

# Die Bakteriengeißeln (Flagella) und das Geißelprotein Flagellin<sup>[\*\*]</sup>

Von Wolfram Bode<sup>[\*]</sup>

Im Vergleich zu den relativ komplizierten Geißeln aller kernhaltigen Lebewesen besitzen die meisten aktiv beweglichen Bakterien sehr viel einfacher gebaute Bewegungsorganellen. Diese Flagella sind einseitig in der Zellmembran verankerte, lange, dünne Filamente mit schraubenförmiger Überstruktur. Während der Bewegung laufen an ihnen helicale Wellen in distaler Richtung entlang. In den Flagella sind identische Bausteine nur einer einzigen Proteinspezies, des Flagellins, über nichtkovalente Bindungen miteinander verknüpft. Durch schonende Methoden können die Flagellinuntereinheiten voneinander getrennt und im isolierten Zustand biochemisch und struktur- sowie gestaltsmäßig untersucht werden. Unter bestimmten Bedingungen können sie *in vitro* zu polymorphen helicalen Filamenten reaggregieren, die sich von intakten Geißeln kaum unterscheiden lassen. Im Flagellum sind die gestreckten Flagellinmoleküle in ca. zehn parallelen Strängen geschichtet angeordnet, die wiederum zu einem Hohlzylinder zusammengefügt sind. Da dieser zu einer großen Schraube deformiert ist, sind die einzelnen chemisch identischen Flagellinprotomeren sowie auch die Protomerstränge in den helicalen Flagella nur noch quasiäquivalent. Vermutlich kann *in vivo* das Konformations- und Bindungsmuster der einzelnen longitudinalen Flagellinreihen von den Basalstrukturen aus gesteuert werden, so daß folgender Bewegungsablauf innerhalb des Flagellums denkbar ist: Eine zyklisch induzierte Längenänderung der einzelnen Stränge könnte eine scheinbare Rotation der Flagellumschraube bewirken. Nach hydrodynamischen Berechnungen reicht der resultierende Vorwärtsschub aus, um den Bakterien die beobachteten Geschwindigkeiten bis zu 50  $\mu\text{m/s}$  zu verleihen.

## 1. Einleitung

Alle Geißeln der kernhaltigen (eukaryontischen) Einzeller (z. B. Flagellaten) wie auch der beweglichen Zellformen höherer Lebewesen (z. B. Zoosporen, Spermatozoen von Wirbellosen und Wirbeltieren) weisen trotz verschiedenartiger äußerer Form und Funktion einen überraschend gleichartigen Feinbau auf: Eingelagert in eine wenig strukturierte Matrix und miteinander verbunden durch feine Sekundärfasern, sind immer zwei zentrale Achsenfäden von neun peripheren Doppelfibrillen zylindrisch umgeben<sup>[1-3]</sup>. Man vermutet, daß die wellenförmigen oder schlagenden Bewegungen der Geißeln durch Kontraktion oder gegenseitige Verschiebung dieser Proteinfibrillen hervorgerufen werden.

Sehr viel kleiner und einfacher im Aufbau sind die Bakteriengeißeln. Sie ähneln in Größe und Struktur den einzelnen peripheren und axialen Fibrillen der Eukaryontengeißeln und können deshalb als ein primitiver Grundtyp für die komplizierteren Bewegungsorganellen angesehen werden. Wegen ihres relativ einfachen Aufbaus sind die Bakterienflagella daher vermutlich die brauchbarsten Studienobjekte, um prinzipielle Kenntnisse über Struktur und Funktion kontraktiler biologischer Bewegungselemente zu ge-

winnen. Von den Übersichtsartikeln über Bakteriengeißeln seien neben einem besonders ausführlichen Referat<sup>[4]</sup> einige Arbeiten erwähnt, die sich mit den Bewegungsmechanismen von Bakterien<sup>[3, 5, 6]</sup> sowie mit Genetik und Struktur der Geißeln<sup>[7-11]</sup> befassen. Im folgenden soll gezeigt werden, welche Kenntnisse man heute bereits über die Form und Feinstruktur der Flagella hat und wie man sich vermutlich den Bewegungsablauf innerhalb der Geißeln vorstellen kann. Besonders ausführlich sollen dabei die Eigenschaften des Flagellins, insbesondere seine erstaunliche Fähigkeit zur *in-vitro*-Aggregation, besprochen werden.

## 2. Begeißelung und Geißelform

Viele Bakterien sind in der Lage, in oder auf flüssigen Medien in Richtung eines Nahrungsgradienten zu „schwimmen“. Die meisten Bakterien benutzen dabei für ihre aktiven Bewegungen hochspezialisierte Organellen, die Flagella. Daneben sind nur wenige motile, aber unbegeißelte Bakterien bekannt, die sich auf andere Weise bewegen (z. B. Spirochäten, Myxobakterien<sup>[4, 6]</sup>).

Die Anordnung der Flagella an der Bakterienzelle ist artspezifisch<sup>[12]</sup>. Bekannt sind Bakterien mit einer einzigen, polar inserierten Geißel, mit je einer Geißel an jedem Zellpol, mit einem Flagellabündel an einem Pol oder an beiden Polen oder mit zahlreichen, an der gesamten Zelloberfläche entspringenden Geißeln (peritrichie Begeißelung, s. Abb. 1). Die Geißeln haben meistens eine Länge von etwa 10  $\mu\text{m}$  und einen einheitlichen, aber artspezifischen Durchmesser von 120 bis 200 Å. Sie besitzen im angehefte-

[\*] Dr. W. Bode  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung II  
8033 Martinsried bei München  
Am Klopferspitz

[\*\*] Diesem Fortschrittsbericht liegt ein Referat zugrunde, das der Autor während des Makromolekularen Kolloquiums in Freiburg am 2. März 1972 gehalten hat; vgl. Angew. Chem. 84, 357 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, 334 (1972).

ten wie auch im abgeschüttelten Zustand in Lösung die Form einer Schraube<sup>[4]</sup>. Bei der Eintrocknung und Kontrastierung auf der ebenen Unterlage kollabieren die helicalen Flagella und erscheinen im Elektronenmikroskop als sinusförmige Filamente, deren artspezifische „Wellenlänge“ etwa der Ganghöhe der ursprünglichen Helix gleichgesetzt werden kann und bei den peritrich begeißelten Eubacteriales, wie z. B. *Proteus*-Bakterien (Abb. 1), *Salmonella* und *Bacilli*, normalerweise knapp  $2.5\text{ }\mu\text{m}$ <sup>[4, 10]</sup> beträgt (normaler Flagellatypus). Mit Ausnahme einiger paralyserter Mutanten<sup>[9]</sup> können diese normal begeißelten Bakterien im allgemeinen relativ rasche Rotations- und Translationsbewegungen ausführen.

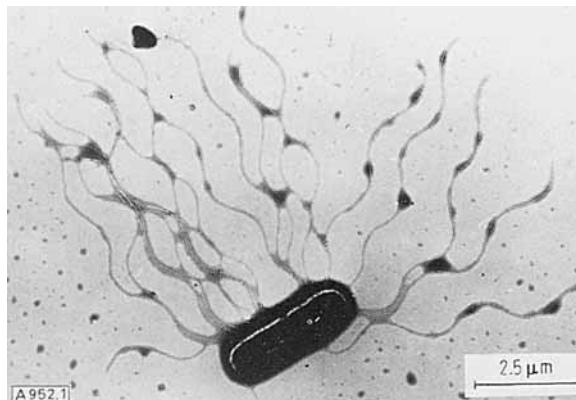


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines peritrich begeißelten Bakteriums (*Proteus mirabilis*) nach Negativkontrastierung mit 2-proz. Kaliumwolframatophosphatlösung bei pH = 7.

Daneben sind aber auch wenig bewegliche Mutanten mit curly-Flagella gefunden worden, deren Wellenlänge etwa die Hälfte derjenigen der normalen Flagella beträgt, entsprechend einer etwa halbierten Steighöhe der Flagellahelix<sup>[4, 9, 10]</sup>. Außerdem können neben kaum beweglichen Mutanten mit kurzen kreisförmigen Flagella auch noch vollkommen unbewegliche Bakterien mit völlig geraden („straight“) Flagella beobachtet werden<sup>[4, 10]</sup>. Diese Änderungen der Flagellaform sind zumeist genetisch bedingt (vgl. Abschnitt 4). In Nährmedien mit sehr niedrigen pH-Werten hat man die kurzwellige Flagellaform aber auch bei *Proteus-mirabilis*-Wildtypen finden können, die unter gewöhnlichen Wachstumsbedingungen normale Flagella besitzen<sup>[4, 12]</sup>.

