

## 22. Pilze, Bakterien, Viren: Biochemische Genetik, Molekulare Genetik

### A. Biochemische Genetik

*Drosophila* ermöglichte uns zu erkennen, wie Gene in einem Chromosom lokalisiert sind. Wie schon gesagt, lag einer ihrer Vorteile, verglichen mit den bis dahin verwendeten Objekten darin, daß sie eine kurze Generationsdauer hat. Die Frage ist nur, ob es nicht noch günstigere Objekte gibt: Wir haben schon zu Beginn dieser Vorlesung gehört, daß man auch mit Bakterien und Viren genetisch arbeiten kann. Doch bevor man darauf kam, bediente man sich erfolgreich eines weiteren Objekts, des Brotschimmels *Neurospora crassa*. *Neurospora crassa* kann man, wie die Bakterien, auf einem genau definierten Medium halten. Es wächst als Mycel (= Geflecht von Hyphen = Pilzzellen) auf Agar, dem einige Salze und Glucose zugesetzt sind (Minimalmedium). Die Glucose ist als Energie- und Kohlenstoffquelle unentbehrlich.

In Abb. 22.1 ist der Lebenszyklus dieses Pilzes wiedergegeben. In der Regel findet man nur die haploiden Formen, gelegentlich können jedoch zwei Gameten miteinander verschmelzen und einen Sporangienträger (Perithecium) bilden, in dem sich wieder haploide Sporen bilden.

Dieser Zyklus gehört noch zu den relativ einfachen: Viele Pilze zeichnen sich durch außerordentlich komplexe Zyklen von Generationswechseln aus.

Es gibt Mutanten, die sich durch das Aussehen des Mycels voneinander unterscheiden. Das hätten wir, nach dem, was wir schon aus der Genetik gelernt haben, erwarten sollen: Für den Fortgang der Wissenschaft ist das also nichts Aufregendes.

BEADLE und TATUM sind der Frage nachgegangen, welche Produkte ein solches Mycel bilden kann und testeten, inwieweit ihnen dabei Mutanten von *Neurospora* eine Hilfe sein könnten. Sie ließen Tausende von Sporen, die sie vorher mit Röntgenstrahlen behandelten, auf einem Vollmedium auskeimen. Ein Vollmedium enthält außer den bereits genannten Substanzen, alle Aminosäuren und einige Vitamine. Viele der Sporen keimten aus. Übertrugen BEADLE und TATUM Mycelstücke davon auf Minimalmedien, so stellten sie fest, daß viele der Mycelien nicht wuchsen. Sie hatten somit Mutanten isoliert, die einen Defekt in ihrem Stoffwechsel aufwiesen. Herauszufinden war nun, wo der Defekt lag. Dazu war eine systematische Suche erforderlich. BEADLE und TATUM setzten ihre Experimente etwa wie folgt an: Sie stellten ein Minimalmedium her und gaben in 20 voneinander unabhängigen Ansätzen jeweils eine der 20 Aminosäuren hinzu, d.h. jedesmal eine andere. Auf dieser Serie von 20 Ansätzen wurde jede einzelne Mutante durchgetestet. Dadurch fanden sie, daß es Mutanten gibt, die nur dann wachsen können, wenn Tryptophan im Medium vorhanden ist, andere wachsen nur, wenn Leucin vorhanden ist etc. Somit war gezeigt, daß irgendein Defekt in der Biosynthese der genannten Aminosäuren vorliegt. Man hatte seinerzeit (Mitte der vierziger Jahre) schon gewisse Vorstellungen, aus welchen Vorstufen Tryptophan im Organismus gebildet wird: Anthranilsäure, Indol, Serin.

