

Die Mureinstruktur.

I. Ermittlung der Mureinschichtdicke an festen Präparaten von *Spirillum serpens* Zellwänden mit Röntgenkleinwinkelmethoden

Estimation of the Mureinlayerthickness of *Spirillum serpens* Using Small-Angle X-Ray Methods

H. Wawra

Forschungszentrum Graz, Steyrergasse 17/5, A-8010 Graz, Austria

Z. Naturforsch. 35 c, 495–502 (1980); eingegangen am 14. Dezember 1979/5. März 1980

Bacterial Cell Wall, Small-Angle X-Ray Scattering

The mureinlayerthickness of *Spirillum serpens* was estimated by means of small-angle X-ray scattering methods using solid prepares of broken cell walls. The interpretation of the scattering curves was possible by application of G. Porod's scattering theory of packings of lamellae.

Einleitung

Über die räumliche Struktur von Mureinschichten in Bakterienzellwänden gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, bei denen Untersuchungen vorzugsweise mit Röntgenbeugungsmethoden durchgeführt worden sind. Allen diesen Arbeiten gemeinsam sind die meist recht dürftigen Resultate aus den Röntgenaufnahmen und somit ein beträchtlicher Informationsmangel, der nur zum Teil durch Heranziehen von Ergebnissen anderer Untersuchungsmethoden wettgemacht werden kann. Zu diesen Resultaten kann man die meist bekannte chemische Struktur zählen, Ergebnisse von elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Infrarotmessungen. Daß damit vorgeschlagene Strukturmodelle recht unterschiedlich ausfallen und teilweise echte Widersprüche zu einzelnen Befunden aufweisen, kann wenig verwundern, ist ja bereits die Deutung der wenigen Röntgenreflexe ein recht unsicheres Unterfangen.

Inzwischen sind im Rahmen von Röntgenbeugungsarbeiten verschiedene Strukturparameter teilweise unter Benützung moderner Methoden der Messung zugänglich gemacht worden, wobei nun die Resultate jeweils in kurzen Publikationen dargelegt und ihre Einflüsse auf vorgeschlagene Strukturmodelle diskutiert werden sollen. Die bereits zur Routine gewordene Präparation des Mureins aus den Bakterienzellwänden wurde inzwischen so häufig

publiziert, daß hier die einzelnen Präparations-schritte nicht mehr angegeben werden, sie sind sicher hinlänglich bekannt [1]. Dasselbe gilt für die Aufnahmetechniken der Intensitäten von Röntgenbeugungskurven sowohl für den Weitwinkel- als auch den Röntgenkleinwinkelbereich [2].

Präparate und Messungen

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Ermittlung der Schichtdicke von Mureinsacculistücken gramnegativer Bakterien, im speziellen mit den Schichtdicken des Mureins von *Spirillum serpens*. Für die Untersuchung werden Präparate in festem Zustand benutzt, die aus wäßriger Suspension durch langsames Sedimentierenlassen und anschließendes ausgiebiges Trocknen im Exsiccator hergestellt wurden. Es entstehen dabei ebene Platten mit einer Schichtdicke von etwa 0,5 mm, aus welchen für die Röntgenaufnahmen Stücke passender Form herausgeschnitten werden, hier also Stücke von etwa 15 mm Länge und 1 mm Breite. Dabei handelt es sich schon von der Präparationsart her um hochorientierte Präparate, die bei den Röntgenaufnahmen von der Kante her, also senkrecht auf die Fläche mit den Abmessungen 0,5 mm × 15 mm bestrahlt werden. Die Beobachtung der abgebeugten Strahlung erfolgt senkrecht dazu in Richtung der Flächennormale auf die Fläche mit den Maßen 1 mm × 15 mm. Die notwendige Präparatlänge von 15 mm ist aus der Benützung des langen Focus der Röntgenröhre zu erklären, die verwendete Röntgenkleinwinkelkamera liefert dabei auch für nichtorientierte Präparate unmittelbar eine

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Wawra.

