den Transport durchs Periplasma, zur äußeren Membran und durch diese hindurch gelangt das fertige LPS dann an seinen Bestimmungsort, das äußere Blatt der äußeren Membran.

Ausschließlich extrazellulär und damit ohne Beteiligung des membranständigen Zuckercarriers synthetisiert *Leuconostoc mesenteroides* das Exopolysaccharid **Dextran**. Bei diesem handelt es sich um ein nur aus Glucose bestehendes Polymer (α1→6-glykosidische Bindung), das das Bakterium nur synthetisiert, wenn ihm Saccharose (Glucose-α1→β2-Fructose) im Überschuss zur Verfügung steht. Da die Glucose zur Synthese der Polyglucose nicht modifiziert werden muss und in der Saccharose bereits in glykosidischer Bindung vorliegt, ist eine Aufnahme in die Zelle nicht nötig. Stattdessen bildet das Bakterium ein Exoenzym (Dextransaccharase), das außerhalb der Zelle die Übertragung der Glucose aus der glykosidischen Bindung in der Saccharose auf die wachsende Polyglucosekette (ebenfalls in glykosidischer Bindung) katalysiert. Die anfallende Fructose setzt der Organismus im Energiestoffwechsel um. Dextran wird als Blutplasmaersatz verwendet.

Transglykosylierung und Transpeptidierung

Die Polymerisierung der Disaccharid-Peptid-Blöcke zu Glykansträngen und die Vernetzung der Glykanstränge zum Peptidoglykan erfolgt außerhalb der Cytoplasmamembran durch zwei **Transferreaktionen**. Es wird zum einen die glykosidische Bindung zwischen den Disaccharidblöcken geknüpft und zum anderen werden die Peptide benachbarter Glykanstränge durch eine Peptidbindung verbunden (Abb. 9.**27**). Die Ausbildung der glykosidischen Bindung erfolgt in Form einer **Transglykosylierung**: Eine wachsende Glykankette wird mit C1 seiner endständigen N-Acetylmuraminsäure auf C4 des N-Acetylglucosaminrestes eines Disaccharidblockes übertragen. Dabei wird an der wachsenden Glykankette die Esterbindung zur Phosphatgruppe am Zuckercarrier aufgelöst und die glykosidische Bindung zum N-Acetylglucosamin des Disaccharidblockes gebildet. Die Verknüpfung des Disaccharidblockes zum Zuckercarrier bleibt erhalten, sodass dieser nun die um zwei Zucker verlängerte Glykankette trägt.

Die Ausbildung der Peptidbrücken erfolgt durch **Transpeptidierung**. Die Peptide der Disaccharidblöcke tragen eine endständige, in der fertigen Peptidbrücke fehlende Aminosäure (D-Ala). Die Peptidbindung zu dieser endständigen Aminosäure wird aufgelöst und gleichzeitig eine Peptidbindung der folgenden Aminosäure zur Diaminosäure eines benachbarten Glykanstranges ausgebildet. Im einlagigen Mureinsacculus von *E. coli* werden 50–60 % der Peptide der Glykanketten zur Ausbildung von Peptidbrücken genutzt, eine Carboxypeptidase spaltet an ungenutzten Peptiden die beiden terminalen D-Alaninreste ab. Bei dem grampositiven Organismus *Staphylococcus aureus* sind bis zu 90 % der Peptide zu Peptidbrücken verbunden. Hier sind die Peptidbrücken durch Pentaglycin-Interpeptide (S. 31) länger und flexibler und erlauben die Ausbildung von Brücken zwischen übereinander liegenden Peptidoglykanschichten.

Ein direkter Energieaufwand zur Ausbildung der Peptidoglykanstruktur aus den Disaccharid-Peptid-Blöcken ist nicht nötig und dieser wäre außerhalb der Zelle auch nicht zu leisten, da eine Regenerierung von ATP dort nicht möglich ist. Vielmehr wird bei den Transferreaktionen jeweils die freie Energie der gelösten Bindung zum Aufbau der neuen Bindung genutzt. Die Gleichwertigkeit von gelöster und geknüpfter Bindung hat jedoch zur Folge, dass die Ausbildung der Peptidoglykanstruktur nicht gegenüber seiner Zerlegung in die Ausgangsbausteine bevorzugt ist. Erst die stark exergone, hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe vom Undekaprenylpyrophosphat sorgt dafür, dass die Reaktionen irreversibel in Richtung der Peptidoglykanbildung ablaufen.

Gewöhnlich besitzen Bakterien eine ganze Reihe von Enzymen, die für die Katalyse von Transglykosylierung und Transpeptidierung verantwortlich sind. Neben monofunktionellen Transglykosylasen und Transpeptidasen gibt es auch bifunktionelle Enzyme, die beide Reaktionen katalysieren. In der Regel sind diese Enzyme über eine N-terminale Signalsequenz in der Cytoplasmamembran verankert. Alle Enzyme mit Transpeptidaseaktivität werden auch als **Penicillin-Binde-Proteine** bezeichnet, da **Penicillin** und andere **β-Lactam-Antibiotika** an das katalytische Zentrum dieser Enzyme binden und dadurch die Transpeptidierung verhindern.

9

Peptidoglykan wird ausschließlich von Vertretern der Bacteria gebildet. Die Peptidoglykansynthese stellt daher einen geeigneten Ansatzpunkt für Antibiotika dar. Bekanntestes Beispiel für ein Antibiotikum, das in die Zellwandsynthese eingreift, ist das Penicillin. Penicilline und Cephalosporine tragen einen β-Lactamring (Abb. 9.**28**), mittels dessen sie an einen Serinrest im katalytischen Zentrum der Transpeptidasen (Penicillin-Binde-Proteine) binden und diese inaktivieren. **β-Lactam-Antibiotika** verhindern daher die Vernetzung der Glykanstränge im wachsenden Mureinsacculus und führen so zur Lyse der Zellen. Bakterien, die gegen β-Lactam-Antibiotika resistent sind, verfügen in der Regel über eine β-Lactamase, ein Enzym, das den Lactamring spaltet und das Antibiotikum dadurch inaktiviert.

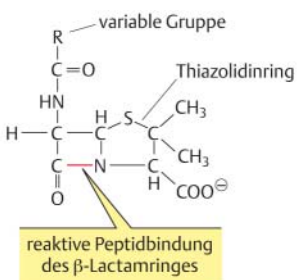


Abb. 9.**28** **Allgemeine Struktur der Penicilline.**

Einbau von neuem Peptidoglykan in den Mureinsacculus

Die im Cytoplasma, an der Cytoplasmamembran und außerhalb der Zelle ablaufenden Reaktionen der Peptidoglykansynthese bilden die Grundlage für die Bereitstellung neuen Wandmaterials. Zur **Erweiterung der Mureinsacculus** muss dieses in das bestehende Peptidoglykannetz integriert werden. Dies ist nur möglich, wenn im alten Material kovalente Bindungen gelöst werden. Tatsächlich sind in einigen gut untersuchten Organismen neben den Enzymen für die Peptidoglykansynthese auch **Peptidoglykan-Hydrolasen**, für jede der im Peptidoglykan vorkommenden Bindungen, nachgewiesen. Da der Mureinsacculus jedoch zu jedem Zeitpunkt mechanisch belastbar sein muss, um seine Funktion als Exoskelett erfüllen zu können, bedarf es einer strengen Kontrolle dieser Hydrolasen. Modelle für das Wachstum des Mureinsacculus fordern daher für alle Umbauarbeiten im Peptidoglykan die Einhaltung des Prinzips „**make before break**“. Danach werden neue Peptidoglykanstränge zuerst kovalent, über Peptidbrücken unter bestehende, zu diesem Zeitpunkt mechanisch belastete Wandschichten geknüpft. Erst danach werden Bindungen im alten Material gelöst und die neuen Bindungen belastet. Entsprechend wächst der Mureinsacculus von innen nach außen.

Abb. 9.**29** zeigt schematisch, wie entsprechend dieses Modells das Wachstum des Mureinsacculus bei grampositiven und gramnegativen Bacteria erfolgt. Bei der aus vielen Peptidoglykanschichten bestehenden Zellwand **grampositiver** Bacteria werden auf der **Innenseite** der Wand **neue** Peptidoglykanschichten durch die in der Cytoplasmamembran verankerten Polymerasen gebildet (Abb. 9.**29a**). Auf der Außenseite der Wand werden die **ältesten** Schichten **hydrolytisch** abgebaut. Dadurch wandert neu gebildetes Material kontinuierlich in den unter mechanischer Belastung stehenden Bereich der

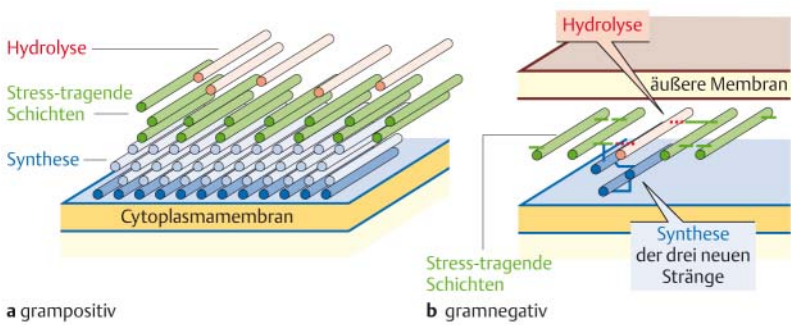


Abb. 9.**29** **Wachstum der Zellwand** bei grampositiven (**a**) und bei gramnegativen (**b**) Bacteria (Modell nach Templin und Höltje). Neues Peptidoglykan wird auf der der Cytoplasmamembran zugewandten Seite der Zellwand gebildet und kovalent mit dem bestehenden Mureinsacculus verbunden. Durch gezielte Hydrolyse von Bindungen auf der Außenseite der Zellwand werden Peptidoglykanstränge aus dem Sacculus entfernt und das neu angeknüpfte Material in die unter Spannung stehende Schicht integriert.

Wand und erweitert diese. Für das Wachstum der aus nur einer Peptidoglykanschicht bestehenden Zellwand **gramnegativer** Bacteria wird angenommen, dass jeweils **drei neue**, miteinander quervernetzte Peptidoglykanstränge über Peptidbrücken **unter die bestehende** Peptidoglykanschicht gehängt werden (Abb. 9.**29b**). Herauslösen des **darüber liegenden**, **alten** Peptidoglykanstrangs durch **hydrolytische** Spaltung der Peptidbindungen, führt zur Integration der drei neuen Stränge in den unter Spannung stehenden, einschichtigen Mureinsacculus. Peptidoglykan synthetisierende Enzyme und Peptidoglykan hydrolysierende Enzyme könnten in diesem Fall einen Multienzymkomplex bilden, der an der Innenseite des Mureinsacculus entlang gleitend kontinuierlich drei neue Peptidoglykanstrang integriert und einen entfernt. Die Freisetzung von Mureinbruchstücken beim Wachstum des Mureinsacculus ist sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Bacteria belegt. Murein-Abbauprodukte werden zum Teil wiederverwertet, also in die Zelle aufgenommen, zerlegt und wieder in den Peptidoglykansyntheseweg eingeschleust. Sie fungieren auch als Signalstoffe, die die Zelle über den Zustand des Mureinmetabolismus informieren.

Steuerung der Peptidoglykansynthese bei Wachstum und Teilung

Bakterienzellen können durch Vergrößerung ihres Zellvolumens und durch Teilung der Zelle wachsen. In beiden Fällen bedarf es einer zeitlichen und räumlichen Koordinierung der Peptidoglykansynthese. Es wird angenommen, dass die **Strukturen des Cytoskeletts** (S. 51) an der Steuerung der Zellwandsynthese beteiligt sind: In *Bacillus subtilis* bildet ein zur Actinfamilie zählendes Protein auf der Innenseite der Cytoplasmamembran ein Gerüst in Form einer Helix und dirigiert die Peptidoglykansynthese an der Außenseite der Membran. Die Bildung neuer Zellwand erfolgt dann ebenfalls in einem helikalen Band und führt so zur Verlängerung der Stäbchenform. Stäbchenförmige Bakterien bilden neues Peptidoglykan sowohl in ihrer seitlichen Wand als auch im Teilungsseptum bei der Zellteilung. Sie verfügen über Peptidoglykansyntheseenzyme, die für die jeweilige Art der Wandsynthese spezifisch sind. Bei vielen Kokken erfolgt die Neusynthese neuen Wandmaterials ausschließlich zum Aufbau des Teilungsseptums während der Zellteilung. Die Peptidoglykansynthese wird hier offenbar durch das zum eukaryotischen Tubulin homologe FtsZ-Protein gesteuert.

9.5.2 Biosynthese archaebakterieller Zellwände

Die Proteine oder Glykoproteine, die die als S-Layer (surface layer) bezeichneten Zellwände vieler Archaea bilden (S. 34), werden im Cytoplasma synthetisiert und anschließend auf die Außenseite der Membran transportiert. Ein N-terminaler Proteinabschnitt, der im reifen Protein fehlt, ist für die Erkennung und den Transport der Proteine durch den Proteintranslokationsapparat verantwortlich. Der Saccharidanteil der Glykoproteine wird offenbar ausgehend von Zuckernucleotiden synthetisiert. In einigen Organismen wurde gezeigt, dass Bacitracin die Glykosylierung der S-Layer-Proteine verhindert. Daher wird angenommen, dass am Zusammenbau der Saccharidketten der Glykoproteine Undekaprenylphosphat als Membrananker beteiligt ist.

Glucosenucleotide: Mit einem Nucleosid-Monophosphat markiertes Glucosephosphat; die Markierung dient der Einschleusung des aktivierten Zuckers in verschiedene Biosynthesewege.
UDP-N-Acetylglucosamin: Aktivierter Monosaccharidbaustein für die Peptidoglykanbiosynthese.
UDP-N-Acetylmuraminsäure: Aktivierter Monosaccharidbaustein für die Peptidoglykanbiosynthese.
Undekaprenylphosphat: Membrananker für Oligosaccharidbausteine, die intrazellulär gebildet und extrazellulär polymerisiert werden; Transfer über die Membran erfolgt gebunden an Membrananker.
Transglykosylierung: Knüpfung der glykosidischen Bindung zwischen den im Cytoplasma synthetisierten Disaccharidblöcken.
Transpeptidierung: Ausbildung der Peptidbindung zwischen den Peptiden benachbarter Glykanstränge.
Penicillin-Binde-Proteine: Enzyme mit Transpeptidaseaktivität.
β-Lactam-Antibiotika: Antibiotika, die die Transpeptidierung hemmen; besitzen als strukturelles Merkmal einen β-Lactamring.
Peptidoglykan-Hydrolasen: Enzyme, die Bindungen im Peptidoglykan hydrolytisch spalten.

10 Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen

Martina Jahn, Dieter Jahn

10.1 Grundlagen der Anpassung von Mikroorganismen an Veränderungen in ihrem Lebensraum

Mikroorganismen haben sich viele **verschiedene Lebensräume** dieser Erde erfolgreich erobert. Dazu haben sie einerseits eine hoch spezialisierte biochemische **Ausstattung** entwickelt, um sich extreme Habitate, wie heiße Quellen, Salz- und Alkaliseen sowie anaerobe Lebensräume zu erschließen. Andererseits besitzen sie vielfältigste, hoch koordinierte **Anpassungsmechanismen**, um sich an ändernde Umweltparameter, wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Nährstoffversorgung, auch im nicht extremen Habitat schnell und effizient anzupassen. Anpassungsmechanismen benötigen die Aufnahme des Umweltreizes, eine Anpassung der Genexpression auf Ebene der Transkription, der Translation der gebildeten mRNA sowie bei der Stabilität und Funktion der synthetisierten Proteine. Eine schnelle und hoch entwickelte Anpassungsmaschinerie ist die biochemische Grundlage der Erfolgsgeschichte dieser Organismen.

10.1.1 Organismus und Umwelt

Versteht man eine Mikrobenzelle als ein großes biochemisches Laboratorium, wird klar, dass sie den gleichen chemischen und physikalischen Gesetzen unterliegt, die für chemische Reaktionen gelten. Da Mikrobenzellen meist von einer semipermeablen Membran und einer Zellwand umgeben sind, bestimmen hauptsächlich **Temperatur**, **pH-Wert**, **Redoxzustand** und **Osmolarität** über die zentralen intrazellulären Funktionen. Neben diesen physikalischen und chemischen Parametern ist die Versorgung mit essentiellen Zellbausteinen, wie Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor oder Schwefel, wichtig für den Baustoffwechsel. Außerdem werden energiereiche **Substrate** für den Energiestoffwechsel benötigt. Die Verfügbarkeit dieser Verbindungen sowie die oben erwähnten physikalischen **Umweltparameter** verändern sich ständig durch wechselnde Bedingungen im Lebensraum.

Mikroorganismen leben normalerweise nicht allein in ihrem Habitat, sondern in **Konkurrenz** mit vielen anderen Spezies. Um das Überleben und die Vermehrung eines Mikroorganismus sicher zu stellen, ist eine optimale Anpassung an die jeweiligen Gegebenheiten des Standortes und seiner Veränderungen notwendig.

10.1.2 Umweltreiz und molekulare Antwort

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, mit diesen Umweltfaktoren umzugehen und diese sogar für die eigene Konkurrenzfähigkeit zu nutzen. Prinzipiell kann man **drei unterschiedliche Strategien** unterscheiden: Einerseits erschließen Organismen mit einer hoch **spezialisierten** biochemischen Ausstattung extreme Standorte, wie heiße Quellen, arktisches Eis, Salz- oder Natronseen und erobern damit ökologische Nischen, andererseits setzen sich Mikroorganismen in populären, weniger extremen Habitaten durch, die fähig sind, sich schnell und **vielseitig** an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen. Schließlich können Mikroorganismen **Gemeinschaften** bilden, sogenannte **Biofilme**, die ihnen eine arbeitsteilige Gesellschaft und besonders Schutz vor einer feindlichen Umwelt gewähren (S. 265). So sind zum einen die Spezialisten, zum anderen die Alleskönner, aber auch die Geselligen gefragt.

Grundvoraussetzung jeder Anpassungsreaktion ist die **Wahrnehmung** des Umweltreizes. Einfach ausgedrückt heißt das, die Zelle misst Veränderungen im Lebensraum. Dazu besitzen Mikroorganismen vielfältige **Rezeptoren**. In Abhängigkeit von den zu messenden Umweltparametern findet man diese auf der Zelloberfläche oder auch im Zellinneren. So werden einige Umweltreize direkt außen detektiert. Andere werden intrazellulär gemessen: Gase, wie Sauerstoff oder Stickstoff, oder physikalische Reize, wie Temperatur oder Druck, passieren die Zellmembran frei. Andere Signal auslösende Substanzen müssen erst mittels eines Transporters in die Zelle eingebracht werden. Dort können neben der eigentlichen transportierten Substanz auch deren Stoffwechselprodukte als Signal dienen.

Um eine zelluläre **Antwort** auf den Umweltreiz auszulösen, kann der Rezeptor im einfachsten Fall selbst als **Regulator** wirken. Komplexer ist die Übertragung des Reizes vom Rezeptor über eine **Signaltransduktionskette** zu einem Regulator (Abb. 10.**1**). Der Regulator verändert die Physiologie der Zelle so, dass der Organismus effizienter unter den veränderten Umweltbedingungen leben kann. Dafür sind oft neue Proteine mit enzymatischer oder struktureller Funktion nötig. Deren Bildung steuern aktivierte Regulatoren durch Kontrolle der **Expression** zugehöriger Gene. Sie können die **Transkription** dieser Gene induzieren oder reprimieren, die Stabilität der gebildeten **mRNA** modulieren und deren **Translation** verändern. Neben der Bildung neuer Proteine werden im Rahmen der gleichen Anpassungsreaktion eine Reihe von anderen Proteinen nicht mehr gebraucht. Zum Beispiel benötigt man die Enzyme der Sauerstoffatmung unter anaeroben Bedingungen nicht mehr. Entsprechend wird deren Bildung durch negative Genexpressionskontrolle verringert. Gleichzeitig ist möglich, nicht mehr benötigte Proteine einem geregelten **Proteinabbau** durch Proteasen zuzuführen.

Schließlich kann die Aktivität schon **vorhandener zellulärer Komponenten** durch Regulatoren, aber auch direkt durch den Umweltreiz selbst verändert wer-

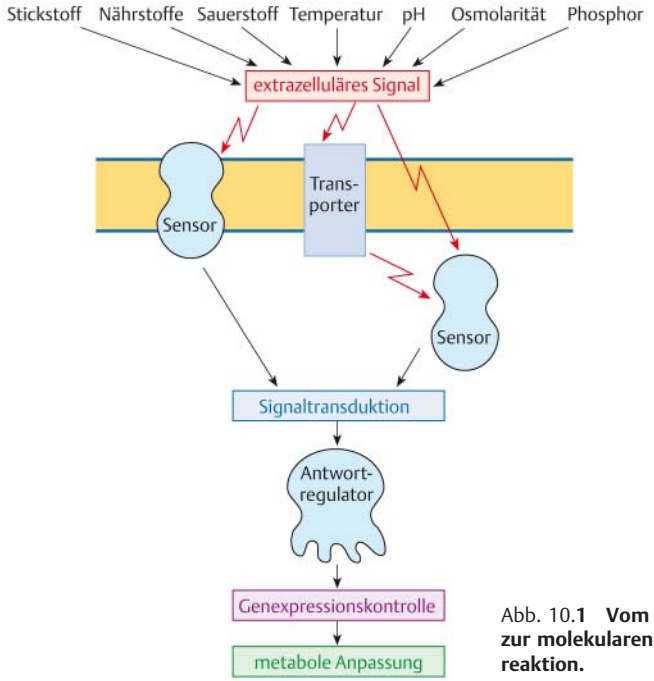


Abb. 10.**1** **Vom Umweltreiz zur molekularen Anpassungsreaktion.**

den. Dabei können Enzyme in ihrer katalytischen Aktivität verändert werden oder Transporter in der Membran ihre Funktion aufnehmen oder einstellen.

Die Anpassung wird durch ein komplexes Netzwerk von Regulatoren garantiert. Die Notwendigkeit eines komplexen **Regulationsnetzwerkes** ergibt sich aus der einfachen Tatsache, dass viele Umweltreize gleichzeitig auf eine Zelle treffen. So verändert ein Regenschauer für ein Bakterium der oberen Schichten des Bodens die Osmolarität, den Sauerstoffpartialdruck, die Temperatur und den Zugang zu Nährstoffen. Für diese Parameter existiert eine Vielzahl von Rezeptoren und Regulatoren. Das Netzwerk integriert durch das Zusammenspiel aller Regulationssysteme die Antworten auf diese vielfältigen Reize zu einer Gesamtantwort, die sich in einer kurzfristigen Verschiebung des zellulären Gleichgewichtszustandes äußert, bis eine neue Anpassungsreaktion erfolgt. Daraus wird ersichtlich, dass Anpassung ein permanenter Prozess ist, solange ein Organismus lebt.

10.1.3 Regulatoren der Anpassung

Entsprechend der Vielfalt der von Mikroorganismen besiedelten Standorte dieser Erde, der dort herrschenden Umweltbedingungen und deren spezifischer Veränderungen, ist ein breites Spektrum von Anpassungsstrategien nötig. Die Variabilität und hohe Spezifität der Anpassung wird nicht durch eine unendliche Anzahl von Rezeptoren und Regulatoren erreicht, sondern durch die vielseitige **Kombination** strukturell verwandter Regulationssysteme. Eine begrenzte Anzahl von Grundrezeptor- und Regulatortypen wurde für unterschiedliche Zwecke, wie die Messung von Nitrat, Phosphat sowie der Zelldichte, im Laufe der Evolution vielfältig strukturell modifiziert. Auf diese Weise entstanden **Rezeptor/Regulator-Familien**. Eine zweite Ebene der Vielfältigkeit wird durch organismusspezifische Kombination und Verwendung dieser Regulationssysteme erreicht.

Jeder Mikroorganismus hat durch seine einmalige Ausstattung mit diesen spezialisierten Regulationssystemen die für sich optimale, molekulare Überlebensstrategie entwickelt. Für die Erforschung dieser Mechanismen bedeutet dies oft, dass sich die für einen Organismus gewonnenen Erkenntnisse nicht automatisch auf alle anderen übertragen lassen. Trotzdem lassen sich einige **Regulationsprinzipien** ableiten.

Zweikomponenten-Regulationssysteme

Viele regulatorische Systeme, mit denen Mikroben Umweltsignale wahrnehmen und darauf reagieren, bestehen aus zwei Teilen und werden daher als **Zweikomponenten-Regulationssysteme** bezeichnet. Diese Systeme enthalten eine signalspezifische Sensorkinase, die oft in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und ein intrazelluläres Antwortregulatorprotein. Die Sensorkinase wirkt als **Rezeptor**, der das Umweltsignal wahrnimmt (📖*Zellbiologie, Biochemie*). Sie reagiert auf ein Umweltsignal mit einer Autophosphorylierung an einem spezifischen Histidinrest auf der Proteinoberfläche. Dazu wird ATP in ADP plus P_i gespalten. Die Phosphatgruppe der Sensorkinase wird dann anschließend auf einen Aspartatrest des zugehörigen Antwortregulators übertragen. Durch diese **Phosphorylierung** wird die Konformation des Regulators verändert und dieser so aktiviert. Der **Regulator** ist typischerweise ein **DNA-bindendes Protein**, das die Transkription von Genen reguliert, deren codierte Proteine in ihrer zellulären Konzentration verändert werden sollen. Für das Beenden der Antwort auf einen Umweltreiz wird eine spezifische Phosphatase benötigt, welche die Phosphatgruppe wieder vom Antwortregulator entfernt. In manchen Fällen übernimmt diese Funktion die Sensor-Kinase selbst, in anderen Fällen ist ein drittes Protein dazu nötig (Abb. 10.**2**).

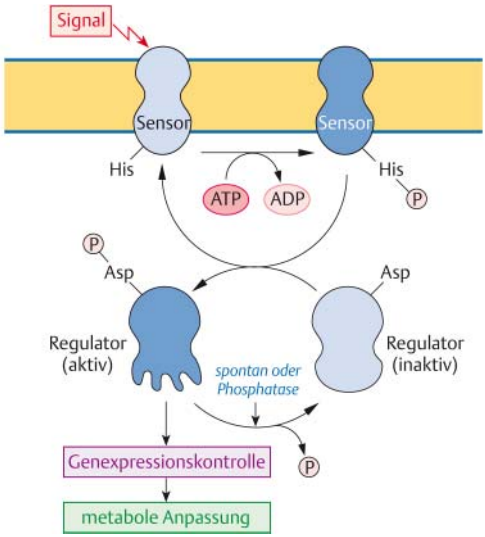


Abb. 10.**2** **Funktion eines Zweikomponenten-Regulationssystems.**

10

Alternative Sigmafaktoren

Bisher beschriebene Regulatoren der Genexpression entfalten ihre Wirkung durch Promotorbindung und anschließende Wechselwirkung mit der **RNA-Polymerase**. Die bakterielle RNA-Polymerase besitzt eine **σ-Untereinheit,** genannt **Sigmafaktor**, die die Promotorerkennung vermittelt. Unter Wachstumsbedingungen wird ein Hauptteil der Gene durch eine RNA-Polymerase transkribiert, die den **vegetativen Sigmafaktor** trägt, in *Escherichia coli* σ^{70} oder RpoD genannt. Die Zahl 70 bedeutet, dass das Protein eine relative molekulare Masse von 70 000 besitzt. Veränderte Umweltbedingungen führen dazu, dass die RNA-Polymerase einen anderen, **alternativen Sigmafaktor** bindet, über den sie an andere Promotoren dirigiert wird. Analog zu den Antwortregulatoren sind dies Promotoren von Genen, deren codierte Proteine an der zellulären Antwort auf das Umweltsignal beteiligt sind. Wichtige alternative Sigmafaktoren, zugehörige Umweltreize und regulierte physiologische Prozesse sind für das Enterobakterium *E. coli* in Tab. 10.**1** zusammengefasst. Für *Streptomyces avermitilis* sind 60 verschiedene Sigmafaktoren codierende Gene beschrieben worden.

Transkriptionsfaktoren

Die Effizienz der RNA-Polymerase mit σ-Untereinheit einen Promotor zu erkennen und dort die Transkription eines Gens zu initiieren, wird sehr stark von zusätzlichen Regulatoren, sogenannten **Transkriptionsfaktoren**, bestimmt. Dazu gehören auch die Antwortregulatoren der Zweikomponenten-Systeme.

Tab. 10.1 **Alternative Sigmafaktoren von *E. coli*.**

Sigmafaktor	*Gen*	*System*	*Umweltreiz*	*Regulierte Prozesse*
σ^{70}	*rpoD*	vegetatives Wachstum	–	Wachstum
σ^{38}	*rpoS*	Stationärphase	verlangsamtes Zellwachstum, diverse Formen von Umweltstress	Stressresistenzbildung
σ^{54}	*rpoN*	Stickstoffhaushalt	Menge an reduziertem Stickstoff	Stickstoffnutzung und Stickstoffeinbau
σ^{32}	*rpoH*	Hitzeschock	hohe Temperaturen	Stabilisierung, Faltung, Abbau von Proteinen
σ^{24}	*rpoE*	extrazellulärer Hitzeschock	hohe Temperaturen	Proteinabbau, σ^{32}
σ^{28}	*rpoF*	Flagellenbildung	anziehende oder abstoßende Substanzen	Chemotaxis, Bewegung
σ^{19}	*fecJ*	Eisentransport	Eisenmangel	Citrat-abhängiger Eisentransport

Zusätzlich gibt es eine Vielzahl von einzelnen Transkriptionsfaktoren, die auf extra- und intrazelluläre Signale ansprechen. **Aktivatoren** induzieren die Transkription, während **Repressoren** diese unterdrücken. Wird ein Repressor durch ein Signal aktiv, führt dies zur Verminderung der Transkription des Zielgens. Wird ein Repressor durch ein Signal inaktiviert, führt dies zur Derepression des Zielgens und zu dessen verstärkter Transkription. Viele verschiedene Regulatoren können an einem Promotor kooperieren, aber auch konkurrieren. So können verschiedene Signale permanent auf ein Zielgen wirken und dessen Transkription optimal für den momentanen Lebenszustand der Zelle einstellen.

Man kann Transkriptionsfaktoren auch nach der Struktur ihrer **DNA-Bindungsdomänen** einteilen. In prokaryotischen Transkriptionsregulatoren findet man oft das Helix-turn-Helix-Motiv, während bei eukaryotischen Regulatoren der Zinkfinger oder eine Dimerisation über einen Leucin-Zipper verbreitet sind (📖 *Biochemie, Zellbiologie*).

10.1.4 Regulon, Modulon, Stimulon

Die Nomenklatur zur Einteilung von Genen und Genfamilien, die als Antwort auf einen Umweltreiz reguliert werden, leitet sich vom Operonbegriff ab. Als **Operon** bezeichnet man eine Reihe von Genen, die hintereinander auf dem Chromosom angeordnet sind. Sie werden von einem **gemeinsamen Promotor** gesteuert zu einer mRNA transkribiert und stellen somit eine **Transkriptionseinheit** dar. Ursprünglich implizierte der Begriff Operon auch eine gemeinsame Funktion der

codierten Proteine. Heute wird der Operonbegriff oft synonym zum eigentlichen Begriff der Transkriptionseinheit, dem **Cistron**, verwendet.

In einem **Regulon** werden mehrere Gene und Operons, die durch einen **gemeinsamen Regulator** reguliert werden, zusammengefasst. Ein Beispiel für ein Regulon ist die Regulation der Arabinoseverwertung in *E. coli* durch die Kontrolle der zwei Operons *araBAD* und *araFGH* sowie der Gene *araE* und *araJ* durch den Regulator AraC in Anwesenheit von Arabinose. Alle Gene zusammen codieren alle zur Arabinoseverwertung nötigen Enzyme.

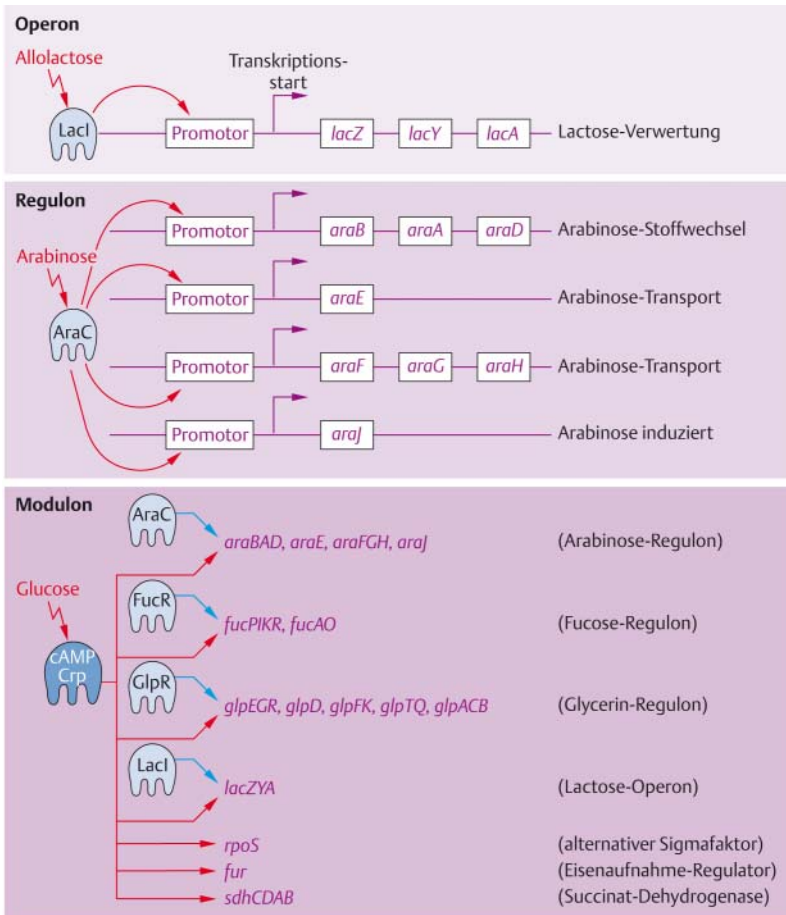


Abb. 10.3 **Aufbau eines Operons, Regulons und eines Modulons.** Als Beispiele sind das *lac*-Operon, das *ara*-Regulon und das cAMP-Crp-Modulon von *E. coli* gezeigt. Das *lac*-Operon und das *ara*-Regulon sind Bestandteile des cAMP-Crp-Modulons.

Ein **Modulon** kann aus einer Vielzahl von Operons und Regulons bestehen, die alle unter der Kontrolle eines **übergeordneten Regulatorsystems** stehen, das auf einen spezifischen Umweltreiz anspricht. Dabei wird die Expression der Gene eines Modulons meist nicht einfach nur strikt aktiviert oder strikt reprimiert, sondern durch das Zusammenwirken mehrerer sowohl positiv als auch negativ wirkender Regulatoren für verschiedene Umweltsignale an einem Gen fein moduliert. Das heißt, ein Gen kann zu verschiedenen Modulons gehören und dabei von mehreren Umweltreizen beeinflusst werden.

Das dabei entstehende regulatorische Netzwerk überlappender Modulons ist die molekulare Grundlage der molekularen Anpassung eines Mikroorganismus. Als Beispiel ist in Abb. 10.**3** das cAMP-Crp-Modulon, das auf vorhandene Kohlenstoffquellen reagiert und die Transkription einer Vielzahl von Genen, Operons und Regulons steuert, gezeigt (S. 483).

Eine Möglichkeit für alle Operons eines Modulons auf Stressfaktoren synchron und schnell zu reagieren, ist die Produktion von Signalmolekülen, sogenannten **Alarmonen,** die intrazellulär angehäuft werden. Dabei handelt es sich häufig um kleine Nucleotide wie cAMP, c-di-GMP, AppppA oder ppGpp.

Der Terminus **Stimulon** wird benutzt, um **alle** Gene, Operons, Regulons und Modulons zu beschreiben, die auf einen bestimmten Umweltreiz reagieren. Es können dabei diverse **Regulationssysteme** und damit Modulons zu einem Stimulon gehören.

Signaltransduktionskette: Abfolge verschiedener Schritte, mit denen eine Zelle ein extrazelluläres Signal über Rezeptoren aufnimmt, in intrazelluläre Signale umwandelt und an Regulatoren weiterleitet. Manchmal sind intrazelluläre Botenstoffe (Alarmone) an der Signaltransduktion beteiligt.
Zweikomponenten-Regulationssystem: Komponenten eines Signaltransduktionswegs in Bakterien, besteht aus signalspezifischer Sensorkinase (Rezeptor) und Regulator (typischerweise DNA-bindendes Protein), Sensorkinase reagiert auf ein Signal mit Autophosphorylierung, aktiviert über Transphosphorylierung den zugehörigen Regulator.
Sigmafaktor: Untereinheit der RNA-Polymerase, die die Promotererkennung vermittelt. Spezifische Sigmafaktoren wirken als Regulatoren der Transkription für bestimmte Anpassungsreaktionen auf bestimmte Umweltreize.
Transkriptionsfaktoren: Proteine, die Promotorerkennung und Initiation durch die RNA-Polymerase steuern, enthalten bei Prokaryoten häufig Helix-turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung, Repressoren vermindern die Transkription, Aktivatoren induzieren die Transkription des Zielgens.
Operon: Gruppe benachbarter Gene, die von einem gemeinsamen Promoter gesteuert und als Einheit transkribiert werden.
Regulon: Mehrere Gene und Operons, die durch einen gemeinsamen Regulator reguliert werden.
Modulon: Mehrere Regulons und Operons, die unter der Kontrolle eines übergeordneten Regulators stehen.

Stimulon: Alle Gene, Operons, Regulons und Modulons, die auf einen bestimmten Umweltreiz reagieren.
Alarmon: Intrazelluläre Botenstoffe z. B. ppGpp, cAMP im Rahmen der Signaltransduktion.

10.2 Anpassung an Temperaturbedingungen

Die **Umgebungstemperatur** hat entscheidenden Einfluss auf Wachstum und Überleben von Mikroorganismen. Eine Erhöhung der Temperatur in einem für einen Organismus physiologischen Bereich hat zur Folge, dass chemische und folglich auch enzymatische Reaktionen beschleunigt werden. Als Konsequenz erhöht sich die Geschwindigkeit des Zellwachstums. Wenn jedoch der **Temperaturanstieg** über den physiologischen Bereich hinausgeht, sind die Zerstörung von Membranen, Proteinen und anderen zellulären Komponenten und schließlich der Zelltod die Folge. **Niedrige Temperaturen** bewirken eine starke Verlangsamung biochemischer Prozesse bis hin zum Stillstand sowie eine Versteifung der Membranen und können so den Tod des Mikroorganismus bedeuten. Als Anpassung an extreme Temperaturen im Lebensraum werden entsprechende molekulare Schutz- und Reparaturstrategien genutzt, um genante Probleme zu bewältigen. So können Mikroorganismen einerseits extreme Standorte besiedeln, aber auch **Temperaturschwankungen** im Lebensraum überstehen.

Man findet für jeden Organismus eine **minimale Wachstumstemperatur**, unterhalb derer Wachstum nicht möglich ist, eine für das Zellwachstum **optimale** Wachstumstemperatur und eine **maximale** Wachstumstemperatur, bei deren Überschreitung Zellbestandteile zerstört werden. Diese drei Temperaturen sind für jeden Organismus charakteristisch und werden als **Kardinaltemperaturen** bezeichnet (Abb. 10.**4**). Die Temperaturspanne für das Leben von Mikroorganismen reicht von ca. –15 °C bis über 120 °C.

Hinsichtlich ihrer **Kardinaltemperaturen** unterteilt man Mikroorganismen in verschiedene Klassen (Abb. 10.**4**). **Psychrophile** (oder **kryophile**) Organismen (z. B. *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*) haben ein Wachstumsoptimum von ca. 15 °C, eine maximale Wachstumstemperatur von 20 °C und eine minimale Wachstumstemperatur von 0 °C oder niedriger. Zu diesen Mikroben gehören hauptsächlich marine Organismen. **Psychrotolerante** Organismen wachsen nicht bei Temperaturen unter 3 bis 5 °C. Die meisten Boden- und Wassermikroorganismen, aber auch Bakterien, die Warmblüter besiedeln, sind **mesophil**. Typische Beispiele sind *E. coli* und *Bacillus subtilis*. Sie erreichen ihre maximale Wachstumsrate zwischen 20 °C und 42 °C. **Thermophile**, wie *Bacillus stearothermophilus*, erlangen ihre maximale

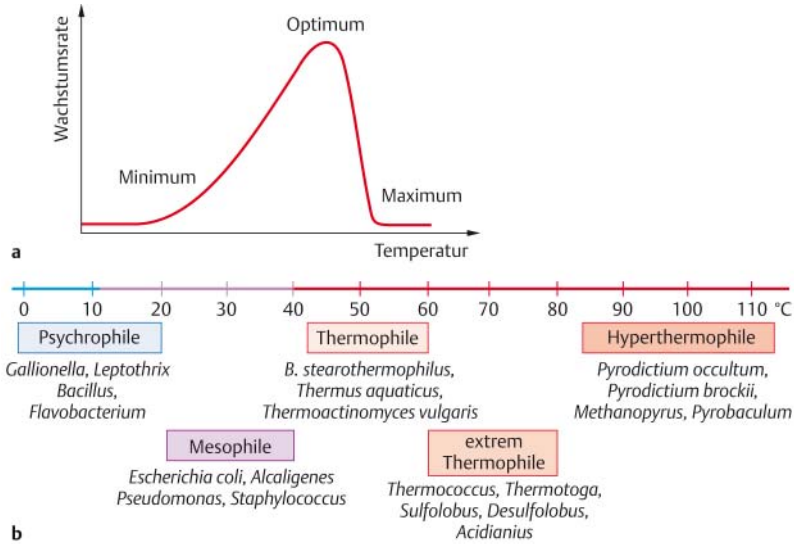


Abb. 10.4 **Temperatur. a** Temperaturabhängigkeit des Wachstums. **b** Einteilung der Mikroorganismen nach ihrer optimalen Wachstumstemperatur.

Teilungsrate erst oberhalb von 40 °C und sind bei 70 °C in ihrem Wachstum gehemmt. Als **extrem thermophil**, wie *Thermotoga maritima, Pyrococcus furiosus*, bezeichnet man Organismen, deren Temperaturoptimum für Wachstum oberhalb von 65 °C liegt und deren maximale Wachstumstemperatur bei 70 bis 80 °C liegt. Archaea, die erst oberhalb von 80 bis 90 °C ein ausreichendes Wachstum erreichen, bezeichnet man als **hyperthermophil**, wie das methanogene Archaeon *Methanopyrus kandleri*.

10.2.1 Anpassung an extreme Temperaturen

Psychrophile Organismen

In einem Großteil der Erde werden nie Temperaturen von mehr als **5 °C** erreicht. Dazu gehören tiefe, kalte Ozeane, die fast drei Viertel der Erdoberfläche bedecken, und die riesigen eisbeschichteten terrestrischen Areale Antarktis und Grönland. Trotzdem weisen Satellitenaufnahmen das Vorkommen von signifikanten Mengen an Biomasse in diesen Regionen der Erde nach: Man findet eine breite Vielfalt an Bacteria, Archaea, Pilzen und Mikroalgen. Sie besiedeln Boden, Süß- und Salzwasser, aber auch Pflanzen und Tiere. Durch ihre Beteiligung an den Stoffkreisläufen des Kohlenstoffs, Stickstoffs, Phosphors und

Schwefels in kalten Habitaten sind diese **psychrophilen Organismen** von zentraler Bedeutung für die globale Ökologie (S. 512).

Psychrophile Organismen spielen aber auch bei **biotechnologischen Fermentationsprozessen** (S. 556) eine entscheidende Rolle. Viele **Molkereiprodukte** wie Käse oder Joghurt, aber auch **Bier** werden von psychrotoleranten Organismen produziert. Andererseits sind psychrophile und psychrotolerante Bakterien, z. B. *Brochothrix thermosphacta* und *Pseudomonas fragi* verantwortlich für das Verderben gekühlter Lebensmittel. Auch psychrophile pathogene Bakterien können so über gekühlte Lebensmittel verbreitet werden. Dies gilt für humanpathogene Organismen, wie *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* oder *Bacillus cereus* und für pflanzenpathogene wie *Pseudomonas syringae* oder diverse *Erwinia*-Stämme. ◀

Die bedeutendsten biochemischen Anpassungen betreffen die Zusammensetzung der **Membranlipide**, die **Proteinbiosynthese**, die **Proteinstabilität** und die **Enzymaktivität**. Um die Fluidität der Membran bei niedriger Temperatur aufrechtzuerhalten, werden mehr ungesättigte Fettsäuren mit verkürzter Kettenlänge und zunehmender Verzweigung gebildet und in die Membran eingebaut. Trotz offensichtlicher Labilität bei mesophilen Temperaturen besitzen psychrophile Enzyme oft ein Temperaturoptimum über dem des Wachstumsoptimums. Gleichzeitig müssen Enzyme psychrophiler Organismen ihre für die Katalyse notwendige Flexibilität bei niedrigen Temperaturen behalten. Die dazu nötigen strukturellen Konsequenzen sind noch wenig untersucht.

10

Thermophile Organismen

Für die meisten **thermophilen Organismen** liegt das untere Wachstumslimit bei **50 bis 70 °C**, obwohl sie bei 25 bis 40 °C auch noch langsam wachsen. Taxonomisch finden sich unter den Thermophilen viele verschiedene Gruppen der Pro- und Eukaryoten (Tab. 10.**2**). Durch die enge phylogenetische Beziehung der Thermophilen zu den Mesophilen geht man von einer **sekundären Adaptation** dieser Organismen an heiße Habitate aus.

Die extrem heißen Lebensräume bleiben **Prokaryoten** vorbehalten. Man findet sie in vulkanisch und geothermal aufgeheizten Lebensräumen, wie heißen Quellen am Festland oder schwarzen Rauchern auf dem Meeresboden, in Geysiren und Solfatarenfeldern. Zu den **extrem thermophilen Bacteria** gehören die Gattungen *Thermotoga* und *Aquifex*. Extrem thermophile **Archaea** dominieren allerdings die hyperthermophilen Lebensräume. Wichtige Vertreter sind den Gattungen *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Pyridictium*, *Thermococcus*, *Archaeoglobus*, *Methanococcus* und *Methanopyrus* zuzuordnen. Chemotlithoautotrophe Organismen darunter nutzen oft Wasserstoff als Elektronendonor. Heterotrophe gewinnen Energie über anaerobe Atmungsketten mit molekularem Schwefel, Sulfat und Sauerstoff als Elektronenakzeptoren oder über diverse Fermentationsprozesse.

Tab. 10.2 **Temperaturlimits für das Wachstum verschiedener Organismen.**

Gruppe		*Temperaturlimit (°C)*
Tiere	Fische und andere marine Vertebraten	38
	Insekten	45–50
	Crustaceen	49–50
Pflanzen	Gefäßpflanzen	45
	Moose	50
eukaryotische Mikroorganismen	Protozoen	56
	Algen	55–60
Bacteria	Cyanobakterien	70–74
	anoxygene phototrophe Bakterien	70–73
	chemoorganotrophe Bakterien	90
Archaea	hyperthermophile methanogene Archaea	118
	schwefelabhängige hyperthermophile Archaea	113

Normalerweise sind Zellkomponenten, wie Lipide, Nucleinsäuren und Proteine sehr sensibel gegenüber Hitze. Daher besitzen hyperthermophile Archaea meist **thermostabilere Glycerolipide**, die anstelle der Fettsäuren in Esterbindung Isopreneinheiten in Etherbindung enthalten (S. 26). Alle extrem Thermophilen besitzen eine **reverse Gyrase**, die positive superhelikale Windungen in die DNA einführt und diese darüber stabilisiert. Extrem thermophile Archaea besitzen **sehr basische Histone**, die die Schmelztemperatur der DNA (S. 62, S. 199) drastisch erhöhen. Stark **hitzestabile Enzyme** unterscheiden sich nicht offensichtlich von ihren mesophilen Gegenstücken bezüglich ihrer Aminosäuresequenz oder Struktur. Offenbar macht die Summe einer Vielzahl kleiner struktureller Unterschiede, wie zusätzlicher Wasserstoffbrücken, die Hitzestabilität aus.

10.2.2 Hitzeschock-Antwort

Wenn eine *E.-coli*-Zelle eine Temperaturänderung von 32 °C auf 42 °C erfährt, wird die Synthese einer ganzen Reihe von Proteinen induziert, die man als **Hitzeschock-Proteine** (**Hsp**) bezeichnet. Die Hitzeschock-Proteine liegen unter normalen Wachstumsbedingungen in geringen Mengen in der Zelle vor, sie werden vermehrt produziert, wenn das Signal Hitze vorliegt. Zu den Hitzeschock-Proteinen gehören in *E. coli* **Chaperone**, wie DnaK, DnaJ, GrpE, GroES und GroEL. Diese Chaperone binden an durch Hitze partiell denaturierte Polypeptide und verhindern, dass diese Proteine aggregieren, ihre Löslichkeit verlieren und dabei

schließlich ausfallen. Weiterhin wird den gebundenen Proteinen aber auch die Möglichkeit zur Rückfaltung in ihre Ursprungskonformation gegeben.

Die Konzentration eines **alternativen Sigmafaktors σ^{32}** (RpoH) wird bei Hitze in der Zelle erhöht, wobei die Translation der σ^{32}-mRNA durch ein RNA-Thermometer (s. u.) in Abhängigkeit von der Temperatur gesteuert wird. Die Aktivierung von σ^{32} wird dann durch eine Wechselwirkung mit dem Chaperon DnaK gesteuert: Dabei wird σ^{32} bei niedriger Temperatur durch Bindung an DnaK destabilisiert. Bei hoher Temperatur dissoziiert DnaK von σ^{32}. So erhöht sich dessen Stabilität und der alternative Sigmafaktor kann seine Wirkung entfalten. Freier σ^{32} verdrängt den vegetativen Sigmafaktor σ^{70} von der RNA-Polymerase, die daraufhin ihre Promotorspezifität ändert und nun vorzugsweise die Synthese von über 50 Hitzeschock-Proteinen induziert. So wirkt das DnaK-Protein als eines der Thermometer der Zelle (Abb. 10.**5**).

Gleichzeitig mit den Chaperonen wird die Bildung verschiedener **Proteasen**, wie ClpB, HslUV, Lon und HflB, induziert, um irreversibel denaturierte oder aggregierte Proteine abzubauen. Die Bedeutung von Chaperonen und Proteasen auch für den normalen Zellstoffwechsel erklärt die unentbehrliche Funktion des Sigmafaktors σ^{32} für das Wachstum und Überleben von *E. coli* unter normalen Temperaturbedingungen.

10

Während eines Hitzeschocks wird in *E. coli* zum Schutz von Proteinen in der äußeren und inneren Membran und im Periplasma eine weitere Klasse von Genen durch den alternativen Sigmafaktor σ^{24} (RpoE) induziert. RpoE liegt bei für *E. coli* normalen Temperaturen mit dem Anti-Sigmafaktor RseA komplexiert

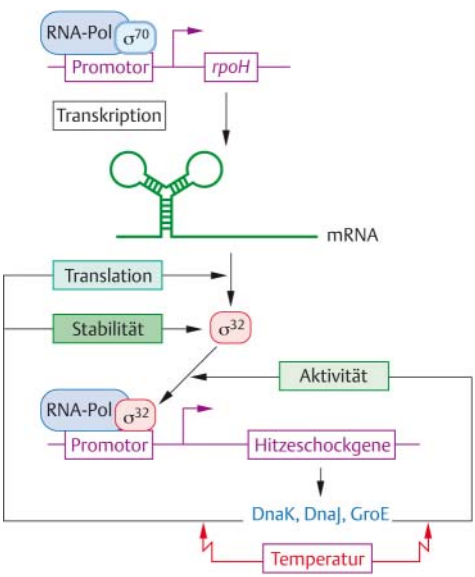


Abb. 10.**5** **Alternativer Sigmafaktor.** Regulation der Bildung, Stabilität und Aktivität des alternativen Sigmafaktors σ^{32} (RpoH), der an der Hitzeschockantwort in *E. coli* beteiligt ist.

und damit inaktiv vor. Bei einem Hitzeschock wird RseA proteolytisch abgebaut und RpoE ins Cytoplasma entlassen, was seine Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase und darüber die Aktivierung des RpoE-Regulons erlaubt. Zu den induzierten Genen gehören Gene für periplasmatische Chaperone und Proteasen sowie das Gen des alternativen Sigmafaktors σ^{32} (RpoH), um die zuvor beschriebene Hitzeschockantwort aufrecht zu erhalten.

Neben Hitze lösen auch andere **Stressoren** wie Ethanol, ultraviolette Strahlung und H_2O_2 eine Hitzeschockantwort aus.

10.2.3 Kälteschock-Antwort

Ähnlich dem Hitzeschock wird durch eine rapide Senkung der Wachstumstemperatur von 37 °C auf 10 °C in *E. coli* die Bildung einer Vielzahl neuer Proteine induziert. Zu ihnen gehört der **Transkriptionsregulator CspA**, der dann wiederum andere **Kälteschockgene** induziert. Zusätzlich werden viele Kälteschockgene durch die Superspiralisierung der DNA kontrolliert. So führt die **DNA-Gyrase** bei Kälte eine negative Superspiralisierung ein und aktiviert so Kälteschockgene. Zu diesen gehören die Gene für Fettsäure-Desaturasen, die Doppelbindungen in die Fettsäureanteile von Membranlipiden einführen und darüber die Fluidität von Membranen in der Kälte aufrechterhalten. Ein weiteres Problem in der Kälte ist die steigende Stabilität von Sekundärstrukturen in mRNAs, die deren nötige Translation und darüber die Proteinbiosynthese behindern. Deshalb produzieren Bakterienzellen in der Kälte **RNA-bindende Chaperone** und auch **RNA-Helicasen**, die versteifte RNA-Strukturen wieder auflösen und den Betrieb der Proteinbiosynthese garantieren. Auch die **Ribosomen** können als Sensor für Kälte dienen: Durch eine temperaturbedingt niedrige Aktivität der Ribosomen kommt es zur Bildung des Alarmons **ppGpp**, das wiederum eine komplexe Anpassung der Genexpression auslöst. Das gleiche Signal wird unter normalen Temperaturbedingungen bei Aminosäuremangel und infolgedessen einer verlangsamten Proteinbiosynthese am Ribosom ausgelöst (S. 207).

Sinkt die Temperatur kontinuierlich weiter, bildet sich **Eis**. In der Zelle werden sukzessive Proteine und Membranen geschädigt und die Zellen zerstört. Um die Zellen kommt es durch Eisbildung zur Konzentrierung von Salzen und damit zur lokalen Erhöhung des **osmotischen Drucks**. Als Gegenreaktion wird eine osmotische Stressantwort ausgelöst (S. 466). Somit führt die Senkung der Temperatur zur Akkumulation **kompatibler Solute** (S. 466, Tab. 10.**5**) in der Zelle, die dann wiederum zum Schutz zellulärer Strukturen genutzt werden.

Die Temperatur in der Zelle kann auch direkt von der mRNA für einige Hitze- oder Kälteschockproteine gemessen und darüber deren Bildung gesteuert werden. Solche mRNA-Elemente nennt man **RNA-Thermometer**. Dazu finden sich in der nicht translatierten Region stromaufwärts vom Translationsstartcodon der RpoH und CspA mRNA-Bereiche, die eine solche Sekundärstruktur annehmen können, dass die Ribosomenbindestelle unzugänglich für das Ribosom positioniert und so eine Translation dieser mRNA verhin-

dert wird. Bei einer Temperaturveränderung werden diese Strukturen geschmolzen und alternative Strukturen gebildet, die dann eine Bindung des Ribosoms an die mRNA und damit deren Translation erlauben.

Kardinaltemperaturen: Minimale, optimale und maximale Wachstumstemperatur.
Psychrophile (oder Kryophile): Minimale (0 °C oder niedriger), optimale (ca. 15 °C), maximale Wachstumstemperatur (ca. 20 °C).
Psychrotolerante: Minimale Wachstumstemperatur (3–5 °C).
Mesophile: Optimale Wachstumstemperatur (20–42 °C).
Thermophile: Optimale (> 40 °C), maximale Wachstumstemperatur (70 °C).
Extrem Thermophile: Optimale (> 65 °C), maximale Wachstumstemperatur (70–80 °C).
Hyperthermophile: Optimale Wachstumstemperatur (> 80–90 °C).
Hitzeschockantwort: Die alternativen Sigmafaktoren RpoH und RpoE führen zur Bildung von Chaperonen und Proteasen.
Kälteschockantwort: CspA führt zur Bildung von RNA-bindenden Proteinen, Gyrase und Lipid-verändernden Enzymen.
RNA-Thermometer: mRNA-Strukturen, mit denen die Temperatur gemessen und die Translation geregelt wird.

10.3 Anpassung an pH-Bedingungen

Der **pH-Wert** beeinflusst an vielen Stellen den Stoffwechsel und die dazu gehörende Regulation. Extreme pH-Werte können zelluläre Komponenten, wie Proteine und Nucleinsäuren, schädigen und zerstören. Dagegen müssen Besiedler extremer pH-Standorte sich schützen. Der Protonengradient an der Membran ist auch ein pH-Gradient und wird deshalb vom pH-Wert im Lebensraum beeinflusst. Der pH-Gradient bildet die Grundlage einer lebenden Prokaryotenzelle und muss entsprechend aufrecht erhalten bleiben. Dazu werden vielfältige biochemische Strategien angewendet.

Die Konzentration an Wasserstoffionen in einer Lösung wird durch den pH-Wert ausgedrückt (📖*Biochemie*, Zellbiologie), wobei ein pH-Wert von 7 als **neutral**, pH-Werte unter 7 als **sauer** und pH-Werte über 7 als **alkalisch** oder **basisch** definiert werden (Abb. 10.**6**).

Die meisten natürlichen Habitate liegen in ihrem pH-Wert zwischen 5 und 9, und entsprechend haben die meisten Organismen ein **pH-Optimum** für ihr Wachstum innerhalb dieses Bereichs. Man unterscheidet drei verschiedene Gruppen von Mikroorganismen nach dem für ihr Wachstum optimalen pH-Bereich: **Acidophile** (optimaler pH < 4), **Neutrophile** (optimaler pH 6–7) und **Alkaliphile** (optimaler pH > 8) (Abb. 10.**6**).

