

Ein neuer Typ von Makromolekülen [*]

VON PROF. DR. DR. W. WEIDEL †

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOLOGIE, ABTEILUNG WEIDEL, TÜBINGEN

Die meisten Bakterienzellwände enthalten als formgebende Struktur einen makromolekularen, durch covalente Bindungen zusammengehaltenen Hohlkörper („Sacculus“). Seine Bauelemente („Muropeptide“) sind glykosidisch und peptidisch untereinander verknüpft und bilden so ein polymeres Netz („Murein“), das allseitig geschlossen ist. Jede Muropeptid-Untereinheit besteht aus zwei Aminosucker- und vier Aminosäureresten in stets gleicher Anordnung. Akzessorische, qualitativ meist sehr viel komplizierter zusammengesetzte Polymere sind teils covalent, teils in anderer Weise mit dem Murein des Sacculus verbunden und komplettieren ihn so zur eigentlichen Zellwand. Das Studium der chemischen Struktur von Murein-Sacculi und der Synthesemechanismen, die beim Zellwachstum eine ständige Erweiterung des Sacculus unter strikter Einhaltung seiner vorgegebenen Gestalt ermöglichen, führt unmittelbar an die bisher ungelösten Probleme der Morphogenese heran.

I. Gewinnung von „Sacculi“ aus Bakterienzellen

Bakterienzellen haben im allgemeinen eine bestimmte, wegen ihrer spezifischen Ausprägung und Konstanz auch für Klassifizierungszwecke geeignete Form. Besonders häufig sind Kugel- und Stäbchenform (Zylinder mit abgerundeten Enden). Man kann nun fragen, ob diese typische Form jeweils der ganzen Zelle, etwa wie einem Kristall, aufgeprägt ist, oder ob sie in einer ihrer Teilstrukturen fixiert wird.

Setzt man Bakterienzellen starken mechanischen Beanspruchungen aus, z. B. indem man sie in wäßriger Suspension nach Zugabe feiner Glasperlen mit einer Frequenz von etwa 50 Hz schüttelt, dann zeigt sich, daß sie eine selbständige Zellwand besitzen [1], und daß dieses Gebilde die Zellgestalt determiniert (Abb. 1a [2]). Bei der beschriebenen Prozedur läuft nämlich der Zellinhalt aus, und von den Zellen bleiben nur leere, mechanisch sehr widerstandsfähige Beutel übrig, die unter dem Elektronenmikroskop, abgesehen davon, daß sie jetzt nicht mehr prall gefüllt, sondern kollabiert sind, noch immer die typische Form der Zellen erkennen lassen, von denen sie gewonnen wurden.

Das Problem der formgebenden Faktoren bei Bakterienzellen engt sich also zunächst ein auf die Frage, welche strukturchemischen Eigentümlichkeiten es sind, denen Bakterienzellwände die strikte Festlegung ihrer Gestalt und ihre damit offenbar zusammenhängende hohe mechanische Widerstandsfähigkeit verdanken.

Auf die richtige Spur brachte uns die Beobachtung, daß die Zellwand von Coli-Bakterien Form und mechanische Festigkeit verliert, wenn sie der Einwirkung eines Enzyms ausgesetzt wird, das an die Teilchen mancher Typen von Bakteriophagen gebunden ist, die für Coli-Zellen infektiös sind. Wir fanden, daß dieses Enzym aus der vorwiegend Lipoproteine und Lipopolysaccharide enthaltenden Zellwand kleine Mengen eines leicht wasserlöslichen Materials von sehr einfacher Zusammensetzung herausschlägt. Bei saurer Hydrolyse liefert es nur die beiden Aminosucker Glucosamin (GN) und Mureaminsäure (MA) sowie die drei Aminosäuren Alanin (Ala), Glutaminsäure (Glu) und 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) [3].

Daraus schlossen wir, daß sich in der Coli-Zellwand – gewissermaßen als ihr Skelett – ein starres, also vermutlich ganz durch covalente Bindungen zusammengehaltenes makromolekulares Netz verbergen müsse, und daß

[*] Eine ausführlichere Behandlung dieses Themas ist kürzlich in englischer Sprache erschienen [10].

[1] M. R. J. Salton u. R. W. Horne, *Biochim. biophysica Acta* 7, 177 (1951).

[2] W. Weidel, H. Frank u. H. H. Martin, *J. gen. Microbiol.* 22, 158 (1960).

[3] W. Weidel u. J. Primosigh, *Z. Naturforsch.* 12b, 421 (1957).

jene qualitativ einfach zusammengesetzten, vom Phagen-enzym offensichtlich unter hydrolytischer Zerstörung des Netzes freigesetzten Bruchstücke als dessen Strukturelemente eine wichtige Rolle zu spielen hätten [3,4].