0341-0382/80/0500-0495 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

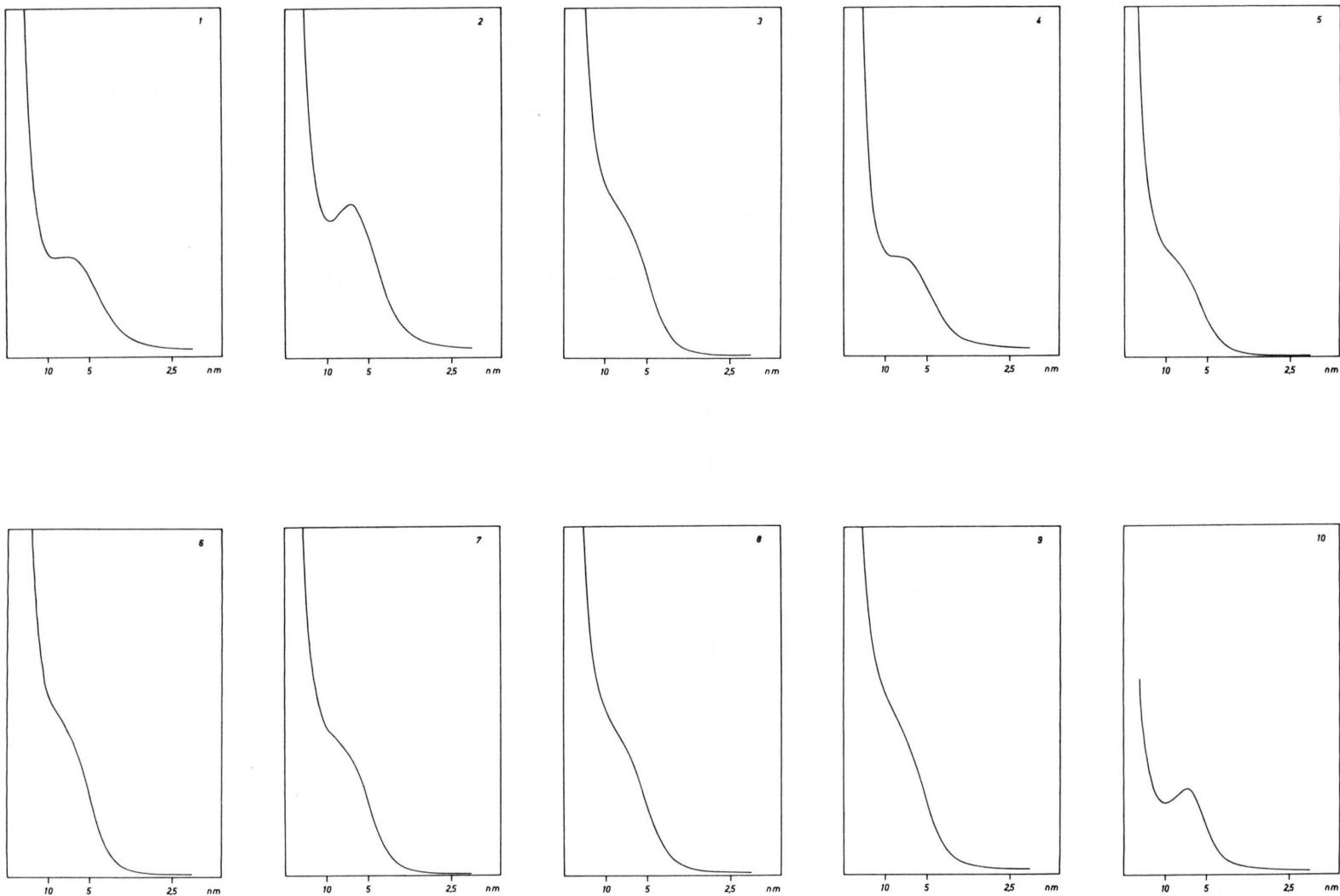


Abb. 1. Es sind zehn unverschmiert gemessene Röntgenkleinwinkelstreukurven von festen Präparaten des Mureins von *Spirillum serpens* wiedergegeben. Als Abszisse dient nicht der Beugungswinkel, sondern der aus der Bragg'schen Formel berechnete zugehörige Abstand $d = \lambda / \sin \vartheta$. Ordinate ist die gemessene, durch das Präparat gestreute Intensität in relativen Einheiten.

Röntgenkleinwinkelkurve ohne Spaltlängenverschmierung [2].

Die Abmessungen der Präparatbestandteile, also der Sacculibruchstücke, sind in zwei Dimensionen als groß anzusehen gegenüber der Dicke einer Sacculischicht, man wird bei der Flächenausdehnung der Sacculibruchstücke zumindest mit dem Hundertfachen der Sacculischichtdicke rechnen müssen.

