

## Viren

**Allgemeines.** Viren sind infektiöse Partikel ohne eigenen Stoffwechsel. Ihr genetisches Programm ist entweder in DNA oder RNA niedergelegt, deren Replikation mit Hilfe lebender Wirtszellen erfolgt. Bei der Vermehrung des Virus wird meist eine Protein-Hülle (Capsid) gebildet, die außerhalb der Wirtszelle die virale Nucleinsäure umschließt (Viruspartikel, Nucleocapsid). Viren können die meisten lebenden Organismen infizieren, sind dabei aber fast immer wirtsspezifisch und oft sogar auf bestimmte Gewebe oder Zellen spezialisiert. Man unterscheidet Viren nach ihrer Wirtsspezifität, ihrer Morphologie, dem Nucleinsäure-Typ (DNA/RNA) und dem Aufbau des Capsids. In der medizinischen und veterinärmedizinischen Forschung spielt die Diagnose und Behandlung von Virus-Erkrankungen wie AIDS (HI-Virus), Vogelgrippe (H5N1-, H7N9-Virus), hämorrhagischem Fieber (Ebola-virus) oder Rinderpest (Morbillivirus) eine sehr wichtige Rolle (→248). In der Biotechnologie verwendet man Viren zur Entwicklung von Komponenten-Vakzinen (→250) und zur Herstellung von Vektoren und Promotor-Elementen, z. B. für die Gentherapie und die Expression von Genen in tierischen Zellkulturen.

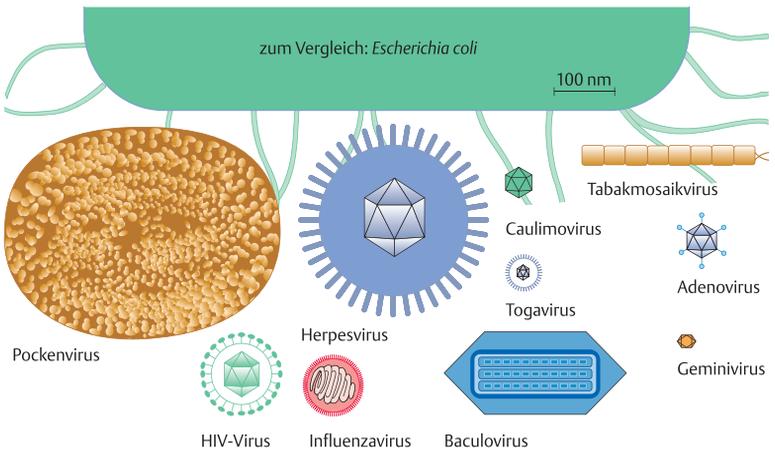
**Viren für Experimente am Tier.** Die ersten Klonierungsexperimente mit Tierzellen führte man 1979 mit einem Vektor auf der Grundlage des *simian virus 40* (SV40) durch (→98). Das Virus infiziert verschiedene Säugetiere und kann dabei lytische (Zell-lysierende) oder lysogene (verzögert Zell-lysierende) Cyclen durchlaufen. Sein ca. 5,2 kb großes Genom enthält „frühe Gene“ für die DNA- und „späte Gene“ für die Capsid-Synthese. Expressionsvektoren auf der Grundlage des SV40-Virus enthalten dessen Replikationsursprung (*ori*), häufig auch eine von diesem Virus abgeleitete Promotor- und Transkriptions-Terminationssequenz (Poly-Adenylierungssequenz). Für die Transfektion von Mauszellen haben sich Konstrukte auf der Grundlage des bovinen Papillomvirus (BPV) bewährt. Sie verwandeln sich bei der Infektion in ein Viel-Kopien-Plasmid, das bei der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Bei der Gentherapie mit attenuierten Viren bevorzugt man Retro-, Adeno- und Herpesviren (→304). Retroviren, z. B. das HIV-Virus, enthalten ein

RNA-Genom. Sie infizieren sich teilende Zellen, wobei eine von ihrem Genom kodierte reverse Transkriptase das RNA-Genom in cDNA umschreibt. Diese wird dann im Wirtsgenom integriert und dirigiert dort mittels starker Promotoren die Bildung von Capsid-Proteinen und viraler mRNA. Mit replikationsdefekten Retrovirus-Vektoren wurden bereits mehrere hundert Gentherapie-Versuche erfolgreich abgeschlossen, die verpackbare Fremd-DNA (*insert*) ist aber klein. Demgegenüber liegt die Klonierungskapazität von Adenoviren für fremde DNA bei 28 kb. Adenoviren infizieren auch Zellen, die sich nicht teilen, ihre DNA integriert aber nicht in das Chromosom der Wirtszelle. Für die Gentherapie neuronaler Zellen bei Krankheitsbildern wie Alzheimer- und Parkinson-Krankheit untersucht man *Herpes simplex*-Vektoren. Ihr großes DNA-Genom von 152 kb erlaubt den Einbau fremder DNA-Abschnitte > 20 kb. Auch Vaccinia-Viren kommen bei der Gentherapie zum Einsatz. Sie haben eine ähnlich große Klonierungskapazität und befallen viele Zelltypen.

**Viren für Experimente an Pflanzen.** Die meisten Pflanzenviren bestehen aus RNA (→280). Man kennt nur zwei Gruppen von DNA-Viren, die höhere Pflanzen infizieren: Caulimoviren haben ein sehr enges Wirtsspektrum: sie infizieren nur Kreuzblütler wie Rüben und einige Kohlsorten. Ihr geringes Capsid-Volumen beschränkt die Gesamtgröße des Genoms und damit der verpackbaren Fremd-DNA. Geminiviren infizieren wichtige Nutzpflanzen wie Mais und Weizen, was das Risiko ihrer Nutzung erhöht. Außerdem macht ihr Genom während des Infektionszyklus zahlreiche Umordnungen und Deletionen durch, wodurch die intakte Expression fremder DNA-Inserts erschwert wird.

**Baculoviren** infizieren Insekten, nicht aber Wirbeltiere. Nach Infektion verursachen sie die Bildung eines kristallinen Proteins (Polyhedrin), das dann über 50% des Gesamtproteins der Insektenzelle ausmacht. Der Polyhedrin-Promotor wird deshalb in Verbindung mit Zellkulturen von *Spodoptera* (einem Schmetterling) zur heterologen Expression von Proteinen verwendet. Vorteilhaft ist dabei, dass die posttranslationale Glykosylierung (→262) derjenigen bei Wirbeltieren ähnelt. Zur Züchtung transgener Seidenraupen (*Bombyx mori*) wird das Kernpolyedervirus BmNPV eingesetzt.

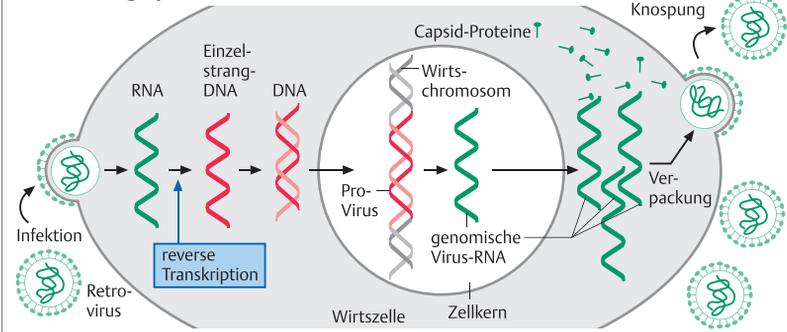
## Formen



| Viren       | Wirt             | Erkrankung       | Verpackung                  | Nucleinsäure         |
|-------------|------------------|------------------|-----------------------------|----------------------|
| Pocken      | Mensch, Haustier | Pocken           | komplexe Hülle              | lineare DNA, d       |
| Hepatitis B | Mensch           | Hepatitis B      | polyedrisches Capsid        | circuläre DNA, d     |
| Toga        | Mensch           | Masern           | polyedrisches Capsid        | (+)-RNA, e           |
| Herpes      | Mensch, Vögel    | Gürtelrose u. a. | polyedrisches Capsid, Hülle | lineare DNA, d       |
| HIV         | Mensch, Primaten | AIDS             | runde Hülle                 | 2 x (+)-RNA, e       |
| Influenza   | Mensch, Säuger   | Grippe           | helikale Hülle              | (-)-RNA, segmentiert |
| Adeno       | Mensch           | Erkältung        | polyedrisches Capsid        | lineare DNA, d       |
| Papilloma   | Rind             | Warzen           | polyedrisches Capsid        | circuläre DNA, d     |
| Tabakmosaik | Tabakpflanze     |                  | polyedrisches Capsid        | RNA, e               |
| Caulimo     | Kohlarten        |                  | polyedrisches Capsid        | circuläre DNA, e     |
| Gemini      | Dikotyledonen    |                  | Doppel-Polyeder             | circuläre DNA, e     |
| Baculo      | Insekten         |                  | polyedrisches Capsid        | circuläre DNA, d     |

e = Einzelstrang, d = Doppelstrang, + = sense-Richtung, - = antisense-Richtung

## Vermehrungszyklus eines Retrovirus



## Bakteriophagen

**Allgemeines.** Viren, die Bakterien befallen, nennt man Bakteriophagen oder kurz Phagen. Sie werden vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) klassifiziert. Wie Metagenom-Analysen (→74) gezeigt haben, kommen sie in großer Zahl in der Umwelt vor. Der Einsatz von Phagen wird seit langem als Therapie bei Infektionskrankheiten untersucht. Bei der Fermentation, z. B. bei der Herstellung von Starterkulturen (→114), muss ein Befall mit Phagen verhindert werden. Dazu selektiert man meist Phagen-resistente Stämme. In der Gentechnik leisten Phagen wertvolle Dienste bei der Entwicklung von Vektoren und Promotoren für die Klonierung, bei der Gen-Sequenzierung und bei der Herstellung von Gen- und Protein-Bibliotheken (→62, 64, 68). Da viele Klonierungsarbeiten mit *Escherichia coli* als Wirtsorganismus durchgeführt werden, spielen dort *E. coli*-spezifische Phagen ( $\lambda$ , M13, Q $\beta$ , T-Phagen) eine besonders wichtige Rolle.