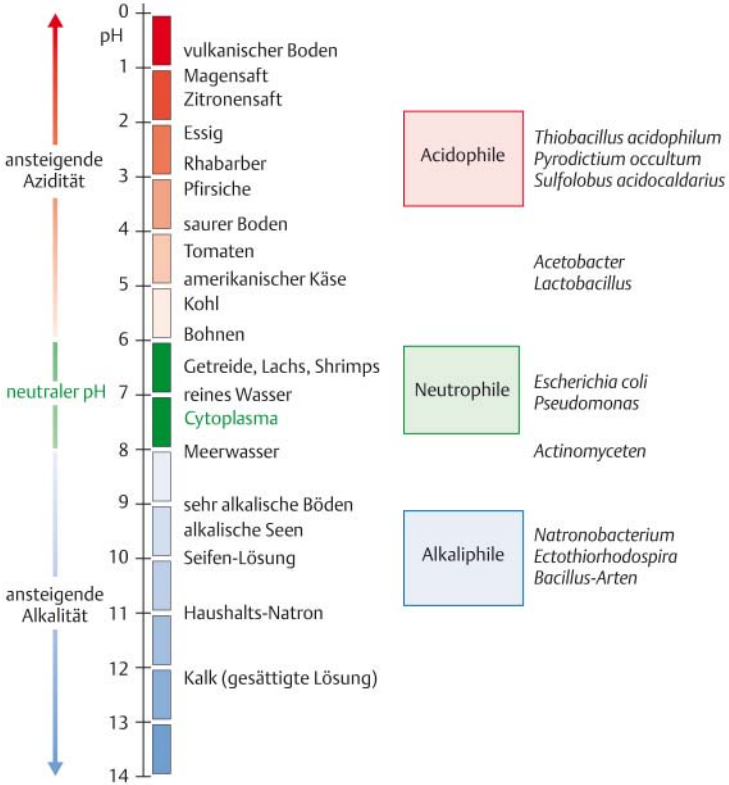


Abb. 10.**6** **pH-Wert.** Spanne der pH-Werte in von Mikroorganismen besiedelten Lebensräumen mit Einteilung der Mikroorganismen nach ihrem optimalen Wachstums-pH-Wert.

Unter den **acidophilen Mikroorganismen** sind häufiger Pilze als Bakterien zu finden. Aber auch Algen, Flagellaten, Ciliaten und Amöben wurden in sauren Abwässern (pH 2–2,5) von Minen und in sauren Quellen (pH 2–3) gefunden. **Acidophile Prokaryoten** werden nach ihrer Thermotoleranz in **Mesophile** (*Thiobacillus*, *Acidiphilium*), **moderat Thermophile** (*Sulfobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Thermoplasma*) und **Thermophile** (*Sulfolobus*, *Sulfurococcus*, *Metallosphaera*) eingeteilt. Unter den acidophilen Bakterien und Archaea finden sich viele Schwefel und Eisen oxidierende Spezies. Neben chemolithotrophen werden auch eine Reihe heterotropher Organismen beschrieben. Natürlich saure Habitate sind auch Zitrusfrüchte, Essig oder Milchprodukte. Teile des Intestinaltrakts des menschlichen Körpers bieten ein stark saures Habitat.

Als **alkaliphil** bezeichnet man Organismen, die ein pH-Optimum für ihr Wachstum zwischen pH 9 und 11 haben. Man findet hoch basische Habitate in Salzseen oder carbonatreichen Böden. Die meisten dort lebenden Mikroorganismen sind aerobe nicht marine Bakterien, häufig *Bacillus*- und *Clostridium*-Arten. Viele extrem alkaliphile Mikroorganismen sind gleichzeitig halophil und gehören phylogenetisch zu den Archaea. Aber auch Actinomyceten, Pilze und Hefen wurden aus alkaliphilen Habitaten isoliert.

10.3.3 Anpassung an Lebensräume mit extremen pH-Werten

Die Anpassung eines Mikroorganismus an Lebensräume mit extremen pH-Werten erfordert, den intrazellulären pH-Wert (pH_i) zum Schutz aller zellulären Komponenten vor Denaturierung im Bereich von pH 6 bis 7 zu halten. Diesen Prozess bezeichnet man als **Homöostasis** und unterscheidet dabei zwischen **passiver** und **aktiver Homöostasis**. Weiterhin sind oberflächenexponierte Proteine, die unter anderem bei der Zellwandsynthese oder an der Nährstoffbeschaffung beteiligt sind, pH-stabil.

10

Da die Cytoplasmamembran so gut wie undurchlässig für Protonen und andere Ionen ist, wird der intrazelluläre pH weitestgehend über diese **Barriere** konstant gehalten. Ein zweiter wichtiger Schutzfaktor ist die hohe **Pufferkapazität** der Zelle durch Nucleinsäuren, Proteine und die zellulären Konzentrationen an Glutamat oder Polyaminen. Vor allem die Phosphatgruppen der **DNA/RNA** sowie negativ geladene Aminosäurereste von **Proteinen** besitzen Pufferkapazität. In gramnegativen Bakterien kann Glutamat beispielsweise bis zu einer Menge von 400 bis 500 mM angehäuft werden (**passive Homöostasis**).

Als **aktive Homöostasis** wird die Stabilisierung des pH_i über Ionenkreisläufe bezeichnet. Die zentralen Komponenten sind die Transporter des **Protonen-**, des **Kaliumionen-** und des **Natriumionenkreislaufs**. Bei zu saurem pH_i sorgen Protonenpumpen für den Efflux von Protonen und somit für eine Erhöhung des pH_i. Die Protonen sind zuvor über die ATP-Synthase oder andere Transportsysteme in die Zelle gelangt. Der Kaliumionenkreislauf besteht aus Aufnahme- und Effluxsystemen, die teilweise an den Eintransport von Protonen gekoppelt sind.

Alkaliphile haben das besondere Problem, in einem stark basischen Milieu zu leben, das dem Aufbau einer protonenmotorischen Kraft (PMK, S. 317) entgegensteht, der Triebkraft für ATP-Synthese, aktiven Membrantransport und Bewegung. Alkaliphile nutzen zur Lösung dieses Problems den dualen Aufbau der PMK aus dem transmembranalen **pH-Gradienten** und dem **elektrischen Potential**. Dabei werden primär Protonen mittels der Atmungskette nach außen transportiert, deren Rücktransport über einen Na^+/H^+-Antiporter zum Austransport von Na^+ genutzt wird. Das dabei über die **Na^+-Ionen** aufgebaute elektrische Potential wird dann für **Bewegungs-** und **Transportprozesse** genutzt, die dabei an den Eintransport des Na^+ gekoppelt werden. Für die ATP-Synthese nut-

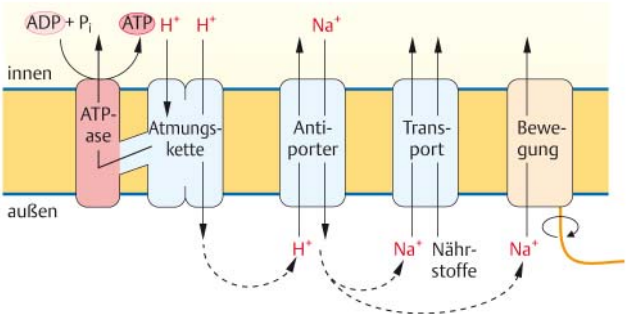


Abb. 10.**7** **Protonentransport und Na^+-Gradient für die Energiegewinnung, den aktiven Transport und die Bewegung von Alkaliphilen.**

zen Alkaliphile allerdings den primär gebildeten Protonengradienten. Durch eine **enge strukturelle Wechselwirkung** zwischen Atmungskette und ATP-Synthase wird eine direkte Nutzung der nach außen translozierten Protonen gesichert und dabei ein direkter Kontakt der Protonen zur alkalischen Umgebung vermieden (Abb. 10.**7**).

10

10.3.4 Säure-Base-Schock-Antwort

Um auf Änderungen des pH-Wertes angemessen reagieren zu können, ist zuerst eine **Detektion** des **pH-Unterschieds** nötig. Für Mikroben gibt es prinzipiell drei Möglichkeiten, den pH-Wert der Umgebung zu messen. Ein veränderter pH-Wert beeinflusst direkt die Strukturen und darüber die Aktivität zellulärer Komponenten. So verändert sich der **Protonierungszustand** der Aminosäureseitenketten von **cytoplasmatischen Proteinen**, sodass diese direkt als Sensoren dienen können. Die zweite Möglichkeit besteht darin, den pH-Wert der Umgebung anhand der intrazellulären Menge **kleiner Moleküle** in einem bestimmten Ionisierungszustand festzustellen. Zu diesen kleinen Molekülen gehören schwache Säuren. Nach dem Eintransport in ihrer protonierten Form und der Dissoziation im Cytoplasma ist die Menge angehäufter Säuren und damit freigesetzter Protonen ein Indikator für einen sauren pH im extrazellulären Lebensraum. Als Drittes sind **Membranproteine** gute Sensoren für Veränderungen des pH-Wertes, da sie mit ihrem Protonierungszustand ihre Struktur und Funktion ändern und darüber eine Signalkette auslösen können (Abb. 10.**8**).

Nach der Detektion des pH-Wertes hat eine Mikrobenzelle wiederum mehrere **Reaktionsmöglichkeiten**: Bei einer geringen pH-Senkung ($>$ 6,0) werden **Protonen-** und andere **Ionenkanäle** aktiviert, um über den Protonenaustransport einen pH-Ausgleich herbeizuführen. Bei einer Senkung des pH-Wertes auf

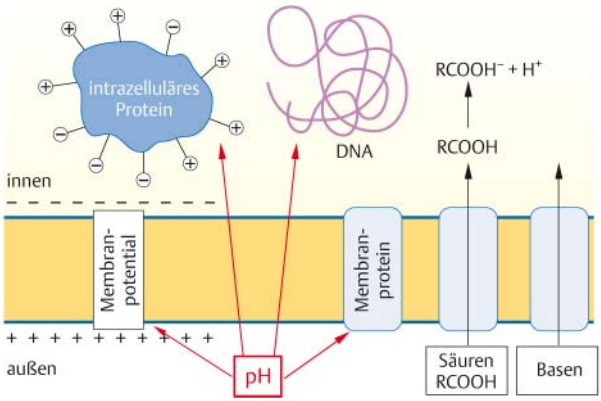


Abb. 10.8 **Einfluss des pH-Wertes auf zelluläre Strukturen.**

10

Werte zwischen 5 und 6 werden eine Reihe neuer Proteine synthetisiert. Dazu gehören **Aminosäure-Decarboxylasen**, wie Lysin- oder Arginin-Decarboxylasen, die dafür sorgen, dass das Medium neutralisiert wird. Außerdem werden die Gene für **Fermentationsenzyme** reprimiert, deren Produkte organische Säuren sind. Wenn der pH_i-Wert 5 unterschreitet, werden spezielle **Säureschock-Proteine** induziert. Dabei handelt es sich um verschiedene Transkriptionsfaktoren und den alternativen Sigmafaktor **RpoS**. RpoS vermittelt auch den Anpassungsprozess an die Stationärphase, in der kein Wachstum mehr erfolgt (S. 271). Durch äußere alkalische Bedingungen werden in *E. coli* der **Na^+/H^+-Antiporter** und **aerobe Elektronentransportketten** stark induziert, um Homöostasis zu gewährleisten.

Einteilung von Mikroorganismen nach dem für ihr Wachstum optimalen pH-Bereich:
- **Acidophile:** pH < 4
- **Neutrophile:** pH 6–7
- **Alkaliphile:** pH > 8

Homöostase: Stabiler intrazellulärer pH zwischen 6 und 7, der aktiv durch Transportsysteme für Ionen und durch enzymatische Reaktionen konstant gehalten wird.

10.4 Anpassung an osmotische Bedingungen

Einzellige Mikroorganismen sind von der Chemie des Lebensraumes nur durch eine semipermeable, also Wasser-gängige Membran getrennt. Die Zahl gelöster Teilchen bestimmt daher die Menge und die Flussrichtung des Wassers auf beiden Seiten dieser Membran. Trotzdem können **halophile Organismen** extreme Lebensräume, wie Salzseen besiedeln. Die meisten Mikroorganismen sind aber **halotolerant**, sie können sich kurzfristig wechselnden osmotischen Bedingungen in ihrer Umwelt anpassen. Um hohe Teilchenkonzentrationen in der Umwelt auszugleichen, häuft die Zelle mit dem Stoffwechsel verträgliche Teilchen, sogenannte **kompatible Solute**, an. Dies geschieht durch Aufnahme aus der Umwelt und durch Biosynthese.

10.4.1 Wasseraktivität

Wasser ist die Grundlage für Leben und Wachstum. Die Verfügbarkeit von Wasser in einem Lebensraum wird über die **Wasseraktivität** definiert, die das Verhältnis der Konzentration an Wasser in der Dampfphase über dem betreffenden festen oder flüssigen Habitat zu der Konzentration über reinem Wasser bei einer bestimmten Temperatur angibt. Mikroorganismen können bei einer Wasseraktivität von 0,998 bis 0,6 wachsen (Tab. 10.**3**).

Eine Zelle kann man als einen mit einer wässrigen Lösung gefüllten Reaktionsraum verstehen, der von einer unpolaren Lipidschicht in Form der Membran umgeben ist. Diese Membran ist **semipermeabel**, das heißt sie ist durchlässig für Gase und Wasser, während sie für geladene polare Verbindungen und beson-

Tab. 10.**3** **Wasseraktivitäten verschiedener Substanzen.**

Wasseraktivität (a_w)	*Material*	*Organismen, die in diesem Habitat wachsen*
1,000	reines Wasser	*Caulobacter*, *Spirillum*
0,995	menschliches Blut	*Streptococcus*, *E. coli*
0,980	Seewasser	*Pseudomonas*, *Vibrio*
0,950	Brot	grampositive Stäbchen
0,900	Kochschinken	grampositive Kokken
0,850	Salami	*Saccharomyces rouxii* (Hefe)
0,800	Obstkuchen	*Saccharomyces bailii*, *Penicillium* (Pilze)
0,750	Salzseen, Meeresfische	*Halobacterium*, *Halococcus*
0,700	Getreide, Süßigkeiten	*Xeromyces bisporus* und andere xerophile Pilze

ders für Ionen eine Barriere darstellt (*Biochemie*, *Zellbiologie*). Besteht ein Konzentrationsunterschied zwischen gelösten Verbindungen oder Ionen im Inneren und außerhalb der Zelle, strömen Wassermoleküle auf die Seite mit der höheren Konzentration an gelösten Teilchen, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen (**Osmose**, *Biochemie*, *Zellbiologie*). Osmose wird von Mikroorganismen zur Aufrechterhaltung ihrer Körperform benutzt und stellt damit auch eine treibende Kraft bei der Zellteilung dar. Um Wasser in der Zelle osmotisch zu binden und um dabei sogar einen erheblichen Überdruck, den **Turgor**, aufzubauen, bedarf es der Anhäufung löslicher Substanzen, die man **kompatible Solute** nennt (Abb. 10.**9**). Zusätzlich wird eine stabile Zellumhüllung in Form einer Zellwand, analog einem Autoreifen, benötigt, um ein Platzen der Zelle zu verhindern. Dabei kann eine gramnegative Bakterienzelle einen Turgor von 3–10 · 10^5 Pa (3–10 bar) und eine grampositive einen von bis zu 20 · 10^5 Pa (20 bar) aufbauen. Das beschriebene osmotische Gleichgewicht ist essentiell für eine Prokaryotenzelle und muss permanent aufrechterhalten werden. Deshalb muss der Organismus wechselnden Umweltbedingungen wie Flutung des Lebensraums durch Niedergang eines Regenschauers oder Austrocknung eines Lebensraums durch Sonneneinstrahlung mittels molekularer Anpassungsreaktionen schnell entgegenwirken. Ebenso bedarf die Besiedelung osmotisch extremer Lebensräume, z. B. Salzseen, spezieller molekularer Überlebensstrategien.

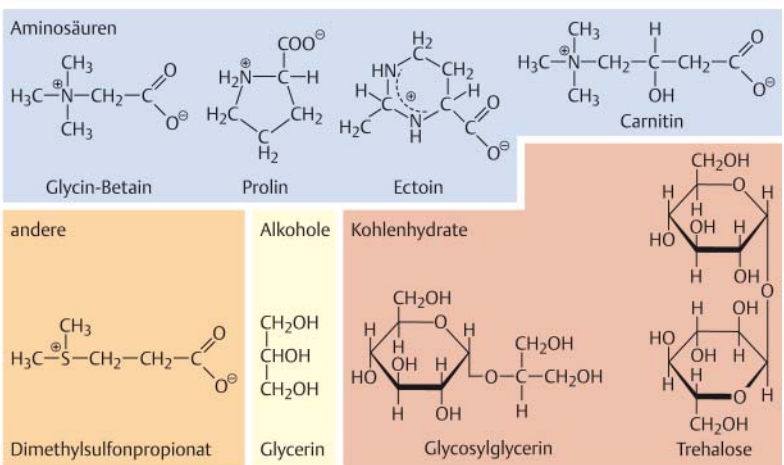


Abb. 10.**9** **Kompatible Solute.**

10.4.2 Halophile Mikroorganismen

Mikroorganismen, die eine bestimmte höhere Salzkonzentration (NaCl) in ihrem Lebensraum benötigen, werden als **halophil** bezeichnet. Man kann diese Gruppe in Abhängigkeit von den Salzkonzentrationen im besiedelten Habitat noch einmal unterteilen in leicht halophile, moderat halophile und extrem halophile Organismen (Tab. 10.**4**). **Leicht** und **moderat halophile** Mikroorganismen mit einer Wachstumskompetenz bis zu einer Salzkonzentration von 2 mol l^{-1} findet man hauptsächlich unter den Bacteria. Darunter sind spezialisierte Vertreter der Cyanobakterien, *Bacilli*, Actinomyceten, Proteobakterien, Spirochäten und Flavobakterien zu finden. Der Grenzwert für das Leben von Eukaryoten ist normalerweise bei einer Salzkonzentration von 1,5 mol l^{-1} anzusetzen. So haben sich spezialisierte Garnelenarten (*Artemia salina*), Flagellaten (*Dunaliella*), Grünalgen und Fliegenarten (*Ephydra*) an das Leben in halophilen Habitaten angepasst.

Das Tote Meer oder der Große Salzsee in Utah (USA) sind ganz besonders extreme osmotische Standorte. Organismen, die hier leben, erreichen bei einer Salzkonzentration von über 3,0 mol l^{-1} ein optimales Wachstum. Diese **extrem Halophilen** findet man hauptsächlich unter den Archaea (*Halobacterium*, *Haloferax*, *Natronobacterium*, *Methanohalophilus*).

Ein großer Teil der bekannten Mikroorganismen ist nicht in der Lage, auf Dauer in Umgebungen mit niedriger Wasseraktivität zu leben. Viele können aber für kurze Zeit mit einer Erhöhung der Salzkonzentration zurechtkommen und werden daher als **halotolerant** bezeichnet (Tab. 10.**4**). Diese Tatsache erklärt, warum Salze und Zucker als Konservierungsmittel für Lebensmittel eingesetzt werden. Beide machen Lebensmittel haltbar, indem sie durch niedrige Wasseraktivität das Wachstum der meisten Mikroorganismen verhindern. Organismen, die dennoch zuckerhaltige Habitate besiedeln, nennt man **osmophil** und solche, die ein extrem trockenes Milieu bevorzugen, **xerophil**.

Tab. 10.**4** **Salzkonzentrationen, in denen Leben von Mikroorganismen möglich ist.**

halophile Mikroorganismen Kategorie	*NaCl-Konzentration (mol l^{-1}), Spanne*	*Optimum*
nicht halophil	0–1,0	< 0,2
leicht halophil	0,2–2,0	0,2–0,5
moderat halophil	0,4–3,5	0,5–2,0
extrem halophil	2,0–5,2	> 3,0
halotolerant	0 bis > 1,0	< 0,2

10.4.3 Anpassung an Standorte extremer Osmolarität

Um den Turgor einer Zelle und damit alle zellulären Funktionen aufrechtzuerhalten, muss die Konzentration **kompatibler Solute** in der Zelle so hoch sein, dass dort immer genug Wasser gebunden werden kann. Dabei kommt es zur Anhäufung der kompatiblen Solute im molaren Bereich. In diesen hohen Konzentrationen dürfen sie den Metabolismus nicht stören, sondern sollen im Gegenteil dessen Komponenten stabilisieren. Außerdem müssen sie auch in hohen Konzentrationen (> 1 mol l^{-1}) noch gut löslich sein. Zu den kompatiblen Soluten gehören **Zucker**, **Alkohole**, **Aminosäuren** und deren Derivate sowie **Kaliumionen**, die vor allem von extrem halophilen Organismen verwendet werden. Entweder werden diese Verbindungen in der Zelle **neu synthetisiert** oder aus der **Umgebung aufgenommen** und akkumuliert. Einige genutzte Verbindungen sind in Tab. 10.**5** aufgeführt (Abb. 10.**9**).

Tab. 10.**5** **Nutzung verschiedener kompatibler Solute durch Mikroorganismen in unterschiedlichen osmotischen Habitaten.**

10

Organismus	*Kompatible Solute*	*Minimum a_w*
nicht phototrophe Bakterien	Glycin-Betain, Prolin, Glutamat	0,97–0,90
Süßwasser Cyanobakterien	Carnitin, Prolin-Betain, Saccharose, Trehalose	0,98
Salzwasser Cyanobakterien	α-Glucosylglycerin	0,92
marine Algen	Mannitol, verschiedene Glycoside, Prolin, Dimethylsulfonpropionat	0,92
Salzsee Cyanobakterien	Glycin-Betain	0,90–0,75
halophile, anoxygene, phototrophe Bakterien (*Ectothiorhodospira*)	Glycin-Betain, Ectoin, Trehalose	0,90–0,75
extrem halophile Archaea (*Halobacterium*)	KCl	0,75
einige Bacteria (*Haloanaerobium*)	KCl	0,75
Dunaliella (halophile Grünalge)	Glycerin	0,75
xerophile Hefen	Glycerin	0,83–0,62
xerophile filamentöse Pilze	Glycerin	0,72–0,61

10.4.4 Osmoschock-Antwort

Bakterien, die einem Anstieg der Osmolarität, zum Beispiel durch Austrocknen des Habitats ausgesetzt sind, antworten mit einem **zweiphasigen Osmoadaptionsprozess**. Zuerst werden große Mengen an K^+-Ionen aus der Umgebung über spezielle Transportsysteme in die Zelle aufgenommen. Dafür existieren beispielsweise in *E. coli* drei Aufnahmesysteme: Kup und Trk sind permanent präsente Transporter, die ständig niedrige K^+-Mengen aufnehmen. Dagegen ist Kdp ein Transportsystem,

das stark durch osmotischen Schock induziert wird und dann große Mengen an K^+-Ionen aktiv in die Zelle transportiert. Die Aktivität von Kdp wird durch den Turgor der Zelle reguliert. Während der intrazellulären **Anhäufung von Kaliumionen** wird auch die **Glutamatsynthese** induziert, um das für die hohen K^+-Mengen nötige Gegenion zu bilden und damit einer negativen K^+-Wirkung entgegenzuwirken. Der erhöhte intrazelluläre Kalium/Glutamat-Spiegel initiiert nun die zweite Phase der Osmoadaption, die **Anhäufung von kompatiblen Soluten**. In *E. coli* wird das Disaccharid **Trehalose neu synthetisiert**. Auch eukaryotische Zellen wie Hefen nutzen dieses kompatible Solut. Die zur Trehalosebiosynthese nötigen Enzyme werden durch das *otsBA*-Operon codiert. Die durch die erhöhte Osmolarität induzierte Genexpression wird komplett durch den alternativen Sigmafaktor **RpoS** vermittelt. Dieser Sigmafaktor induziert auch die Gene der Stationärphasenanpassung (S. 462). Somit findet man auch bei normalen osmotischen Bedingungen Trehalosebildung in *E.-coli*-Zellen während der Stationärphase.

Alle weiteren kompatiblen Solute, wie Ectoin, Prolin, Cholin, Prolin-Betain und Glycin-Betain, werden aus dem Habitat absorbiert (Abb. 10.**10**). Sie passieren mittels passiver **Diffusion** durch die **Porine** OmpC und OmpF die **äußere Membran** von *E. coli*. Die Expression der zugehörigen *ompC*- und *ompF*-Gene wird durch das Zweikomponenten-System **EnvZ/OmpR** osmolaritätsabhängig vermittelt. Ectoin, Prolin, Prolin-Betain und Glycin-Betain werden über den Kationensymporter ProP und den ATP-abhängigen ABC-Transporter ProU durch die **Cytoplasmamembran** transportiert (📖*Biochemie*, *Zellbiologie*). Während das *proP*-Gen wieder zum RpoS-Modulon gehört, wird *proU* über DNA-Topologie verändernde Regulatoren (H-NS, IHF, HU) gesteuert. Schließlich wird Cholin mittels des Transporters BetT durch die innere Membran geschleust und in einer Zweischrittreaktion zu Glycin-Betain oxidiert. Zugehörige Gene (*betAB*) unterliegen wieder einer Osmoregulation (Abb. 10.**10**).

Im grampositiven *Bacillus subtilis* vermittelt eine Vielzahl unterschiedlichster **Transportsysteme** (OpuA, OpuB, OpuC, OpuD, OpuE) den Transport von Prolin-Betain, Glycin-Betain, Cholin, Ectoin, Carnitin, Prolin und anderen kompatiblen Soluten. Cholin wird cytoplasmatisch, wie in *E. coli*, zu Glycin-Betain oxidiert. Zusätzlich kann *B. subtilis* **Prolin** osmotisch induziert in großen Mengen de novo **synthetisieren**. Einige osmotisch regulierten Gene werden in *B. subtilis* über den alternativen Sigmafaktor **SigB** induziert, der eine allgemeine Stressantwort vermittelt (S. 482).

In sowohl gramnegativen wie auch grampositiven Bakterien dienen einige der **Transporter**, wie OpuA, BetP und ProP, auch als **Osmosensoren**, die an der Detektion des Umweltreizes und an der Anpassungsreaktion beteiligt sind.

Über die Anpassungsmechanismen an Bedingungen **niedriger Osmolarität** im Habitat ist weniger bekannt. Um ein Platzen der Zelle durch erhöhte Wasseraufnahme zu verhindern, werden Wasser und Solute exportiert. Dabei werden zum Wassertransport spezielle Wassertransporter, sogenannte **Aquaporine** (AqpZ, MscL, MscS), benutzt (📖*Biochemie, Zellbiologie*).

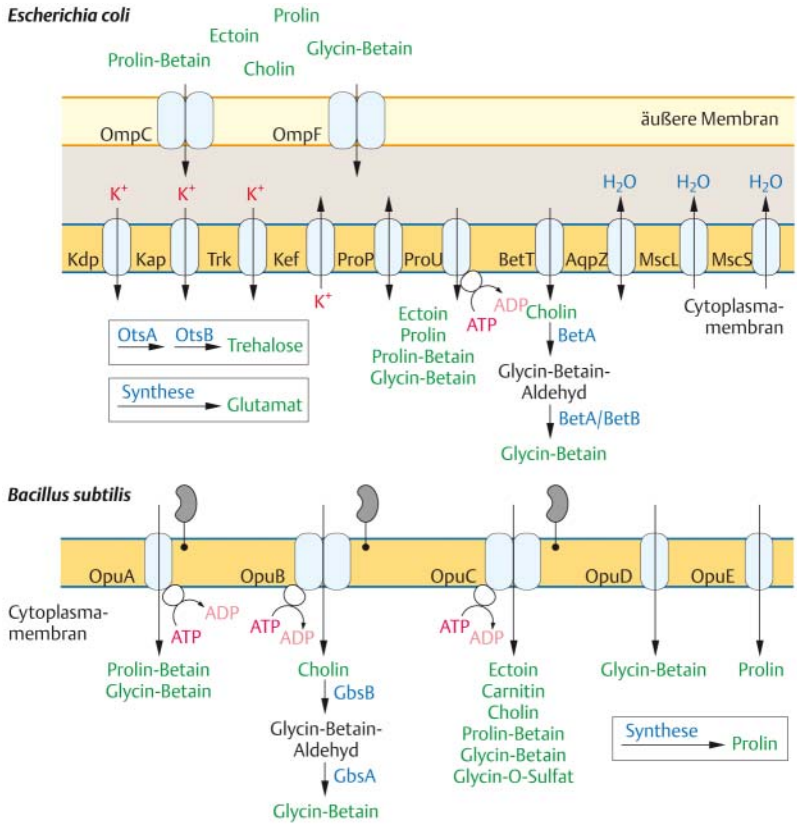


Abb. 10.**10** **Anpassung an sich ändernde osmotische Bedingungen.** Vergleich der bisher bekannten Transporter und Biosynthesesysteme aus *E. coli* und *B. subtilis*.

Einteilung von Mikroorganismen nach der für ihr Wachstum optimalen NaCl-Konzentration (M):
- **nicht halophil:** < 0,2
- **leicht halophil:** 0,2–0,5
- **moderat halophil:** 0,5–2,0
- **extrem halophil:** > 3,0
- **halotolerant:** < 0,2

kompatible Solute: Organische Substanzen, z. B. Glycin-Betain, Prolin, Trehalose; verhindern den Wasserentzug und damit die Austrocknung der Zellen. Sie sind mit dem Stoffwechsel kompatibel, werden im Cytoplasma von Organismen angereichert, die in einem Lebensraum mit stark osmotisch wirksamen Substanzen wachsen oder kurzfristig diesen ausgesetzt sind.

10.5 Anpassung an Sauerstoffpartialdruck und Sauerstoffstress

Sauerstoff dient als Elektronenakzeptor für Elektronentransportprozesse, die meist zum Aufbau eines Protonengradienten an der Cytoplasmamembran von Bakterien führen. Dies ist die effizienteste Art zellulärer Energiegewinnung. Unter anaeroben Bedingungen, also in der Abwesenheit von Sauerstoff können alternative Elektronenakzeptoren, wie Nitrat, Nitrit, Fumarat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) oder Thiosulfat benutzt werden. Im Vergleich dazu bieten Fermentationsprozesse schlechteste Energieausbeute. Je nachdem welche Elektronenakzeptoren im Lebensraum zu finden sind, wird durch ein komplexes Regulationsnetzwerk sichergestellt, dass immer die **effizienteste Form der Energiegewinnung** genutzt wird. Das Leben mit Sauerstoff ist aber auch gefährlich, denn es bilden sich **Zell-schädigende Sauerstoffradikale**. Diese werden durch ein Rezeptorsystem erkannt, eine **Sauerstoffstressantwort** ausgelöst und die Radikale durch Katalasen, Peroxidasen und Superoxid-Dismutasen unschädlich gemacht.

10.5.1 Sauerstoff und Energiegewinnung

Für den Menschen ist eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff lebenswichtig, da Sauerstoff als Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette zur ATP-Bildung benötigt wird (📖*Biochemie, Zellbiologie*). Viele Prokaryoten führen ebenfalls eine Atmung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor durch. In Abwesenheit von Sauerstoff werden entweder alternative Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Nitrit, Fumarat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) oder Thiosulfat für eine anaerobe Atmung oder Fermentationsprozesse zur Energiegewinnung genutzt (Abb. 10.**11**). Ausschlaggebend für den Energiegewinn ist die Redoxpotentialdifferenz zwischen Elektronendonor und terminalem Elektronenakzeptor (S. 314, 📖*Biochemie*, *Zellbiologie*). Sie ist bei Nutzung von Sauerstoff am größten und bei Fermentationen am geringsten.

So bestimmt das Vorhandensein und die Art des Elektronenakzeptors die **Effizienz** und Form der **Energiegewinnung**. Spezialisten nutzen vielfältigste Formen der **Atmung** und **Fermentation**, um sich ihre Habitate zu erschließen. Fakultativ anaerobe Organismen können dank einer fein abgestimmten Regulation auch bei wechselnden Sauerstoffpartialdrücken immer eine optimale Energieausbeute erreichen.

Gemäß ihrer Wachstumsfähigkeiten bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken, teilt man Mikroorganismen in Aerobe, Anaerobe, fakultativ Anaerobe und Mikroaerophile ein. **Strikt Aerobe** benötigen Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung. **Strikt anaerobe** Organismen können dagegen in

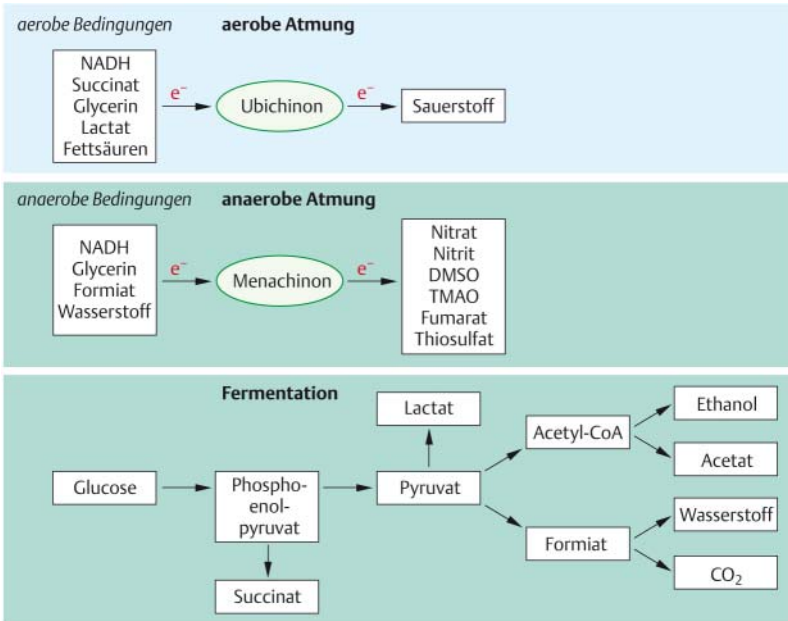


Abb. 10.**11** **Formen der aeroben und anaeroben Energiegewinnung in *E. coli*.**

Anwesenheit von Sauerstoff nicht wachsen, aber oft überleben. Sie besitzen dazu eine **Superoxid-Dismutase**, die entstehende reaktive Sauerstoffspezies abbauen kann. Strikt anaerobe Organismen bevorzugen **fermentative Formen** der Energiegewinnung. **Fakultativ Anaerobe** nutzen Sauerstoff zur Energiegewinnung, wenn er vorhanden ist. Sie können aber auch fehlenden Sauerstoff durch **alternative Elektronenakzeptoren** ersetzen oder **Fermentationsprozesse** zur Energiegewinnung heranziehen. **Mikroaerophile** wachsen am besten bei **niedrigem Sauerstoffpartialdruck**. Bezogen auf das Redoxpotential des Lebensraums wachsen Aerobe zwischen +500 mV und +300 mV, fakultativ Anaerobe zwischen +300 mV und –100 mV und Anaerobe zwischen +100 mV und –250 mV.

10.5.2 Regulation des Energiestoffwechsels

Das Überleben und die Konkurrenzfähigkeit von Mikroorganismen in Habitaten mit ständig **wechselndem Sauerstoffpartialdruck** hängt davon ab, wie schnell und effizient sie die Form ihrer **Energiegewinnung** an die jeweils herrschenden Bedingungen **anpassen** können. Das am besten untersuchte bakterielle Anpassungssystem von *E. coli* nutzt dazu eine Kombination verschiedener sauerstoff-

abhängiger Regulationssysteme. *E. coli* besitzt die Möglichkeit, eine Vielzahl von Elektronendonoren (NADH, Glycerin, Formiat, Wasserstoff) durch primäre Dehydrogenasen zu oxidieren und die Elektronen über Chinone mittels terminaler Oxidasen auf diverse Elektronenakzeptoren (Sauerstoff, Nitrat, Nitrit, DMSO, TMAO, Fumarat) zu übertragen (Abb. 10.**11**). Gleichzeitig besitzt *E. coli* eine hoch entwickelte gemischte Säuregärung. Ziel der Zelle bei einem Absinken des Sauerstoffpartialdrucks ist die schnelle Expression sauerstoffunabhängiger Energiegewinnungssysteme bei einer gleichzeitigen Repression sauerstoffabhängiger Enzyme.

Bei einem Wechsel von aerober zu anaerober Lebensweise werden so in *E. coli* eine Vielzahl von Genen durch den Transkriptionsfaktor **Fnr** (**f**umarate **n**itrate **r**eduction) induziert. Dazu gehören Gene für Dehydrogenasen (Hydrogenase, Formiat-Dehydrogenase, Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase) und terminale Oxidasen (Nitrat-Reductase, Nitrit-Reductase, TMAO-Reductase, DMSO-Reductase, Fumarat-Reductase) (Abb. 10.**12**). Gleichzeitig kommt es zur Induktion diverser Fermentationsgene mittels Fnr. Fnr misst dabei den Sauerstoffpartialdruck über ein proteingebundenes Eisen-Schwefel-Zentrum. Unter reduzierten Bedingungen ist das Eisen-Schwefel-Zentrum intakt und Fnr kann an Promotoren entsprechender Zielgene binden und diese regulieren. In der Anwesenheit von Sauerstoff wird das Eisen-Schwefel-Zentrum zerstört und Fnr verliert seine Wirkung.

Das Zweikomponenten-System **ArcA/B** (**a**erobic **r**espiration **c**ontrol) ist hauptsächlich verantwortlich für die Repression von Genen des aeroben Energiestoffwechsels (Cytochrom *c*-Oxidase, Citratzyklus-Enzyme, Pyruvat-Dehydrogenase, Superoxid-Dismutase) und für die weitere Induktion von Fermentationsgenen

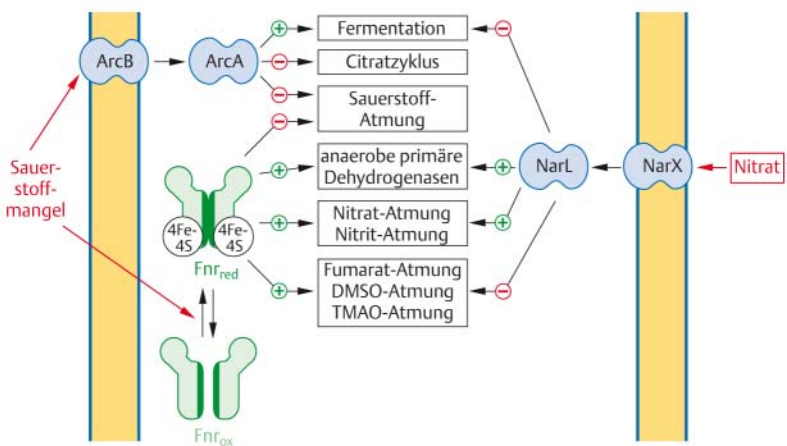


Abb. 10.**12** **Regulation des Energiestoffwechsels von *E. coli* durch den Sauerstoffpartialdruck und Nitrat im Lebensraum mittels der Regulatorsysteme Fnr, ArcA/B, NarX/L.**

(Pyruvat-Formiat-Lyase). ArcB ist eine membranständige Sensorkinase, die auf das Signal „Sauerstoffmangel" mittels Autophosphorylierung reagiert. Dabei wird Sauerstoffmangel am Redoxzustand von Chinonen erkannt, mit denen ArcB interagiert. Diese dienen in aeroben und anaeroben Atmungsketten als Elektronenüberträger. Durch Transphosphorylierung wird das Signal auf den Transkriptionsregulator ArcA übertragen. ArcA-P reguliert über DNA-Bindung die Expression von über 300 Zielgenen. Dabei steuert das ArcA/B-System die Transkription des Gens für den alternativen Stationärphasen Sigmafaktor RpoS und in Zusammenspiel mit einem weiteren Regulator RssB auch dessen Proteolyse. So wird die Energiegewinnung der Wachstumsphase mit der Stationärphasenregulation koordiniert.

Durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale $E^{0\prime}$ sind für die verschiedenen anaeroben Atmungsprozesse und die Fermentation sehr **unterschiedlich hohe Energieausbeuten** zu erwarten (📖 *Biochemie*, *Zellbiologie*, Abb. 10.**11**). Die höchste Energieausbeute liefert die Nitratatmung. Andere Atmungsprozesse, wie DMSO- oder Fumaratatmung, aber vor allem Fermentationsprozesse sind erheblich ineffizienter. Daher wäre eine Produktion der anderen anaeroben Enzymsysteme in Anwesenheit von Nitrat für *E. coli* Energieverschwendung. Allerdings werden durch Fnr zuerst alle Formen der anaeroben Energiegewinnung induziert ohne Berücksichtigung der besonderen Rolle von Nitrat. Deshalb wird diese generelle ArcA/B- und Fnr-vermittelte primäre Antwort auf anaerobe Bedingungen durch die An- oder Abwesenheit von Nitrat im Lebensraum sekundär nochmals differenziert. Da durch Nitratatmung Nitrit entsteht und dieses auch effizient verwertet werden kann, wird Nitrit ebenfalls bei dieser sekundären Anpassungsreaktion berücksichtigt. Die Zweikomponenten-Systeme **NarX/L** und **NarP/Q** (nitrate respiration) reagieren auf die Anwesenheit von Nitrat und Nitrit im Lebensraum. NarX und NarQ dienen als die Sensorkinasen und NarL und NarP als die darüber aktivierten Transkriptionsregulatoren. Durch Nitrat- oder Nitritpräsenz aktivierte NarL/NarP-Systeme reprimieren Gene anderer alternativer Atmungssysteme und der Fermentation (DMSO-Reduktase, Alkohol-Dehydrogenase, Fumarat-Reduktase, Pyruvat-Formiat-Lyase), während Gene der Nitrat- und Nitritatmung (Nitrat-Reduktase, Nitrit-Reduktase, Nitrittransporter, Formiat-Dehydrogenase) zusätzlich deutlich induziert werden. Über dieses komplexe Regulationsnetzwerk (Abb. 10.**12**) wird gesichert, dass unter anaeroben Bedingungen immer die effizienteste Form der Energiegewinnung genutzt und keine Energie unnötigerweise für die Expression zusätzlicher Systeme verschwendet wird.

10

10.5.3 Sauerstoffstress

Ein Nachteil der energetisch günstigen Sauerstoffatmung mit hoher Energieausbeute ist die Bildung toxischer, hoch reaktiver Sauerstoffspezies. O_2 kann unerwünschterweise Elektronen aus Elektronentransportketten aufnehmen

und dabei Superoxide (O_2^-) und Hydroxylradikale ($OH^\bullet$) bilden. Außerdem bilden einige Flavoenzyme Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- + 2\ H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 + H^+ + e^- \rightarrow H_2O + OH^\bullet$$

$$OH^\cdot + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$$

Da diese sehr reaktiven Sauerstoffspezies zelluläre Strukturen zerstören, haben sauerstoffexponierte Organismen Schutzsysteme aufgebaut. Eine nicht enzymatische **Detoxifikation** wird durch die Anhäufung reduzierter **Schutzsubstanzen** wie **Glutathion** erreicht. So reagieren O_2^-, OH^+ und H_2O_2 mit Glutathion (📖 *Biochemie*, *Zellbiologie*) zu Wasser. Auch die schützende Wirkung von NADPH, NADH und Thioredoxin ist bekannt. Als zweite Möglichkeit hat die Zelle Enzyme zur Detoxifikation zur Verfügung. Die verbreitetste Enzymklasse sind die **Katalasen**, die H_2O_2 in Wasser umwandeln. Eine weitere Enzymfamilie, die Wasserstoffperoxid neutralisiert, sind die **Peroxidasen**. Sie unterscheiden sich durch ihr Reduktionsmittel (NADH) von den Katalasen. Schließlich werden zwei Moleküle Superoxid (O_2^-) durch die Metallo-Enzymfamilie der **Superoxid-Dismutasen** in Gegenwart von Protonen (H^+) zu H_2O_2 und O_2 disproportioniert. Um das entstehende Wasserstoffperoxid zu entsorgen, arbeiten die Superoxid-Dismutasen meist mit Katalasen zusammen.

Katalase: $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$

Peroxidase: $H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2\ H_2O + NAD^+$

Superoxid-Dismutase: $O_2^- + O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Die meisten aeroben und fakultativ aeroben Bakterien enthalten deshalb sowohl eine Superoxid-Dismutase als auch eine Katalase. Im Gegensatz zur Katalase ist die Superoxid-Dismutase unentbehrlich für aerobes Wachstum.

10.5.4 Sauerstoffstress-Antwort

Das Sauerstoffstress-Modulon von *E. coli* beinhaltet 70 Proteine, die durch Superoxid (O_2^-) deutlich in ihrer Expression beeinflusst werden. Etwa die Hälfte dieser Proteine reagiert ebenfalls auf die Gabe von H_2O_2. Innerhalb dieses Stress-Modulons konnten bisher zwei Regulons identifiziert werden, das OxyR-System und das SoxRS-System.

Das **OxyR-Regulon** besteht aus ungefähr 30 bekannten Proteinen mit Schutzfunktion, deren Expression durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) induziert wird. Der Regulator OxyR detektiert **H_2O_2** durch die Oxidation proteinlokalisierter Cysteinreste unter Bildung von Disulfid-Brücken. Nur die oxidierte Form von OxyR kann die Transkription von Zielgenen aktivieren. Zu den durch OxyR regulierten Genen gehören die Gene für eine **Katalase** (*katG*), **Glutathion-Reductase** (*gorA*),

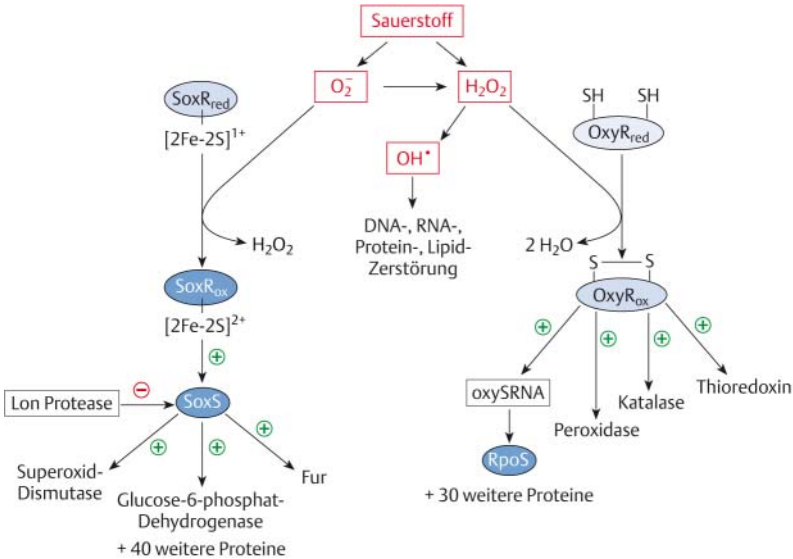


Abb. 10.**13** **Die molekulare Sauerstoffstressantwort von *E. coli* vermittelt durch die SoxRS- und OxyR-Regulationssysteme.**

Enzyme der **Eisen-Schwefel-Zentrenbildung** (*sufABCDES*) und **Alkyl-Hyperoxid-Reductase** (*ahpCF*). Schließlich wird über OxyR die Expression des *oxyS*-Gens gesteuert. Die regulatorische RNA OxyS steuert die Translation des alternativen Stress-Sigmafaktors RpoS (S. 480) und verbindet darüber die Sauerstoffstress-Antwort mit anderen Stress-Regulons.

Das zweite Sauerstoffstress-Regulon, das **SoxRS-System**, umfasst 40 Proteine, die durch Superoxid ($\mathbf{O_2^-}$) induziert werden und ebenfalls an der Schutzfunktion der Zelle beteiligt sind. Über ein Eisen-Schwefel-Zentrum des Regulators SoxR wird die Präsenz von O_2^- gemessen und SoxR dabei aktiviert. SoxR induziert dann die Expression des **zweiten Regulators** des Systems SoxS, der seinerseits die eigentlichen Zielgene des Regulons reguliert. Zu den Genen, die durch SoxS reguliert werden, gehören die **Superoxid-Dismutase** (*sodA*), das DNA-Reparaturenzym **Endonuclease IV** (*nfo*), die **Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase** (*zwf*), **Fumarase** C (*fumC*) und die **Aconitase** (*acnA*). Der Regulator SoxS wird in wenigen Minuten von der Lon-Protease abgebaut. Dies sichert die Präzision der regulierten Stressantwort.

Es existiert **kein** Enzymsystem zur **Detoxifikation** von Hydroxylradikalen ($\mathbf{OH^•}$). Diese sind chemisch so reaktiv, dass sie sofort nach Entstehen mit dem ersten möglichen Reaktionspartner reagieren und damit nie das Reaktionszentrum eines Detoxifikationsenzyms erreichen würden. Da $OH^•$ meist durch die Reaktion

von H_2O_2 mit enzymgebundenem Fe^{2+} spontan entsteht, sind Aminosäurereste des gleichen Proteins die naheliegendsten Reaktionspartner. Das Protein wird bei dieser Reaktion in der Regel irreversibel geschädigt. Die Konzentration von $OH^{\cdot}$ lässt sich daher nur über die H_2O_2-Konzentration in der Zelle kontrollieren.

Strikt Aerobe: Benötigen Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung, z. B. *Micrococcus luteus.*
Strikt Anaerobe: Können in Anwesenheit von Sauerstoff nicht wachsen, z. B. *Bacteroides fragilis.*
Fakultativ Anaerobe: Können in An- und Abwesenheit von O_2 wachsen. Sie können zu O_2 alternative terminale Elektronenakzeptor oder Fermentationsprozesse unter anaeroben Bedingungen zum Wachstum nutzen, z. B. *E. coli.*
Mikroaerophile: Wachsen am besten bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck ($< 0{,}2$ Atmosphären), z. B. *Corynebacterium diphteriae.*
Sauerstoffregulation: Fnr und ArcAB messen Sauerstoff, NarXL und NarPQ messen Nitrat und Nitrit. Regeln zusammen Gene des Energiestoffwechsels.
Sauerstoffstress: Bildung von zellschädigenden Superoxiden. Werden durch SoxRS und OxyRS erkannt, Katalasen und Superoxid Dismutasen werden gebildet.

10.6 Stoffwechselsteuerung durch stringente Kontrolle, Attenuation, RNA-Schalter, Stationärphase und Katabolitenregulation

Die Energie- und Baustoffwechsel von Prokaryoten muss sich permanent den zur Verfügung stehenden Nährstoffen anpassen. Dabei sind lange Phasen des Hungerns die Regel. Durch die **stringente Kontrolle** wird ein Aminosäure- und Kohlenstoffquellenmangel am Ribosom gemessen. Als Reaktion werden anabole Reaktionen zu Gunsten von katabolen über das Alarmon ppGpp unterdrückt. Die Biosynthese von Tryptophan und von Enzymcofaktoren, wie FMN, Vitamin B_{12} und S-Adenosylmethionin, werden abhängig vom zellulären Bedarf auf Ebene der mRNA durch Translationskontrolle mittels **Attenuation** und **RNA-Schaltern** reguliert. Bei Wachstumsstillstand in der Stationärphase werden durch alternative Sigmafaktoren (RpoS, SigB) eine Vielzahl von Genen aktiviert, deren Genprodukte zelluläre Strukturen sichern und den Organismus auf ein Überleben im Mangelzustand vorbereiten. Stehen schließlich unterschiedliche Kohlenstoffquellen zur Verfügung wird über die **Katabolitenregulation** die am effizientesten zu verwertende bevorzugt. Prokaryoten nutzen komplexe Regulationsnetzwerke bestehend aus einer Vielzahl von Sensoren und Regulatoren, um auf Ebene der Transkription, Translation und Proteinstabilität hunderte von Transportern und Enzymen zu kontrollieren. Dies sichert schnelles effizientes Wachstum in Anwesenheit von Nährstoffen, das Überleben in Zeiten des Hungers und so die Konkurrenzfähigkeit im Lebensraum.

Die meisten Mikroorganismen sind in ihrem Habitat längeren Perioden ausgesetzt, in denen ein Mangel an Grundbausteinen für Biosynthesen und an Energiestoffquellen herrscht. Um sich von guten, wachstumsfördernden Bedingungen auf Mangelbedingungen umzustellen, besitzt die Zelle Regulationsmechanismen für Anabolismus, Katabolismus und das Überleben bei längerem Wachstumsstillstand, der **Stationärphase** (S. 480).

10.6.1 Stringente Kontrolle

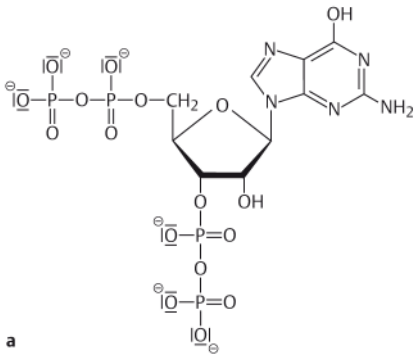
Bei Aminosäure- und Kohlenstoffquellenmangel kommt das Nettowachstum der Zellmasse schnell zum Erliegen. In einer ersten Phase werden die DNA-Synthese und die Zellteilung noch fortgesetzt. Allerdings werden die Zellen kürzer und leichter. Die RNA-Synthese und die Proteinbiosynthese werden jedoch schnell eingestellt. Es folgt eine Inhibition der Biosynthese von Kohlenhydraten, Phospholipiden und Zellwandbestandteilen. Dagegen werden selektiv Gene für die Aminosäurebiosynthese und katabole Wege aktiviert, um der Mangelsituation entgegenzuwirken. Dieser Gesamtprozess heißt **stringente Kontrolle** (stringent response).

10

Durch Aminosäuremangel werden in Bakterien unbeladene tRNAs angehäuft. Infolgedessen kommt es am Ribosom zum Einbau einer unbeladenen tRNA in die Aminoacylstelle (A site). Die Peptidkettenverlängerung wird abgebrochen. Dadurch wird die (p)ppGpp-Synthetase I (RelA), die an der großen 50S ribosomalen Untereinheit gebunden ist, aktiviert. Sie katalysiert den Transfer der βγ-Pyrophosphatgruppe von ATP auf die 3′-Hydroxylgruppe von GTP (seltener auch GDP), um (p)ppGpp zu bilden. Gebildetes pppGpp wird durch eine 5′-Phosphohydrolase in das eigentliche Alarmon ppGpp überführt (Abb. 10.**14**). Ein zweites Enzym SpoT besitzt sowohl eine (p)ppGpp synthetisierende, als auch abbauende Aktivität. Die zelluläre Konzentration von ppGpp wird durch das abbauende Recyclingsystem bestehend aus SpoT und einer Nucleosid-5′-Diphosphatkinase (Ndk) kontrolliert. Ein Mangel an Kohlenstoffquellen, Fettsäuren und Eisen inaktiviert das degradierende System und führt zur Anhäufung des Alarmons. Dazu wechselwirkt unter anderem die Fettsäuresynthase mit SpoT (Abb. 10.**14**). Die intrazelluläre Anhäufung von ppGpp führt zu einer Bindung des Alarmons an die β- und β′-Untereinheit der RNA-Polymerase, so dass die Transkription einer Vielzahl von Genen verändert wird. Die sowohl aktivierende, als auch reprimierende Wirkung von ppGpp wird noch durch den Transkriptionsfaktor DksA verstärkt.

Akkumulierende ribosomale Proteine, die nun wegen fehlender rRNA nicht mehr zum Ribosomaufbau benötigt werden, unterdrücken die Translation ihrer eigenen mRNAs. Dies ist die Ursache für weniger Ribosomen in der Zelle und eine stark reduzierte Proteinbiosynthese. Im Gegenzug werden Operons, die für Enzyme der Aminosäure- und Nucleotidbiosynthese sowie für diverse Kohlenstoffabbauwege codieren, verstärkt transkribiert. Zusätzlich kommt es zum

erhöhten Proteinabbau, der zur Freisetzung von benötigten Aminosäuren führt. Die beobachteten Effekte der stringenten Kontrolle sind in Tab. 10.**6** zusammengefasst. Über die Stimulation der Transkription der *rpoS*-Transkription durch ppGpp wird die stringente Kontrolle mit der RpoS vermittelten Stressantwort gekoppelt.


OH
N
N
N
N
NH2
O
O
OH
O
O
O

Tab. 10.6 **Zelluläre Reaktionen auf das Alarmon ppGpp.**

Direkte Wirkung	*Indirekte Wirkung*
Inhibierung:	**Inhibierung:**
Transkription von rRNA und tRNA-Genen	Proteinbiosynthese Phospholipidsynthese
Elongation der Peptidkette am Ribosom	Kohlenhydratbiosynthese Zellwandbildung
Transkription von Genen für biosynthetische Enzyme	Initiation der DNA-Replikation tRNA-Prozessierung Zellteilung
Aktivierung:	**Erhöhung:**
	Proteinabbau Chaperonbildung
Transkription von Genen für katabole Enzyme	Stressproteinbildung Translationsgenauigkeit

10

10.6.2 Steuerung der Aminosäure- und Cofaktorenbiosynthese auf Ebene der RNA durch Attenuation und RNA-Schalter

Die Biosynthese von Aminosäuren ist ein energetisch aufwändiger Prozess. Im Fall der komplexen aromatischen Aminosäure Tryptophan nutzen Bakterien deshalb eine Kombination verschiedener Regulationsprinzipien zur Steuerung dieser Prozesse. So wird ein beteiligtes Enzym, die Anthranilat-Synthase, **allosterisch** durch das **Endprodukt** Tryptophan **gehemmt**. Auf genetischer Ebene wird die Transkription der Gene für die Enzyme der Tryptophanbiosynthese durch den **TrpR-Repressor** gesteuert. In Anwesenheit von Tryptophan bindet TrpR die Aminosäure und verändert dabei seine Proteinkonformation so, dass er eine Operatorstelle im Tryptophan-Operon-Promotor erkennt und bindet. Diese Operatorstelle überlappt mit der Bindungsstelle für die RNA-Polymerase, sodass durch TrpR-Bindung wiederum deren Bindung und damit die Transkriptionsinitiation verhindert werden. Im Gegensatz zu LacI, wo es durch Allolactose zur Ablösung des Repressors vom Promotor und somit zur Derepression des Lactose-Operons kommt (S. 483), bewirkt Tryptophan die Aktivierung von TrpR und damit die Repression des Tryptophan-Operons.

Ein dritter Kontrollmechanismus zur direkten Kontrolle der Expression des Tryptophan-Operons in Abhängigkeit von der zellulären Tryptophankonzentration nutzt das Prinzip der **Attenuation**. Stromabwärts des TrpR-Operators, zwischen Transkriptions- und Translationsstart, befindet sich eine **Leitsequenz** für das Tryptophan-Operon. Nach deren Transkription codiert die mRNA dieses Bereichs ein 14 Aminosäuren langes Leitpeptid, das zwei aufeinander folgende Tryptophanreste enthält. Über die Biosynthese dieses kurzen Leitpeptids wird

die Tryptophankonzentration gemessen und die Transkription des gesamten Tryptophan-Operons gesteuert. Dies ist möglich, da in Bakterien Transkription und Translation gekoppelt im Cytoplasma stattfinden. So fehlt bei Tryptophanmangel die mit Tryptophan beladene tRNA zur Translation der beiden Tryptophan spezifischen Codons des Leitpeptids (Abb. 10.**15a**). Als Konsequenz kommt es zum Verharren der Ribosomen an einem der beiden tryptophanspezifischen Codons der Leitpeptid-mRNA. Die gerade zuvor gebildete mRNA stromabwärts des leitpeptidcodierenden Bereichs bildet eine **haarnadelähnliche Sekundärstruktur**, die der RNA-Polymerase erlaubt, die Gene des Tryptophanbiosynthese-Operons zu transkribieren. Über die gebildeten biosynthetischen Enzyme wird der Tryptophanmangel ausgeglichen. Ist genügend Tryptophan in der Zelle (Abb. 10.**15b**), kann das Leitpeptid mit beiden Tryptophanresten zu Ende translatiert werden. Das Ribosom hält dann erst am Stop-Codon des Leitpeptids an. Dadurch wird eine andere alternative Sekundärstruktur der stromabwärts liegenden mRNA induziert. Diese mRNA-Struktur bewirkt die Dissoziation der RNA-Polymerase von der DNA und verhindert so die Transkription des Tryptophanbiosynthese-Operons. Da genug Tryptophan in der Zelle vorhanden ist, wird so dessen Biosynthese reduziert. Die regulierende RNA-Region, die die beiden unterschiedlichen Konformationen einnehmen kann, nennt man den Attenuator. Ähnliche Attenuatoren mit zugehörigen Leitsequenzen findet man auch vor Operons zur Biosynthese von anderen Aminosäuren.