In der Abb. 1 sind die gemessenen Röntgenkleinwinkelstreukurven von zehn Präparaten wiedergegeben – deren Streukurven an sich punktweise mit dem Proportionalzählrohr und unter Verwendung monochromatischer Strahlung (Cu K_α) gemessen wurden –, jedoch ohne die zahlreichen Messpunkte gesondert zu zeichnen.

Bei den dargestellten Kurven handelt es sich um wahllos herausgegriffene Beispiele mit teilweise unterschiedlicher Präparation. So wurden die Mureinsacculi für die Präparate der Streukurven Nr. 3, 6, 7 und 8 zusätzlich gemickelt, während das Präparat von Kurve Nr. 10 in bereits getrocknetem Zustand versuchsweise einer speziellen Behandlung unterzogen wurde. Es wurde nämlich in Glycerin neuerlich gequollen, dann für längere Zeit in Wasser gegeben und schließlich wieder getrocknet. Es sollte damit der Versuch gemacht werden, den Ordnungsgrad des Präparates zu verbessern, also ein höheres Kurvenmaximum zu erzielen. Das ist zwar, wie an der Streukurve zu sehen, tatsächlich gelungen, gleichzeitig wurden aber durch diese Behandlung auch andere Parameter verändert, so daß in dieser Richtung nichts mehr versucht wurde.

Alle Streukurven wurden von einem Beugungswinkel entsprechend einem Bragg'schen Abstand von 20 nm an gemessen bis zu Winkelwerten, bei denen nur mehr Untergrundstreuung registriert werden konnte. Den Streukurven der Mureinpräparate gemeinsam ist der verhältnismäßig steile Abfall im Streukurveninnenteil und ein mehr oder weniger deutliches Kurvenmaximum in einem Beugungswinkelbereich entsprechend dem Bragg'schen Abstand von etwa 5 nm.

Auswertung

Während sich die Auswertung derartiger Streukurven gewöhnlich darauf beschränkt, den Winkelwert des Kurvenmaximums direkt oder nach Eliminierung von Lorentzfaktoren anzugeben und daraus einen oberen Wert der Identitätsperiode in Richtung

der Gitterlinie des Schichtenstapels zu folgern, sollte hier versucht werden, jeweils den gesamten bekannten Verlauf einer Streukurve theoretisch zu berechnen und in der sonst üblichen Weise, nämlich durch Kurvenvergleich, Parameter des Präparates so genau als möglich zu erhalten. In diesem Fall also die Schichtdicke des Murein. Tatsächlich konnten in der seinerzeit für die Deutung der Streukurven von Zellulosepräparaten herangezogenen Theorie der Röntgenkleinwinkelstreuung von Lamellenpaketen nach G. Porod die geeigneten Ausdrücke für die Berechnung der Streukurven gefunden werden [3]. Formeln, die von der Ableitung her genau auf die vorliegenden Verhältnisse zutreffen. Der hier benützte Ausdruck stellt – in der Bezeichnungsweise der Originalarbeit – die vollständige Streufunktion $\tilde{\Phi}$ dar mit Berücksichtigung des Längenfaktors, also ohne den Einfluß einer in der Originalarbeit daran anschließend noch betrachteten Gitterlinienverdrehung.

Der Theorie liegt das Modell eines Schichtenstapels zugrunde, wobei die einzelnen Schichten durch Zwischenräume voneinander getrennt sind. Schicht und Zwischenraum bilden zusammen einen Identitätsabstand in Richtung der Gitterlinie, also in Stapelrichtung, wobei die Größe der Identitätsperiode Schwankungen von der Form einer Gauß'schen Glockenkurvenverteilung unterliegt. Die Streuung dieser Werte um die mittlere Identitätsperiode wird durch den Parameter δ angegeben.

$$\tilde{\Phi} = \frac{2}{s L} \cdot \frac{\sin^2\left(\frac{s D_0}{2}\right)}{\left(\frac{s D_0}{2}\right)^2} \cdot \left(\Phi_1 + \frac{1}{n} \Phi_2\right) \cdot e^{-\left(\frac{s D_0}{2}\right)^2 \cdot \delta^2}.$$

Dabei sind Φ_1 und Φ_2 wiederum Funktionen des Beugungswinkels und des Parameters δ , bzw. von n und δ :

$$\Phi_1 = \frac{1 - k^2}{1 - 2 k \cos \mu + k^2}; \quad k = e^{-\mu^2 \frac{\delta^2}{2}}.$$

$$\Phi_2 = \frac{2 k}{(1 - 2 k \cos \mu + k^2)^2} \cdot [(-\cos \mu + 2 k - k^2 \cos \mu) \\ \cdot (1 - k^n \cos n \mu) - k^n (1 - k^2) \cdot \sin \mu \cdot \sin n \mu].$$