**Der  $\lambda$ -Phage** befällt *E. coli*. Als temperenter Phage kann er dabei 2 Wege einschlagen: entweder wird seine lineare Doppelstrang-DNA (48,5 kbp, ca. 1 % des *E. coli*-Chromosoms) extrachromosomal vermehrt, wobei es zur Lyse kommt („lytischer Cyclus“), oder sie wird in das *E. coli*-Genom integriert (lysogene Zellen mit latenten Pro-Phagen) und mit diesem repliziert. Durch Temperaturerhöhung, UV-Strahlen oder andere Stressfaktoren wird der Prophage aus dem *E. coli*-Genom ausgegliedert und virulent, die Zelle lysiert. Eine für die Gentechnik wichtige Eigenschaft ist, dass sowohl die Bildung der ringförmigen  $\lambda$ -DNA wie ihre Integration ins *E. coli*-Genom an den *cos*-Stellen erfolgt (kohäsive oder klebrige Enden von je 12 ungepaarten Nucleotiden, die auch als Erkennungssignal für das Genprodukt A, eine Endonuclease, dienen). Nach Replikation der  $\lambda$ -DNA zu einem Concatemer aus linearen, aneinandergereihten  $\lambda$ -Genomen schneidet die Endonuclease A an den *cos*-Stellen und leitet damit die Verpackung der DNA in sein Capsid ein. Vom  $\lambda$ -Phagen abgeleitet sind die Cosmide zur Herstellung von Genbanken und die Familie der  $\lambda$ -Vektoren, z. B.  $\lambda$ EMBL4, die durch Temperaturerhöhung induziert werden können.

8

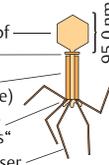
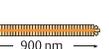
**Der M13-Phage** befällt ebenfalls *E. coli*, ist aber völlig anders aufgebaut. Er enthält

einen DNA-Einzelstrang von ca. 6,4 kb, der nach Infektion von *E. coli* die Synthese des komplementären Strangs dirigiert. Die doppelsträngige Phagen-DNA wird nicht in das *E. coli*-Genom eingebaut, sondern im Cytoplasma repliziert und kontinuierlich freigesetzt (1000 Phagenpartikel/Zelle). Bei der Zellteilung wird sie an die Tochterzellen weitergegeben (ca. 100/Zelle). Gene, die in einen M13-Vektor inkloniert wurden, kann man als einzelsträngige DNA erhalten – eine wertvolle Eigenschaft für die klassische DNA-Sequenzierung (→56). Vor der Einführung der PCR-Methoden dienten M13-Vektoren auch zur gerichteten Mutagenese von Proteinen.

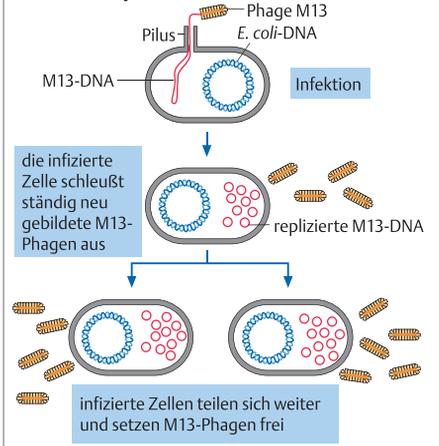
**T-Phagen** kommen in sieben unterschiedlichen Typen vor. In der Gentechnik verwendet man häufig zwei vom Genom der T-Phagen kodierte Enzyme: die DNA-Ligase des T4-Phagen, die DNA-Fragmente sowohl mit klebrigen wie mit glatten Enden verknüpft, und die DNA-Polymerase des T7-Phagen, die DNA am Einzelstrang polymerisiert und bei der Gensequenzierung nach Sanger-Coulson zum Einsatz kommt. Den Promotor der T7-RNA-Polymerase verwendet man u. a. zur Expression in *E. coli*.

**Phagen anderer Bakterien.** Unter den weit über 1000 klassifizierten Phagen (Viren insgesamt: über 2800) finden sich >300 für Enterobakterien, >230 für Bacteriocyten und jeweils >150 für Actinomyceten und Bacillen. Für Pseudomonaden wurden ca. 100, für Lactobacillen ca. 40 Phagen beschrieben. Eine erst jüngst beschriebene Gruppe von insgesamt 13 Phagen, die *Ligamenvirales*, infizieren Archaeobakterien. Nach Bau und Funktion entsprechen diese Phagen den verschiedenen Bakteriophagen von *E. coli* und anderen Viren. Wie diese können sie virulent oder temperent sein. Phagen für Lactobacillen sind in Molkerei-Betrieben ein großes Risiko bei der Herstellung von Milchprodukten. Resistente Starterkulturen sind durch Plasmid-kodierte Mechanismen in der Lage, die Adsorption oder Replikation dieser Phagen zu verhindern. Unter den 5 Gruppen der *Bacillus*-Phagen wurden 105 und SPO2 häufig für Transformationsversuche, PBS1 dagegen zur Erstellung der Genkarte von *B. subtilis* verwendet. Phage M3112 ist der bevorzugte Vektor für die Transformation von Pseudomonaden, SV1 und C31 für die Transformation von Streptomycceten.

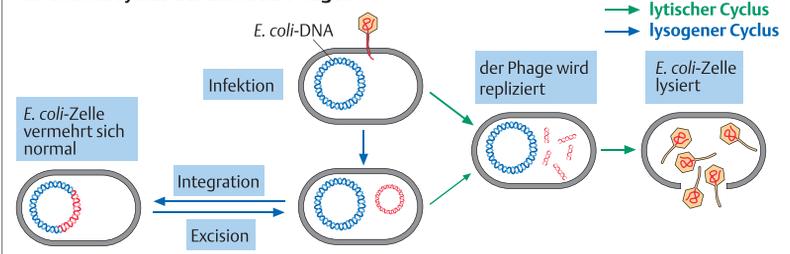
### E. coli-Phagen (Auswahl)

| Name                                 | Form  | genetisches Material |
|--------------------------------------|---|----------------------|
| <b>T2 und T4</b>                     |  <p>Phagenkopf<br/>Kragen<br/>Schwanz (Kern, Hülle)<br/>Basisplatte mit „Spikes“<br/>Schwanzfaser</p> <p>95,0 nm</p> | DNA (Doppel-Strang)  |
| <b>Lambda (<math>\lambda</math>)</b> |    | DNA (Doppel-Strang)  |
| <b>M13</b>                           |  <p>6 nm<br/>900 nm</p>  | DNA (Einzel-Strang)  |
| <b>MS2</b>                           |    | RNA                  |

### Infektionscyclus von M13



### Infektionscyclus des Lambda-Phagen



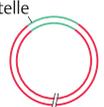
#### $\lambda$ -DNA in gestreckter Form

linkes klebriges Ende      rechtes klebriges Ende

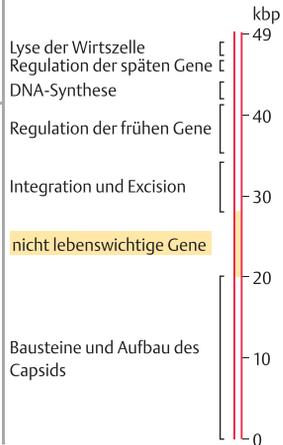


#### $\lambda$ -DNA in Ringform

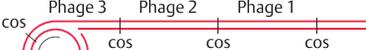
cos-Stelle



#### Genkarte des $\lambda$ -Phagen



cos      Phage 3      Phage 2      Phage 1



Concatemer wird an der  $\lambda$ -DNA abgerollt



Endonuclease ( $\Delta$ ) von Phagen-DNA codiert, spaltet das Concatemer an den cos-Stellen



aus gestreckten  $\lambda$ -DNA-Molekülen entstehen neue Phagen

## Mikroorganismen

**Allgemeines.** Mikroorganismen spielen eine Schlüsselrolle im Stoffkreislauf. Sie sind als Destruenten am Abbau vieler Verbindungen beteiligt. Dieser Vorgang erfolgt sowohl in der Umwelt wie in Symbiose mit anderen Lebewesen (Beispiele: Flechten, Darm- und Pansenbakterien). Als Pathogene bedrohen Mikroorganismen die Gesundheit anderer Organismen. In der Biotechnologie dienen für den Menschen ungefährliche Mikroorganismen zur Herstellung zahlreicher Produkte wie Citronensäure, Antibiotika, Xanthan oder Enzyme, zur aeroben und anaeroben Reinigung von Abwasser, Klärschlamm, Böden und Luft und als Wirtsorganismen zur Synthese rekombinanter Proteine. Aufgrund ihres verhältnismäßig einfachen Aufbaus, des breiten Methodenspektrums zur Herstellung von Mutanten und der kurzen Generationszeit dienen sie als Modell-Organismen für die Untersuchung biochemischer, genetischer und physiologischer Vorgänge und als bevorzugter Wirt für die technische Herstellung rekombinanter Produkte. Ihr völlig unterschiedlicher Zellaufbau erlaubt eine Unterscheidung in prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen. Die Prokaryoten unterteilt man weiter in Eubakterien und Archaeobakterien (> 10 000 vollständig charakterisierte Stämme).

**Eubakterien** sind einzellige Lebewesen. Sie vermehren sich durch Teilung. Ihr Zelldurchmesser liegt meist in der Größenordnung von 1 µm. Sie besitzen keinen Zellkern, ihre DNA ist in einem Nucleoid geknäuel. Häufig ist ein Teil ihrer genetischen Informationen auf nicht-chromosomalen Elementen, sog. Plasmiden, niedergelegt (→44). Plasmide können durch horizontalen Gentransfer auf andere Bakterien übertragen werden – ein für den Menschen nützlicher Effekt bei der natürlichen Evolution von Abbaupotenzialen für xenobiotische Verbindungen in der Umwelt und der Klärtechnik, aber eine große Gefahr bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Antibiotika. Ihre aus Peptidoglykan aufgebaute Zellwand ist bei Gram-negativen Bakterien komplexer aufgebaut als bei den Gram-positiven und ist häufig von einer Schleimschicht umgeben, aus der bei vielen Bakterien Geißeln herausragen, die die Beweglichkeit des Organismus sicherstellen. Im Cytoplasma können Speicherstoffe

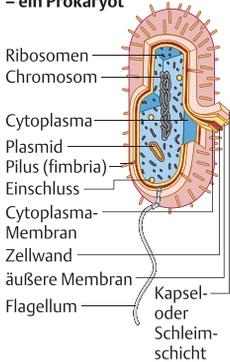
eingelagert sein, z. B. Polyhydroxybuttersäure oder Polyphosphat. Eubakterien zeichnen sich durch das Potenzial zu ungewöhnlich zahlreichen Varianten des Stoffwechsels aus, wodurch sie in der Lage sind, eine große Zahl von Lebensräumen zu besiedeln. Dabei überraschen sie immer wieder mit einzigartig evolvierten Proteinen und Cofaktoren. So ist beispielsweise die Purpurmembran der Halobakterien eine auf diese begrenzte funktionelle Einheit, die Ähnlichkeiten zur Photosynthese und zum Sehvorgang bei höheren Organismen aufweist.