Einzelne Flagella können wegen ihrer geringen Dicke lichtmikroskopisch erst nach Trocknung und spezieller Beizfärbung betrachtet werden<sup>[6]</sup>. Bei den vielbegeißelten Bakterien lagern sich die Flagella aber während der Bewegung zu einem dicken, helicalen Bündel zusammen. Die gemeinsame Bewegung dieses Geißelbündels am lebenden Bakterium kann im Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 2). Während der aktiven Bewegung weist dieses Geißelbündel immer in die der Fortbewegung entgegengesetzte Richtung. Dabei laufen fortwährend helicale Wellen in distaler Richtung an diesem Bündel entlang, das daher wie eine rotierende Schraube aussieht. Zugleich scheint sich der Bakterienkörper gegensinnig drehend im Medium vorwärtszuschrauben. Einige Bakterien können so Geschwindigkeiten von über  $50\text{ }\mu\text{m/s}$  erreichen, d. h. ein Vielfaches ihrer Körperlänge in der Sekunde zurücklegen.

Wenn die Bakterien langsame Schwimmbewegungen ausführen, können manchmal auch Übergänge zwischen zwei unterschiedlichen Schraubenformen der Bündel beobachtet werden, die einer normalen Helix bzw. einer Schraube mit nur etwa der halben Ganghöhe (curly-Typ) entsprechen<sup>[10]</sup>. Diese Eigenschaft des Geißelbündels, nacheinander oder gleichzeitig in zwei bestimmten, gut voneinander



Abb. 2. Lichtmikroskopische Aufnahme eines *Salmonella*-Bakteriums mit seinem Bündel normaler Flagella während der Bewegung (Dunkelfeldbeleuchtung). Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. T. Iino und Dr. S. Asakura zur Verfügung gestellt.

unterscheidbaren Schraubenformen auftreten zu können, wird auch „Biplizität“ genannt. Da solche Übergänge aber nur relativ selten während der Bewegung beobachtet werden können, dürften sie für die Bewegung nicht notwendig oder verantwortlich sein.

### 3. Die Feinstruktur der Geißel

Während die Flagella bei mechanischer Belastung wie z. B. Schütteln, Rühren oder Zentrifugieren in Höhe der Zellwand abbrechen, können nach schonender enzymatischer Ablösung der Zellwand und Behandlung mit Detergentien ganze Geißeln einschließlich ihrer Verankerung präparativ dargestellt und untersucht werden<sup>[13, 14]</sup>. Danach bestehen alle Bakteriengeißeln unabhängig von ihrer Herkunft einheitlich aus drei morphologisch unterscheidbaren Teilen: Die Geißel beginnt in einem mit der Cytoplasmamembran verbundenen *Basalkörper*, tritt mit dem *Geißelhaken* durch die Zellwand und setzt sich dann in dem langen, helicalen *Hauptfilament* fort.

Erst kürzlich ist es gelungen, Feinstrukturen an der isolierten Basalregion zu erkennen<sup>[13]</sup>. Danach sitzen bei gramnegativen Bakterien wie z. B. *E. coli* auf einem relativ dünnen Stift vier ringförmige, voneinander abgesetzte Scheiben. Bei der inserierten Geißel dürften drei der Ringe mit jeweils einer der definierten Schichten der Zellhülle gramnegativer Bakterien verbunden sein, nämlich der Cytoplasmamembran (innen), der Mureinschicht (Mitte) und der Lipopolysaccharidschicht (außen)<sup>[13]</sup>. Das Bindeglied zwischen dem Basalkörper und dem helicalen Hauptfilament bildet der Geißelhaken, ein leicht gekrümmter Zylinder von etwa  $500\text{ \AA}$  Länge (s. Abb. 3). Sein Durchmesser liegt meistens etwas über dem des Filaments, von dem er sich auch

durch seine größere Temperaturbeständigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber desaggregierenden Agentien unterscheidet<sup>[4, 13, 14]</sup>. Offenbar besteht er auch aus einem anderen Protein als das Hauptfilament<sup>[4, 14]</sup>.



Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines abgetrennten Flagellums von *Proteus mirabilis* mit Haken und eingeschnittenem „Schwanzenende“ (vgl. Text) nach Negativkontrastierung mit 2-proz. Kaliumwolframatophosphatlösung bei pH = 7.

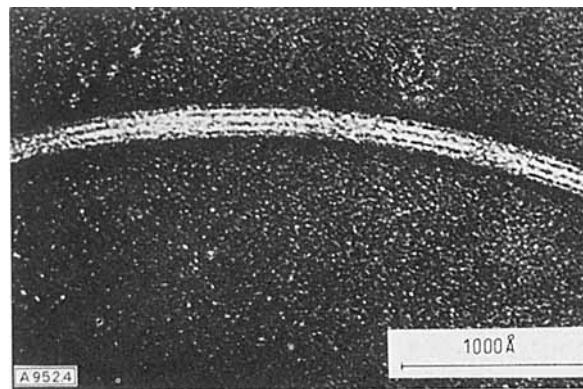


Abb. 4. Flagellum (B-Form) von *Pseudomonas fluorescens* mit periodisch gestörtem longitudinalem Streifenmuster. Die Aufnahme (Kontrastierung mit Uranylacetat) wurde freundlicherweise von J. Lowy zur Verfügung gestellt.

An den Geißelhaken schließt sich – oft über eine etwas verengte Region – das helicale Hauptfilament an, das auch oft allein schon als „Flagellum“ bezeichnet wird. Mit einigen Ausnahmen, bei denen ein weiteres Protein das Filament mit einer Geißelscheide umhüllt<sup>[4, 15]</sup>, bestehen die Flagella aus chemisch gleichen Bausteinen eines einzigen Proteins, des Flagellins. Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen bilden eiförmige morphologische Untereinheiten, die aufgrund ihrer Abmessungen von ca. 50 Å<sup>[15, 16]</sup> mit dem Flagellin identisch sein dürften, einen Zylinder (Abb. 4). In einigen Fällen erscheinen die Untereinheiten etwa hexagonal zusammengepackt, wobei eine deutliche, schräge Querstreifung auf eine helicale Anordnung der Protomerstränge hinweist (A-Form<sup>[15]</sup>). In anderen Fällen (Abb. 4) scheint die Zylinderwand aus acht<sup>[15]</sup>, neun bis zehn<sup>[17, 18]</sup> oder elf<sup>[19, 20]</sup> longitudinalen Flagellinreihen zu bestehen (B-Form<sup>[15]</sup>).

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und aus Röntgen-Faserdiagrammen konnten die Abstände zwischen den Untereinheiten in axialer Richtung recht genau

zu 52 Å<sup>[21–23]</sup>, die seitlichen Abstände zwischen den longitudinalen Reihen oder Untereinheiten aber zu 40 bis 60 Å bestimmt werden<sup>[4, 15, 16]</sup>. Dabei erwiesen sich die Abstände in axialer Richtung im Gegensatz zu denen in lateraler Richtung als äußerst invariant gegenüber Trocknungsgrad sowie Kontrastierungs- und Präparationsart<sup>[24]</sup>.

An abgeschüttelten Flagella, insbesondere nach Verkürzung durch Ultraschall oder durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen, kann sich Negativkontrastierungsmittel wie Kaliumwolframatophosphat in die Achsenregion einlagern (Abb. 5). Dadurch können in der Achse kurzer Flagella bis zu 30 Å dicke Kontrastlinien auftreten<sup>[4, 16–18]</sup>, die allerdings nie so stark sichtbar werden wie etwa beim Tabakmosaikvirus oder bei Bakteriophagenschwänzen<sup>[15]</sup>. Auf das Vorliegen eines hohlen Zentralkanals weisen auch Röntgen-Beugungsversuche an orientierten Flagellabündeln<sup>[25]</sup> wie auch Röntgen-Kleinwinkelmessungen an ver-



Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme von ultrabeschallten Flagella (*Proteus mirabilis*) nach Negativkontrastierung mit 2-proz. Kaliumwolframatophosphatlösung bei pH = 7. Zu erkennen ist eine schwache, schwarze Zentrallinie.