Die weiteren Bezeichnungen haben folgende Bedeutung: n ist die Anzahl der Schichten in einem Paket, d_0 bedeutet die mittlere Identitätsperiode, D_0 die mittlere Dicke einer einzelnen Schicht, also je nach Größe entweder den Zwischenraum oder die tatsächliche Materialschicht. $D_0 = r \cdot d_0$, wobei

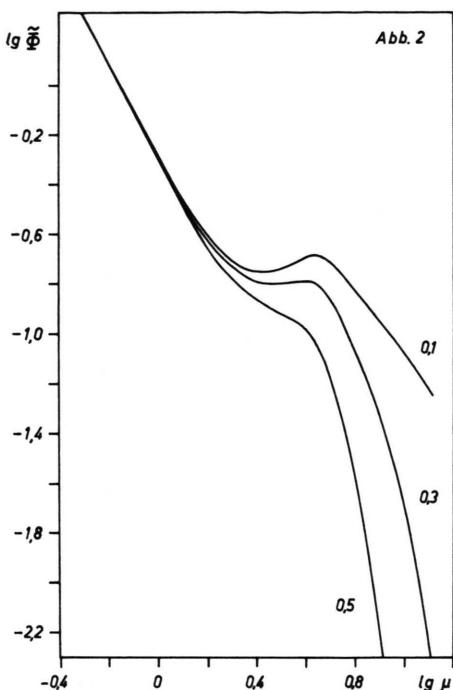


Abb. 2. Beispiel eines nach G. Porod gerechneten Satzes von theoretischen Streukurven in doppeltlogarithmischer Auftragung. Parameterwerte: $n = 10$; $\delta = 0,5$; $\delta_F = 0,6$; $r = 0,1; 0,3; 0,5$.

$0 < r \leq 0,5$. Als Bezugsgröße dient d_0 , die Winkelvariable ist $\mu = s \cdot d_0$, $s = (2\pi/\lambda) \cdot \sin \vartheta$. ϑ ist der ganze Beugungswinkel, λ die verwendete Wellenlänge.

Die zahlreichen mit varierten Parametern n , δ und r mit Hilfe eines kleinen Computers gerechneten Streukurven wurden in üblicher Weise doppeltlogarithmisch aufgetragen, wofür die Abb. 2 ein Beispiel zeigt. Für die Auswertung so gezeichneter Kurven ist nur die Kurvenform maßgebend, es konnte somit in der Berechnung von $\tilde{\Phi}$ der nicht winkelabhängige Faktor $2/L$ weggelassen werden. Aus demselben Grund sind die Ordinaten der experimentellen Streukurven in den Abbildungen 1, 3, 4 und 5, also die gemessenen Intensitäten J dieser Kurven, nicht im absoluten Maß angegeben, sondern nur in relativen Einheiten.

Grundsätzlich lässt sich jede von diesen Streukurven in drei Abschnitte unterteilen: Einmal den mehr oder weniger steil verlaufenden Kurveninnenteil, dessen Steilheit nur von dem Parameter n abhängig ist. Dann den Bereich des Kurvenmaximums, dessen

Form von dem verwendeten δ abhängt. Kleiner δ -Wert bedeutet ein ausgeprägtes Maximum, mit zunehmendem δ wird das Maximum immer flacher. Schließlich noch der Verlauf des Kurvenaußenteiles, der praktisch nur von der Größe des Parameters r bestimmt wird. Lediglich die Berücksichtigung einer Schwankung der Schichtdicke D selbst, in den theoretischen Kurven wird der zugehörige Parameter dann mit δ_F bezeichnet, führt noch zu einer geringen Zunahme des Intensitätsabfalles im Kurvenaußenteil und zu weiterer Abflachung des Maximums. Die Güte der Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Streukurven wird für doppeltlogarithmische Auftragung in den Abb. 3, 4 und 5 für drei Streukurven unterschiedlicher Form gezeigt. Man sieht, daß mit Ausnahme der letzten, schon zu sehr geringen Intensitäten gehörigen Meßpunkte, der gesamte bekannte Kurvenverlauf durch die Theorie wiedergegeben werden kann. Es muß dazu auch gesagt werden, daß die theoretischen Kurven natür-