**Archaeobakterien.** (Archaea) stehen vermutlich den ältesten Formen des Lebens auf der Erde nahe. Ihre Spuren wurden in mehrere hundert Millionen Jahre alten Formationen nachgewiesen. Sie leben häufig ohne Sauerstoff und sind meist auf die Besiedlung sehr spezieller Biotope spezialisiert. Beispielsweise sind sie die wichtigste Gruppe von Bakterien, die aus Essigsäure Methan bilden – ein wichtiger biotechnologischer Schritt bei der anaeroben Schlammfäulung (→288). Von den Eubakterien unterscheiden sie sich durch strukturelle und genetische Merkmale, beispielsweise durch den Aufbau ihrer Zellmembranen aus Etherlipiden anstelle der sonst üblichen Phospholipide. Die Funktion ihrer Enzyme ist oft an extreme Standorte angepasst, was man in der Technik ausnutzen kann. So wird eine DNA-Polymerase aus einem Tiefseebakterium (*Pyrococcus furiosus*) für besonders fehlerarme PCR-Reaktionen eingesetzt (→50).

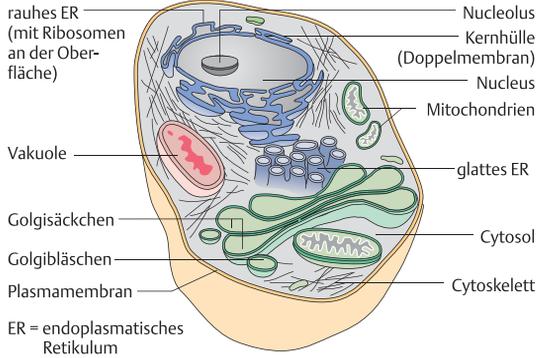
**Hefen und Pilze.** Alle Hefen und Pilze (ca. 70 000 Stämme) sind Eukaryoten. Im Gegensatz zu den Bakterien ist ihre Zellwand aus Chitin, selten auch aus Cellulose aufgebaut. Fast alle Pilze sind heterotroph und leben aerob. Die großen Unterschiede in ihrer Vermehrung bieten den besten Ansatz zu ihrer Klassifizierung. Der Vegetationskörper der Pilze ist ein aus *Hyphen* bestehendes Fadengeflecht (*Mycel*), das sich asexuell oder sexuell vermehren kann. Die asexuelle Vermehrung geschieht meist durch Sporenbildung, gelegentlich auch durch Knospung. Die sexuelle Vermehrung der niederen Pilze (*Phycomyceten*) erfolgt durch Gameten, der höheren Pilze durch Fruchtkörper, die als Schlauch (*Ascomyceten*) oder Ständer (*Basidiomyceten*) geformt sind. Hefen und Pilze begleiten die heutigen Verfahren der Biotechnologie schon seit der Frühgeschichte des Menschen.

## Mikroorganismen

### *Escherichia coli* – ein Prokaryot

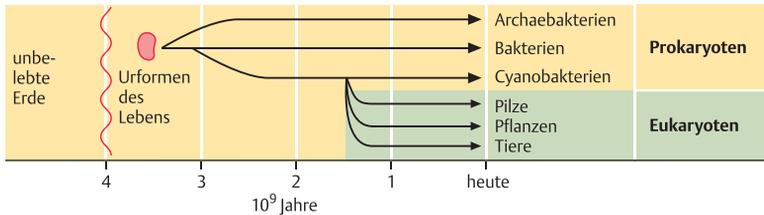


### *Saccharomyces cerevisiae* – ein Eukaryot



|  | <i>E. coli</i> | <i>S. cerevisiae</i> | zum Vergleich:<br>Pflanzen- und Tierzellen |
|--|----------------|----------------------|--|
| Zellkern, Organellen                                     | nein           | ja                   | ja   |
| Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]                            | ~ 1            | ~ 10                 | 100  |
| Volumen [ $\mu\text{m}^3$ ]                              | ~ 1            | ~ 1000               | >10 000                                    |
| Atmung [ $\mu\text{L O}_2/\text{mg TS} \cdot \text{h}$ ] | 1000           | 100                  | 10   |
| Generationszeit [h]                                      | 0,3            | 1,5                  | > 20                                       |
| Gene   | ~ 4 300        | ~ 6 400              | > 30 000                                   |

## Stellung der Mikroorganismen in der Evolution



## Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryoten (z. B. Pilze)

|                      | Archaeobakterien   | Eubakterien                            | Pilze, Hefen  |
|----------------------|--|--|---|
| Zelltyp              | prokaryotisch  | prokaryotisch                          | eukaryotisch  |
| Zellwand             | Heterosaccharid oder Glykoprotein                                | Peptidoglykan                          | Glucan, Chitin  |
| Membranlipide        | Etherlipide aus Isopren-Bausteinen                               | Phospholipide                          | Phospholipide   |
| Initiator-tRNA       | Methionin  | Formylmethionin                        | Methionin   |
| genetisches Material | kleines zirkuläres Chromosom, Plasmide<br>Histon-artige Proteine | kleines zirkuläres Chromosom, Plasmide | komplexer Kern mit<br>> 1 großen, linearen Chromosom, Histone |
| RNA-Polymerase       | komplex  | einfach                                | komplex   |
| Größe des Ribosoms   | 70S  | 70S                                    | 80S   |

## Bakterien

**Allgemeines.** Bakterien kann man durch eine Vielzahl morphologischer, biochemischer und genetischer Analysemethoden sowie durch ihre Nährstoffansprüche unterscheiden. Sie können nach einem seit 1980 international vereinbarten *Bacteriological Code* verbindlich in Genera und Species eingeteilt werden. Er enthält derzeit etwa 2200 Genera- und 11 500 Species-Namen. Molekulargenetische Analysen von ribosomaler RNA aus Umweltproben lassen allerdings vermuten, dass die Zahl der bisher nicht kultivierten und charakterisierten Bakterien wesentlich größer ist (→74).

**Eubakterien.** Die älteste Einteilung der Eubakterien beruht auf ihrer Morphologie. Bereits mit Hilfe des Lichtmikroskops kann man Stäbchen, Kokken und Spirillen unterscheiden, ferner die Bildung von Zellverbänden (Filamente, Kolonien) und strukturelle Details wie Sporen und Geißeln. Färbemethoden erlauben eine weitere Differenzierung. So gelingt mit der Anfärbung nach H. C. Gram bei den Prokaryoten eine Unterscheidung nach Zellwand-Strukturen: Gram-positive Bakterien haben eine dicke Murein-Zellwand und nur eine Zellmembran, Gram-negative dagegen eine äußere und eine innere Zellmembran, die einen periplasmatischen Raum einschließen. Auf der äußeren Zellmembran sitzt eine dünne Murein-Zellwand, aus der Lipopolysaccharide herausragen. Physiologische und biochemische Kriterien führen zu einer noch genaueren Unterteilung. Die wichtigsten Merkmale sind:

**Verhalten gegenüber Sauerstoff:** man unterscheidet, ob die Zellen unter aeroben, anaeroben oder unter beiden Bedingungen wachsen.

**Form der Energiegewinnung:** sie kann durch Photosynthese (phototroph), Atmung oder Gärung (chemotroph) erfolgen.

**Bevorzugte Wasserstoff-Donatoren:** organotrophe Mikroorganismen verwenden organische, lithotrophe anorganische Verbindungen wie  $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ ,  $S$ ,  $CO$ ,  $Fe^{2+}$  usw.

**Kohlenstoff-Quelle:** autotrophe Mikroorganismen fixieren  $CO_2$ , heterotrophe beziehen Kohlenstoff aus organischen Verbindungen,

**Verhältnis zu anderen Organismen:** man unterscheidet zwischen saprophytischem (autonomen) und parasitischem Stoffwechsel (abhängig von einem Wirtsorganismus). Auch der Befall durch bestimmte Phagen kann zur Differenzierung dienen (*phage typing*).

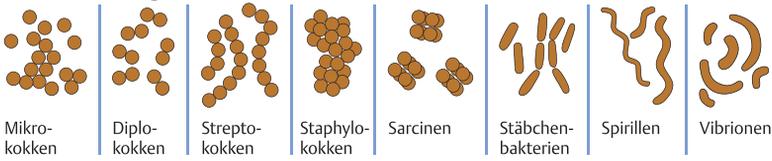
**Anpassung an Standorte:** mesophile Mikroorganismen wachsen unter normalen Bedingungen, während Extremophile an Standorte mit extremen Bedingungen (Temperatur, Druck, pH, Salzgehalt usw.) angepasst sind. Zelleinschlüsse, Pigmentierungen, chemische Komponenten der Zellwand und der Zellmembran (Fettsäure-Zusammensetzung), die immunologische Differenzierung der Oberflächenantigene (Serologie) und die Empfindlichkeit gegen Antibiotika bieten weitere phänotypische Differenzierungsmöglichkeiten. Daneben treten immer häufiger genetische Charakterisierungsmerkmale. Eröffnet die Basenzusammensetzung der DNA (GC-Gehalt) bereits Anhaltspunkte für eine grobe Differenzierung, so ermöglicht die nahezu exponentiell zunehmende Sequenzierung vollständiger Bakterien-Genome eine Differenzierung in allen Details. Als eine besonders wertvolle Methode zur Klassifizierung und zur Bestimmung evolutiver Zusammenhänge wurde bereits 1972 die Sequenzierung ribosomaler RNA erkannt, vor allem der 16S-, 18S- und 23S-rRNA, die während der gesamten Evolution stark konservierte Bereiche aufweist (→74). Sie legt drei Grundtypen des Lebens nahe: die Archae- und Eubakterien (die Prokaryoten), und die Eukaryoten.