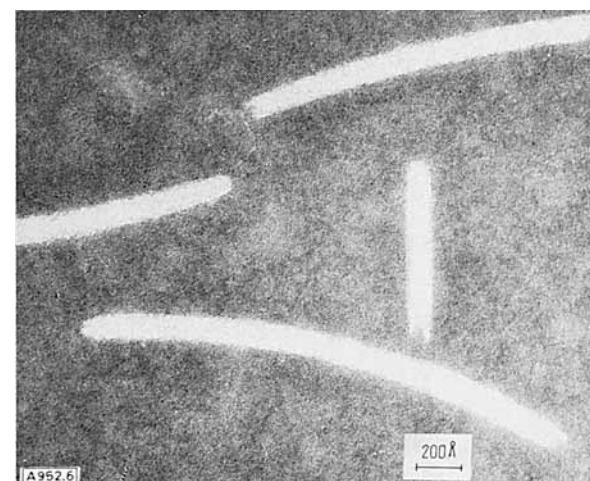


Abb. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahme von beschallten Flagella (*Proteus mirabilis*) nach Negativkontrastierung mit 2-proz. Kaliumwolframatophosphatlösung bei pH = 7. Zu erkennen sind jeweils ein rundes bis spitzes und ein eingeschnittenes Ende.

schieden langen Flagella in Lösung<sup>[17, 18]</sup> hin. Im letzteren Fall erwiesen sich die Flagella von *Proteus mirabilis* als etwa streuäquivalent zu einem langen Hohlzylinder mit äußerem bzw. innerem Durchmesser von 150 bzw. 30 Å<sup>[18]</sup>.

An kurzen Flagellabruschstücken können in bestimmten Fällen unterschiedlich ausgebildete Enden beobachtet werden<sup>[4, 10, 17, 18, 26, 27]</sup>. Nach Negativkontrastierung ist ein Ende immer rund bis spitz, während das andere eingeschnitten erscheint (Abb. 6). Nach Schrägbedämpfung mit Schwermetallen bleibt dagegen nur noch die Spitze, nicht aber das „Schwanzende“ sichtbar<sup>[28]</sup>. Wie Abbildung 3 zeigt, enthält das distale, von der Bakterienzelle und dem Geißelhaken abgewandte Ende des verankerten Flagellums diesen Einschnitt.

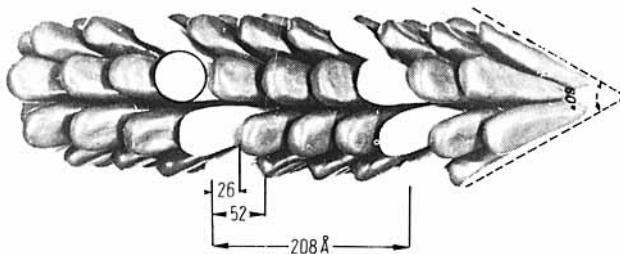


Abb. 7. Feinstrukturmodell des Flagellumfilaments, aufgebaut aus keilförmigen Untereinheiten [18] (Erklärung siehe Text).

Das Beobachtungsmaterial erlaubt es nun bereits, ein recht detailliertes Feinstrukturmodell des Geißelfilaments zu entwickeln. Bei dessen Konstruktion wird noch von einer zusätzlichen Information Gebrauch gemacht, die erst in Abschnitt 4 ausführlich begründet werden kann. Das Flagellinmonomere besitzt nämlich keine kugelige Gestalt, wie früher angenommen<sup>[15]</sup>, sondern ist ein sehr gestrecktes Molekül<sup>[17, 18]</sup>. Da eine dichte, zylindrische Packung von langen Protomeren nur möglich ist, wenn jede Untereinheit nahe der Zylinderachse weniger voluminös ist als an der Peripherie, dürfte ein Keil eine vernünftige Näherung für die wirkliche Form des Protomers sein. Im Feinstrukturmodell (Abb. 7) ist in Anlehnung an Lowy und Hanson<sup>[15]</sup> angenommen worden, daß (bei den Flagella der Eubacteriales) die Flagellinprotomeren mit einem regelmäßigen Abstand von 52 Å in acht etwa achsenparallelen Strängen aufgereiht sind, die wiederum zu einem hohen Zylinder zusammengefügt sind. Zugleich sind die Protomeren in benachbarten Reihen versetzt und hexagonal angeordnet und bilden Helices mit acht Untereinheiten pro Schraubenwindung.

Eine dieser vier gleichen 8/4-Helices ist in Abbildung 7 zur besseren Sichtbarmachung hell gezeichnet. Das helicale Oberflächengitter wird durch die sich kreuzenden (vier) 8/4-Helices und die (acht) longitudinalen Reihen (allgemein durch zwei Familien von parallelen Helices) bestimmt. Die genaue Protomeranordnung und die Anzahl der longitudinalen Reihen (nach neuesten Messungen durch Optische Diffraktion<sup>[19, 20]</sup> eher elf als acht) sind z. Z. noch nicht eindeutig bekannt. Nach diesem Modell<sup>[18]</sup> werden die in elektronenmikroskopischen Bildern etwa rund erscheinenden morphologischen Untereinheiten mit einem Durchmesser von etwa 50 Å damit erklärt, daß von den länglichen Protomeren an der Oberfläche nur ein etwa kreisförmiger Teil sichtbar ist.

Mit seinem kegelförmigen und seinem eingeschnittenen Ende kann dieses Modell darüber hinaus auf molekularer Ebene die unterschiedlichen Endstrukturen der polaren

Flagella (Abb. 6) erklären. Im Gegensatz zum großen Achsenkanal mit etwa 60 Å effektivem Durchmesser des Lowy-Hanson-Modells lassen die Protomeren in diesem Feinstrukturmodell nur einen schmalen Hohlraum von etwa 30 Å Durchmesser frei, wie er durch die Röntgen-Messungen und die relativ schwache Anfärbbarkeit (Abb. 5) nahegelegt wird.

#### 4. Das Flagellin

Das helicale Filament zerfällt bei Behandlung mit Detergentien, strukturbrechenden Salzen<sup>[17]</sup>, Säuren<sup>[29, 30]</sup>, Alkalien oder auch beim Erhitzen<sup>[31]</sup> in identische Flagellinuntereinheiten, die also im Flagellum nur über nichtkovalente Bindungen verknüpft sind. Monomeres Flagellin wird meistens durch Hitze- oder Säuredissoziation dargestellt (vgl. <sup>[4]</sup>). Das Molekulargewicht von Flagellinen verschiedener Organismen wurde unter physiologischen Bedingungen (pH = 7, ca. 0.15 mol/l NaCl) in der Ultrazentrifuge zu etwa 40000 bestimmt<sup>[18, 29 – 33]</sup>. Diese Werte konnten in denaturierenden Reagentien wie 6 M Guanidiniumchlorid, durch die Natriumdodecylsulfat-Diskelektrophorese oder durch Analyse der Flagellinpeptide nach Trypsin- oder BrCN-Spaltung bestätigt werden<sup>[18, 34 – 37]</sup>.

Damit wurde zugleich gezeigt, daß in den meisten Fällen das Flagellin das einzige und kleinste Protomere der Flagella ist und aus einer einzigen Peptidkette besteht. Bei wenigen Organismen sind jedoch zwei chemisch sehr ähnliche, aber doch unterscheidbare Proteinkomponenten in den Flagella gefunden worden<sup>[4]</sup>. Inwieweit dies einer Makro- oder Mikroheterogenität des Beobachtungsmaterials zuzuschreiben ist, läßt sich z. Z. noch nicht entscheiden<sup>[4]</sup>. Bei einigen Salmonellabakterien hat man aber zwei für die Flagellinbiosynthese zuständige, nebeneinander vorliegende Strukturgene festgestellt, von denen phasenabhängig jeweils eines an- und eines abgeschaltet ist (vgl. <sup>[4, 9]</sup>).