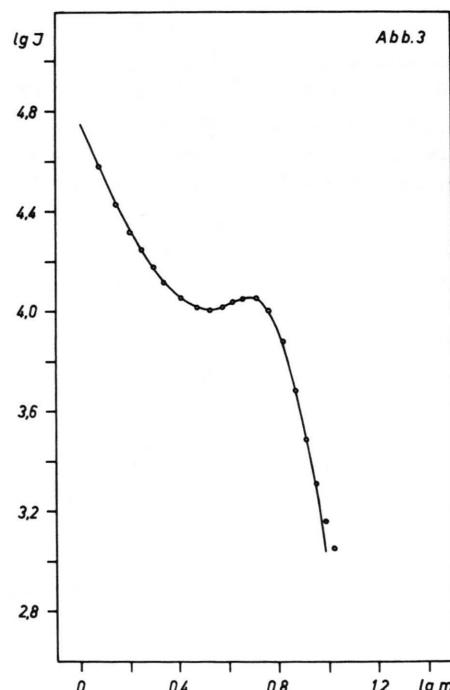


Abb. 3. Kurvenvergleich zwischen der gemessenen Streukurve Nr. 2 und einer theoretischen Kurve mit den Parameterwerten $n = 10$; $\delta = 0,4$; $\delta_F = 0,3$; $r = 0,5$. Die hier verwendete Abszisse m bedeutet den Abstand von dem Kurvennullpunkt – der Primärstrahlmitte – in der Registrierebene, bei fotografischer Aufnahme in der Filmoberfläche. In der Ordinate ist J die gemessene, von dem Präparat gestreute Intensität in relativen Einheiten.

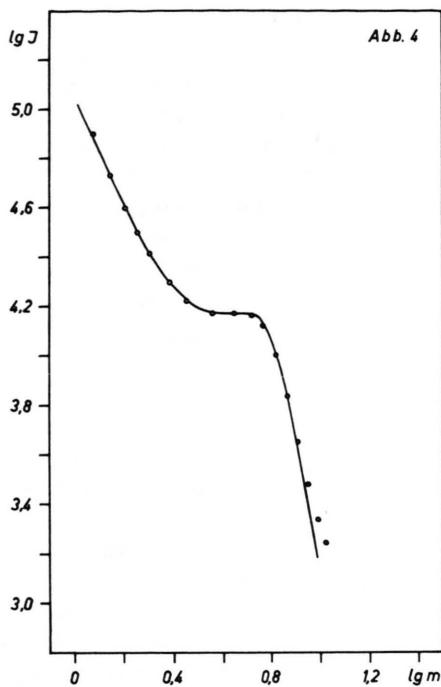


Abb. 4. Wie Abb. 3. Vergleich zwischen Streukurve Nr. 1 und einer theoretischen Kurve mit den Parameterwerten $n = 10$; $\delta = 0,4$; $\delta_F = 0,5$; $r = 0,5$.

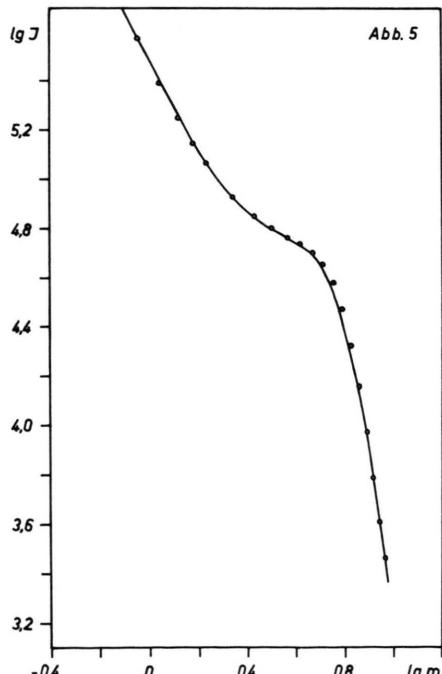


Abb. 5. Wie Abb. 3. Vergleich zwischen Streukurve Nr. 3 und einer theoretischen Kurve mit den Parameterwerten $n = 10$; $\delta = 0,5$; $\delta_F = 0,6$; $r = 0,5$.