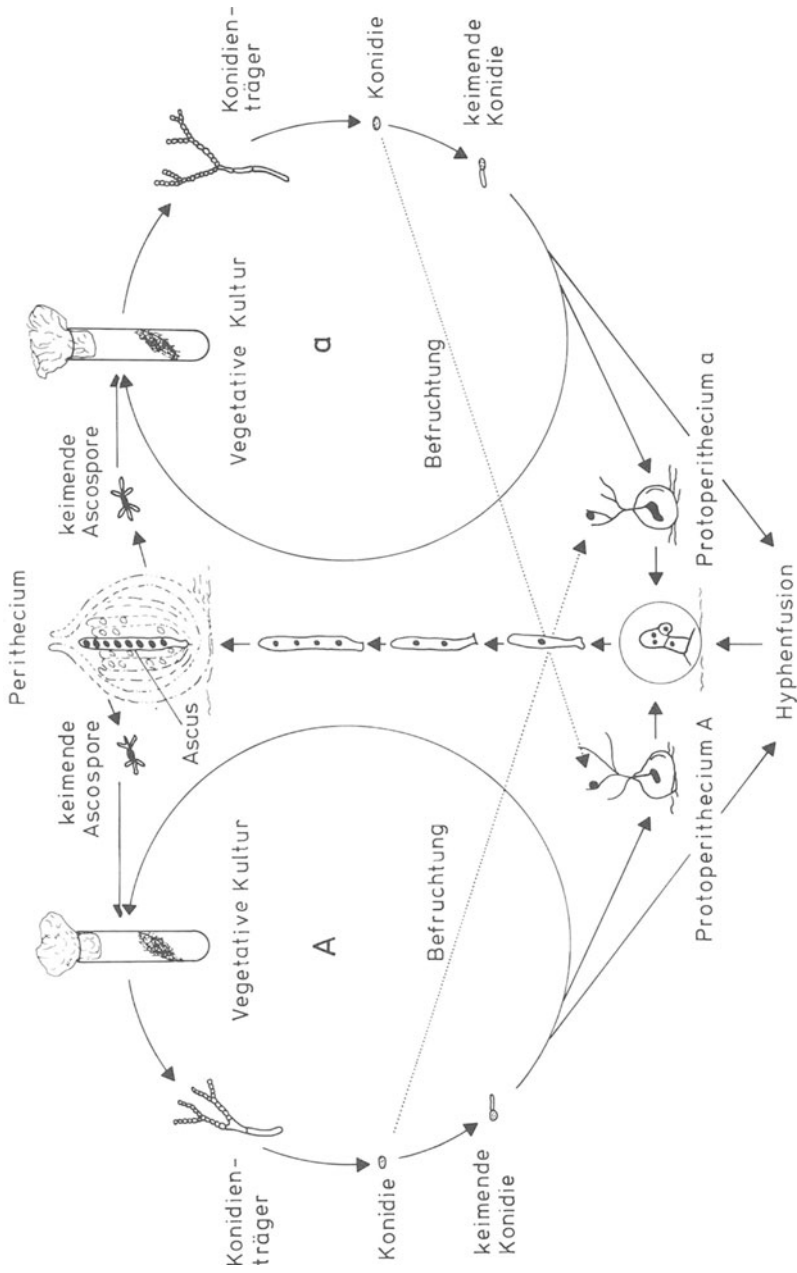


Abb. 22.1. Diagramm des Lebenszyklus von *Neurospora crassa*. In der Regel erfolgt die Vermehrung ungeschlechtlich. (Nach BEADLE und TATUM, 1947)

Was geschah, wenn man einer solchen Defektmutante Anthranilsäure statt des Tryptophans anbot? Manche der Mutanten wuchsen, andere nicht. Was geschah, wenn man Indol hinzugab? Jetzt wuchsen sowohl diejenigen, die schon auf Anthranilsäure wuchsen als auch einige weitere. Man wußte damals natürlich schon, daß die Biosyntheseschritte durch Enzyme katalysiert werden. Doch was hatte die Biochemie mit der Genetik zu tun? BEADLE und TATUM stellten den Zusammenhang durch ihre Ein Gen-ein Enzym-Hypothese her. Sie ergibt sich zwangsläufig aus den bisher beschriebenen Experimenten. Wir haben Gene, die bestimmen, welche Enzyme gebildet werden, die ihrerseits wiederum biochemische Reaktionsschritte katalysieren (Abb. 22.2). Gleichzeitig entwickelten BEADLE und TATUM eine neue Methode, um Biosynthesewege aufzuklären. Man muß nur genügend viele Mutanten von einem Stoffwechselweg isolieren und testen, ob sie auf vermeintlichen Zwischenprodukten wachsen.