Der manchmal in geringen Mengen nachgewiesene Kohlenhydratanteil in Flagellinpräparationen dürfte meistens einer Verunreinigung durch Zellwandpolysaccharide zuzuschreiben sein, die im Unterschied zu den H-Antigenen der Flagella die bakteriellen O-Antigene sind<sup>[38]</sup>. Alle Flagelline haben eine charakteristische Aminosäurezusammensetzung: Sie enthalten nie Cystein und Tryptophan, selten Prolin und Histidin und meistens wenig Methionin, Tyrosin und Phenylalanin. Auffällig ist auch ein relativ hoher Anteil an nichtpolaren, hydrophoben Aminosäuren. In manchen Flagella ist die seltene Aminosäure  $\epsilon$ -N-Methyllysin gefunden worden<sup>[4, 34, 36]</sup>. Vermutlich werden einige in bestimmten Bereichen der Peptidkette lokalisierte Lysine am fertigen Flagellinmolekül enzymatisch methyliert<sup>[36]</sup>. Von einem *Bacillus-subtilis*-Wildtyp mit normalschraubigen Geißeln konnten durch Behandlung mit mutagenen Reagentien unbewegliche Mutanten mit völlig geraden Flagella erzeugt werden<sup>[39, 40]</sup>. In allen Fällen hatte die Mutation den Austausch einer einzigen Aminosäure, nämlich den von Valin für das ursprüngliche Alanin, zur Folge.

Es ist möglich (vgl. Abschnitt 5), das Flagellin in neutralen Puffern für längere Zeit monodispers in Lösung zu halten<sup>[18, 29, 31]</sup>. Dies erlaubt die Messung von Form- und

Strukturparametern des Flagellins. So konnten der Streumassenradius und der Stokessche Radius des isolierten, neutral gelösten Flagellins von *Proteus mirabilis* (mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung bzw. aufgrund seines Elutionsverhaltens an Sephadexgelen) zu etwa 40 bzw. 37 Å bestimmt werden<sup>[17, 18]</sup>. Im Vergleich dazu würden der Streumassenradius bzw. der Radius einer kompakten Kugel mit dem Molekulargewicht und Partialvolumen des Flagellins nur 17.5 bzw. 23 Å betragen.

Auch die Sedimentationskonstante  $s$  und die Viskositätszahl  $[\eta]$  sind sehr viel kleiner bzw. größer, als für ein kugelförmiges solvatisiertes Teilchen zu erwarten wäre. Danach verhält sich das Flagellin hydrodynamisch wie ein gestrecktes starres Rotationsellipsoid mit einem Achsenverhältnis von etwa 9:1<sup>[18]</sup>. Das Flagellin ist etwa streuäquivalent mit einer Reihe gestreckter geometrischer Körper mit etwas kleinerem Achsenverhältnis und mittleren Längen um 160 Å. Unter der Annahme, daß sich die Form des isolierten nicht sehr von der des polymerisierten Flagellins unterscheidet, wurde aus solchen streuäquivalenten Untereinheiten mit Keilform das Feinstrukturmodell (Abb. 7) aufgestellt<sup>[18]</sup>.

Durch optische Rotationsdispersion (ORD) und Circulardichroismus (CD) – zwei optische Methoden, die Aussagen über den Anteil an Sekundärstrukturen in Proteinen gestatten – konnte gezeigt werden, daß das isolierte Flagellin unter etwa physiologischen pH-Werten und Salzkonzentrationen bei Raumtemperatur in einem von seiner Vorbehandlung unabhängigen Konformations- und Strukturzustand vorliegt<sup>[18, 27, 41 – 44]</sup>. Aufgrund seiner molaren Elliptizität pro mittlerem Aminosäurerest bei 220 nm von – 8800 Grad·cm<sup>2</sup>/Dezimol kann man für das Flagellin von *Proteus mirabilis*<sup>[45]</sup> nach den üblichen Methoden den Anteil an  $\alpha$ -helicalen Strukturbereichen zu etwa 25% abschätzen (vgl. andere Werte<sup>[4, 41 – 44]</sup>).

## 5. Die in-vitro-Reaggregation

Das Flagellin kann in vitro zu langen, helicalen Filamenten reaggregieren, die sich bei elektronenmikroskopischer Beobachtung, aufgrund ihrer Röntgen-Beugungsmuster oder ihrer optischen Eigenschaften von den ursprünglichen, nativen Flagella kaum unterscheiden lassen. Diesen Selbstorganisationsprozeß bezeichnet man auch als Polymerisation, obwohl dabei keine kovalenten Bindungen geknüpft werden. Das Flagellin von *Bacillus pumilus* polymerisiert z. B. in 0.02 M Phosphatpuffer zwischen pH = 5.4 und 5.6 (der isoelektrische Punkt der Flagelline liegt um 5) bei 26°C relativ schnell zu flagellaähnlichen Filamenten. Zwischen pH = 4 und 4.9 entstehen dagegen lineare Strukturen, die sich bei Erhöhung des pH-Wertes irreversibel ebenfalls in helicale Filamente umwandeln<sup>[30]</sup>. Spontan polymerisiert Flagellin auch in halbkonzentrierten, neutralen Lösungen bestimmter „aussalzender“ Anionen (z. B.  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ )<sup>[10, 46, 47]</sup>. Bei dieser „Salzpolymerisation“ nehmen in einem Molaritätsbereich zwischen 0.4 und 1.2 die Bildungsgeschwindigkeit und die Anzahl der Fragmente mit der Konzentration von Salz und Flagellin zu, die Länge der schließlich gebildeten Filamente aber

ab. Aus der Konzentrationsabhängigkeit von Länge und Bildungsgeschwindigkeit der Filamente wurde abgeschätzt, daß zur Keimbildung etwa drei Monomere zusammentreten müssen<sup>[10, 47]</sup>.

Um pH = 7 und in Gegenwart von etwa 0.15 mol/l Natriumchlorid bleiben Flagellinlösungen dagegen lange monodispers und stabil, so daß ausführliche Untersuchungen am gelösten, nativen Flagellin möglich sind (vgl. Abschnitt 4). Dagegen polymerisieren die Flagellinmonomeren unter diesen Bedingungen in Gegenwart von etwa 0.3 µm langen Flagellafragmenten (Seeds), die durch Ultraschall dargestellt werden können, relativ schnell auf diese auf<sup>[31]</sup>. Bei dieser „Seedspolymerisation“ wachsen die Fragmente ausschließlich am Schwanzende (vgl. Abb. 6)<sup>[27]</sup>. Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist direkt proportional der Anzahl der zugesetzten Seeds. Sie wächst mit steigender Monomerkonzentration bis zu einem Grenz- oder Sättigungswert von etwa 15 mg/ml Flagellin, wenn zwischen dem Einbau von zwei Monomeren etwa 0.3 s verstreichen<sup>[10]</sup>.

Die Stabilität der Flagella und die Fähigkeit des Flagellins zur Seedspolymerisation zeigen, daß sich das isolierte Flagellin in 0.15 M Natriumchloridlösung um pH = 7 und bei Raumtemperatur in einem kinetisch gehemmten Zustand befindet; thermodynamisch stabil unter diesen physiologischen Bedingungen sind nur die helicalen Filamente. Während also die Keimbildung äußerst langsam und schwierig ist, kommt es bei Anwesenheit von Keimen, als Seeds zugefügt oder in einem anderen Lösungsmittel spontan gebildet, zu einem relativ schnellen Kettenwachstum. Damit zeigt dieses Flagella-Flagellin-System ähnlich wie z. B. das G-F-Actin-System<sup>[48, 49]</sup> charakteristische Eigenschaften einer kooperativen Aggregation, wie sie z. B. bei der Kristallisation oder anderen Phasenumwandlungen<sup>[50, 51]</sup> beobachtet werden.

In der Theorie der linearen (oder helicalen) kooperativen Aggregation<sup>[48, 50 – 52]</sup> wird im einfachsten Fall angenommen, daß oberhalb einer bestimmten Keimgröße alle folgenden elementaren Gleichgewichts-Wachstumsschritte mit derselben Gleichgewichtskonstanten K beschrieben werden können. Nur die ersten Keimbildungsschritte sollen thermodynamisch ungünstiger sein, indem etwa die Geschwindigkeitskonstanten des Keimaufbaus sehr viel kleiner als die der Keimverlängerung sein können. Dies kann z. B. daher rühren, daß die beteiligten Monomeren vor oder während der Keimbildung gemeinsam ihre Konformation ändern müssen (s. u.) oder daß im Keim weniger Bindungsstellen pro Monomer vorhanden sind als in den größeren Aggregaten (vgl. <sup>[48]</sup>). Obwohl auch noch höhere Oligomere mit dem kleinsten stabilen Keim identisch sein können (s.o.), sei hier die erschwerte Keimbildung formal als Dimerisation bezeichnet mit der Dimerisationskonstanten  $K_2 = \sigma \cdot K$  (nach Winklmair<sup>[53]</sup>). Der Kooperativitätsparameter  $\sigma$  ist dabei umso kleiner, je mehr das Monomere den Keim als Konformations- oder Wachstumsmatrix benötigt. Der genaue Zustand eines solchen Monomer-Polymer-Gleichgewichtssystems ist dann von  $\sigma$  und K (und damit von äußeren Parametern wie pH-Wert, Ionenstärke, Art der Salze, Temperatur) und von der Gesamtprotomerkonzentration  $c_i$  abhängig, da es sich um bimolekulare Reaktionen handelt. Im Falle sehr hoher Kooperativität ( $\sigma \ll 1$ ) enthält die Lösung bei  $K \cdot c_i < 1$  praktisch nur Mono-

mere, während bei  $K \cdot c_t = 1$ , also bei der kritischen Micellenkonzentration  $c_t = 1/K$ , plötzlich auch Polymere auftreten<sup>[48, 53]</sup>.