lich nur für schrittweise Änderung der Parameter n , δ und r gerechnet worden sind. Und zwar n in Abständen von 10, δ und r in Schritten von 0,1. Die δ_F -Werte sind wegen des geringeren Einflusses auf die Kurvenform meist nur mit den Werten 0,0 und 0,6 berücksichtigt. Die Abweichung der weiter außen liegenden Meßpunkte von dem Verlauf der theoretischen Kurven erklärt sich aus der Tatsache, daß die experimentellen Streukurven ohne jede Veränderung, also auch ohne Abzug einer eventuellen Untergrundstreuung, für den Kurvenvergleich benutzt wurden. Diese meist geringe Untergrundstreuung bewirkt dann gegenüber den schon sehr kleinen Ordinatenwerten des Kurvenauslaufes eine Abweichung nach oben. Übrigens zeigen die Streukurven der gemickelten Präparate diese Abweichung nicht, sie besitzen eine vergleichsweise geringe Untergrundstreuung, was offenbar bedeutet, daß diese Streuung nicht von der Aufnahmekamera herrührt, sondern eine Präparateigenschaft darstellt.

Indem man bei bestmöglicher Kurvenanpassung in üblicher Weise an einer Stelle der Abszisse den Abszissenwert der theoretischen Kurve mit dem sich deckenden Abszissenwert der experimentellen Streukurve gleichsetzt, erhält man für die Bezugsgröße der theoretischen Kurven, hier der mittlere Identitätsabstand d_0 , die entsprechende experimentelle Größe. In der Tabelle sind nun zu jeder der zehn experimentellen Streukurven die Parameterwerte der gerechneten Kurven eingetragen, mit welchen bestmögliche Übereinstimmung im Kurvenvergleich erzielt werden konnte. Außerdem noch die aus dem Kurvenvergleich resultierenden Werte der experimentellen Kurven für d_0 , den mittleren Identitätsabstand in Richtung der Gitterlinie, also jeweils die Summe aus Schicht und Zwischenraum.

Tabelle

Kurve Nr.	Bemerkung	n	δ	δ_F	d_0 [nm]	D_0 [nm]
1	—	10	0,4	0,5	4,07	2,04
2	—	10	0,4	0,3	4,41	2,21
3	gemickelt	10	0,5	0,6	4,22	2,11
4	—	10	0,4	0,6	4,27	2,14
5	—	20	0,5	0,6	4,47	2,24
6	gemickelt	10	0,5	0,6	4,17	2,09
7	gemickelt	20	0,5	0,6	4,27	2,14
8	gemickelt	20	0,5	0,6	4,36	2,18
9	—	40	0,5	0,6	4,46	2,23
10	Glycerin	10	0,4	0,2	4,78	2,39

Da alle gemessenen Streukurven der verwendeten Mureinpräparate nur mit theoretischen Kurven zur Deckung zu bringen sind, welche ein $r = 0,5$ besitzen, so bedeutet das, daß bei allen Präparaten Schicht und Zwischenraum im Mittel gleich groß sind, also je die Hälfte von d_0 betragen. Im übrigen sieht man, gleichgültig ob die Kurven von gemickelten oder nicht gemickelten Präparaten ausgewertet werden, daß die erhaltenen Werte für die Schichtdicken recht eng beisammen liegen. Die Ausnahme bildet das mit Glycerin behandelte Präparat, welches – nicht sehr überraschend – eine größere Schichtdicke erkennen läßt. Da hier ebenfalls der Wert $r = 0,5$ gehalten wird, muß man auch aus diesem Grund schließen, daß die Zwischenräume zwischen den einzelnen Schichten von Mureinwandstücken keine eigenständige Ursache haben, sondern die Größe dieser Zwischenräume aus dem Aufbau der durch Sedimentation der Mureinwandstücke entstandenen Präparate folgt. Es kann bei der Sedimentation nicht eine ziegelmauerartig dichte Packung entstehen, das folgt schon aus dem Sedimentationsvorgang selbst, aber auch aus der unregelmäßigen Gestalt der Mureinschichtstücke. Da aber die in keiner Beschränkung variierenden seitlichen Distanzen durch nachfolgend

sedimentierende Mureinschichtteile überdeckt werden, entstehen auf diese Weise Zwischenräume von im Mittel genau derselben Dicke, wie sie die einzelnen Mureinschichten besitzen. Auch die δ -Werte sind leicht erklärbar, wenn man sich veranschaulicht, daß einerseits diese Hohlräume mit denjenigen von benachbarten Schichten zusammenhängen und somit über verschiedene große Flächenbereiche größere Zwischenraumdicken darstellen, andererseits Mureinstücke einseitig höher aufliegen und dadurch etwa keilförmige Zwischenräume erzeugen.