### Charakterisierung und Taxonomie.

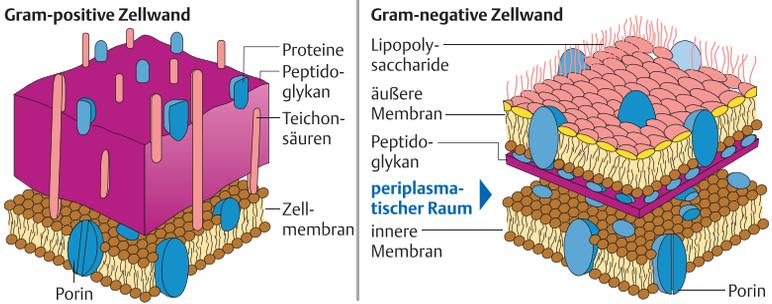
Der schnellen Identifizierung von Mikroorganismen kommt im klinischen Alltag, aber auch in der Veterinärmedizin, bei der Lebensmittel-Herstellung und als Voraussetzung für das sichere Arbeiten im Labor eine große Bedeutung zu. Neben mikroskopischen und biochemischen Untersuchungen wie der „bunten Reihe“, der Charakterisierung aufgrund der Fähigkeit zum Wachstum auf verschiedenen Nährböden, benutzt man zunehmend die DNA-Analytik, z. B. mit Taxon-spezifischen DNA-Sonden. Die taxonomische Einordnung eines Stamms ist nicht immer trivial und erfordert die Abwägung zahlreicher Merkmale.

**Genomsequenzierung.** 2013 war die Sequenzierung von über 2100 Bakterien- und mehr als 140 Archaea-Genomen abgeschlossen. Darunter befinden sich auch zahlreiche pathogene Mikroorganismen wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis*. Die Genomsequenzierung hat gezeigt, dass es zahlreiche Varianten des Stoffwechsels gibt.

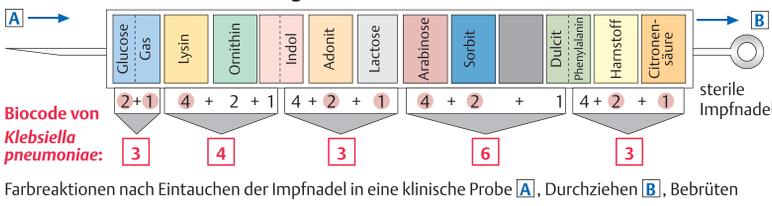
## Formen einzelliger Bakterien



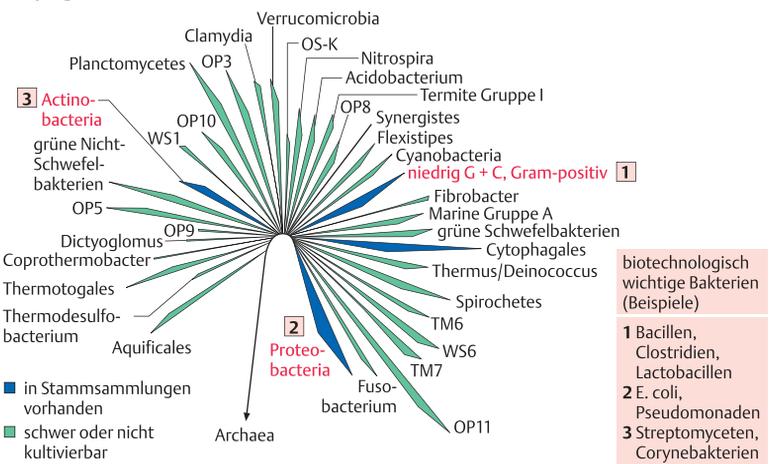
## Zellwandaufbau und Gram-Färbung



## Biochemische Charakterisierung



## Phylogenetik und Kultivierbarkeit



## Hefen

**Allgemeines.** Hefen sind eine Untergruppe der Schlauchpilze (Ascomyceten). Da sie sich durch Sprossbildung vermehren können, bezeichnet man sie auch als Sprosspilze. Hefen wachsen heterotroph bei vorzugsweise sauren pH-Werten (pH 3,5–5,0) und bilden meist kein Mycel. Ihre Zellwand besteht aus Chitin. Einige biotechnologisch wichtige Hefen sind *Saccharomyces cerevisiae*, verschiedene *Candida*-Arten, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris*.

***Saccharomyces cerevisiae*.** (Synonyme: Backhefe, Bäckerhefe, Bierhefe) (→120) kann sich sowohl haploid wie diploid vermehren und bildet damit ein hervorragendes Objekt für genetische Untersuchungen. Haploide Laborstämme gehören zu einem von zwei Paarungstypen (*MATa* oder *MATα*), die nur wechselseitig kreuzen. Die Fortpflanzung erfolgt sowohl asexuell durch Bildung von Sprosszellen, in die ein diploider oder haploider Kern einwandert, oder sexuell durch Kopulation zweier haploider Sprosszellen mit anschließender Meiose und Bildung von vier haploiden Ascosporen, deren Phänotyp leicht visuell erkennbar ist (Tetraden-Analyse) und Rückschlüsse auf genetische Veränderungen erlaubt. Dank der leichten Kultivierbarkeit in haploider und diploider Form, der vollständigen Sequenzanalyse des haploiden Genoms (12 Mbp auf 16 Chromosomen), der Abwesenheit von Introns und der geringen Verdopplungszeit von 90 min ist *S. cerevisiae* ein bevorzugtes Objekt der molekulargenetischen Forschung. Vorteilhaft ist auch, dass mit dem 2 $\mu$ -Ring (60–100 Kopien im Zellkern) ein natürliches Plasmid und mit dem *killer*-Virion ein weiteres extrachromosomales Element für Rekombinationsversuche vorliegt. Für die Transformation von Hefe stehen viele unterschiedliche Klonierungsvektoren zur Verfügung, mit denen fremde Gene extrachromosomal repliziert (YRP = *yeast replicating plasmids* und YEP = *yeast expression plasmids*) oder ins Chromosom integriert (YIP = *yeast integrating plasmids*) werden können (→72, 296). Künstliche Hefe-Chromosomen (YAC = *yeast artificial chromosomes*) erlauben die Klonierung riesiger DNA-Stücke (600–1400 kbp). Die etwa 6000 Gene der Hefe weisen oft eine hohe Homologie zu Genen des Menschen auf und sind deshalb ein beliebtes eukaryotisches Mo-

dellsystem für die molekulargenetische Analyse des Stoffwechsels. Biotechnologisch wird Backhefe zur Herstellung von Lebensmitteln, alkoholischen Getränken (→110, 112), Ethanol (→138) sowie als Wirtsorganismus zur industriellen Produktion rekombinanter Produkte benutzt, z. B. von  $\alpha$ -Interferon (→234) und von Vakzinen (→250) (Beispiel: Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen). Anders als bei *E. coli* als Wirtsorganismus erfolgt dabei auch die posttranslationale Modifikation heterolog exprimierter Proteine, vor allem durch Glykosylierung (→262).

***Candida utilis*** bildet, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, ein Mycel, pflanzt sich aber nur asexuell durch Sprossung fort. Manche *Candida*-Gene weisen eine nicht-kanonische Codon-Nutzung auf (z. B. CUG für Serin anstelle von Leucin), was ihre heterologe Expression sehr erschwert. Einige *Candida*-Stämme haben biotechnologische Bedeutung für die Produktion extrazellulärer Enzyme, für Biotransformationsreaktionen und als Futterhefen. Sie können auf unkonventionellen C-Quellen wie Sulfit-Ablaugen, *Candida tropicalis* auch auf Erdöl-Fractionen wachsen (→122). Manche *Candida*-Stämme sind humanpathogen (*Candida albicans*).

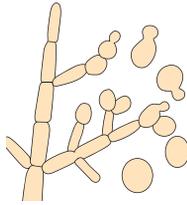
***Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha*** sind methylotrophe Hefen, die auf Methanol als einziger C-Quelle wachsen können. Sie wurden, wie viele andere Methanol-Hefen, im Zusammenhang mit der Erzeugung von Einzellerprotein intensiv untersucht. Heute sind sie vor allem attraktive Wirtsorganismen für die Expression eukaryotischer Gene. So wurden mit *Pichia pastoris* so unterschiedliche Proteine wie Lipasen,  $\beta$ -Interferon und Antikörper-Fragmente in Ausbeuten bis zu > 10 g rekombinantes Protein/L Kulturlösung exprimiert. Das relativ kleine Genom von ~9,4 Mbp wurde 2009 sequenziert.

***Schizosaccharomyces pombe*** wurde erstmals aus ostafrikanischem Bier (Suaheli: pombe) isoliert. Das Genom dieses Ascomyceten ist seit 2002 sequenziert. Mit 12,6 Mbp ist es etwa so groß wie das von *S. cerevisiae*, besitzt aber nur 3 Chromosomen, auf denen ca. 5000 Gene angeordnet sind. Mittlerweile stehen Stämme zur Verfügung, die nach Deletion von Protease-Genen in hohen Ausbeuten Fremdproteine bilden und diese bei Bedarf auch ins Nährmedium sekretieren.