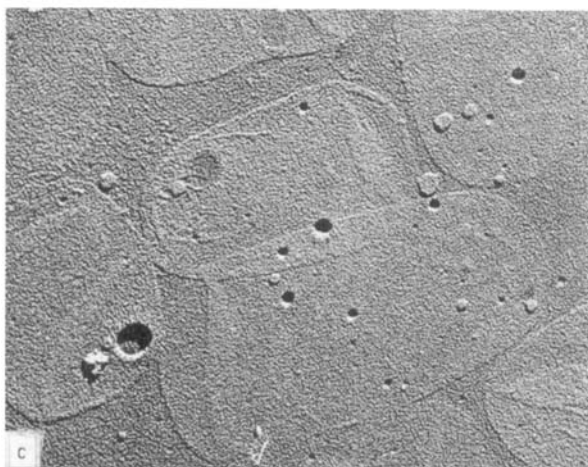
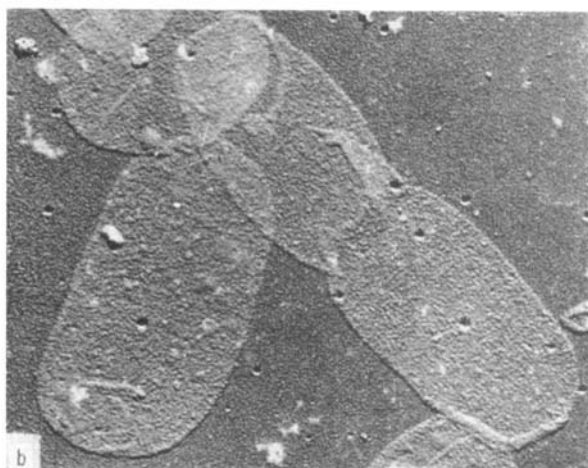
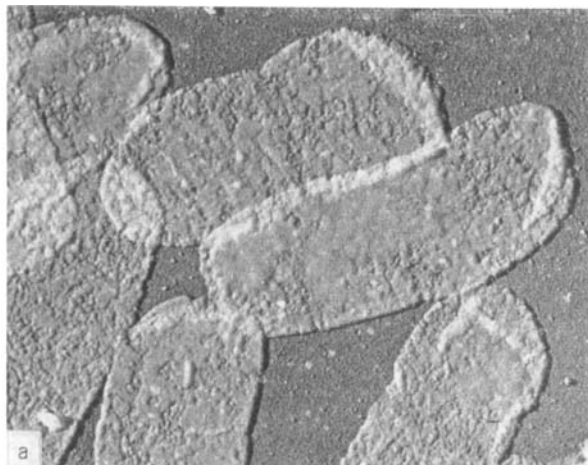


Abb. 1. Freilegen des Murein-Sacculus in der Zellwand von *E. coli* durch schrittweises Entfernen von akzessorischen Komponenten.

(a) Leere Zellhüllen nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat.

(b) Anschließende Behandlung mit Phenol (90 %) schält den Rest eines dicken Belages von nicht covalent gebundenem Lipoprotein und Lipopolysaccharid ab. Das charakteristische Oberflächenmuster wird von covalent und lokalisiert an das Murein gebundenem Protein hervorgerufen.

(c) Murein-Sacculi nach enzymatischer Beseitigung der restlichen Akzessorien.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von H. Frank.

Vergrößerung: 32000-fach.

[4] W. Weidel u. J. Primosigh, J. gen. Microbiol. 18, 513 (1958).

Studien über das Phagenreceptor-Mosaik der Coli-Zellwand [5] hatten uns bereits gelehrt, wie man aus diesem chemisch überaus komplexen Gebilde schonend bestimmte Komponenten extrahieren kann, und so war es nicht allzu schwierig, die Demontage unter steter Kontrolle durch das Elektronenmikroskop so zu leiten, daß das gesuchte makromolekulare Netz alsbald unter dicken, plastischen Deckschichten von Lipoprotein und Lipopolysaccharid zum Vorschein kam [2]. Wenn man zur Beseitigung der Deckschichten nur Agentien verwendet, die zwar Wasserstoff- und hydrophobe Bindungen, aber keine covalenten Bindungen sprengen, erhält man das Netz als einen allseitig geschlossenen, coliformen Beutel, dessen Oberfläche charakteristisch strukturiert erscheint (Abb. 1b).

Diese Beutel zerfielen bei Behandlung mit dem erwähnten Phagenenzym oder auch mit Eiweißlysozym – beide Enzyme besitzen die gleiche Substratspezifität [6, 12] – sofort vollständig in winzige, vorwiegend aus Protein bestehende Kügelchen, suspendiert in einer Lösung der schon genannten, aus nur zwei Aminosackern und drei Aminosäuren zusammengesetzten Fragmente eines noch unbekannten Polymers [2]. Es sah also zunächst so aus, als seien die Kügelchen im intakten Beutel, dem sie das charakteristische Oberflächenmuster geben, durch Stränge dieses lysozymempfindlichen Polymers aus Glucosamin, Muraminsäure, Alanin, Glutaminsäure und 2.6-Diaminopimelinsäure untereinander zu einem allseitig geschlossenen Netz verbunden.

Unter dieser Voraussetzung war zu erwarten, daß der Beutel auch durch Hydrolyse der Kügelchenkomponente mit proteolytischen Enzymen zu zerstören sein würde. Entsprechende Experimente hatten jedoch ein sehr interessantes, negatives Ergebnis: Die Proteinkomponente verschwand zwar bei Behandlung von Beutelpräparaten mit Proteasen, und die Beutel wurden glatt und hauchdünn, aber sie zerfielen nicht, widerstanden weiterhin selbst groben mechanischen Beanspruchungen und besaßen noch immer die typische Gesamtform der Coli-Zelle (Abb. 1c [7]). Lysozym hingegen löste die Beutel sofort vollständig auf, wobei nur die Bruchstücke mit den fünf charakteristischen Bestandteilen entstanden. Die Proteinkomponente mußte also als „Verzierung“ betrachtet werden, zwar durch covalente Bindungen an der Beutelstruktur angebracht, aber ohne Bedeutung für deren festen Zusammenhalt. Nachdem schließlich noch geklärt werden konnte, daß der oft nicht unbeträchtliche Glucosegehalt solcher Beutelpräparate von einem Glykogen herrührt, dessen Teilchen in den bei der Präparierung nicht aufreißenden Beuteln gefangen bleiben, doch leicht mit α -Amylase daraus zu entfernen sind [8], durften wir überzeugt sein, in den aller Akzessorien beraubten Beuteln echte Makromoleküle von überraschend einfacher Zusammensetzung, wiewohl höchst ungewöhnlicher Größe und Gestalt, vor uns zu haben [9].

[5] W. Weidel, Annu. Rev. Microbiol. 12, 27 (1958).

[6] D. Maass u. W. Weidel, Biochim. biophysica Acta 78, 369 (1963).