Leider konnten bisher beim Flagellin (im Gegensatz zum Actin<sup>[49]</sup>) zur Prüfung der Theorie keine echten Gleichgewichtsmessungen durchgeführt werden, da die Assoziation in der Nähe des Gleichgewichts außerordentlich langsam erfolgt und daher das echte Gleichgewicht schwer zu bestimmen ist. In einem Fall wird aber beim Salmonellaflagellin über eine „kritische Flagellinkonzentration“ berichtet<sup>[10]</sup>. Viskositätsmessungen konnten nämlich beobachtet werden, daß bei 40 °C Seeds in Lösung mit Flagellinkonzentrationen unter 0.6 mg/ml depolymerisierten, während sie bei 0.6 mg/ml Flagellin stabil blieben und bei höheren Konzentrationen auf Kosten des monomeren Flagellins sogar wuchsen. Bei der Versuchstemperatur von 40 °C liegen aber sicherlich keine physikalisch einheitlichen Flagellinspezies mehr vor. So nimmt z. B. der  $\alpha$ -helicale Strukturanteil des Flagellins ab 27 °C<sup>[18]</sup> bzw. 35 °C<sup>[41]</sup> mit steigender Temperatur stark ab. Auch dilatometrisch wurde eine Strukturänderung bzw. Auffaltung des Flagellins in diesem Temperaturbereich festgestellt. Während der Flagellinpolymerisation ändert sich nämlich das Molvolumen unter 28 °C um +150 ml/mol Flagellin und über 35 °C sogar um das Doppelte<sup>[54]</sup>. Die Polymerisationsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Temperatur unter 27 °C zu, darüber aber wieder ab<sup>[17, 30, 54]</sup>. Nach halblogarithmischer Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit<sup>[17]</sup> oder der Halbwertszeit der Polymerisation<sup>[54]</sup> gegen die reziproke Temperatur wurde aus dem (zwischen 4 und 20 °C) geraden Kurvenverlauf die Arrheniussche Aktivierungsenergie des Wachstums schrittes zu 8 bis 10 kcal/mol bestimmt. Bei höheren Temperaturen ergeben sich wegen des negativen Temperaturkoeffizienten der Polymerisationsgeschwindigkeit (s. o.) scheinbar negative Aktivierungsenergien. Man hat versucht, sie durch ein vorgelagertes, stark temperaturabhängiges und reversibles Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form des Monomeren zu erklären<sup>[17, 54]</sup>.

Die CD- und ORD-Spektren der Flagella sind bis auf eine leichte Rotverschiebung den Flagellinspektren in der Form ähnlich<sup>[42, 45]</sup>. Die molare mittlere Restelliptizität der Flagella bei 220 nm beträgt aber mit etwa -15000 Grad cm<sup>2</sup>/Dezimol<sup>[44, 45]</sup> das 1.7-fache bzw. 1.5-fache des Wertes für isoliertes Flagellin in physiologischen Puffern bzw. in polymerisationsfördernder 0.9 M Ammoniumsulfatlösung<sup>[44, 45]</sup>. Diese starke Erhöhung der optischen Aktivität während der Polymerisation wird häufig als Hinweis auf eine Konformationsänderung interpretiert, die das Monomere vor, während oder nach Einbau in das Flagellum durchmachen muß<sup>[4, 10]</sup>. Ohne quantitative Rechnungen oder Messungen an ähnlich komplizierten Systemen ist aber schwer abzuschätzen, inwieweit allein die helicale Anordnung und dichte Packung der optisch aktiven Protomeren im Flagellum (s. Abb. 7) bereits die Rotationsstärken der Elektronenübergänge beeinflussen bzw. verstärken können (vgl. Cholesterinphasen<sup>[55]</sup>). Die Partikelstreuung, die bei sehr großen optisch aktiven Teilchen diskutiert und auch gemessen wird<sup>[56, 57]</sup>, scheint nicht die Ursache dieser optischen Effekte zu sein<sup>[10, 44]</sup>, zumal da sie eher zu kleineren Amplituden führen sollte (vgl. aber<sup>[44]</sup>).

Am Carboxyende der Salmonella- und Proteusflagelline mit ihren ca. 380 Aminosäureresten steht Arginin<sup>[34, 36, 58]</sup>. Nach seiner enzymatischen Abspaltung durch Carboxypeptidase B verliert das Flagellin weitgehend seine Fähigkeit zur spontanen und schnellen in-vitro-Polymerisation<sup>[45, 58]</sup>. Im Flagellum widersteht dagegen dieses C-terminale Arginin dem enzymatischen Angriff. Danach dürfte der C-Terminus in oder bei den Kontaktflächen zwischen den Flagellinprotomeren lokalisiert sein. An den Protomerbindungsflächen liegen vermutlich auch die meisten Tyrosin- und Methioninreste (5 bis 10 bzw. 2 bis 10 je nach Flagellinspezies), da sie zwar im isolierten Flagellin, nicht aber im polymeren Flagellum typischen Modifikationsreaktanten oder den Hydroxid-Ionen zugänglich sind<sup>[4, 17, 36, 43, 59]</sup>. Außerdem dürften an den intermolekularen Bindungen besonders viele apolare Aminosäuren beteiligt sein, deren Anteil im Flagellin außergewöhnlich hoch ist (s. Abschnitt 4).

Typisch für solche hydrophobe Bindungen sind neben schwach positiven molaren Reaktionenthalpien  $\Delta H$  und stark positiven molaren Volumenänderungen  $\Delta V$  stark positive Werte für die molare Reaktionsentropie  $\Delta S$ . Bei der Assoziation von Peptidmonomeren wird nämlich die Zahl der Kontakte hydrophober Gruppen zu umgebenden Wassermolekülen verringert, die dadurch erhöhte Bewegungsfreiheit gewinnen. Vor allem die hieraus resultierende positive Reaktionsentropie begünstigt entsprechend der grundlegenden thermodynamischen Beziehung zwischen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  einerseits und der molaren Freien Reaktionenthalpie  $\Delta G$  andererseits ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) die Proteinaggregation<sup>[60, 61]</sup>. Auch die beträchtliche Molvolumenzunahme bei der Flagellinpolymerisation (s. o.) ist ein Hinweis auf die Beteiligung solcher hydrophober intermolekulare Wechselwirkungen im Flagellum. Derzeit durchgeführte kalorische Messungen<sup>[62]</sup> werden zeigen, inwieweit auch die Enthalpie- und Entropieeffekte dafür sprechen.

## 6. Der Polymorphismus

Wie bereits in Abschnitt 2 erwähnt, hat man bei Bakterien Flagella mit verschieden gestaltigen (polymorphen) Schraubenformen gefunden, die im wesentlichen als normal (n), kurzwellig oder curly (c) sowie gerade oder straight (s) bezeichnet werden (s. Abb. 8). Asakura et al. haben durch Seedspolymerisationsexperimente mit einheitlichen oder gemischten n-, c- oder s-Flagellinlösungen die formprägenden oder Anpassungseigenschaften der beteiligten Flagelline untersucht<sup>[10, 33, 63]</sup>. Bei der Polymerisation von einer kleinen Menge n- bzw. c-Flagellin mit vielen langen c- bzw. n-Seeds nahm das neugewachsene Filamentstück in beiden Fällen curly-Form an. Dagegen wurde in Lösungen, die neben wenigen kurzen Seeds (gleich welchen Typs) sehr viel n-, c- oder s-Flagellin enthielten, die Form der polymerisierten Filamente weitgehend von der Natur dieses Monomers bestimmt<sup>[33]</sup>.