## Morphologie



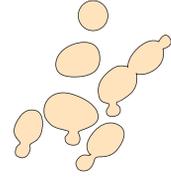
*Endomycopsis*  
Ascusbildung  
Mycelbildung  
Sprössung



*Candida*  
-  
Mycelbildung  
Sprössung



*Saccharomyces*  
Ascusbildung  
-  
Sprössung



*Torulopsis*  
-  
Sprössung

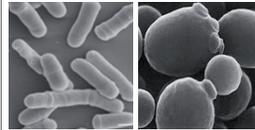
## Genetik

|  | haploide Genomgröße [Mbp] | Chromosomen | Gene | Genomsequenz |
|--|---------------------------|-------------|------|--------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>            | 12,1                      | 16          | 5905 | 1996         |
| <i>Candida utilis</i>                      | 14,6                      | 14          | 8646 | 2012         |
| <i>Pichia pastoris</i>                     | 9,4                       | 4           | 5040 | 2009         |
| <i>Hansenula polymorpha</i>                | 9,5                       | 6           | 5933 | 2003         |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>           | 14,1                      | 3           | 4970 | 2002         |
| Zum Vergleich: <i>Escherichia coli</i> K12 | 4,6                       | 1           | 4145 | 1997         |

## Technische Anwendung von Hefen

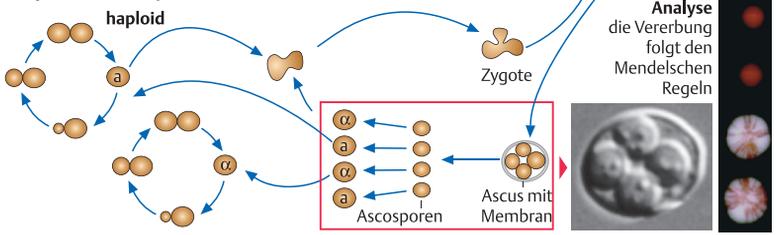
|  |  |
|--|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>als Backhefe, Bierhefe</li> <li>als Wirtsorganismus zur Expression von Peptiden, Proteinen und Enzymen</li> <li>als Modell-Organismus für die Analyse der Stoffwechsel- und Genregulation</li> <li>als Modell-Organismus für die Altersforschung</li> </ul> |
| Candida-Stämme                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>als Futterhefen</li> <li>zur Synthese von Biotensiden</li> <li>für Biotransformations-Reaktionen</li> </ul>   |
| <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula polymorpha</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>als Wirtsorganismus zur Expression von Proteinen und Enzymen</li> </ul>   |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>als Wirtsorganismus zur Expression von Proteinen und Enzymen</li> <li>als Modell-Organismus für die Analyse der Genregulation</li> </ul>  |

## Hefen



*Schizosaccharomyces pombe*    *Saccharomyces cerevisiae*  
= Backhefe

## Reproduktionszyklus von *S. cerevisiae*



## Pilze

**Allgemeines.** Pilze spielen eine herausragende Rolle im Kreislauf der Natur, z. B. beim Abbau von Holz und bei der Bildung von Humus. In der Lebensgemeinschaft mit Pflanzen (*Mycorrhiza*-Pilze) helfen sie bei der Aufnahme von Nährstoffen, sind aber auch gefürchtete Pflanzen-Pathogene (z. B. der Mehltau). In der Biotechnologie haben sie eine große Bedeutung beim Verderb, aber auch bei der Verarbeitung von Lebensmitteln und bei der Herstellung von Antibiotika und Enzymen. Unter den ca. 70 000 klassifizierten Pilzen bilden die Schlauchpilze (Ascomyceten) mit ca. 20 000 Arten die größte Gruppe. Als Beispiele werden hier *Penicillium notatum* und *Aspergillus niger* erwähnt. Bei den Niederen Pilzen (Phycomyceten) haben *Rhizopus*- und *Mucor*-Arten die größte biotechnologische Bedeutung. Einige der ca. 12 000 Ständerpilze (Basidiomyceten) sind essbar (Champignon, Shiitake, Pfifferling, Steinpilz), andere sind am Abbau von Holz beteiligt (Weiß- und Rotfäulepilze). Etwa 300 Pilz-Arten haben für den Menschen pathogene Eigenschaften. Alle Pilze sind heterotroph. Ihre Zellwand besteht aus Chitin und Zellulose, in Einzelfällen kommt auch Cellulose vor.

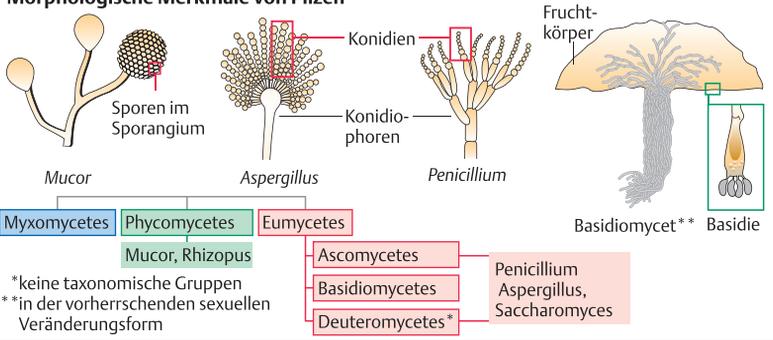
**Vermehrungsformen.** Die Vermehrungsformen der Pilze sind sehr vielfältig und werden hier am Beispiel eines Ascomyceten beschrieben. Die Zellmasse (*Thallus*) besteht aus einem Mycel, das aus *Hyphen* aufgebaut ist. Bei der asexuellen Vermehrung bilden sich an den Spitzen des *Mycels* Konidiophoren, die sich teilen und Sporen freisetzen (*Konidien*). Aus diesen bildet sich neues Mycel. Wie viele Pilze können sich Ascomyceten aber auch sexuell fortpflanzen. Dabei nehmen sie eine andere Erscheinungsform an (*Dimorphismus*), was ihre Klassifikation erheblich erschwert: Die *Hyphen* bilden männliche und weibliche Geschlechtsorgane (*Antheridien* und *Ascogonien*), die in der *Plasmogamie* zu dikaryoten *Hyphen* mit einem *Ascocarp* („Fruchtkörper“) auswachsen. In den endständigen Zellen der dikaryoten *Hyphen* fusionieren die dikaryoten Kerne zu einer diploiden *Zygote* (*Karyogamie*). Nach *Meiose* bilden sich 8 haploide Ascosporen (*Ascomyceten*) bzw. 4 Basidiosporen (*Basidiomyceten*), die wieder zum Mycel auswachsen.

*Penicillium chrysogenum* wächst als Mycel. Er bildet Fruchtkörper, aus denen Sporen (*Konidien*) freigesetzt werden. Diese haben allerdings die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung verloren (*Fungi imperfecti*). Im Labor führt man deshalb die Rekombination des genetischen Materials mittels Protoplasten-Fusion verschiedener Kerntypen durch (*Heterokaryose*, parasexueller Zyklus). *P. chrysogenum* und der verwandte *Acremonium chrysogenum* bilden die besonders wichtigen Lactam-Antibiotika (→206), andere *Penicillium*-Arten wie *Penicillium camembertii* spielen eine Rolle bei der Käse-Reifung (→188). Das Genom von *P. chrysogenum* ist ca. 32 Mbp groß, seine Sequenz wurde 2008 veröffentlicht.

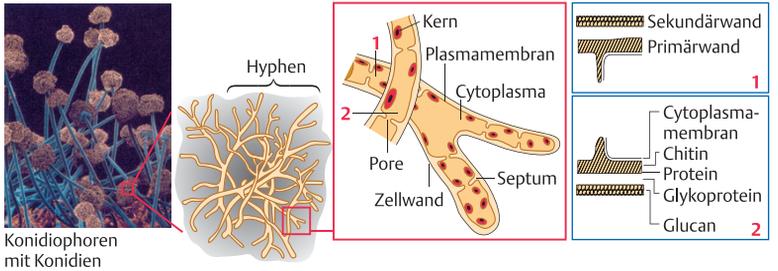
*Aspergillus nidulans* unterscheidet sich morphologisch von *Penicillium* durch die unterschiedliche Form der Konidien. Sein Genom ist 30,5 Mbp groß und sequenziert, aber erst teilweise annotiert (2014). *A. niger* ist der bevorzugte Produktionsstamm zur Herstellung von Citronensäure (→146) und Glucosäure (→150). *Aspergillus oryzae* und *A. niger* spielen im asiatischen Raum eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Lebensmitteln (Sojasauce, Miso) (→86, 114) und werden weltweit zur Produktion extrazellulärer Enzyme (Proteasen, Amylasen) verwendet (→178, 182, 186, 192, 194). Wie bei *Penicillium* verwendet man zur Stammverbesserung Protoplastenfusion und Selektion. Die Genom-Sequenzen von *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* und acht weiteren *Aspergillus*-Stämmen liegen vor (2014) und erlauben zunehmend gerichtete molekulargenetische Transformationen.

*Rhizopus oryzae* wächst auf Reis, *Rhizopus nigricans*, der „schwarze Brotpilz“, auf Brot. Seine *Hyphen* wachsen rasch aus und bohren sich in das Nährsubstrat. Die asexuelle Fortpflanzung erfolgt durch die Bildung von Sporen, die sich in differenziertem Mycel (*Sporangien*) bilden. *Rhizopus* und die nahe verwandten *Mucor*-Arten leben auch auf faulendem organischen Material und bilden zu dessen Aufschluss zahlreiche extrazelluläre Enzyme. Sie sind wichtige Organismen für die Herstellung extrazellulärer Enzyme, z. B. von Lipasen und Proteasen. Das Genom von *R. oryzae* ist 45,2 Mbp groß und seine Sequenzierung wurde 2009 abgeschlossen. Auch von *Mucor circinelloides* liegt eine Genom-Sequenz vor.

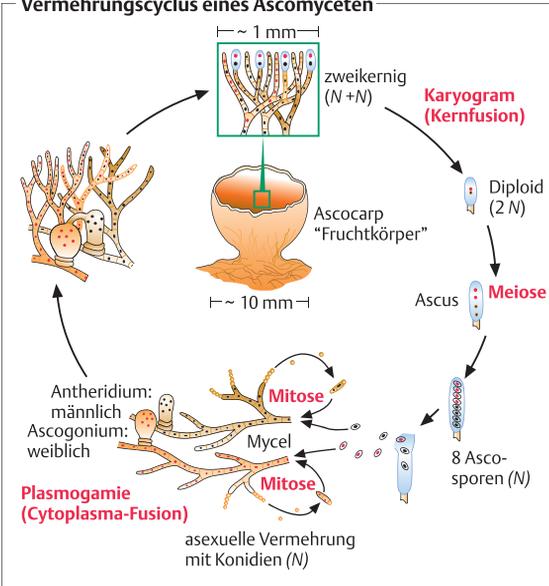
### Morphologische Merkmale von Pilzen



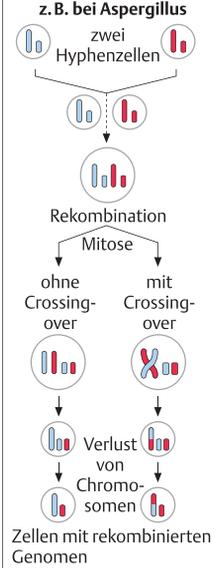
### Aspergillus niger, ein Ascomycet



### Vermehrungszyklus eines Ascomyceten



### Parasexueller Cyclus z.B. bei Aspergillus



## Algen

**Allgemeines.** Algen leben meist im Wasser, assimilieren  $\text{CO}_2$  und entwickeln  $\text{O}_2$  durch Photosynthese, bilden aber im Gegensatz zu Landpflanzen keinen Embryo. Prokaryotische Algen werden als Blaualgen oder Cyanobakterien bezeichnet und etwa 100 Gattungen zugeordnet. Die über 20000 Arten eukaryotischer Algen werden in Grün-, Braun-, Rot-, Kieselalgen und andere Gattungen unterteilt. Einige Cyanobakterien und Algen bilden hochgiftige Toxine (Microcystine, Saxitoxin), andere werden schon lange für die Erzeugung von Nahrungszusatzstoffen und für die Herstellung von Spezialchemikalien wie z. B. Alginat, Agar oder Astaxanthin verwendet. Da Algen überwiegend photoautotroph sind, d. h. wie höhere Pflanzen  $\text{CO}_2$  als einzige C-Quelle verwerten und mit Lichtenergie aktivieren, da sie ferner im Wasser leben und keine Konkurrenz zu landwirtschaftlich genutzten Landflächen bilden, sind sie in den letzten Jahren als Lieferanten von Bio-Treibstoffen populär geworden, sei es durch Abbau ihrer Biomasse zu Biogas, sei es durch Eingriffe in ihren Stoffwechsel zur optimierten Bildung von Biodiesel ( $\rightarrow 328$ ). Länder mit viel Sonnenstrahlung und langen Küsten wie z. B. die USA, Australien, Israel, Japan und China treiben derartige Projekte intensiv voran.