[7] H. H. Martin u. H. Frank, Z. Naturforsch. 17b, 190 (1962).

[8] W. Leutgeb u. W. Weidel, Z. Naturforsch. 18b, 1060 (1963).

[9] W. Leutgeb, D. Maass u. W. Weidel, Z. Naturforsch. 18b, 1062 (1963).

Wir schlugen den Ausdruck „Sacculus“ zur Bezeichnung dieses neuen, im Bakterienreich weitverbreiteten Molekültyps vor [10]. Dem Polymer andererseits, aus dem Bakterienzellen ihre Sacculi verfertigen und das nach bisherigen Erfahrungen von Zelltyp zu Zelltyp nur relativ geringfügig abgewandelt wird [10,11], gaben wir den Trivialnamen „Murein“ [10].

II. Struktur des Murein-Netzes

1. Murein-Netze gram-negativer Bakterien

Um ein Bild von der chemischen Struktur des Murein-Netzes zu gewinnen, aus dem die Sacculi von Colizellen und zweifellos von zahlreichen anderen gram-negativen Bakterien bestehen [10], bot sich der Versuch einer Isolierung und Strukturermittlung der Bruchstücke an, in die dieses Netz unter Lysozymeinwirkung zerfällt. Es war zu hoffen, daß sich aus der Struktur der Bruchstücke und aus Beobachtungen über die enzymatische Spezifität des Lysozyms die chemische Struktur des Sacculus würde ableiten lassen.

Die Isolierung der Bruchstücke („Muropeptide“ [10]) gelang papierchromatographisch [12]. Unter bestimmten Voraussetzungen, die hauptsächlich den Schutz des Mureins vor der Einwirkung zelleigener, das Murein angreifender Hydrolasen (siehe Abschnitt III) während der Herstellung der Sacculus-Präparate betreffen [13,14],

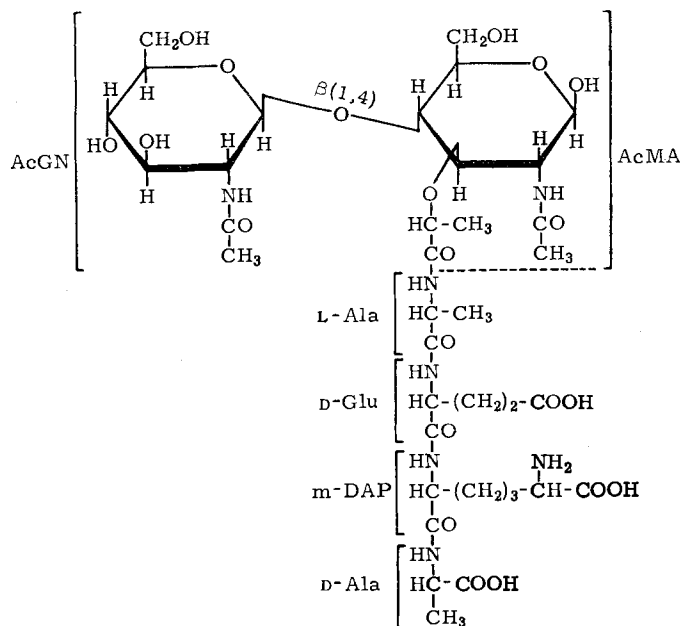


Abb. 2. Strukturformel des Coli-Muropeptids C6. AcGN = Acetylglucosamin; AcMA = Acetylmuraminsäure; L-Ala = L-Alanin; D-Glu = D-Glutaminsäure; m-DAP = meso-2,6-Diaminopimelinsäure; D-Ala = D-Alanin.

[10] W. Weidel u. H. Pelzer, *Advances in Enzymol.* 26, 195 (1964).

[11] M. R. J. Salton: *Microbial Cell Walls*. Wiley, New York 1960.

[12] J. Primosigh, H. Pelzer, D. Maass u. W. Weidel, *Biochim. biophysica Acta* 46, 68 (1961).

[13] W. Leutgeb u. W. Weidel, *Z. Naturforsch.* 18b, 1065 (1963).

[14] W. Weidel, H. Frank u. W. Leutgeb, *J. gen. Microbiol.* 30, 127 (1963).

liefern Sacculi von *E. coli* mit Lysozym nach vollständiger Spaltung ein Gemisch von Muropeptiden, das praktisch aus nur zwei Komponenten besteht.

Das eine, von uns als „C6“ bezeichnete Muropeptid hat die in Abbildung 2 wiedergegebene Struktur [12,15]. Die Glucosidbindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure ist vermutlich eine $\beta(1,4)$ -Bindung [16] und nicht $\beta(1,6)$, wie lange Zeit angenommen wurde [17]. Noch nicht geklärt ist ferner, ob Glutaminsäure durch seine α - oder γ -Carboxylgruppe mit der Diaminopimelinsäure verbunden ist, welches der beiden Asymmetriezentren der meso-Diaminopimelinsäure an der Bindung teilnimmt, und ob das D-Alanin an C-1 oder C-7 der Diaminopimelinsäure gebunden ist. Daß diese Fragen noch offenbleiben müssen, behindert die Untersuchungen über die Mureinstruktur vorläufig nicht.

Das andere von uns isolierte Mureinfragment („C3“) besitzt nach allen Analysendaten [10,12] und den Ergebnissen enzymatischer Abbaureaktionen [18,19] die in Abbildung 3 wiedergegebene Struktur. Es handelt sich also um ein durch peptidische Verknüpfung zweier C6-Moleküle gebildetes Dimeres.

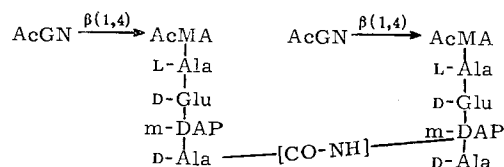


Abb. 3. Strukturformel von C3, des peptidischen Dimeren von Muropeptid C6. Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 2.