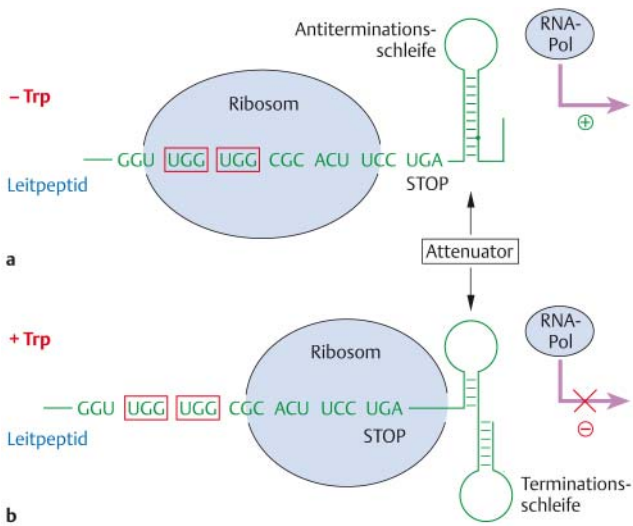


Abb. 10.**15** **Regulation der bakteriellen Genexpression durch Attenuation am Beispiel des Tryptophan-Operons.**

RNA-Schalter: Die Bildung von Enzymen für die Biosynthese von Flavinmononucleotid (FMN), Thiaminpyrophosphat, Vitamin B_{12}, S-Adenosylmethionin (SAM), Lysin und Guanin werden auf Ebene der zugehörigen mRNAs reguliert. Dabei binden die Cofaktoren, Aminosäuren und Nucleotide direkt an den nicht translatierten Bereich stromaufwärts des Startcodons der Translation der mRNA betroffener Enzyme. Ähnlich wie bei der Attenuation wird dadurch die **Struktur der mRNA** in dieser Region drastisch verändert. Dadurch kann einerseits die Translation, aber andererseits auch die Transkription der mRNA deutlich verändert werden.

10.6.3 Stationärphase und generelle Stressantwort

Wenn Nährstoffe im Habitat begrenzt sind, stellen Mikroorganismen ihr Wachstum ein und erreichen damit die **Stationärphase**. Sie bereiten sich anhand einer molekularen Anpassungsreaktion auf eine Periode des Überlebens mit minimaler Energieversorgung bei gleichzeitiger Konfrontation mit diversen umweltbedingten Gefahren vor. Die Stationärphasen-Modulons bewirken eine möglichst starke Reduktion des Metabolismus und sichern das Überleben von Mikroorganismen, indem sie zelluläre Strukturen vor Schädigung durch Hitze, Kälte, Osmo-, pH- und Sauerstoffstress schützen. Zusätzlich müssen die Detektionssysteme für neue Nährstoffe erhalten bleiben und eine mögliche weitere Wachstumsphase muss vorbereitet werden. Gleichzeitig wird eine generelle Stressantwort auf Nährstoffmangel, Sauerstoffstress, Hitzeschock und Osmoschock über RpoS vermittelt.

In ***E. coli*** kontrolliert der alternative Sigmafaktor **RpoS** die Stationärphasenanpassung. Es sind an die 500 Gene bekannt, die unter direkter oder indirekter RpoS-Kontrolle stehen.

Die Expression des *rpoS*-Gens wird auf der Ebene der Transkription, Translation, Proteinstabilität und seiner Wirkung durch weitere Regulatoren und Signalstoffe kontrolliert. Diese stammen aus den Modulons der stringenten Kontrolle (s. o.), der Katabolitregulation (s. o.), des Sauerstoffstresses (S. 472), des Hitzeschocks (S. 455), des Phosphatregulons (S. 491) und des Osmoschocks (S. 466) und koordinieren über RpoS eine übergreifende Stressanpassungsreaktion. RpoS wirkt meistens aktivierend und selten reprimierend auf die Transkription der Zielgene.

Die **Transkription** des *rpoS*-Gens wird dabei durch das Alarmon der stringenten Kontrolle ppGpp und durch Polyphosphat positiv sowie durch den Katabolitregulator Crp-cAMP negativ kontrolliert. Die **Translation** der *rpoS*-mRNA wird dann wiederum durch ein komplexes Zusammenspiel regulierender RNAs (*oxyS*-RNA, *dsrA*-RNA) und RNA-bindender Proteine (Hfq, H-NS) am Ribosom gesteuert. Die Bildung der dabei regulierenden *dsrA*-RNA wird über den Transkriptionsregulator LeuO ppGpp-abhängig kontrolliert. Auch hier werden Umweltsignale, wie Sauerstoffstress (*oxyS*-RNA über Hfq), späte Stationärphase (HU) und Osmolarität (H-NS), in die Stressantwort integriert.

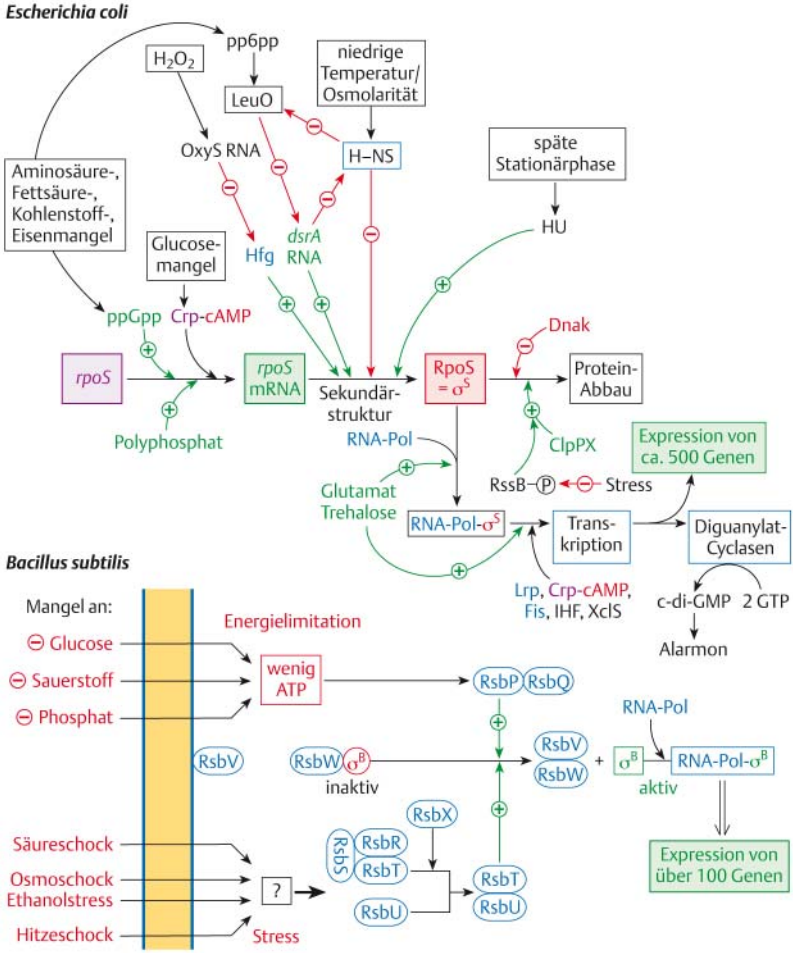


Abb. 10.**16** **Die generelle Stressantwort vermittelt von RpoS in *E. coli* und σ^B in *B. subtilis*.**

Schließlich wird auch die **Proteinstabilität** und damit die Halbwertszeit von RpoS in der Zelle streng über die Proteinase ClpPX kontrolliert. In der exponentiellen Wachstumsphase baut ClpPX RpoS ab. Dabei wird die ClpPX-Aktivität und damit der RpoS-Abbau von dem phosphorylierten Antwortregulator RssB durch eine direkte Wechselwirkung mit der Proteinase deutlich verstärkt. Über eine stressabhängige Kontrolle der RssB-Phsophorylierung wird dieser Prozess kon-

trolliert. In der Stationärphase und bei Hitzeschock stabilisiert das Chaperon DnaK weiterhin durch Bindung RpoS. DnaK schützt damit den alternativen Sigmafaktor vor ClpPX-Abbau. Diese DnaK-Funktion für RpoS ist genau umgekehrt zur Wirkung des Chaperons DnaK auf den alternativen Hitzeschock-Sigmafaktor RpoH (σ^H), der durch DnaK-Wechselwirkung destabilisiert wird. Die Wirkung von RpoS auf die Transkription von Zielgenen wird durch intrazelluläre Moleküle, wie das kompatible Solut Trehalose und durch Glutamat sowie durch eine Vielzahl von Transkriptionsregulatoren (Lrp, Crp, XylS, Fis), nochmals modifiziert. Über dieses komplexe Regulationsnetzwerk führen die vielfältigsten umweltbedingten Stresssituationen neben einer stressspezifischen Antwort auch zur RpoS-koordinierten generellen Stressantwort der *E.-coli*-Zelle.

In ***B. subtilis*** ist der alternative Sigmafaktor **σ^B** für die generelle Stressantwort verantwortlich. Unter Bedingungen exponentiellen Wachstums wird der alternative Sigmafaktor σ^B durch Bindung an den Anti-Sigmafaktor RsbW inaktiviert. In Stresssituationen wird der Anti-Sigmafaktor RsbW wiederum vom Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV gebunden. Dabei wird σ^B freigesetzt und induziert die Bildung von mehr als 100 Stressproteinen, darunter Chaperone, Katalasen und Proteinasen. Der kritische Punkt der Regulation, die Aktivität des Anti-Anti-Sigmafaktors **RsbV**, wird über dessen **Phosphorylierungszustand** kontrolliert. Dabei gibt es wiederum zwei Wege. Der Mangel an Kohlenstoffquellen, Sauerstoff und Phosphat führt zu einer niedrigen ATP-Konzentration in der Zelle. RsbV verliert dabei vermittelt über RsBP und RsbQ sein Phosphat. Dephosphorylierter RsbV kann den Anti-Sigmafaktor RsbW binden, σ^B wird freigesetzt und löst die Stressantwort aus. Ist wieder genug zelluläres ATP da, phophoryliert RsbW den Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV. RsbV verlässt den Komplex mit RsbW und freies RsbW bindet wieder σ^B. Als Antwort auf Säureschock, Hitzeschock, Ethanolstress und Osmoschock wird der Phosphorylierungszustand von RsbV über ein komplexes Wechselspiel von RsbS, RsbT, RsbR mit RsbU kontrolliert. Dabei bildet RsbS mit RsbR und RsbT einen Komplex. Stress vermittelt löst RsbX diesen Komplex auf, so dass RsbT mit RsbU einen neuen Komplex bilden kann, der dann zur RsbV-Dephosporylierung und damit zur σ^B-Freisetzung führt.

Kleine regulatorische RNAs: Kleine nicht codierende RNAs mit regulierender Funktion wurden in allen untersuchten Organismen gefunden. *E. coli* besitzt ungefähr 50 dieser RNAs. Dazu gehören DsrA und OxyS in der RpoS-Kontrolle und der Sauerstoffstressantwort. Insgesamt unterscheidet man eine Klasse von kleinen regulierenden RNAs, die über das RNA-Chaperon Hfq wirken, von anderen, die ohne Hfq ihre Funktion ausüben.

Die Alarmone AppppA und ApppA: *E. coli* besitzt zwei Lysyl-tRNA-Synthetasen. Eine bildet mit Lysin-beladene tRNA, die andere, genannt LysU, wird nur unter Bedingungen eines Hitzeschocks oder bei oxidativem Stress gebildet. Sie synthetisiert sowohl AppppA, als auch ApppA. Über die Wirkung der Alarmone ist wenig bekannt. Eine Veränderung des Zellzyklus wurde beobachtet.

10.6.4 Regulation des Katabolismus

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen und die molekulare Anwort auf zugehörige Mangelsituationen werden durch ein komplexes Regulationsnetzwerk koordiniert. Neben einer Vielzahl von Regulatoren (GalR, AraC), die spezifisch auf eine Kohlenstoffquelle (Galactose, Arabinose) reagieren, sind übergeordnete katabole Regulatoren für die koordinierte Verwertung verschiedener, parallel vorhandener Kohlenstoffquellen verantwortlich. Ein Beispiel ist das cAMP-Crp-Modulon von *E. coli* (Abb. 10.**3**). Das Alarmon dieses Systems ist **zyklisches AMP** (**cAMP**), das bei Abwesenheit eines favorisierten Substrats, wie Glucose, durch eine **Adenylatcyclase** direkt in Verbindung mit dem **Glucosetransportsystem** gebildet wird.

Beim Transport von Glucose in die Zelle wird der Zucker durch das Phosphoenolpyruvat-abhängige **Phosphotransferase-System** (**PTS**, S. 399) phosphoryliert. Dabei wird über eine Enzymkaskade ein Phosphatrest von Phosphoenolpyruvat auf das Enzym IIA übertragen. Phosphoryliertes Enzym IIA überträgt dann in **Anwesenheit von Glucose** den Phosphatrest über einen Transporter auf den Zucker. Dabei wird **dephosphoryliertes Enzym IIA** angehäuft. Dieses inhibiert durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung allosterisch diverse Permeasen und katabole Enzyme zur Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen, wie Lactose, Maltose, Glycerin, Arabinose und Melibiose. So wird ökonomischerweise die Verwertungsmaschinerie anderer Kohlenstoffquellen als Glucose reprimiert. In **Abwesenheit von Glucose** wird phosphoryliertes **Enzym II-P** akkumuliert, da Glucose den Phosphatrest nicht übernimmt. II-P kann die Bildung alternativer Verwertungssysteme nicht mehr unterdrücken (Abb. 10.**17**). Gleichzeitig aktiviert II-P allosterisch die **Adenylatcyclase** (CyaA), die dann **cAMP** synthetisiert. Das gebildete cAMP aktiviert durch Bindung den Transkriptionsregulator Crp (**c**AMP **r**eceptor **p**rotein), der wiederum Gene für Enzyme zur Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen aktiviert (Abb. 10.**18**). Dabei werden 180 Gene induziert und 200 Gene reprimiert. Durch die Regulation der *rpoS*-Transkription durch cAMP-Crp wird die Katabolitregulation mit der Stationärphase und Stressantwort koordiniert.

Ein typisches katabolitreguliertes Operon ist das ***lacZYA*-Operon** (Abb. 10.**18**). Das *lacZ*-Gen codiert für eine β-Galactosidase, die das β-Galactosid Lactose in die Monosaccharide Glucose und Galactose spaltet. Das *lacY*-Gen codiert für eine Permease, die den aktiven Transport von Lactose in die Zelle vermittelt. Das *lacA*-Gen codiert für eine Thiogalactosid-Transacetylase. Das Gen des Repressors LacI wird in die entgegengesetzte Richtung transkribiert. Man kann drei Expressionszustände des Operons unterscheiden, die in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Lactose und Glucose durch die Regulatoren LacI und cAMP-Crp vermittelt werden. In **Abwesenheit von Lactose** bindet der LacI-Repressor an eine Operatorsequenz im Promotor des *lacZYA*-Operons, die mit der RNA-Polymerase-Erkennungsstelle überlappt (Abb. 10.**18a**). So wird die Bindung der RNA-Poly-

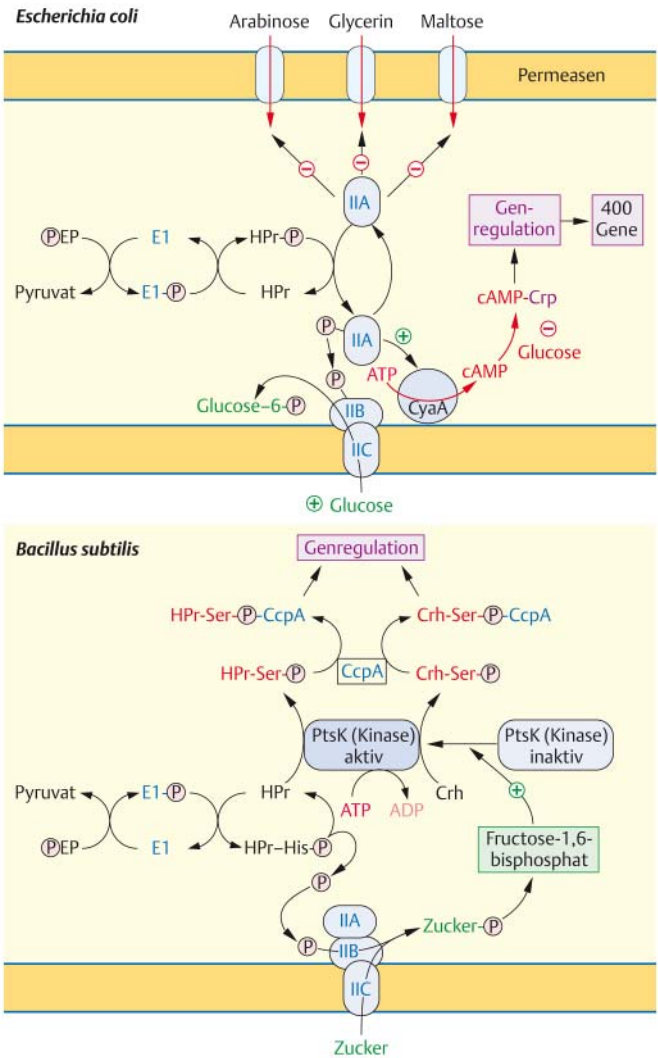


Abb. 10.**17** **Katabolitregulation in *E. coli* und *B. subtilis*.**

merase und die Transkription des *lacZYA*-Operons verhindert. In **Anwesenheit von Lactose** wird diese von der β-Galactosidase nicht nur gespalten, sondern zu einem geringen Anteil in einer Nebenreaktion auch in Allolactose umgewandelt. Allolactose ist der Induktor, der durch Bindung an den Repressor LacI dessen

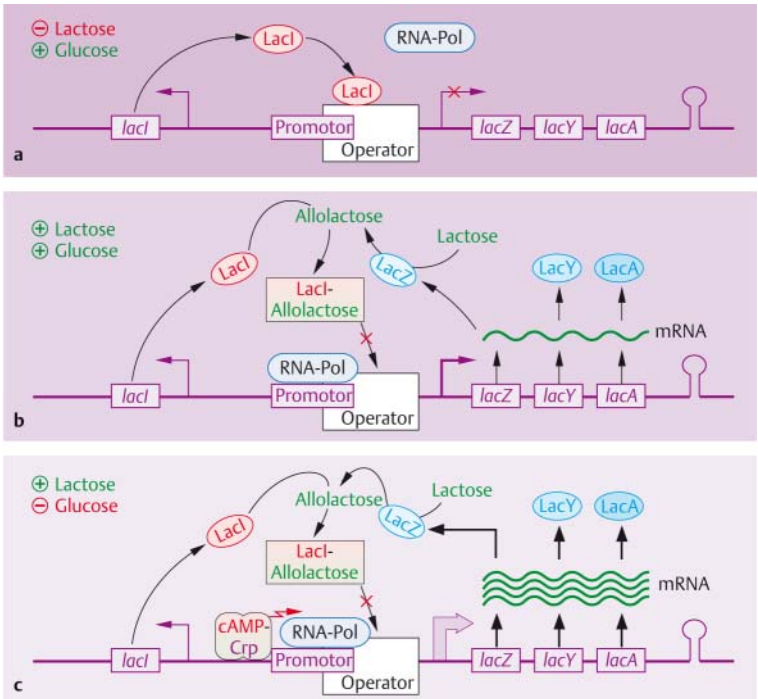


Abb. 10.**18** **Lactose-Operon.** Die Regulation mittels des Lactat-Repressors LacI und des Katabolitregulators cAMP-Crp ist abhängig von der An- oder Abwesenheit von Glucose.

Proteinkonformation so ändert, dass dieser nicht mehr an die Operatorsequenz binden kann. Die Transkription des *lacZYA*-Operons kann nun mit geringer Rate erfolgen. Ob die Lactoseverwertungsmaschinerie auch wirklich benötigt wird, hängt von der An- oder Abwesenheit des von *E. coli* bevorzugten Substrats Glucose ab. Ist Glucose und Lactose gleichzeitig im Wachstumsmedium, bleibt es bei der niedrigen *lacZYA*-Operon-Expression (Abb. 10.**18b**). Herrscht aber Glucosemangel, wird eine Katabolitantwort ausgelöst, die zur Bildung von cAMP-Crp führt. Bei Anwesenheit von Lactose und damit von inaktiviertem Repressor LacI und bei gleichzeitiger Abwesenheit von Glucose und damit aktiviertem Aktivator cAMP-Crp wird die Expression des *lacZYA*-Operons stark induziert (Abb. 10.**18c**). So wird die durch die Glucoseabwesenheit nun für *E. coli* sinnvolle Lactoseverwertung induziert.

In der Mehrzahl der untersuchten Bakterien spielt ein cAMP-abhängiges System keine Rolle bei der Katabolitregulation. In *B. subtilis* stimuliert die Konzentration spezifischer Stoffwechselzwischenprodukte, wie Fructose-1,6-bisphosphat, eine Proteinkinase (PtsK), die dann die Regulationsproteine HPr oder Crh an einem Serinrest phosphoryliert. HPr- oder Crh-P können einen Komplex mit dem Regulator CcpA (**C**atabolite **C**ontrol **P**rotein) bilden und über die Bindung an Promotorelemente (**C**atabolite **R**esponsive **E**lements; cre) die Expression katabolitregulierter Gene steuern (Abb. 10.**17**). Die Aufnahme und Phosphorylierung von Zuckern erfolgt ähnlich wie in *E. coli*.

Stringente Kontrolle (stringent response): Über das Alarmon ppGpp vermittelter Regulationsmechanismus bei Aminosäure- und Kohlenstoffquellenmangel. Induktion der Biosynthese von Aminosäuren, Mobilisierung von alternativen Energiequellen, Reduktion des energieverbrauchenden Baustoffwechsels.
Attenuation und RNA-Schalter: RNA-abhängig auf Ebene der gekoppelten Transkription und Translation kontrollierte Aminosäure- und Vitaminproduktion.
Stationärphasenregulation: Alternative Sigmafaktoren (RpoS, SigB) steuern allgemeine Stationärphasen- und Stressanpassung. Regulation der Bildung der Sigmafaktoren auf Ebene der Transkription, der Translation, der Proteinstabilität und eigenlichen Transkription regulierenden Wirkung.
Kleine regulierende RNAs: Kleine, nicht translatierte RNAs, wie OxyS und DsrA, die die Translation anderer mRNAs beeinflussen.
Katabolitrepression: Hemmung der Produktion von Enzymen für den Abbau alternativer Kohlenstoffquellen bei Anwesenheit einer bevorzugten Kohlenstoffquelle.

10.7 Regulation der Assimilation und Fixierung von Stickstoff

Stickstoff in seiner reduzierten Form NH_4^+ wird für die Biosynthese von Aminosäuren und Nucleinsäuren benötigt und ist daher wachstumslimitierend. Deshalb wird seine Bildung über **Stickstofffixierung** und sein Einbau in Aminosäuren streng reguliert. Die **Glutaminsynthetase** katalsiert den ATP-abhängigen Einbau von NH_4^+ in Glutamat unter Bildung von Glutamin. Die Bildung und Aktivität des Enzyms wird über die zelluläre Konzentration an diversen Aminosäuren und ATP auf Ebene der Transkription des zugehörigen Gens und der Enzymaktivität streng reguliert. Die sauerstoffempfindliche **Nitrogenase** katalysiert die ATP abhängige Reduktion von molekularem N_2 zu NH_4^+. Entsprechend ist die Transkription zugehöriger Gene stark vom Sauerstoffpartialdruck im Lebensraum abhängig.

Reduzierter Stickstoff in Form von **NH_4^+** ist das Ausgangsmolekül für die Bildung von Aminosäuren, den Grundbausteinen der Proteine. Von Aminosäuren leiten sich andere stickstoffhaltige biologische Verbindungen ab, wie die Nucleotide

als Grundbausteine der Nucleinsäuren. NH_4^+ kann einerseits während des **Assimilation**sprozesses durch die Reduktion von **NO_3^-** gebildet werden. Andererseits ist es einigen Bakterien möglich, im Rahmen der **Stickstofffixierung** molekularen Stickstoff (**N_2**) aus der Luft zu NH_4^+ zu reduzieren.

10.7.1 Regulation der Stickstoffassimilation

Bei einer Konzentration von weniger als 1 mM **NH_4^+** im Lebensraum ist die **Glutamin-Synthetase** (GlnS, codiert durch *glnA*) von zentraler Bedeutung für den zweistufigen NH_4^+-Einbau in Aminosäuren. Sie katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat. Glutaminfixiertes NH_4^+ wird dann in einem zweiten Schritt durch die **Glutamat-Synthase** (GltB) auf α-Ketoglutarat übertragen, so dass netto zwei Glutamat entstehen. Bei hohen NH_4^+-Konzentrationen kann NH_4^+ durch die **Glutamat-Dehydrogenase** (Gdh) direkt auf α-Ketoglutarat übertragen werden (S. 420, *Biochemie, Zellbiologie*):

Glutamin-Synthetase: Glutamat + NH_4^+ + ATP → Glutamin + ADP + P_i

Glutamat-Synthase: Glutamin + α-Ketoglutarat + NADPH → 2 Glutamat + $NADP^+$

Glutamat-Dehydrogenase: NH_4^+ + α-Ketoglutarat + NADPH
↔ Glutamat + H_2O + $NADP^+$

Von Glutamat und Glutamin aus werden Amino/Amido-Gruppen in den Stoffwechsel eingeschleust.

Bei einem Mangel an reduziertem Stickstoff gilt es, dessen Assimilation zu aktivieren. Bei einem Überschuss an reduzierten Stickstoffverbindungen oder bei Energiemangel muss die energieintensive Assimilation reprimiert werden. Dazu wird ein komplexes System zur Regulation der Glutamin-Synthetasereaktion und der Expression zugehöriger Gene verwendet.

Die bakterielle Glutamin-Synthetase unterliegt sowohl einer **allosterischen Regulation** als auch einer Kontrolle durch kovalente Modifikation (Abb. 10.**19**). Die **Endprodukte** des Glutaminstoffwechsels, wie AMP, CTP, Tryptophan, Carbamoylphosphat, Histidin und Glucosamin-6-phosphat sowie Glycin und Alanin, sind allosterische **Inhibitoren** des Enzyms. Das Enzym besteht aus 12 Untereinheiten, wovon jede über Bindestellen für alle acht Inhibitoren verfügt. Jeder Inhibitor bewirkt allerdings nur eine teilweise Inhibition des Enzyms (Abb. 10.**19**). Die Wirkung verschiedener Inhibitoren summiert sich, bis zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms in Anwesenheit aller acht Inhibitoren.

Überlagert wird diese allosterische Kontrolle durch eine Hemmung des Enzyms durch **Adenylierung** mittels AMP-Anlagerung in der Nähe des aktiven Zentrums. Diese **kovalente Modifikation** in Abhängigkeit der α-Ketoglutarat-, ATP- und P_i-Spiegel der Zelle erhöht die Sensibilität der Glutamin-Synthetase gegenüber ihren acht allosterischen Inhibitoren. Die Adenylierung wird durch eine Adenyl-Transferase (AT) katalysiert. Die Aktivität der Adenyl-Transferase hängt

wiederum vom Regulator-Protein P_{II} ab. P_{II} wird über eine weitere kovalente Modifikation, einer **Uridylierung**, reguliert, die durch eine Uridylyl-Transferase katalysiert wird. Bei **NH_4^+-Mangel** und ausreichend vorhandener Energie wird die Uridylierung von P_{II} durch α-Ketoglutarat und ATP stimuliert. P_{II}-UMP in Komplex mit der Adenyl-Transferase stimuliert die Desadenylierung der Glutamin-Synthase und erhöht so deren Aktivität (Abb. 10.**19**).

Bei **viel** zellulärem **NH_4^+** und wenig verfügbarer Energie wird die Uridylierung von P_{II} durch Glutamin und P_i gehemmt. Der P_{II}-AT-Komplex adenyliert nun die Glutamin-Synthetase und inhibiert sie auf diese Weise.

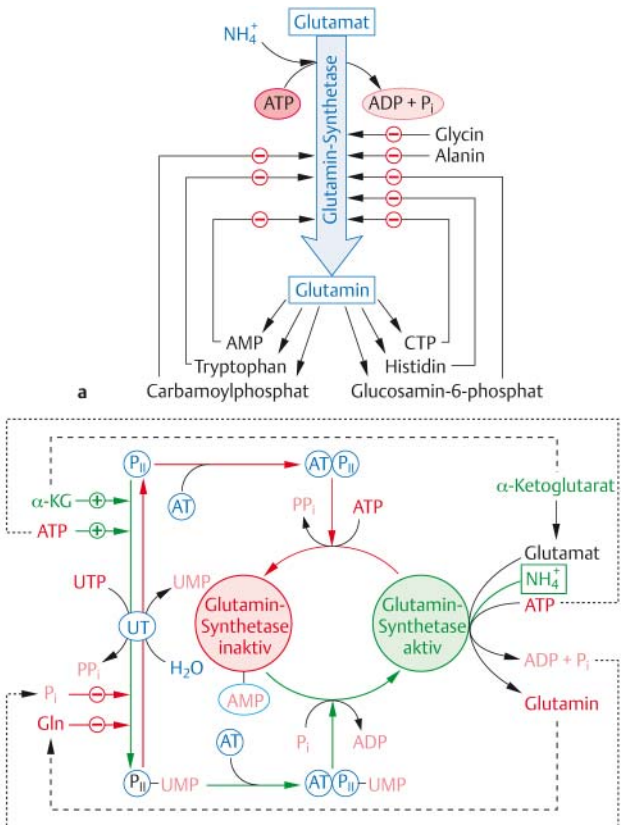


Abb. 10.**19** **Glutamin-Synthetase. a** Allosterische Regulation der Glutamin-Synthetase von *E. coli*. **b** Regulation der Glutamin-Synthetase durch kovalente Modifikation in Abhängigkeit von Produkt/Substrat-Verhältnis und vorhandener Energie.

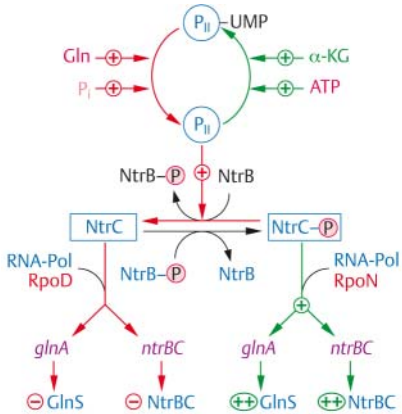


Abb. 10.**20** **Transkriptionelle Kontrolle der Stickstoffassimilation über NtrB/C in *E. coli*.**

Direkt an die kovalente Modifikation der Glutamin-Synthetase ist in *E. coli* die **transkriptionelle Kontrolle** des zugehörigen *glnA*-Gens gekoppelt (Abb. 10.**20**). Das Signal des zellulären Glutamin/α-Ketoglutarat-Verhältnisses, und damit des Spiegels an reduziertem Stickstoff, wird über das Zweikomponenten-System NtrBC vermittelt. Bei NH_4^+-Überschuss stimuliert P_{II} die Dephosphorylierung des Antwortregulators NtrC durch die Sensorkinase NtrB. NtrC ist an der niedrigen Transkription der *glnA*- und *ntrBC*-Gene durch eine σ^{70} (RpoD)-abhängige RNA-Polymerase beteiligt. Bei NH_4^+-Mangel wird das Gleichgewicht zur Phosphorylierung von NtrC durch NtrB-P verschoben. Entstandenes NtrC-P induziert über eine σ^{54} (RpoN)-abhängige RNA-Polymerase stark die Expression der *glnA*- und *ntrBC*-Gene und sorgt so für die nötige Glutamin-Synthetase-Bildung. Der alternative Sigmafaktor σ^{54} ist spezifisch für die Stickstoffregulation und induziert mit NtrC-P auch Gene für die Verwertung der stickstoffhaltigen Aminosäuren Histidin (*hut*) und Prolin (*put*).

10.7.2 Kontrolle der Stickstofffixierung

Die Fähigkeit zur Reduktion von molekularem Stickstoff (N_2) zu 2 NH_3 ist auf Prokaryoten beschränkt und unter Bacteria und Archaea weit verbreitet. Dieser Prozess, den man **Stickstofffixierung** nennt, wird einerseits durch frei lebende und andererseits durch in Symbiose mit Pflanzen lebenden Prokaryoten mittels des Enzyms **Nitrogenase** durchgeführt (S. 520). Beispiele für frei lebende Stickstofffixierer sind *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus macerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Anabena cylindrica* sowie das Archaeon *Methanosarcina barkeri*. Beispiele für symbiontische Stickstofffixierer sind *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* und *Frankia*.

Nitrogenase: $N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- + 16\ ATP \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ ADP + 16\ P_i$

Die Anzahl verbrauchter ATPs demonstriert den **erheblichen Energieaufwand** für den Reduktionsprozess. Daher wird der Organismus bei NH_4^+-Sättigung die Stickstofffixierung so schnell wie möglich reduzieren. Die Reduktion von molekularem Stickstoff benötigt stark reduzierende Cofaktoren, die sehr sauerstoffempfindlich sind, sodass die Nitrogenase nur unter **sauerstofflimitierten Bedingungen** gebildet werden darf und aktiv sein kann. Diese verschiedenen zellulären und extrazellulären Parameter werden über ein komplexes Regulationsnetzwerk bei der Expression der Nitrogenasegene integriert.

Beispielhaft soll ein Ausschnitt des Regulationsnetzwerkes aus *R. meliloti* besprochen werden (Abb. 10.**21**). Die Kaskade zur Regulation der Stickstofffixierungsgene (*nif* und *fix*) beginnt mit dem **Zweikomponenten-System FixL/J**. Bei **niedrigem Sauerstoffpartialdruck** autophosphoryliert sich die Sensorkinase FixL und aktiviert über Transphosphorylierung den Antwortregulator FixJ. FixJ-P aktiviert die Expression der Regulatorgene *fixK* und *nifA*. FixK initiiert wiederum die Transkription der *fixNOQP*- und *fixGHJS*-Operons, die unter anderem für Komponenten spezifischer Elektronentransportketten zur Energiegewinnung bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck codieren. Weiterhin beeinflusst FixK die Transkription von fast hundert anderen Genen, wie die der Denitrifikation, der Argininfermentation, der anaeroben Hämbiosynthese und der allgemeinen Stress-

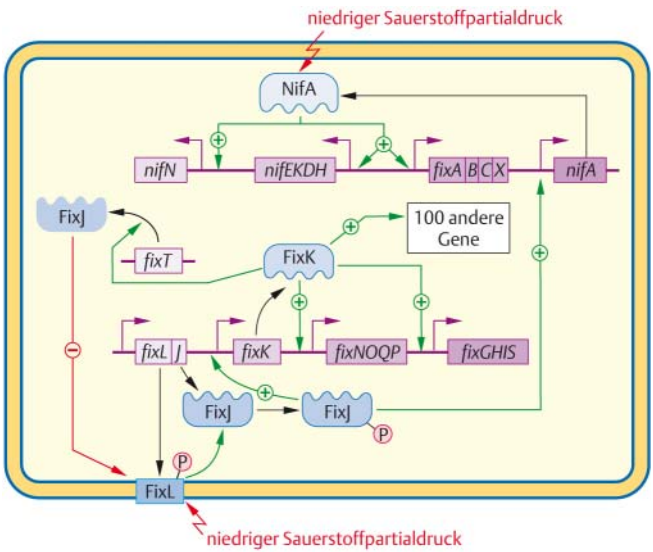


Abb. 10.**21** **Regulation der Gene für die Stickstofffixierung in *Rhizobien* über das Zweikomponenten-System FixL/J und die Regulatoren NifA und FixK.**

antwort. Das Eisen-Schwefel-Protein NifA ist sauerstoffempfindlich und aktiviert nur bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck die Strukturgene der Nitrogenase (*nifHDK*), die Gene für die Biosynthese des FeMoCo-Cofaktors (*nifE*, *N*) und für ein Elektronentransportsystem zur Nitrogenase (*fixABCX*). Die Transkription der *fix*- und *nif*-Gene ist abhängig vom alternativen Sigmafaktor σ^{54}. Das FisT Protein inhibiert wiederum die FixL-Aktivität und fährt so die FixLJ-Regulation wieder zurück.

Stickstoffassimiliation: Einbau von reduziertem Stickstoff in Form von NH_4^+ in Aminosäuren durch Glutamin-Synthetase. Strikte Regulation der Expression des zugehörigen Gens über NtrAB und des Enzyms durch eine Vielzahl an Metaboliten.
Stickstofffixierung: Reduktion molekularem Stickstoffs N_2 zu Ammonium NH_4^+ durch die Sauerstoff-empfindliche Nitrogenase. Regulation zugehöriger (*nif*, *fix*)-Gene durch den Sauerstoffpartialdruck.

10.8 Regulation der Phosphorassimilation

Phosphor wird über Phosphate in zentrale Bausteine von Zellen, wie in Lipide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate, aber auch in ATP integriert. Die Verfügbarkeit von **Phosphat** in der Umwelt wird über einen Transporter/Regulatorkomplex direkt detektiert und in eine Regulation auf Genebene übersetzt.

Phosphor findet sich in Form von Phosphaten in zentralen Bestandteilen der Zelle, wie Membranlipiden, Lipopolysacchariden, Nucleinsäuren und komplexen Kohlenhydraten. Eine zentrale Rolle spielen Phosphorverbindungen wie ATP für den Energiestoffwechsel der Zelle.

Phosphor wird auf verschiedene Weise von der Zelle aufgenommen. **Anorganisches Phosphat** ($\mathbf{P_i}$) kann in *E. coli* über zwei Transportsysteme, Pit und Pst, in die Zelle geschleust werden. P_i wird im Rahmen der Glykolyse (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), des Citratzyklus (Succinyl-CoA-Synthetase), der gemischten Säuregärung (Phosphotransacetylase) und der oxidativen Phosphorylierung (ATP-Synthase) in den Stoffwechsel integriert.

Einige **Organophosphate** werden in *E. coli* durch Phosphatasen im Periplasma bis zum P_i abgebaut. Andere, wie Glycerin-3-phosphat, werden direkt als Phosphoester aufgenommen. Schließlich dienen auch Phosphonate (C-P), die entweder abgebaut oder direkt eintransportiert werden, als Phosphorquellen.

Das komplexe Phosphorassimilationssystem unterliegt in *E. coli* einer strengen Kontrolle in Abhängigkeit des Bedarfs und der Verfügbarkeit von Phosphor im Lebensraum. Signal für das **Zweikomponenten-Regulationssystem PhoR/B** ist die P_i-Konzentration im Habitat und die Aktivität des Phosphattransporters Pst (PstABCS). Bei einer **höheren Phosphatkonzentration** (> 4 µmol l^{-1}) wird

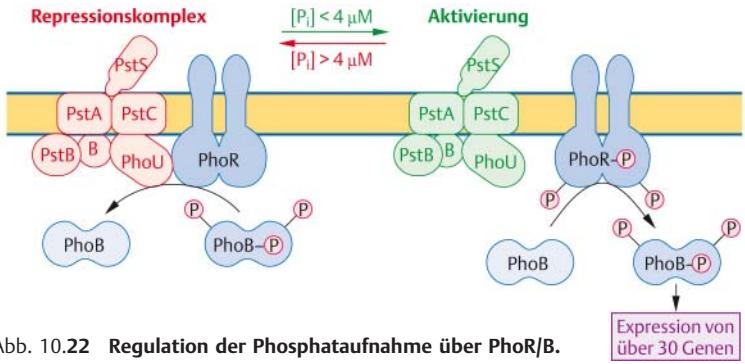


Abb. 10.**22** **Regulation der Phosphataufnahme über PhoR/B.**

ein Repressionskomplex aus den Komponenten des Transporters Pst, dem PhoU-Protein und der membranständigen Sensorkinase PhoR gebildet. Dieser Komplex verhindert die Phosphorylierung von PhoR und dephosphoryliert den Antwortregulator PhoB. Damit ist das Pho-Regulon abgeschaltet. Bei **Phosphatmangel** (< 4 µmol l^{-1}) dissoziiert der Komplex, PhoR autophosphoryliert sich und transferiert die Phosphorylgruppe auf PhoB. PhoB-P aktiviert nun über 30 Gene, die für verschiedene Porine, Transporter der inneren Membran, Phosphatasen und Phosphodiesterasen codieren (Abb. 10.**22**). Aber auch intrazelluläre Signale wie der Acetylphosphatspiegel der Zelle kontrollieren das Pho-Regulon. Es gibt Hinweise, dass die Bildung und der Abbau des Alarmon AppppA über das Pho-Regulon reguliert wird.

In *B. subtilis* wird der Phosphatmangel ebenfalls über ein Zweikomponenten-Regulationssystem erkannt. Hier allerdings wird der Umweltreiz über die Elektronentransportkette in der Cytoplasmamembran vermittelt. Phosphatmangel führt hier zur Autophosphorylierung der Sensorkinase PhoR, die dann den Antowortregulator PhoP über Transphosphorylierung aktiviert. Weitere Regulatoren des Phosphat-Modulons in *B. subtilis* sind in der Phosphorylierungskaskade der Sporulation und im Zweikomponenten-System ResDE zu finden.

Phosphatregulation: Phosphataufnahme über Pst-Transporter aus der Umwelt führt zu Komplex mit PhoU und der Sensorkinase PhoR des inaktiven Zweikomponenten-Regulationssystems PhoR/B. Wenig Phosphat löst den Komplex auf, PhoR phosphoryliert sich selbst, überträgt den Phosphatrest auf den Antwortregurlator PhoB, der aktiviert das Pho-Regulon für Phosphattransport und Einbau.

10.9 Regulation der Sporulation von *Bacillus subtilis*

Endosporen sind metabolisch inaktive Überdauerungsformen von Bakterien. Die Regulation des Überganges von einer vegetativen *B.-subtilis*-Zelle zu einer sporulierenden Zelle ist momentan einer der komplexesten bekannten Regulationsprozesse in Bakterien. Diverse Kinasen vermitteln eine Vielzahl von Umwelteinflüssen, wie Nährstoffversorgung, Zelldichte und Zellzyklus, über eine **Phosphorylierungskaskade** auf den zentralen Sporulationsregulator **Spo0A**. Dessen Gegenspieler ist der Übergangsstadiumsregulator **AbrB**. Setzt sich Spo0A durch, wird die Sporulation mit ihren sieben Stadien endgültig eingeleitet. Dies führt zu einer unterschiedlichen Genexpression in der sporenbildenden Mutterzelle und der Spore selbst. Dabei werden jeweils zwei Sigmafaktoren in der Mutterzelle und der Spore gebildet, die in ihrer Synthese und Funktion über die Grenze der Sporenhülle hinweg voneinander abhängen. Über 100 Gene sind an diesem bakteriellen **Differenzierungsprozess** beteiligt.

10.9.1 Sporenbildung bei Bakterien

Sporen haben für Bakterien zwei zentrale Funktionen. In Zeiten des extremen Nährstoffmangels dienen sie als metabolisch inaktive, dabei UV-Licht, Chemikalien und Hitze resistente **Überdauerungsform**. Zugleich sind sie auf vielfältigsten Wegen eine **Verbreitungsform** der Organismen. Sporen werden von diversen *Bacillus*-, *Clostridium*- und *Streptomyces*-Spezies sowie auch von Myxobakterien gebildet. Die Bildung einer Endospore bei *B. subtilis* bedeutet, dass in zwei genetisch identischen, miteinander assoziierten Zellen völlig unterschiedliche genetische Programme ablaufen, die sich aber gegenseitig kontrollieren. Dies ist somit ein typischer **Differenzierungsprozess**. Bei *B. subtilis* lässt er sich in sieben Phasen unterteilen. In der **Phase 0** und **I** wird ein **asymetrisches Septum** gesetzt, das also nicht in der Mitte der Zelle lokalisiert ist. Zuvor wurde die **DNA repliziert** und auf die zwei neuen Kompartimente verteilt. In Phase **II** folgt das Abschnüren der **Vorspore**. In Phase **III** wird eine **Doppelmembran** um die Vorspore gebildet. Zwischen diese Membranen wird in Phase **IV** Zellwandmaterial, der **Cortex**, eingelagert. Dann wird der Proteinmantel (**Coat**) durch die Mutterzelle um die sich entwickelnde Spore herum angelagert. Die Spore **reift** weiter und wird dabei resistent gegen Hitze, Chemikalien und UV-Strahlung. Gleichzeitig wird das Programm zum erfolgreichen **Auskeimen** aktiviert (Phase **V–VI**). In Phase **VII** folgt die **Zelllyse** und Freisetzung der Spore mit dem Tod der Mutterzelle. Trifft die Spore auf einen attraktiven Lebensraum keimt sie wieder zur vegetativen Zelle aus und der Zyklus kann von vorn beginnen. Nach den Phasen, die mit römischen Zahlen durchnumeriert sind, werden die Gene benannt, die in der jeweiligen Phase wichtig für den Sporulationsprozess sind, z. B. SpoIIA ist wichtig während Phase II, dem Abschnüren der Spore (Abb. 10.**23**).

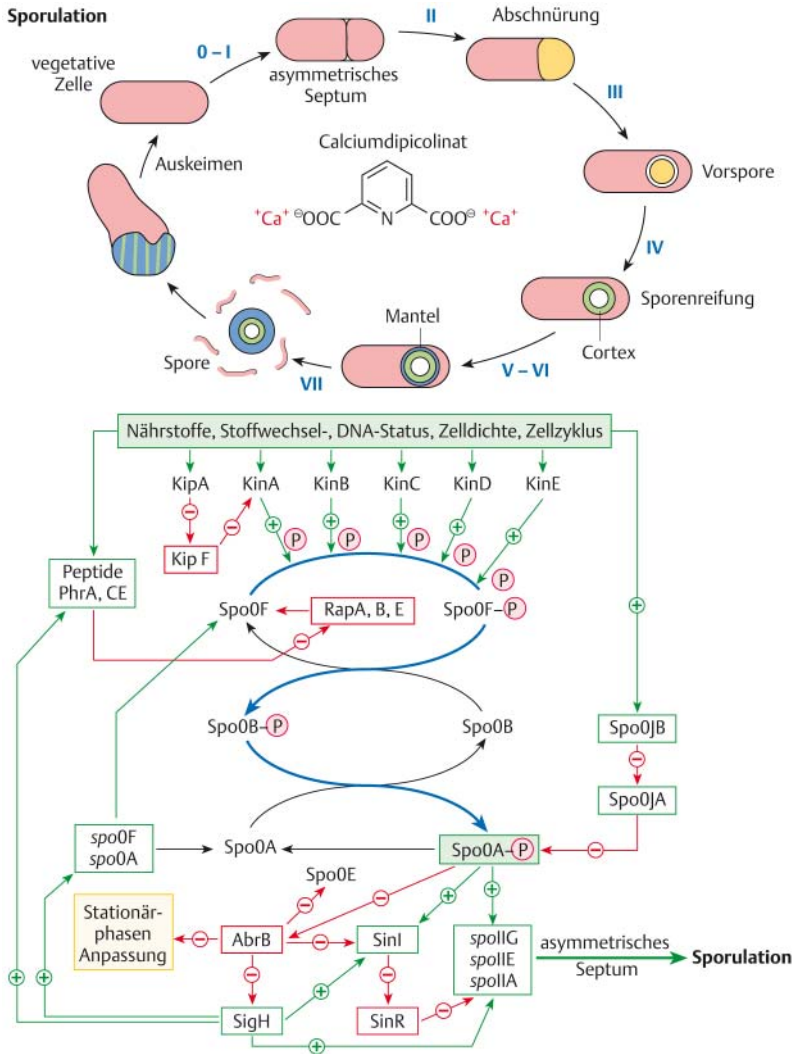


Abb. 10.**23** **Sporenbildung.** Der Entwicklungszyklus von *B. subtilis* während der Sporenbildung und die Regulation zu Beginn der Sporulation.

10.9.2 Molekulare Regulation der Sporenbildung in B. subtilis

Die Entscheidung für eine Sporulation macht sich die *B.-subtilis*-Zelle nicht leicht: Wird eine Spore gebildet, die sehr lange überdauert, kann sich der Organismus in diesem Zeitraum nicht vermehren und sich nicht genetisch weiterentwickeln. Deshalb werden die Umweltbedingungen und der eigene physiologische und genetische Zustand exakt analysiert und die gewonnenen Ergebnisse zu einer Entscheidung intregriert. Molekular spielt dabei der **Übergangszustandsregulator AbrB**, der für eine Beibehaltung des vegetativen Lebens sorgt, gegen den **Sporulationsregulator Spo0A**, der unumkehrbar die Sporulation einleitet. Signale über die Nährstoffversorgung, den eigenen Stoffwechsel, die Integrität der eigenen DNA, die Zelldichte und den Zellzyklus führen zu einer Phosphorylierung von Spo0F über die Kinasen KinA bis KinE. Der Phosphatrest wird über Spo0B auf Spo0A übertragen. Diesen Prozess nennt man **Phosphorylierungskaskade** (Phospho relay). Hier werden weitere intra- und extrazelluläre Signale verarbeitet. Gleichzeitg wird Spo0JB gebildet, das nun Spo0JA inaktiviert und damit Spo0A-P stabilisiert. Spo0A-P schaltet den Übergangszustandsregulator AbrB aus. Somit kann das bisher blockierte SinI den Inhibitor der *spoIIA*-, *spoIIE*- und *spoIIG*-Gene SinR reprimieren. Die drei Gene können nun durch Spo0A-P aktiviert werden. Dies ist der entscheidende Schritt zur Sporulationsauslösung. Ohne AbrB wird nun auch der alternative Sigmafaktor SigH gebildet, der die Sporulationsantwort verstärkt. So führt er zur Auschüttung der Peptide PhrA, C, E, die die Rap-vermittelte Dephosphorylierung von Spo0F-P verhindern. Auch wird mehr Spo0F und Spo0A gebildet sowie die Dephosphorylierung von Spo0A-P über Spo0E verhindert. (Abb. 10.**24**). Mit der Aktivierung verschiedener Gene der Phase II kommt es zur Bildung von zwei Kompartimenten, d. h. durch ein **asymmetrisches Septum** wird die *B.-subtilis*-Zelle in eine **Mutterzelle** und eine **Vorspore** geteilt. Anfänglich enthalten beide Kompartimente noch einen ähnlichen Satz an Regulatoren. Allerdings werden diese unterschiedlich aktiv. In der Mutterzelle liegt der Sigmafaktor F inaktiv an seinen Anti-Sigmafaktor SpoIIAB gebunden vor, da der zugehörige Anti-Anti-Sigmafaktor SpoIIAA phosphoryliert ist. Anders ist es in der Vorspore: Durch SpoIIE vermittelte Dephosphorylierung des Anti-Anti-Sigmafaktors SpoIIAA kann dieser nun den Anti-Sigmafaktor SpoIIAB binden und der Sigmafaktor F wird frei und aktiv. Eine der wichtigsten Aufgaben von Sigmafaktor F ist die Transkription des *sigG* (*spoIIIC*)-Gens für den Prä-Sigmafaktor G. In beiden Kompartimenten liegt die Vorläuferform des alternativen Sigmafaktors E vor. Durch Sigmafaktor F in der Vorspore wird die Protease SpoIIGA aktiviert, die nun den inaktiven Prä-Sigmafaktor E nur in der Mutterzelle in seine aktive Form umwandelt. Der wiederum sorgt dort für die Bildung von SpoIIIA, das wiederum SpoIIIJ in der Vorspore aktiviert und darüber zur Bildung von aktivem Sigmafaktor G in der Vorspore führt. Der sorgt für die Synthese einer Vielzahl von **Schutzproteinen**, die für den Hitze-, Chemikalien- und UV-Schutz verantwortlich sind. Auch alles Nötige für eine spä-

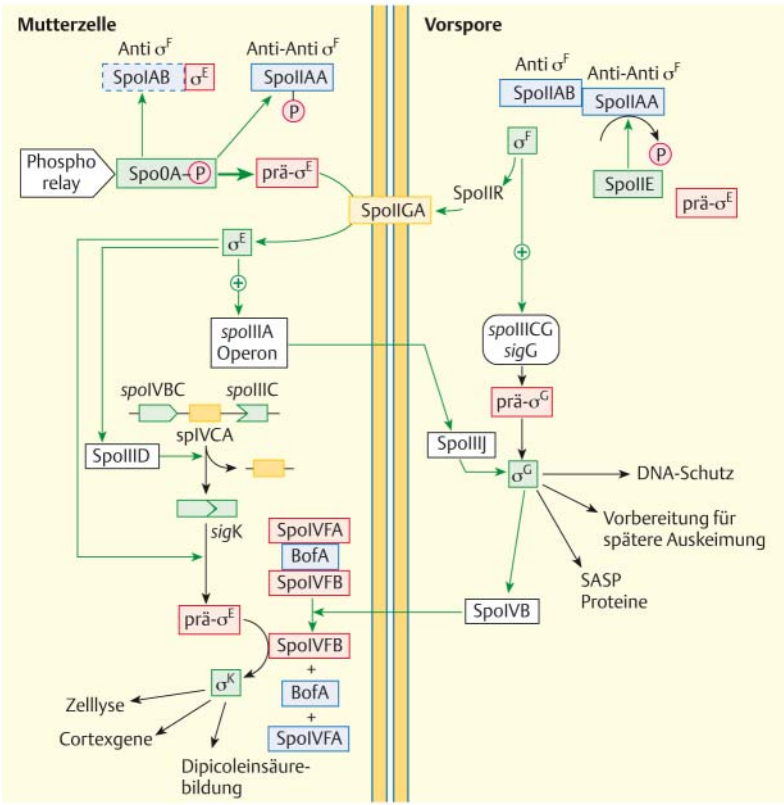


Abb. 10.**24** **Differentielle Genexpression in der Mutterzelle und Vorspore während der Sporenbildung in *B. subtilis*.**

tere Auskeimung wird angelegt. Gleichzeitig sorgt Sigmafaktor E in der Mutterzelle für die Bildung des Sigmafaktors K, in dem er dessen Gen *sigK* durch rekombinatorische Entfernung einer intragenen Region bilden lässt und seine Transkription vermittelt. Wieder wird eine inaktive Vorstufe (Prä-Sigmafaktor K) synthetisiert. Die prozessierende Protease SpoIVFB ist in einem Komplex mit SpoIVFA und BofA gefangen. Durch ein Signal von Sigmafaktor G, das aus der Vorspore über SpoIVB in die Mutterzelle gelangt, wird die Protease SpoIVFB freigesetzt und damit Sigmafaktor K aktiviert. Es kommt zur **Cortex-** und **Dipicolinsäurebildung** sowie schließlich zur **Zelllyse** der Mutterzelle (Abb. 10.**24**).

Sporen: Hitze-, Chemikalien- und UV-Licht-resistente Dauerformen von einigen Bakterien.

- **Sporulationsauslöser:** Schlechte Nährstoffversorgung, hohe Populationsdichte, Probleme im eigenen Stoffwechsel, die Integrität der eigenen DNA, und richtige Phase im Zellzyklus. Übergangsregulator AbrB hält vegetatives Leben im Gleichgewicht, Spo0A leitet als Gegenspieler die Sporulation ein.
- **Genetik der Sporulation:** Unterschiedliche genetische Regulationsprozesse in Vorspore und Mutterzelle. Zwei Vorsporen-spezifische alternative Sigmafaktoren (F, G) und zwei für die Mutterzelle-spezifische (E, K).

11 Einfluss von Mikroorganismen auf Natur und Mensch

Marcella Eikmanns (11.1, 11.2), Bernd Eikmanns (11.1, 11.2),
Regina Nethe-Jaenchen (11.3)

11.1 Auf- und Abbau von Biomasse

Biomasse entsteht durch Wachstum und Vermehrung von Lebewesen. Die **Primärproduzenten** der Biomasse sind **autotrophe Organismen**, die organische Verbindungen aus CO_2 synthetisieren (heute in erster Linie die **photoautotrophen Pflanzen** und **Cyanobakterien**, nur an vulkanischen Quellen auch **chemolithoautotrophe Bakterien**). **Konsumenten** (alle heterotrophen Organismen; Sekundärproduzenten) benötigen von Primärproduzenten gebildete organische Verbindungen, um sich mit Energie und Vorläufermolekülen für die Synthese der eigenen Zellstrukturen zu versorgen. Diejenigen heterotrophen Organismen, die an der **Mineralisation** der Biomasse (Abbau zu anorganischen Verbindungen) beteiligt sind (Mikroorganismen: Pilze, Protozoen, Bakterien), werden als **Destruenten** bezeichnet. Biomasse besteht hauptsächlich aus **hochpolymeren Verbindungen**. Mit Hilfe von **Exoenzymen** zerlegen Destruenten diese Verbindungen außerhalb ihres Cytoplasmas hydrolytisch in Monomere, die dann aufgenommen und verstoffwechselt werden. Die **Depolymerisierung** ist in der Regel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Mineralisation. In **pflanzlicher Biomasse** überwiegen **Kohlenhydratpolymere** (Cellulose, Hemicellulose, Stärke), **tierische Biomasse** enthält dagegen viel **Protein**.

Die **Biomasse**, d. h. das die Körper der Lebewesen aufbauende Material besteht aus **organischen Kohlenstoffverbindungen** und enthält neben Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor noch eine ganze Reihe anderer Elemente (Kalium, Magnesium, Calcium, Natrium, Eisen, Mangan etc.), diese jedoch in weitaus geringerer Menge. Durch **Wachstum** und **Vermehrung** der Lebewesen ist die Biomasse einem dauernden **Auf-**, **Um-** und **Abbau** unterworfen.

11.1.1 Der Biomassekreislauf

Der **Biomassekreislauf** (Abb. 11.**1**) wird durch **drei Organismengruppen** in Gang gehalten: **Primärproduzenten** der Biomasse sind diejenigen Organismen, die zur Synthese ihrer Zellstrukturen ausschließlich Kohlendioxid (CO_2) verwenden (ein Vorgang, der als **CO_2-Fixierung** bezeichnet wird) und dazu die Energie des Sonnenlichts verwenden oder die Energie, die bei der Oxidation einer anorganischen

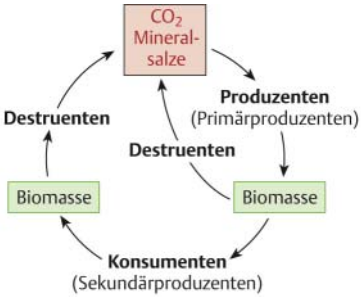


Abb. 11.1 **Der Biomassekreislauf.** Durch die Stoffwechselaktivität der drei Organismengruppen Produzenten, Konsumenten und Destruenten kommt es zum zyklischen Auf- und Abbau von Biomasse. Primärproduzenten fixieren Kohlendioxid, sodass der Kohlenstoff in der Biomasse in Form organischer Verbindungen vorliegt. Stickstoff, Schwefel und Phosphor bilden an organische Moleküle gebundene Sulfhydryl-, Amino- und Phosphatgruppen. Biomasse enthält außerdem viele andere Mineralien in geringen Mengen.