**Eukaryontische Algen** können in ihrer Wuchsform Einzeller von einigen  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Chlorella) oder Vielzeller von bis zu 30 m Länge sein (Kelp). Die Zellen sind kompartimentiert und bilden Chloroplasten, die Chlorophyll a und b und häufig auch Carotinoide enthalten. Einige Arten, z. B. *Euglena*, können vollständig heterotroph leben und verlieren dann ihre Chloroplasten. Die Zellwand vieler Algen besteht aus Cellulose-Fibrillen, die mit anderen Polysacchariden wie z. B. Alginsäure verstärkt sind. Die Gruppe der Diatomeen bildet ihre Zellwand aus Silikaten, die auf einer Protein-Matrix aufgebaut werden. *Laminaria* und andere marine Braunalgen sind eine wichtige Quelle für Alginat ( $\rightarrow 158$ ). Die Viskosität einer Alginat-Lösung ist vom  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt abhängig. Alginat werden in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel, in der Medizin als Wundauflage und neuerdings auch als Textilfasern verwendet. *Chlorella* sind einzelne Süßwasseralgen, die sich ungeschlechtlich

vermehrten. Sie enthalten einen Chloroplasten und wenige Mitochondrien. Sie können verhältnismäßig einfach kultiviert werden und finden als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung. *Botryococcus braunii* ist ebenfalls eine grüne Mikroalge, die in Kolonieform im Süßwasser lebt und bis zu 60 % Kohlenwasserstoffe in Form von Alkanen, Terpenen und Squalen bildet und einlagert ( $\rightarrow 162$ ). Das Öl wird als Flüssigtreibstoff untersucht. *Haematococcus fluviatilis* ist eine kokkenförmige Süßwasseralge, die das Tetraterpen Astaxanthin in hohen Ausbeuten bildet. Astaxanthin vermittelt über die Nahrungskette die rötliche Farbe von Lachs, Shrimps usw. Es ist ein starkes Antioxidans, für den Menschen sehr gut verträglich und wird deshalb als Nahrungsmittelzusatz und in der dekorativen Kosmetik verwendet. *Cryptocodinium cohnii* ist eine marine Rotalge aus der Gruppe der Dynoflagellaten. Sie reichert bis zu 20 % (als % Trockenmasse) Dodosahexaensäure an, eine  $\omega$ -3-Fettsäure ( $\rightarrow 162$ ), die als Nahrungsergänzungsmittel verwendet wird. *Dunaliella* sind halophile marine Mikroalgen. Sie bilden hohe Konzentrationen an  $\beta$ -Carotin und Glycerin zur Anpassung an ihre salzreiche Umgebung. *Neochloris oleoabundans* ist eine Mikro-Grünalge, die bis zu 30 % Triglyceride (als % Trockenmasse) anreichert. Das Öl wird als Treibstoff untersucht. *Nannochloropsis*-Arten gehören zum Phytoplankton. Sie sind gut transformierbar und bilden Einzelleröl.

**Cyanobakterien** sind Prokaryonten, die häufig auch heterotroph leben können. Sie weisen eine große morphologische Diversität auf, auf Grund deren sie in 5 Klassen eingeteilt werden können. Die Zellwand besteht aus Peptidoglykan, und ihr photosynthetische Membransystem ist vielschichtig und komplex. Es enthält neben Chlorophyll a noch Phycobiline als Pigment. Viele Cyanobakterien enthalten sog. Heterocysten zur  $\text{N}_2$ -Fixierung und Cyanophycin, ein Aspartat-Arginin-Copolymer, als C/N-haltigen Reservestoff. Die Genome von etwa 35 Cyanobakterien wurden ganz oder teilweise sequenziert – der bestuntersuchte Organismus ist *Synechocystis sp.* *Spirulina* ist eine Gattung von 1–3  $\mu\text{m}$  langen Cyanobakterien, die in stark alkalischen Salzseen wachsen. Sie bilden mehrzellige gewendelte Mikrofilamente. Spirulina-Biomasse wird in Aquakulturen produziert und kommt als Nahrungs- und Tierfutter-Zusatz in den Handel.



## Einige biotechnologisch wichtige Bakterien

**Allgemeines.** Als Beispiele für einige biotechnologisch bedeutende Bakterien werden hier besprochen: *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor* und *Corynebacterium glutamicum*.

***Escherichia coli*** lebt im Darm von Säugern und gehört zur Gruppe der Enterobakterien. Es bildet begeißelte Stäbchen. Die Zellwand färbt Gram-negativ; unter ihr liegen zwei Membranen und dazwischen ein periplasmatischer Raum. Unter anaeroben Bedingungen gewinnt *E. coli* Energie durch Gärung und scheidet Säuren aus. In Gegenwart von O<sub>2</sub> erfolgt die Energie-Gewinnung über die Atmungskette. Die Generationszeit beträgt unter optimalen aeroben Wachstumsbedingungen ca. 20 min. Das Genom von *E. coli* ist ca. 4,6 Mbp groß, der GC-Gehalt beträgt 51 %. Obwohl *E. coli* K-12 MG1655 bereits 1997 vollständig sequenziert wurde und dieser Organismus zu den bestuntersuchten Lebewesen gehört, versteht man noch immer nicht die Funktion aller Genprodukte, die von den etwa 4300 ORFs („open reading frames“) gebildet werden. Biotechnologisch wird *E. coli* vor allem als Wirtsorganismus für die Expression nicht-glykosylierter Proteine verwendet, z. B. von Insulin, Wachstumshormonen und Antikörper-Fragmenten. Da *E. coli* Wildstämme in die Sicherheitsgruppe S2 fallen, weil sie den menschlichen Darm besiedeln, benutzt man für Klonierungsexperimente attenuierte *E. coli*-Stämme (z. B. *E. coli* K12), bei denen alle Risikofaktoren eliminiert sind; sie fallen deshalb in die Sicherheitsgruppe S1 und sind unter normalen mikrobiologischen Sicherheitsvorkehrungen kultivierbar (→332). Zur Klonierung fremder Gene in *E. coli* gibt es zahlreiche Vektoren, von denen für die Anlage von Genbanken der BAC-Klonierungsvektor (BAC = bacterial artificial chromosome) besonders wichtig ist (→68).

***Pseudomonas putida*** hat die Form eines polar begeißelten, aeroben Stäbchens und lebt aerob im Wasser. Die Zellwand besitzt zwei Membranen, die einen periplasmatischen Raum einschließen, und färbt Gram-negativ. Das Genom von *P. putida* ist ca. 6,1 Mbp groß, der GC-Gehalt beträgt 61 %. Pseudomonaden haben ein großes genetisches Potenzial zum Abbau aromatischer Verbindungen, das über

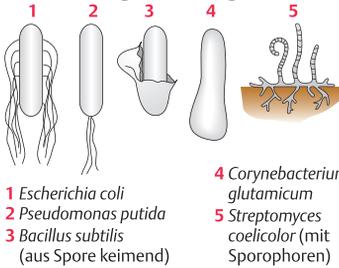
Plasmide übertragen wird (→292). Biotechnologisch werden sie deshalb vor allem für Aufgaben des Umweltschutzes untersucht.

***Bacillus subtilis*** ist ein aerobes Bodenbakterium. Das unbegeißelte Stäbchen bildet unter ungünstigen Wachstumsbedingungen thermoresistente Sporen als Dauerform. Die Zellwand färbt Gram-positiv; unter ihr liegt nur eine Membran. Die Energie-Gewinnung erfolgt über die Atmungskette. Die Generationszeit beträgt unter optimalen Wachstumsbedingungen ca. 20 min. Das Genom von *B. subtilis* ist ca. 4,2 Mb groß und wurde vollständig sequenziert. Der GC-Gehalt beträgt 44 %. Mit *Bacillus*-Stämmen werden biotechnologisch vor allem extrazelluläre Enzyme, z. B. Proteasen, Cellulasen und Amylasen, hergestellt (→174, 176, 190, 194).

***Corynebacterium glutamicum*** gehört zu den coryneformen Bakterien, die zahlreiche Lebensräume besiedeln und auch pathogene Spezies bilden (z. B. *C. diphtheriae*). Die keulenförmigen Zellen wachsen aerob und färben Gram-positiv. Das Genom von *C. glutamicum* ist ca. 3,1 Mbp groß, seine Sequenzierung wurde 2003 abgeschlossen. Der GC-Gehalt beträgt 56 %. Deregulierte und Stoffwechsel-optimierte Mutanten von *C. glutamicum* sind wichtige Produktionsstämme für L-Glutaminsäure (→126) und L-Lysin (→128). *C. glutamicum* gehört zu den bevorzugten Organismen der „synthetischen Biologie“, und Mutantensämme wurden beschrieben, die Milchsäure, Bernsteinsäure, 1,2-Propanediol oder Anilin aus Glucose oder hydrolysiertes Biomasse bilden. Das Corynex-System ermöglicht die kostengünstige Herstellung von Pharma-Proteinen.