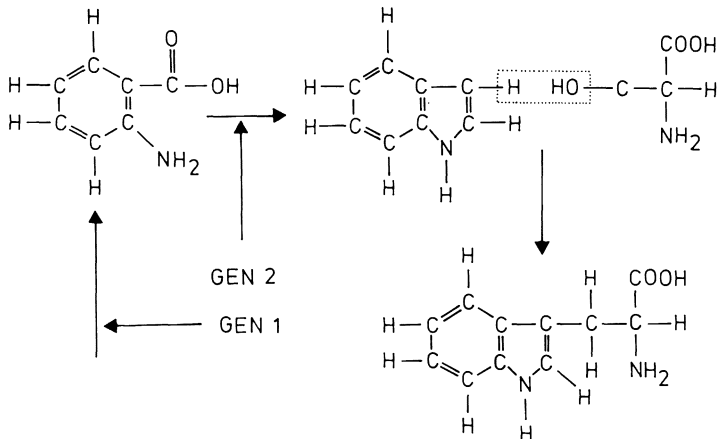
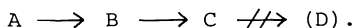


Abb. 22.2. Die Biosynthese von Tryptophan in *Neurospora crassa*. Gen 1 bewirkt die Bildung von Anthranilsäure; Gen 2 die Umwandlung in Indol; Gen 3 schließlich die Verknüpfung von Indol und Serin. (Nach BEADLE und TATUM, 1947)

Die von BEADLE und TATUM eingeleitete Phase der Genetik wird als biochemische Genetik bezeichnet.

Haben diese Befunde auch eine Bedeutung für den Menschen? Man fand zahlreiche Stoffwechsellanomalien, die auf diesen Mechanismus zurückzuführen sind. Eine der bekanntesten ist die Phenylketonurie. Jeder 15.000. Mensch ist davon betroffen. Die Stadt Heidelberg z.B. hat 125.000 Einwohner, man müßte also in dieser Stadt etwa 9 Personen mit dieser Krankheit erwarten. Bei der Phenylketonurie kann Phenylalanin nicht in Tyrosin verwandelt werden. Es reichert sich Phenylbrenztraubensäure an. Wird diese Krankheit nicht rechtzeitig erkannt (gleich nach der Geburt) und durch phenylalaninarme Ernährung behandelt, führt sie zu Schwachsinn.

Was kann man mit diesen Erkenntnissen noch anfangen? Wenn ein genetischer Block vorliegt, d.h. ein Biosyntheseschritt nicht ausgeführt werden kann, sammelt sich das Ausgangsprodukt in erhöhter Konzentration an (siehe eben genanntes Beispiel)



Die Anreicherung von Stoffwechselzwischenprodukten, in unserem Fall C, kann man industriell ausnutzen, da man oft an solchen Produkten interessiert ist. Um sie in größerer Menge zu erhalten, braucht man Mutanten von Pilzen, bei denen der darauffolgende Schritt blockiert ist.

## B. Molekulare Genetik

Der logische Schritt zum Arbeiten mit Bakterien war nicht weit. DEMEREC sind die ersten biochemisch-genetischen Arbeiten auf diesem Gebiet zu verdanken. Auch hier ging es zunächst einmal primär um die Aufklärung von Biosynthesewegen und die Kartierung von Genen. Bakterien hatten den Vorteil, daß man von Individuen ausgehen und in kurzer Zeit eine große Nachkommenschaft erhalten konnte. Die Generationsdauer von *Escherichia coli*, dem Darmbakterium, beträgt nur ca. 20 min. Läßt man es in einem Nährmedium wachsen, erhält man eine charakteristische Wachstumskinetik (Abb. 22.3). Experimentelle Einzelheiten haben wir bereits im Kapitel 5 besprochen.

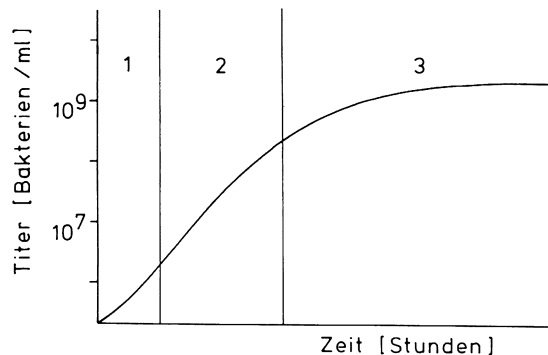


Abb. 22.3. Wachstumskinetik einer Bakterienkultur. Das Wachstum durchläuft 3 Phasen: 1 die lag-Phase oder Anlaufphase; 2 die logarithmische Wachstumsphase; 3 die stationäre Phase

Geht man auf der Suche nach geeigneten Versuchsobjekten konsequent weiter, so stößt man auf die Viren. Viren sind eine sehr heterogene Gruppe von Strukturen. Sie besitzen Nukleinsäuren (DNS oder RNS) und - in der Regel - Proteine. Manche Viren enthalten zusätzlich Lipide und Kohlenhydrate. Die Abb. 22.4 gibt einen Überblick über einige der bekannten Strukturen.