Verbindung verfügbar wird (**autotrophe Organismen**: photolithoautotrophe bzw. chemolithoautotrophe Organismen; S. 307). Auf der Landoberfläche macht die von den Primärproduzenten gebildete Biomasse ca. 90 % der Gesamtbiomasse aus. Von photoautotrophen Organismen, also **höheren Pflanzen**, **Algen** sowie den prokaryotischen **Cyanobakterien**, **Schwefelpurpurbakterien** und **Grünen Schwefelbakterien** gebildete Biomasse überwiegt in nahezu allen Lebensräumen. In ihrer Menge vernachlässigbar ist in der Regel die durch chemolithoautotrophe Organismen (ausschließlich Bakterien) gebildete Biomasse.

11

Eine Ausnahme stellt hier die Situation an **hydrothermalen Quellen** dar. Diese sind in den Zentralgräben (Rifts) der mittelozeanischen Rücken anzutreffen, an denen die die Erdoberfläche bildenden Platten auseinander driften und neuer Meeresboden entsteht. Während die Tiefsee im Allgemeinen aufgrund des Lichtmangels biologisch verhältnismäßig unproduktiv ist, finden sich rund um die als **schwarze Raucher** bezeichneten Quellen Lebensgemeinschaften von wirbellosen Tieren (Röhrenwürmer, Muscheln), deren Grundlage die Primärproduktion von Biomasse durch chemolithoautotrophe Bakterien ist. An den hydrothermalen Quellen wird 300–350 °C heißes, mit Mineralien angereichertes Wasser unter Druck aus Gesteinsspalten ausgestoßen. Durch die Vermischung mit Meerwasser präzipitieren Eisen- und Manganverbindungen und verfärben den Wasserstrom schwarz. Im Wasser enthaltene reduzierte anorganische Verbindungen wie NH_4^+, H_2S, H_2, CH_4, Fe^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen können von chemolithotrophen Bakterien als Basis ihres Energiestoffwechsels mit Sauerstoff (**Nitrifikanten**, **Sulfurikanten**, **Knallgasbakterien**, **methylotrophe** und **Eisen-** und **Mangan-oxidierende Bakterien**), Nitrat (**Nitratreduzierer**), Sulfat (**Sulfatreduzierer**) oder CO_2 (**methanogene Archaebakterien**) als Elektronenakzeptor oxidiert werden (S. 388). Die Bakterien leben meist als **Symbionten** in speziellen Geweben ihrer eukaryotischen Wirte, werden von diesen mit den benötigten anorganischen Verbindungen versorgt und beliefern diese im Gegenzug mit organischen Nährstoffen.

Organismen, die von Primärproduzenten gebildete Biomasse als Nahrung nutzen, werden als **Konsumenten** bezeichnet. Diese Organismen sind **heterotroph**, d. h. sie bauen organische Verbindungen einerseits ab, um sich Energie für ihre eigene Stoffwechselaktivität zu verschaffen, und wandeln sie andererseits für Wachstum und Vermehrung in körpereigene Verbindungen um. Zu den Konsumenten zählen alle **chemoorganotrophen** (S. 349) Organismen, d. h. alle **Tiere**,

so auch der **Mensch**, sowie **chemoorganotrophe Bakterien**. Die Konsumenten können auch als **Sekundärproduzenten** bezeichnet werden, auch sie bilden Biomasse, sind dabei jedoch von den Primärproduzenten abhängig.

Für den Abbau der von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen gebildeten Biomasse zu CO_2, Wasser und anorganischen Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorverbindungen, d. h. für die **Mineralisation** organischen Materials, sind die **Destruenten** verantwortlich. Bei dieser Organismengruppe handelt es sich um **chemoheterotrophe Mikroorganismen** (**Bakterien**, **Pilze** und **Protozoen**), die im Boden und in Gewässersedimenten angesiedelt sind. Durch die Mineralisation werden die Ausgangsverbindungen für die Primärproduktion regeneriert.

Biomasse: Die Gesamtheit des die Körper der Lebewesen aufbauenden Materials; im Wesentlichen organische Verbindungen.
Biomassekreislauf: Beschreibung des Auf-, Um- und Abbaus von Biomasse durch Lebewesen.
Primärproduzenten: Autotrophe Organismen; bauen organische Verbindungen aus CO_2 auf; nutzen dazu Sonnenenergie (photolithoautotrophe Organismen) oder aus der Oxidation einer anorganischen Verbindung bezogene Energie (chemolithoautotrophe Bakterien).
Konsumenten: Heterotrophe Organismen; benötigen zu ihrer Energieversorgung und für den Aufbau ihrer Zellstrukturen von Primärproduzenten synthetisierte organische Verbindungen.
Destruenten: Chemoheterotrophe Mikroorganismen, die Biomasse zu CO_2, Wasser und anorganischen Salzen abbauen (Mineralisation) und dadurch die Substrate für die Primärproduzenten regenerieren; chemoheterotrophe Bakterien, Pilze, Protozoen.

11.1.2 Zusammensetzung und Depolymerisierung der Biomasse

Die von den Primärproduzenten und Konsumenten gebildete Biomasse besteht in erster Linie aus **hochpolymerem organischen Material** und nur in geringem Ausmaß aus niedermolekularen organischen Verbindungen. Dabei existieren deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der von Pflanzen bzw. Tieren gebildeten Biomasse (Tab. 11.**1**). Während die Zellsubstanz **höherer Pflanzen** zum größten Teil aus **Kohlenhydratpolymeren**, in erster Linie den die pflanzlichen Zellwände bildenden Strukturpolysacchariden (Cellulose, Lignin, Hemicellulosen), besteht, überwiegen in der **tierischen** Zellsubstanz **Proteine**, also Polymere, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die **mikrobielle** Biomasse ähnelt mehr derjenigen der Tiere, wobei der Protein- und Lipidanteil etwas geringer, der Nucleinsäureanteil höher liegt (15–20 %).

Die Destruenten können die großen Polymere der Biomasse nicht direkt verstoffwechseln, sondern müssen sie im ersten Schritt in kleinere Einheiten, Mono- und Oligomere, zerlegen. In der Regel ist diese **Depolymerisierung** der **geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Mineralisationsprozesses**. Dabei

Tab. 11.1 **Zusammensetzung der pflanzlichen und tierischen Biomasse.**

Bestandteil	*% Anteil in pflanzlicher Biomasse*	*% Anteil in tierischer Biomasse*
Cellulose	30–50	–
Lignin	15–30	–
Hemicellulose	15–25	–
Pektin	3–10	–
Stärke	2–3	–
Glykogen, Mucopolysaccharide	–	5–10
Protein	2–5	50–80
Lipide	2–5	10–15
Nucleinsäuren	2	5
gelöste Monomere	< 5	< 5

bestehen deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der Mikroorganismen unterschiedliche Polymere zerlegen können (Tab. 11.**2**). Während z. B. einige Proteine innerhalb weniger Stunden vollständig abgebaut werden, können Lignin oder tierisches Haar je nach den vorliegenden Bedingungen (pH-Wert, Sauerstoffkonzentration) sogar einige Jahrhunderte überdauern.

Die Depolymerisierung der Biomasse erfolgt durch **Exoenzyme** (extrazelluläre Enzyme), die die Polymere **hydrolytisch spalten**, sodass als Produkte hauptsächlich Mono-, Di- oder Trisaccharide, Aminosäuren oder kurze Peptide, Nucleotide oder Oligonucleotide und Fettsäuren entstehen. Exoenzyme sind Enzyme, die entweder von der Zelle ausgeschieden und freigesetzt werden oder auf der Zelloberfläche, d. h. auf der Außenseite der Cytoplasmamembran oder bei gramnegativen Bakterien im Periplasma, in oder auf der äußeren Membran lokalisiert sind. Viele dieser Enzyme werden in großem Maßstab **biotechnologisch** hergestellt

Tab. 11.2 **Biologische Halbwertszeiten der polymeren Bestandteile der Biomasse.**

Polymer der Biomasse	*Halbwertszeit*
globuläre Proteine	0,1–2 Tage
Stärke	1–10 Tage
Cellulose	1–60 Tage
Lignocellulose	2–200 Jahre
Haare, Wolle (Strukturprotein Keratin)	1–2000 Jahre
Lignin	10–2000 Jahre

und für industrielle Prozesse, z. B. in der **Lebensmittelindustrie** oder bei der **Waschmittelherstellung**, eingesetzt (S. 574). Für die weitere Verstoffwechselung werden die durch die Exoenzyme gebildeten Mono- und Oligomere von den Destruenten aufgenommen. Intrazellulär erfolgt dann der oxidative Abbau der Verbindungen, der als Endprodukt in erster Linie CO_2 liefert.

Depolymerisierung von Polysacchariden

Pflanzliche Biomasse, die den größten Teil des auf der Erde vorhandenen organischen Materials ausmacht, besteht zu mehr als 50 % aus den Polysacchariden **Cellulose** und **Hemicellulose**. Damit stellen diese beiden Polysaccharide die mengenmäßig bedeutendsten Substrate für die Mineralisation durch die Destruenten dar. Einen geringeren, jedoch immer noch beträchtlichen Anteil an der Biomasse haben die Polysaccharide **Pektin**, **Chitin** und **Stärke**.

Cellulose (Abb. 11.**2a**) ist ein lineares Polymer aus 1000 bis 15 000 **β-1,4-glykosidisch** verknüpften **Glucoseeinheiten**. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen diesen Celluloseketten enstehen Cellulosefibrillen, die die Grundstruktur pflanzlicher Zellwände bilden. Zwischen den Cellulosefibrillen sind Hemicellulosen, bei Verholzung der Zellwände auch Lignin eingelagert. Der Komplex aus den drei untereinander über Wasserstoffbrücken oder auch kovalent verbundenen Komponenten wird als **Lignocellulose** bezeichnet. Cellulosefibrillen und Lignocellulose sind starr, wasserunlöslich und außergewöhnlich resistent gegenüber enzymatischer Hydrolyse. Tatsächlich wird Cellulose nur durch einige wenige Bakterien und Pilze abgebaut. Zu diesen **cellulolytischen Mikroorganismen** zählen unter den Bakterien einige Myxobakterien (z. B. *Cytophaga*), Actinomyceten (z. B. *Streptomyces*) und *Bacillus*-Arten (z. B. *B. licheniformis*), die Cellulose unter aeroben Bedingungen abbauen, sowie einige Clostridien (z. B. *C. thermocellum*), *Fibrobacter* (z. B. *F. succinogenes*) und *Ruminococcus* (z. B. *R. albus*), die Cellulose unter anaeroben Bedingungen depolymerisieren. Wenn die Cellulose stark mit Lignin vernetzt ist, sind nur Pilze zu einem Abbau in der Lage. Zu den cellulolytischen Pilzen gehören die **Schimmelpilze** *Aspergillus* und *Trichoderma*, der anaerobe Pansenpilz *Neocallimastix* und holzzerstörende Pilze wie der **Braunfäulepilz** *Piptocarpus betulinus* und der **Weißfäulepilz** *Phanerochaete chrysosporium* (S. 147). Der Celluloseabbau durch Bakterien ist meist weniger effektiv als der durch Pilze. Bakterien können Cellulose nur dort hydrolysieren, wo sie selbst anhaften, da ihre cellulolytischen Enzyme an der Zelloberfläche lokalisiert sind und nicht in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Pilze durchziehen dagegen pflanzliches Gewebe mit ihren Hyphen und scheiden Cellulose spaltende Enzyme in den extrazellulären Raum aus.

Für die menschliche Ernährung indirekt von großer Bedeutung ist der **Celluloseabbau** im Pansen der ausschließlich Pflanzen fressenden (herbivoren) **Wiederkäuer** (Nutztiere: Kuh, Schaf, Ziege). Der **Pansen** ist eine vor dem Magen liegende **spezialisierte Gärkammer**, in der anoxische Bedingungen herrschen und ein konstanter pH-Wert von 6,5 und eine Temperatur von 39 °C gehalten werden. Hierhin gelangt durch Kauen zerkleinertes

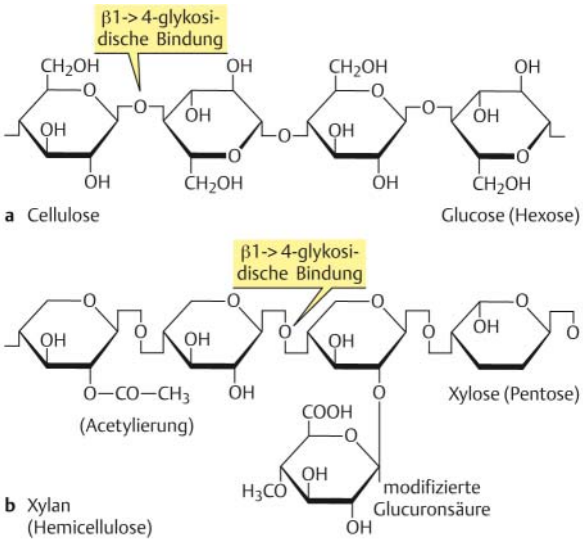


Abb. 11.**2** **Struktur von Cellulose (a) und eines Xylans (Hemicellulose) (b)**. Die fibrillären Strukturen pflanzlicher Zellwände werden von Cellulose, einem aus bis zu 15 000 Monomeren aufgebauten, unverzweigten β-1,4-Glucan gebildet. Die strukturlose Matrix der Zellwände besteht aus heteropolymeren Hemicellulosen. Dabei handelt es sich häufig um Xylane, Ketten aus β-1,4-glykosidisch verbundenen, zum Teil auch modifizierten Einheiten der Pentose D-Xylose, mit zahlreichen von einzelnen Zuckern oder Zuckersäuren (auch modifiziert) gebildeten Verzweigungen. Ist das Zellwandmaterial aus Cellulosefibrillen und Hemicellulose-Matrix mit Lignin (Abb. 11.**5**) durchsetzt, so spricht man von Lignocellulose.

Pflanzenmaterial, und hier erfolgt die Depolymerisierung der Cellulose durch Mikroorganismen. Die häufigsten **cellulolytischen Pansenbakterien** sind *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus albus*. Gemeinsam mit einer Vielzahl anderer Bakterien setzen diese Organismen die aus der Cellulose und anderen pflanzlichen Polysacchariden freigesetzten Zucker in erster Linie zu **kurzkettigen Fettsäuren** (Acetat, Propionat, Butyrat) um, die dann über die Pansenwand in den Blutkreislauf aufgenommen werden und so die Ernährungsgrundlage des Wiederkäuers bilden. Im Verlauf der Zuckervergärung gebildeter Wasserstoff wird von ebenfalls im Pansen angesiedelten, methanogenen Archaebakterien zur Reduktion von Kohlendioxid zu Methan genutzt. Regelmäßiges Aufstoßen der Rinder befördert dieses Gas in die Atmosphäre. Durch die Lage des Pansens am Anfang des Verdauungssystems gelangen die Bakterien nach Passage des Pansens in den dem Magen von Nicht-Wiederkäuern vergleichbaren Abomasum und werden bei dem dort herschenden sauren pH-Wert chemisch verdaut. Auf diese Weise versorgen Pansenbakterien den Wiederkäuer zusätzlich mit **Aminosäuren** und **Vitaminen**. Über den Verzehr des Fleischs von Wiederkäuern profitiert auch der Mensch von der Fähigkeit der Mikroorganismen, pflanzliche Strukturpolysaccharide zu hydrolysieren. Cellulolytische Bakterien leben auch im Verdauungstrakt von **holzfressenden Termiten** und einigen reinen

Pflanzenfressern, die keine Wiederkäuer sind, z. B. **Pferden**. Bei letzteren erfolgt der Celluloseabbau im sogenannten **Caecum**, einem im Anschluss an den Magen durchlaufenen Verdauungsorgan.

Die Depolymerisation der Cellulose erfolgt in drei Schritten. Zunächst spalten Endo-β-1,4-Glucanasen (**Endocellulasen**) die Cellulose in größere Bruchstücke. Anschließend spalten Exo-β-1,4-Glucanasen (**Exocellulasen**) von den freigesetzten Enden dieser Bruchstücke das Trisaccharid **Cellotriose** oder das Disaccharid **Cellobiose** ab. Cellotriose und Cellobiose werden dann durch Pilze und einige der cellulolytischen Bakterien mit einer β-1,4-Glucosidase (**Cellobiase**) in Glucoseeinheiten zerlegt. Einige der Cellulose abbauenden Bakterien besitzen jedoch keine β-1,4-Glucosidase. Sie transportieren Cellobiose und Cellotriose in die Zelle und spalten die Di- und Trisaccharide dort phosphorolytisch, d. h. unter Freisetzung von Glucose-6-phosphat. Bei einigen anaeroben Bakterien, z. B. Clostridien, sind mehrere cellulolytische Enzyme in einem Komplex, dem **Cellulosom**, zusammengefasst sind. Dieser enthält zentral eine Cellulose-Bindedomäne, die für die Bindung des Komplexes an die Cellulose verantwortlich ist.

Hemicellulose ist eine alkalilösliche heterogene Polysaccharidfraktion der pflanzlichen Zellwand, die im Wesentlichen aus **Xylan** (Abb. 11.**2b**) besteht. Xylan ist ein Polymer, das sich überwiegend aus bis zu 500 **β-1,4-glykosidisch** verknüpften **Pentoseeinheiten**, der **β-D-Xylose**, zusammensetzt. Die Xylosereste sind z. T. acetyliert und tragen andere Zucker wie Glucose, Galactose oder Glucuronsäure als Seitenkette. Da Xylan im Gegensatz zu Cellulose nicht kristallin vorliegt, ist es besser angreifbar und wird deshalb schneller und von einer wesentlich größeren Anzahl von Mikroorganismen abgebaut. Xylan abbauende Organismen werden **xylanolytisch** genannt. Neben den meisten cellulolytischen Mikroorganismen können weitere Vertreter der Clostridien und einige *Thermoanaerobium*-Arten unter den Prokaryoten sowie einige Hefen (*Candida shehatae* und *Pichia stipidis*) und Mycelpilze (z. B. *Neurospora crassa*) unter den eukaryotischen Mikroorganismen Xylan abbauen und verwerten.

Xylan wird durch einen aus mehreren Enzymen bestehenden extrazellulär vorliegenden Komplex, die **Xylanase**, in das Disaccharid **Xylobiose** und die Substituenten (z. B. Acetat) gespalten. Die Xylobiose wird in die Zelle transportiert und dort durch eine **β-Xylosidase** zu Xylose abgebaut.

Pektine, die hauptsächlich in Stein- und Beerenobst vorkommen, bestehen aus **α-1,4-glykosidisch** verknüpften **Galacturonsäureresten**, die z. T. mit Methanol verestert sind und unverzweigte Ketten bilden. Viele Pilze (z. B. die pflanzenpathogenen *Fusarium oxysporum* und *Butrytis cinerea*, sowie einige *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten) und Bakterien (z. B. *Bacillus macerans* und *B. polymyxa*, *Clostridium pectivorum, Erwinia carotovora*, viele Pseudomonaden und Actinomyceten) sind in der Lage, Pektin sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen abzubauen. Am hydrolytischen Pektinabbau sind **Polygalacturonidase** (Pektinase) und **Oligogalacturonidase** beteiligt. Es wird

Galacturonsäure freigesetzt. Die Methanolreste werden durch eine **Pektinmethylesterase** abgespalten.

Chitin (Abb. 11.**3**) ist der Hauptbestandteil der **Zellwand** von **Pilzen** (vor allem von Basidiomyceten und Ascomyceten) und bildet das **Exoskelett** vieler **wirbelloser Tiere**, z. B. der **Insekten**. Chitin besteht aus **β-1,4-glykosidisch** verknüpften **N-Acetylglucosaminresten**. Sowohl unter den Pilzen als auch unter den Bakterien findet sich eine relativ große Zahl von Vertretern, die in der Lage sind, Chitin zu depolymerisieren. Bei den Bakterien gehören Flavobakterien, Bacillen, Cytophagen, Pseudomonaden und Streptomyceten, bei den Pilzen *Aspergillus*- und *Mucor*-Arten zu den wichtigsten Chitinverwertern.

Auch Chitin wird extrazellulär in seine Monomere zerlegt. Daran beteiligt sind die **Chitinasen**, die Chitinoligomere (hauptsächlich Di- und Trisaccharide) als Produkte liefern. Spaltet eine solche Chitinase innerhalb der N-Acetylglucosaminkette, so handelt es sich um eine **Endochitinase**. Werden dagegen N-Acetylglucosamin-Dimere von den Enden abgespaltet, so wird das entsprechende Enzym als **Exochitinase** bezeichnet. Die **N-Acetylglucosaminidase** (Chitobiase) zerlegt die Dimere (Chitobiose) dann in die Monomere.

Stärke ist die Hauptspeichersubstanz der Pflanzen und besteht aus **Amylose** und **Amylopektin** (Abb. 11.**4**). Diese beiden Glucane sind aus bis zu 5000 **α-1,4-verknüpften D-Glucoseresten** zusammengesetzt. Im Amylopektin sind an etwa jedem fünfundzwanzigsten Glucosemolekül zusätzlich weitere Glucose-

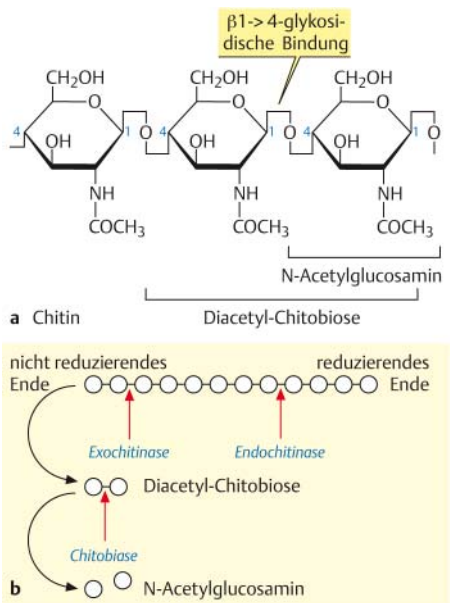


Abb. 11.**3** **Struktur (a) und Depolymerisierung (b) von Chitin.** Chitin kann von Endochitinasen innerhalb der N-Acetylglucosaminkette gespalten werden. Exochitinasen spalten Dimere von den Enden des Chitins ab. Die Chitobiase zerlegt die Dimere in die Monomere.

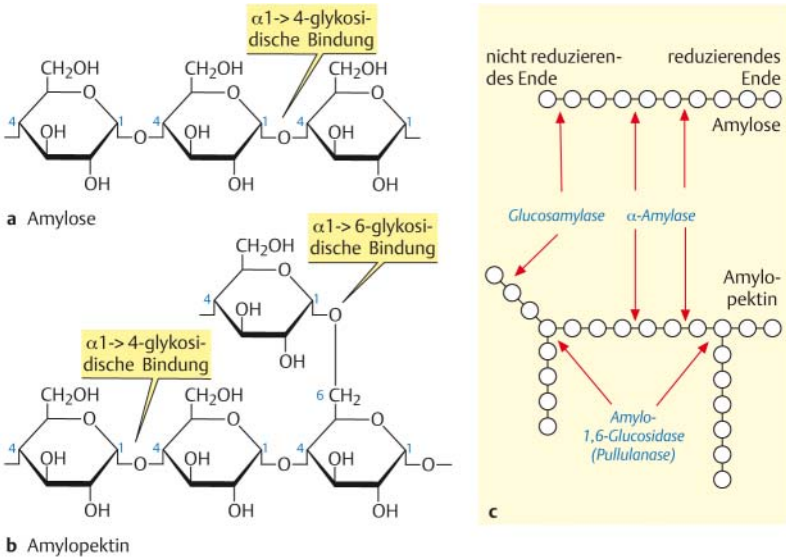


Abb. 11.**4** **Struktur und Depolymerisierung von Stärke.** Stärke besteht aus Amylose (**a**) und Amylopektin (**b**). **c** Die α-Amylase spaltet die α-1,4-Bindungen in beiden Komponenten. Die α-1,6-Bindungen im Amylopektin werden durch Amylo-1,6-Glucosidase angegriffen. Die Glucoamylase spaltet Glucosereste von den Enden ab.

reste über eine **α-1,6-**Bindung angehängt, was zu einer Verzweigung des Polysaccharids führt. Die Fähigkeit zum Stärkeabbau ist in der Natur weit verbreitet, eine Vielzahl von Bakterien und Pilzen ist dazu in der Lage. Zu den wichtigsten Stärke hydrolysierenden Bakterien gehören eine Reihe von Bacillen (z. B. *Bacillus macerans, B. polymyxa, B. subtilis, B. stearothermophilus, B. licheniformis*), Pseudomonaden, Streptomyceten und Clostridien, zu den Stärke hydrolysierenden Pilzen im Wesentlichen einige *Aspergillus*-Arten.

Am Abbau der Stärke (Abb. 11.**4**) ist zunächst die **α-Amylase**, eine α-1,4-Endoglucanase, beteiligt. Die Aktivität dieses Enzyms führt zu einer Verflüssigung der Stärke, es entstehen Glucose, Maltose und oligomere Dextrine. Die α-1,6-Bindungen in den Dextrinen werden anschließend durch die **Amylo-1,6-Glucosidase** (Pullulanase) gespalten. Zusätzlich spaltet die **Glucoamylase**, eine Exoglucanase, Glucosereste von den Enden der Dextrine ab.

Depolymerisierung von Lignin

Lignin (Abb. 11.**5**) ist neben Cellulose und Hemicellulose ein wichtiger Bestandteil der Zellwand höherer Pflanzen. Es setzt sich aus **Phenylpropanresten**

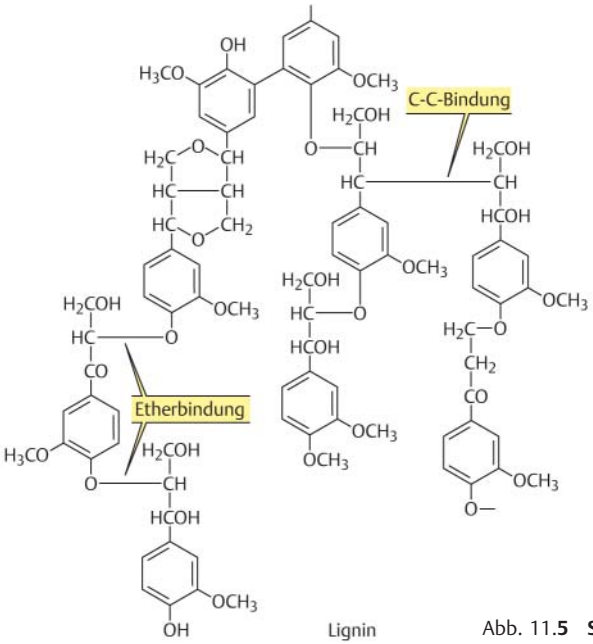


Abb. 11.**5** **Struktur des Lignins.**

zusammen, die durch **Ether-** und **Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen** in vielfältiger Weise miteinander verknüpft sind. Die komplexe Vernetzung ist für die außerordentliche **Resistenz** des Lignins gegenüber enzymatischem Abbau verantwortlich. Lignin wird daher nur extrem langsam depolymerisiert. Nur sehr wenige Mikroorganismen (möglicherweise nur Pilze) sind in der Lage, Lignin anzugreifen und abzubauen. Am besten untersucht ist der Ligninabbau bei holzzerstörenden Weißfäulepilzen (z. B. *Phanerochaete chrysosporium*, *Nematoloma frowardii*), wo er nur unter aeroben Bedingungen und im Cometabolismus mit anderen Kohlenstoffquellen wie Glucose erfolgt.

Am **Abbau** des Lignins sind nach heutigem Kenntnisstand mindestens drei extrazelluläre Enzyme beteiligt. Die **Lignin-Peroxidase** reagiert mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2), indem sie zwei Elektronen an das Wasserstoffperoxid abgibt. Es entsteht Wasser. Die oxidierte Lignin-Peroxidase wird durch sequentiellen Entzug von zwei einzelnen Elektronen aus dem Lignin wieder reduziert. Beim Entzug der Elektronen entstehen im Lignin sehr instabile Radikale, die sowohl die β-O-4-Etherbindungen und die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zwischen den Phenylresten als auch die Bindungen in den aromatischen Ringen spalten können. Es wird diskutiert, dass die relativ große Ligninperoxidase nicht in den Lignin-Cellulose-Komplex eindringen und deshalb nicht direkt mit dem

Lignin reagieren kann, sondern niedermolekulare Verbindungen, die ebenfalls Radikale bilden können, als Vermittler (Mediatoren) zwischen Lignin und Enzym fungieren. Die **Mangan-Peroxidase** hat einen sehr ähnlichen Wirkungsmechanismus wie die Lignin-Peroxidase. Auf die Oxidation des Enzyms durch H_2O_2 folgt die erneute Reduktion des Enzyms durch zweiwertiges Mangan. Das dabei entstehende dreiwertige Mangan entzieht nach seiner Chelatisierung mit Dicarbonsäuren den phenolischen Bestandteilen des Lignins einzelne Elektronen, es kommt zur Radikalbildung und damit zur Spaltung des Polymers. Die **Laccasen** oxidieren im Wesentlichen Phenolgruppen der niedermolekularen Bruchstücke des Lignins.

Die beim Ligninabbau anfallenden aromatischen Verbindungen und andere mikrobiell synthetisierte phenolische Verbindungen finden sich in erster Linie im sogenannten **Humus**. Dabei handelt es sich um die oberste Bodenschicht, die aus abgestorbener und teilweise abgebauter Biomasse besteht und den **Lebensraum der Destruenten** an Land bildet. Humus wird aufgrund der komplexen Struktur seiner Bestandteile nur sehr langsam abgebaut. Er hat gute Adsorptions- und Absorptionseigenschaften und ist daher ein ausgezeichneter Mineral-, Nährstoff- und Wasserspeicher.

11

Depolymerisierung von Proteinen: Proteolyse

Proteine machen den überwiegenden Anteil der von den Konsumenten, also in erster Linie von Tieren gebildeten Biomasse aus und stellen eine bedeutende Nahrungsquelle für die Destruenten dar. Proteine sind Polymere, die sich aus den 20 (mit Selenocystein 21) natürlich vorkommenden, über **Peptidbindungen** miteinander verknüpften **Aminosäuren** zusammensetzen (S. 418, *Biochemie*, *Zellbiologie*). Die meisten Proteine sind gut hydrolysierbar, es gibt jedoch einige unlösliche Strukturproteine wie Keratin, Elastin und Kollagen, die sich relativ resistent gegenüber mikrobiellem Abbau verhalten. Eine sehr große Zahl von Mikroorganismen (Pilze und Bakterien) verfügt über extrazelluläre Proteinasen (**Proteasen**), die Proteine zu Polypeptiden (mehr als 10 Aminosäuren), Oligopeptiden (bis 10 Aminosäuren) oder einzelnen Aminosäuren hydrolysieren (Abb. 11.**6**). Dabei kommen meistens zunächst **Endopeptidasen** zum Einsatz, welche die Aminosäureketten der Proteine intern spalten. Von den Enden der entstandenen Polypeptide werden anschließend durch **Exopeptidasen** einzelne Aminosäurereste abgespalten. Je nachdem, ob die Aminosäuren vom carboxyterminalen bzw. vom aminoterminalen Ende her abgespalten werden, spricht man bei den Exopeptidasen auch von **Carboxypeptidasen** bzw. **Aminopeptidasen**. Die niedermolekularen Produkte der Proteinase-Reaktionen (Aminosäuren, Di- und Tripeptide) werden in die Zelle aufgenommen, die Di- und Tripeptide dort durch intrazelluläre Peptidasen zerlegt und die Aminosäuren dann entweder in zelleigene Proteine eingebaut oder mit Hilfe von Aminosäure-Dehydrogenasen, Aminosäure-Oxidasen oder Transaminasen zu α-Ketosäuren oxidiert.

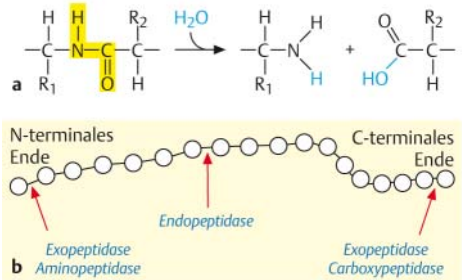


Abb. 11.**6** **Depolymerisierung von Proteinen. a** Hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung. **b** Je nach Angriffsort am aminoterminalen oder carboxyterminalen Ende eines Peptids bzw. mitten in einer Peptidkette wird zwischen Amino-, Carboxy- und Endopeptidasen unterschieden.

Depolymerisierung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren machen nur einen relativ kleinen Teil der in der Natur anfallenden Biomasse aus, sie werden jedoch von Destruenten sehr effektiv depolymerisiert und verwertet. Nucleinsäuren sind aus Nucleotiden aufgebaut. Diese bestehen aus einer phosphorylierten Ribose oder Desoxyribose, die N-glykosidisch mit einer heterozyklischen Base verbunden ist. Je nach dem, ob die Nucleotide Ribose bzw. Desoxyribose enthalten, unterscheidet man **Ribonucleinsäuren** (**RNA**) und **Desoxyribonucleinsäuren** (**DNA**). In den Nucleinsäuren sind die Nucleotide über Phosphodiesterbindungen miteinander zu langen Ketten verknüpft (S. 192, Abb. 6.**2**). Diese Bindungen sind der Angriffsort der **Phosphodiesterasen**, die von einer Reihe von Mikroorganismen in ihre Umgebung (oder bei gramnegativen Bakterien in ihr Periplasma) abgegeben werden und Nucleotide und Oligonucleotide abspalten. Bei unspezifisch arbeitenden Phosphodiesterasen spricht man auch von **Nucleasen**. In vielen Fällen sind die Enzyme jedoch spezifisch für DNA bzw. RNA, sodass zwischen Desoxyribonucleasen (**DNasen**) bzw. Ribonucleasen (**RNasen**) unterschieden werden kann. Außerdem existieren **3′-** und **5′-Exonucleasen**, die vom 3′-OH-Ende bzw. vom 5′-Phosphat-Ende der Nucleinsäurekette Nucleotid für Nucleotid freisetzen, **Endonucleasen**, die in der Mitte der Nucleotidkette unspezifisch oder spezifisch eine bestimmte Nucleotidsequenz spalten und solche Nucleasen, die spezifisch nur einzelsträngige (z. B. Exo-DNase I) oder nur doppelsträngige DNA (z. B. DNase I) hydrolysieren. Die Produkte der Nucleinsäure-Depolymerisierung, die Nucleotide und Oligonucleotide, werden von den Destruenten vor oder nach Dephosphorylierung (z. B. durch im Periplasma von gramnegativen Bakterien vorhandene Phosphatasen) aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust.

Abbau von Lipiden

Lipide sind Membrankomponenten aller Organismen. Außerdem stellen sie als Triacylglycerine (**Triglyceride** oder auch **Neutralfette**) den überwiegenden Teil der von eukaryotischen Organismen als Speicherstoffe gebildeten Fette und Öle. So machen sie einen nicht unerheblichen Teil der von den Primärproduzen-

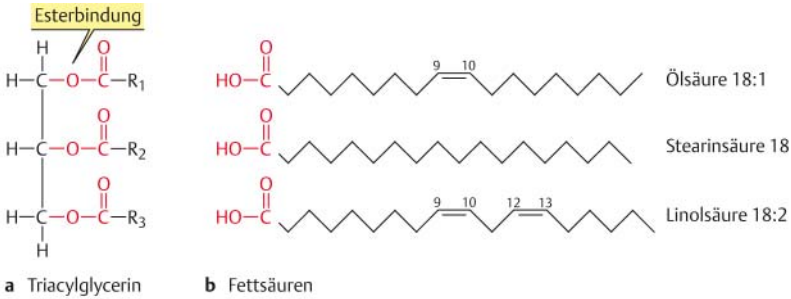


Abb. 11.**7** **Struktur eines Triacylglycerids (a) und der in Triacylglycerinen häufig vertretenen Fettsäuren (b).**

ten und Konsumenten gebildeten Biomasse aus. Lipide sind wasserunlöslich, sie bilden jedoch kolloidale und micellare Lösungen. Lipide sind keine Polymere im eigentlichen Sinn. Sie bestehen aus dem Alkohol Glycerin, welcher mit drei langkettigen, unverzweigten, häufig auch unterschiedlichen Fettsäuren verestert ist (Abb. 11.**7**). Die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind **Palmitinsäure** (16 Kohlenstoffatome) und **Stearinsäure** (18 Kohlenstoffatome), beides gesättigte Fettsäuren. Es kommen jedoch auch einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor, z. B. die **Ölsäure** mit 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung, die **Linolsäure** mit 18 Kohlenstoffatomen und zwei Doppelbindungen oder die **Linolensäure**, ebenfalls mit 18 Kohlenstoffatomen und drei Doppelbindungen.

Lipide werden von sehr vielen Mikroorganismen verwertet. Der Abbau erfolgt durch **Lipasen** (Acylhydrolasen), die die Triacylglycerine über Di- und Monoacylglycerin hydrolytisch in Glycerin und die Fettsäuren spaltet. Die enzymatische Hydrolyse erfolgt an der Wasser-Lipid-Phasengrenze. Je nach Organismus werden die Lipasen ins Medium ausgeschieden, liegen im Periplasma vor oder sind an der Zelloberfläche gebunden. Die Produkte der Lipasereaktion werden von den Mikroorganismen aufgenommen: Glycerin wird nach Phosphorylierung und Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat in die Glykolyse eingespeist, die Fettsäuren werden über die β-Oxidation zu Acetyl-Coenzym A abgebaut, das dann weiterverwertet wird.

Depolymerisierung von Biomasse: Zerlegung der die Biomasse aufbauenden polymeren, organischen Verbindungen in Oligo- und Monomere durch Destruenten; erster Schritt der Mineralisation der Biomasse.
Exoenzyme: Enzyme, die polymere Verbindungen hydrolytisch spalten und von Destruenten in ihre Umgebung ausgeschieden werden bzw. in zellulären Strukturen außerhalb der Cytoplasmamembran lokalisiert sind.

Polysaccharide:
- **Cellulose:** Glucose β-1,4-glykosidisch verknüpft; unverzweigt; bildet Fibrillen der pflanzlichen Zellwand; Cellulolytische Mikroorganismen: 1. aerob: einige Myxobakterien, Actinomyceten, *Bacillus*-Arten, einige Schimmelpilze; 2. anaerob: einige Clostridien, *Fibrobacter*- u. *Ruminococcus*-Arten; Enzyme: Endocellulasen (Spaltung in große Bruchstücke), Exocellulasen (endständige Abspaltung von Cellotriose und Cellobiose) und Cellobiase (Zerlegung von Cellotriose und Cellobiose in Glucosemonomere).
- **Hemicellulose:** Heterogene Polysaccharidfraktion, bildet Matrix pflanzlicher Zellwände, häufig Xylane (verzweigte Pentosepolymere). Xylanolytische Organismen: die meisten cellulolytischen Mikroorganismen, weitere Clostridien, *Thermoanaerobium*-Arten, einige Hefen und Myzelpilze; Enzyme: Xylanase (Spaltung in Xylobiose und Substituenten), β-Xylosidase (Zerlegung von Xylobiose in Xylose-Einheiten).
- **Pektin:** Galacturonsäure α-1,4-glykosidisch verknüpft; z. T. mit Methanolresten verestert; Vorkommen in Stein- und Beerenobst; Abbau aerob oder anaerob durch viele Pilze und Bakterien; Enzyme: Polygalacturonidase, Oligogalacturonidase und Pektinmethylesterase.
- **Chitin:** N-Acetylmuraminsäure β-1,4-glykosidisch verknüpft; Hauptbestandteil der Zellwand von Pilzen, Exoskelett vieler Wirbelloser; Abbau durch viele Pilze und Bakterien; Enzyme: Chitinasen und N-Acetylglucosaminidase.
- **Stärke:** Amylose (Glucose α-1,4 verknüpft), Amylopektin (zusätzlich Verzweigungen α-1,6 angeknüpft); Hauptspeichersubstanz der Pflanzen; Abbau durch viele Pilze und Bakterien; Enzyme: α-Amylase, Amylo-1,6-Glucosidase, Glucoamylase.

Lignin: Polymer aus durch Ether und C-C-Bindungen verknüpften Phenylpropanresten, Bestandteil verholzter pflanzlicher Zellwände; Ligninabbau nur durch wenige Pilze; Enzyme: Lignin-Peroxidase, Mangan-Peroxidase, Laccase (Polyphenoloxidase).

Proteine: Polymer aus über Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren; Hauptbestandteil tierischer Biomasse; Abbau (Proteolyse) durch zahlreiche Pilze und Bakterien; Enzyme: Endopeptidasen (Spaltung innerhalb der Proteinkette), Exopeptidasen (Abspaltung endständiger Aminosäuren).

Nucleinsäuren: Polymer aus Nucleotiden; Bestandteile des genetischen Materials aller Organismen; Abbau durch viele Mikroorganismen; Enzyme: Phosphodiesterasen (Nucleasen, Spaltung in Nucleotide und Oligonucleotide), Exonucleasen (Abspaltung endständiger Nucleotide), Endonucleasen (spezifisch oder unspezifisch Spaltung innerhalb der Nucleotidkette).

Lipide: Aus Glycerin und langkettigen Fettsäuren aufgebaute Moleküle; Membrankomponenten aller Organismen (Phospholipide), Speicherstoffe vieler Eukaryoten (Neutralfette); Abbau durch viele Mikroorganismen; Enzyme: Lipasen (Spaltung der Esterbindungen zwischen Glycerin und Fettsäuren).

Lignocellulose: Komplex aus Cellulose-Mikrofibrillen, Lignin und Hemicellulose.

Pansen: Gärkammer im Verdauungstrakt von Wiederkäuern, in der die Depolymerisation pflanzlicher Strukturpolysaccharide und Abbau von Monosacchariden zu kurzkettigen Fettsäuren durch cellulolytische Bakterien erfolgt.

Humus: Oberste Bodenschicht aus abgestorbener Biomasse; Lebensraum von Destruenten an Land; enthält aus Ligninabbau stammende aromatische Verbindungen.

11.2 Stoffkreisläufe

Die **organischen Verbindungen**, aus denen die Zellstrukturen aller Organismen aufgebaut sind, besitzen ein Kohlenstoff-Grundgerüst, an das Stickstoffatome (in Form der Aminogruppe), Schwefelatome (in Form der Sulfhydrylgruppe) und Phosphatgruppen geknüpft sind. Der Auf- und Abbau von Biomasse durch (Mikro-)Organismen bewirkt einen **Kreislauf** von Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor.

Die **Kohlenstoffassimilation** durch autotrophe Primärproduzenten beruht auf der Reduktion von CO_2 und führt primär zur Synthese von Zuckern, aus denen alle anderen Zellbausteine gebildet werden. Beim **Abbau organischer Verbindungen**, von heterotrophen Konsumenten und Destruenten zur Energiekonservierung betrieben, wird der Kohlenstoff wieder oxidiert. Unter **oxischen Bedingungen** erfolgt die Oxidation über **aerobe Atmung** vollständig bis zu CO_2. Unter **anoxischen Bedingungen** ist häufig keine vollständige Oxidation möglich. Am Abbau sind dann verschiedene Gruppen von Organismen beteiligt: Bakterien, die eine **anaerobe Atmung** betreiben, **primäre und sekundäre Gärer**. Bei sekundären Gärungen wird Wasserstoff gebildet, der von methanogenen Archaebakterien zur Synthese von Methan genutzt wird.

Zur Stickstoffassimilation wird Ammonium benötigt. Der **Stickstoffkreislauf** resultiert aus reduktiven Reaktionen zur Bereitstellung von Ammonium (**assimilatorische Nitratreduktion**, **Stickstofffixierung**) und Reaktionen, die von Bakterien zur Energiekonservierung genutzt werden (dissimilatorische Nitratreduktion = **Ammonifikation** und **Denitrifikation**, Ammoniumoxidation = **Nitrifikation**).

Die Schwefelassimilation geht von Schwefelwasserstoff (H_2S bzw. HS^-) aus. Der **Schwefelkreislauf** beruht auf der **assimilatorischen Sulfatreduktion**, über die Bakterien und Pflanzen H_2S/HS^- bereitstellen, und von Bakterien zur Energiekonservierung genutzten Reaktionen (**dissimilatorische Sulfat**- und **Schwefelreduktion**, **Sulfidoxidation**).

Phosphor liegt stets in Form von Phosphat vor. Der **Phosphorkreislauf** beruht auf dem Einbau von Phosphat in und seiner Freisetzung aus organischen Verbindungen. Mikroorganismen bewirken die Mobilisierung von unlöslichen Phosphaten.

Die Elemente **Kohlenstoff**, **Stickstoff**, **Schwefel** und **Phosphor** unterliegen in der Natur einem **Kreislauf**, der sowohl auf geochemischen Prozessen, in besonderem Maße aber auf der **Aktivität von Lebewesen** beruht. Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel machen dabei einen zyklischen Wechsel ihres Redoxzustandes durch, Phosphor liegt dagegen stets im Redoxzustand des Phosphates vor.

11.2.1 Kohlenstoffkreislauf

Kohlenstoff (**C**) kommt auf der Erde in Form **anorganischer** und **organischer Verbindungen** vor. In Kohlendioxid (CO_2), Kohlensäure (H_2CO_3), Bicarbonationen (HCO_3^-) und Carbonationen (CO_3^{2-}) liegt der Kohlenstoff in oxidierter Form vor, in organischen Verbindungen ist er in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Durch verschiedene Mechanismen, die entweder physikalisch-geochemischer Natur sind oder auf der Aktivität von Lebewesen beruhen, kommt es zum Austausch zwischen den verschiedenen Kohlenstoffvorkommen.

Kohlenstoffvorkommen auf der Erde

Die Kohlenstoffvorkommen auf der Erde und die sie miteinander verknüpfenden Vorgänge sind als **globaler Kohlenstoffkreislauf** in Abb. 11.**8** skizziert. Das **Kohlendioxid** der **Luft** stellt das Reservoir dar, aus dem die landlebenden Primärproduzenten Kohlenstoff beziehen. In **Wasser** gelöstes CO_2 liegt im Gleichgewicht mit H_2CO_3, HCO_3^-- und CO_3^{2-}-Ionen vor und wird von wasserlebenden Primärproduzenten als Kohlenstoffquelle genutzt. Ein riesiges Reservoir anorganischen Kohlenstoffs stellen **Carbonate** in **Sedimenten** und **Gesteinen** dar, die durch Ausfällung von Salzen aus Lösungen oder durch Ablagerung der Kalkskelette von Lebewesen entstanden sind. Die Freisetzung von Kohlenstoff durch Verwitterung von Kalkstein verläuft langsam.

Kohlenstoff in **Biomasse** liegt in Form organischer Verbindungen vor. Die Überführung von CO_2 in organische Moleküle, die **CO_2-Fixierung**, entspricht einer **Kohlenstoff-Reduktion** und beruht zum größten Teil auf der Stoffwechselaktivität **Photosynthese** betreibender Organismen (CO_2-Reduktion durch Chemosynthese chemolithoautotropher Bakterien ist vom Umfang her vernachlässigbar; s. o.). Primäre Produkte der CO_2-Fixierung sind Zucker. Beim Abbau organischer Verbindungen zu CO_2, der zum Zweck der Energiekonservierung von einer Vielzahl chemoheterotropher Organismen betrieben wird, erfolgt eine **Kohlenstoff-Oxidation**. Eine große Menge organischer Verbindungen aus abgestorbener Biomasse, vor allem schwer degradierbare organische Substanzen wie Lignin und dessen Abbauprodukte, verbleiben an Land längere Zeit in der bodenbedeckenden Schicht aus **Humus** und werden dort durch spezialisierte chemoorganotrophe Destruenten nur langsam zu CO_2 oxidiert.

Fossile Brennstoffe bestehen aus Kohlenwasserstoffen, organischen Molekülen, in denen der Kohlenstoff einen höheren Reduktionsgrad als in Zuckern aufweist. Sie sind unter Luftabschluss, hohen Temperaturen und dem Druck darüber gelagerter Sedimentschichten aus den Resten von Organismen entstanden. **Kohle** geht auf Biomasse landlebender Pflanzen zurück (Umwandlungsprozess: Inkohlung), **Erdöl** und **Erdgas** dagegen auf Biomasse von marinen Kleinstlebewesen (Mikroorganismen, Algen, Plankton). Die Verbrennung von Kohle, Erdöl und Erdgas durch den Menschen führt der Atmosphäre CO_2 zu.

Der **Eingriff des Menschen in den globalen Kohlenstoffkreislauf** erfolgt in vielfältiger Weise: So wird die Festlegung von Kohlenstoff in Biomasse in signifikantem Ausmaß durch die **Landwirtschaft**, also den Anbau von Nutzpflanzen und die Haltung von Nutztieren, gelenkt. Um den Nachschub des Bau- und Brennstoffes **Holz** zu gewährleisten und Flächen für Landwirtschaft und die Ansiedlung der wachsenden Bevölkerung bereitzustellen, wurde in Europa bereits sehr früh und wird bis heute auch in vielen anderen Teilen der Welt Wald in großem Maßstab abgeholzt. Die Nutzung fossiler Brennstoffe zur **Energieversorgung** der Menschheit hat zu einem **Anstieg der CO_2-Konzentration** in der Atmosphäre geführt (im Jahr 1800: ca. 280 ppm, im Jahr 2000 ca. 380 ppm), der als Ursache der globalen Erwärmung angesehen wird.

Kohlendioxid (CO_2), **Wasserdampf**, **Lachgas** (N_2O), **Methan** (CH_4) und **Ozon** (O_3) sind **Treibhausgase**, die in der Erdatmosphäre vorkommen. Als Treibhausgase werden solche Gase bezeichnet, die elektromagnetische Strahlung des langwelligen Infrarotbereichs (Wellenlänge > 3200 nm) absorbieren bzw. emitieren (z. B. CO_2: Absorptionsmaximum bei ca. 15 000 nm). Von der Sonne ausgestrahlte elektromagnetische Strahlung (Wellenlängenbereich: 225–3200 nm) passiert zum Teil die Erdatmosphäre (die Erdoberfläche erreichender Wellenlängenbereich: 340–1100 nm) und wird an der Erdoberfläche absorbiert. Von der Erdoberfläche emitierte Wärmestrahlung (terrestrische Ausstrahlung) wird von den Treibhausgasen der Atmosphäre absorbiert, die dann ihrerseits Wärmestrahlung emitieren (atmosphärische Gegenstrahlung), die der Erdoberfläche wiederum Energie zuführt. Die Strahlungsenergie der Sonne wird dadurch wie in einem gläsernen Treibhaus zurückgehalten. Dieser **Treibhauseffekt**, der auf den natürlicherweise in der Atmosphäre anwesenden Treibhausgasen beruht, führt dazu, dass die mittlere Temperatur der erdnahen Atmosphäre (15 °C) ca. 30 ° höher liegt als dies ohne Treibhausgase der Fall wäre. Für den Zeitraum der letzten hundert Jahre ist nun ein Anstieg der mittleren Temperatur auf der Erde um 0,74 °C +/– 0,18 °C belegt, der auf die Bildung und Freisetzung von Treibhausgasen durch menschliche Aktivität (in erster Linie Bildung von CO_2 durch Verbrennung von fossilen Brennstoffen) zurückzuführen ist. Der Zusammenhang zwischen dieser gestiegenen Erdtemperatur und dem zugleich beobachteten **Klimawandel** (verstärktes Abtauen von Gletschern und der Eisdecke an den Polen, Auftauen von Permafrostböden, Anstieg von Frequenz und Stärke von Stürmen etc.) wird kontrovers diskutiert.

11

Umsatz von Kohlenstoffverbindungen durch (Mikro-)Organismen

Der durch **Lebewesen** bewirkte Umsatz von Kohlenstoffverbindungen (Abb. 11.**9**) ist in der Regel mit **Veränderung des Redoxzustandes** des Kohlenstoffs verbunden. Produkte der CO_2-Fixierung durch photoautotrophe Organismen sind primär Zucker. Cyanobakterien und niedere und höhere Pflanzen benutzen Wasser als Elektronendonor zur Reduktion des CO_2, sodass als Abfallprodukt der Photosynthese molekularer Sauerstoff (O_2) entsteht. Der heutige Sauerstoffgehalt der Erdatmosphäre (21 %) geht auf diese **oxygene Photosynthese** zurück (S. 6, S. 343). Der **Zuckerabbau**, der als Beispiel für die Verstoffwechselung einer niedermolekularen, organischen Verbindung im Energiestoffwechsel eines **chemoheterotrophen** Organismus dient, erfolgt abhängig von den Umweltbedingungen auf unterschiedliche Weise und durch verschiedene Gruppen von Organismen. Unter **oxischen Bedingungen** ist die Oxidation von Zuckern mit **O_2** als Elektronenakzeptor, d. h. die **aerobe Atmung**, der von den Organismen bevorzugte Weg zur Energiekonservierung (S. 359). Dabei wird O_2 zu Wasser redu-

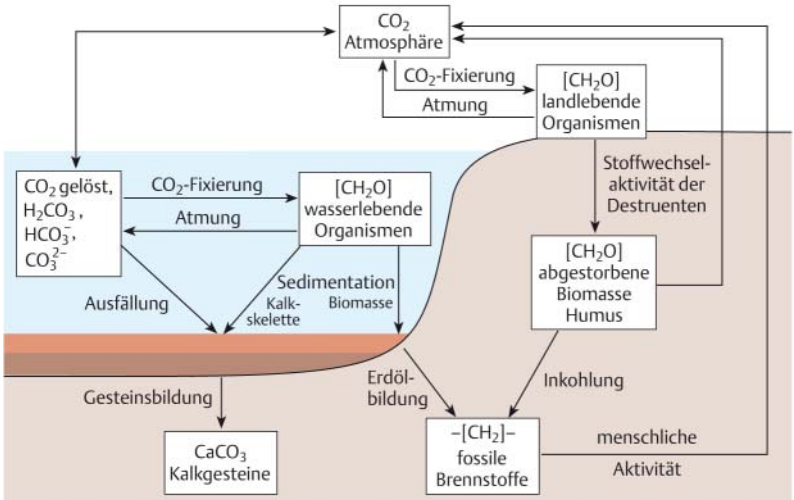


Abb. 11.8 **Der globale Kohlenstoffkreislauf:** Die Kohlenstoffvorkommen auf der Erde (Methanhydratlagerstätten der Weltmeere nicht gezeigt) und die Prozesse, die dem Austausch von Kohlenstoff zwischen den verschiedenen Reservoirs zugrunde liegen.

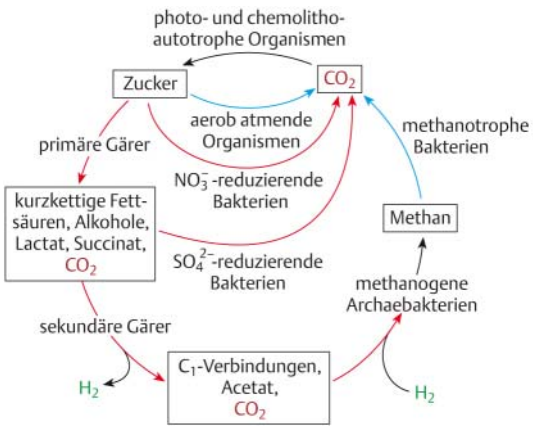


Abb. 11.9 **Durch Lebewesen bewirkter Umsatz von Kohlenstoffverbindungen.** In der anorganischen Kohlenstoffverbindung CO_2 liegt der Kohlenstoff vollständig oxidiert vor, in organischen Kohlenstoffverbindungen ist er in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Die Reduktion von CO_2 durch autotrophe Organismen resultiert in der Synthese von Zuckern, die dann von heterotrophen Organismen als Nahrung genutzt werden. Abhängig davon, ob Sauerstoff verfügbar ist, sind unterschiedliche Gruppen von heterotrophen Lebewesen am Zuckerabbau beteiligt (blau: Stoffwechselaktivität aerober Organismen; rot: Stoffwechselaktivität anaerober Organismen).

ziert. Oxygene Photosynthese und aerobe Atmung sind daher gegenläufige Prozesse, die einen Wechsel des Redoxzustandes des Kohlenstoffs mit dem von Sauerstoff verknüpfen:

oxygene Photosynthese: $6\ CO_2 + 6\ H_2O \rightarrow 6\ O_2 + C_6H_{12}O_6$ (Zucker)

aerobe Atmung: $C_6H_{12}O_6$ (Zucker) $+ 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$

Ist kein Sauerstoff vorhanden (**anoxische Bedingungen**), so können einige chemoheterotrophe Bakterien auch **Nitrat** als Elektronenakzeptor nutzen und dann eine **anaerobe Atmung** (Nitratatmung; S. 364) durchführen. Der Abbau von Zuckern unter anaeroben Bedingungen liefert als Endprodukt ebenfalls CO_2, an einigen Standorten jedoch zusätzlich auch **Methan**. Hier sind mehrere Organismengruppen beteiligt, deren Energiestoffwechsel auf **Gärung** (S. 374) oder anaerober Atmung beruht. **Primäre Gärer** oxidieren einzelne Kohlenstoffatome eines Zuckers zu CO_2, die Kohlenstoffatome des verbleibenden Kohlenstoffgerüsts müssen dann jedoch als Akzeptoren für die bei den Oxidationsschritten anfallenden Elektronen dienen. Entsprechend bilden primäre Gärer unvollständig oxidierte organische Verbindungen als Gärungsprodukte. Diese können, sofern Sulfat verfügbar ist, von **sulfatreduzierenden Bakterien** (Sulfatatmung: Nutzung von Sulfat als Elektronenakzeptor; S. 366) zu CO_2 oxidiert werden. Die Gärungsprodukte der primären Gärer können auch von **sekundären Gärern** weiter oxidiert werden. Dabei entstehen als Gärungsprodukte neben CO_2 nur die C2-Verbindung Acetat und verschiedene C1-Verbindungen. Sekundäre Gärer entledigen sich der bei Oxidationsschritten anfallenden Elektronen durch ihre Übertragung auf Protonen, was die Bildung von molekularem Wasserstoff ($\mathbf{H_2}$) zur Folge hat. Acetat, C1-Verbindungen und CO_2 werden von den **methanogenen Archaebakterien** zur Synthese von Methan (CH_4) verwendet (S. 367). CO_2 kann außerdem von **acetogenen Bakterien** zu Acetat umgesetzt werden (S. 371). Für die Reduktion des CO_2-Kohlenstoffatoms verwenden methanogene und acetogene Bakterien als Elektronendonor molekularen Wasserstoff. Dieser entsteht in anoxischen Habitaten durch die Stoffwechselaktivität der sekundären Gärer. Die Weitergabe des Wasserstoffs von sekundären Gärern an methan- und acetatbildende Bakterien wird als **Interspecies Hydrogen Transfer** bezeichnet.

11

sekundärer Gärer (z. B.): 2 Butyrat $\rightarrow 4$ Acetat $+ 4\ H_2$

methanogenes Archaebakterium: $4\ H_2 + 1\ CO_2 \rightarrow 1\ CH_4 + 2\ H_2O$

Unter anoxischen Bedingungen gebildetes Methan kann, wenn es von dort in oxische Bereiche gelangt, von **methanotrophen Bakterien** (aerobe, methanoxidierende Bakterien) erneut zu CO_2 oxidiert werden.

Natürliche anoxische Habitate sind Süß- und Salzwassersedimente, durch Staunässe geprägte terrestrische Ökosysteme wie Sümpfe und Marschen und der Darmtrakt von Tieren. In anoxischen Meeressedimenten begünstigt die Anwesenheit von Sulfat in der Regel die sulfatreduzierenden Bakterien, sodass in erster Linie CO_2 das Endprodukt des

Abbaus organischer Verbindungen ist. In anoxischen Sedimenten im Süßwasser ist die Sulfatkonzentration gewöhnlich limitierend, sodass Methanogenese und Acetogenese dominieren und neben CO_2 auch CH_4 entsteht.