Die so entstandenen Filamente wurden unter dem Elektronenmikroskop vermessen und durch ihre auf eine Wellenlänge  $\lambda$  entfallende Konturlänge  $L$  und durch ihre maximale Wellenhöhe  $h$  charakterisiert. Bei der gemeinsamen oder

Mischpolymerisation von n- und s-Flagellin konnten nach Zusatz sehr weniger kurzer Seeds je nach Mischungsverhältnis fünf deutlich unterscheidbare, stabile Filamentformen beobachtet werden (vgl. Abb. 8 und Tabelle 1): während mit homogenen n- bzw. s-Flagellinlösungen fast ausnahmslos normalwellige (Abb. 8a, Typ I) bzw. gerade (Abb. 8e, Typ V) Filamente entstanden, lagen in gemischten Lösungen (n+s) drei weitere wellige (helicale) Filamenttypen II, III bzw. IV (Abb. 8b, 8c bzw. 8d) vor. Da die Wellen- und Konturlängen mit zunehmendem Gehalt an s-Flagellin abnehmen, entsprechen die völlig geraden s-Flagella also dem Grenzfall unendlich kleiner L- und  $\lambda$ -Werte<sup>[10]</sup>. Analog entstanden bei der Mischpolymerisation von

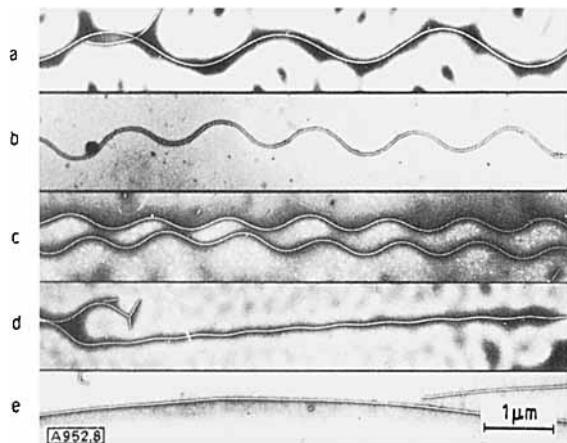


Abb. 8. Elektronenmikroskopische Aufnahme der fünf stabilen Filamenttypen, erhalten durch Copolymerisation von n- und s-Flagellin [10] im Verhältnis von: a) 1:0 (normal (n), Typ I); b) 9:1 (Typ II); c) 1:1 (curly (c), Typ III); d) 1:9 (Typ IV); e) 0:1 (straight (s), Typ V). Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. S. Asakura zur Verfügung gestellt.

c- und n-Flagellin neben normalen Flagella je nach Mischungsverhältnis zwei kürzerwellige Filamenttypen, die den Typen II und III (Abb. 8 und Tabelle 1) ähnlich sind<sup>[10, 63]</sup>.

Tabelle 1. Gestaltparameter der durch Copolymerisation von n- und s-Flagellin erhaltenen Filamente (nach [10], vgl. Text und Abb. 8).

	I	II	III	IV	V
Konturlänge L [μm]	2.70	1.54	1.15	0.63	0
Wellenlänge λ [μm]	2.49	1.36	1.08	—	0
Wellenhöhe h [μm]	0.45	0.31	0.16	0.027	0

Bemerkenswert ist, daß die durch Mischpolymerisationen entstandenen Filamente fast immer in durchgehend einheitlicher Form vorlagen, obwohl in ihnen die einzelnen Flagellinspezies deren unterschiedlicher Polymerisationsgeschwindigkeit wegen nicht völlig gleichmäßig verteilt angeordnet waren. Selten konnten, unter bestimmten äußeren Bedingungen, bei Filamenten aus reinem n-Flagellin reversible Transformationen zwischen der n- und der c-Form beobachtet werden, wobei die Filamente immer vollständig eine dieser Formen annahmen<sup>[33]</sup> („Alles-oder-Nichts“-Fall<sup>[61]</sup>). Offenbar ist es also meistens für die Filamente energetisch am günstigsten, in ihrer ganzen Länge von

einheitlichem Typus zu sein. Dabei kann jede Flagellinspezies in mehrere stabile Flagellatypen eingebaut werden. Mit wachsendem Gewichtsanteil in der Mischung prägen die Flagelline den Filamenten aber ihre bevorzugte Form immer stärker auf (s. Abb. 8).

## 7. Das in-vivo-Wachstum

Motile Bakterien vermögen innerhalb einer bis weniger Generationsdauern vollständige Geißeln von etwa 10 μm Länge auszubilden<sup>[4]</sup>. So können z. B. Salmonellabakterien unter günstigen Lebensbedingungen ihre Geißeln bei 37°C um etwa 0.15 μm/min verlängern<sup>[4, 64]</sup>. In Abschnitt 5 wurde bereits gesagt, daß sich das Flagellin in vitro bei der Seedspolymerisation ausschließlich am eingeschnittenen Schwanzende der Filamente anlagert (siehe Abb. 3 und 6). Vor kurzem konnte nun durch zwei hübsche Experimente gezeigt werden, daß auch das in-vivo-Wachstum der Flagella am eingeschnittenen distalen, also von der Bakterienzelle weit entfernten Ende vor sich geht. Im ersten Versuch wurde von der Beobachtung Gebrauch gemacht, daß bestimmte Mangelmutanten in einem Vollmedium, das statt Phenylalanin dessen p-Fluorderivat enthält, anstelle der normalwelligen nur noch curly-Flagella produzieren<sup>[65]</sup>. Nach Überführung der Mangelmutanten aus einem normalen in ein p-Fluorophenylalanin enthaltendes Nährmedium nahmen die wachsenden Flagella in ihrem distalen Bereich plötzlich curly-Charakter an. Folglich mußte dieser Bereich zuletzt synthetisiert worden sein<sup>[66]</sup>. Dieses überraschende Ergebnis konnte durch autoradiographische Untersuchungen bestätigt werden, bei denen die Bakterien während ihrer Wachstumsphase nacheinander in einem kalten und anschließend in einem tritiummarkierten Medium inkubiert wurden<sup>[66]</sup>. Die elektronenmikroskopische Auswertung ergab, daß vorwiegend die vom Geißelhaken abgewandten Filamentteile filmschwärzend und also markiert waren, d. h. auch zuletzt fertiggestellt worden sein mußten.

Offen bleibt dabei, auf welchem Wege die Flagellinproteine in vivo zu der vom Zellkörper häufig sehr weit entfernten Flagellawachstumszone gelangen. In einem weiteren Experiment<sup>[67]</sup> wurden die geraden s-Flagella unbeweglicher Mutanten durch Ultraschallbehandlung gekürzt und anschließend dieser Bakterienlösung relativ konzentrierte Lösungen von n-Flagellin zugesetzt. Nach einiger Zeit konnten in der Lösung aktiv bewegliche Bakterien beobachtet werden, die zum Teil heteromorphe Flagella mit geradem proximalem und normalgewelltem distalem Teil, zumeist aber vollständig normale Geißeln besaßen. Das zugesetzte n-Flagellin mußte also aus der Lösung auf die Flagellastümpfe aufpolymerisiert worden sein. Es ist aber fast auszuschließen, daß auch bei der natürlichen Flagellaentstehung freies, gelöstes Flagellin zunächst von der Zelle an das offene, umgebende Medium abgeschieden wird und von dort nach Art der Seedspolymerisation aufwächst. Man hat nämlich bisher in Bakterienlösungen außerhalb der Zellen kein freies Flagellin nachweisen können. Und die bei 37°C beobachtete hohe in-vivo-Wachstums geschwindigkeit konnte in vitro nur bei Raumtemperatur und mit relativ hohen Flagellinkonzentrationen (ca. 5-

10 mg/ml) gemessen werden<sup>[10, 33]</sup> (vgl. Abschnitt 5); die Anlagerungsmechanismen in vivo und in vitro sind demnach vermutlich verschieden. So muß man wohl annehmen, daß das Flagellin nach seiner Biosynthese an der Basalmembran<sup>[4]</sup> in den verschiedentlich nachgewiesenen Flagellumkanal (Abschnitt 3 und Abb. 5) abgegeben wird, dort aktiv oder passiv entsprechend dem Konzentrationsgradienten zum distalen Flagellumende „diffundiert“ und sich dort direkt anlagert.