Man erkennt aus den Formelbildern, daß es möglich ist, allein aus dem Muropeptid C6 und seinem Dimeren C3 und allein durch glykosidische Verknüpfung dieser Strukturelemente ein Netz aufzubauen. Dieses Netz kann, je nach der Verteilung von C6 und C3, sowohl offen bleiben als auch zu einem allseitig geschlossenen, beliebig geformten Sack ausgestaltet werden (Abb. 4).

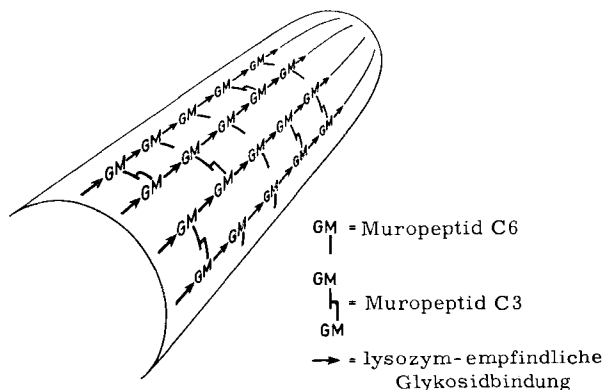


Abb. 4. Strukturmodell des Murein-Sacculus von *E. coli*. Die Muropeptid-Untereinheiten sind im Verhältnis zum Sacculus zu groß gezeichnet.

[15] H. Pelzer, *Biochim. biophysica Acta* 63, 229 (1962).

[16] R. W. Jeanloz, N. Sharon u. H. M. Flowers, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 13, 20 (1963).

[17] M. R. J. Salton u. J.-M. Ghuyssen, *Biochim. biophysica Acta* 45, 355 (1960).

[18] H. Pelzer, *Z. Naturforsch.* 18b, 950 (1963).

[19] D. Maass, H. Pelzer u. W. Weidel, *Z. Naturforsch.* 19b, 413 (1964).

Lysozym, eine endo-N-Acetylglucosaminid- $\beta(1,4)$ -glykanohydrolase [17,20] mit wahrscheinlich besonders hoher Affinität zur Muraminsäure \rightarrow Glucosamin-Glykosid-Bindung [6], muß ein solches Mureinnetz vollständig in die Muropeptide C3 und C6 zerlegen. Bei unvollständiger Lysozym-Hydrolyse sollten Oligomuropeptide auftreten, in denen mehrere C3- und/oder C6-Untereinheiten miteinander verknüpft sind (Abb. 5), was experimentell bestätigt wurde [13]. Bei erneuter Inkubation mit Lysozym zerfallen diese Oligomuropeptide in

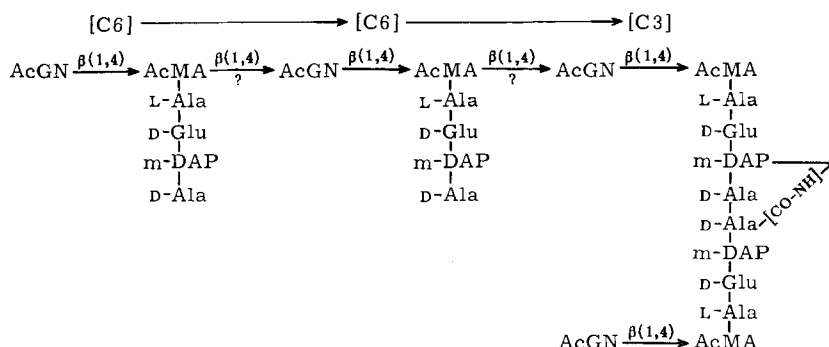


Abb. 5. Strukturformel eines Oligomuropeptids aus zwei C6- und einer C3-Untereinheit. Die gezeigte Anordnung der Untereinheiten ist nur eine von mehreren möglichen. Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 2.

die einfachen Muropeptide C3 und/oder C6. Schließlich scheint Lysozym beim Abbau des Coli-Sacculus auch transglykosidierend zu wirken. Jedenfalls findet man unter den Produkten unvollständiger Lysozymeinwirkung wechselnde Mengen eines cyclischen Dimeren aus

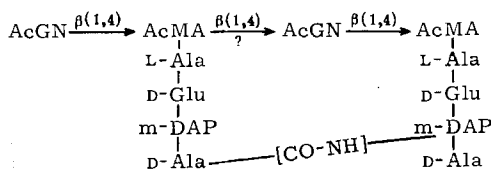


Abb. 6. Cyclisches Dimeres aus zwei C6-Muropeptiden.

zwei Molekülen C6 (Abb. 6), das bei erneuter Behandlung mit Lysozym in C3 umgewandelt wird [12,18]. Die Entstehung des cyclischen Dimeren aus einer C3-Untereinheit durch intramolekulare Transglykosidierung während des Mureinabbaus veranschaulicht Abbildung 7.

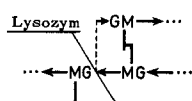


Abb. 7. Zur Bildung des cyclischen Dimeren (Abb. 6) aus einer C3-Untereinheit durch intramolekulare Transglykosidierung in situ während des Mureinabbaus mit Lysozym. Abkürzungen siehe Abbildung 4.