***Streptomyces coelicolor*** ist ebenfalls ein Bodenbakterium aus der Gruppe der Actinomyceten. Es wächst in Form eines Mycel und bildet dabei Lufthyphen, von denen Sporenbildende Konidien abgeschnürt werden. Die Zellwand besitzt eine Membran und färbt Gram-positiv. *S. coelicolor* baut, wie viele andere Streptomyceten, Cellulose und Chitin ab. Sein Genom ist mit ca. 8,7 Mbp fast doppelt so groß wie das von *E. coli*, der GC-Gehalt ist mit 72 % sehr hoch. Die Sequenzierung ist abgeschlossen und weist auf knapp 8000 Strukturgene hin. Wahrscheinlich benötigen Streptomyceten einen großen Teil der im Genom gespeicherten Informationen zur Biosynthese von Produkten des Sekundär-Stoffwechsels, z. B. von Antibiotika. (→200)

## Biotechnologisch wichtige Bakterien

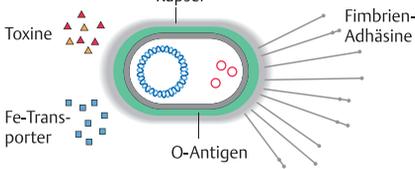


- 1 *Escherichia coli*
- 2 *Pseudomonas putida*
- 3 *Bacillus subtilis*  
(aus Spore keimend)
- 4 *Corynebacterium glutamicum*
- 5 *Streptomyces coelicolor* (mit Sporophoren)

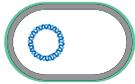
|                   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Begeißelung       | +   | +   | -   | -   | -   |
| Gram-Färbung      | -   | -   | +   | +   | +   |
| Sporenbildung     | -   | -   | +   | -   | +   |
| aerobes Wachstum  | +   | +   | +   | +   | +   |
| GC-Gehalt         | 51  | 61  | 44  | 56  | 72  |
| Genom-Größe (Mbp) | 4,6 | 6,1 | 4,2 | 3,1 | 8,7 |

### *E. coli* K12-Wirtsstamm

#### Wildtyp



#### *E. coli* K12

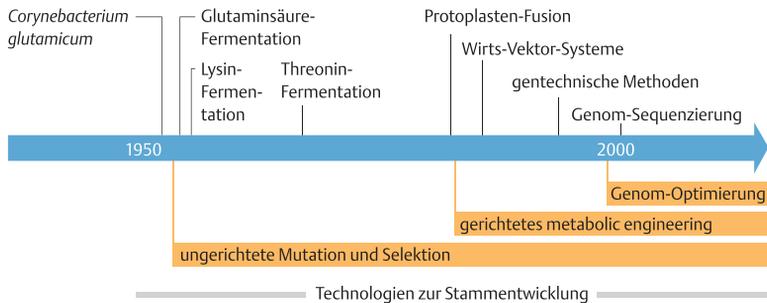


- kleineres Genom
- keine Plasmide
- keine Kapsel
- keine Fimbrien-Adhäsine
- reduziertes O-Antigen
- keine Toxine
- keine Fe-Transporter

### Genfunktion im *E. coli* K12-Genom

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| gesamt                | 4364  |
| Enzyme                | ~1500 |
| Transportproteine     | ~600  |
| Regulationsproteine   | ~400  |
| Gene fremder Herkunft | ~300  |
| Membranproteine       | ~250  |
| Strukturproteine      | ~200  |
| Carrierproteine       | ~100  |
| RNA-Synthese          | ~150  |
| Sonstige              | ~300  |
| unbekannte Funktion   | ~600  |

### *Corynebacterium glutamicum*



### Einige vollständig sequenzierte Prokaryoten-Genome (Auswahl)

|                                   | Erkrankung                   | Genomgröße (Mbp) |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------|
| <i>Haemophilus influenzae</i>     | Erkältungen beim Kleinkind   | 1,8              |
| <i>Helicobacter pylori</i>        | Ulkus                        | 1,7              |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>      | bakterielle Lungenentzündung | 0,8              |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Lungentuberkulose            | 4,4              |
| <i>Treponema pallidum</i>         | Syphilis                     | 1,1              |
| <i>Mycobacterium leprae</i>       | Lepra                        | 3,3              |

## Mikroorganismen: Isolierung, Stammhaltung, Sicherheit

**Allgemeines.** Für die meisten Untersuchungen verwendet man Reinkulturen von Mikroorganismen. Bei biotechnologischen Anwendungen handelt es sich dabei in der Regel um Stämme, die durch Mutation und Selektion für die gewünschte Anwendung optimiert wurden. Man lagert und konserviert sie in Stammsammlungen. Ihre Anzucht erfolgt auf festen oder flüssigen Nährmedien unter sterilen Bedingungen. Die meisten in der Biotechnologie verwendeten Mikroorganismen sind heterotroph und wachsen aerob. Für die Anzucht photosynthetischer Mikroorganismen gibt es spezielle Arbeitsprotokolle unter Licht, für Anaerobier unter O<sub>2</sub>-Ausschluss.

**Reinkulturen** erhält man aus Stammsammlungen oder durch Anreicherung der Mikroorganismen aus ihren natürlichen Standorten (z. B. Boden, Wasser, Lebensmittel, andere Organismen). Die bevorzugte Methode ist ein Verdünnungs-Ausstrich auf sterilem, Nährstoff-haltigem Agar, einem vernetzten Polysaccharid aus Meeresalgen („ausplattieren“). Dabei kann man Einzelkolonien isolieren. Meist wählt man die Wachstumsbedingungen (→88) so, dass der gewünschte Mikroorganismus einen Wachstumsvorteil hat (Selektion) (→24): so kann man bei O<sub>2</sub>-freiem Arbeiten unter Licht mit CO<sub>2</sub> als einziger C-Quelle und N<sub>2</sub> als N-Quelle Cyanobakterien anreichern. Mit einem schwach sauren pH-Wert eines Zucker-reichen Mediums isoliert man bevorzugt Pilze, durch erhöhte Bebrütungstemperatur thermophile Mikroorganismen, und durch Zusatz von Casein als einziger organischer N-Quelle Protease-Bildner. Nach Maßgabe der 16S-rRNA-Analytik erfasst man mit diesen Methoden allerdings weniger als 5% der in Wasser und Erdproben vorkommenden Mikroorganismen (→74).

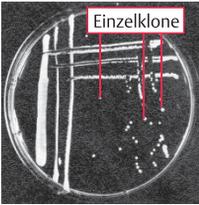
**Stammhaltungen** dienen der Konservierung von Reinkulturen, die dabei ihre Identität, Lebensfähigkeit und Funktionsfähigkeit behalten müssen. Die konventionelle Methode besteht im regelmäßigen Überimpfen auf Agarplatten oder Schrägagar-Röhrchen. Dabei können allerdings genetisch bedingte Degenerationserscheinungen auftreten. Für Typstämme oder wichtige Produktionsstämme bevorzugt man deshalb folgende Methoden: a) Aufbe-

wahrung unter chemisch inerten Flüssigkeiten, z. B. unter Paraffin (geeignet für Hyphenpilze), b) Einfrieren bei -196°C und Aufbewahren unter flüssigem N<sub>2</sub> oder bei -70°C (Tiefkühltruhe); Einfrieren und Auftauen müssen rasch und in Gegenwart von Glycerin oder DMSO erfolgen, um eine Zerstörung der Zellen durch Eiskristalle zu verhindern (diese Methode wird vor allem für Bakterien und Hefen verwendet), c) Eintrocknen von Suspensionen im Vakuum auf Träger (Silicagel, Sand) in Gegenwart eines Emulgators (Magermilch, Serum) und Aufbewahren bei -70°C. Dabei ist sicherzustellen, dass die Stämme reaktiviert werden können. Weltweit stehen mittlerweile umfangreiche öffentliche Stammsammlungen zur Verfügung, von denen Reinkulturen abgerufen werden können. Sie sind entweder universell (Beispiele: ATCC: American Type Culture Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) oder auf bestimmte Gruppen von Mikroorganismen, z. B. auf Pilze spezialisiert (Beispiel: CBS: Centralburau voor Schimmelkulturen). Viele Industrieunternehmen unterhalten umfangreiche eigene Stammsammlungen. Liegt der Wert eines Stamms in einer Plasmid-kodierten Eigenschaft (häufig z. B. bei der Herstellung von Enzym-Mutanten-Bibliotheken), so tritt neben die Stammsammlung die Aufbewahrung von Plasmiden, die als sogenannte „Plasmid-Preps“ bei -20°C sehr lange gelagert werden (nuclease-frei!) und auch leicht transportiert oder versendet werden können.

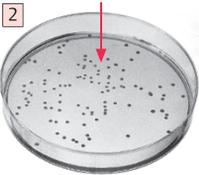
**Sicherheit.** Jeder Umgang mit Mikroorganismen muss nach den Regeln der biologischen Sicherheit erfolgen (→332), denn schließlich gibt es in nahezu jeder Gattung auch gefährliche Krankheitserreger (Beispiele: *Bacillus subtilis*: harmloser Produzent technischer Enzyme – *Bacillus anthracis*: Milzbranderreger; *Aspergillus oryzae*: Sojasaucen-Fermentation – *Aspergillus flavus*: Bildner lebertoxischer, carcinogener Aflatoxine). Mikroorganismen sind in Positiv-Listen vier Risikogruppen zugeordnet. Die Ausstattung der Labors und die Arbeitsrichtlinien entsprechen dem biologischen Risiko. Zur Risikogruppe 1 zählen vor allem solche Mikroorganismen, die seit alters her zur Nahrungsmittel-Herstellung eingesetzt werden, z. B. Backhefe. Die meisten biotechnologisch verwendeten Mikroorganismen gehören in diese Gruppe.