Diskussion

Die Schwankungen der Größe des Identitätsabstandes, wie sie durch den Parameter δ wiedergegeben wird, setzt sich aus den Schwankungen des Zwischenraumes und denjenigen der Mureinschicht selbst zusammen. Wenn man nun die Schwankungen in der Größe des Zwischenraumes nicht extrem groß annehmen will, diese also etwa durch ein doppelt so großes δ_F repräsentiert, als es die δ -Werte für die Identitätsperiode sind, wofür aber die Werte in der Tabelle keine Veranlassung geben, so bleibt nur die Schlußfolgerung, daß auch die Dicke der Mureinschicht selbst gewisse Schwankungen aufweisen muß. Nun kann eine Vergrößerung der resultieren-

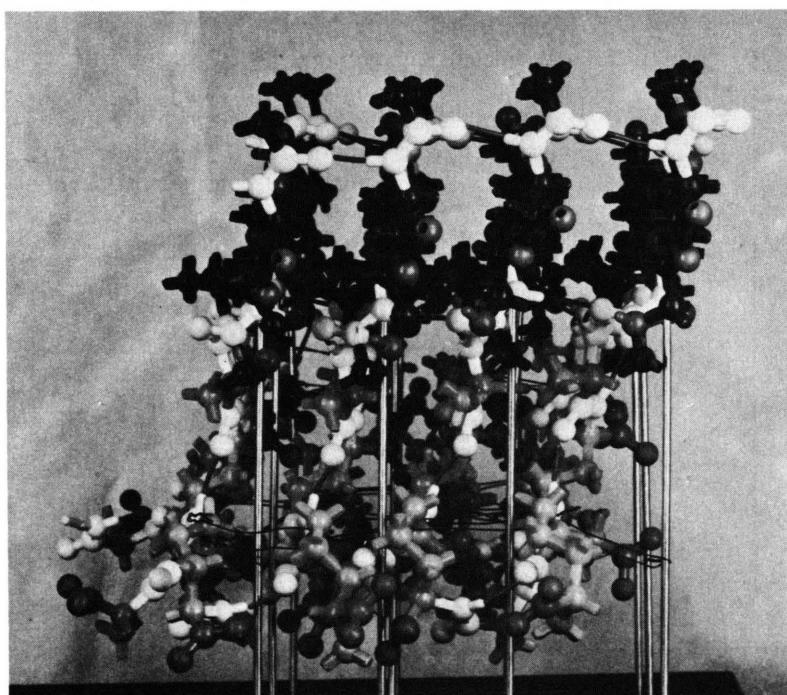


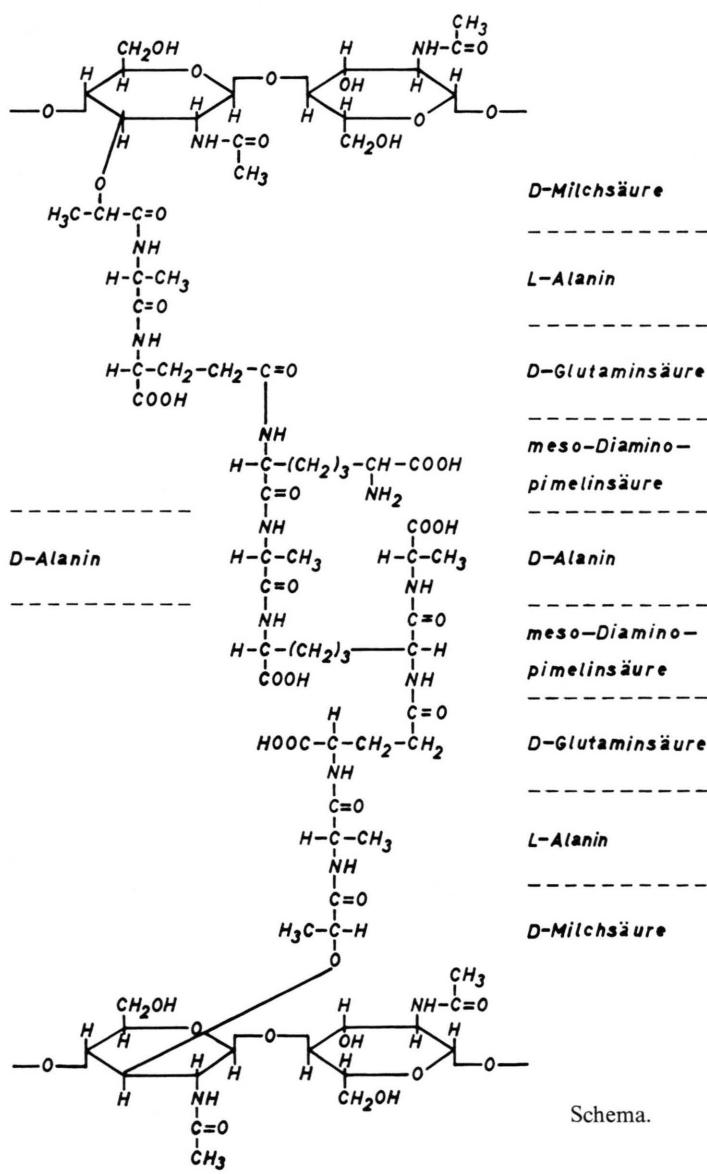
Abb. 6. Ausschnitt aus einem atomaren Modell der Mureinstruktur, wie sie in einer früheren Arbeit [4] vorgeschlagen worden ist. Im oberen Teil der Abbildung sind insgesamt vier senkrecht zur Papierebene verlaufende und zueinander parallele Saccharidketten zu erkennen.