2. Murein-Netze gram-positiver Bakterien

Wie schon angedeutet, synthetisieren nicht alle Bakterienarten genau den gleichen Mureintyp. Zwar scheint unter den gram-negativen Mikroorganismen weitgehende Uniformität zu herrschen, so daß Coli-Murein

hier wohl jetzt schon als Prototyp gelten kann [10]. Bei grampositiven Bakterien ist es hingegen schwierig, präparativ bis zum akzessorienfreien Sacculus vorzudringen, um die hier für den festen Zusammenhalt des Makromoleküls unentbehrlichen chemischen Komponenten, d.h. die echten Mureinbestandteile, zu ermitteln. Akzessorien machen zudem das Murein für den Angriff des Lysozyms oft ganz oder teilweise unzugänglich [10]; doch selbst dann, wenn der Abbau nicht wesentlich behindert ist, liefern von Akzessorien nicht befreite Sac-

culi unter Umständen eine sehr heterogene Mischung verschieden zusammengesetzter Bruchstücke, die keine klaren Rückschlüsse gestattet [21].

Völlig oder doch nahezu akzessorienfreie Sacculi gram-positiver Organismen sind aber offenbar fast ebenso einfach konstituiert wie die von *E. coli*, d.h. sie enthalten Muraminsäure, Glucosamin, Alanin, 2,6-Diaminopimelinsäure und Glutaminsäure in den gleichen molaren Proportionen wie Coli-Murein [22,23]. Oft tritt L-Lysin, manchmal auch Ornithin oder Diaminobuttersäure [24], an die Stelle der Diaminopimelinsäure, und man findet auch die eine oder andere Aminosäure, z.B. Glycin, als zusätzliche Komponente. Trotz der weitgehenden analytischen Übereinstimmung mit Coli-Murein, die auf einen analogen Aufbau aus Muropeptiden schließen läßt, erhält man jedoch mit Lysozym aus den Sacculi gram-positiver Organismen kaum oder gar keine Muropeptide, sondern Bruchstücke von sehr viel höherem Molekulargewicht [23,25]. Es müssen also in diesem Mureintyp strukturelle Besonderheiten vorliegen, welche die Freisetzung von monomeren (analog C6) und dimeren (analog C3) Muropeptiden allein durch Lysozym verhindern. Wie die Muropeptid-Strukturformel zeigt (Abb. 2), besteht kein Grund dafür, daß Muropeptide nur höchstens paarweise (wie im Coli-Murein) peptidisch miteinander verknüpft sein sollten. Vielmehr kann man sie in beliebiger Zahl zu langen Muro-polypeptidketten aneinanderkondensieren. Falls von dieser Möglichkeit im Murein gram-positiver Organismen Gebrauch gemacht wird, ist es nicht verwunderlich, daß

[21] E. Work, J. gen. Microbiol. 25, 167 (1961).

[22] J. W. Czerkawski, H. R. Perkins u. H. J. Rogers, Biochem. J. 86, 468 (1963).

[23] M. H. Mandelstam u. J. L. Strominger, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 466 (1961).

[24] H. R. Perkins, Nature (London) 201, 1105 (1964).

[25] J. M. Ghuysen, Biochim. biophysica Acta 47, 561 (1961).

Lysozym daraus keine einfachen Muropeptide freisetzt. Es könnte Mureine dieses Typs eben nur in Muro-polypeptide, also relativ hochmolekulare Bruchstücke, zerlegen.

Abbildung 8 zeigt das Schema eines nach dem geschilderten Prinzip konstruierten und dadurch außerordentlich dichten Murein-Netzes. In der Abbildung ist auch angegeben, an welchen Stellen Aminosäuren (z. B. Glycin), die in Muropeptide nicht hineingehören, in solche Netze

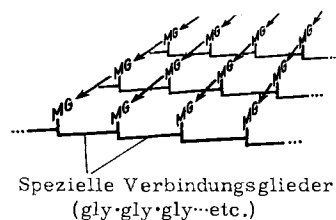


Abb. 8. Strukturmodell eines Murein-Netzes mit fortlaufend glykosidisch und peptidisch miteinander verknüpften Muropeptid-Untereinheiten. Die Pfeile bezeichnen die lysozymempfindlichen Glykosidbindungen.

vermutlich eingebaut werden [23]. Sie fungieren als Verbindungs- oder Verlängerungsstücke zwischen benachbarten Peptidketten und ermöglichen wahrscheinlich erst einen spannungsfreien Aufbau so engmaschiger Netze [10].

Übrigens ist der Sacculus gram-positiver Zellen auch stets dickwandiger als der von gram-negativen. Während das Mureinnetz bei den letzteren wahrscheinlich einschichtig ist (genaue Messungen stehen noch aus), liegen im Murein gram-positiver Zellen sicher mehrere der in Abbildung 8 skizzierten Netze übereinander. Die Konstruktion eines mehrschichtigen Netzes aus peptidisch und glykosidisch miteinander verknüpften Muropeptiden bereitet theoretisch keine Schwierigkeiten. Die Erweiterung solcher Netze während des Zellwachstums (siehe Abschnitt III) ist aber nicht so einfach wie bei einschichtigen Netzen, sondern erfordert zweifellos besondere Vorkehrungen [10]. Die dadurch bedingten Unterschiede, die das Gesamtbild des Zellwandwachstums bei gram-positiven und gram-negativen Mikroorganismen bietet, lassen sich fluoreszenzmikroskopisch direkt beobachten [26–29].

Bis vor kurzem waren diese Überlegungen zur Struktur des Mureins gram-positiver Mikroorganismen noch recht hypothetisch [10]. Inzwischen haben jedoch vor allem Arbeiten von *Ghuysen* und *Strominger* über die Struktur des Mureins (von ihnen „Glykopeptid“ genannt) von *Staphylococcus aureus* viele neue Ergebnisse erbracht, die sich zwanglos in das entworfene Bild einzu-fügen scheinen [30]. Das wichtigste Instrumentarium bei diesen Untersuchungen sind spezifische Hydrolasen, die einen Abbau von Mureinen, welche mit Lysozym nur Muro-polypeptide liefern, über diese Stufe hinaus ge-

statten. Man findet solche Hydrolasen in allen Bakterienarten, die selbst Murein synthetisieren, und diese Tatsache hat, wie gleich zu zeigen, ihren guten Grund [2,10].