Die Bildung des **Treibhausgases Methan** wird vom Menschen durch den vermehrten, auf überfluteten Feldern erfolgenden **Reisanbau** und die Zunahme der **Rinderzucht** begünstigt. Methan entsteht auch im Faulturm bei der **Abwasserreinigung** (sekundäre, anoxische Abwasserbehandlung). In **Biogasanlagen** ist es das erwünschte Produkt, das als Brennstoff für Blockheizkraftwerke zur Stromerzeugung und zu Heizungszwecken, nach Aufreingung auch als Treibstoff für Gasfahrzeuge genutzt wird. Ausgangsmaterial für die Methanbildung sind hier Bioabfälle wie Gülle und Mist, ansonsten ungenutzte Pflanzenabfälle oder auch gezielt angebaute Energiepflanzen (nachwachsende Rohstoffe, z. B. Mais). Durch die Aktivität methanogener Bakterien sind wohl auch die großen **Methanhydratlagerstätten** in den Kontinentalhängen der Weltmeere entstanden, die erst während der letzten Jahrzehnte entdeckt und erforscht wurden. Methanhydrate, in Käfigen von Eiskristallen eingeschlossenes Methan, entstehen unter hohem Druck und bei niedrigen Temperaturen.

Kohlenstoff(C)-Vorkommen: CO_2 der Luft; CO_2 gelöst in Meerwasser (steht in Gleichgewicht mit H_2CO_3, HCO_3^-, CO_3^{2-}); Carbonate in Gesteinen und Sedimenten; organische Verbindungen in Biomasse, Humus, fossilen Brennstoffen und Methanhydratlagerstätten.

Kohlenstoffkreislauf: Beschreibung des Umsatzes anorganischer und organischer C-Verbindungen durch geochemische Vorgänge und die Stoffwechselaktivität von Lebewesen; der Umsatz von C-Verbindungen im Energiestoffwechsel der Organismen ist mit einem Wechsel des Redoxzustandes des Kohlenstoffs verbunden.

Photosynthese und Chemosynthese: Synthese organischer Verbindungen (Zucker) aus CO_2 durch autotrophe (photolithotrophe und chemolithotrophe) Organismen.

Abbau organischer Verbindungen durch heterotrophe Organismen:

- **Oxische Bedingungen:** Endprodukt CO_2; beteiligte Organismen: aerob atmende, chemoorganotrophe Organismen; Methanabbau speziell durch methanotrophe Bakterien.
- **Anoxische Bedingungen:** Endprodukte CO_2 und CH_4; beteiligte Organismen: anaerob atmende und gärende, chemoorganotrophe Organismen, methanogene Archaebakterien, acetogene Bakterien.

Treibhausgase: Gase, die Infrarotstrahlung (Wärmestrahlung) absorbieren; Kohlendioxid (CO_2), Wasserdampf, Methan (CH_4), Lachgas (N_2O), Ozon (O_3).

Treibhauseffekt: Erhöhung der Temperatur der Erdoberfläche durch Wärmerückstrahlung aus der Atmosphäre, welche auf die Absorption von Infrarotstrahlung durch Treibhausgase in der Atmosphäre zurückgeht.

11.2.2 Stickstoffkreislauf

Stickstoff (**N**) ist in Form der **Aminogruppe** Bestandteil vieler organischer Verbindungen, die die Zellstrukturen der Lebewesen aufbauen, und macht etwa 15 % der Biomasse aus. 99 % des Gesamtstickstoffs auf der Erde liegt in Form **elementaren Stickstoffs** (N_2; Redoxzustand: 0) vor. Dabei handelt es sich um ein

chemisch inertes Gas, das die Hauptkomponente der Erdatmosphäre (78 %) bildet. Außerdem tritt Stickstoff oxidiert in Form von **Nitrat** (**NO_3^-**; Redoxzustand: + V) und **Nitrit** (**NO_2^-**; Redoxzustand: + III) auf. Vollständig reduziert ist der Stickstoff in **Ammoniak** bzw. **Ammonium** (**NH_3** bzw. **NH_4^+**; Redoxzustand: –III). Ammoniak ist eine flüchtige, aber gut wasserlösliche, giftige Verbindung, die bei alkalischem pH-Wert vorliegt und aus der bei neutralem und saurem pH-Wert durch Protonierung Ammonium entsteht. Der **Stickstoff in der Biomasse** besitzt den gleichen Redoxzustand wie der Stickstoff in NH_3/NH_4^+. Entsprechend bevorzugen alle Organismen **Ammonium** als direkte **Stickstoffquelle** und auch beim Abbau stickstoffhaltiger organischer Verbindungen wird der Stickstoff wieder in Form von Ammonium frei.

Um den stets mit Ammonium im Gleichgewicht vorliegenden Ammoniak unschädlich zu machen, bilden Landtiere zur Ausscheidung von Stickstoff die ungiftigen und gut wasserlöslichen Verbindungen **Harnstoff** bzw. **Harnsäure**.

Während viele Organismen ausschließlich Ammonium als N-Quelle nutzen können, sind einige Bakterien dazu in der Lage, sich durch Reduktion oxidierter, anorganischer Stickstoffverbindungen (**Nitrat**) selbst mit Ammonium zu versorgen. Alle von einem Organismus katalysierten Reaktionsschritte, die der Bereitstellung von Ammonium und dessen Einbau in die Zellsubstanz dienen, werden unter dem Begriff **Stickstoffassimilation** zusammengefasst. Die Reduktion oder Oxidation verschiedener Stickstoffverbindungen kann jedoch auch im Energiestoffwechsel einiger Bakteriengruppen zum Zweck der **Energiekonservierung** erfolgen. Der Umsatz von Stickstoffverbindungen in der Natur geht ganz überwiegend auf die Aktivität von Mikroorganismen zurück und kann daher als **mikrobieller Stickstoffkreislauf** (Abb. 11.**10**) dargestellt werden.

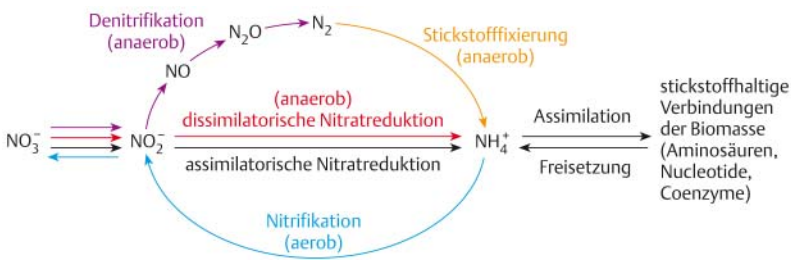


Abb. 11.**10** **Mikrobieller Stickstoffkreislauf.** Die Bildung organischer Stickstoffverbindungen der Biomasse beruht auf Assimilation von Ammonium durch Pflanzen, Pilze und Bakterien. Ihr hydrolytischer Abbau setzt Ammonium wieder frei. Der Umsatz der anorganischen Stickstoffverbindungen wird ausschließlich von Bakterien katalysiert (Ausnahme: assimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium) und ist gleichbedeutend mit einem Wechsel des Redoxzustandes des enthaltenen Stickstoffatoms.

Ammonium: Einbau in und Freisetzung aus Biomasse

Die **Ammoniumassimilation** erfolgt in den meisten Mikroorganismen bei Ammoniumkonzentrationen größer als 1 mM über die **reduktive Aminierung** von α-Ketoglutarat bzw. Pyruvat zu L-Glutamat bzw. L-Alanin. Die beteiligten Enzyme **Glutamat-Dehydrogenase** und **Alanin-Dehydrogenase** weisen beide eine relativ geringe Affinität zu Ammonium auf. Liegt die Ammoniumkonzentration unter 1 mM, erfolgt die Assimilation des Ammoniums über die **Glutaminsynthetase**. Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zu den beiden Dehydrogenasen eine höhere Affinität zu Ammonium und katalysiert die reduktive Aminierung von Glutamat zu Glutamin in einer **ATP-abhängigen Reaktion**. Die Diaminosäure Glutamin wird anschließend mit α-Ketoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt (Glutamat-Synthase o. GOGAT). Glutamat fungiert im Zuge einer **Transaminierung** als Aminogruppendonor für die Synthese anderer Aminosäuren (S. 419) und Nucleotide (S. 422).

Ein großer Teil des von den Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen assimilierten Ammoniums stammt aus dem mikrobiellen Abbau von organischem Material, der mit der **Freisetzung von Ammonium** einhergeht. Im Verlauf der **Proteolyse** werden Proteine hydrolytisch in Aminosäuren gespalten. Durch **oxidative Desaminierung** wird aus den Aminosäuren anschließend Ammonium freigesetzt. Auch die **hydrolytische Desaminierung** von Harnstoff und Harnsäure liefert Ammonium. Desaminierungsreaktionen sind unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Sauerstoff, erfolgen also sowohl unter oxischen als auch unter anoxischen Bedingungen.

Nitratreduktion

Pflanzen, Pilze und Bakterien können **Nitrat** als **Stickstoffquelle** nutzen. Sie versorgen sich durch **assimilatorische Nitratreduktion** mit dem zur Synthese organischer Stickstoffverbindungen benötigten Ammonium. Die Reaktionen der assimilatorischen Nitratreduktion erfolgen durch **lösliche Enzyme** im **Cytoplasma** der Zellen, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Sauerstoff. Nitrat wird dabei über **Nitrit** als Zwischenprodukt zu Ammonium reduziert.

Einige fakultativ anaerobe Bakterien betreiben unter anoxischen Bedingungen jedoch auch eine **dissimilatorische Nitratreduktion**, die der **Energiekonservierung** dient. Hier werden Elektronen, die bei der Oxidation von organischen Verbindungen oder von Wasserstoff anfallen, durch **membranständige Enzyme** auf Nitrat übertragen, Nitrat fungiert als alternativer Elektronenakzeptor einer anaeroben Atmungskette (**Nitratatmung**, S. 364). Zwischenprodukt ist **Nitrit**. Bei der als **Nitratammonifikation** bezeichneten und von verschiedenen Enterobakterien katalysierten Form der Nitratatmung wird das Nitrit zu Ammonium weiterreduziert. Pseudomonaden und einige Bacillus-Arten reduzieren Nitrit dagegen über Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (Lachgas, N_2O, ein Treibhausgas, das in geringem Umfang auch freigesetzt wird) zum ebenfalls gas-

förmigen molekularen Stickstoff (N_2). Dieser Vorgang wird als **Denitrifikation** bezeichnet.

N_2-Reduktion: Stickstofffixierung

Einige Bakterien versorgen sich durch **Stickstofffixierung**, d. h. die **Reduktion molekularen Stickstoffs**, mit Ammonium. Unter diesen finden sich sowohl aerobe als auch anaerobe chemolitho- und chemoorganotrophe Organismen (aerobe Bakterien: z. B. *Azotobacter vinelandii*, einige Pseudomonaden, anaerob wachsende Bakterien: z. B. einige Clostridien, einige methanogene Archaebakterien), genauso wie phototrophe Organismen, die eine oxygene oder anoxygene Photosynthese betreiben (anoxygene Photosynthese: z. B. *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium vinosum, Chlorobium limicola*; oxgene Photosynthese: Cyanobakterien).

In vielen Habitaten ist die Biomassebildung durch die **Verfügbarkeit** von Nitrat und Ammonium **limitiert**. Durch die **Denitrifikation** wird Stickstoff in N_2 überführt, eine Verbindung, die von den meisten Organismen nicht als Stickstoffquelle genutzt werden kann und die in die Atmosphäre entweicht. In der Landwirtschaft ist ein solcher Stickstoffverlust des Bodens unerwünscht, bei der Abwasseraufbereitung (S. 580) ist die Eliminierung gebundenen Stickstoffs durch die Denitrifikation dagegen beabsichtigt. Die **Stickstofffixierung** wirkt dem Stickstoffverlust durch die Denitrifikation entgegen.

11

Zur Förderung des Pflanzenwachstums hat der Mensch seit jeher die stickstoffhaltigen Ausscheidungen von Tieren (Jauche, Mist) auf den Feldern als **Dünger** ausgebracht. In solchen **organischen Düngern** liegt der Stickstoff gebunden an organische Moleküle vor. **Mineralischer Stickstoffdünger** enthält dagegen den Stickstoff in Form von Nitraten oder Ammoniumsalzen. Im 19. Jahrhundert wurden zur Düngemittelherstellung Chilesalpeter (Natriumnitrat) und Guano abgebaut. Seit ca. 1910 bildet die Gewinnung von Ammoniak durch Reduktion von N_2, also gemäß der Reaktion, die auch von den stickstofffixierenden Bakterien beschritten wird, die Grundlage für die Herstellung von Stickstoffdüngern. Die Ammoniaksynthese über das sogenannte **Haber-Bosch-Verfahren** erfolgt an Metallkatalysatoren und benötigt hohen Druck und hohe Temperaturen, als Reduktionsmittel dient Wasserstoff. ◀

In allen stickstofffixierenden Organismen wird die N_2-Reduktion durch den **Nitrogenase-Enzymkomplex** katalysiert (Abb. 11.**11**). Dabei werden Elektronen mit hoher Reduktionskraft benötigt, die über **Ferredoxin** bereitgestellt werden. Die N_2-Reduktion mit diesem Elektronendonor ist ein exergoner Prozess, der jedoch aufgrund der stabilen Dreifachbindung zwischen den N-Atomen des N_2-Moleküls eine extrem hohe Aktivierungsenergie besitzt und für die N_2-fixierenden Organismen mit **hohen energetischen Kosten** verbunden ist: Pro reduziertem N_2-Molekül müssen 16 ATP aufgewandt werden.

Ein zentrales Problem für alle N_2-reduzierenden Bakterien ist die **Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase**. Beide Komponenten des Enzyms werden durch O_2 irreversibel inaktiviert. N_2-Reduzierer haben daher verschiedene Mechanismen entwickelt, das

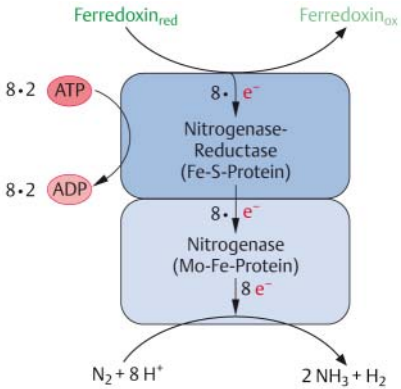


Abb. 11.**11** **Der Nitrogenase-Enzymkomplex.** Der Enzymkomplex besteht aus zwei Komponenten. Die Nitrogenase-Reductase (Eisen-Schwefel-Protein) überträgt einzelne Elektronen von Ferredoxin auf die eigentliche Nitrogenase (Molybdän-Eisen-Protein). Dabei werden pro Elektron 2 ATP hydrolysiert. Zur Reduktion des N_2 am FeMo-Protein werden 8 Elektronen übertragen, 2 davon werden zur Reduktion von H^+ verwendet. Zwischenprodukte der N_2-Reduktion werden nicht frei. Reduziertes Ferredoxin, der direkte Elektronendonor wird in vielen phototrophen Organismen durch den lichtgetriebenen Elektronentransport gebildet (S. 333), in chemotrophen Organismen entsteht es durch die Oxidation von Wasserstoff (H_2), Pyruvat oder Formiat, in aeroben chemolithotrophen Organismen durch revertierten Elektronentransport (S. 331).

Enzym zu schützen. **1. Expressionskontrolle der Nitrogenase-Gene durch Sauerstoff**: In einigen fakultativ anaeroben Bakterien wird die Nitrogenase bei Anwesenheit von O_2 nicht gebildet und entsprechend findet die N_2-Reduktion nur unter anoxischen Bedingungen statt. **2. Konformationsschutz**: Die Konformation der Nitrogenase wird in Anwesenheit von O_2 durch Bindung eines Proteins verändert, das Enzym dadurch reversibel inaktiviert und so vor der O_2-Wirkung geschützt. **3. Atmungsschutz**: Die O_2-Konzentration in der Zelle wird durch eine extrem hohe Atmungsrate gering gehalten. **4. Heterocysten**: Fädig wachsende Cyanobakterien, die wie alle Cyanobakterien eine oxygene Photosynthese betreiben, fixieren N_2 nur in spezialisierten, dickwandigen Zellen (Heterocysten), die nicht über Photosystem II verfügen. Diese Zellen können nur durch zyklische Photophosphorylierung ATP synthetisieren, es findet jedoch keine Wasserspaltung und damit keine O_2-Freisetzung im Verlauf der Photophosphorylierung statt. Die Heterocysten liefern den Nachbarzellen gebundenen Stickstoff, sind ihrerseits jedoch auf die Versorgung mit organischen Verbindungen angewiesen. Cyanobakterien, die keine Heterocysten bilden, fixieren Stickstoff nur im Dunkeln.

Neben **freilebenden Stickstofffixierern** gibt es auch einige in **Symbiose mit Pflanzen** lebende Stickstofffixierer, wobei durch die Symbiose einerseits der pflanzliche Wirt von dem symbiontischen Bakterium mit gebundenem Stickstoff versorgt wird und damit unabhängig von externen N-Quellen ist, das Bakterium andererseits von der Pflanze photosynthetisch gebildete, organische Verbindun-

gen erhält. Dank dieser direkten Versorgung mit Substraten zur Energiekonservierung sind symbiotische N_2-Fixierer in deutlich stärkerem Maß an der globalen Stickstofffixierung beteiligt als freilebende Organismen. Bekanntestes Beispiel für die symbiotische N_2-Fixierung ist die Lebensgemeinschaft von Bakterien der Gattungen *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* und *Azorhizobium* (gramnegativ, obligat aerob, beweglich) mit **Leguminosen** (z. B. Bohne, Erbse, Sojabohne und Klee). Bakterien der Gattungen *Azospirillum, Azotobacter* und *Azoarcus* (gramnegativ, aerob oder mikroaerophil) finden sich assoziiert mit **Gräsern**. Bei **Erle**, **Sanddorn** und **Ölweide** sind Bakterien der Gattung *Frankia* (grampositiv, mycelartig wachsende Aktinomyceten) nachgewiesen. Zur Etablierung der Symbiose dringen die zunächst frei lebenden Bakterien in Wurzelgewebe ihres Wirtes ein und vermehren sich dort. Häufig bildet die Pflanze spezielle, die N_2-fixierenden Symbionten beherbergende Strukturen aus.

Das bekannteste und am besten untersuchte Symbiosesystem zur Stickstofffixierung sind die **Wurzelknöllchen der Leguminosen**. In diesen bis zu 1 cm großen Knöllchen liegen die N_2-fixierenden Bakterien in großer Zahl als abgerundete **Bacteroide** vor. Der Nitrogenase-Enzymkomplex macht bis zu 10 % des löslichen Proteins der Bacteriode aus. Von den Wurzelzellen erhalten die Bacteroide organische Säuren (Succinat, Malat, Fumarat), aus denen sie einerseits Pyruvat bilden (durch dessen Oxidation kann reduziertes Ferredoxin, der Elektronendonor für die Nitrogenase, bereitgestellt werden) und die sie andererseits im Citratzyklus oxidieren. Um die Funktionstüchtigkeit der Nitrogenase zu gewährleisten, wird die O_2-Konzentration in den Wurzelknöllchen durch eine hohe Atmungsrate der Wurzelzellen niedrig gehalten. Zusätzlich bilden die Pflanzenzellen **Leghämoglobin**, ein Protein mit hoher Affinität zu Sauerstoff. Seine Aufgabe ist neben der Regulation der O_2-Konzentration im Knöllchengewebe die kontrollierte O_2-Versorgung der aeroben Atmungskette der Bacteroide, auf deren Funktionieren diese zur Bereitstellung von ATP für die N_2-Fixierung angewiesen sind.

11

Ein weiteres Symbiosesystem zur Stickstofffixierung stellen die **Actinorrhiza** dar. Dabei handelt es sich um die ganz eigentümlich gestalteten Wurzelknöllchen von Erle, Sanddorn und Ölweide, die durch die Symbiose mit Bakterien der Gattung *Frankia* entstehen. Bei **assoziativen Symbiosesystemen** leben die Stickstofffixierer nicht in Wurzelgewebe sondern sind mit der Wurzeloberfläche assoziiert. Dieses System ist typisch für Gräser (z. B. Reis und Mais) und wahrscheinlich sehr viel verbreiteter als bisher angenommen.

Die N_2-Fixierung durch symbiotische Bakterien ist von großer **Bedeutung für die Landwirtschaft**. Zu den Wurzelknöllchen bildenden Leguminosen zählen viele Pflanzen, die entweder als **Gemüsepflanzen** direkt der menschlichen Ernährung (Erbse, Bohne, Sojabohne) oder als **Futterpflanze** bei der Tiermast (Klee, Pferde- oder Saubohne, Luzerne) dienen. Dank ihrer Unabhängigkeit von externer Stickstoffversorgung gedeihen diese Pflanzen auch auf stickstoffarmen Böden und ersparen den Einsatz von Stickstoffdünger. Bereits die Anpflanzung von Leguminosen führt zu einer Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit. Dies kann durch **Gründüngung**, d. h. die Einarbeitung der zuvor auf einem Feld angebauten Pflanzen in den Boden, noch unterstützt werden. ◀

Ammoniumoxidation

Die **Oxidation von Ammonium** zu Nitrit und weiter zu Nitrat wird ausschließlich von einigen chemolithotrophen Bakterien durchgeführt und von diesen zur Energiekonservierung genutzt (S. 391). Der als **Nitrifikation** bezeichnete Vorgang resultiert stets aus der Aktivität von zwei Organismengruppen: **Ammoniumoxidierer**, die Nitrit bilden (z. B. *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosolobus*), und **Nitritoxidierer**, die Nitrit anschließend zu Nitrat oxidieren (z. B. *Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus*). Beide zusammen werden auch als **nitrifizierende Bakterien** oder **Nitrifikanten** bezeichnet. Sie sind strikt aerob (Sauerstoff dient als Akzeptor der Ammonium bzw. Nitrit entzogenen Elektronen) und im Boden und in Gewässern weit verbreitet. In industriellen Abwasseranlagen bewirken bisher noch nicht eindeutig identifizierte Bakterien eine Ammoniumoxidation unter anaeroben Bedingungen (**Anammox-Prozess**, S. 582). Mit Nitrit als Elektronenakzeptor entsteht dabei molekularer Stickstoff.

Mikrobieller Stickstoffkreislauf: Beschreibung des Umsatzes von Stickstoffverbindungen durch Mikroorganismen; mit einem Wechsel des Redoxzustandes des Stickstoffes verbunden.
Stickstoffassimilation: Reaktionen zur Bereitstellung von Ammonium und zu dessen Einbau in Zellsubstanz.
Ammoniumassimilation: Einbau von Ammonium in organische Verbindungen über Aminierung und Transaminierung.
Assimilatorische Nitratreduktion: Reduktion von NO_3^- zu NH_4^+ zum Einbau in neues Zellmaterial; bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien; Katalyse durch lösliche Enzyme unabhängig von der An- oder Abwesenheit von O_2.
Dissimilatorische Nitratreduktion (Nitratatmung): Reduktion von NO_3^- zu NH_4^+ (Nitratammonifikation) oder zu N_2 (Denitrifikation) zur Energiekonservierung; bei chemoorganotrophen Bakterien; Katalyse durch membranständige Enzyme nur unter anoxischen Bedingungen.
Stickstofffixierung: Reduktion von N_2 zu NH_4^+ durch freilebende und symbiontische Stickstofffixierer; Katalyse durch den O_2-empfindlichen Nitrogenase-Enzymkomplex; erfolgt nur unter anoxischen Bedingungen.
Heterocysten: Auf die N_2-Fixierung spezialisierte, dickwandige Zellen fädiger Cyanobakterien; aufgrund des Fehlens von Photosystem II keine H_2O-Spaltung, keine O_2-Freisetzung.
Wurzelknöllchen: Strukturen an den Wurzeln von Leguminosen; beherbergen symbiotische, N_2-fixierende Bakterien in Form von Bacteroiden; Schutz des Nitrogenase-Enzymkomplexes vor O_2 und kontrollierte O_2-Versorgung der Bacteroiden durch von der Pflanze gebildetes Leghämoglobin.
Actinorrhiza: Wurzelknöllchen bei Erle, Sanddorn und Ölweide; Symbiosesystem mit Bakterien der Gattung *Frankia*.
Nitrifikation: Oxidation von NH_4^+ über NO_2^- zu NO_3^- durch nitrifizierende Bakterien; Ammoniumoxidierer (z. B. *Nitrosomonas*): Oxidation von NH_4^+ zu NO_2^-; Nitritoxidierer (z. B. *Nitrobacter*): Oxidation von NO_2^- zu NO_3^-.

11.2.3 Schwefelkreislauf

Schwefel (**S**) kommt in der Natur in verschiedenen Redoxstufen vor. Vollständig oxidiert ist der Schwefel im **Sulfation** (SO_4^{2-}, Redoxzustand +VI), das gelöst in den Weltmeeren vorliegt und in Form von **Calciumsulfat** ($CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$: Gips) das mengenmäßig wichtigste schwefelhaltige Mineral der Erdkruste bildet. Dort ist Schwefel noch in Form von **elementarem Schwefel** (S^0; Redoxzustand: 0), **Pyrit** (FeS_2; Redoxzustand: –I) und einer Vielzahl von **sulfidischen Mineralien** anzutreffen. Von letzteren werden viele vom Menschen als Erze zur Metallgewinnung genutzt. **Sulfidischer Schwefel** stellt die vollständig reduzierte Form des Schwefels dar (S^{2-}, Redoxzustand –II). Er kommt auch als gasförmiger, nur schlecht wasserlöslicher und faulig riechender **Schwefelwasserstoff** (H_2S) im Boden und in Gewässersedimenten vor. H_2S ist eine schwache Säure, liegt in wässriger Lösung abhängig vom pH-Wert daher auch als **Sulfid-** bzw. **Hydrogensulfidanion** (S_2^- bzw. HS^-) vor. In Anwesenheit von Eisen(II)ionen fällt schwerlösliches **Eisensulfid** (**FeS**) aus. Die Atmosphäre enthält Schwefelverbindungen in Form von **Schwefeldioxid** (SO_2; Redoxzustand: +IV, entsteht in erster Linie bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe), Schwefelwasserstoff (H_2S) und Dimethylsulfid ($H_3C\text{-}S\text{-}CH_3$, entsteht im Meer durch mikrobielle Aktivität aus dem von Algen als Osmoregulator gebildeten Dimethylsulfonium-Propionat). Reduzierte Schwefelverbindungen werden in der Atmosphäre oxidiert, die Produkte (Schwefeloxide) durch Niederschläge wieder in die Böden und Gewässer zurückgeführt (📖 *Ökologie, Evolution*).

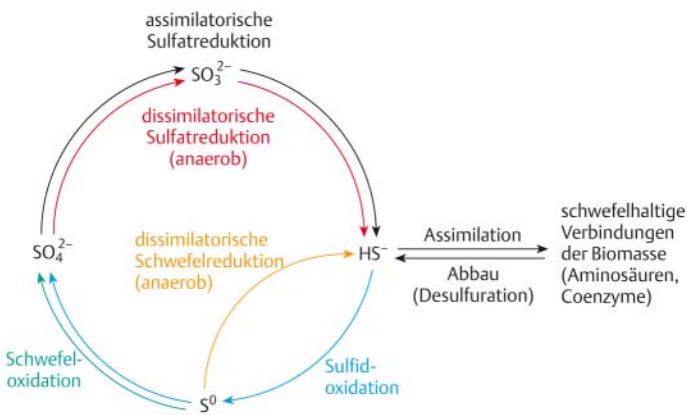


Abb. 11.**12** **Mikrobieller Schwefelkreislauf.** Schwefel wird in allen Organismen ausgehend von H_2S/HS^- in die Biomasse eingebaut und beim Abbau schwefelhaltiger Verbindungen auch wieder in Form von H_2S/HS^- freigesetzt. Bakterien und Pflanzen können sich auch über die Reduktion von Sulfat (assimilatorische SO_4^{2-}-Reduktion) mit H_2S/HS^- versorgen. Dissimilatorische Sulfat- bzw. Schwefelreduktion sowie die Sulfid- bzw. Schwefeloxidation werden von verschiedenen Bakterien zur Energiekonservierung genutzt.

Der Schwefel in der **Biomasse** liegt an organische Verbindungen gebunden vor und besitzt in der Regel den gleichen Redoxzustand wie in H_2S/HS^-. Beim **Abbau** von Biomasse wird Schwefel in Form von H_2S/HS^- freigesetzt und kann von Bakterien und Pflanzen auch direkt wieder in organische Verbindungen eingebaut werden. Da H_2S/HS^- jedoch giftig ist, bei Kontakt mit Luftsauerstoff schnell oxidiert wird und zudem ein begehrtes Substrat chemolithotropher Bakterien ist (s. u.), nutzen Bakterien und Pflanzen auch **Sulfat** als **Schwefelquelle**. Alle von einem Organismus katalysierten Reaktionsschritte, die der Bereitstellung von H_2S/HS^- und dessen Einbau in die Zellsubstanz dienen, werden unter dem Begriff **Schwefelassimilation** zusammengefasst. Der **mikrobielle Schwefelkreislauf** (Abb. 11.**12**) beschreibt den Umsatz der wichtigsten Schwefelverbindungen (H_2S/HS^-, S^0, SO_3^{2-}, SO_4^{2-}) durch Mikroorganismen. Er umfasst neben den Reaktionen der Schwefelassimilation auch reduktive und oxidative Prozesse, die von den Organismen zur **Energiekonservierung** genutzt werden. Häufig steht die katalytische Aktivität der Organismen in Konkurenz zu einfachen chemischen Reaktionen.

H_2S/HS^-: Einbau in und Freisetzung aus Biomasse

Die **H_2S/HS^--Assimilation** bei Bakterien und Pflanzen beruht auf der Bildung der Aminosäure **Cystein**. Sie entsteht aus Serin, wobei über das Enzym **Serintransacetylase** erst die Verbindung **O-Acetylserin** (OH-Gruppe an γ-C-Atom mit Essigsäure verestert) gebildet wird. Diese wird dann durch die **O-Acetyl-Seryl-Sulfurylase** mit H_2S/HS^- zu Cystein und Acetat umgesetzt. Die **Sulfhydrylgruppe** des Cysteins wird dann an die Vorstufen anderer schwefelhaltiger Verbindungen weitergegeben. Neben Cystein enthalten auch die Aminosäuren Methionin und Homocystein sowie verschiedene Coenzyme und prosthetische Gruppen von Enzymen (z. B. Coenzym A, Liponsäure, Biotin, Thiamin, Eisen-Schwefel-Zentren) Schwefel. Der Anteil des Schwefels an der pflanzlichen Biomasse beträgt etwa 0,5 bis 1 %, in der tierischen und mikrobiellen Biomasse liegt er aufgrund des höheren Proteingehalts mit bis zu 1,5 % etwas höher. Bei der **Mineralisation der Biomasse**, in erster Linie durch **Proteinabbau**, wird der Schwefel durch den Vorgang der **Desulfuration** wieder in Form von H_2S/HS^- freigesetzt.

Reduktion von Schwefelverbindungen

Bakterien, Pilze und Pflanzen können sich durch die Reduktion von Sulfat mit dem zur Synthese von Zellmaterial benötigten Schwefel versorgen. Diese **assimilatorische Sulfatreduktion** wird durch **lösliche Enzyme** im Cytoplasma der Zellen katalysiert und ist unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Sauerstoff. Die sulfidogenen Bakterien oder Desulfurikanten (S. 366), strikt anaerobe Bakterien, reduzieren Sulfat dagegen zur **Energiekonservierung** im Rahmen einer anaeroben Atmung. Diese **dissimilatorische Sulfatreduktion** wird durch **membranständige Enzyme** katalysiert und Sulfat ist hier der Akzeptor für Elektronen,

die bei der Oxidation verschiedener organischer Verbindungen (z. B. Acetat, Lactat oder auch molekularer Wasserstoff) anfallen.

Bei der assimilatorischen und dissimilatorischen Sulfatreduktion wird **Sulfit** als Zwischenprodukt und schließlich **H_2S/HS^-** als Endprodukt gebildet, wobei aus energetischen Gründen zunächst eine **Aktivierung des Sulfats** notwendig ist. Diese erfolgt durch Umsatz des Sulfats mit ATP zu **Adenosin-5′-Phosphosulfat** (**APS**; ATP-Sulfurylase, Bildung von PP_i), das bei der dissimilatorischen Sulfatreduktion und auch bei der assimilatorischen Sulfatreduktion vieler Bakterien direkt reduziert wird. Bei der assimilatorischen Sulfatreduktion der Pilze und auch einiger Bakterien (z. B. *E. coli*) wird APS mit Hilfe von ATP erst noch zu **Phosphoadenosinphosphosulfat** (**PAPS**) phosphoryliert (APS-Kinase) und erst dann reduziert.

Einige Sulfatreduzierer betreiben auch eine **dissimilatorische Schwefelreduktion** (**Schwefelatmung**), sie nutzen im Energiestoffwechsel neben Sulfat auch Schwefel als Elektronenakzeptor und reduzieren diesen zu H_2S/HS^-.

Der **Beitrag der dissimilatorischen Sulfatreduktion** zum gesamten Schwefelumsatz in der Natur überwiegt alle anderen Prozesse. Dort wo Sulfat unter anoxischen Bedingungen verfügbar ist, entsteht H_2S/HS^- hauptsächlich durch die Aktivität der sulfatreduzierenden Bakterien. In den gewöhnlich **sulfatreichen Meeressedimenten** (SO_4^{2-}-Konzentration des Salzwassers ca. 28 mM) verknüpfen die Sulfatreduzierer Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf, da sie durch Nutzung von Sulfat als Elektronenakzeptor die Gärungsprodukte chemoorganotropher Organismen vollständig zu CO_2 oxidieren können. In Bezug auf die von ihnen oxidierten organischen Verbindung weisen die Sulfatreduzierer ein breiteres Substratspektrum auf als die mit ihnen um diese Substrate konkurrierenden methanogenen Archaebakterien. An **sulfatarmen**, **anoxischen Standorten** (Süßwassersedimente, Sümpfe, Pansen der Wiederkäuer S. 438, Faulturm der Kläranlage S. 582) sind es dann jedoch diese methanogenen Archaebakterien, die mit der Methanbildung aus Acetat, Wasserstoff und CO_2 den Abbau organischer Verbindungen unter anoxischen Bedingungen abschließen.

11

Oxidation von Schwefelverbindungen

Die **Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen** wird von zwei Organismengruppen durchgeführt, den aeroben farblosen schwefeloxidierenden Bakterien und den anaeroben phototrophen Schwefelbakterien. Die **farblosen Sulfurikanten** (S. 391) sind **chemolithotrophe Organismen**, die verschiedene Schwefelverbindungen wie H_2S/HS^-, elementaren Schwefel, Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) oder Tetrathionat ($S_4O_6^{2-}$) zu Sulfat bzw. Schwefelsäure (H_2SO_4) oxidieren und dabei **O_2**, in einigen Fällen auch **Nitrat** (**NO_3^-**), als **Elektronenakzeptor** einsetzen. Die Redoxreaktion wird von den Bakterien zur **Energiekonservierung** genutzt.

Farblose Sulfurikanten sind in diversen **Lebensräumen** anzutreffen. Extrem **acidophile Arten** (z. B. *Acidithiobacillus thiooxidans*) leben in Wasser und Boden und auch direkt auf sulfidhaltigem Gestein. Sie bilden große Mengen Schwefelsäure. Verschiedene **neutrophile Arten** (z. B. *Beggiatoa*) leben an der Oberfläche von Süß- und Salzwassersedimenten und bilden dort ausgedehnte Matten. Sie oxidieren das aus den anaeroben Sedimenten aufsteigende, von Sulfatreduzierern gebildete H_2S/HS^- mit Nitrat als Elektronen-

akzeptor. Zu dieser Gruppe von Organismen gehört auch *Thiomargarita namibiensis* (Schwefelperle Namibias), mit einem Durchmesser von über 500 µm das größte derzeit bekannte Bakterium. Die außergewöhnliche Größe geht auf die zentrale Vakuole zurück, in der große Mengen des Elektronenakzeptors Nitrat gespeichert sind. Der Speicher erlaubt es dem Bakterium, lange Zeit ohne Nachschub von Nitrat zu überleben. Weitere bekannte neutrophile und Nitrat-reduzierende Sulfurikanten sind *Thiobacillus denitrificans* und *Paracoccus denitrificans*. An heißen vulkanischen Quellen sind extrem **thermophile**, schwefeloxidierende Archaebakterien (z. B. *Sulfolobus acidocaldarius*) anzutreffen. Sie oxidieren den Schwefel, der durch Oxidation von an der Quelle austretendem H_2S mit Luftsauerstoff entsteht und der rund um eine solche Quelle ausfällt.

Die Stoffwechselaktivität der farblosen Sulfurikanten kann drastische **Folgen für die Umwelt** haben. Durch das Zusammenwirken von Sulfidoxidation (durch Sulfurikanten), der Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) (durch eisenoxidierende Bakterien, S. 392) und abiotisch erfolgende Redoxreaktionen können aus schwerlöslichen Metallsulfiden gut wasserlösliche Metallsulfate entstehen. Beim **Bergbau** hat dies die **Mobilisierung von Schwermetallen** und die **Ansäuerung des Grubenwassers** zur Folge. Allerdings wird die Stoffwechselaktivität der farblosen Sulfurikanten auch vom Menschen ausgenutzt, um Edelmetalle wie Kupfer, Uran, Zink, Nickel, Molybdän und Gold aus erzarmem Gestein zu gewinnen (**mikrobielle Erzlaugung** oder **Bioleaching**). Die **Korrosion von Betonabwasserrohren**, die nur teilweise mit Abwasser gefüllt sind, basiert auf der Bildung von H_2S/HS^- durch anaeroben Proteinabbau und Sulfatreduzierer und der mit der Bildung von Schwefelsäure verbundenen, erneuten Oxidation des H_2S/HS^- durch Sulfurikanten an dem Luftraum zugewandten Flächen.

Die **phototrophen Schwefelbakterien**, d. h. die **Schwefelpurpurbakterien** (Chromatiaceae, S. 341) und die **Grünen Schwefelbakterien** (Chlorobiaceae, S. 343), sind anaerob und benötigen reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronenquelle. Sie nutzen die Energie des Lichts, um $NADP^+$, eine Verbindung mit niedrigem Redoxpotential, mit Hilfe von **H_2S/HS^- als Elektronendonor**, einer Verbindung mit deutlich höherem Redxpotential, reduzieren zu können. Das NADPH wird von den autotrophen Bakterien zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für reduktive Reaktionen des Baustoffwechsels benötigt. Bei der Sulfidoxidation anfallender Schwefel wird entweder intrazellulär (Chromatiaceae) oder extrazellulär (Chlorobiaceae) abgelagert. Bei Mangel des Elektronendonors H_2S/HS^- können die Chromatiaceae auch den gespeicherten Schwefel als Donor nutzen, sodass Sulfat entsteht.

Der **Lebensraum** der phototrophen Schwefelbakterien sind belichtete, anoxische Gewässerbereiche (Süß- und Salzwasser), oberhalb von Sedimentschichten. In diesen Schichten angesiedelte Sulfatreduzierer liefern den Schwefelwasserstoff, der von den phototrophen Schwefelbakterien benötigt wird.

Mikrobieller Schwefelkreislauf: Beschreibung des Umsatzes von Schwefelverbindungen durch Mikroorganismen; meist mit einem Wechsel des Redoxzustandes des Schwefels verbunden.
Schwefelassimilation: Reaktionen zur Bereitstellung von H_2S/HS^- und zu dessen Einbau in Zellsubstanz.

H_2S/HS^--Assimilation: Einbau von H_2S/HS^- in organische Verbindungen; bei Pflanzen und Bakterien durch Synthese von Cystein.
Desulfuration: Freisetzung von H_2S/HS^- aus organischen Verbindungen.
Assimilatorische Sulfatreduktion: Reduktion von SO_4^{2-} zu H_2S/HS^- zum Einbau in neues Zellmaterial; bei Bakterien und Pflanzen; Katalyse durch lösliche Enzyme unabhängig von der An- oder Abwesenheit von O_2; Aktivierung von SO_4^{2-} durch Bildung von Adenosin-5′-Phosphosulfat (APS) und Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS).
Dissimilatorische Sulfat- bzw. Schwefelreduktion: = Sulfat- bzw. Schwefelatmung; Reduktion von SO_4^{2-} zu H_2S/HS^-; von Sulfurikanten (sulfidogene Bakterien) zur Energiekonservierung durchgeführt; Katalyse durch membranständige Enzyme nur unter anoxischen Bedingungen; Aktivierung von SO_4^{2-} durch Bildung von Adenosin-5′-Phosphosulfat (APS).
Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen: 1. Farblose Schwefelbakterien: chemolithotrophe Bakterien, die Schwefelverbindungen mit O_2 als Elektronenakzeptor zur Energiekonservierung oxidieren. 2. Phototrophe Schwefelbakterien: Nutzung der Schwefelverbindungen als Elektronendonor zur $NADP^+$-Reduktion.

11

11.2.4 Phosphorkreislauf

Phosphor liegt in der Natur praktisch ausschließlich als **Phosphat** (PO_4^{3-}; Redoxstufe: +V) vor und wird auch durch Lebewesen weder oxidiert noch reduziert. Der **mikrobielle Phosphorkreislauf** umfasst daher im Prinzip nur den Einbau von Phosphat in organische Verbindungen und dessen Freisetzung im Zuge der Mineralisation. In der **Biomasse**, die etwa 0,5 % Phosphat enthält, liegt Phosphat als **Phosphorsäureester** an organische Verbindungen gebunden vor. Primär wird das Phosphat im Energiestoffwechsel aller Organismen durch Substratstufen- bzw. Elektronentransportphosphorylierung an ADP gebunden. Das dabei entstehende **ATP** dient als **Phosphatgruppendonor** zur Synthese anderer phosphathaltiger Verbindungen, wie Nucleotide und Phospholipide. **Phytin**, der Hexaphosphorsäureester des Inositols (Cyclohexanhexol, zyklischer sechswertiger Alkohol), wird von Pflanzen gebildet und dient als **Speicher** für Phosphat und **verschiedene Kationen** (Calcium, Magnesium, Eisen, Zink), die an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Phytins gebunden sind.

Voraussetzung für die **Phosphatassimilation**, zu der alle Organismen befähigt sind, ist die Verfügbarkeit von freiem, löslichen Phosphat, sogenanntem **Orthophosphat**. Im Boden ist Phosphat jedoch durch organische Bindung (in Humus und Phytin), durch Adsorption an Aluminium- und Eisenoxide sowie Tonmineralien und durch Ausfällung von Apatiten (z. B. $Ca_5(PO_4)_3OH$, Hydroxylapatit) und Calciumphosphat ($Ca_3(PO_4)_2$) in der Regel vollständig immobilisiert. Die **Mobilisierung** des Phosphats erfolgt durch Mikroorganismen, die **extrazelluläre Phosphatasen** bilden oder Phosphate durch ausgeschiedene **organische Säuren** (z. B. Citronensäure oder Oxalsäure) lösen. Säureausscheidende Mikroorganismen sind z. B. Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Bacillus* und frei lebende Pilze

der Gattung *Aspergillus*. Phosphat wird auch von **Mykorrhizapilzen** mobilisiert, die in Symbiose mit Pflanzen leben und deren Wurzelzellen Phosphat zuführen.

Phosphathaltige Mineraldünger, die zur Steigerung des Pflanzenwachstums auf Feldern ausgebracht werden, enthalten gut wasserlösliches **Superphosphat** (Calciumdihydrogenphosphat: $Ca(H_2PO_4)_2$). Gelangt dies durch Auswaschung in Gewässer, so führt es dort zu einer **Eutrophierung**, d. h. der ursprünglich nährstoffarme Zustand des Gewässers wird aufgehoben, und es kommt zu einer Steigerung der Biomasseproduktion durch phototrophe Organismen (Wasserblüte, häufig N_2-fixierende Cyanobakterien). Die **Phosphateliminierung** aus Abwässern ist genauso wie die Stickstoff-Eliminierung eine der Hauptaufgaben der **Abwasserreinigung** und dient dazu, Gewässereutrophierung durch die Einleitung phosphathaltigen Abwassers (Phosphate aus Waschmitteln und Nahrungsmitteln) zu vermeiden. Die Phosphateliminierung kann **chemisch** durch Ausfällung mit Eisen- und Aluminiumsalzen oder **biologisch** durch den Einsatz von Polyphosphat-speichernden Bakterien erfolgen. ◀

Mikrobieller Phosphorkreislauf: Beschreibung des (mikrobiellen) Umsatzes von anorganischem Phosphat und organisch gebundenem Phosphat; nicht mit einem Wechsel des Redoxzustands des Phosphoratoms verbunden.
Orthophosphat: Assimilierbares gelöstes Phosphat.
Phosphatassimilation: Einbau von Phosphat in organische Verbindungen; erster Schritt ist Synthese von ATP aus ADP und Orthophosphat.
Phytin: Hexaphosphorsäureester des Inositols, von Pflanzen gebildete Verbindung zur Speicherung von Phosphat und verschiedener Kationen.
Immobilisiertes Phosphat: In Humus und Phytin organisch gebundenes Phosphat; an Aluminium- und Eisenoxide sowie Tonmineralien adsorbiertes Phosphat; in Form von Apatiten (z. B. $Ca_5(PO_4)_3OH$, Hydroxylapatit) und Calciumphosphat ($Ca_3(PO_4)_2$) ausgefälltes Phosphat.
Phosphatmobilisierung: Freisetzung von assimilierbarem Orthophosphat aus immobilisierten Phosphaten durch Bakterien oder Pilze, die Phosphatasen oder organische Säuren ausscheiden.
Superphosphat $Ca(H_2PO_4)_2$: Als Dünger eingesetztes, gut wasserlösliches Phosphat.
Phosphateliminierung: Entfernung von Phosphaten aus Abwasser über Ausfällung von Eisen- und Aluminiumsalzen oder durch Polyphosphat-speichernde Bakterien.

11.3 Mikrobielle Besiedelung des Menschen

Die **Besiedelung des gesunden Menschen,** die **Normalflora** oder **physiologische Mikroflora,** besteht aus apathogenen Mikroorganismen. Die Normalflora wird für zahlreiche Stoffwechselprozesse des Wirtsorganismus benötigt und verursacht nur bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen Mikroorganismen und Makroorganismus **endogene Infektionen**.

Pathogene Mikroorganismen kommen in der Regel von außen und verursachen **exogene Infektionen**, die sich als **Infektionskrankheit** manifestieren können. Sie besitzen **Pathogenitätsfaktoren**, durch die zelluläre Prozesse im Wirtsorganismus und dadurch seine normalen Lebensfunktionen beeinträchtigt werden können. Die **Übertragung** der Krankheitserreger erfolgt entweder **direkt** durch einen anderen Wirt oder **indirekt** durch verschiedene Vektoren. Infektionskrankheiten des Menschen können durch Pilze, Protozoen, Bakterien oder Viren verursacht werden. Der **Infektionsschutz** umfasst verschiedene Methoden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsablaufes ansetzen: Hygienemaßnahmen und Quarantäne verhindern die Erregerausbreitung in der Umwelt, Schutzimpfungen wirken der Vermehrung im Wirtsorganismus entgegen. Für die Therapie stehen **Chemotherapeutika** zur Verfügung, die auf den jeweiligen Erregertyp abgestimmt sind. Mögliche Nebenwirkungen und die Entstehung und Ausbreitung von **Resistenzen** stellen ein beträchtliches Problem dar. Im **Infektionsschutzgesetz** sind alle gesetzlichen Regelungen zum Umgang mit Infektionskrankheiten zusammengefasst.

11

11.3.1 Die Normalflora des Menschen

Abhängig von Alter, Geschlecht, Ernährungs- und Gesundheitszustand sind die verschiedenen Bereiche des **gesunden menschlichen Körpers** mikrobiell besiedelt. Diese **Normalflora** oder **physiologische Mikroflora** setzt sich aus Bakterien, Pilzen und Protozoen zusammen und besteht aus der für einen bestimmten Körperbereich charakteristischen **residenten Standortflora** und der aufgrund von kurzzeitig veränderten Bedingungen nur vorübergehend vorhandenen **transienten Flora**. Unter veränderten Bedingungen kann die entstandene transiente Flora sich langfristig ansiedeln und so zur residenten Standortflora werden. Besiedelungsdichte und Zusammensetzung der Mikroflora sind je nach Körperregion sehr unterschiedlich (Tab. 11.**3**).

Die physiologische Mikroflora stellt für den Wirtsorganismus einen **Schutz vor der Ansiedelung von Krankheitserregern** dar, denn sie konkurriert mit von außen kommenden Mikroorganismen um Nahrung und Rezeptoren der Wirtszellen. Verstärkt wird diese Schutzwirkung durch die Produktion von Bacteriocinen, die Schaffung ungünstiger Lebensbedingungen für fremde Mikroorganismen (z. B. durch Säurebildung) und die permanente Stimulierung des Immunsystems durch die residente Standortflora. Die Normalflora kann **endogene Infektionen** (= von innen kommende) verursachen, wenn Mikroorganismen durch Verletzungen in normalerweise sterile Körperbereiche gelangen. Auch eine krankheitsbedingte Schwächung der Immunabwehr des Wirtes oder die Einnahme von Immunsuppressiva kann Auslöser einer endogenen Infektion sein, ebenso die Dezimierung der Standortflora durch eine breit wirkende Anti-

Tab. 11.3 **Physiologische Mikroflora des Menschen.**

Körperregion	*Keimzahl*	*Mikroorganismen*	*Wirkung*
Haut	10^3–10^6 pro cm^2	*Staphylococcus, Micrococcus, Brevibacterium, Acinetobacter, Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes,* Hefen	Säureschutzmantel pH ca. 5–6
Mundhöhle	bis 10^9 pro ml	Streptokokken, *Neisseria*, *Moraxella*, *Haemophilus*, Lactobacillen, Enterokokken, Pseudomonaden, Hefen, auch *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* möglich, viele anaerobe Arten, z. B. *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium* u. a.	Förderung der Kariesentstehung bei zuckerhaltiger Ernährung, insbesondere durch *Streptococcus mutans, S. sanguis, S. mitis, Actinomyces viscosus* (S. 40)
Speiseröhre u. Magen	$<$ 10 bis max. 10^3 pro ml	vor allem transiente Keime der Mundhöhlenflora und speziell angepasste Bakterien wie *Helicobacter pylori*	*H. pylori* kann Gastritis und Magengeschwüre auslösen
Dünndarm	Duodenum: 10^3 pro ml Ileum: bis 10^9 pro ml	Lactobacillen, Streptokokken, Clostridien, *Fusobacterium*, Enterokokken, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Enterobacteriaceae*, *Candida*-Hefen, Protozoen	Vitaminsynthese, Entgiftung von Toxinen, Senkung des pH-Wertes und des Redoxpotentials, Cholesterinabbau, Aktivierung bzw. Inaktivierung von Arzneistoffen, Förderung der Darmperistaltik, Immunstimulation
Dickdarm	bis 10^{12} pro g	*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, Fusobakterien, Eubakterien, Bifidobakterien, Streptokokken, Peptostreptokokken, *E. coli* und andere Enterobacteriaceae, Enterokokken, Lactobacillen, Clostridien, Staphylokokken, Pseudomonaden, Hefen, Protozoen	wie Dünndarm
Harnröhre	10^2–10^4 pro ml Erststrahlurin	Hautflora aus der Umgebung, außerdem Streptokokken, Enterokokken, Mycoplasmen, Ureoplasmen	Aufsteigen der Keime kann Harnwegsinfektionen verursachen
Vagina	10^5–10^9 pro ml Sekret	Lactobacillen, Streptokokken, verschiedene Anaerobier, vor der Pubertät und nach der Menopause Mikroorganismen der Haut- und Dickdarmflora	Säureschutz, Haut- und Dickdarmkeime können zu Infektionen führen (z. B. Hefen)

biotikatherapie. Man unterscheidet diese **opportunistischen** oder **fakultativen** Mikroorganismen, die nur unter besonderen Bedingungen zu einer Erkrankung führen, von den **obligat pathogenen**, die stets typische pathogene Eigenschaften besitzen und nicht zur Normalflora gehören (S. 530).

Die **mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten** im Darm des Menschen haben unterschiedliche Auswirkungen. Die Bildung von Gasen und Säuren durch die Darmflora verstärkt die **Peristaltik des Darms** und sorgt so für eine Förderung der Verdauungsprozesse und eine schnelle Eliminierung von Fremdkeimen, die nicht an Rezeptoren angeheftet sind. Die **Hydrolyse von Nahrungsbestandteilen** durch mikrobielle Enzyme, vor allem Poly- und Disaccharide, die vom menschlichen Verdauungssystem nicht abgebaut werden können, liefert Abbauprodukte, die z. T. resorbiert werden. Die **Vitamine** B_{12}, K, Folsäure, Pyridoxal, Riboflavin, Pantothensäure oder Biotin werden durch bakterielle Mitglieder der Darmflora synthetisiert, z. B. Vitamin K durch *E. coli*. Bakterielle Enzyme sorgen für die **Entgiftung von Schadstoffen** und die **Aktivierung medizinischer Wirkstoffe**, beispielsweise wird das Herzglykosid Digoxin aus *Digitalis lanata* (Fingerhut) durch Bakterien der Darmflora in die aktive Form Digoxigenin umgewandelt. Das hohe Angebot an Lactose führt dazu, dass die Darmflora von Säuglingen, die ausschließlich mit Muttermilch ernährt werden, nahezu vollständig aus ***Bifidobacterium*** besteht. Anders als homo- und heterofermentative Milchsäurebakterien vergärt *Bifidobacterium* die Lactose der Muttermilch zu Milchsäure und Essigsäure (S. 82, S. 377). Die Dominanz der Bifidobakterien im Darm von gestillten Säuglingen wirkt als **Infektionsschutz**. Mithilfe von **probiotischen Lebensmitteln** sollen erwünschte Mikroorganismen im Verdauungstrakt angesiedelt werden.

Andererseits kommt es durch mikrobielle Aktivitäten auch zur **Bildung von Kanzerogenen** (krebserregenden Verbindungen) und **toxischen Substanzen** aus Nahrungsbestandteilen. Beispielsweise ist die potentielle Gefährlichkeit sehr hoher Nitratkonzentrationen im Trinkwasser darauf zurückzuführen, dass Nitrat durch Darmbakterien zu Nitrit reduziert wird, das als Oxidationsmittel für Hämoglobin wirkt. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung von Methämoglobin im Blut, in dem das Eisen oxidiert als Fe^{3+} vorliegt. Methämoglobin gibt den gebundenen Sauerstoff nur schlecht wieder ab, sodass es zu einem insbesondere für Säuglinge lebensbedrohenden Sauerstoffmangel in den Organen kommen kann (**Methämoglobinämie**). Durch Reaktion mit Aminosäuren, Amiden und Aminen, die beim Abbau proteinreicher Lebensmittel gebildet werden, können aus Nitrit **kanzerogene Nitrosamine** entstehen. ◀

11

Physiologische Mikroflora (Normalflora): Besiedelung eines gesunden Körpers mit Mikroorganismen.
Residente Standortflora: In einer Körperregion ständig vorhandene Mikroflora.
Transiente Flora (Anflugkeime): In einer Körperregion nur vorübergehend anwesende Flora, kann unter bestimmten Umständen zu residenter Standortflora werden.

Säureschutzmantel: Absenkung des pH-Wertes von Körperregionen auf 5–6 durch mikrobielle Säurebildung. Schutz vor der Ansiedlung pathogener Keime (Haut, Vagina, Darm gestillter Säuglinge).
endogene Infektionen: Werden unter bestimmten Bedingungen ausgelöst durch Mikroorganismen aus der Normalflora.
opportunistische (fakultative) Krankheitserreger: Mikroorganismen der Normalflora, die Krankheiten verursachen.

11.3.2 Pathogene Mikroorganismen

Pathogene Mikroorganismen besitzen spezielle **Pathogenitätsfaktoren** (**Virulenzfaktoren**), die die Besiedelung eines Wirtes und die Vermehrung innerhalb des Wirtsorganismus ermöglichen. Die Gene für diese speziellen Fähigkeiten sind Genom-, Plasmid- oder Phagen-codiert; Plasmide oder Phagen können stabil ins Genom integriert werden oder wieder verloren gehen, was zum Verlust der Pathogenität führt. Zu den Pathogenitätsfaktoren gehören Mechanismen zur **Adhäsion** an die Zielzellen und ihre nachfolgende **Besiedelung**, z. B. die **Fimbrien** oder **Pili** bei *Neisseria gonorrhoeae*, dem Erreger der Gonorrhoe, oder bei *E. coli*-Stämmen, die für Harnwegsinfektionen verantwortlich sind (Abb. 11.**13**).

Auch der Besitz einer **Kapsel** aus Polysacchariden stellt bei Bakterien einen Pathogenitätsfaktor dar, sie bietet **Schutz** vor der sofortigen Phagocytose durch die Immunabwehr des Wirtes, da die Kapsel die auf der Zellwand befindlichen Antigene maskiert und so die Erkennung durch die Abwehrzellen erschwert. Erst wenn Antikörper gegen Kapselbestandteile (s. u.) an die Kapsel binden und diese so für die Phagocyten erkennbar machen, werden bekapselte Bakterien phagocytiert. Diese **Zeitverzögerung** ermöglicht den Bakterien eine erste ungehinderte Vermehrung.

▶ **Poly-γ-D-Glutamat** (**PGA**) ist ein saures **Polyamid**, das im Gegensatz zu Zellproteinen aus **D-Glutamat**-Monomeren anstelle von L-Glutamat besteht und von verschiedenen *Bacillus*- oder *Staphylococcus*-Arten produziert und sezerniert wird. Die Synthese von Poly-γ-D-Glutamat startet mit L-Glutamat, das vor der Polymerisation jedoch zu D-Glutamat isomerisiert wird. Die PGA-Schicht bildet eine Kapsel um die Bakterienzelle, die z. B. den Milzbranderreger *Bacillus anthracis* vor der Erkennung durch das Immunsystem schützt. Um diesen Schutzmechanismus auszuhebeln, enthält ein neuer Milzbrand-Impfstoff aus den USA neben anderen Komponenten auch PGA-Fragmente zur Sensibilisierung des Immunsystems gegen die Kapselbestandteile von *B. anthracis*. Wenn der normalerweise harmlose Hautbewohner *Staphylococcus epidermidis* über Wunden oder Implantate in den menschlichen Organismus gelangt, kommt es häufig zu chronischen Infektionen. Da für das Überleben der Bakterien im Wirtsorganismus die PGA-Kapsel essentiell ist, wäre die präventive oder therapeutische Anwendung von gegen PGA gerichteten Wirkstoffen erfolgversprechend. ◀

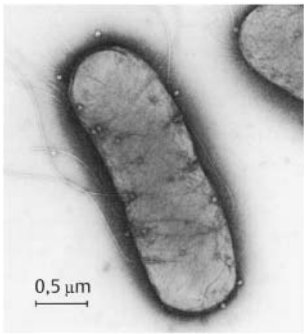


Abb. 11.**13** ***E. coli*.** Neben zahlreichen langen Geißeln, die peritrich angeordnet sind, besitzen die abgebildeten Zellen von *E. coli* auch kurze, sehr viel feinere Fortsätze, die Fimbrien (hier mit Lambda-Viren). (EM-Aufnahme von B. Menge, K. G. Lickfeld, Basel, aus Hirsch-Kauffmann, Thieme 2004)

Ein Pathogenitätsfaktor ist auch die Produktion zellschädigender **Enzyme** für die Ausbreitung im Wirtsorganismus. Beispielsweise verursachen **Proteasen** und **Kollagenasen** bei einer Wundinfektion mit dem Gasbranderreger *Clostridium perfringens* Nekrosen in tiefer liegenden Gewebeschichten. Manche Erreger nutzen auch Abwehrmaßnahmen des Wirtes für ihre Ausbreitung von Zelle zu Zelle, z. B. *Listeria monocytogenes*.