## 8. Die Schraubenform

Im Feinstrukturmodell (Abb. 7), in dem u. a. die wahrscheinliche Nahbereichsordnung innerhalb eines kurzen Filamentstückes demonstriert werden soll, wird das Geißelfilament wie ein dem Tabakmosaikvirus oder den Bakteriennpili<sup>[11]</sup> ähnliches gerades Stäbchen behandelt. Wie bereits beschrieben (Abschnitt 2), sind aber die meisten Flagella sowohl im funktionstüchtigen als auch im isolierten Zustand schraubenförmig verdreht. Einfache Symmetrievergleichungen zeigen, daß die einzelnen, chemisch identischen Flagellinuntereinheiten wegen dieser überhelicalen Struktur der Flagella nicht völlig identische, sondern wegen der nur ähnlichen Nachbarschaftsbeziehungen quasiäquivalente Positionen im Flagellum einnehmen können<sup>[68]</sup>. Dies sollte ein vereinfachtes und dennoch möglichst einfaches Flagellamodell ebenfalls berücksichtigen.

Klug<sup>[68]</sup> nimmt in seinem Modell zwei energetisch etwa gleichwertige Sätze von Protomerbindungen an, die beide allein zu geraden, leicht unterschiedlichen Zylindern führen. Eine gleichzeitige (teilweise) Absättigung beider Bindungssätze in einer Struktur ist dagegen nur in einem Zylinder mit zur Helix deformierter Achse möglich. Im folgenden soll an einem anderen Modell anschaulich gezeigt werden, wie ein Tubus, der aus vielen sehr ähnlichen Bausteinen besteht, je nach deren Anordnung mehrere unterscheidbare Superhelixformen annehmen kann. Dabei wird einem Vorschlag von Asakura<sup>[10]</sup> folgend angenommen, daß die Untereinheiten im wesentlichen in nur zwei unterschiedlichen Formen (Konformationen) in der Superschraube (Flagellahelix) auftreten können.

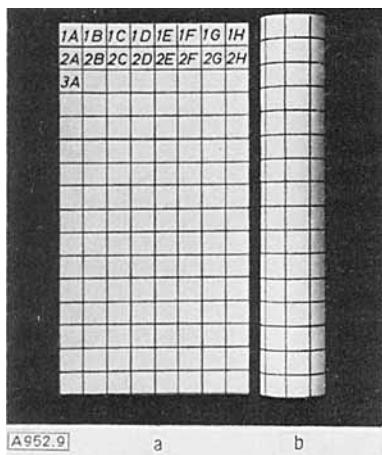


Abb. 9. a) Oberflächengitter und b) entsprechendes Zylindermodell.

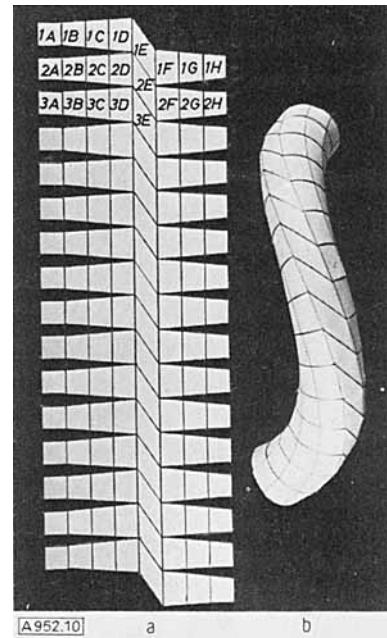


Abb. 10. a) Oberflächengitter und b) entsprechendes Superschraubenmodell; Beziehungen zwischen Abb. 9a und 10a siehe Text.

Beim Zusammenrollen des ebenen, regelmäßigen Oberflächengitters<sup>[69]</sup> (Abb. 9a) entsteht der Mantel eines geraden Zylinders (Abb. 9b), in dem – in Anlehnung an das Feinstrukturmodell (Abb. 7) – Untereinheiten mit schematisiertem quadratischem Querschnitt in acht achsenparallelen Reihen (A bis H) angeordnet sind. Der Einfachheit halber sind die Untereinheiten oder Protomeren in benachbarten Reihen nicht gegeneinander versetzt gezeichnet. Sie sind hinsichtlich ihrer Form und, bis auf beide willkürlich gewählten Enden, ihrer Position und Nachbarschaftsbeziehung völlig identisch oder äquivalent.

Nun sei der Fall betrachtet, daß alle Protomeren einer der willkürlich gewählten longitudinalen Reihen (z. B. E) eine etwas längere und zugleich abgewinkelte Form annehmen. Die Protomeren der übrigen Reihen sollen aber weiterhin unter Beibehaltung einer geschlossenen Tubusoberfläche die ursprüngliche (kürzere und quadratische) Form beizubehalten versuchen, was der von der E-Reihe am weitesten entfernten A-Reihe am besten gelingen wird. Das entsprechende ebene Oberflächengitter ist in Abbildung 10a dargestellt. Die Einführung des neuen Protomertypus hat folgende Konsequenzen: aufgrund der gewinkelten Form wird eine Versetzung in den einzelnen, bezifferten Querreihen erzeugt, so daß diese und gleichermaßen die longitudinalen Reihen nach dem Zusammenrollen des Gitters (Abb. 10a) nicht mehr senkrecht bzw. parallel, sondern schräg zur Zylinderachse verlaufen (Abb. 10b). Zugleich wird sich der Zylinder wegen der Längenunterschiede der „longitudinalen“ Reihen zusammenrollen. Weil dabei aber die längste (kürzeste) Protomerreihe immer bestrebt ist, an der äußeren, längeren (inneren, kürzeren) Krümmungslinie zu liegen zu kommen, wird der Zylinder deren schrägen Verlaufs wegen nicht zu einem Reifen, sondern zu einer großen Schraube deformiert (Abb. 10b). Deren Parameter ergeben sich eindeutig aus Versetzung und Größenunterschieden der Untereinheiten. Diese besitzen jetzt aber nur noch ähnliche Nachbarschaftsbeziehungen, ihre Formen

und Berührungsflächen sind auch in mittleren Tubusabschnitten nicht mehr völlig gleich, sondern nur noch quasi-äquivalent.

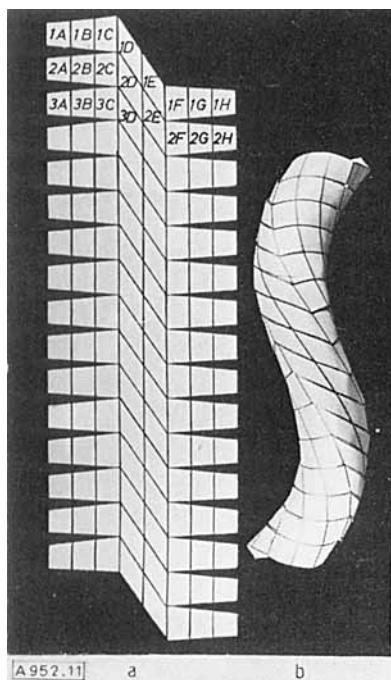


Abb. 11. a) Oberflächengitter und b) entsprechendes Superschraubenmodell; Beziehungen zwischen Abb. 11a und 10a siehe Text.

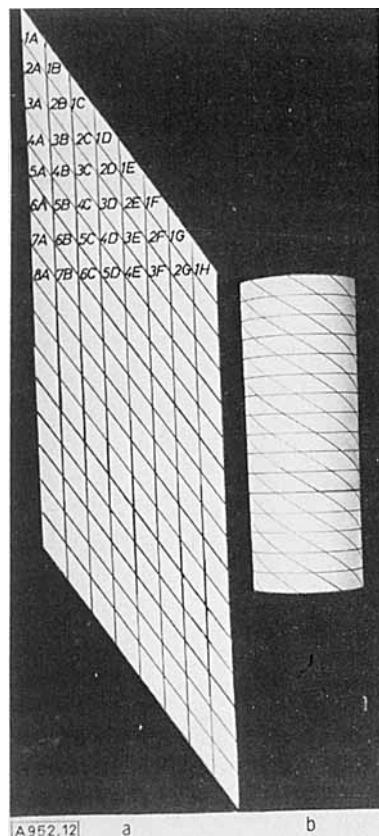


Abb. 12. a) Oberflächengitter und b) entsprechendes Zylindermodell; Beziehungen zwischen Abb. 12a und 11a siehe Text.