Viren sind außerordentlich wirtsspezifisch. Es gibt Tierviren, Pflanzen- und Bakterienviren (Bakteriophagen). Ein Tiervirus (animales Virus) kann sich keineswegs in allen Tieren vermehren. Oft ist seine Vermehrung auch nur auf einige bestimmte Organe des Wirts beschränkt. Analoges gilt für Pflanzen- und Bakterienviren.

Strukturell lassen sich Viren in die folgenden Kategorien einordnen:

- a) Strukturen mit helicaler Anordnung ihrer Proteinuntereinheiten (vgl. S. 245). Beispiel: Tabakmosaikvirus.
- b) Mehr oder weniger kugelförmige Strukturen (radiäre Symmetrie). Beispiel: *Poliovirus* (es gehört in die Gruppe der *Picornaviren*).

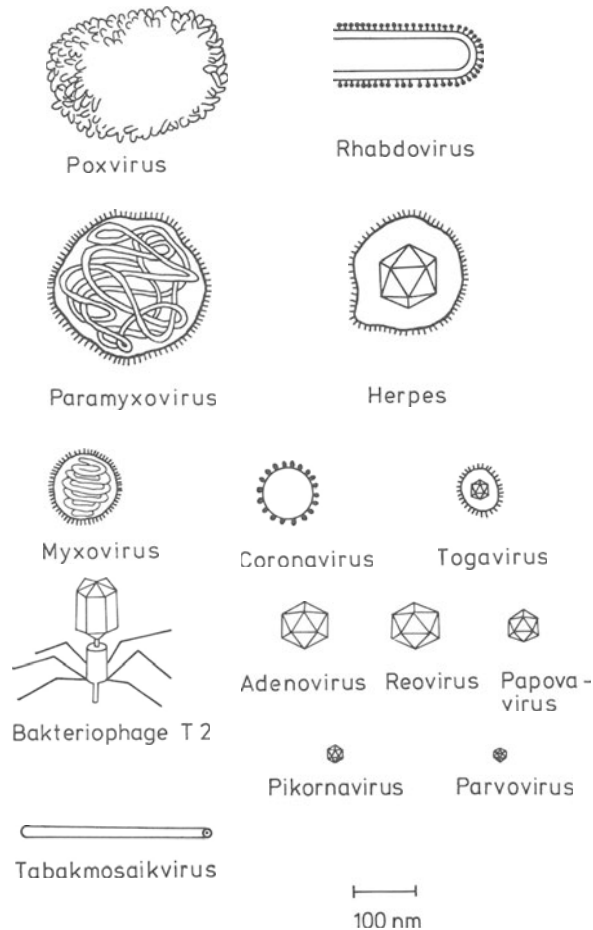


Abb. 22.4. Unterschiedliche Strukturen und relative Größen einiger Viren. (Nach FENNER und WHITE)

c) Viren, die von einer Hülle umgeben sind. Beispiel: *Togaviren*, *Influenzavirus*, *Herpesvirus* etc. (vgl. Abb. 22.4).

d) Komplexe Strukturen. Hierzu gehören z.B. viele der Bakteriophagen (T 1 - T 7,  $\lambda$  u.a.) (vgl. S. 246).

Man kann Viren auch nach der Art ihrer Nukleinsäuren klassifizieren:

a) Einige enthalten einsträngige RNS, z.B. das Tabakmosaikvirus, *Influenzaviren* (*Myxoviren*), das *Poliovirus*, einige tierische Tumoviren (*Hühner-Leukämievirus*, *Rous Sarcoma Virus* u.a.), Bakteriophagen: R 17, Q $\beta$ , fr, MS 2 etc.

b) doppelsträngige (!) RNS: *Reovirus* (Wundtumor),

c) einsträngige DNS (!): Bakteriophage  $\phi$ X 174,

d) doppelsträngige DNS: *Vaccinia Virus* (Pocken), *Adenovirus*, *Herpes*, die Bakteriophagen der T-Gruppe, der Phage  $\lambda$ , einige Tumoviren wie *Simian Virus 40* (SV 40), *Polyoma* u.a.