11

Nach Adhäsion an die Wirtszelle produziert *L. monocytogenes* ein Protein, das die Wirtszelle (Makrophagen, Phagozyten, Darmepithelzellen) zur Phagocytose des Bakteriums anregt. Im Rahmen der Abwehrmechanismen der Wirtszelle fusioniert die dabei entstehende Phagocytosevakuole mit einem Lysosom, um die Verdauung des Fremdkörpers einzuleiten. Durch die bei der Fusion eintretende Ansäuerung wird jedoch das **Listeriolysin O** des Bakteriums aktiviert, das nachfolgend die Vakuolenmembran perforiert, sodass *L. monocytogenes* ins Cytoplasma der Wirtszelle entkommen kann. Dort vermehren sich die Bakterien und induzieren die Kondensation von Actinfilamenten an einem Zellpol. Mithilfe dieses Actinbündels werden die Bakterien anschließend in die Nachbarzelle transferiert.

Neben Enzymen bilden viele pathogene Bakterien **Toxine**. **Exotoxine** werden von den Bakterien sezerniert und gelangen über die Blutbahn oder Nervenbahnen in Gewebe und Organe, die vom Vermehrungsort der Bakterien weit entfernt sind. Häufig sind es vorwiegend diese Exotoxine, die den Verlauf einer Krankheit bestimmen (z. B. bei Cholera, Tetanus). **Endotoxine** sind die **Lipopolysaccharide** der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, die größtenteils erst bei der Lyse der Bakterienzellen freiwerden. Sie wirken als Antigene und rufen beim Wirt eine starke Immunreaktion hervor (S. 35, S. 439).

Viele Bakterien benötigen eine **Eisenkonzentration** zwischen 0,4 und 4 µM für ihre Vermehrung. Auch die Ausprägung bestimmter Pathogenitätsfaktoren hängt von der Verfügbarkeit dreiwertiger Eisenionen ab. Da das im Serum und in Sekreten vorhandene Eisen zum größten Teil durch spezielle Eisen-Bindungsproteine des Wirtes (Transferrin und Lactoferrin) gebunden ist, besitzen viele pathogene Bakterien **Siderophore**, die Eisen mit deutlich höherer Affinität binden als

Tab. 11.**4** **Wachstumstypen pathogener Mikroorganismen.**

Gruppe	*Wachstum im Wirt*	*Besonderheit*	*Beispiel*
Eitererreger	extrazellulär	lokale oder systemische eitrige Infektion	*Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus* *Escherichia coli, Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis, Haemophilus influenzae*
Toxinbildner	extrazellulär	Organschäden durch Toxinwirkung	*Vibrio cholerae, Clostridium tetani* *C. botulinum, C. perfringens, Corynebacterium diphtheriae, Bordetella pertussis, Pseudomonas aeruginosa*
intrazelluläre Mikroorganismen	obligat oder fakultativ intrazellulär	werden nur durch zelluläre Immunabwehr bekämpft	*Mycobacterium tuberculosis, M. leprae, Listeria monocytogenes, Legionella pneumophila, Salmonella typhi, S. paratyphi, Yersinia spp., Chlamydia ssp., Rickettsia ssp., Toxoplasma gondii,* alle Viren

die konkurrierenden Systeme des Wirtsorganismus. Siderophore werden von den Bakterien sezerniert und **binden Fe^{3+}** außerhalb der Zelle. Anschließend werden die mit Eisen beladenen Siderophore über spezielle Transportproteine in die Bakterienzelle zurückgeschleust, wo sie das Eisen wieder abgeben. Chemisch handelt es sich bei den Siderophoren um **Komplexbildner**, die sich bei verschiedenen Bakterienarten unterscheiden (S. 259). Auf diese Weise können pathogene Bakterien auch gegen die Konkurrenz der Wirtszellen ihren hohen Eisenbedarf decken.

Die Aufnahme pathogener Mikroorganismen über eine erregertypische **Eintrittspforte**, meist Schleimhäute oder Hautverletzungen, und die Fähigkeit, sich im Wirtsorganismus zu vermehren, führen beim Wirt zu einer Infektion. Die Vermehrung im Wirt erfolgt erregertypisch extrazellulär oder intrazellulär (Tab. 11.**4**). Manchmal findet im Verlauf der Krankheit auch ein Wechsel zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Wachstum statt, z. B. wächst *Neisseria gonorrhoeae* in der akuten Phase extrazellulär, bei chronischem Verlauf jedoch intrazellulär.

exogene Infektionen: Werden ausgelöst durch Mikroorganismen aus der Umwelt.
Krankheitserreger: Mikroorganismen aus der Umwelt, die Pathogenitätsfaktoren besitzen.
Pathogenitätsfaktoren (Virulenzfaktoren): Charakteristische Eigenschaften pathogener Mikroorganismen. Adhäsion, Kapsel, Fähigkeit zur Vermehrung im Wirt, Produktion von Enzymen und Toxinen, Eisenbindungssysteme.
Eintrittspforte: Eintrittsstelle für Krankheitserreger in den Organismus, Schleimhäute oder Hautverletzungen.

Exotoxine: Werden von den Bakterien sezerniert und gelangen selbstständig zu ihren Zielzellen.
Endotoxine: Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien (Lipopolysaccharide), wirken als starke Antigene.
Eisenbindungssysteme bei pathogenen Bakterien: Siderophore, die Fe^{3+} binden und in die Bakterienzelle transportieren.

11.3.3 Übertragungswege

Infektionskrankheiten können direkt oder indirekt übertragen werden. Dabei erfolgt die Übertragung von Mensch zu Mensch oder bei einigen tierischen Erregern, die auch humanpathogen sind, über Tiere auf Menschen. Bekannte Beispiele sind das Tollwutvirus oder *Yersinia pestis* (Pest). Eine **direkte Übertragung** erfolgt durch erkrankte Menschen oder Tiere über **Kontakt-** oder **Tröpfcheninfektion**, eine **indirekte** über verschiedene **Vektoren**. Vektoren sind häufig blutsaugende Arthropoden, die durch ihren Biss oder Stich Krankheitserreger wie Plasmodien (Malaria) oder das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) in die Blutbahn einbringen. Infektionen wie Ruhr, Typhus oder Cholera werden meist durch **kontaminiertes Trinkwasser** oder **Lebensmittel** verbreitet. Hier erfolgt die Infektion wie bei der Übertragung durch blutsaugende Arthropoden indirekt, da in beiden Fällen kein Kontakt zwischen dem Infektionsträger und dem neu Infizierten erforderlich ist. **Sporen** (*Clostridium, Bacillus*) und **Zysten** (z. B. *Entamoeba histolytica)* werden auch durch **Gegenstände**, **Erde**, **Staub** oder **Luft** verbreitet. Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind die **vertikale** (**diaplazentare**) **Infektion** eines Feten über die Plazenta, z. B. bei Röteln, oder die **iatrogene Infektion** bei medizinischen Maßnahmen, z. B. über unsterile Instrumente.

Art der Krankheitsübertragung:
- **direkt:** durch Kontakt- oder Tröpfcheninfektion,
- **indirekt:** durch Vektoren,
- **vertikal (diaplazentar):** Infektion des Feten über die Plazenta,
- **iatrogen:** Infektion durch medizinische Maßnahmen,
- **Vektoren:** Vehikel, die Krankheitserreger zwischen Warmblütern transportieren; blutsaugende Arthropoden (z. B. bei Malaria), Wasser, Lebensmittel, Erde, Luft, kontaminierte Gegenstände.

11.3.4 Infektionskrankheiten des Menschen

Gelingt dem Mikroorganismus nach der Infektion eine ausreichende Vermehrung und die Invasion weiterer Körperregionen, kann sich beim Wirtsorganismus eine **Infektionskrankheit** manifestieren, die **lokal** begrenzt oder nach Ausbreitung der Erreger über das Blut- und Lymphsystem **generalisiert** sein kann. Bei einem **manifesten** Krankheitsverlauf entwickeln sich sichtbare Krankheitssymp-

tome, eine **inapparente** Infektion verläuft symptomlos, aber es sind Antikörper nachweisbar. Die erregertypische **Inkubationszeit** ist der Zeitraum zwischen Erregeraufnahme und dem Auftreten der ersten Symptome, die Weitergabe der Erreger kann allerdings schon einige Tage vor den ersten Krankheitszeichen stattfinden. Die regionale Ausbreitung von Infektionskrankheiten ist unterschiedlich: Eine **Endemie** ist in bestimmten Gebieten ständig vorhanden wie beispielsweise die Malaria in großen Teilen Afrikas, die Zahl der Neuerkrankungen bleibt dabei auf einem annähernd konstanten Niveau. Als **Epidemie** wird der plötzliche Ausbruch einer Infektionskrankheit in einem lokal begrenzten Gebiet mit starkem Anstieg der Erkrankungszahlen und allmählichem Rückgang bezeichnet. Setzt eine Epidemie sich wellenartig in weitere Gebiete fort und durchquert dabei zahlreiche Länder, spricht man von einer **Pandemie**. Historische Beispiele sind die Pestzüge im Mittelalter oder die weltweite Ausbreitung der spanischen Grippe (Influenza) im Winter 1918/19 mit geschätzten 20 bis 40 Millionen Todesfällen. Der prozentuale Anteil der an einer Krankheit Verstorbenen, die **Letalität**, ist ein Maß für die Gefährlichkeit eines Erregers.

Humanpathogene Arten gibt es sowohl unter Pilzen (Kap. 5), Protozoen (📖*Zoologie*) und Bakterien (S. 8 und S. 70) als auch bei Viren (Kap. 4). Dabei scheint die **Virulenz** eines Erregers sowohl vom Übertragungsweg als auch von der Umweltresistenz beeinflusst zu werden.

Untersuchungen haben gezeigt, dass wenig umweltresistente Krankheitserreger wie Schnupfenviren, die auf eine rasche, direkte Weitergabe von Mensch zu Mensch angewiesen sind, ihren Wirt meist nur geringfügig beeinträchtigen ohne ihn völlig zu immobilisieren. Dagegen zeigen Krankheiten, die indirekt über blutsaugende Insekten oder Wasser verbreitet werden, häufiger schwere bis letale Verläufe. Auch Infektionskrankheiten, die von besonders umweltresistenten Keimen verursacht werden, die längere Zeit außerhalb eines Wirtes überleben können, verlaufen eher schwerwiegend. Diese Erreger sind für ihr Überleben nicht in dem Maße von einer schnellen Weitergabe und damit von der Mobilität ihres Wirtes abhängig wie ein empfindlicher Mikroorganismus. Da insbesondere Lebensmittel- und Trinkwasserhygiene Übertragungswege und Übertragungsgeschwindigkeit von Krankheitserregern beeinflussen, kann der Hygienestandard zur Selektion einer stark oder schwach virulenten Erregervariante aus der Gesamtheit einer Population beitragen.

Pilzkrankheiten

Erreger von **Pilzerkrankungen** beim Menschen sind vor allem Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze. Voraussetzung für die Ausprägung eines manifesten Krankheitsbildes ist meist eine geschwächte Immunabwehr des Wirtes. **Dermatophyten** verursachen oberflächliche Mykosen an Haut, Nägeln und Haaren, sie besitzen die Fähigkeit zur **Keratinzersetzung**. Andere Pilzarten dringen über Verletzungen in tiefere Hautschichten ein. Diese **Verletzungsmykosen** kommen insbesondere in wärmeren Klimazonen vor, z. B. bei Landarbeitern. Die gefährlichsten Pilzinfektionen sind **Systemmykosen**, die meist durch **Hefen** wie *Candida albicans* verursacht werden. Gefährdet sind insbesondere Patienten, deren

Immunabwehr durch **Immunsuppressiva** (z. B. bei Leukämie) oder eine schwere Grunderkrankung (z. B. **AIDS**) geschwächt ist. Auch **Schimmelpilze** wie *Aspergillus fumigatus*, die normalerweise totes organisches Material besiedeln, sind für diese Personen gefährlich. Für gesunde Menschen stellen sie keine Krankheitserreger dar; allerdings reagieren manche Menschen allergisch auf Schimmelpilzsporen. Zur Therapie von Pilzinfektionen werden **fungizide Antibiotika** (Nystatin, Amphotericin B) und andere Spezialpräparate angewendet.

Protozoenkrankheiten

An **Protozoenkrankheiten** leiden weltweit vermutlich mehr als 2 Milliarden Menschen. Viele Protozoen werden über blutsaugende Insekten weitergegeben, häufig finden **Wirtswechsel** zwischen Mensch und Säugetier statt. Viele Protozoenkrankheiten sind auf den Lebensraum ihrer Vektoren beschränkt und dort endemisch, z. B. **Malaria** in den Tropen und Subtropen (Anophelesmücke) und die **afrikanische Schlafkrankheit** (Tsetsefliegen). Ebenfalls vorwiegend in tropischen Ländern verbreitet ist der Darmparasit *Entamoeba histolytica* (**Amöbenruhr**), der über kontaminiertes Trinkwasser oder Lebensmittel verbreitet wird. Auch im europäischen und nordamerikanischen Raum von Bedeutung ist der **Schleimhautparasit** *Trichomonas vaginalis,* der den weiblichen und den männlichen Genitaltrakt besiedelt und sexuell übertragen wird.

11

Weiträumig verbreitet ist *Toxoplasma gondii* (**Toxoplasmose**), in dessen Entwicklungszyklus ein Wirtswechsel zwischen Endwirt (Feliden, meist Katzen) und verschiedenen Zwischenwirten (Mensch, Hund, andere Haustiere) erfolgt. Der Mensch infiziert sich über Katzenkot oder ungenügend gegartes Fleisch eines anderen Zwischenwirtes (z. B. Schwein). Dabei induzieren die Parasiten die Bildung von **parasitophoren Vakuolen** in Zellen des Wirtes und persistieren später in Zysten in Muskel- und Gehirnzellen. Eine Erstinfektion mit **Toxoplasmose** im ersten Schwangerschaftsdrittel kann zu einer schweren Schädigung des Feten führen.

Zur **Therapie** von Protozoeninfektionen stehen **Sulfonamide** und andere Folsäureantagonisten (S. 423) sowie verschiedene spezielle Präparate zur Verfügung, bei deren Anwendung allerdings auf mögliche Resistenzen (z. B. Malaria) geachtet werden muss.

Unterschiedliche Formen der **Malaria** werden von vier verschiedenen *Plasmodium*-Arten verursacht, die alle komplizierte Generationszyklen mit mehrfachem Gestaltswechsel und einen Wirtswechsel zwischen Mensch und Anophelesmücke durchlaufen. Die Infektion des Menschen erfolgt meist durch den Stich der weiblichen Anophelesmücke, in Endemiegebieten, vor allem tropische und subtropische Gebiete in Afrika, Asien, Mittel- und Südamerika, auch über die Plazenta und durch kontaminierte, ungekühlte Frischblutkonserven. Die gefährlichste Form ist die durch *Plasmodium falciparum* (Abb. 11.**14**) verursachte *Malaria tropica* mit über 95 % aller Malaria-Todesfälle. Weltweit gibt es nach Schätzungen der WHO etwa 300 bis 500 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr, davon etwa 90 % in Afrika. Die Zahl der jährlichen Todesfälle liegt bei 1,5 bis 2,7 Millionen, davon ca. 1 Million Kinder. Die **Prophylaxe** zur Bekämpfung der Malaria umfasst die Trockenlegung von Sumpfgebieten als Hauptlebensraum der Anophelesmücke, Schutzmaß-

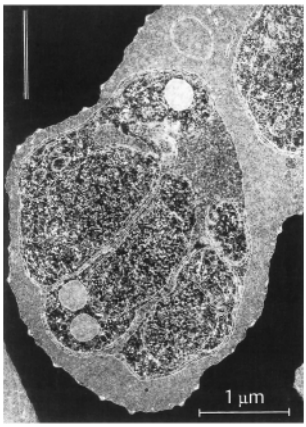


Abb. 11.**14** ***Plasmodium falciparum*.** Ein Parasitenstadium (Trophozoit) lebt innerhalb der Erythrocyten und produziert ein spezielles Protein, das befallene Erythrocyten am Epithel der Blutgefäße haften lässt. Dadurch werden insbesondere die feinen Kapillaren verstopft, die resultierende Unterversorgung des umliegenden Gewebes führt zu den für Malaria tropica typischen neurologischen Symptomen. (Von Bauer, F. Wunderlich, Düsseldorf, aus Hirsch-Kauffmann, Thieme, 2004)

nahmen im Wohn- und Schlafbereich (Moskitonetze, Repellentien, Insektizide) sowie die Chemoprophylaxe (z. B. Resochin). Nachdem die Anwendung von DDT gegen die Anophelesmücke wegen der Toxizität dieses Insektizids in den 1970er Jahren eingestellt wurde, könnte das bei der Stechmückenbekämpfung erfolgreiche Präparat Bti (*Bacillus thuringiensis israeliensis*) eine erfolgversprechende Alternative sein. Für die **Therapie** stehen verschiedene Präparate zur Verfügung, die in unterschiedliche Stoffwechselprozesse der Parasiten eingreifen: RNA-Polymerase-Inhibitoren (Chinin und Artemisin sowie deren Derivate), Inhibitoren der Purinbasen-Synthese (Folsäureantagonisten), Proteinsynthese-Inhibitoren (Makrolide, Tetracycline) und Inhibitoren des mitochondrialen Elektronentransportes der Parasiten. Plasmodien verwenden wie Bakterien einen Isopren-Syntheseweg, der sich von dem in Menschen und Tieren unterscheidet und Angriffsziel des Antibiotikums Fosmidomycin ist. In der Praxis müssen meist Kombinationspräparate aus zwei oder mehr Wirkstoffen eingesetzt werden, da inzwischen regional unterschiedlich resistente Plasmodienstämme existieren. Die Entwicklung eines **Impfstoffes** gestaltet sich schwierig, da die unterschiedlichen Formen des Parasiten jeweils unterschiedliche Antigenität besitzen. Nach der vollständigen Genomsequenzierung von *Plasmodium falciparum* und *Anopheles gambiae* wurden bereits gentechnisch veränderte *Plasmodium*-Varianten hergestellt, die als Impfstoff eingesetzt werden könnten. Erste Versuche an Mäusen verliefen erfolgreich. Auch an einer gentechnischen Veränderung der Anophelesmücken zur Herstellung steriler oder gegen Plasmodien resistenter Insekten wird gearbeitet.

Viruskrankheiten

Als **obligate Zellparasiten** schädigen **Viren** durch die Inanspruchnahme des zellulären Syntheseapparates ihre Wirtszellen und verursachen morphologische Veränderungen der Zellen (zytopathischer Effekt), die jeweils typisch für die Virusart sind und daher diagnostisch genutzt werden. Durch die Infektion zahlreicher Wirtszellen können sich Funktionsstörungen bzw. Krankheiten manifestieren. Viele Viren nutzen Strukturen der Wirtszelle zur Tarnung. Für ihre weitere Existenz sind sie je nach Virustyp auf eine direkte oder indirekte Übertra-

gung von Wirt zu Wirt angewiesen. Bestimmte Viren sind weit verbreitet und hoch ansteckend, sodass eine Infektion meist bereits im Kindesalter erfolgt („Kinderkrankheiten", z. B. Windpocken, Masern, Röteln, Mumps, Poliomyelitis). Wegen der Möglichkeit von Komplikationen oder schwerwiegenden Verläufen werden in Deutschland von der Ständigen Impfkommission Schutzimpfungen gegen diese Krankheiten empfohlen.

Eine Rötelninfektion kann bei einer Erstinfektion im ersten Schwangerschaftsdrittel zur Fehlgeburt oder zu bleibenden Schäden an den kindlichen Organen (insbesondere Augen, Gehör, Herz und Gehirn) führen. Wegen der Gefahr dieser **Rötelnembryopathie** wird die Röteln-Schutzimpfung für alle Kleinkinder empfohlen, um den Anteil der nicht immunen Bevölkerung möglichst gering zu halten. Da das Röteln-Virus kein tierisches Wirtsreservoir hat, kann seine Ausbreitung auf diese Weise wirksam eingeschränkt werden. Der Erreger der Kinderlähmung, das **Poliomyelitisvirus**, wird oral aufgenommen und über den Darm wieder ausgeschieden. Seine Verbreitung hängt daher direkt mit dem Hygienestandard einer Bevölkerung zusammen. Gegen das Virus existiert seit 1962 ein Oralimpfstoff (**Schluckimpfung**) aus vermehrungsfähigen, also lebenden Viren. Weil in seltenen Fällen durch die Ausscheidung von rückmutierten Impfviren bei nicht immunen Kontaktpersonen des Impflings eine Poliomyelitis-Erkrankung ausgelöst wurde, wird in Deutschland inzwischen ausschließlich ein **inaktivierter Totimpfstoff** injiziert. Europa wurde 2002 von der WHO für Poliomyelitis-frei erklärt, eine erneute Einschleppung der Viren durch Reisende ist jedoch jederzeit möglich.

11

Bei Viruskrankheiten wie Schnupfen und **Influenza** (S. 120) ist die Entwicklung von langfristig wirksamen Impfstoffen durch die hohe Antigenvariabilität des Erregers und die Anzahl der pathogenen Stämme erschwert. Aus diesem Grund wird die Verbreitung der verschiedenen Influenzavirustypen ständig überprüft und jährlich ein entsprechend aktualisierter Impfstoff neu entwickelt (S. 122). Auch gegen Viruserkrankungen wie **AIDS** (S. 125) oder **Hepatitis C** gibt es wegen der hohen Antigenvariabilität noch keine Impfprophylaxe.

Infektionen mit bestimmten **Hepatitisviren** können in einigen Fällen schwerwiegend und chronisch verlaufen bis hin zur Entwicklung eines Leberkarzinoms. Heute werden fünf klassische Hepatitisviren unterschieden (HAV, HBV, HVC, HDV, HEV). Allen Hepatitisformen gemeinsam ist eine Leberentzündung, durch die häufig, aber nicht immer, eine Gelbsucht hervorgerufen wird. Hepatitisviren werden verschiedenen Virusfamilien zugerechnet, HBV gehört zu den DNA-Viren, alle anderen sind RNA-Viren. Auch die Übertragung geschieht auf unterschiedliche Weise; HAV und HEV werden fäkal-oral durch Trinkwasser und Lebensmittel übertragen, die Ansteckung mit HBV, HCV und HDV erfolgt parenteral über Blut und andere Körperflüssigkeiten. Impfstoffe konnten bisher nur gegen Hepatitis A und B entwickelt werden. **Hepatitis D** tritt nur bei Hepatitis-B-Infizierten auf, da das defekte Hepatitis-D-Virus (HDV) zur Infektion auf das HBV-Hüllprotein angewiesen ist. Aus diesem Grund schützt der gentechnisch hergestellte HBV-Impfstoff, der gegen dieses Hüllprotein immunisiert, gleichzeitig vor einer HDV-Infektion. **HBV-** und **HCV**-Infektionen verlaufen bei einem Teil der Betroffenen chronisch mit Spätfolgen wie Leberzirrhose und Leberkarzinom. Das HC-Virus wurde erst 1988 entdeckt und ist weltweit verbreitet, insbesondere in Risikogruppen, die in erhöhtem Maße Kontakt mit Blut oder Blutprodukten haben (Bluter, Dialysepatienten, Drogenabhängige). Inzwischen können Blutkonserven auf HCV getestet werden. Weltweit laufen For-

schungsarbeiten zur Entwicklung einer Schutzimpfung, ein therapeutischer Impfstoff für chronisch an Hepatitis C Erkrankte befindet sich in der Erprobungsphase. Das **HE**-Virus wurde erstmalig 1985 isoliert und ist vor allem in Asien, Afrika, Mittel- und Südamerika verbreitet, wahrscheinlich handelt es sich um eine Zoonose. Das Krankheitsbild ähnelt der Hepatitis A. Beide Formen werden nicht chronisch, allerdings verläuft Hepatitis E meist schwerwiegender und zeigt vor allem bei Schwangeren sehr schwere Verläufe mit einer Letalität von ca. 20 %.

Zu den seit 1960 neu aufgetretenen viralen Krankheitserregern gehören neben **HIV** (S. 125) auch das von Zecken übertragene **FSME**-Virus (**F**rüh**s**ommer-**M**eningo**e**nzephalitis), SARS (S. 123) sowie verschiedene **hämorrhagische Viren**.

Ein schon seit langem bekannter Vertreter der hämorrhagischen Viren ist das **Gelbfiebervirus**, das ausschließlich in Zentralafrika und in tropischen Gebieten Südamerikas vorkommt und die akute Infektionskrankheit Gelbfieber verursacht. Der Name der Krankheit beschreibt zwei typische Symptome, das sehr hohe Fieber von 40 bis 41 °C, das meist in zwei aufeinander folgenden Schüben auftritt, und die während des zweiten Fiebergipfels auftretende Gelbsucht. Durch toxische Gefäßschädigungen werden Blutungen ausgelöst, die vorwiegend als Bluterbrechen und Darmblutungen in Erscheinung treten. Gelbfieber wird durch den Stich infizierter Mücken übertragen und kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor: Beim **urbanen Gelbfieber** erfolgt die Ansteckung über den Insekten-Vektor von Mensch zu Mensch, beim **Dschungelgelbfieber** bilden Affen das Säugerreservoir für das Virus. Gegen die Krankheit, deren Letalität 10 %, in Extremfällen sogar bis zu 80 % beträgt, existiert ein Impfstoff aus abgeschwächten Erregern.

Innerhalb der letzten 30 Jahre wurden wiederholt lokale Ausbrüche von hämorrhagischen Fiebererkrankungen beobachtet, die von bis dahin unbekannten Viren verursacht wurden und meist außerordentlich schwere Verläufe mit hoher Letalität aufwiesen. Zu den bekanntesten Beispielen zählt das **Marburg-Virus**, das 1967 mit aus Uganda stammenden Affen in Versuchslaboratorien in Marburg, Frankfurt und Belgrad gelangte und dort unter dem Personal insgesamt 25 Erkrankungsfälle verursachte. Zusätzlich wurden mehrere Kontaktpersonen der Kranken durch direkte Infektion angesteckt, es gab sieben Todesfälle. In späteren Jahren traten mehrmals vereinzelte Fälle in Afrika auf, zuletzt 2004/2005 in Nordangola. Eine sehr ähnlich verlaufende, von hohem Fieber und Blutungen gekennzeichnete Erkrankung trat erstmalig 1976 im Sudan und zeitgleich in Zaire auf. Von den jeweils rund 300 Patienten starben im Sudan 53 %, in Zaire sogar 88 %. Das aus den Kranken isolierte Virus weist große morphologische Ähnlichkeit mit dem Marburg-Virus auf, unterscheidet sich aber in seiner Antigenität. Nach einem Fluss in Zaire erhielt es den Namen **Ebola-Virus**. Bei den im Sudan und in Zaire aufgetretenen Virusstämmen handelte es sich um zwei Subtypen des gleichen Erregers. Auch dieses Virus führte in der Zwischenzeit wiederholt zu neuen Ausbrüchen mit äußerst schweren Verläufen beim Menschen und auch bei erkrankten Affen. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene Flughundearten, die selbst nicht erkranken, das eigentliche Erregerreservoir bilden. Ist das Virus allerdings einmal in eine menschliche Population eingedrungen, wird es von Mensch zu Mensch weitergegeben, wobei unzureichende hygienische Bedingungen, beispielsweise der Mangel an sterilen Einmal-Spritzen in vielen afrikanischen Krankenhäusern, die Ausbreitung der Seuche offenbar begünstigt haben. Eine Impfprophylaxe steht derzeit nicht zur Verfügung, therapeutisch wurden einige Erfolge mit Rekonvaleszentenserum erzielt.

Die **Therapie** von Viruskrankheiten ist im Allgemeinen **symptomatisch**, nur in schweren Fällen werden spezielle **antivirale Wirkstoffe** eingesetzt (S. 547).

Bakterielle Krankheiten

Zahlreiche Krankheiten des Menschen werden durch **Bakterien** verursacht. Dabei können verschiedene Bakterienarten gleiche oder ähnliche Krankheitsbilder auslösen, umgekehrt kann eine Bakterienart auch verschiedene Erkrankungsformen hervorrufen (Tab. 11.**5**).

Krankheiten wie Cholera (Abb. 11.**15**), Tuberkulose, Scharlach, Typhus oder Diphtherie zählten in Europa noch im 19. Jahrhundert zu den Haupttodesursachen. Nach der Einführung der Kausaltherapie durch Antibiotika und Sulfonamide schienen viele bakterielle Krankheiten besiegt zu sein; die Entwicklung von Schutzimpfungen trug zu dieser optimistischen Einschätzung bei. Doch die Entstehung resistenter Bakterienstämme und eine nachlassende Impfbereitschaft ließ in den letzten Jahren alte Krankheiten wie Tuberkulose oder Diphtherie verstärkt wieder auftreten.

Diphtherie wird durch Stämme von *Corynebacterium diphtheriae* verursacht, die durch die Infektion mit einem lysogenen Phagen (S. 133, S. 247) die Fähigkeit zur Produktion des **Diphtherietoxins** erworben haben. Die vor allem bei Kindern gefürchtete Krankheit

11

Tab. 11.**5** **Typische durch Bakterien verursachte Krankheiten.**

Krankheit	*Bakterien*	*Übertragungsweg*
Angina, Scharlach, Kindbettfieber, Eiterflechte	*Streptococcus-pyogenes*-Stämme	Tröpfchen- oder Kontaktinfektion
Furunkel, Brustdrüsenentzündung, Gastroenteritis, Toxic-Shock-Syndrom	*Staphylococcus-aureus*-Stämme	Tröpfchen- oder Kontaktinfektion
Meningitis	*Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae B,* verschiedene andere Bakterienarten	Tröpfcheninfektion
Diphtherie	*Corynebacterium diphtheriae*	Tröpfcheninfektion
Keuchhusten	*Bordetella pertussis*	Tröpfcheninfektion
Typhus	*Salmonella typhi*	Wasser, Lebensmittel
Tuberkulose	*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis*	Tröpfcheninfektion, infizierte Milch
Legionärskrankheit	*Legionella pneumophila*	Klimaanlagen, Warmwasserreservoire
Cholera	*Vibrio cholerae*	Wasser
Bakterienruhr	*Shigella*-Arten	Wasser
Magengeschwüre, Zwölffingerdarmgeschwüre	*Helicobacter pylori*	nicht eindeutig geklärt, vermutlich fäkal-oral
Gastroenteritis	pathogene *Escherichia-coli*-Stämme, verschiedene andere Bakterien	Wasser, Lebensmittel

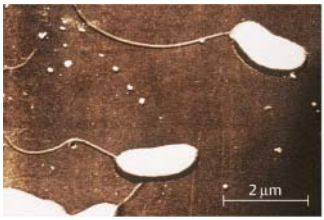


Abb. 11.**15** ***Vibrio cholerae.*** Der Erreger der Cholera ist ein gramnegatives gekrümmtes Stäbchen mit monotricher Begeißelung. (REM-Aufnahme aus Kayser, Thieme, 2005)

wird über Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch verbreitet. Da die schweren Symptome der Krankheit (Atemnot, Erstickungsgefahr, Kreislaufschädigung) auf die Wirkung des Toxins zurückgehen, ist bei der Therapie die Gabe eines **Antitoxins** vorrangig, erst in zweiter Linie werden die Bakterien selbst durch Antibiotika bekämpft. Nachdem die Einführung der Schutzimpfung bei Kleinkindern die Verbreitung der Diphtherie weitgehend zurückgedrängt hatte, nahm die Erkrankungshäufigkeit besonders in den Ländern der ehemaligen Sowjetunion in den letzten Jahren wieder deutlich zu. Grund hierfür ist der Zusammenbruch des Gesundheitssystems in vielen Staaten (Impfstoffmangel) und die z. T. schlechten Lebensbedingungen. Weil viele Menschen in den westlichen Ländern die Möglichkeit der **Diphtherie-Impfung** in den vergangenen Jahren nicht mehr wahrgenommen haben, gab es auch dort vereinzelte Neuinfektionen, insbesondere in Gemeinschaften mit niedrigem Impfstatus. Aufklärungskampagnen sollen daher das Bewusstsein für die Notwendigkeit eines möglichst breiten Impfschutzes in der Bevölkerung wieder stärken.

Tuberkulose ist ein klassisches Beispiel für eine chronische Erkrankung. Vor rund 100 Jahren starben in Deutschland 30 % der Erwachsenen an dieser auch „Schwindsucht" oder „Weiße Pest" genannten Krankheit. Der Erreger, *Mycobacterium tuberculosis*, gehört zu den **intrazellulären Bakterien** und wächst mit einer Verdopplungszeit von 12 Stunden ausgesprochen langsam **innerhalb von Makrophagen**. Die Tuberkulose verläuft in Schüben und kann sich über Jahre hinziehen, bei immungeschwächten Personen oder bei Kleinkindern kann sie sich allerdings auch sehr schnell als meist letal verlaufende **Miliartuberkulose** oder als **tuberkulöse Meningitis** manifestieren, auch ein septischer Verlauf ist möglich. Erkrankte, bei denen sich eine **offene Lungentuberkulose** entwickelt hat, verbreiten die Erreger über Hustentröpfchen. Die Therapie der Krankheit mit wachstumshemmenden Substanzen ist sehr langwierig (ca. 6 bis 12 Monate) und fordert große Disziplin von den Patienten. Ein vorzeitiger Therapieabbruch begünstigt die Selektion **resistenter Bakterien**, die inzwischen ein großes Problem darstellen. Aus diesem Grund werden meist **Kombinationspräparate** aus drei oder sogar vier verschiedenen Antibiotika bzw. Sulfonamiden zur Behandlung der Tuberkulose eingesetzt. Eine Impfung gegen Tuberkulose wird zurzeit nicht empfohlen, da der alte BCG-Impfstoff Nebenwirkungen haben kann und keinen zuverlässigen Schutz bietet. Gentechnische Veränderungen sollen die Wirksamkeit des BCG-Impfstammes verbessern.

Auch heute ist die Tuberkulose eine der am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten. Nach Schätzungen der WHO ist **ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert** und täglich kommen über 80 000 Neuinfektionen hinzu. Pro Jahr erkranken 9 Millionen der Infizierten und bis zu **3 Millionen sterben** an Tuberkulose. Dabei liegt der Schwerpunkt vor allem in den Ballungsgebieten von Entwicklungsländern in Asien und Afrika sowie in Osteuropa, wo insbesondere die Ausbreitung multiresistenter Stämme des Tuberkuloseerregers beobachtet wird. Hier zeigt sich der **Zusammenhang zwischen Tuberkulose und Armut**, durch die auch eine frühzeitige Diagnose und eine erfolgreiche Therapie erschwert werden. Eine Zunahme von Tuberkulose fand in den letzten Jahren aber

auch in hoch entwickelten Industrieländern wie den USA und einigen westeuropäischen Staaten statt, auch hier waren vor allem soziale Randgruppen wie Nichtsesshafte, Drogen- und Alkoholabhängige betroffen. Gerade für diesen Personenkreis ist die korrekte Durchführung der Chemotherapie extrem schwierig. Einen bedeutenden Risikofaktor für die Reaktivierung einer früher durchgemachten Tuberkulose oder eine Neuinfektion mit dem Erreger stellt eine HIV-Infektion dar. Auch andere schwere Grunderkrankungen, z. B. Diabetes mellitus, erhöhen das Erkrankungsrisiko. Um eine weitere Ausbreitung der Tuberkulose zu verhindern, hat die WHO eine Kontrollstrategie entwickelt, für deren konsequente Anwendung allerdings die Hilfe der Industriestaaten für die am stärksten betroffenen Entwicklungsländer notwendig wäre. Kernpunkte des Programms sind die Erkennung Tuberkulose-Infizierter und ihre mindestens sechsmonatige Versorgung mit Arzneimitteln. Dabei muss eine mögliche Resistenz des Erregers ermittelt und berücksichtigt werden.

Neben diesen klassischen Krankheiten sind inzwischen einige neue bakterielle Erkrankungen aufgetreten, deren Entdeckung zu teilweise überraschenden Erkenntnissen führte. Beispielsweise wird *Legionella pneumophila*, der Erreger der 1976 bei einem Treffen amerikanischer Kriegsveteranen (Mitglieder der American Legion, legionnaires) erstmals beobachteten **Legionärskrankheit**, vor allem über Errungenschaften der modernen Zivilisation wie Klimaanlagen und größere Warmwassertanks verbreitet. Die Entdeckung des Magenbakteriums *Helicobacter pylori* als Ursache bestimmter Erkrankungen des Magens widerlegte die bis dahin herrschende Lehrmeinung, dass **Magengeschwüre** psychosomatisch bedingt sind.

1982 wurde aus dem Magen von Patienten, die teilweise schon seit Jahren an Magengeschwüren oder Gastritis litten, ***Helicobacter pylori***, isoliert, ein spiraliges Bakterium, das in den Zotten der Magenschleimhaut lebt. Um im stark sauren Milieu des Magens (pH 2) existieren zu können, besitzt es das Enzym **Urease** zur Harnstoffspaltung. Das dabei erzeugte Ammoniak umhüllt als alkalische Schutzwolke die Zellen und neutralisiert die Magensäure. Inzwischen ist bekannt, dass *H. pylori* weltweit verbreitet und eine der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen ist, beispielsweise beherbergen 40 % der Bevölkerung in Deutschland *H. pylori* im Magen, bezogen auf die Weltbevölkerung beträgt die Infektionsrate 50 %. Viele Infizierte zeigen zunächst keine Krankheitssymptome, erst die Immunreaktion des Wirtes führt zur Entzündung der Magenschleimhaut, die dann durch die erhöhte Magensäureproduktion noch weiter angegriffen wird. Als Folge kann es zu einer **chronischen Magenschleimhautentzündung**, zu **Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren** und auch zu **Magenkrebs** kommen. Weltweit wurden mehr als 350 unterschiedliche Stämme von *H. pylori* identifiziert und sequenziert. Während noch vor wenigen Jahren vor allem Wismutpräparate zur **Therapie** eingesetzt wurden, weil gängige Antibiotika nicht säurestabil waren, werden inzwischen standardmäßig Kombinationspräparate aus einem **Protonenpumpeninhibitor und zwei Antibiotika** angewendet. 2005 wurden auf einer Konferenz von Experten die Entwicklung und großflächige Anwendung eines Impfstoffes diskutiert, um insbesondere im Hinblick auf das Magenkrebsrisiko *H. pylori* zu eliminieren. Allerdings könnte ein verlässlicher Impfstoff frühestens 2010 zur Verfügung stehen.

Infektionskrankheit: Manifestation einer Infektion, kann lokal oder generalisiert sein.
manifester Krankheitsverlauf: Sichtbare Krankheitssymptome.

inapparenter Krankheitsverlauf: Ohne sichtbare Symptome, aber Antikörperbildung.
Inkubationszeit: Erregertypischer Zeitraum zwischen Erregeraufnahme und Auftreten der ersten Symptome.
Endemie: Ständiges Vorkommen einer Krankheit in einem bestimmten Gebiet auf konstantem Niveau.
Epidemie: Plötzliches Auftreten einer Krankheit in einem begrenzten Gebiet.
Pandemie: Weiträumige bis weltweite Ausbreitung einer Epidemie.
Letalität: Verhältniszahl zwischen an einer bestimmten Krankheit Erkrankten und der Anzahl der Todesfälle in Prozent.

11.3.5 Infektionsschutz

Maßnahmen zum Infektionsschutz setzen zuerst bei der Verhinderung der Erregerausbreitung an. Die älteste Methode ist die **Quarantäne** (zeitliche Isolierung Ansteckungsverdächtiger), die bereits im 15. Jahrhundert in italienischen Städten zur Verhinderung der Pestausbreitung eingeführt wurde. Sind Tiere Überträger einer Krankheit, ist ihre Bekämpfung (**Entwesung**) immer Bestandteil des Maßnahmenkatalogs. Beispielsweise wurde die Malaria auf dem amerikanischen Kontinent durch die Trockenlegung von Sümpfen, dem natürlichen Lebensraum der übertragenden Anophelesmücke, und durch den großflächigen Einsatz von Insektiziden zurückgedrängt. Um eine Übertragung von Krankheitserregern durch Gegenstände, Nahrungsmittel, Trinkwasser usw. zu unterbinden, verwendet man verschiedene Techniken zur **Desinfektion** oder **Sterilisation** (S. 278).

Schutzimpfungen verhindern die Vermehrung und Ausbreitung eines Krankheitserregers im Wirtsorganismus. Das Prinzip einer Schutzimpfung besteht in der **aktiven Immunisierung** des Wirtes durch Induktion von Antikörpern, die bei einem späteren Kontakt mit dem Krankheitserreger oder seinem Toxin zu einer sofortigen Neutralisierung führen und so den Ausbruch der Krankheit verhindern. Die Schutzwirkung hält mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte an. Als Impfstoffe werden entweder Suspensionen aus abgetöteten Erregern bzw. Erregerbestandteilen (**Totimpfstoffe**, **Spaltimpfstoffe**), abgeschwächte, aber noch vermehrungsfähige Erreger (**Lebendimpfstoffe**) oder entgiftete Toxine (**Toxoidimpfstoffe**) verwendet, die als Antigene fungieren. Die erste aktive Schutzimpfung wurde vor über 200 Jahren in England gegen Pocken entwickelt.

Bei einer **passiven Immunisierung** wird Antiserum verwendet, das keine Antigene enthält, sondern die zur Neutralisation eines bestimmten Erregers oder Toxins notwendigen Antikörper aus einem fremden Organismus. Diese fremden Antikörper werden nach einigen Wochen abgebaut, die Schutzwirkung ist daher kurzzeitig.

Im **Infektionsschutzgesetz** sind alle gesetzlichen Vorschriften niedergelegt, die der **Früherkennung**, **Verhütung** und **Bekämpfung** von Infektionskrankheiten dienen. Dieses Gesetz trat im Januar 2001 in Kraft und ersetzt das bis

dahin geltende Bundesseuchengesetz. Im Infektionsschutzgesetz werden der **Informationsfluss** und die **Koordination** von Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung auf nationaler und internationaler Ebene geregelt und dem **Robert-Koch-Institut** als zentraler Einrichtung des Bundes im Bereich der öffentlichen Gesundheit weitreichende Aufgaben zugewiesen. Ein Abschnitt des Gesetzes regelt die **Meldepflicht** durch medizinisches Personal für eine Reihe von Infektionskrankheiten sowie für den Nachweis bestimmter Krankheitserreger, dabei kann die Meldepflicht im Bedarfsfall durch das Bundesgesundheitsministerium erweitert werden, um schnell auf eine akute Bedrohung reagieren zu können. Weitere Abschnitte behandeln zusätzliche Vorschriften für Gemeinschaftseinrichtungen wie Schulen, den Umgang mit Krankheitserregern und Krankenhaushygiene, insbesondere beim Auftreten von nosokomialen Infektionen und Resistenzen. Ebenfalls geregelt werden gesundheitliche Anforderungen an das Personal von Gemeinschaftseinrichtungen und in der Lebensmittelherstellung oder -verabeitung Beschäftigte sowie die Pflicht zu entsprechender Belehrung durch den Arbeitgeber.

Quarantäne: Isolierung von Infizierten.
Entwesung: Bekämpfung von tierischen Überträgern.
Schutzimpfungen:
- **Aktive Immunisierung:** Induktion der Antkörperbildung in einem Organismus durch Gabe von Antigenen, lang andauernder Schutz vor einer späteren Infektion.
- **Passive Immunisierung:** Gabe von fremden Antikörpern, kurzfristiger Schutz.

Totimpfstoff: Impfstoff aus abgetöteten Erregern.
Spaltimpfstoff: Impfstoff aus Erregerbestandteilen.
Lebendimpfstoff: Impfstoff aus abgeschwächten vermehrungsfähigen Erregern.
Toxoidimpfstoff: Impfstoff aus entgiftetem Toxin.
Infektionsschutzgesetz: Bundesgesetz zur Vorbeugung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen, regelt unter anderem die Meldepflicht.
Meldepflicht: Gesetzliche Verpflichtung zur Meldung bestimmter Erkrankungen und den Nachweis bestimmter Erreger durch medizinisches Personal, kann im Bedarfsfall vom Bundesgesundheitsministerium erweitert werden.

11.3.6 Infektionstherapie

Bei der Infektionstherapie wird zwischen **symptomatischer** und **ätiologischer Therapie** unterschieden. Während im ersten Fall nur Krankheitssymptome behandelt werden (Fiebersenkung, Schmerzmittel), bekämpft eine ätiologische Therapie (auch **Kausaltherapie**) die Krankheitsursache, den Infektionserreger. Die Entdeckung des **Penicillins** (1929) und wenig später die Synthese der ersten **Sulfonamide** (1933, S. 423) brachten den entscheidenden Fortschritt bei der Behandlung bakterieller Erkrankungen; auch bei Pilz- oder Protozoeninfektionen

sind bestimmte Antibiotika wirksam gegen die Erreger. Nach den ersten medizinischen Erfolgen mit Penicillin wurden zahlreiche weitere Antibiotika, die natürlicherweise von Bakterien und Schimmelpilzen synthetisiert werden, isoliert und nach der Aufklärung ihrer chemischen Strukturen auch modifiziert und synthetisch hergestellt (S. 562). Die Wirksamkeit von Antibiotika beruht darauf, dass sie spezifisch Strukturen oder Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen angreifen, ohne die der Wirte zu schädigen. Inzwischen können auch bestimmte schwere Viruskrankheiten mit speziellen **antiviralen Wirkstoffen** behandelt werden. Dazu gehören gentechnisch hergestellte **Interferone** und verschiedene **Nucleosid-Analoga**, die beispielsweise bei hartnäckigen Herpes-Infektionen eingesetzt werden. Gegen Infektionserreger gerichtete Wirkstoffe werden unter dem Oberbegriff **Antiinfektiva** zusammengefasst.

Doch die Euphorie der ersten Jahre ist inzwischen der Erkenntnis gewichen, dass auch diese Wunderwaffen nicht unproblematisch sind. **Breitspektrum-Antibiotika** begünstigen endogene Infektionen durch opportunistische Mikroorganismen (S. 532), weil zusammen mit den Infektionserregern ein Teil der bakteriellen Normalflora dezimiert wird, sodass unempfindliche Mikroorganismen, z. B. Hefen, sich übermäßig stark vermehren können. Aus diesem Grund wird im Anschluss an eine Antibiotikabehandlung häufig eine Hefepilzerkrankung (Soor) beobachtet. Ein weiteres Problem stellen **Allergien** gegen Antibiotika dar; die bekannteste ist die Penicillinallergie.

Als besonders fatal für die Anwendung von Antibiotika in der Medizin haben sich die **Resistenzen** erwiesen, die inzwischen bei zahlreichen Mikroorganismen anzutreffen sind. Unter dem Begriff Resistenz werden **Abwehrmechanismen** von Mikroorganismen gegen ein Medikament zusammengefasst, die auf unterschiedliche Weise dessen Wirksamkeit aufheben. Dabei kann die Resistenz darauf beruhen, dass das Medikament durch spezielle Transportsysteme ausgeschleust oder enzymatisch inaktiviert wird, bevor es wirken kann. Andere Resistenzmechanismen verändern nicht das Chemotherapeutikum selbst, sondern seinen Angriffspunkt, sodass er nicht mehr erkannt wird. Eine weitere Möglichkeit ist die Umgehung der verursachten Störung durch einen alternativen Biosyntheseweg. Die Weitergabe von **Resistenzgenen** zwischen Bakterien wird dadurch erleichtert, dass sie häufig auf **Transposons** oder auf **Plasmiden** lokalisiert sind (S. 248 und 🕮*Genetik*). Ein Austausch von **Resistenzplasmiden** findet nicht nur innerhalb einer Art, sondern auch zwischen verschiedenen Arten statt. Auf diese Weise werden Antibiotikaresistenzen, beispielsweise zwischen den Mitgliedern der Darmflora, sehr schnell weitergegeben. Da alle Antibiotika einer Strukturfamilie in der Regel das gleiche Ziel an der Bakterienzelle angreifen, betreffen Resistenzen gegen ein bestimmtes Antibiotikum häufig auch die anderen Antibiotika aus dieser Familie. Für die Therapie von Krankheiten, bei denen Antibiotikaresistenzen des Krankheitserregers wahrscheinlich sind, ist deshalb vor Therapiebeginn eine **Resistenzprüfung** über ein **Antibiogramm** sinnvoll, um die Anwendung unwirksamer Präparate zu vermeiden (Abb. 11.**16**).



Abb. 11.**16** **Antibiogramm.** Auf einen Bakterienrasen werden runde Filterblättchen gelegt, die mit Lösungen verschiedener Antiinfektiva, meist Antibiotika, getränkt sind (Agardiffusionstest). Sind die Bakterien sensibel gegenüber einem Wirkstoff, entsteht eine Hemmzone. Aus dem Hemmhofdurchmesser und der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Wirkstoffs kann die minimale Hemmkonzentration berechnet werden. (Aus Kayser, Thieme, 2005)

Die massive Anwendung von Antibiotika in Krankenhäusern und in der Tierzucht hat dazu beigetragen, die **Selektion resistenter Stämme** zu fördern. Immer häufiger führen auch **multiresistente** Bakterienstämme, vor allem **m**ethicillin**r**esistente Stämme von ***S**taphylococcus **a**ureus* (MRSA), zu **nosokomialen Infektionen** (Krankenhausinfektionen). Durch die **Verbesserung der Hygiene** im medizinischen und im landwirtschaftlichen Bereich sollen die Anwendung von Antibiotika deshalb auf das Notwendigste beschränkt und bereits bestehende Resistenzmechanismen durch **neue Strategien** ausgehebelt werden. Beispielsweise wurden verschiedene halbsynthetische Antibiotika entwickelt, die unempfindlich gegen ihre enzymatische Inaktivierung durch bestimmte pathogene Bakterien sind. **Clavulansäure** (S. 564) ist ein Inhibitor des Enzyms β-Lactamase, das β-Lactam-Antibiotika wie Penicillin inaktiviert. Wird Clavulansäure zusammen mit Penicillin verabreicht, kann eine bestehende Resistenz aufgehoben und die Wirksamkeit von Penicillin wiederhergestellt werden. Die meisten der heute zur Verfügung stehenden Antibiotika inhibieren die Synthese von Zellwand, Nucleinsäuren oder Proteinen. Kürzlich wurde ein Antibiotikum mit einem völlig anderen Wirkungsmechanismus entdeckt, das von *Streptomyces platensis* produziert wird: **Platensimycin** inaktiviert Enzyme der Fettsäuresynthese. In Tests erwies sich Platensimycin als wirksam gegen eine Reihe von resistenten Bakterien, darunter auch MRSA, zudem zeigte das neue Antibiotikum im Tierversuch keine toxischen Nebenwirkungen.

Infektionstherapie: symptomatisch oder ätiologisch
- **Symptomatische Therapie:** Behandlung der Krankheitssymptome, z. B. Schmerzmittel, Fiebersenkung.
- **Ätiologische Therapie, Kausaltherapie:** Bekämpfung der Krankheitserreger durch Antiinfektiva.

Antiinfektiva: Antimikrobielle Wirkstoffe, die spezifische Strukturen oder Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen angreifen, z. B. Antibiotika.
Antivirale Wirkstoffe: Wirken spezifisch gegen Viren, z. B. Interferone, bestimmte Nucleosid-Analoga.
Nosokomiale Infektionen (Krankenhausinfektionen): Infektionen, die im Krankenhaus erworben werden.
Resistenz: Verschiedene Mechanismen der Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegen Antibiotika und andere Chemotherapeutika, Gene häufig auf Resistenzplasmiden oder Transposons lokalisiert.
Multiresistenz: Gleichzeitige Resistenz gegen mehrere Antibiotika.

12 Mikrobielle Biotechnologie

Bernd Eikmanns, Marcella Eikmanns, Regina-Nethe-Jaenchen

12.1 Mikroorganismen und mikrobielle Enzyme im Dienste des Menschen

In der mikrobiellen Biotechnologie werden Bakterien, Pilze oder mikrobielle Enzyme für die **Stoffproduktion**, die **Stoffumwandlung** und den **Stoffabbau** eingesetzt. Anwendungsbereiche für Mikroorganismen und Enzyme sind **Ernährung**, **Gesundheit**, **Pharma**, **Chemie** und **Umwelt**. In Screeningverfahren werden für den Prozess geeignete Mikroorganismen bzw. Enzyme identifiziert. **Optimale Qualität** und **hohe Produkt- bzw. Umsatzausbeute** sollen die Kosten der Prozesse möglichst gering halten. Die eingesetzten biologischen Systeme müssen strenge Sicherheits- und Qualitätskriterien erfüllen, insbesondere bei der Produktion von Lebensmitteln und Arzneistoffen. **Produktionsstämme** werden auch mithilfe der **Gentechnik** optimiert. Gentechnisch veränderte Mikroorganismen kommen insbesondere im Pharma- und Chemiebereich und bei der Produktion von Enzymen zum Einsatz. Vor allem die weiße (industrielle) Biotechnologie hat sich zu einem bedeutenden Industriezweig und einer **Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts** entwickelt.

Die **Biotechnologie** stellt heute eine **Schlüsseltechnologie** dar, die in letzter Zeit aufgrund steigender Beschäftigungs- und Umsatzzahlen international enorm an Bedeutung gewonnen hat. Das Ziel der Biotechnologie ist die Anwendung traditioneller und moderner Technologien, in denen biologische Systeme mikrobiellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder einzelne Komponenten dieser Systeme für die Produktion von Stoffen und für Dienstleistungen genutzt werden. Die **mikrobielle Biotechnologie** beschränkt sich auf Mikroorganismen und mikrobielle Enzyme als biologisches System. Die Biotechnologie erfordert im besonderen Maße die **Zusammenarbeit verschiedener Disziplinen**: Biologie (z. B. Mikrobiologie, Zellbiologie), Medizin (z. B. Virologie, Immunologie), Chemie und Biochemie (z. B. analytische Chemie, Enzymtechnologie), Verfahrenstechnik (z. B. Fermenter-, Mess- und Regeltechnik) und Bioinformatik.

Vereinfacht kann man mikrobielle biotechnologische Prozesse wie in Abb. 12.**1** schematisch darstellen: Bakterien, Pilze oder Enzyme nutzen ein Substrat oder Substratgemisch für die Synthese eines gewünschten Produktes. Bei dieser **Stoffproduktion** (Aufbauleistung, S. 558) werden oft Nebenprodukte wie CO_2, NH_4^+ oder organische Stoffwechselendprodukte gebildet, sowie neue Zellmasse, die einerseits als neuer Katalysator für den Prozess dienen, andererseits die Produktausbeute erniedrigen kann und dann unerwünscht ist. Idealerweise ist das

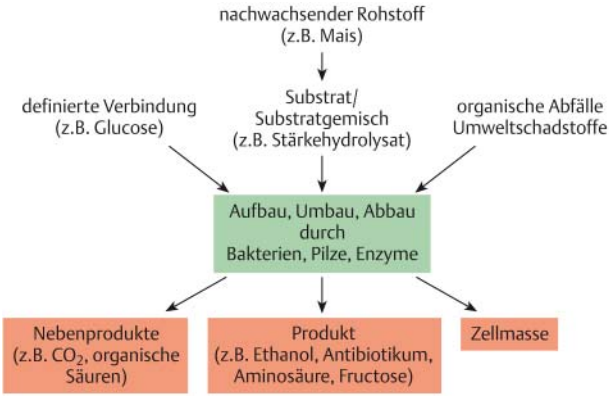


Abb. 12.**1** **Schematischer Ablauf von biotechnologischen Prozessen mit Mikroorganismen oder Enzymen.**

12

Substrat des Prozesses ein nachwachsender Rohstoff, z. B. depolymerisierte pflanzliche Biomasse. Eine biotechnologische **Stoffumwandlung** liegt vor, wenn das biologische System ein definiertes Substrat zu einer anderen Verbindung umsetzt, z. B. Glucose zu Fructose oder Fumarsäure zu Asparaginsäure (S. 576). Neben solchen Umbauleistungen gibt es in der Biotechnologie auch **Abbauleistungen**, z. B. die Abwasserreinigung oder die Eliminierung von Umweltschadstoffen (S. 580).

Um ein biologisches System optimal ausnutzen zu können, muss es sicher handhabbar sein, Ablauf und Regulation der relevanten Stoffwechselwege oder Reaktionen müssen genau bekannt sein. In vielen Fällen muss das biologische System für eine effektive Stoffproduktion oder -umwandlung durch geeignete Inkubations-/Reaktionsbedingungen oder mithilfe der Gentechnik „überlistet" werden.

In Abgrenzung zur Biotechnologie ist die **Gentechnologie** (**Gentechnik**) definiert als Anwendung von molekularbiologischen Methoden zur direkten und gezielten Neukombination von Erbinformationen verschiedener Organismen durch kontrollierten Eingriff. Damit stellt die Gentechnologie ein Teilgebiet der Biotechnologie dar, wenn sie biologische Systeme mit veränderten (genetischen) Eigenschaften für biotechnologische Prozesse liefert. In diesem Fall spricht man auch von **Molekularer Biotechnologie** oder **Moderner Biotechnologie**.

Anhand der unterschiedlichen Anwendungsgebiete wird die Biotechnologie in verschiedene Bereiche unterteilt: Die **grüne Biotechnologie** (landwirtschaftliche Anwendung) dient der Veränderung von Pflanzen zur Verbesserung vorhandener oder zur Übertragung neuer Eigenschaften, z. B. von Resistenzen. Die **rote Biotechnologie** (medizinisch-pharmazeutische Anwendung) befasst sich mit der Entwicklung und Herstellung von

Medikamenten und Diagnostika, dazu gehört auch die Regeneration körperlicher Schäden durch Gewebezüchtung (Tissue Engineering). Die **weiße Biotechnologie**, auch **industrielle Biotechnologie**, findet ihre Anwendung in der Chemie-, Textil- und Lebensmittelindustrie und befasst sich mit der mikrobiellen oder enzymatischen Herstellung von Produkten im Industriemaßstab. Antibiotika, Vitamine, Aminosäuren und technische Enzyme, aber auch „Basischemikalien" wie Dicarbonsäuren, Fasern oder Kraftstoffe, die heute noch größtenteils aus fossilen Rohstoffen gewonnen werden, sind Produkte der weißen Biotechnologie.

Neben der grünen, roten und weißen Biotechnologie gibt es weitere Unterteilungen, deren Definitionen jedoch (noch) nicht allgemein akzeptiert sind. Schwerpunkt der **blauen Biotechnologie** ist die Nutzung der besonderen Fähigkeiten von Organismen der Weltmeere. Die Biotechnologie der Abwasser- und Abfallwirtschaft wird als **graue Biotechnologie**, die Lebensmittelbiotechnologie manchmal als **gelbe Biotechnologie** bezeichnet.