Zuvor noch einige Bemerkungen über akzessorische Komponenten, die dazu dienen, Murein-Sacculi zur Bakterienzellwand zu komplettieren. Bei gram-negativen Bakterien dürfte es sich da vorwiegend um Lipoproteine und Lipopolysaccharide handeln, wobei vor allem die in ihrem Kohlenhydratanteil sehr variablen Lipopolysaccharide bestimmend für die antigenen Eigenschaften der Zellwand oder der ganzen Zelle sind [31]. Beide Arten von Akzessorien (bei *Coli* mehr als 80 % des Zellwandgewichtes) sind dem Sacculus sozusagen aufgeklebt, also nicht covalent an ihn gebunden, im Gegensatz zu einem mengenmäßig sehr kleinen Anteil von Protein, der schon in Abschnitt I besprochen wurde [2]. Sacculi gram-positiver Bakterien hingegen scheinen ihre Akzessorien vorwiegend covalent gebunden zu tragen. Es handelt sich um Polysaccharide unterschiedlicher Zusammensetzung, selten um Proteine [10]. Besonderes Interesse hat eine mit dem Sammelnamen Teichonsäuren bezeichnete Gruppe akzessorischer Polymere gefunden [32,33]. Wiederum sind es offenbar die Akzessorien, welche die immunbiologischen Eigenschaften der gram-positiven Zellen bestimmen. Tatsächlich ist über antigene Eigenschaften reinen Mureins noch nichts bekannt geworden.

III. Die Erweiterung des Murein-Netzes beim Zellwachstum

Wie wird nun die rasche und geordnete Erweiterung eines Sacculus, also eines starren, makromolekularen Hohlkörpers, während des Zellwachstums möglich? Sein Volumen wird oft schon innerhalb von 20 Minuten (maximale Zellteilungsgeschwindigkeit!) verdoppelt, und zwar unter strikter Einhaltung der vorgegebenen Gesamtform. Das ist überaus merkwürdig, denn offensichtlich wird durch die chemische Struktur der Muropeptide nicht vorherbestimmt, welche Gestalt ein daraus aufgebauter Hohlkörper annehmen muß. Die Situation ist hier also grundsätzlich anders als bei allen sonst noch bekannten Makromolekülen von biologischem Interesse, deren Morphologie im allgemeinen problemlos aus Struktur und Verknüpfungsweise ihrer Bausteine folgt. Die Mureinsynthese muß offenbar in vivo ständig kontrolliert werden, damit ein wachsender Sacculus seine Form erhalten oder beibehalten kann. Das die ganze Biologie durchziehende, ungelöste Problem der Morphogenese scheint hier zum ersten Mal in die Reichweite des Biochemikers gerückt, weil wenigstens das Material, das in eine definierte Form gebracht werden soll, nämlich Murein, noch mit den Begriffen der organischen Chemie exakt zu beschreiben ist.

Den Schlüssel zum Verständnis der Mureinsynthese in vivo liefert die Überlegung, daß eine Zelle nur dann imstande sein wird, ihren Sacculus zu erweitern, wenn sie Murein nicht nur zu synthetisieren, sondern auch zu zerstören vermag. Mit anderen Worten, sie sollte über Murein-Hydrolasen verfügen, um überall dort im all-

[26] R. M. Cole u. J. J. Hahn, *Science* (Washington) 135, 722 (1962).

[27] J. W. May, *Exptl. Cell Res.* 31, 217 (1963).

[28] R. M. Cole, *Science* (Washington) 143, 820 (1964).

[29] K. L. Chung, R. Z. Hawirko u. P. K. Isaak, *Canad. J. Microbiol.* 10, 43 (1964).

[30] J. M. Ghuysen in: *Proceedings III. Internat. Symp. on Fleming's Lysozyme*. Milano 1964 (in Vorbereitung).

[31] L. Krüger, O. Lüderitz, J. L. Strominger u. O. Westphal, *Biochem. Z.* 335, 548 (1962).

[32] J. Baddiley, J. G. Buchanan, U. L. Rajhandary u. A. R. Sanderson, *Biochem. J.* 82, 439 (1962).

[33] J. M. Ghuysen u. J. L. Strominger, *Biochemistry* 2, 1110 (1963).

seitig geschlossenen Murein-Netz, wo neue Bauelemente einzuschieben sind, zunächst einmal durch Sprengung covalenter Bindungen die nötigen Lücken schaffen zu können. Dann erst könnten Murein-Synthetasen jedes neue, passend aktivierte Bauelement durch Wiederherstellung covalenter Bindungen fest im Netz verankern. Die postulierten Hydrolasen findet man tatsächlich allenthalben in murein-synthetisierenden Bakterien, für die sie, obwohl unentbehrlich, doch eine stete potentielle Gefahr darstellen [10]. Wann immer nämlich den Hydrolasen Gelegenheit zur Betätigung gegeben wird, ohne daß Murein-Synthetasen ihre Wirkung kompensieren, zerstören sie unweigerlich den Sacculus, was gewöhnlich zur Folge hat, daß die Zelle platzt. Mehrere Antibiotika, vor allem Penicillin, führen auf noch nicht völlig übersichtlichen Wegen zur Aufhebung dieser Balance und damit zum Tod der Bakterienzelle.