Diese Liste sollte nur andeuten, wie heterogen die Gruppe der Viren ist und daß man keinen gemeinsamen Ursprung annehmen darf. Man kann die Viren deshalb auch nicht zu einer systematischen Gruppe zusammenfassen.

Viren vermehren sich nur in lebenden Zellen, und auch das kann auf sehr unterschiedliche Weise geschehen. Infiziert man Bakterien mit einem Bakteriophagen der T-Reihe, etwa T 7, so geschieht in den ersten 12-13 min scheinbar gar nichts. Entnimmt man Proben der infizierten Bakterienkultur 2, 4, 6, 8, 10 und 12 min nach der Infektion, so wird man den gleichen Titer (Phagen/ml) messen wie zum Zeitpunkt 0, d.h. man mißt nur die Phagen, die in Lösung verblieben sind, die also kein Bakterium infiziert haben. Zwischen der 14. und 16. Minute steigt der Phagentiter sprunghaft an und erreicht ein neues Plateau. Wir

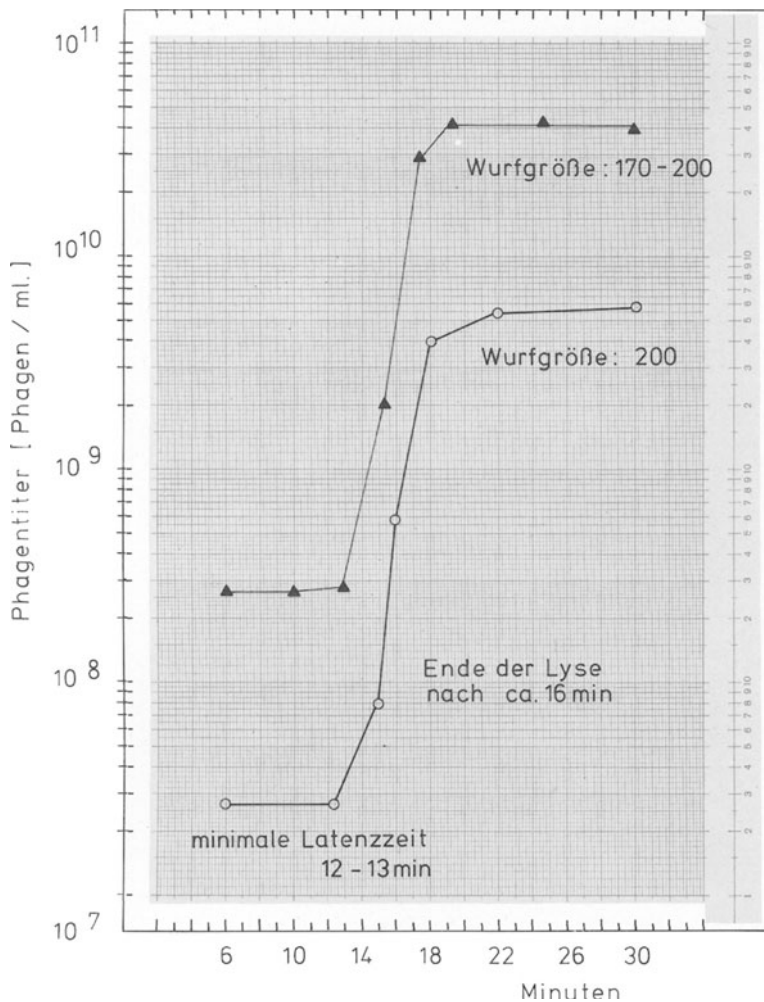


Abb. 22.5. Einstufenwachstumskinetik des Bacteriophagen T7. Darstellung auf halblogarithmischem Papier. (Ergebnisse zweier Praktikumsversuche)

haben mit einem Schlag 200 mal so viele Phagen erhalten, wie wir ursprünglich eingesetzt haben. Dieser Versuch, der zum ersten Mal von ELIS und DELBRÜCK (1939) ausgeführt wurde, wird als Einstufenwachstumskurve bezeichnet (vgl. auch Abb. 22.5).