den Schichtdicke durch teilweises Aneinanderkleben zweier Mureinschichten erklärt werden, eine Verringerung der Schichtdicke erfordert jedoch eine nähere Erklärung.

Die Abb. 6 zeigt als Atommodell einen kleinen Ausschnitt der räumlichen Struktur des Mureins von *Spirillum serpens*, wie sie seinerzeit vorgeschlagen worden ist [4]. Es sind vier Saccharidketten abgebildet, die senkrecht zur Papierebene verlaufen, sie bestehen – alternierend – aus N-acetyl-Glucosamin und N-acetyl-Muraminsäureresten. Die heller gehal-

tenen Teile der Struktur stellen die Peptidketten dar, welche die Saccharidketten miteinander vernetzen. Aus dem in der Abb. 6 gezeigten Modell folgt eine Schichtdicke des Mureins, welche mit dem hier gefundenen Wert der mittleren Schichtdicke von $2,15 \text{ nm} \pm 5\%$ recht gut übereinstimmt. Der Zahlenwert ist das Mittel aus den D_0 -Werten der ersten neun Kurven von Abb. 1.

Tatsächlich ist die im Modell angegebene Struktur etwas idealisiert, da sie eine vollständige Vernetzung wiedergibt, während die realen Werte des Ver-



netzungsgrades 30% bis maximal 50% betragen. Dies ergibt keine wesentliche Veränderung der Schichtdicke, höchstens weist deshalb die Schichtoberfläche mehr Unebenheiten auf. Wesentlich gravierender ist jedoch ein anderer Punkt: Die abgebildete Struktur hat die Ausbildung der höchstmöglichen Zahl von Wasserstoffbrücken zur Voraussetzung und zwar sowohl innerhalb der einzelnen Peptidketten als auch zwischen den Saccharidsträngen des Mureins. Sind nun, aus welchen Gründen auch immer, die H-Brücken zwischen den einzelnen Saccharidketten nicht vorhanden, z. B. infolge einer geringen Verschiebung der Ketten in ihrer Richtung gegeneinander, so ist durchaus ein größerer Abstand zwischen den parallel laufenden Ketten möglich und damit auch eine gewisse Schichtdickenveränderung

denkbar. Daß die Mureinstruktur etwas variabel ist und zumindest im Präparat in zwei ein wenig verschiedenen Modifikationen auftreten kann, darauf weisen unterschiedliche Röntgenbeugungsaufnahmen im Weitwinkelbereich hin, doch soll diese Frage in einer weiteren Mitteilung behandelt werden.

Wenn man jetzt noch die bekannte Wirkungsweise des Lysozyms auf das Murein in Betracht zieht, so ist eine zumindest stellenweise aufgeweitete Struktur des Mureins, wie sie soeben angedeutet wurde, aus sterischen Gründen durchaus notwendig. Andernfalls könnte der richtige Kontakt einer Saccharidkette mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, wie er für den Ablauf der bekannten Protonisierungsreaktion notwendig ist, nicht zustande kommen.

- [1] W. Weidel, H. Frank u. H. H. Martin, J. Gen. Microbiol. **22**, 158–166 (1960).
[2] H. Wawra, Z. Naturforsch. **31 c**, 635–640 (1976).

- [3] G. Porod, Acta Physica Austriaca, **Bd. III**, 66–81 (1949).
[4] H. Formanek, S. Formanek u. H. Wawra, Eur. J. Biochem. **46**, 279–294 (1974).