12.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung der mikrobiellen Biotechnologie

Im Vergleich zu nicht biotechnologischen Stoffproduktions- und Stoffumsatzprozessen liegen die **Vorteile biotechnologischer Verfahren** häufig in erhöhter **Produktivität** (höhere Ausbeute in kürzerer Zeit), erhöhter **Qualität** (weniger Nebenprodukte, höhere Reinheit), **Einsparung** von fossilen Rohstoffen und Energie und Reduzierung der Umweltbelastung. Alle diese Faktoren senken die Kosten und sind umweltfreundlich. Das macht die biotechnologischen Verfahren attraktiv und lässt auch in den nächsten Jahren weltweit relativ hohe Wachstumsraten im Umsatz und bei den Beschäftigtenzahlen erwarten.

Die **Einsatzgebiete** der mikrobiellen Biotechnologie erstrecken sich über die Bereiche **Lebensmittel** (Nahrungs- und Genussmittel), **Gesundheit**, **Medizin** und **Pharma**, **Chemie** und **Umwelt**. Das gesamte Marktvolumen der mikrobiellen Biotechnologie ist schwer abzuschätzen, da die Abgrenzung in den Anwendungsgebieten unscharf ist. Für das Jahr 2004 wird allein der Umsatz im Nahrungs- und Genussmittelbereich auf über 500 Mrd. € geschätzt. Der Umsatz der industriellen Produktion von organischen Grund- und Feinchemikalien sowie von Wirkstoffen mithilfe von Enzymen und Mikroorganismen wurde im Jahr 2007 auf mehr als 50 Mrd. € geschätzt und ist damit vergleichbar mit dem Umsatz von Biopharmaka, der für das gleiche Jahr mit 55 Mrd € angegeben wird.

Insbesondere die **Weiße Biotechnologie** macht seit kurzem mit ihren Produktionsprozessen für die chemische Industrie (Massen- und Feinchemikalien), der Entwicklung neuer technischer Enzyme und der Herstellung von Biokraftstoffen auf der Basis von nachwachsenden Rohstoffen (Biomasse) von sich reden. Hier werden konventionelle industrielle Prozesse durch biologische Prozesse ersetzt, die den Energiebedarf und den Rohstoffeinsatz senken, die CO_2-Bilanz neutral halten sowie die Anzahl der Prozessstufen reduzieren und damit die Kosten senken. Ein Beispiel ist Bioethanol, von dem weltweit im Jahr 2007 etwa 40 Mio. t durch Fermentation hergestellt wurden. Prognosen zufolge werden bis zum Jahr 2020 etwa 20 % der Umsätze der gesamten Chemieindustrie auf die Nutzung der Weißen Biotechnologie zurückzuführen sein.

12.1.2 Der Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie

Organismen, die in einem biotechnologischen Verfahren zum Einsatz kommen, müssen bestimmte Anforderungen an Sicherheit, Handhabbarkeit und Wirtschaftlichkeit des geplanten Prozesses erfüllen. Bakterien oder Pilze werden dafür in umfangreichen Durchmusterungsversuchen (**Screening**) auf ihre Eignung (z. B. als Starterkultur oder Antibiotikaproduzent) getestet. Bei neu isolierten Mikroorganismen muss zunächst das Gefährdungspotenzial für Mensch und Umwelt festgestellt werden (S. 282). Ist dieses nicht gegeben, entscheidet das Stoffwechsel- bzw. Produktionsvermögen (Substratspektrum, Ausbeute, Nebenproduktbildung) oder die genetische Zugänglichkeit über die weitere Verwendung des Organismus. Die natürlicherweise ausgeschiedene Menge eines gewünschten Produktes ist bei Isolaten von verschiedenen Standorten unterschiedlich, deshalb lohnen sich die aufwendigen Screeningverfahren in vielen Fällen.

Bei der **Optimierung** der Mikroorganismen kommen heute oft gentechnische Methoden zum Einsatz. Idealerweise hat die Veränderung im Genom positive Auswirkungen auf die für den biotechnologischen Prozess wichtigen Eigenschaften (z. B. Produktivität, Stressresistenz), jedoch keine Auswirkungen auf andere Eigenschaften, z. B. das Wachstum. Außerdem sollte die eingeführte Veränderung genetisch stabil sein und auf nachfolgende Generationen vererbt werden. Bei der klassischen **Stammoptimierung** wird versucht, durch die Induktion von **Mutationen** (durch Strahlung, mutagene Chemikalien) und anschließende **Selektion** Stämme mit verbesserten Produktionseigenschaften zu erhalten (S. 220). Die Kenntnisse über Gene und Genome vieler Mikroorganismen sowie das heute verfügbare Methodenspektrum erlauben das Einbringen und gezielte An- und Ausschalten von Genen für Enzyme oder auch für ganze Stoffwechselwege („**Metabolic Engineering**“, S. 407). In vielen der biotechnologisch genutzten Organismen ist es heute möglich, die genetische Regulation von Enzymen zu modifizieren und damit die Produktions- oder Umsatzeigenschaften signifikant zu verbessern. Für Produktionsprozesse verwendete gentechnisch veränderte Mikroorganismen müssen dem **GRAS-Status** (**g**enerally **r**ecognized **a**s **s**afe) entsprechen, d. h. als sicher eingestuft werden.

Für **optimales Wachstum** der im biotechnologischen Prozess verwendeten Organismen müssen die jeweiligen **Nährstoffansprüche** berücksichtigt werden (S. 260). Neben den Wachstumsfaktoren, die in aller Regel nicht umgangen werden können, stellt die C-Quelle einen wesentlichen Kostenfaktor dar. Reinsubstanzen werden nur eingesetzt, wenn das Produkt entsprechend teuer verkauft werden kann. Vor allem bei Verfahren im größeren Maßstab werden deshalb **kostengünstige**, **zuckerhaltige** (**Abfall-**)**Produkte** wie Rohr- und Rübenzuckermelassen, Molke, Zellstoffablaugen und Stärkehydrolysate eingesetzt. Sojamehl, Erdnussmehl, Maisquellwasser, Magermilchpulver und Hefeextrakt werden als komplexe C- und N-Quelle verwendet.

Faktoren wie die Verfügbarkeit von **Wasser** (bei Oberflächenkultivierung, s. u.) und **O_2**, der **pH-Wert** und die **Temperatur** (S. 285) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Eine optimale Belüftung der Kulturen ist im großen Maßstab aufgrund der hohen O_2-Verbrauchsraten vieler Organismen und der geringen O_2-Löslichkeit in der Kulturbrühe oft problematisch und ein wichtiger Kostenfaktor.

Unter optimalen Kultivierungsbedingungen werden die **maximale Wachstumsrate** und ein **hoher Wachstumsertrag** erreicht. Das ist bei biotechnologischen Verfahren wichtig, bei denen die Biomasse selbst das gewünschte Produkt ist (S. 561) oder bei denen die Organismen erst in hoher Zelldichte für ein Produktionsverfahren eingesetzt werden. Manchmal unterscheiden sich die optimalen Bedingungen für das Wachstum der Organismen von denen für optimale Stoffproduktion oder -umsetzung. Bei mit dem Wachstum einhergehender Stoffproduktion oder -umsetzung können für den Gesamtprozess suboptimale Wachstumsbedingungen günstiger sein. Das gilt insbesondere, wenn die Produktion erst nach der Wachstumsphase einsetzt. Beispielsweise wird die Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* bei einem pH-Wert von 2 bis 2,5 und hoher Belüftungsrate durchgeführt, das vorhergehende Wachstum erfolgt bei einem pH-Wert von etwa 5 und niedrigerer Belüftung.

Die **Kultivierung** von Mikroorganismen erfolgt im Oberflächenverfahren oder im Submersverfahren (S. 287). Im **Oberflächenverfahren** werden die Mikroorganismen in **Gärkammern** (**Oberflächenreaktor**) in Gärpfannen auf halbfesten Medien bzw. auf der Oberfläche von Flüssigmedien gezüchtet. Der Vorteil dieser Kultivierung liegt in einer guten O_2-Versorgung ohne Einwirkung von Scherkräften. Das ist besonders bei der Produktion einiger Enzyme mit mycelbildenden Pilzen wichtig. Der Nachteil der Oberflächenkultivierung liegt in einem hohen Raum-/Zeitbedarf und in der relativ schlechten Steuerbarkeit. Die meisten Prozesse werden deshalb im **Submersverfahren** in **Fermentern** (**Bioreaktoren**; Arbeitsvolumen von 10 l bis zu 300 m^3) betrieben (Abb. 12.**2**). Diese Verfahren lassen sich bezüglich Nährstoffverteilung, Temperatur und pH-Wert vergleichsweise leicht steuern. Probleme treten bei großen Fermentern durch die aufwendige O_2-Versorgung, die bei der Rührung auftretenden Scherkräfte, die Schaumbildung und die beim Stoffwechsel der Mikroorganismen anfallende Wärme auf. Die meisten Produktionsverfahren werden als **Batch-** oder **Fed-Batch-Kultur** (mit Nährstoffzulauf) betrieben (S. 290). Die kontinuierliche Kultur wird nur bei der Abwasserreinigung im größeren Maßstab verwendet.

Bei der Übertragung von Fermentationsprozessen aus dem Labor- über den Pilot- (Technikums-) zum Produktionsmaßstab (**Maßstabsvergrößerung**, **Scale up**, S. 290) muss beachtet werden, dass mit steigendem Arbeitsvolumen der Transfer von Flüssigkeiten (z. B. das Inokulieren), die gleichmäßige Temperierung und Durchmischung und die Zellabtrennung immer problematischer werden. Alle Schritte des Verfahrensablaufes müssen jeweils neu erprobt und optimiert werden. Die mit der Lösung dieser Probleme verbundenen Investions-

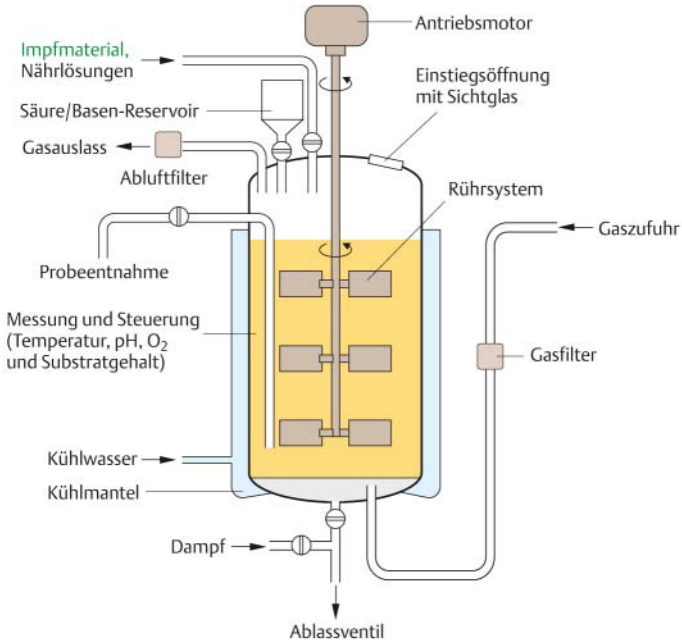


Abb. 12.2 **Aufbau eines in der Biotechnologie genutzten Fermenters.**

und Energiekosten führen in einigen Fällen zu suboptimalen Verfahrensabläufen im Produktionsmaßstab.

Biotechnologie: Anwendung traditioneller und moderner Technologien, in denen biologische Systeme mikrobiellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs oder einzelne Komponenten dieser Systeme für die Produktion von Stoffen und für Dienstleistungen genutzt werden.
Gentechnologie (Gentechnik): Anwendung von molekularbiologischen Methoden zur Neukombination von Erbinformationen verschiedener Organismen durch kontrollierten Eingriff. Gentechnisch veränderte Organismen werden als rekombinante Organismen bezeichnet.
Molekulare Biotechnologie (Moderne Biotechnologie): Biotechnologie mit biologischem System, welches mithilfe von Gentechnik verändert wurde.
Industrielle (weiße) Biotechnologie: Mikrobielle oder enzymatische Herstellung von Produkten im industriellen Maßstab.
Screening: Systematisches Verfahren zur Durchmusterung bzw. Identifizierung von für ein bestimmtes biotechnologisches Verfahren geeigneten Mikroorganismen.

Stammoptimierung: Optimierung von geeigneten Mikroorganismen für den Einsatz in biotechnologischen Verfahren, erfolgt mit klassischen oder gentechnologischen Methoden.
Metabolic Engineering: Veränderung/Optimierung von Stoffwechselleistungen eines Organismus durch gezieltes An-oder Abschalten, Deletion, Überexpression oder Modifikation von Genen (Gentechnik).
GRAS-Status (generally recognized as safe): Organismus, Einzelsubstanz oder Lebensmittel wird als sicher eingestuft.
Oberflächenverfahren (Oberflächenkultur): Kultivierung von Mikroorganismen in Gärkammern in offenen Aluminiumpfannen auf festem oder halbfestem Medium.
Submersverfahren (Submerskultur): Kultivierung von Mikroorganismen in Fermentern in Flüssigkultur.
Fermenter (Bioreaktor): Gefäß, in dem Mikroorganismen in Nährmedium kultiviert werden, um die Zellen selbst, Teile von ihnen oder Stoffwechselprodukte zu gewinnen.
Scale up (Maßstabsübertragung): Übertragung von biotechnologischen Verfahren aus dem Labor- in den Industriemaßstab.

12.2 Lebensmittelherstellung und -veredelung

Fermentierte Lebensmittel sind weit verbreitet und seit langem essentieller Bestandteil der menschlichen Ernährung. Die **mikrobielle Fermentation** führt häufig zu einem länger haltbaren, nahrhafteren, besser verdaulichen, schmackhafteren und toxikologisch und mikrobiologisch einwandfreiem Nahrungsmittel. Bei der Fermentation von Milch- und Molkereiprodukten, Rohwurst und verschiedenen Gemüsen kommen im Wesentlichen **Milchsäurebakterien**, zu einem geringeren Anteil andere Bakterien oder Pilze zum Einsatz, sie werden heute als **Starter-** oder **Schutzkultur** zum Ausgangsprodukt zugegeben. Alkoholische Getränke und Speiseessig werden durch Fermentation mit **Hefen** bzw. mit **Essigsäurebakterien** gewonnen.

12.2.1 Fermentierte Lebensmittel

Die mikrobielle **Fermentation** ist eine sehr alte und weit verbreitete Methode zur Konservierung, Veredelung und Geschmacksverbesserung von **Lebensmitteln**. Während früher undefinierte Mischkulturen verwendet wurden, werden heute Rein- oder Mischkulturen spezieller Mikroorganismen als **Starter-** oder **Schutzkulturen** eingesetzt . Die Mikroorganismen verändern durch ihren Stoffwechsel, hauptsächlich durch Gärung, den pH-Wert und die Zusammensetzung eines Lebensmittels. Bei der Herstellung von **Milch-** bzw. **Molkereiprodukten** werden **Milchsäurebakterien** verwendet, im Wesentlichen *Streptococcus ther-*

mophilus und die Gattungen *Lactococcus* und *Lactobacillus*. Sie vergären den Milchzucker (Lactose) zu Milchsäure.

Bifidobacterium gehört verwandtschaftlich nicht zu den Milchsäurebakterien, sondern zu den Actinobacteria (S. 81) und gilt als **Probiotikum**, also als „Organismus mit gesundheitsfördernder Wirkung auf den Wirt". Entsprechend wird dieser Organismus für die Herstellung probiotischer Joghurts verwendet.

Für die Herstellung von **Sauermilchprodukten** (z. B. Joghurt, Buttermilch) wird die Milch direkt beimpft und unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Zur Herstellung von **Käse** wird die Milch zunächst durch Enzyme (Chymosin oder Labferment), die das Milcheiweiß (Casein) ausfällen, „dickgelegt" und erst dann gezielt mit Mikroorganismen beimpft. Die bei der „Dicklegung" anfallende **Molke** wird z. T. als Substrat für weitere biotechnologische Verfahren eingesetzt. Fermentation und Reifung des Käses erfolgen unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen (Temperatur, oxisch/anoxisch, Luftfeuchtigkeit, Dauer), um die Geschmacks- und Konsistenzeigenschaften des Produktes reproduzierbar zu halten.

Auch bei der Herstellung von **Rohwurst** (z. B. Salami, Cervelatwurst), die ohne Kochvorgang zubereitet wird, setzt man zur Geschmacksverbesserung und Konservierung Milchsäurebakterien der Gattungen *Staphylococcus*, *Lactobacillus* und *Micrococcus* ein. Die aus dem Glykogen des Fleisches gebildete Milchsäure erniedrigt den pH-Wert und verhindert die Besiedelung mit unerwünschten oder pathogenen Mikroorganismen.

12

Eine Reihe von **Gemüseerzeugnissen** wird ebenfalls durch Fermentation konserviert und besser verdaulich gemacht. Die bedeutendsten Produkte sind Sauerkraut (fermentierter Weißkohl) und Sojasauce (Fermentationsprodukt aus Sojabohnen und Weizen). Vor allem in Asien und Afrika sind fermentierte Gemüse weit verbreitet und machen einen wesentlichen Teil der Nahrungsmittel aus.

12.2.2 Alkoholische Getränke

Die wichtigsten alkoholischen Getränke sind Bier, Wein, Schaumweine, Branntweine und Liköre, die alle durch **Alkoholfermentation** mit Pilzen, im Wesentlichen Hefen (***Saccharomyces*-Stämme**), hergestellt werden.

Deutsche **Biere** enthalten in der Regel Gerstenmalz. Nach dem **deutschen Reinheitsgebot** dürfen für die Herstellung von Bier ausschließlich **Wasser**, **Gerste**, **Hopfen** und **Hefe** verwendet werden. In Deutschland bilden die Weizenbiere Kölsch und Altbier Ausnahmen, in anderen Ländern sind auch weitere Zusatzstoffe erlaubt. Das Malz wird geschrotet, gemaischt und geläutert, die resultierende **Würze** mit den gelösten Nährstoffen wird dann mit Hopfen gekocht, was dem Bier Aroma, Schaumvermögen und Haltbarkeit verleiht. Nach Abkühlung dieser **Stammwürze** beginnt der Gärprozess durch Zugabe der **Brauhefe**, die aus Zuckern Ethanol und CO_2 bildet. Bei Lagerbier und Pils wird **untergärige Hefe** (*S. cerevisiae*) verwendet, die sich am Boden des Gärbottichs absetzt. Wei-

zenbiere werden mit **obergäriger Hefe** (z. B. *S. carlsbergensis)*, die an die Oberfläche steigt, hergestellt. Bei Verwendung von obergärigen Hefen wird bei 15–22 °C etwa 4 Tage fermentiert, bei untergärigen bei 6–10 °C für etwa 8 Tage. Nach einer 4–6-wöchigen Lagerung und Nachgärung wird das Bier abgefüllt. Der Alkoholgehalt der verschiedenen Biere hängt vom Extraktgehalt der eingesetzten Stammwürze ab. 2007 wurden in Deutschland über 10 Mrd. und weltweit über 130 Mrd. l Bier hergestellt.

Wein wird durch die Fermentation von Traubenmost mit Hefen hergestellt. Weine aus anderen Ausgangsmaterialien tragen Zusatzbezeichnungen (z. B. Obstwein, Reiswein). Die Technologie der Weinherstellung, die **Kellertechnik**, gliedert sich in Traubenlese, Keltern (Pressmostherstellung), Gärung und Weinausbau. **Weißweine** werden aus hellen Trauben hergestellt, **Rotweine** aus dunklen Trauben, die mit Schalen vergoren werden. Die Mostgärung mit von den Trauben eingebrachten Hefen oder mit Reinzuchthefen (**Weinhefen**, z. B. *Saccharomyces*- und *Kloeckera*-Arten) findet heute fast ausschließlich in Edelstahltanks (20 000–50 000 l) statt und dauert mehrere Wochen. Die Hefe wird dann über Filtration abgetrennt. Bei der Herstellung von **Reiswein** (**Sake**) wird Reisstärke mit *Aspergillus oryzae* verzuckert und danach mit Hefen vergoren.

Bei **Schaumweinen**, die einen hohen CO_2-Gehalt aufweisen, wird das CO_2 dem Wein direkt zugesetzt (**Perlweine**) oder durch eine Nachgärung mit Hefe erzeugt (**Sekt**). Bei der Herstellung von **Champagner** findet die Nachgärung als Flaschengärung statt.

Durch Zugabe von Ethanol, ebenfalls mit *S. cerevisiae* hergestellt und anschließend destilliert (S. 572), wird der Alkoholgehalt bei höherprozentigen Weinen (**Sherry**, **Portwein**) und **Likören** auf über 15 % erhöht.

12.2.3 Essig

Essig (5–6 %ige Essigsäure) ist ein schon sehr lange genutztes Geschmacks- und Konservierungsmittel und wird von säuretoleranten Essigsäurebakterien der Gattungen ***Acetobacter*** (z. B. *A. suboxidans, A. pasteurianum*) und ***Gluconobacter*** (z. B. *G. oxydans*) durch **unvollständigen Abbau von Ethanol** gebildet (unvollständige Oxidation). Beteiligt sind Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase, die Pyrrolochinolinchinon als Elektronenakzeptor nutzen. Die fermentative Essigherstellung aus **Wein** und vergorenen Fruchtsäften geht auf ein Verfahren (**Orleans-Verfahren**) aus dem 14. Jahrhundert zurück, wobei L. Pasteur erst Mitte des 19. Jahrhunderts erkannte, dass Mikroorganismen an dem Prozess beteiligt sind. Heute wird Essig ausgehend von Wein oder Ethanol im Submersverfahren in großen Fermentern unter starker Belüftung und unter Substratnachfütterung (Fed-Batch) mit *Acetobacter* sp. produziert. Die Ausbeuten liegen bei 85–90 %. Weltweit wurden 2006 mehr als 3 Mio. t Essig fermentativ produziert.

Neben dem Speiseessig wird hochkonzentrierte Essigsäure für technische Zwecke (**Eisessig**) chemisch aus Methanol und CO im sogenannten **Monsanto-Prozess** hergestellt.

Mikrobielle Fermentation von Lebensmitteln: Verfahren, um Lebensmittel durch die Aktivität von Mikroorganismen zu konservieren, zu veredeln und geschmacklich zu verbessern.
Starterkultur: Rein- oder Mischkultur definierter Mikroorganismen, die gezielt eingesetzt werden, um durch ihren Stoffwechsel den pH-Wert und/oder die Zusammensetzung eines Lebensmittels zu verändern.
Schutzkultur: Rein- oder Mischkultur definierter Mikroorganismen, die gezielt eingesetzt werden, um das Wachstum von pathogenen Keimen in Lebensmitteln zu hemmen.
Chymosin (Labferment): Enzym zur Caseinfällung bei der Dicklegung von Milch bei der Käseherstellung, traditionelle Gewinnung aus Kälbermägen, Produktion heute mit Mikroorganismen.
Molke: Restflüssigkeit der Käseherstellung, enthält 4–5 % Lactose (Milchzucker), einige Vitamine und Mineralien, jedoch kaum noch Casein und Fett.
Alkoholfermentation: Mikrobielle Umsetzung von Zucker zu Ethanol, in der Regel mit Hefen.
Brauhefen: Für die Bierherstellung eingesetzte Hefen, vergären die bei der Keimung der Braugerste durch Stärke-Hydrolyse freigesetzte Glucose zu Ethanol; untergärige Hefen setzen sich im Gärbottich ab, obergärige Hefe schwimmt auf der Oberfläche der Fermentationsbrühe.
Kellertechnik: Technologie der Weinherstellung: Pressmostherstellung, Gärung, Weinausbau.
Weinhefen: Von den Trauben eingebrachte oder speziell für die Weinherstellung gezüchtete Hefen, die den in Trauben enthaltenen Zucker zu Ethanol verstoffwechseln.
Essigherstellung: Unvollständiger Abbau (Oxidation) von Ethanol zu Essigsäure durch Essigsäurebakterien.

12.3 Stoffproduktion mit Mikroorganismen

Eine Vielzahl von Produkten wird heute mithilfe von Bakterien oder Pilzen hergestellt. **Primärmetabolite** werden dabei in der Regel in der Wachstumsphase, **Sekundärmetabolite** in oder zu Beginn der Stationärphase gebildet. Der typische Ablauf eines biotechnologischen Verfahrens beinhaltet die Herstellung des Kulturmediums und des Inokulums, die Vorbereitung und Durchführung der **Fermentation** und die Aufarbeitung/Reinigung des Produktes (**Downstream Processing**). Im Falle der Produktion von **Starter-**, **Schutz-** oder **Indikatorkulturen** oder von **Einzellerprotein** sind die gezüchteten Mikroorganismen selbst das Produkt. Bedeutende Produkte für **Gesundheit** und **Ernährung** sind Antibiotika, Vitamine, Aminosäuren, organische Säuren, Alkoholika für Genusszwecke oder therapeutisch wirksame Substanzen. Produkte für **technische Zwecke** sind Bioethanol, Lösungsmittel, und Biopolymere. Auch **Enzyme**, häufig Exoenzyme, für die unterschiedlichsten Anwendungsbereiche sind Produkte mikrobieller Fermentationen.

Bei der Produktbildung durch Mikroorganismen können die Wachstumsphase (**Trophophase**) und die Produktionsphase parallel oder sequenziell verlaufen. **Primärmetabolite**, End- oder Zwischenprodukte des Energie- oder Baustoffwechsels (z. B. Ethanol, Milchsäure, Aminosäuren), werden in der Regel während der exponentiellen Wachstumsphase ausgeschieden. Ein solcher Produktionsprozess wird als **Wachstums-gekoppelte Fermentation** bezeichnet. **Sekundärmetabolite**, für das Wachstum nicht essentielle Metabolite (z.B Antibiotika oder einige Exoenzyme), werden erst gegen Ende der Wachstumsphase oder in der Stationärphase, die dann auch **Idiophase** genannt wird, ausgeschieden. Hier handelt es sich um **Wachstums-entkoppelte Fermentation**.

In der Biotechnologie werden mikrobielle Verfahren in größerem Maßstab generell als **Fermentation** bezeichnet, unabhängig davon, ob sie aerob oder anaerob gefahren werden.

12.3.1 Ablauf biotechnologischer Produktionsverfahren

Der Ablauf eines typischen mikrobiellen Produktionsverfahrens ist in Abb. 12.**3** dargestellt. Die bei Prozessen im größeren Maßstab oft verwendeten komplexen, relativ undefinierten **Substratgemische** werden zunächst analysiert (z. B. C-, N-, P-, S-Gehalt; Reinheit) und dann entsprechend dosiert zum **Fermentationsmedium** gegeben, das die restlichen Makro- und Mikroelemente in ausgewogenen Konzentrationen enthalten muss. Die **Sterilisation** des fertigen Mediums erfolgt im kleinen Maßstab durch Autoklavieren, im Produktionsmaßstab durch kontinuierliche Dampfsterilisation im Fermenter (wenige Minuten bei 140 °C). Hitze-empfindliche Nährstoffe, z. B. Vitamine, werden über Sterilfiltration zugegeben. Das **Inokulum** muss stoffwechselaktiv, frei von Kontaminationen und für großvolumige Fermenter in ausreichender Menge vorhanden sein. Bei einem 100 000-l-Fermenter werden 3000 bis 10 000 l Inokulum benötigt.

Im Mittelpunkt des Prozesses steht die **Fermentation**, die aerob oder anaerob in Gärkammern oder Fermentern stattfindet. Für Einstellung und Aufrecherhaltung optimaler Wachstums- und Produktionsbedingungen sorgt die **Mess-** und **Regeltechnik**. Die Erfassung einer Reihe von physikalischen und analytischen Daten zum aktuellen Zustand des Systems einerseits und die Kenntnisse über den optimalen Zustand des Verfahrens andererseits erlauben bei entsprechender technischer Ausstattung eine gezielte und effiziente Steuerung der Fermentation. Zu den **Messgrößen** gehören der pH-Wert, die Temperatur, der Druck, die Rührerdrehzahl, der O_2-Partialdruck, die Biomassekonzentration und die Substrat- und Produktkonzentrationen. Je nach Verfahren werden auch CO_2-Partialdruck, Viskosität der Kulturbrühe, Nebenprodukte oder Enzymaktivitäten des biologischen Systems erfasst. Aus den Messgrößen lassen sich dann die Wachstumsrate (μ), die O_2- und Substratverbrauchsraten, die Produkt-/Nebenprodukt-/CO_2-Bildungsraten, der Wachstumsertrag (g Biomasse/g Substrat), der Produktertrag (g Produkt/g Substrat) und die Produktivität (g Produkt/Zeit)

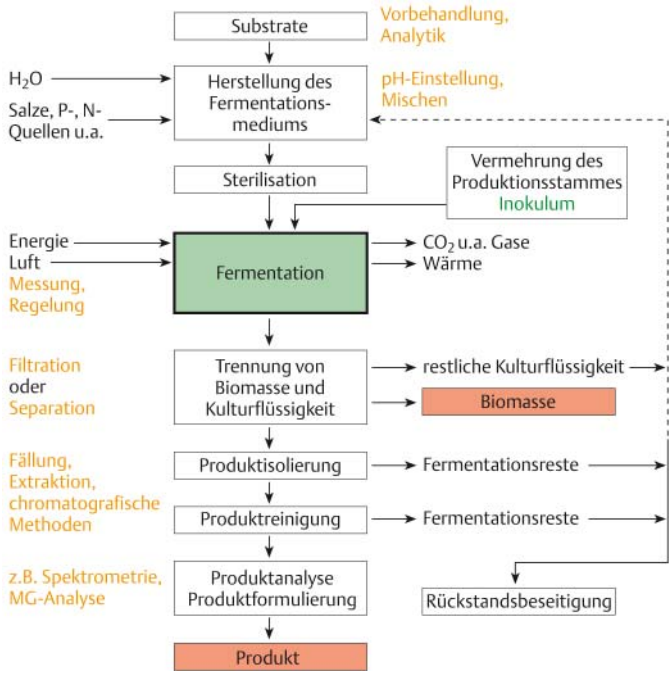


Abb. 12.3 **Ablauf typischer biotechnologischer Produktionsverfahren.**

ableiten. Diese Informationen geben Aufschluss über den Verlauf der Fermentation und kennzeichnen den Prozess.

Nach Beendigung der Fermentation beginnt die **Aufarbeitung des Produktes**, das „**Downstream Processing**". Das Produkt kann die Biomasse selbst, ein Bestandteil der Biomasse (z. B. ein Enzym) oder ein von den Mikroorganismen ausgeschiedener Primär- oder Sekundärmetabolit sein. In den meisten Fällen besteht der erste Schritt der Aufarbeitung in der **Abtrennung der Biomasse**. Dies geschieht in der Regel bei mycelbildenden Pilzen und Bakterien über Filtration (in Filterpressen), ansonsten mit Zentrifugen, die im kontinuierlichen Betrieb Trennleistungen von bis zu 100 m^3 pro h erreichen. Einige Organismen, z. B. Hefen, setzen sich unter bestimmten Bedingungen in kurzer Zeit ab (Flockulation), was als Vorstufe für die Zentrifugation (Separation) genutzt werden kann.

Wenn das Ziel des Verfahrens ein intrazelluläres Produkt ist, steht vor der Produktreinigung der **Zellaufschluss** (**Zellextraktion**). Dieser erfolgt abhängig von der Empfindlichkeit des Produktes über physikalische Methoden (Mahlen in

Rührwerkskugelmühlen, Dekompression in Hochdruckhomogenisatoren), chemische Methoden (Zellwandlyse durch Säuren, Detergentien, organische Lösungsmittel) oder durch enzymatische Zelllyse.

Ausgehend von der Kulturbrühe oder vom Zellextrakt erfolgt die **Produktisolierung**. Dabei wird in vielen Fällen das Produkt zunächst über Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (z. B. Antibiotika) oder wässrigen 2-Phasengemischen (Proteine), über Fällung mit Salzen oder durch Änderung des pH-Wertes (organische Säuren, Antibiotika, Proteine) oder über Adsorption an unlösliche Materialien (Proteine) angereichert. Die **Produktreinigung** erfolgt dann meistens über chromatographische Methoden (hauptsächlich Ionenaustausch-, Adsorptions-, Molekularsieb- und Affinitäts-Chromatographie), über Kristallisation oder Membrantrennverfahren (Dialyse, Mikrofiltration, Ultrafiltration, Umkehrosmose).

Am Ende des Verfahrens steht die **Produktanalyse** (Menge, Reinheit, Aktivität) und die **Produktformulierung**, d. h. die Überführung in ein lager- und transportfähiges Produkt (wenig Gewicht, geringes Volumen). Dies geschieht in Abhängigkeit von der Temperaturempfindlichkeit durch Kontakttrocknung auf Blechen im Trockenschrank (z. B. Futterhefen), Sprühtrocknung nach Zerstäubung der Lösung oder Suspension in einem Heißluftstrom (z. B. Aminosäuren) oder Gefriertrocknung (Vitamine, Enzyme, viele Pharmaprodukte). Vielen Produkten werden bei der Formulierung stabilisierende Substanzen oder spezielle Zusätze für die Überführung in die Tabletten- oder Granulatform zugesetzt.

12.3.2 Biomasse als Produkt

Bei einigen biotechnologischen Verfahren ist die **Biomasse** selbst das gewünschte Produkt, z. B. die **Hefe** ***Saccharomyces cerevisiae***, die im großen Maßstab für die Backwarenherstellung mit Rüben- oder Rohrzuckermelasse als Substrat unter aeroben Bedingungen hergestellt wird (weltweit etwa 1,8 Mio. t/Jahr). Als **Starter- und Schutzkulturen** dienen **Milchsäurebakterien** (für Sauermilchprodukte, Käse, Sauerteig, Wurst), **Hefen** (Brauereiprodukte) und **Schimmelpilze** (Käse, Wurst, Sojasoße) (S. 556). **Indikatorkulturen** werden zum Nachweis von Schadstoffen oder pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln verwendet oder in technischen Bereichen eingesetzt. Beispielsweise wird die Validierung von Autoklaven mit dem thermophilen Sporenbildner *Bacillus stearothermophilus* durchgeführt.

Um den weltweit ansteigenden Proteinbedarf zu decken, wird seit Ende der 1970iger Jahre **Einzellerprotein** (**single cell protein**) produziert, hauptsächlich **Futterhefen** (*Hansenula, Candida, Pichia*) und **Bakterien** (*Methylophilus, Methylomonas*). Diese Organismen werden mit Abfall- und Nebenprodukten der Landwirtschaft und der Lebensmittelindustrie (z. B. Melasse, Molke) oder auf Methanol (methylotrophe Organismen) gezüchtet und im Wesentlichen als protein- und vitaminhaltiges Tierfutter verwendet. Im Vergleich zur Sojapflanze hat

mikrobielle Biomasse einen deutlich höheren Proteingehalt, jedoch auch einen höheren Anteil an (unerwünschten) Nucleinsäuren und Fetten.

Die Biomasse selbst ist auch das primäre Produkt, wenn die Gewinnung eines intrazellulär vorliegenden Enzyms Ziel des biotechnologischen Verfahrens ist. Die meisten biotechnologisch interessanten Enzyme sind jedoch Exoenzyme, die aus dem Kulturüberstand gewonnen und nicht aus den Zellen selbst isoliert werden.

Fermentation: Kultivierung von Mikroorganismen im technischen Maßstab (1 l–500 m^3), unabhängig davon, ob sie aerob oder anaerob erfolgt.
Trophophase: Logarithmische Wachstumsphase.
Idiophase: Produktionsphase nach der Trophophase, d. h. in der Stationärphase des Wachstums.
Primärmetabolite: Zwischen- oder Endprodukte des Primärstoffwechsels, z. B. Ethanol, Milchsäure, Aminosäuren. Die Produktion erfolgt in der Regel in der Trophophase und ist an das Wachstum gekoppelt.
Sekundärmetabolite: Zwischen- oder Endprodukte des Sekundärstoffwechsels, z. B. Antibiotika, Exopolysaccharide. Die Synthese erfolgt in der Idiophase und ist nicht an den Energiestoffwechsel gekoppelt.
Downstream Processing: Aufarbeitung des Produktes einer Fermentation. Darunter fallen Abtrennung der Biomasse, Zellaufschluss, Produktanreicherung und -reinigung, Produktanalyse und -formulierung.
Indikatorkulturen: Rein- oder Mischkulturen von Mikroorganismen, die zum Nachweis von Schadstoffen oder Pathogenen in Lebensmitteln oder für technische Zwecke genutzt werden.
Einzellerprotein (single cell protein): Einzellige Mikroorganismen, die im großen Maßstab gezüchtet und als protein- und vitaminhaltiges Tierfutter verwendet werden.

12.3.3 Mikrobielle Produkte für Gesundheit und Ernährung

Antibiotika

Antibiotika sind typische **Sekundärmetabolite** von Mikroorganismen, die seit etwa 1942 in großem Maßstab fermentativ hergestellt und gegen Infektionskrankheiten eingesetzt werden (S. 538, S. 546). Die meisten Antibiotika werden von Bakterien (hauptsächlich Actinomyceten) und Pilzen (*Penicillium, Acremonium*) produziert. Heute werden von den rund 8000 bekannten Antibiotika etwa 200 industriell produziert und für **Therapiezwecke**, **Tiermast**, **Tier-** und **Pflanzenschutz** eingesetzt. Der Umsatz wird weltweit auf mehr als 30 Mrd. € und über 50 000 t pro Jahr geschätzt. Zur Anwendung kommen meist **halbsynthetische Antibiotika**, in denen die biologisch aktive Leitstruktur chemisch oder durch Biokonversion mit Enzymen bzw. durch gentechnische Veränderung der Produzentenstämme modifiziert wurde, um ein breiteres Wirkungsspektrum, die Verbesserung der Effizienz und der Pharmakokinetik zu erreichen und die

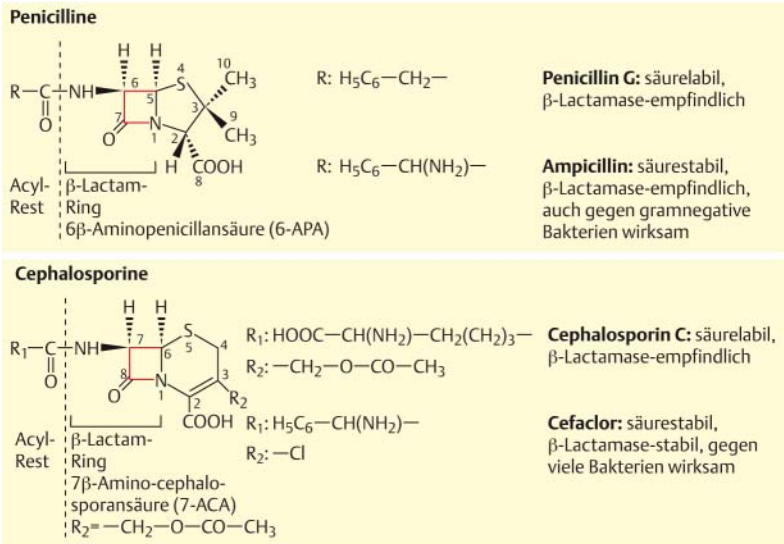
oft beträchtlichen Nebenwirkungen im Therapieeinsatz zu verringern. Wegen wachsender Resistenzprobleme werden auch heute noch aufwendige Screeningverfahren durchgeführt und ständig neue Antibiotika und Antibiotikabildner gefunden. Neue Wirkstoffe werden durch **Drug Design** (📖*Zellbiologie, Biochemie*) entwickelt, eine Methode, bei der mit Computermodellen Modifikationen bekannter Antibiotika simuliert und auf ihre Wirksamkeit gegenüber dem Zielorganismus (bzw. der Zielstruktur im zu bekämpfenden Organismus) überprüft werden.

Je nach Substanzklasse wirken Antibiotika gegen gramnegative und/oder grampositive Bakterien und Pilze, **Wirkort** sind Zellstrukturen oder Stoffwechselwege. Gegenüber seinen eigenen Antibiotika ist ein Mikroorganismus natürlicherweise resistent. Antibiotikaresistenzen, die sekundär erworben werden, z. B. über Plasmidtransfer, beruhen auf unterschiedlichen Mechanismen und stellen ein wachsendes Problem für den therapeutischen Einsatz dar (S. 248). Antibiotika lassen sich nach ihrer chemischen Leitstruktur unterteilen.

Verschiedene **synthetische Wirkstoffe** haben ebenfalls antimikrobielle Wirkung und werden häufig als Antibiotika bezeichnet, jedoch nicht von Mikroorganismen hergestellt. Zu diesen zählen Wachstumsfaktoranaloga (z. B. Sulfonamide), Nucleinsäureanaloga (z. B. 5-Fluor- oder 5-Bromuracil) und Gyrasehemmstoffe (Chinolone). Auch Chloramphenicol, ursprünglich aus *Streptomyces venezuelae*, wird heute ausschließlich chemisch synthetisiert, aber wegen seiner knochenmarkschädigenden Nebenwirkungen nur noch stark eingeschränkt verwendet.

β-Lactam-Antibiotika, deren gemeinsames Strukturmerkmal der **β-Lactamring** ist (Abb. 12.**4**), zeichnen sich durch hohe Wirksamkeit, gute Verträglichkeit und geringe Nebenwirkungen aus. Sie wirken als Hemmstoffe der bakteriellen **Zellwandsynthese**, indem sie an die **Transpeptidasen** (auch Penicillin-Binde-Proteine genannt) binden, deren Aktivität hemmen und damit die Quervernetzung des Peptidoglykans verhindern (S. 440). Wachsende Bakterien lysieren in Anwesenheit von β-Lactam-Antibiotika aufgrund der unterschiedlichen osmotischen Drücke im Zellinneren und der Umgebung, d. h. diese Antibiotika wirken unter diesen Bedingungen **bakterizid**.

Die natürlich vorkommenden β-Lactame bieten vielfache Möglichkeiten zur Modifizierung, was zu einer Vielzahl von **halbsynthetischen Derivaten** mit verbesserten Wirkungsspektren, pharmakologischen oder anderen Eigenschaften (z. B. Säurefestigkeit und Möglichkeit der oralen Verabreichung) geführt hat. Die wichtigsten natürlichen Ausgangsderivate sind **Penicillin G** und **Cephalosporin C**, die über enzymatische Abspaltung von Seitenketten an Position 6 bzw. 7 des β-Lactamrings zu **6-Aminopenicillansäure** (**6-APA**) bzw. **7-Aminocephalosporansäure** (**7-ACA**) umgewandelt werden (Abb. 12.**4**). 6-APA und 7-ACA sind die häufigsten Zwischenprodukte für die Herstellung der Derivate, die dann an den Positionen 6 bzw. 7 die unterschiedlichsten Reste tragen. Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und ihrer breiten Wirksamkeit sind Cephalosporine heute die wichtigsten Antibiotika, zusammen mit den Penicillinen machen sie



12

Abb. 12.4 **β-Lactam-Antibiotika.** Penicilline bestehen aus der 6-APA, Cephalosporine aus der 7-ACA, jeweils mit unterschiedlichen Seitenketten (R). Die Carboxylgruppe liegt je nach pH-Wert geladen oder ungeladen vor.

weit über die Hälfte aller weltweit produzierten Antibiotika aus (> 30 000 t; Marktwert etwa 15 Mrd. €).

Penicillin G wird mit dem Pilz ***Penicillium chrysogenum*** produziert, **Cephalosporin C** mit ***Acremonium chrysogenum*** (früher *Cephalosporium acremonium)*. Beide Substanzen werden im Submersverfahren in Fermentern bis 200 m^3 unter starker Belüftung produziert. Die komplexen Medien enthalten zunächst Lactose und Maisquellwasser; in der Idiophase, die mehrere Tage dauern kann, wird dann kontinuierlich Glucose und NH_3 zugegeben (Fed-Batch). Die Ausbeuten liegen bei > 50 g/l. Nach Abtrennung des Mycels wird Penicillin G durch zweistufige Extraktion (im Sauren bei pH < 2,5 mit Butyl- oder Amylacetat, anschließend im Neutralen mit KOH) extrahiert und umkristallisiert oder mit Kaliumsalz gefällt. Cephalosporin C wird durch Membrantrennverfahren und Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. ◀

Die zunehmenden **Resistenzen** gegenüber β-Lactam-Antibiotika beruhen im Wesentlichen auf dem Besitz von **β-Lactamasen** (**Penicillinasen**), die den β-Lactamring spalten. Durch gleichzeitige Gabe von **Clavulansäure**, einem antimikrobiell nur schwach wirksamen β-Lactam-Antibiotikum, das jedoch **β-Lactamasen** inhibiert, kann die Wirksamkeit von Penicillinen und Cephalosporinen wiederhergestellt werden.

Glykopeptid-Antibiotika setzen sich aus **glykosylierten Heptapeptiden** mit aromatischen Seitenketten zusammen (Abb. 12.**5a**), wobei das Heptapeptid nicht ribosomal gebildet wird. Sie wirken auf die bakterielle **Zellwandwandsynthese**, indem sie bei der Synthese an UDP-Muramyl-Pentapeptid (Abb. 9.**27** S. 438) binden und die Transpeptidierung und Quervernetzung des Mureins verhindern.

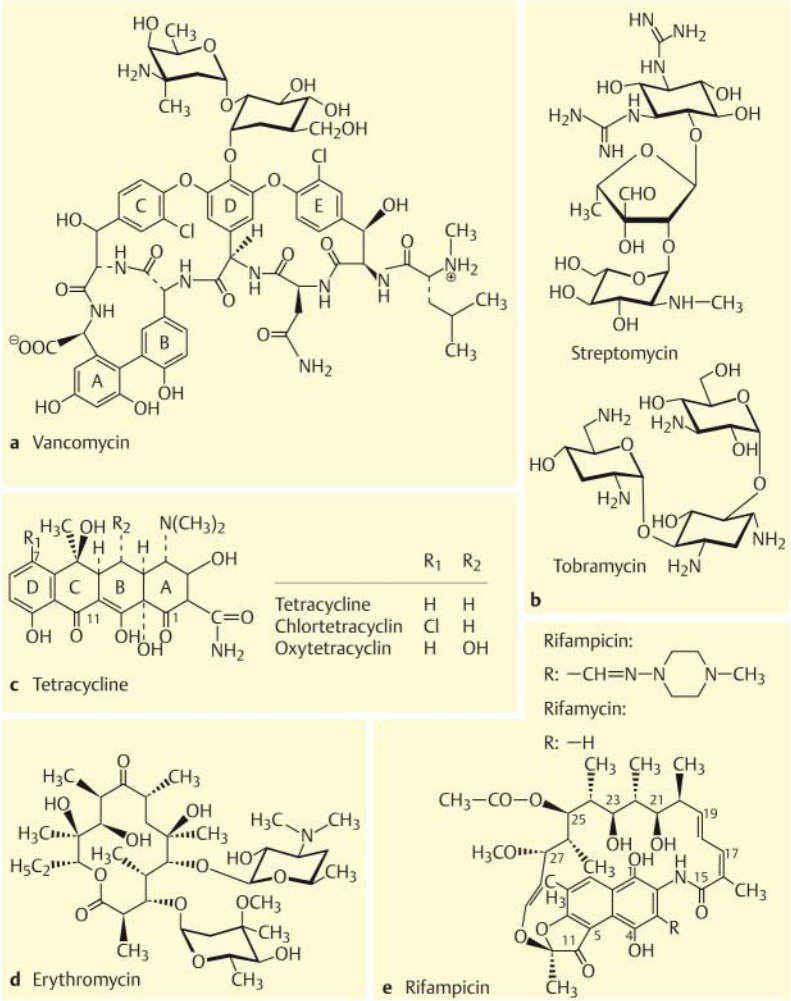


Abb. 12.**5** **Strukturen wichtiger Antibiotika.**

Wie β-Lactam-Antibiotika sind Glykopeptid-Antibiotika unter Wachstumsbedingungen **bakterizid**, dabei zeigen sie die beste Wirkung gegen grampositive Bakterien (die äußere Membran gramnegativer Bakterien verhindert die Aufnahme weitgehend). Sie gelten als **Reserve-Antibiotika**, die gegen multiresistente Enterokokken und Staphylokokken (z. B. Methicillin-/Oxacillin-resistente *S. aureus*-Stämme; MRSA bzw. ORSA) sowie gegen *Clostridium difficile* eingesetzt werden und haben deshalb große klinische Bedeutung. Die bekanntesten Glykopeptid-Antibiotika sind **Vancomycin**, **Teicoplanin** und das bis vor wenigen Jahren in der Tiermast eingesetzte **Avoparcin**. Vancomycin wird von ***Amycolatopsis orientalis***, Teicoplanin von ***Actinoplanes teichomyceticus*** und Avoparcin von ***Streptomyces candidus*** (alle Ordnung Actinomycetales) gebildet.

Lange Zeit waren keine **Resistenzen** gegenüber Glykopeptid-Antibiotika bekannt, inzwischen wurden aber resistente Enterokokken gefunden. Die Resistenz beruht auf einem **veränderten UDP-Muramyl-Pentapeptid** (D-Lactat statt D-Alanin als endständiger Rest), welches sehr viel schlechter von dem Antibiotikum erkannt wird.

Aminoglykoside bestehen aus einem **Aminocyclohexanring**, der mit **Aminozuckern** über glykosidische Bindungen verknüpft ist (Abb. 12.**5b**). Die meisten Aminoglykosid-Antibiotika besitzen ein breites Wirkungsspektrum, allerdings haben sie z. T. schwere Nebenwirkungen, und es treten häufig Resistenzen auf. Deshalb ist ihre Bedeutung in der Therapie begrenzt, sie werden nur als Reserve-Antibiotika in der Intensivmedizin (z. B. bei Hirnhautentzündungen oder Mukoviszidose), auf Oberflächen (Hautkrankheiten) und im Tier- und Pflanzenschutz eingesetzt. Aminoglykosid-Antibiotika wirken **bakterizid**; durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen verursachen sie Fehler bei der Translation und eine **Hemmung der Proteinbiosynthese**. Bisher wurden mehr als 100 verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika gefunden, die meisten wurden aus Actinomyceten der Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora* isoliert, die wichtigsten sind **Streptomycin**, **Neomycin**, **Kanamycin**, **Gentamycin**, **Spektinomycin**, **Hygromycin** und das halbsynthetische **Tobramycin**. Der Marktwert der biotechnologisch hergestellten Aminoglykoside liegt mit etwa 700 Mio. € bei etwa 5 % des gesamten Antibiotika-Marktwertes.

12

Die Produktion von **Aminoglykosid-Antibiotika** erfolgt aerob im Fed-Batch-Verfahren in Fermentern (bis 150 m^3) mit Glucose, Stärke und Sojamehl als Substraten. Mycelgebundene Aminoglykoside werden durch Ansäuern auf pH 2 abgelöst. Die Ausbeute nach mehreren Tagen liegt bei etwa 15 g/l. Da häufig Gemische von Aminoglykosiden gebildet werden, ist die Aufreinigung aufwendiger als bei den β-Lactamen. Nach Abtrennung der Biomasse erfolgt sie durch Ionenaustauscher, Ausfällung und gegebenenfalls weitere chromatographische Verfahren. ◀

Die **Resistenz** gegen Aminoglykoside beruht auf dem Besitz von Enzymen, die das Antibiotikum durch **Modifikation** (Phosphorylierung, Acetylierung oder Adenylierung) inaktivieren und damit die Bindung an die ribosomale Untereinheit verhindern.

Tetracycline sind Breitband-Antibiotika und bestehen aus einem 4-Ringsystem (Naphtocenringsystem) mit mehreren Substituenten (Abb. 12.**5c**). Durch Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit verhindern sie die Elongation bei der Proteinbiosynthese und wirken **bakteriostatisch** (**wachstumshemmend**). Tetracycline werden ausschließlich von **Streptomyceten** gebildet und sind von Natur aus optimiert, es gibt nur wenige halbsynthetische Derivate mit breiterem Wirkungsspektrum oder höherer Effizienz. Neben den β-Lactamen werden Tetracycline in der Infektionstherapie am häufigsten eingesetzt. Durch die außerhalb der EU praktizierte Nutzung als Nahrungsergänzungsmittel in der Tiermast wird die Verbreitung von Resistenzen gefördert. Die wirtschaftliche Bedeutung der Tetracycline ist mit der von Aminoglykosiden vergleichbar. Die bedeutendsten Tetracycline sind **Tetracyclin**, **Chlortetracyclin** (**Aureomycin**) und **Oxytetracyclin**.

▶ Die Produktion der genannten **Tetracycline** erfolgt mit ***Streptomyces aureofaciens*** bzw. ***S. rimosus***, unter PO_4^{3-}-Limitierung im Fed-Batch-Verfahren in Fermentern mit Saccharose und Maisquellwasser als Substraten. Die Ausbeute liegt nach 3 Tagen bei > 25 g/l, die Aufreinigung ist aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit einfach und erfolgt nach Abtrennung des Mycels über mehrfache Extraktion mit Butylacetat. ◀

Resistenzen gegen Tetracyclin sind relativ weit verbreitet und beruhen entweder auf der **Ausschleusung** des Antibiotikums durch aktiven Transport oder auf einer Strukturänderung der ribosomalen Bindestelle.

Makrolide bestehen aus großen Lactonringsystemen mit Zucker- oder Aminozuckerresten (Abb. 12.**5d**). Es gibt viele **natürliche** Makrolid-Antibiotika, die wegen ihrer guten Verträglichkeit und geringen Toxizität in der Medizin, aber auch in der Tiermast, verwendet werden. Makrolide bewirken durch Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheiten eine Hemmung der Elongation bei der **Proteinbiosynthese**. Ihre Wirkung ist **bakteriostatisch**, vor allem bei grampositiven Bakterien. Das bekannteste Makrolid ist das **Erythromycin**, neuere Varianten sind **Clarithromycin** und **Azithromycin**. Polyen-Antibiotika, eine Untergruppe der Makrolide, wirken auf pilzspezifische Sterole (Ergosterol) und damit fungistatisch (pilzhemmend). Der Marktwert der Makrolide liegt bei etwa 15 % (4 Mrd. €) des Gesamtwertes für Antibiotika.

▶ **Erythromycin** wird mit ***Saccharopolyspora erythrea*** (früher *Streptomyces erythrea*) in großen Fermentern (150 m^3) im Fed-Batch-Verfahren mit Glucose und Sojamehl als Substraten produziert. Die Ausbeuten liegen nach 3 Tagen bei 7 g/l. Nach Zellabtrennung erfolgt die Reinigung durch Essigsäurebutylester-Extraktion, chromatographische Verfahren und Umkristallisation. ◀

Die **Resistenz** gegenüber Makrolid-Antibiotika wird durch Methylierung der 23S RNA bewirkt (**Wirkortresistenz**).

Ansamycine besitzen einen großen Makrolactamring (Abb. 12.**5e**) und wirken auf grampositive Bakterien, besonders gut auf Mykobakterien. Auch von dieser Gruppe gibt es viele Derivate, sie wirken **bakterizid**, indem sie die DNA-abhängige RNA-Polymerase und damit die **Transkription inhibieren**. Die bedeutendsten Ansamycine sind **Rifamycin**, das von ***Amycolatopsis mediterranei*** gebildet wird, und **Rifampicin**, ein halbsynthetisches Derivat. Weitere natürliche Ansamycine werden von Vertretern der Gattungen *Nocardia, Micromonospora* und *Streptomyces* gebildet.

Die Produktion und auch die Reinigung von Rifamycin erfolgt mit *A. mediterranei* in einem Verfahren, welches identisch zum Verfahren der Erythromycinproduktion ist (s. o.).

Die **Resistenz** gegenüber Ansamycin-Antibiotika beruht auf Punktmutationen in der β-Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (**Wirkortresistenz**).

Vitamine

Vitamine werden zur **Nahrungs-** und **Futtermittelergänzung** eingesetzt und vorwiegend chemisch synthetisiert, zurzeit werden nur Vitamin B_2, Vitamin B_{12} und Vitamin C biotechnologisch mit Mikroorganismen hergestellt. Vom Marktwert liegen die Verkaufszahlen von Vitaminen (> 2 Mrd. €/Jahr) an dritter Stelle hinter denen der Antibiotika und der Aminosäuren.

12

Vitamin B_2 (Riboflavin) bildet den Hauptbestandteil der Flavin-haltigen Coenzyme FAD und FMN, die als Wasserstoff- und Elektronendonoren im Stoffwechsel fast aller Organismen Bedeutung haben. Riboflavin wird von vielen Bakterien, Hefen und Hyphenpilzen synthetisiert.

Für die industrielle Produktion von **Riboflavin** werden gentechnisch optimierte Stämme des Pilzes ***Ashbya gossypii*** verwendet, der besonders mit Melasse und Pflanzenölen auf Sojabasis hohe Erträge (> 15 g/l in 3 Tagen) liefert. Alternativ wird Riboflavin auch mit rekombinanten Stämmen von ***Bacillus subtilis*** mit Glucose als Substrat hergestellt. Die Jahresproduktion von Riboflavin liegt bei über 30 000 t/Jahr. ◀

Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin) ist Cofaktor bei einer Reihe von Reaktionen, bei denen es zu intramolekularen Umlagerungen kommt, und wird in der Natur ausschließlich von Mikroorganismen synthetisiert. Vitamin B_{12}-Mangel führt zu **perniziöser Anämie**.

Für die biotechnologische Herstellung von **Vitamin B_{12}** werden ***Propionibacterium shermannii*** oder ***Pseudomonas denitrificans*** mit Melassen als Substrat eingesetzt, die Ausbeuten nach 4 Tagen Fermentation liegen unter 200 mg/l, entsprechend liegt die Jahresproduktion bei nur etwa 20 t, der Weltmarktpreis bei 25 000 €/kg. ◀

Vitamin C (Ascorbinsäure) wirkt im Stoffwechsel als Antioxidationsmittel und wird von Bakterien und Pflanzen gebildet. Vitamin C-Mangel führt zu **Skorbut**.

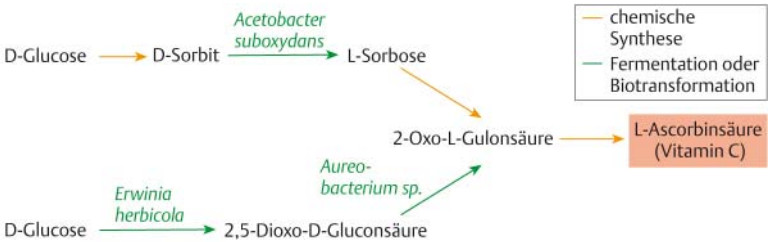


Abb. 12.**6** **Chemisch-mikrobiologische Synthese von Vitamin C.**

Es wird als Vitaminpräparat, in der Tierzucht als Futtermittelergänzung und als Antioxidations- und Konservierungsmittel eingesetzt.