Was ist an dieser Vermehrung bemerkenswert?

Einmal die scheinbare Ruheperiode (lag-period, Latenzzeit, Eclipse), dann der sprunghafte Anstieg des Titors, der in allen Zellen synchron abläuft. Man hat sehr schnell herausgefunden, daß hierbei die Bakterienzellen platzen (lysierten) und dabei simultan ca. 200 fertige Phagenpartikel freisetzen (= Wurfgröße: 200). Während der Latenzzeit müssen offensichtlich alle Phagen gleichzeitig gebildet worden sein. Da wir einen synchronen Reifungsprozess vor uns haben, müßte dieses System uns auch Aufschluß über die dabei ablaufenden Prozesse geben; wir werden darüber im Kapitel 30 mehr hören.

Nicht alle Phagen verhalten sich so. Der Phage  $\lambda$  kann eine Bakterienzelle infizieren und sich darin, wie die T-Phagen, vermehren. Der Pariser Mikrobiologie A LWOFF fand aber, daß mit  $\lambda$  infizierte Bakterien oft nicht lysierten. Man könnte einwenden, daß diese Zellen durch Zufall nicht infiziert worden sind, daß der Phage  $\lambda$  nicht in die Zellen eingedrungen ist, selbst irgendeinen Defekt trug oder daß die Zellen resistent waren. Alle diese Einwände ließen sich entkräften. Bestrahlte man solche scheinbar nicht infizierten Zellen mit ultraviolett Licht, so dauerte es nicht lange, bis es zu einer Phagenvermehrung kam. Die Zellen lysierten, fertige, neue  $\lambda$ -Phagen wurden freigesetzt. - Was war geschehen? Offensichtlich wurden die Zellen ordnungsgemäß infiziert. Nur, der Phage begann nicht sofort, sich wie wild zu vermehren, sondern arrangierte sich mit der Zelle. Das genetische Material des Phagen teilte sich synchron mit dem des Bakteriums.

Das Zusammenleben zweier Arten zum gegenseitigen Nutzen nennt man in der Biologie ganz allgemein eine Symbiose. Der Phage  $\lambda$  (Molekularbiologen nennen den Zustand der Symbiose: Prophage oder auch lysogener Zustand) bot der Zelle einen Vorteil: Eine Bakterienzelle, die einen solchen Prophagen trägt, kann nicht durch einen zweiten  $\lambda$ -Phagen infiziert werden. Sie ist immun geworden. Das Zusammenleben von Phage und Bakterium ist aber, wie das UV-Experiment zeigt, nicht krisenfest. Ändern sich die äußeren Bedingungen, löst der Phage seine Verpflichtungen, vermehrt sich und lysiert die Zelle.

1965 erhielt A. LWOFF für diese Untersuchungen den Nobelpreis für Medizin. Damals war für viele nicht einsichtig, warum eine so hohe Auszeichnung für eine "Kuriosität" verliehen wurde, vor allem, was das mit Medizin zu tun hatte. In der zweiten Hälfte der sechziger Jahre wurde dieser Zusammenhang auch für Laien klar: Man fand nämlich (DULBECCO u. Mitarb., damals am Salk Institute in La Jolla, Californien), daß diese Erscheinung auch bei einer anderen Gruppe von Viren auftrat: den Tumorzellen. Injiziert man SV-40-Virus in junge Hamster, so bilden diese Tumoren. Behandelt man isolierte Hamsterzellen mit SV-40-Virus, so vermehrt sich das Virus darin in der Regel nicht, sondern geht wie der Phage  $\lambda$  eine Symbiose mit seinem Wirt ein. Dabei ändern sich einige der Eigenschaften der Zelle, so ihre Oberfläche (vgl. S. 312). Als Folge davon erkennt die Zelle ihre Nachbarn nicht mehr und beginnt, sich unentwegt zu teilen. Wir erhalten ein unkontrolliertes (malignes) Wachstum: Eigenschaften von Tumorzellen. Einzelzellen, die durch ein Virus verändert worden sind, nennt man transformierte Zellen. Der Begriff Transformation wurde schon einmal erwähnt (S. 32). Die beiden Vorgänge haben aber nicht viel miteinander gemeinsam. Die Entdeckung des Verhaltens von Tumorzellen wäre wohl

kaum möglich gewesen, wäre die experimentelle Technik nicht an dem leichter zugänglichen System Phage  $\lambda$ /Bakterium entwickelt worden.