### Reinkulturen

1 Verdünnungsausstrich auf Nähragar



Überimpfen von Einzelkolonien auf Nähragar: Reinkultur

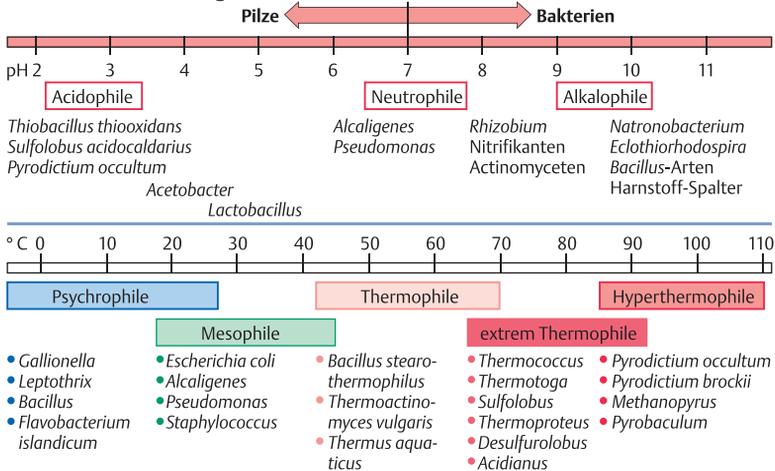


### Anreicherungskulturen (Beispiele)

| Bakterien               | Energiequelle, Nährstoffe  |
|-------------------------|--|
| <b>phototroph</b>       |  |
| Rhodospirillen          | ● Licht, H <sub>2</sub> oder org. Säuren, CO <sub>2</sub>                            |
| Cyanobakterien          | ■ Licht, CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> als N-Quelle                               |
| <b>chemolitotroph</b>   |  |
| Nitrosomonas            | ● NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> als H-Donator, O <sub>2</sub> als H-Akzeptor          |
| Thiobacillus            | ● H <sub>2</sub> S, S oder S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> als H-Donator |
| Methan-Bildner          | ■ H <sub>2</sub> als H-Donator, CO <sub>2</sub> als H-Akzeptor                       |
| <b>heterotroph</b>      |  |
| Pseudomonaden           | ■ 2 % KNO <sub>3</sub> als H-Akzeptor, org. Säuren                                   |
| Clostridien             | ■ Stärke, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , pasteurisiertes Impfgut                     |
| Enterobakterien         | ■ Glucose, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  |
| Milchsäurebakterien     | ■ Glucose, Hefeextrakt, pH 5   |
| Bacillen                | ● Stärke, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>   |
| Streptomyceten          | ● Mannit, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>   |
| <b>enzymbildend</b>     |  |
| aerobe Protease-Bildner | ● Glucose, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Casein                                     |
| aerobe Lipase-Bildner   | ● Glucose, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Tributyrin                                 |

● aerobe oder ■ anaerobe Wachstumsbedingungen

### Diversität der Mikroorganismen



### Risikogruppen (Auswahl)

| Risikogruppe 1   | Risikogruppe 2   | Risikogruppe 3   |
|--|--|--|
| <i>Acetobacter acetii</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Yersinia pestis</i> |
| <i>Penicillium notatum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida tropicalis</i>           | <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trychophyton rubrum</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> | <i>Histoplasma capsulatum</i>  |

■ Bakterien ■ Pilze, Hefen

## Stammverbesserung von Mikroorganismen

**Allgemeines.** Aus der Umwelt isolierte Mikroorganismen weisen nur selten optimale Eigenschaften für technische Anwendungen auf. Sie werden deshalb meist durch eine Kombination von Mutations- und Selektionsschritten optimiert. Die wichtigsten Ziele einer Stammoptimierung sind: a) die Ausbeute-Steigerung eines Produkts, b) die Entfernung von Nebenprodukten, und c) verbesserte Eigenschaften des Mikroorganismus bei der Produktion (z. B. verkürzte Fermentationsdauer, keine störende Pigmentbildung, Resistenz gegen Bakteriophagen). Ein großer Vorteil der Mikroorganismen ist ihre kurze Generationszeit (oft  $< 1$  h). Sie erlaubt es, eine sehr große Zahl von Mutanten herzustellen und zu analysieren. Bei eukaryotischen Mikroorganismen, z. B. bei Pilzen, müssen dabei Rekombinations-Ereignisse berücksichtigt werden. Mit zunehmender Kenntnis des Stoffwechsels, seiner Regulation und seiner Codierung im Genom werden immer häufiger gentechnische Methoden zur gezielten Ausschaltung oder Amplifikation von Stoffwechselschritten eingesetzt (*metabolic engineering*).

**Mutation.** Die spontane Mutationshäufigkeit (Veränderung der DNA-Sequenz infolge natürlicher Mutationsereignisse und Fehlern bei der Replikation) liegt für ein Gen normaler Stabilität bei  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ . Derartige Mutationen bleiben meist stumm, revertieren genetisch oder funktionell oder werden durch DNA-Reparatur behoben. Für die industrielle Stammverbesserung ist eine drastischere Mutationsauslösung erforderlich. Dazu setzt man vor allem UV-Strahlung und mutagene Chemikalien ein. Durch Wahl des Mutagens und der Dauer seiner Einwirkung kann man Mutationstyp und -häufigkeit beeinflussen. Je nach Aufgabenstellung liegt dabei die Abtötungsrate bei 90 bis  $> 99$  %. Man selektiert dann im Phänotyp der Überlebenden auf die gewünschten Eigenschaften.

**Selektion in Oberflächenkultur.** Zur Auswahl von Mikroorganismen mit verbessertem Phänotyp wird meist die selektive Isolierung von Hochleistungsmutanten verwendet. Entscheidend dafür ist, ob eine gut erkennbare Indikatorreaktion zur Verfügung steht. So kann beispielsweise die Resistenz von Mutanten ge-

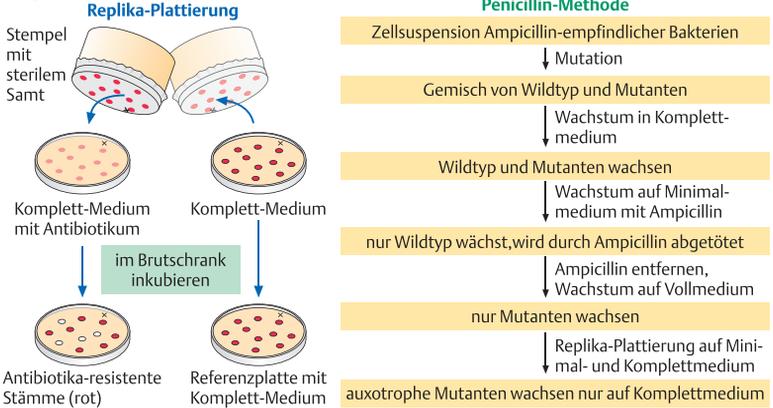
genüber Antibiotika, Hemmstoffen oder Phagen durch Ausplattieren auf ein Nährmedium erprobt werden, das dieses abtötende Prinzip enthält. Auch die Replika-Plattierung auf kompletten und Selektionsmedien, ggf. nach einem Penicillin-Anreicherungs-schritt (Penicillin tötet nur wachsende Zellen ab), leistet wertvolle Dienste, z. B. bei der Selektion auxotropher Mutanten. Sollen Mutanten isoliert werden, die einen biologisch aktiven Metaboliten (z. B. ein Antibiotikum oder ein Enzym) in höheren Ausbeuten bilden, so können Hemmstofftests oder Lysehöfe als Indikatorreaktion verwendet werden. Beispielsweise lässt sich bei einem Screening nach Lipase-Bildnern der klare Lysehof eines Agars verwenden, der durch den Zusatz des Triglycerids Tributyrin opaque ist. Die beiden großen Vorteile dieses Selektionsverfahrens liegen einmal in der großen Flexibilität bei der Auswahl des Selektionsprinzips, zum andern in der großen Zahl von Mutanten (einige 100 pro Agarschale), die durchmustert werden können. Aufgrund des unspezifischen Mutationsverfahrens sind die dabei erhaltenen Mutanten allerdings meist in mehreren Genen verändert, sodass sie in aufwändigen Versuchen auf ihre Eignung als Produktionsstamm untersucht werden müssen. Man überprüft sie deshalb zuerst im Schüttelkolben, dann unter möglichst produktionsnahen Bedingungen auf Wachstum, Stoffproduktion und Handhabbarkeit und optimiert durch stufenweise Auslese der besten Stämme in mehreren Mutations- und Selektionsschritten. Durch das Einkreuzen von Wildstämmen oder wenig mutierter Produktionsstämme versucht man, die negativen Folgen ausgedehnter Mutationsverfahren zu reduzieren.

**Selektion in Submerskultur.** Kontinuierliche Fermentationen können zur selektiven Auslese von Mutanten benutzt werden. Dabei unterwirft man in einem Chemostaten wachsende Mikroorganismen in Gegenwart eines Mutagens einem Selektionsdruck (beispielsweise dem langsamen Ersatz einer gut verwertbaren C-Quelle ( $\rightarrow 88$ ) gegen eine schlechtere). Bei kontinuierlichem Wachstum setzen sich diejenigen Mutanten durch, die den veränderten Nährstoffbedingungen besser angepasst sind. Diese Methode lässt sich allerdings nicht zur Ausbeuteerhöhung von Metaboliten verwenden.

## Stammverbesserung von Mikroorganismen

| Mutagenese                       | Mechanismus  | Anwendungen                          |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| <b>physikalisch</b>              |  |                                      |
| ionisierende Strahlung (Röntgen) | führt zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen         | nachhaltige genetische Veränderungen |
| UV-Licht um 254 nm               | dimerisiert Thymidin und Cytosin                     | Punktmutationen                      |
| <b>chemisch</b>                  |  |                                      |
| Nitrit                           | desaminiert Adenin zu Hypoxanthin, Cytosin zu Uracil | Punktmutationen                      |
| Alkylierungsmittel               | alkyliert Purine                                     | Punktmutationen                      |
| Basenanaloge                     | werden in replizierende DNA eingebaut                | nachhaltige Veränderungen            |
| Acridinorange                    | interkaliert mit DNA                                 | nachhaltige Mutationen               |
| <b>biologisch</b>                |  |                                      |
| Transposons                      | übertragen DNA-Elemente innerhalb des Chromosoms     | Genmarkierung                        |

## Replika-Plattierung und Penicillin-Methode



## Nährmedien zur Selektion

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| Wachstum bei veränderter Temperatur<br>      | Minimalmedium mit Metaboliten<br> | Medium mit Indikator für Metaboliten<br> | Medium und Antimetabolit<br> |
| <b>Temperatur-Mutanten</b>  | <b>auxotrophe Mutanten</b><br>defekt in Biosynthese eines Zellbausteins*   | <b>katabolische Mutanten</b><br>defekt in einem Enzym des Substrat-Abbaus*  | <b>regulatorische Mutanten</b><br>veränderte Syntheserate eines Enzyms oder Produkts                            |
| Medium, Testkeime und $\beta$ -Lactamase<br> | Medium und Testkeime<br>          | Medium und Casein<br>                    | Medium und Tributyrin<br>    |
| Lactamase-resistente Antibiotika-Bildner  | erhöhte Antibiotika-Bildung  | erhöhte Protease-Bildung  | erhöhte Lipase-Bildung  |

\* nach Replika-Plattierung und Penicillin-Methode