Für die Produktion von **Vitamin C** werden mehrere Verfahren eingesetzt (Abb. 12.**6**), wobei der letzte Schritt von der 2-Oxo-L-Gulonsäure zur L-Ascorbinsäure immer chemisch (säurekatalysiert) abläuft. Bis zur 2-Oxo-L-Gulonsäure kommt man **chemisch-mikrobiologisch** über die **Reichstein-Synthese** von D-Glucose über D-Sorbit und L-Sorbose, wobei nur die Oxidation von Sorbit zu Sorbitol mit ***Acetobacter suboxydans*** durchgeführt wird. Alternativ wird D-Glucose mit ***Erwinia herbicola*** zu 2,5-Dioxo-D-Gluconsäure oxidiert und anschließend mit ***Aureobacterium* sp.** zu 2-Oxo-L-Gulonsäure reduziert (**Sonoyama-Verfahren**). Neuerdings wird versucht, die Synthese von Vitamin C über den 2,5-Dioxo-D-Gluconsäure-Weg mit einem gentechnisch veränderten Stamm von *E. herbicola* in einem einstufigen mikrobiellen Verfahren zu etablieren. Die Jahresproduktion von Vitamin C liegt bei über 100 000 t bei einem Preis von etwa 8 €/kg. ◀

Aminosäuren und andere Metabolite, Impfstoffe, Pharmaka

Aminosäuren: Essentielle L-Aminosäuren (L-Histidin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Methionin, L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin) werden als Tierfutter- oder Nahrungsmittelzusatz, aber auch als Ausgangssubstanz für Feinchemikalien oder im medizinischen Bereich für Infusionslösungen und andere Pharmaprodukte hergestellt, **nicht essentielle Aminosäuren** als Geschmacksverstärker und Würzmittel (L-Glutamat), für Süßungsmittel (L-Aspartat und L-Phenylalanin als Bestandteile von Aspartam) und für die Kosmetikindustrie (L-Cystein, L-Serin, Glycin).

Die **Aminosäure-Produktion** erfolgt meist durch fermentative Produktion mit Bakterien (Tab. 12.**1**), durch Proteinhydrolyse und Extraktion (L-Serin, L-Cystein, L-Tyrosin), chemische Synthese (D/L-Methionin, D/L-Alanin) oder Biotransformation mit Enzymen aus kostengünstigen Vorstufen (L-Aspartat, L-Leucin). Die mikrobielle Produktion hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, dass die biologisch aktive L -Form und nicht das aufwendig zu trennende Racemat aus D- und L-Aminosäuren entsteht. D/L-Methionin, das von Tieren in die L-Form

Tab. 12.1 **Fermentativ hergestellte Aminosäuren und deren Anwendung.**

Aminosäure	*Produktion [t/Jahr]**	*Organismus*	*Verwendung*
L-Glutamat	> 1 500 000	*C. glutamicum*	Würzmittel/ Geschmacksverstärker
L-Lysin	> 800 000	*C. glutamicum*	Futtermittel
L-Threonin	85 000	*E. coli*	Futtermittel
L-Phenylalanin	15 000	*E. coli*/ *C. glutamicum*	Aspartam, Medizin
L-Tryptophan	> 2000	*E. coli*/ *C. glutamicum*	Futtermittel
L-Valin	> 1000	*Serratia marcescens*/ *C. glutamicum*	Medizin, Vorstufe für chemische Synthesen
L-Isoleucin	> 1000	*E. coli*/ *C. glutamicum*	Futtermittel

* im Jahr 2005

überführt werden kann, ist deshalb die einzige Aminosäure, die in großem Maßstab chemisch synthetisiert wird (über 500 000 t/Jahr).
Weltweit werden jährlich über 3 Mio. t Aminosäuren mit einem Marktwert von 4,5 Mrd. € hergestellt. Die größten Anteile entfallen dabei auf **L-Glutamat** und **L-Lysin**, die beide mit ***Corynebacterium glutamicum*** unter aeroben Bedingungen im Fed-Batch-Verfahren in großen Rührkesselfermentern (> 200 m^3) mit Melassen, Stärkehydrolysaten und Maisquellwasser als Ausgangssubstraten hergestellt werden. Die Ausbeuten betragen für beide Aminosäuren mehr als 120 g/l in 3 Tagen. Die Produktion von Glutamat erfordert Biotinlimitierung, Detergenzzugabe oder die Gabe von subletalen Dosen von Penicillin. Die Produktion von Lysin (S. 407) und anderen fermentativ erzeugten Aminosäuren erfolgt mit gentechnisch im Biosyntheseweg, in der Regulation und im Transport optimierten Stämmen von *C. glutamicum* oder *E. coli*. Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft weitere bisher über Hydrolyse und Extraktion gewonnene Aminosäuren mithilfe von rekombinanten Mikroorganismen hergestellt werden. ◀

Verschiedene **organische Säuren** werden vor allem als Säuerungs- und Konservierungsmittel für die Lebensmittel- und Getränkeindustrie mit Mikroorganismen in großen Mengen hergestellt.

Citronensäure, ein zentrales Stoffwechselintermediat der meisten aeroben Organismen (S. 355), wird hauptsächlich als Säuerungsmittel (Getränke, Marmelade, Süßigkeiten), aber auch als Komplexbildner, Konservierungsmittel und zur Wasserentkalkung verwendet. Citronensäure wird heute ausschließlich mit *Aspergillus niger* produziert. Dieser Pilz scheidet Citronensäure, obwohl kein Sekundärmetabolit, in der späten exponentiellen und stationären Wachstumsphase aus.

Wegen der gegenüber dem Oberflächenverfahren in Aluminium-Gärpfannen besseren Raum-/Zeit-Ausbeuten erfolgt die **Citronensäure-Produktion** heute größtenteils im Submersverfahren in Fermentern (> 100 m^3) mit Melassen, Stärkehydrolysaten und Saccharose als Substraten (Abb. 12.**7**). In der Produktionsphase sind insbesondere eine gute O_2-Versorgung, ein pH-Wert von < 2,5 und sehr geringe Mn^{2+}- und Fe^{2+}-Konzentrationen wichtig, um die Citronensäure umsetzende Aconitase zu hemmen und die Kontaminationsgefahr zu senken. Nach der 4-tägigen Produktionsphase wird das Mycel abgefiltert und die Citronensäure über Fällungsschritte und Kristallisation in hochreiner Form gewonnen. Die Ausbeuten liegen bei über 85 %, die Weltjahresproduktion lag 2006 bei etwa 1 Mio. t bei einem Preis von 800 €/t. ◀

Fermentativ gewonnene **Milchsäure**, das Endprodukt des Gärungsstoffwechsels von Milchsäurebakterien (S. 376), wird in der Kosmetik und in der pharmazeutischen Industrie sowie als Säuerungsmittel für Getränke und Süßwaren genutzt.

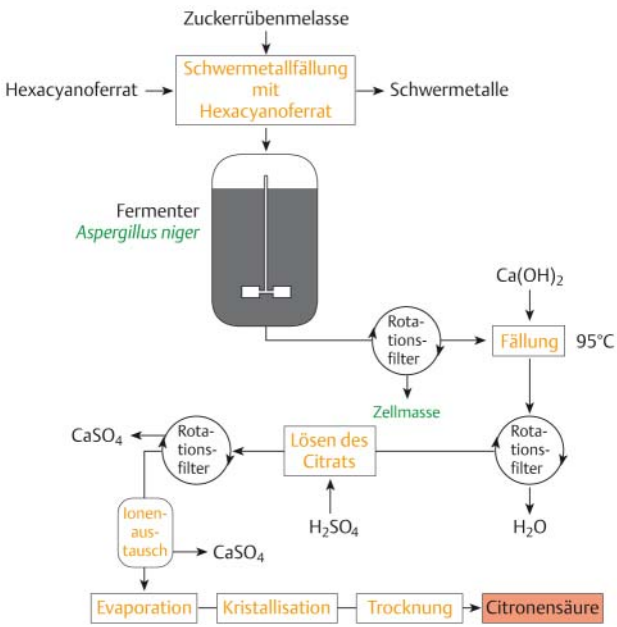


Abb. 12.**7** **Herstellung von Citronensäure mit *Aspergillus niger*.** Die Produktion erfolgt in Mn^{2+}- und Fe^{2+}-freiem Medium. Nach Abtrennen der Biomasse wird die Citronensäure mit Kalkmilch [$Ca(OH)_2$] gefällt, das Ca-Citrat wird anschließend mit Schwefelsäure wieder in Lösung gebracht. Die Reinigung erfolgt über Ionenaustauschchromatographie, Ankonzentrierung und Kristallisation.

Milchsäure wird im Submersverfahren in großen Fermentern mit homofermentativen Milchsäurebakterien der Gattung ***Lactobacillus*** (*L. delbrückii, L. leichmanii, L. bulgaricus*) produziert. Ausgangssubstrat ist Saccharose, in letzter Zeit vermehrt Molke (mit 4–5 % Lactose). Nach Abtrennung der Biomasse erfolgt die Aufreinigung durch Fällung und Ionenaustausch-Chromatographie. 2006 wurden etwa 150 000 t Milchsäure produziert. Die Produktion von Milchsäure wird wahrscheinlich ansteigen, da biologisch abbaubare Polylactid-Kunststoffe an Bedeutung gewinnen. ◀

Gluconsäure wird ebenfalls als Säuerungs- und als Konservierungsmittel sowie in der pharmazeutischen und in der chemischen Industrie verwendet. Sie wird von ***Aspergillus-*** und ***Penicillium-Arten*** sowie von den Essigsäurebakterien ***Acetobacter*** und ***Gluconobacter*** gebildet, wobei die Pilze eine Glucose-Oxidase, die Bakterien eine Glucose-Dehydrogenase für die Oxidation von Glucose nutzen.

Die **Gluconsäure-Produktion** erfolgt im Wesentlichen mit ***A. niger*** im Submersverfahren, das Produkt wird nach Abtrennung der Biomasse ausgesalzt. Die Produktion lag 2006 bei etwa 100 000 t. ◀

Alkoholika für Genusszwecke (**Spirituosen**) werden aus zuckerhaltigen Rohstoffen wie Zuckerrohr und -rüben, Kartoffeln, Getreide, Obst, Mais oder Maniok durch **Alkoholfermentation** mit **Hefen** (*S. cerevisiae*) hergestellt. Stärke- und Cellulose-haltige Rohstoffe werden vor der Gärung über Hitzeschritte und/oder enzymatische Hydrolyse (Glucoamylase, α-Amylase, Cellulase) verzuckert.

12

Ethanol-Produktion: In der Fermentation wird nach der Angärphase der vorhandene Zucker mit einer Ausbeute von über 90 % zu Ethanol umgesetzt, der durch wiederholte Destillation (**Rektifikation**) auf bis zu 95 % ankonzentriert wird. Die Restfeststoffe (**Schlempe**: Protein, Fett, Hefeanteile) werden als hochwertiges Viehfutter verkauft. Branntweine (Cognac, Weinbrand, Rum, Whisky, Korn, Obstwasser, Wodka, je nach Substrat in der Fermentation) und Liköre (mit Zucker versetzt) werden durch Herabsetzen des Ethanolgehaltes auf Trinkstärke hergestellt. In Deutschland werden jährlich über 150 Mio. l Ethanol für Genusszwecke hergestellt. ◀

Für **Impfstoffe** (**Vakzine**) verwendete abgeschwächte Bakterien, bakterielle und virale Komponenten oder Toxine (S. 545) werden häufig mithilfe von mikrobiellen Fermentationsverfahren (< 1000 l) hergestellt. In vielen Fällen nutzt man rekombinante Bakterien oder Hefen, die die Gene für die Produkte plasmidcodiert tragen. Das Vakzin wird dann als **rekombinanter Impfstoff** bezeichnet. Die Aufarbeitung von Impfstoffen ist aufgrund des Einsatzes im Menschen sehr aufwendig und deshalb relativ teuer.

Bei den meisten mikrobiell hergestellten **therapeutisch eingesetzten Substanzen** handelt es sich um Proteine, die im Menschen als Hormone, Immunmodulatoren oder Blutgerinnungsfaktoren (Thrombolytikum) wirken. Dazu gehören **Insulin** (Regulation des Blutzuckerspiegels), das Wachstumshormon **Somatotropin**, mehrere **Interferone** und **Interleukine** (Signalstoffe des Immunsystems),

Urokinase und **Streptokinase**, die alle fermentativ (< 1000 l) mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen, z. T. alternativ mit rekombinanten Streptokokken oder Hefen, hergestellt werden. Einige Proteine können wegen ihrer komplexen Struktur oder ihrer Modifizierung (z. B. Glykosylierung) nicht in Prokaryoten oder Hefen hergestellt werden.

12.3.4 Mikrobielle Produkte für technische Zwecke

Der weitaus größte Teil des mit **Hefe** (*S. cerevisiae*) hergestellten **Ethanols** wird für technische Zwecke, z. B. als **Lösungsmittel**, als **Grundstoff** in Chemie-, Pharma- und Kosmetikindustrie und vor allem als **Treibstoff** (**Bioethanol**) verwendet. Allein in Brasilien und USA wurden 2007 mehr als 40 Mrd. l Bioethanol aus Glucose (aufbereitetem Zuckerrohr, Melasse oder verzuckertem Mais) produziert. In der EU liegt die jährliche Produktion bei mehr als 2 Mrd. l, hier werden hauptsächlich Zuckerrüben, Kartoffeln und Getreide (zerkleinert, verflüssigt, verzuckert) als Rohstoffe eingesetzt. Neben der Hefe, die Glucose über die Glykolyse zu Ethanol umsetzt, kann auch *Zymomonas mobilis* mit dem KDPG-Weg (S. 352) für die Ethanolherstellung genutzt werden. Obwohl Produktivität und Ertrag beim bakteriellen Verfahren höher sind, wird das Hefe-Verfahren aufgrund des niedrigeren Kontaminationsrisikos und des breiteren Substratspektrums der Hefe bevorzugt. Bioethanol wird zusammen mit Biodiesel, Biogas, Biowasserstoff und Biobutanol zu den Biokraftstoffen gezählt.

▶ Die **Bioethanol-Produktion** findet in großen Fermentern (bis 500 m^3) im Fed-Batch-Verfahren statt, der Alkohol wird kontinuierlich entfernt und über Rektifikation auf 95 % ankonzentriert. Der Ertrag liegt bei 0,45 g Ethanol/g Glucose (90 % des theoretischen Maximums). Die bisher eingesetzten Hefen und *Z. mobilis* können Stärke bzw. Cellulose/Hemicellulose nicht direkt abbauen. Um diese kostengünstigen Polysaccharide künftig ohne Vorbehandlung einzusetzen, wird intensiv an der Entwicklung von rekombinanten Produktionsstämmen mit entsprechenden Abbaufähigkeiten gearbeitet. ◀

Als **Lösungsmittel** und als Grundstoff für eine Reihe von chemischen Synthesen werden **Butanol** und **Aceton** genutzt. Weizmann entwickelte 1915 ihre mikrobielle Herstellung. Bis etwa 1950 wurden beide Verbindungen in großem Maßstab durch Vergärung von Zuckern und Stärke mit ***Clostridium acetobutylicum*** produziert (Lösungsmittelgärung der Clostridien S. 383; Abb. 8.**32**). Heute werden jährlich etwa 1,2 Mio. t Butanol und 3 Mio. t Aceton aus Erdöl gewonnen. Steigende Energiekosten, Stammverbesserungen mithilfe der Gentechnik und die Fähigkeit vieler Clostridien, Stärke und andere billige Polysaccharide abzubauen, machen die fermentative Herstellung jedoch zunehmend wieder attraktiv, besonders die Herstellung von Butanol, das als **Biokraftstoff** eingesetzt werden soll. In einer typischen Fermentation mit rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämmen werden knapp 20 kg Butanol plus 10 kg Aceton aus 100 kg Maisstärke gewonnen.

Biopolymere sind von zunehmendem Interesse für technische Anwendungen. Zur Erhöhung der Viskosität werden einige bakterielle **Polysaccharide** Nahrungsmitteln als **Verdickungsmittel** zugesetzt (z. B. in Ketchup, Speiseeis, Pudding, Salatsaucen). Darunter fallen **Alginat** (1,4-glycosidisch Mannuronsäure und Guluronsäure) und **Xanthan** (mit Trisaccharid-Seitenkette substituierte Cellulose), die mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Azotobacter vinelandii* bzw. mit *Xanthomonas campestris* im Batch-Verfahren produziert werden. Xanthan wird außerdem in der Kosmetikindustrie und als Flutpolymer bei der Erdölförderung eingesetzt, die Jahresproduktion liegt bei 40 000 t. **Dextrane** (α-1,6-Glucose) werden als **Blutplasma-Ersatzstoff** und als Grundsubstanz für **Chromatographiematerialien** (Sephadex) verwendet. Dieses Polymer wird mit *Leuconostoc mesenteroides* im Batch-Verfahren mit Saccharose als Substrat produziert (2500 t/Jahr). Das Produkt wird mit Ethanol oder Aceton aus der Fermentationsbrühe gefällt, die Ausbeute liegt bei fast 50 %.

Neben Polysacchariden werden **biologisch abbaubare Polyhydroxyalkanoate** (S. 433) mikrobiell erzeugt. Dazu gehören Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB) und Poly-β-Hydroxyvaleriansäure, die als Copolymere für die Herstellung von Verpackungsmaterialien genutzt werden. *Cupriavidus necator* (früher *Ralstonia eutropha*) bildet diese Polymere in Mengen, die bis über 80 % des Trockengewichtes ausmachen. Die intrazelluläre Lokalisation erfordert bei der Aufarbeitung einen enzymatischen Aufschluss.

12

12.3.5 Mikrobielle Produktion von Enzymen

Zahlreiche **Enzyme** aus Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen, vor allem Hydrolasen und Isomerasen, werden in der Lebensmittelverarbeitung, in der pharmazeutischen und chemischen Industrie, in der Papier-, Textil- und Lederindustrie, in Diagnostik, Analytik und Forschung genutzt (Tab. 12.**2**). Enzyme für Umsetzungen im industriellen Maßstab werden als **technische Enzyme**, solche aus extremophilen Organismen mit besonderen Eigenschaften (z. B. stabile Aktivität bei hohen Temperaturen) werden als **Extremozyme** bezeichnet. Für eine biotechnologische Anwendung müssen Enzyme eine hohe **katalytische Aktivität**, eine hohe **Substrataffinität** und **-spezifität** besitzen und sicher handhabbar sein.

Die meisten **Enzyme** werden in Submerskultur (Fermenter bis 100 m^3) unter aeroben Bedingungen produziert, einige wegen der höheren Ausbeute im Oberflächenverfahren, z. B. einige Cellulasen und Pektinasen mit *Aspergillus*-Arten auf feuchtem Getreide- oder Sojaschrot. Der Weltmarkt für Enzyme liegt bei weit über 10 000 t pro Jahr, davon entfallen etwa 35 % auf Waschmittelenzyme, 30 % auf Enzyme für die Stärke-, Süßwaren-, Getränke-, Mehl- und Backwarenindustrie und 15 % auf die Käseherstellung.

Viele Enzyme werden mit **rekombinanten Organismen** produziert und als **Exoenzyme** ins Kulturmedium sezerniert, die nach der Fermentation oft mit wenigen Aufarbeitungsschritten angereichert bzw. gereinigt werden können.

Tab. 12.2 **Bedeutende fermentativ hergestellte Enzyme, produzierende Mikroorganismen und Anwendungsgebiete.**

Enzymtyp	*Produzierende Mikroorganismen**	*Anwendungsgebiete/ Verwendung*
Protease	*Bacillus licheniformis, B. subtilis, Aspergillus niger*	Waschmittel Mehl- und Backwaren Lederindustrie Käseherstellung
Lipase	*A. nidulans, A. oryzae, Candida* sp.	Waschmittel Käseherstellung
Cellulase	*Trichoderma reesii, A. oryzae, A. niger*	Waschmittel Früchteverwertung
Hemicellulase	*B. subtilis, A. niger, Penicillium* sp.	Gemüse- und Früchteverarbeitung
α-Amylase	*B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. stearothermophilus, A. oryzae, A. niger*	Stärke-Hydrolyse Mehl- und Backwaren Papier-/Textilindustrie
Glucoamylase	*A. niger, Rhizopus* sp.	Stärke-Hydrolyse
Glucose-Isomerase	*Streptomyces venezuelae, B. coagulans, S. murinus*	Süßwaren- /Getränkeindustrie
Pektinase (Enzymgemisch)	*A. niger, T. reesii*	Gemüse- und Früchteverarbeitung
Chymosin	*Mucor miehei, M. pusillus, Escherichia coli, Kluyveromyces lactis*	Käseherstellung
Invertase	*Saccharomyces cerevisiae*	Süßwaren-/Getränkeindustrie
Penicillin-G-Amidase	*E. coli, B. megaterium*	Penicillinherstellung

* Einige der Organismen sind rekombinant, d. h. sie tragen heterologe (fremde) Gene für das produzierte Enzym

Enzyme für therapeutische, diagnostische, analytische oder wissenschaftliche Anwendungen sind meist intrazelluläre Enzyme und müssen in hoher Qualität produziert werden, der Aufwand für die Reinigung ist entsprechend höher. ◀

Antibiotika: Von Mikroorganismen produzierte Sekundärmetabolite, die in geringen Konzentrationen andere Mikroorganismen abtöten (bakterizid) oder im Wachstum hemmen (bakteriostatisch).
Halbsynthetische Antibiotika: Natürliche Antibiotika, die nachträglich chemisch oder biologisch modifiziert werden, um ihre pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern.
Synthetische Antibiotika: Werden auf chemischem Wege synthetisiert.
Drug Design: Entwicklung neuer Wirkstoffe mit Hilfe von Computer-Simulationen.

Vitamine: Wachstumsfaktoren für Menschen und Tiere. Mikrobiell werden in großem Maßstab Vitamin B_2 (Riboflavin), Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin) und Vitamin C (Ascorbinsäure) produziert.
Aminosäuren: Essentielle Aminosäuren werden durch Hydrolyse und Extraktion, chemische Synthese, Biotransformation oder fermentative Produktion mit Bakterien hergestellt, nicht essentielle können von allen Organismen synthetisiert werden. Glutamat und Lysin werden in großem Maßstab mit *Corynebacterium glutamicum* produziert.
Citronensäure: Zwischenprodukt des Citratzyklus, Produktion mit *Aspergillus niger*, spezielle Bedingungen verhindern die Umsetzung der Citronensäure.
Rektifikation: Wiederholte Destillation, eingesetzt bei der fermentativen Ethanolgewinnung.
Schlempe: Restfeststoffe (Proteine, Fette, Hefezellen) bei der Ethanolherstellung.
Impfstoff (Vakzin): Ein biotechnologisch hergestelltes oder aus Tieren gewonnenes Antigen, meist aus abgetöteten/abgeschwächten Bakterien oder Viren oder deren Bestandteilen.
Insulin: Hormon, reguliert im Zusammenspiel mit Glucagon den Blutzuckerspiegel, Therapeutikum bei Diabetes mellitus, Produktion heute mit rekombinanten *Escherichia coli*- oder Hefezellen.
Immunmodulatoren: Pharmazeutisch wirksame Verbindungen, die das Immunsystem beeinflussen.
Bioethanol: Ethanol, der aus nachwachsenden Rohstoffen (Biomasse) mithilfe von Mikroorganismen hergestellt wurde.
Extremozyme: Enzyme extremophiler Mikroorganismen, geeignet für unter extremen Bedingungen ablaufende Prozesse, Produktion erfolgt meist in rekombinanten Mikroorganismen.
Technische Enzyme: Enzyme, die für industrielle Umsetzungsprozesse eingesetzt werden.

12.4 Stoffumwandlung mit Mikroorganismen und Enzymen

Die Stoffumwandlung mithilfe von Bakterien, Pilzen oder mikrobiellen Enzymen spielt in vielen Anwendungsbereichen der Biotechnologie eine große Rolle. Beispiele sind die **zellkatalysierten Biotransformationen** (**Biokonversionen**), bei denen **freie oder immobilisierte Mikroorganismen** spezifische Reaktionen katalysieren (z. B. die stereospezifische Hydroxylierung von Steroiden), oder **enzymtechnische Verfahren**, bei denen **gelöste oder immmobilisierte Enzyme** für die Umsetzung eines definierten Substrates zu einem spezifischen Produkt eingesetzt werden, z. B. für die Stärkehydrolyse oder die Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose.

12.4.1 Biotransformationen

Stoffumwandlungen, die auf chemischem Weg nicht spezifisch genug ablaufen, zu aufwendig oder zu teuer sind, können mithilfe von **Biokonversionen** oder **Biotransformationen** durchgeführt werden, bei denen eine oder mehrere Reaktionen des Syntheseprozesses von **Organismen**, meist Bakterien oder Pilzen, katalysiert werden. Die umzusetzende Vorstufe wird zur angezüchteten Kultur, d. h. zu den „**ruhenden Zellen**" oder zu **immobilisierten** (an Trägermaterial gekoppelten) Zellen gegeben, unter für die Konversion optimalen Bedingungen inkubiert und das Produkt isoliert.

Beispiele für Biokonversionen mit Bakterien sind die Umsetzung von Sorbit zu **Sorbose** durch *Acetobacter suboxydans* bei der Vitamin C-Herstellung (S. 569, Abb. 12.**6**), die Umwandlung von Fumarsäure in **L-Asparaginsäure** oder die Herstellung von **Indigo** aus Tryptophan mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen. Beispiele für Biokonversionen mit Pilzen (*Carvularia lunata, Saccharomyces cerevisiae, Rhizopus nigricans, Septomyxa affinis*) sind die stereospezifische Hydroxylierung, Oxidation und Reduktion von **Steroiden**, die natürlicherweise (in Tieren und Pflanzen) vorkommen und deren Derivate dann vielfältige pharmazeutische Anwendung (z. B. Calciferol, Corticosteroide, Sexualhormone) finden.

12.4.2 Stoffumwandlung mit mikrobiellen Enzymen

Enzyme katalysieren unter vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen **spezifische Reaktionen**, bei denen in aller Regel keine Nebenprodukte entstehen. Ein besonderer Vorteil, vor allem bei der Herstellung von Feinchemikalien und pharmazeutischen Produkten, ist ihre **Stereo-** und **Regiospezifität**.

Bei vielen enzymtechnischen Verfahren werden **trägergebundene** oder **immobilisierte Enzyme** verwendet. Die Immobilisierung erfolgt durch kovalente oder adsorptive Bindung des gereinigten Enzyms an Trägermaterialen, durch Quervernetzung oder durch Einschluss in Polymere oder Kapseln (Abb. 12.**8**). Als Träger dienen natürliche oder synthetische Polymere (z. B. Aktivkohle, Kieselgel, Aluminiumoxid, poröse Keramik, Polyacrylamid, Cellulose). Immobilisierte Enzyme weisen häufig erhöhte Stabilität auf und müssen nicht vom Produkt abgetrennt werden. Außerdem erlaubt die Immobilisierung die Wiederverwen-

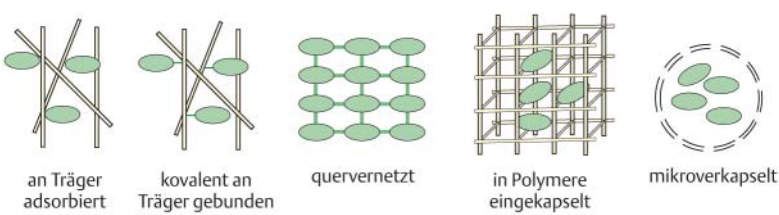


Abb. 12.**8** **Möglichkeiten der Immobilisierung von Enzymen.**

dung der Enzyme und ermöglicht Prozesse, bei denen in einem **Enzymreaktor** (Reaktionsgefäß für Enzyme) kontinuierlich Substrat zugeführt und Produkt abgeführt werden kann. Immobilisierte Enzyme können allerdings nur lösliche Substrate umsetzen, und die kinetischen Konstanten des Enzyms können sich von denen freier Enzyme unterscheiden.

Der Ablauf eines typischen **enzymtechnischen Verfahrens** entspricht prinzipiell dem Ablauf eines Produktionsverfahrens mit Mikroorganismen, ist jedoch viel **weniger aufwendig**, da der Prozess in kleinerem Volumen in einer Lösung mit wenigen Komponenten abläuft, keine sterilen Bedingungen eingehalten werden müssen und keine Nebenprodukte gebildet werden. Die Abtrennung der Biomasse ist unnötig und die Produktreinigung wegen der klar definierten Reaktionslösungen einfacher.

Ein Beispiel für eine im großen Maßstab durchgeführte Stoffumwandlung mit **gelösten Enzymen** ist die Stärkeverflüssigung und -verzuckerung, d. h. die **Hydrolyse von Stärke** zu Maltodextrinen und Glucose-Sirup (Abb. 12.**9**). Jährlich werden über 50 Mio. t Stärke aus Mais (70 %), Kartoffeln und anderen Pflanzen gewonnen, die Hälfte davon wird verzuckert und dann als **Stärkehydrolysat** für mikrobielle Fermentationen oder als Grundstoff für die Nahrungsmittelindustrie (Süßstoff- und Getränkeindustrie) eingesetzt.

12

Für die **Stärkeverflüssigung** wird Mais (bzw. Kartoffeln, Getreide) zerkleinert und vermahlen, als hochprozentige Stärkesuspension kurz auf über 105 °C erhitzt und anschließend für 2–3 Stunden bei 95 °C in Gegenwart von hitzestabiler *Bacillus*-α-Amylase inkubiert. Dabei entstehen die Maltodextrine, die anschließend in mehreren hintereinandergeschalteten Reaktoren mit Glucoamylase (spaltet α-1,4- und α-1,6-Bindungen) aus *Aspergillus niger* bei 60 °C und pH 4 zu Glucose umgesetzt werden (**Verzuckerung**). Durch Variation der Inkubationsdauer und Dosierung der Glucoamylase lassen sich Sirups mit unterschiedlichen Verzuckerungsgraden herstellen. ◀

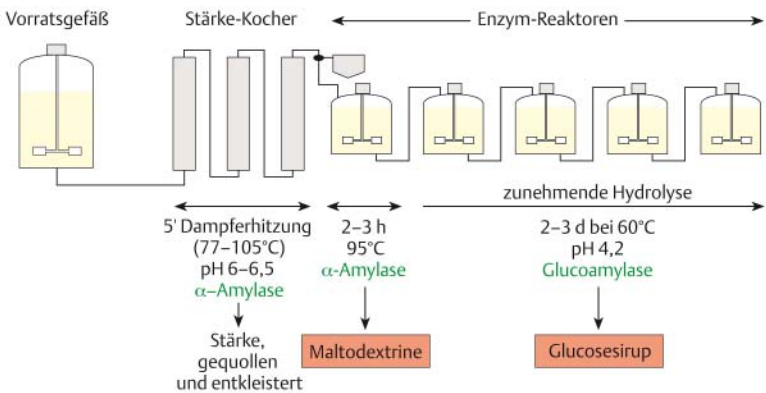


Abb. 12.**9** **Enzymatischer Abbau von Stärke.**

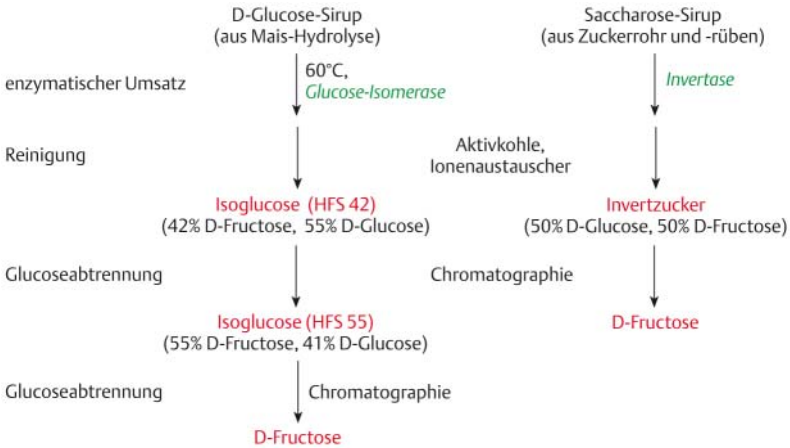


Abb. 12.**10** **Herstellung von Fructose** durch Isomerisierung von Glucose mit immobilisierter Glucose-Isomerase und durch Spaltung von Saccharose mit Invertase.

Die **Hydrolyse von Penicillin G** mit Penicillin-G-Amidase aus *E. coli* ist ein Beispiel für eine Stoffumwandlung mit **immobilisierten Enzymen** im großen Maßstab (> 20 000 t/Jahr). Weitere Beispiele sind die **Isomerisierung von D-Glucose** und die **Spaltung von Saccharose** (Abb. 12.**10**). Bei beiden Prozessen entsteht D-Fructose, die eine etwa doppelt so hohe Süßkraft wie D-Glucose besitzt.

▶ Bei der **Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose** wird der durch Stärkehydrolyse gewonnene Glucose-Sirup (s. o.) in einer Reaktorkaskade mit immobilisierter **Glucose-Isomerase** aus *Bacillus* oder *Streptomyces* kontinuierlich bei 60 °C in **Isoglucose** mit einem Anteil von etwa 42 % Fructose und 55 % Glucose (High-Fructose Sirup, HFS 42) überführt. Die verwendeten Isomerasen haben eine Halbwertszeit von über 100 Tagen. Nach zusätzlichen Chromatographieschritten kann die Fructose ankonzentriert (z. B. auf 55 %; HFS 55) oder in reiner Form gewonnen werden. Jährlich werden etwa 9 Mio t Isoglucose (HFS42 und HFS55) für die Süßwaren-, Getränke- und Lebensmittelherstellung produziert. Bei der **Spaltung von D-Saccharose** (aus Zuckerrohr/Zuckerrüben) zu einem Gemisch aus je 50 % D-Glucose und D-Fructose (**Invertzucker**) wird immobilisierte **Invertase** aus *S. cerevisiae* eingesetzt. Die Umwandlung im Enzymreaktor erfolgt kontinuierlich bei 55 °C, das Enzym ist mehrere Tage stabil. ◀

Biokonversion (Biotransformation): Von Mikroorganismen durchgeführte Schritte innerhalb einer chemischen Synthese, Anwendung z. B. bei der Synthese von Steroiden (Steroidhormone).
Immobilisierte Zellen: An Trägermaterial gekoppelte oder eingekapselte Mikroorganismen. Vorteile: Produkt ist frei von Zellen, erlaubt kontinuierlichen Prozess.
Immobilisierte Enzyme: An Trägermaterial gekoppelte, quervernetzte oder eingekapselte Enzyme. Vorteile: Bessere Nutzung des Enzyms, Produkt ist frei von Enzym, erlaubt kontinuierlichen Prozess.
Enzymreaktor: Reaktionsgefäß für Enzyme.
Stärkeverflüssigung und -verzuckerung: Hydrolyse von Stärke durch Erhitzung, Inkubation mit Amylasen (Maltodextrine als Produkte) und Glucoamylasen (Glucose als Produkt).

12.5 Umweltbiotechnologie

Seit mehr als 100 Jahren werden die vielfältigen Fähigkeiten von Mikroorganismen zum Abbau von organischen Verbindungen im Abwasser (**Abwasseraufbereitung**) in Kläranlagen genutzt. Auch beim Abbau großer Mengen komplexer und/oder toxischer Abfälle kommen neben physikalischen und chemischen Reinigungsschritten Mikroorganismen zum Einsatz, z. B. beim **Abbau von Natur- und Fremdstoffen**, bei der **Bodensanierung** und bei der **Abluftreinigung**.

12.5.1 Abwasseraufbereitung

Das Abwasser von Städten und Kommunen wird in Industriestaaten üblicherweise in einer **Kläranlage** gereinigt. **Häusliches Abwasser** (**kommunales Abwasser**), welches eine Vielzahl von anorganischen und organischen Verbindungen enthält, wird über ein Kanalsystem direkt zur Kläranlage geleitet.

Industrielles Abwasser, das oft nur wenige Verbindungen in großer Menge enthält, wird erst nach entsprechend angepasster Vorreinigung eingeleitet. Große Chemiefirmen betreiben sogar eigene Kläranlagen, um die kommunalen Anlagen, und hier vor allem die an der Abwasserreinigung beteiligten Mikroorganismen, nicht zu beeinträchtigen.

In den meisten Kläranlagen wird das Abwasser in drei Stufen gereinigt. (Abb. 12.**11**). In der **mechanischen Reinigungsstufe** (Vorklärung) werden Feststoffe und kleine Partikel mit Grob- und Feinrechen und im Sandfang abgetrennt; aufschwimmende Verunreinigungen (Fette, Öle, Benzin) werden mit Abscheidern entfernt. Organische Sink- und Schwebstoffe werden anschließend im **Absetzbecken** (Vorklärbecken) sedimentiert, der hier anfallende **Primärschlamm** wird dem anaeroben Abbau zugeführt (s. u.). Die mechanische Reinigung des

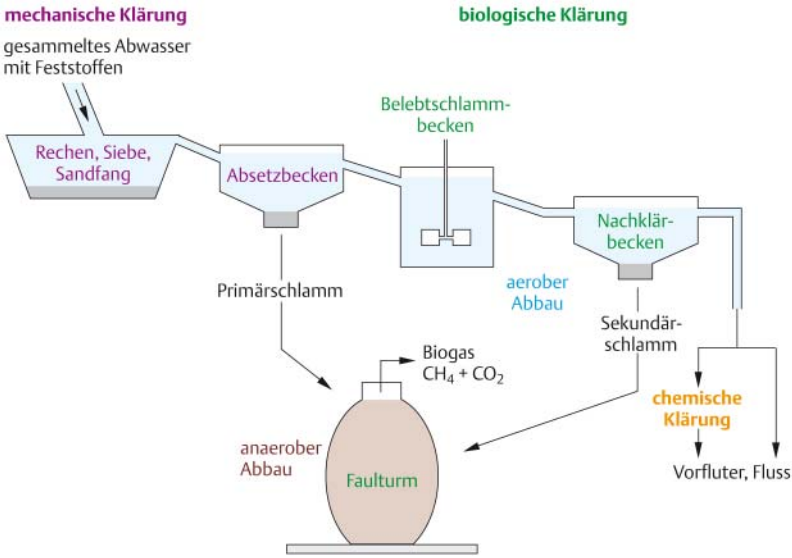


Abb. 12.**11** **Kläranlage.** Die biologische Abwasserklärung besteht aus einem aeroben und einem anaeroben Teil. Die Technik der einzelnen Reinigungsstufen kann unterschiedlich sein, sodass das jeweilige Verfahren an die speziellen Bedingungen einer Kläranlage angepasst werden kann. Nach der mechanischen und biologischen Reinigung erfolgt oft eine chemische Reinigungsstufe.

Abwassers führt zu einer Reduktion der oxidierbaren organischen Substanzen um etwa 20 %.

Der **biologische** (oder **biochemische) Sauerstoffbedarf** (**BSB**) ist ein Maß für die Belastung eines Abwassers mit mikrobiell oxidierbaren organischen und anorganischen Verbindungen. Der BSB gibt die Konzentration an O_2 (mg/l Abwasser) an, die eine Mikroorganismenpopulation bei 20 °C für die Oxidation dieser Verbindungen verbraucht. Der BSB wird üblicherweise auf einen Zeitraum von 5 Tagen bezogen (**BSB_5**). Kommunales Abwasser hat im Mittel einen BSB_5 von 300–500 mg/l, Abwässer aus Brauereien, Molkereien, Papier- oder Zuckerfabriken und aus landwirtschaftlichen Tierzuchtbetrieben haben z. T. 200-fach höhere BSB_5-Werte. Das Ziel der Abwasserreinigung ist, den BSB-Wert auf Werte von < 20 mg/l (oberer Grenzwert in Deutschland: 40 mg/l) zu senken.

In der **biologischen Reinigungsstufe** (Hauptklärung) erfolgt die Entfernung der gelösten und suspendierten organischen Verbindungen aus dem Abwasser. Heute wird dafür fast ausschließlich das **Belebtschlammverfahren** genutzt. In **Belebungsbecken** wird das Abwasser mithilfe von Druckluft mit O_2 angereichert, was den aeroben Abbau (Oxidation) der organischen Verbindungen durch eine Mischpopulation von Bakterien, Pilzen und Protozoen erlaubt. Diese

Mikroorganismen bilden zusammen mit organischem Material den **Belebtschlamm.** Im Belebungsbecken erfolgt auch die mikrobielle Elimination von reduzierten Stickstoffverbindungen durch **Nitrifikation** (S. 522). Das gebildete NO_3^- wird in einigen Kläranlagen in unbelüfteten Teilen des Belebungsbeckens, in anderen in nachgeschalteten Becken durch **Denitrifikation** (S. 520) entfernt. In einem **Nachklärbecken** erfolgt die Abtrennung des Belebtschlamms vom gereinigten Wasser. Der abgesetzte Schlamm wird teilweise dem Belebungsbecken wieder zugesetzt (**Biomasserückführung**), der **Überschussschlamm** (**Sekundärschlamm**) wird dem Faulturm (s. u.) zugeführt.

Das gereinigte Wasser wird in den meisten Kläranlagen einer **chemischen Reinigungsstufe** unterzogen, bei der durch Zusatz von Fällungsmitteln Phosphate und andere anorganische Substanzen eliminiert werden. Das gereinigte Abwasser wird dann in das nächstgelegene Oberflächengewässer, den **Vorfluter**, eingeleitet.

Der Belebtschlamm enthält neben Protozoen (*Paramecium, Vorticella*) sehr viele verschiedene Bakterienarten. Hauptvertreter sind die Gattungen *Zoogloea, Leucothrix* und *Thiothrix*. Neben diesen wurde eine Vielzahl weiterer Gattungen identifiziert, z. B. *Paracoccus, Nitrobacter, Nitrosomonas, Acinetobacter, Pseudomonas*.

Der Primärschlamm aus dem Absetzbecken sowie der Überschussschlamm aus dem Nachklärbecken werden in einen **Faulturm** überführt, wo eine spezialisierte Gemeinschaft von Mikroorganismen die enthaltenen Makromoleküle bei einer Verweilzeit von 1 bis 2 Monaten zu etwa 90 % abbaut (Abb. 12.**12**). Eine ausgewogene Zusammensetzung der Bakterienpopulation ist entscheidend für den

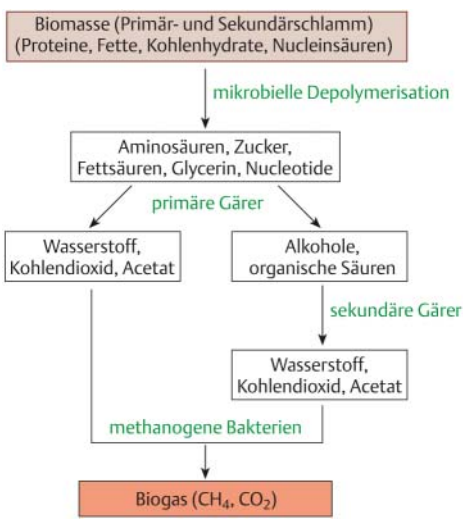


Abb. 12.**12** **Vorgänge im Faulturm einer Kläranlage.** Die Polymere werden durch Exoenzyme, die z. B. von Clostridien ausgeschieden werden, in Monomere gespalten. Diese werden in der anschließenden **Versäuerungsphase** durch **primäre Gärer** abgebaut, dabei entstehen organische Säuren, Alkohole, CO_2 und H_2. Ein Teil der Gärprodukte wird direkt von **methanogenen Bakterien** zu CO_2 und CH_4 umgesetzt, ein anderer Teil (Propionsäure, Buttersäure, Alkohole) durch **sekundäre Gärer** verstoffwechselt. Deren Endprodukte Acetat und H_2 werden dann von den methanogenen Bakterien ebenfalls zu CO_2 und CH_4 umgesetzt.

möglichst kompletten Abbau der eingebrachten Polymere zu dem als **Biogas** bezeichneten Gemisch aus CH_4 und CO_2 (2/3 zu 1/3), das häufig für die Heizung des Faulturmes verwendet oder zur Stromerzeugung genutzt wird. Der im Faulturm anfallende Schlamm wird entwässert und je nach Schadstoffgehalt als Dünger verwendet, deponiert oder verbrannt.

12.5.2 Abbau von Naturstoffen

Bei der Verwertung von organischem Haus- und Grünabfall (**Bioabfall**) kommen sowohl aerobe als auch anaerobe Verfahren zur Anwendung. Beim **aeroben Kompostierungsverfahren** sind in der ersten Phase Pilze und mesophile Bakterien, später bei höheren Temperaturen (bis 80 °C) vorwiegend sporenbildende Prokaryoten und Actinomyceten von Bedeutung. In der Endphase kommen auch andere Organismen (Asseln, Würmer) dazu. Für eine gute **Verrottung** des Bioabfalls ist eine Aussortierung von Fremdstoffen (Metalle, Kunststoffe), eine mechanische Zerkleinerung des anfallenden Materials, die Temperatur, ausreichende Feuchtigkeit und Belüftung während der Kompostierung wichtig. Die während des Prozesses auftretenden hohen Temperaturen von über 60 °C eliminieren pathogene Organismen. Das entstandene Produkt wird in der Regel als Kompost oder Bodenverbesserer vermarktet.

Die **anaerobe Aufbereitung** von Bioabfall erfordert die gleichen Vorbereitungen (Zerkleinerung, Sortierung) wie das aerobe Kompostierungsverfahren. Die biochemischen Vorgänge und die beteiligten Mikroorganismen im **Gärreaktor** (**Biogasanlage**) entsprechen denen im Faulturm. Das entstehende Biogas kann als Energieträger verwertet werden. Der anfallende Gärrest wird entwässert und einer aeroben Verrottung zugeführt.

12.5.3 Bodensanierung und Abbau von Xenobiotika

Bei der Sanierung kontaminierter Böden (**Altlastensanierung**) unterscheidet man zwischen dem biologischen **In-situ-Verfahren**, d. h. der Behandlung des Bodens an Ort und Stelle, und dem **Ex-situ-Verfahren**, bei dem der belastete Boden abgetragen (ausgekoffert) und in speziellen Mieten oder Bioreaktoren behandelt wird. Bei den Altlasten, die als Kontamination in Böden vorkommen, handelt es sich um sehr unterschiedliche chemische Substanzen, beispielsweise Öle, organische Lösungsmittel, aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, die teilweise mit Chlor- oder Nitrogruppen substituiert sind. Darunter sind auch **Fremdstoffe** (**Xenobiotika**), die in der Natur gewöhnlich nicht vorkommen und anthropogenen Ursprungs sind. Verschiedene Mikroorganismen sind in der Lage, diese komplexen Verbindungen aerob oder anaerob zu mineralisieren oder zu ungiftigen Substanzen abzubauen. Um das Wachstum von geeigneten Mikroorganismen zu fördern, wird versucht, durch Schaffung günstiger äußerer Bedingungen die natürlicherweise im Boden enthaltenen Bakterien gegenüber

Konkurrenten zu bevorzugen, oder ihre Anzahl durch das Einbringen von Starterkulturen zu erhöhen.

12.5.4 Mikrobielle Luftreinigung

Die Reinigung von Abluft wird erst seit relativ kurzer Zeit wegen der zunehmenden Geruchsbelästigung und Freisetzung von z. T. gesundheitsschädlichen Abgasen aus Industrie- und Landwirtschaftsbetrieben praktiziert. Die bisher entwickelten Verfahren zur **mikrobiellen Abluftreinigung** beruhen darauf, dass die Geruchs- und Schadstoffe (z. B. kurzkettige Fettsäuren, Lösungsmittel, Ammoniak, Aldehyd- oder Phenol-haltige Dämpfe) durch eine feste oder flüssige Phase geleitet werden, in der sie ad- oder absorbiert und anschließend durch Mikroorganismen abgebaut werden. Dabei kommen Biowäscher bei gut wasserlöslichen, Biofilter bei schlecht wasserlöslichen Abluftbestandteilen zur Anwendung. In **Biowäschern** laufen die Schadstoffabsorption in der Absorberanlage und der mikrobielle Schadstoffabbau im Bioreaktor räumlich getrennt ab. In **Biofiltern**, die z. B. feuchten Rindenkompost, Torf oder Schlacke als Filtermaterial enthalten, werden die gasförmigen Schadstoffe ebenfalls in der wässrigen Phase absorbiert und dann an Ort und Stelle durch die das Filtermaterial besiedelnden Mikroorganismen (Bakterien und Pilze im Biofilm) abgebaut.

12

Kläranlage: Anlage zur Reinigung des Abwassers einer Stadt oder Kommune. Mechanische Reinigungsstufe: Abtrennung fester Bestandteile durch Rechen, Siebe und Sandfang; Biologische Stufe: Abbau organischer Substanzen durch aerobe Mikroorganismen. Chemische Stufe: Ausfällung oder Filtration anorganischer Stoffe.
BSB (Biologischer Sauerstoffbedarf): Maß für die Belastung eines Abwassers mit mikrobiell oxidierbaren Verbindungen. Gemessen wird die Konzentration an O_2 (mg /l), die für die mikrobielle Oxidation der im Abwasser vorhandenen Verbindungen innerhalb von 5 Tagen bei 20 °C notwendig ist.
Belebtschlamm-Verfahren: Hier werden die im Abwasser vorhandenen organischen Verbindungen aerob im Belebungsbecken abgebaut. Die Mischpopulation von Bakterien, Pilzen und Protozoen liegt zum großen Teil als Belebtschlamm vor.
Primärschlamm: Fällt im Absetzbecken der mechanischen Reinigungsstufe an, wird anaerob abgebaut.
Sekundärschlamm (Überschussschlamm): Fällt im Nachklärbecken der biologischen Reinigungsstufe an, wird teilweise in das Belebungsbecken zurückgeführt, teilweise anaerob abgebaut.
Vorfluter: Gewässer, in das das gereinigte Wasser eingeleitet wird.
Anaerobe Abwasserreinigung im Faulturm: Hier werden der Primär- und Sekundärschlamm durch eine Mischpopulation von anaeroben Bakterien abgebaut. Beteiligt sind primäre und sekundäre Gärer sowie methanogene Bakterien. Die Bakterien hydrolysieren die in den Schlämmen enthaltene Biomasse und setzen sie zu CO_2 und CH_4 um.

Biogas: Im Faulturm entstehendes Gemisch aus CO_2 und CH_4, kann als Energieträger genutzt werden.
Aerobe Aufbereitung von Bioabfall: Kompostierung und Mineralisierung von festen organischen Abfällen durch Mikroorganismen.
Bodensanierung (Altlastensanierung): Reinigung kontaminierter Böden mit Hilfe von Mikroorganismen. In-situ- oder Ex-situ-Verfahren.
Xenobiotika: Natürlich nicht vorkommende Verbindungen, die häufig Probleme bei der Entsorgung bereiten, da sie oft nicht oder nur sehr langsam durch Mikroorganismen abgebaut werden.
Mikrobielle Abluftreinigung: Eliminierung von Geruchs- oder Schadstoffen aus Abluft mithilfe von Biowäschern oder Biofiltern.

Bildquellen

Es sind alle Abbildungen gelistet, die nicht von Autoren dieses Buches oder anderer Bände der Taschenbuch-Reihe beigesteuert wurden. Die Zahlen in [ ] verweisen auf die unten aufgeführte Literatur.

2.5a, b	Reinhard Rachel, Regensburg
2.6	aus Plattner/Hentschel [7]
2.8a, b	aus Plattner/Hentschel [7]
2.14	Klaus Wolf, Kingston, Jamaica
2.18a, b	Reinhard Rachel, Regensburg
3.6	aus Westermann et al. [12]
3.7	aus Plattner/Hentschel [7]
3.8	aus Plattner/Hentschel [7]
3.12a, b	Reinhard Rachel, Regensburg
3.13	Reinhard Rachel, Regensburg
4.1a	aus Hirsch-Kauffmann/Schweiger [4]
4.3a	aus Hirsch-Kauffmann/Schweiger [4]
4.4b	aus Hirsch-Kauffmann/Schweiger [4]
4.10a	Andrea Maisner, Marburg
4.15	Ralf Wagner, Marbug
5.1a	Peter Laun, Salzburg
5.2	a, c, e Elizabeth Richardson, Athens, GA, USA; b Marvin Karos, Marburg und Klaus Tenberge, Münster; d Robert Bauer, Tübingen; f, g, h Daniel Veith, Karlsruhe; i, j Nadine Zekert, Karlsruhe; k, l Nicole Sievers, Marburg
5.6	Janina Purschwitz, Karlsruhe
5.9	a, b Saturnino Herrero de Vega, Karlsruhe; c Nicole Sievers, Marburg; d, e, g, h Hans Ulrich Moesch, Marburg; f Meritxell Riquelme, Ensenada, Mexico; i Norio Takeshita, Karlsruhe
5.10	b Danuta Galetzka, Marburg und Daniel Veith, Karlsruhe; c Monika Krüger und Gerhard Kost, Marburg
5.11b	*bristle*-Mutante: Monika Krüger, *abacus*-Mutante: Marvin Karos und Gerhard Kost, Marburg
5.14	aus Purschwitz et al. [8]
5.17c	Rolf Rösser, Marburg
5.20d	Paola Bonfante, Turin, Italien
5.21a–e	Francis Martin, Lyon, Frankreich
5.22	b, d Matthias Hahn und Andreas Mosbach, Kaiserslautern; f–h Stefanie Heupel, Karlsruhe
6.2b	aus Weiler/Nover [11]
6.4a	Manfred Rohde, Braunschweig
6.5	aus Filipski et al. [3]
6.7	nach Cooper/Hausmann [1]
6.24	nach Slonczewski/Foster [9]
7.6c	Mike Hasenberg, Braunschweig
7.7b, c, d	Astrid Brandis-Heep, Marburg
7.8b	Astrid Brandis-Heep, Marburg
7.9	a Rolf Jaenchen, Zwingenberg; b Astrid Brandis-Heep, Marburg
7.11	Astrid Brandis-Heep, Marburg

8.14 aus Nelson/Cox [6]
8.27 nach Deppenmaier/Müller [2]
9.29 nach Templin/Höltje [10]
11.13 aus Hirsch-Kauffmann/Schweiger [4]

Titelliste

[1] Cooper, G. M., Hausmann, R. E. (2006). The cell: a molecular approach. 4. Aufl., ASM press and Sinauer Associates, Inc
[2] Deppenmaier, U., Müller V., (2007). Life close to the thermodynamic limit: How methanogenic archaea conserve energy. Results Probl. Cell Differ. DOI 10.1007/400_2006_026/Published online: 27 January 2007. Springer, Berlin, Heidelberg
[3] Filipski, J., Leblanc, J., Youdale, T. et al, (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. EMBO J., 9;1319–1327
[4] Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M. (2006). Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart
[5] Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R., M. (2005). Medizinische Mikrobiologie. 11. Aufl., Thieme, Stuttgart
[6] Nelson, D. L., Cox, M. M. (2001). Lehninger Biochemie. 3. Aufl, Springer, Berlin, Heidelberg
[7] Plattner, H., Hentschel, J. (2006). Zellbiologie. 3. Aufl., Thieme, Stuttgart.
[8] Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. Current Opinion in Microbiology, 9:566–571
[9] Slonczewski, J. L., Foster, J. W. (2008). Microbiology: An Evolving Science. W. W. Norton Co., New York
[10] Templin, M. F. , Höltje, J. (2000). Auf- und Abbau des Mureins begleiten das Wachstum der Bakterienzellwand. Biospektrum 2/2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
[11] Weiler, E., Nover, L. (2008). Allgemeine und molekulare Botanik. Thieme, Stuttgart
[12] Westermann, M., Ernst, A., Brass, S., Böger, P., Wehrmeyer, W. (1994). Ultrastructure of cell wall and photosynthetic apparatus of the phycobilisome-less *Synechocystis* sp. strain BO 8402 and phycobilisome-containing derivative strain BO 9201. Archives of Microbiology. 162, 222, Springer, Berlin, Heidelberg

Sachverzeichnis

Farbige Seitenzahlen verweisen auf die Definitionen in **Repetitorien**, die dadurch als **Glossar** genutzt werden können.

A
abacus-Mutante, *Aspergillus* 163
ABC-Transporter (ATP-binding-cassette-Transporter) 398
Abluftreinigung 584, **585**
AbrB-Regulator 495
Absetzbecken 580
Absterbephase 271, **277**
Abteilung 59
Abwasserreinigung 580
– Phosphateliminierung 529
– mikrobielle 13
Acanthamoeba polyphaga 112
Acanthurus nigrofuscus (Goldtupfen-Doktorfisch) 17
Acaryochloris, Chlorophyll d 78
Acaryochloris marina, Genom 195
Acetat 406
– Celluloseabbau, Pansen 503
– Gärung 376
– Methanogenese 360, 367
– Propionsäuregärung 381
– Säuregärung, gemischte 379
– Sulfatatmung 366
Acetatkinase 406
Acetatspaltung 370
Acetat-Thiokinase 370
Acetobacter 40
Acetobacter pasteurianum, Essigherstellung 557
Acetobacter suboxydans
– Biokonversion 577
– Essigherstellung 557
– Vitamin C 569
Acetobacterium woodii, Acetogenese 372
acetogene Bakterien 361
– Acetogenese 307
– Chemolithotrophie 373
– Chemoorganotrophie 372
– Kohlenstoffkreislauf 516
Acetogenese 307, 371f., **374**
– Habitat, anoxisches 517
Acetoin
– Gärung 375
– gemischte Säuregärung 379
– Nachweis 302
Aceton 383, 573
Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A)
– ΔG^0 320
– Acetogenese 372
– Fettsäuresynthese 403, 424
– Lipid 429
– β-Oxidation 357
Acetyl-CoA-Carboxylase 412, 424, 426, **427**
Acetyl-CoA-Synthase 413
Acetyl-CoA-Synthetase 406
Acetyl-CoA-Weg, reduktiver (Acetogenese) 371, 408, 413, **414**
Acetyl-Coenzym A s. Acetyl-CoA
N-Acetylglucosamin 30, 437
– Chitin 505
N-Acetylglucosaminidase 505
N-Acetylmuraminsäure 30, 437
Acetylphosphat 320, 377
– Phosphoketolase-Weg 355
O-Acetylserin 525
O-Acetyl-Seryl-Sulfurylase 525
Achromatium 84
Acidianus 100, **102**
– Hydroxypropionatzyklus 412
Acidithiobacillus ferrooxidans 84f., 392
Acidithiobacillus thiooxidans
– Elektronendonor 84
– Sulfurikant 392, 526
Acidobacteria 73
acidophil 458, **462**
– extrem 104
acidophile Sulfurikanten 391
Acinetobacter 93, 582
Acinetobacter baylii
– Cyanophycin 53
– Transformation 242
Acinetobacter calcoaceticus 429
Aconitase 355, 474
Acremonium chrysogenum 148
– Cephalosporin C 564
Acrylyl-Coenzym A-Weg 383
Actin 51
Actinfilament
– Bewegung 43
– Hyphenwachstum 159
– Pilze 145
Actinobacteria 81, **83**, 88
Actinomycetales 81
Actinomyceten 58, 502, 504
Actinoplanes teichomyceticus 566
Actinorrhiza 88, 522, **523**
Acyclovir-Resistenz 119
Acyl-Carrier-Protein (ACP) 424, **427**
Acyl-Coenzym A 358
Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase 357
Acyl-Coenzym A-Synthetase 357
Acylhydrolase 510
Adenin 190, 421
Adenosin-5'-phosphosulfat (APS)
– Pyrosequenzierung 67
– Sulfatatmung 366
– Sulfatreduktion 526
– Sulfitoxidation 392
Adenosindiphosphat (ADP) 305
Adenosinphosphosulfat (APS)-Reductase 367, 392
Adenosintriphosphat (ATP) 305, **306**
S-Adenosylmethionin, Regulation 480
Adenoviren 116
Adenylatcyclase 483
Adenylierung, Glutamin-Synthetase 487
Adenyl-Transferase 487