Es gibt Tierviren, die Zellen infizieren, sich dort vermehren, die Zellen aber nicht transformieren und auch nicht abtöten. Das *Influenza-virus* (Grippevirus) gehört hierzu. Es unterscheidet sich u.a. auch darin von den Bakteriophagen, daß die einzelnen Viruspartikel nicht synchron, sondern fortlaufend gebildet werden.

Als weiteres Beispiel für die Vermehrung von Viren sei das Tabakmosaikvirus, ein Pflanzenvirus, genannt. Es gibt zwei Sorten von Tabakpflanzen der Art *Nicotiana tabacum*, die sich in einem Gen voneinander unterscheiden. Die eine Sorte wird von dem Wildstamm des Virus nur lokal infiziert, d.h. das Virus kann sich nur in einigen wenigen Zellen vermehren. Die Zellen werden dabei abgetötet, man spricht von einer Nekrotisierung des Gewebes (vgl. Abb. 24.3). Das Virus kann sich aber nicht weiter ausbreiten. Man erhält also nur eine Primärinfektion: kleine Nekrosen auf den Blättern der Pflanze. Das ist natürlich ein Schutz der Pflanze vor einer Virusinfektion: einige wenige Zellen gehen zugrunde, der Rest bleibt gesund. Das hierfür verantwortliche Gen (Allel) ist dominant. Man nennt die Erscheinung: Hypersensitivität.

In Pflanzen, denen dieses Allel fehlt, kann sich das Virus ungehindert ausbreiten und alle Zellen infizieren. Man spricht dann von einer Sekundärinfektion. Der Unterschied zur Primärinfektion liegt darin, daß die Zellen hierbei nicht absterben, sondern die Virusinfektion überleben. In der Regel überlebt auch die ganze Pflanze, bildet Blüten und Samen; die Virusinfektion ist aber an einem stark reduzierten Wuchs und Deformation der Blätter erkennbar (vgl. Abb. 2.2). Im Kapitel 2 haben wir bereits gehört, daß es verschiedene Stämme des Tabakmosaikvirus gibt. Inzwischen können wir auch verstehen, daß es Mutanten eines Wildstamms sind.

Diese Beispiele sollten verdeutlichen, welche Möglichkeiten das Arbeiten mit Viren bietet. Wir werden im folgenden einzelne Details herausgreifen und näher besprechen, um zu zeigen, wie hierdurch die Genetik weitergekommen ist und wie gleichzeitig die Genetik als Methode verwandt werden konnte, um Aussagen über die Mechanismen der Zelle zu machen.

### Literatur

- BEADLE, G.W., TATUM, E.L.: Genetic control of biochemical reactions. Proc. Natl. Acad. Sci. US 27, 499 (1941).
- BRESCH, C., HAUSMANN, R.: Klassische und molekulare Genetik, 3.Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972.
- CAIRNS, J., STENT, G.S., WATSON, J.D. (ed.): Phage and the origins of molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory on Quantitative Biology, 1966.
- DEMEREK, M., FANO, U.: Bacteriophage-resistant mutants in *Escherichia coli*. Genetics 30, 119 (1945).
- ELIS, E.L., DELBRÜCK, M.: The growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 22, 365 (1939).
- KADEWITZ, F.: Molekular- und Mikrogenetik. Heidelberger Taschenbücher, Bd. 115. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1973.
- KNIPPERS, R.: Molekulare Genetik. Stuttgart: G. Thieme 1971.
- LWOFF, A.: Conditions de l'efficacité inductrice du rayonnement ultraviolet chez une bactérie lysogène. Ann. Inst. Pasteur 81, 370 (1951).



- WATSON, J.D.: The molecular biology of the gene. New York: Benjamin  
1970.
- WEIDEL, W.: Virus und Molekularbiologie. Heidelberger Taschenbücher,  
Bd. 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer 1964.
- WESTPHAL, H., DULBECCO, R.: Viral DNA in SV-40-transformed cell lines.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US 59, 1158 (1968).