Wenn auch über den Steuerungsmechanismus, der Murein-Hydrolasen und -Synthetasen in ihrer Aktivität aufeinander abstimmt und der dadurch auch die Form des Sacculus direkt kontrollieren dürfte, noch nicht viel gesagt werden kann, so ist es doch möglich, sich Modellvorstellungen von der Art der Zusammenarbeit beider Gruppen von Enzymen zu machen [10]. Abbildung 9A zeigt einen Ausschnitt aus dem Coli-Mureinnetz. Um

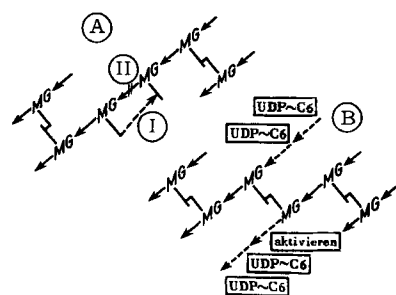


Abb. 9. Modell der Mureinsynthese in vivo. Das Murein-Netz wird durch gesteuertes Zusammenwirken von Hydrolasen und Synthetasen erweitert. Abkürzungen siehe Abbildung 4. Weitere Erklärungen im Text.

das Netz zu erweitern, ohne daß es seine innere Festigkeit auch nur einen Augenblick einbüßt, könnten zunächst (Schritt I) die Seitenketten zweier in der gleichen Polysaccharidkette benachbarter Muropeptid-Untereinheiten peptidisch verknüpft werden (Synthetase). Darauf würde ein zelleigenes Lysozym (Hydrolase) die Glykosidbindung zwischen beiden Untereinheiten gefahrlos durchtrennen können (Schritt II). Das Murein-Netz nimmt an dieser Stelle jetzt die in Abbildung 9B gezeigte Konfiguration ein. Die freien Enden der gesprengten Polysaccharidkette hängen noch immer über die in Schritt I angelegte Peptidbrücke zusammen und lassen sich nun in entgegengesetzten Richtungen durch Anbau neuer, aktivierter Muropeptide verlängern (Synthetase, Schritt III). Da sich die wachsenden Ketten zwischen bereits vorhandene einschieben müssen, wird nun wieder eine Hydrolase gebraucht, die im Wege stehende Peptid-Querverbindungen sprengt (Schritt IV). Schließlich müssen die neuen Kettenstücke mit den rechts und links von ihnen verlaufenden alten ab und zu durch peptidische Brücken verbunden werden (Schritt V), was wieder die Synthetase des Schrittes I leisten könnte.

Die postulierten Hydrolasen (und noch einige mehr, die andere Bindungen im Coli-Mureinnetz oder seinen mit Lysozym gewonnenen Bruchstücken sprengen) wurden in Coli-Zellen wirklich gefunden [18, 19, 34]. Nach den Synthetasen wird noch gesucht. Bei gram-positiven Organismen ist in dieser Richtung immerhin schon ein Anfang gemacht [35, 36]: Partikuläre Zellfraktionen aus *Staphylococcus aureus* scheinen imstande, aus Uridindiphospho-N-acetylglucosamin und dem „Park-Nucleotid“ [37] (UDP-N-AcMA-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) ein glykosidisches Mischkondensat herzustellen. Als aktiviertes Vorprodukt der „Zellwand“-Synthese ist das „Park-Nucleotid“ schon lange in Erwägung gezogen worden, denn es häuft sich oft in Zellen an, deren Mureinsynthese durch Antibiotika (z. B. Penicillin [10]) blockiert wurde [38], und konnte auch mit zelleigenen Enzymen Schritt für Schritt in vitro synthetisiert werden [39]. Merkwürdigerweise lassen sich in der Endstufe nur zwei Moleküle D-Alanin als präsynthetisiertes Dipeptid an die Peptidkette anhängen, nicht aber ein D-Alanin-Rest allein. Im Murein findet man das überschüssige D-Alanin nicht mehr; sein Verbleib ist ungeklärt [10].

IV. Ausblick

Daß die Biosynthese von Murein in vivo mehr erfordert als ein bloßes enzymatisch katalysiertes Aneinanderreihen niedermolekularer Bausteine zu einem Polymer gewohnter Art, dürfte aus dem Vorstehenden klar geworden sein. Wahrscheinlich übertrifft dieser Prozeß in der Zahl der Teilmechanismen und der für ihr geordnetes Zusammenwirken nötigen Vorkehrungen sogar noch die Biosynthese der Proteine an Kompliziertheit. Da die Koordinierung der beteiligten Enzyme sicher ein unlösbares Problem wäre, wenn sie alle als Einzelmoleküle frei in der Zelle diffundieren könnten, darf man vermuten, daß sie alsbald nach ihrer Synthese einer übergeordneten Struktur fest eingegliedert werden und bleiben. Solche wohlgeordneten Enzymsymplexe und die Rolle, die sie sogar bei vergleichsweise einfachen Biosynthesen, z. B. der Fettsäuresynthese spielen, kennt man bereits [40]. Für Murein-Synthetasen und -Hydrolasen kommt als plausibelste Überstruktur eine Membran in Betracht, weil dadurch die Möglichkeit gegeben ist, die zusammenarbeitenden Enzymmoleküle so anzuordnen, daß ihre aktiven Zentren ein geometrisch definiertes, ebenes Punktmuster bilden. Die Einhaltung eines bestimmten Musters auch beim Wachstum der Membran kann ganz selbsttätig erfolgen, wenn die membranbildenden Makromoleküle mit selektiv wirksamen Haftgruppen aus-

[34] H. Pelzer, Z. Naturforsch. 18b, 956 (1963).

[35] P. M. Meadow, J. S. Anderson u. J. L. Strominger, Biochem. biophysic. Res. Commun. 14, 382 (1964).

[36] A. N. Chatterjee u. J. T. Park, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 9 (1964).

[37] J. L. Strominger, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 31, 181 (1959).

[38] J. T. Park u. J. L. Strominger, Science (Washington) 125, 99 (1957).

[39] E. Ito u. J. L. Strominger, J. biol. Chemistry 235, PC7 (1961); 237, 2689, 2696 (1962); 239, 210 (1964).

[40] F. Lynen, Feder. Proc. 20, 941 (1961).

gestattet werden, die eine eindeutige gegenseitige Anordnung erzwingen [41]. Ein geordneter Ablauf der biosynthetischen Erweiterung des Murein-Netzes auf einer solchen (stets mitwachsenden) Membran wäre gut vorstellbar, wenn das Punktmuster der enzymatisch aktiven Zentren die topographischen Beziehungen aller jener

[41] M. L. Zarnitz u. W. Weidel, Z. Naturforsch. 18b, 275 (1963).

Bindungen im Murein-Netz, die die Enzyme zu lösen oder zu knüpfen haben, bereits widerspiegelt. Tatsächlich liegt der Innenseite des Murein-Netzes in der lebenden Zelle überall die sehr labile Cytoplasma-Membran an, deren Struktur und Funktion man also zuerst nach Anhaltspunkten für die Richtigkeit dieser Vermutungen durchsuchen wird.

Eingegangen am 22. Mai 1964 [A 401]

Fluordichlormethylthio-Verbindungen und ihre Verwendung im Pflanzenschutz [*]

VON DR. E. KÜHLE, DR. E. KLAUKE UND DR. F. GREWE

WISSENSCHAFTLICHES HAUPTLABORATORIUM UND BIOLOGISCHES INSTITUT
DER FARBENFABRIKEN BAYER AG., LEVERKUSEN

Beim Übergang von fungizid wirksamen N-Trichlormethylthio-Verbindungen zu den Mono-fluor-Analogen erhält man Verbindungen mit einem Optimum an biozider Potenz, während die höherfluorierten Derivate im allgemeinen wieder unwirksamer sind. Verschiedene Vertreter aus der Reihe der Fluordichlormethylthio-Verbindungen sind als Blatt- und Boden-fungizide, Akarizide, Insektizide und Bakterizide verwendbar.

Für die Entwicklung moderner Pestizide waren die letzten drei Jahrzehnte von überragender Bedeutung. Einen großen Fortschritt bei der Insektenbekämpfung bildeten die ersten systemisch wirksamen, d. h. ins pflanzliche System eindringenden organischen Phosphorsäureester. Auch zur Unkrautbekämpfung mit chemischen Mitteln stehen systemisch wirksame synthetische Pflanzenwuchsstoffe (Derivate der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) zur Verfügung. Dagegen ist noch kein systemisch wirksames Fungizid gefunden worden [1]. Die bekannten organischen Fungizide werden alle protektiv angewendet, d. h. sie müssen noch vor dem Angriff der pilzlichen Krankheitserreger auf die zu schützenden Pflanzen aufgebracht werden. Da der Zeitpunkt des Pilzbefalls nicht genau bekannt ist, muß das Fungizid in hoher Konzentration angewendet werden. Daraus ergibt sich, daß an die Wirkungsdauer, Stabilität, Pflanzenverträglichkeit und Preiswürdigkeit eines Fungizids hohe Anforderungen gestellt werden müssen. Die anorganischen Kupfer- und Schwefelverbindungen werden in der Praxis nur langsam durch organische Wirkstoffe ersetzt; dieser Prozeß ist auch heute noch nicht abgeschlossen.

Die wichtigsten Stufen in der Entwicklung organischer Fungizide werden durch die folgenden Verbindungsgruppen markiert [2]:

1. Dithiocarbamidsäure-Derivate:

a) ausgehend von Dialkylaminen z. B. die Zink-, Eisen- und Mangan-Salze der Dimethyldithiocarbamidsäure sowie Tetramethylthiuramdisulfid (TMTD),

[*] Diese Verbindungen sind Gegenstand zahlreicher in- und ausländischer Patente oder Patentanmeldungen der Farbenfabriken Bayer AG., Leverkusen.

[1] E. Kühle u. R. Wegler, Liebigs Ann. Chem. 616, 183 (1958).

[2] Vgl. hierzu die Übersicht von R. I. Cremllyn, Internat. Pest Control 5, 10 (1963).

b) ausgehend von Alkylendiaminen z. B. die Zink- und Mangan-Salze der Äthylendisithiocarbamidsäure.

2. Chinone:

z. B. Chloranil und 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon.

3. Verbindungen mit langen Alkylresten:

z. B. Salze des 2-Heptadecyl-glyoxalidins und Dodecylguanidins.

4. N-Trichlormethylthio-Verbindungen:

z. B. N-(Trichlormethylthio)-tetrahydrophthalimid und N-(Trichlormethylthio)-phthalimid.

Bei der Bekämpfung der echten Mehltäupilze wurden Aufbereitungen von elementarem Schwefel (Netzschwefel) und Polysulfiden (Schwefel-Kalkbrühe) abgelöst durch:

5. 2-Alkyl-4,6-dinitrophenylester, z. B. der Crotonsäure und Methacrylsäure [3].

6. Chinoxalin-Derivate:

z. B. die Dithio- und Trithiocarbonate des 2,3-Dimercaptochinoxalins [4].

Trotz der großen Bedeutung und des mengenmäßig sehr beträchtlichen Einsatzes von Fungiziden aus den genannten Stoffgruppen steht der Pflanzenschutz vor Problemen, deren Lösung durch Verbindungen mit verbesserten Eigenschaften angestrebt wird. Als praktisch bedeutsame Folge der Verwendung mancher organischer Fungizide sind Verschiebungen innerhalb der pilzlichen Schädlingsflora zu beobachten. So stellt heute bei vielen Kulturpflanzen die Bekämpfung echter Mehltäupilze den Pflanzenschutz vor schwierigere Aufgaben als die Niederhaltung der bisher vor allem gefährlichen Nichtmehltäupilze (Apfelmehltau-Schorf im Obstbau). Zur Lösung dieser Probleme haben wir uns mit der chemischen Abwandlung der bekannten N-Trichlormethylthio-Verbindungen beschäftigt.

[3] K. Reichner et al., Angew. Chem. 74, 994 (1962).

[4] K. Sasse et al., Angew. Chem. 72, 973 (1960).