Nehmen nun auch die Protomeren einer weiteren, benachbarten Reihe (z. B. D in Abbildung 11a) die längere, gewinkelte Form an, so wird eine noch engere Schraube mit kleinerer Ganghöhe und geringerem Durchmesser entstehen (Abb. 11b) usw. Sind schließlich alle Reihen umgewandelt, ergibt sich wegen der Identität der Untereinheiten unabhängig von deren (einheitlicher) Form und Größe schließlich wieder ein gerader Zylinder (Abb. 12b), dessen „longitudinale“ Reihen A–H von allen Zylindern oder Superschrauben den größten Winkel zur Tubusachse aufweisen und dessen Abmessungen im Vergleich zum ursprünglichen geraden Zylinder (Abb. 9b) verändert sind.

Der Einfachheit halber ist in diesem Modell statt der in den Flagella verwirklichten hexagonalen (vgl. Abschnitt 3 und Abb. 7) die quadratische Protomeranordnung gewählt werden. Erstere könnte aber ohne grundsätzliche Veränderungen durch gegenseitige Versetzung der „longitudinalen“ Reihen eingeführt werden. Dieses einfache Modell bietet nun eine plausible Erklärung für den Polymorphismus und die Biplizität der Flagella. Es zeigt, wie unter Verwendung einer einzigen Protomerspezies, die in nur zwei Formen (Konformationen) vorliegen kann, je nach Besetzungsverhältnis neben zylindrischen mehrere Schraubenstrukturen aufgebaut werden können, die sich zugleich in der Konturlänge  $L$ , in der Ganghöhe  $\lambda$  und im Helixdurchmesser (etwa gleich  $h$ ) voneinander unterscheiden.

In den Superschraubenmodellen (Abb. 10 und 11) stellen die „longitudinalen“ Reihen A bis H jeweils eine oder zwei längste (D, E) oder kürzeste (A, B) und mehrere Linien mittlerer Länge dar, die in großen Schrauben (long-range helix) um den Tubus herumlaufen. Diese Schraubenlinien entsprechen vermutlich den „longitudinalen“ Flagelllinien (Abb. 7), die wahrscheinlich nicht parallel, sondern z. B. in den normalschraubigen Flagella in einem Winkel von 1 bis 2° schräg zur Filamentachse<sup>[71]</sup> verlaufen. Die periodischen Störungen innerhalb des Längsstreifenmusters der negativkontrastierten Flagella (s. Abb. 4) konnten recht gut dadurch erklärt werden, daß sich die in einem spitzen Winkel zueinander laufenden Protomerstränge von Flagellaober- und -unterseite überlagern und solche Störungsmuster hervorrufen<sup>[71]</sup>.

Kürzlich konnte mit der Optischen Diffraktion und der Optischen Filterung an elektronenmikroskopischen Aufnahmen gerader Flagella gezeigt werden, daß die (elf<sup>[19]</sup>) Protomerreihen bei geraden Flagella in dem recht großen Winkel von etwa 7° zur Flagellumachse verlaufen<sup>[19]</sup> (vgl. Abb. 12b). Der Übersichtlichkeit halber sind in den Modellen (Abb. 9 bis 12) die Größenverhältnisse völlig verzerrt wiedergegeben. So läßt sich z. B. eine Zahl von 4000 Protomeren pro Helixwindung für die normalen Flagella errechnen, deren Helixdurchmesser außerdem mit 3400 Å<sup>[10, 70]</sup> ein Vielfaches ihres Tubusdurchmessers von ca. 150 Å beträgt. Und die Protomeren der längsten (äußersten) und kürzesten (inneren) Reihe unterscheiden sich in den n-Flagella nur um 1 bis 2%. Durch diese kleine, systematische Variation im regelmäßigen Bindungsmuster – wie Quasi-Äquivalenz definiert wird<sup>[68]</sup> – erhalten die c- und n-Flagella eine Schraubenstruktur, die im Vergleich zu geraden Zylindern (mit äquivalenter Protomeranordnung) offenbar sehr viel stabiler ist. Da die Flagella meistens in einer einheit-

lichen Schraubenform vorliegen, müssen zwischen den einzelnen Protomeren sehr starke kooperative Nachbarschaftswechselwirkungen bestehen<sup>[50]</sup>.

## 9. Die Geißelbewegung

Das oben beschriebene Modell bietet auch eine brauchbare Hypothese für den möglichen Bewegungsablauf innerhalb des Geißelfilaments. Da dieses offenbar keinerlei ATPase-Aktivität besitzt, darf man wohl annehmen, daß es allein als ein passiver Leiter einer helicalen Wellenbewegung dient, die durch chemische Energie an der Basalregion induziert wird<sup>[68]</sup>. Dazu ist nun zunächst nicht nur eine hohe Kooperativität innerhalb der „longitudinalen“ Reihen, sondern auch – über das Hakenstück hinweg – zwischen diesen und den korrespondierenden Strukturen in der Basalregion erforderlich. Diese Strukturen könnten gewissermaßen als allosterische Effektoren<sup>[71]</sup> die Konformation der einzelnen Reihen bestimmen (vgl. Endeffekte bei linearen Biopolymeren<sup>[50]</sup>). Würde z. B. in den Schraubenmodellen (Abb. 10 und 11) zyklisch nacheinander den einzelnen Reihen die längere, gewinkelte Konformation aufgezwungen, so wären diese Reihen nacheinander bestrebt, an der „Außenseite“ der Superschraube zu liegen zu kommen. Das helicale Filament könnte dabei mehrere mikroskopisch nicht unterscheidbare und energetisch völlig gleichwertige (entartete) Mikrozustände durchlaufen, die – worauf auch der Polymorphismus hinweist – vermutlich nur durch geringe Aktivierungsschwellen voneinander getrennt sind. So könnten über das Flagellum ungedämpfte helicale Wellen zur Spitze fortschreiten<sup>[6, 7, 68]</sup> entsprechend der Beobachtung an Flagellabündeln (Abschnitt 2). Dabei erfolgt also nur eine scheinbare Rotation des schraubigen Filaments relativ zur Basis<sup>[5, 7, 72]</sup>, die einzelnen Protomeren behalten während der Bewegung ihre Orientierung im Raum bei. Eine freie Schraube könnte allerdings – im Gegensatz zu einem freien Seil, über das ebene Wellen hinweglaufen – durch eine solche Rotation keinen Vorwärtsschub erzeugen, sie würde wegen der Drehimpulserhaltung als stationär erscheinen<sup>[5]</sup>. Erst die Koppelung an den großen Bakterienzelloörper verhindert diese freie Rotation und bewirkt bei verschiedenen schneller, gegensinniger Rotation der Flagella einerseits und des Zellopers andererseits einen Vorwärtsschub<sup>[5, 6]</sup>, der nach Berechnungen ausreicht, um den Organismen die beobachteten Geschwindigkeiten bis zu 50  $\mu\text{m/s}$  zu verleihen. Dabei sind allein viskose und nicht etwa Trägheitskräfte beteiligt<sup>[6]</sup>. Nach Meinung des Autors spielt für Struktur und Funktion des Filaments der Geißelhaken (Abschnitt 3) eine wichtige Rolle. Das Filament sollte nämlich senkrecht aus der Membran heraus- und durch die Zellwand hindurchtreten und erst danach in die Schraubenkrümmung übergehen. Die vermutlich ebene Krümmung des Geißelhakens könnte diese Aufgabe sehr gut erfüllen. In der (scheinbar) rotierenden Schraube sollte dabei im Haken immer gerade diejenige Protomerreihe verkürzt sein, die im Schraubenteil die äußere, also längste Schraubenlinie bildet, d. h. sein Struktur- und Funktionsmuster sollte gerade entgegengesetzt beschaffen sein. Ist der bereits außerhalb der Zelle gelegene Haken aber für Struktur und Funktion der Geißel notwen-

dig, so muß er auch – sollen auch kürzere, noch nicht fertiggestellte Geißeln funktionieren – als erster entstehen. Dies könnte ein Grund sein für das an sich eigenartige Wachstum der Geißeln an ihrer jeweiligen Spitze (Abschnitt 7).

## 10. Ausblick

Es muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß im Vorhergehenden häufig mit Hypothesen gearbeitet werden mußte. Sehr viele Fragen bleiben offen, so z. B. die nach Ort und Art der Flagellinbiosynthese und der chemisch-mechanischen Energieumwandlung. Völlig ungeklärt sind natürlich auch Initiierung, Regelung und Koordination der Geißelbewegung. Man ist geneigt, diese Funktion in die Basalregion und die angrenzende Zellmembran zu verlegen. In dieser müssen auch Leitungsmechanismen zwischen den nachweisbaren Chemorezeptoren<sup>[73]</sup> und den Bewegungszentren bestehen, wodurch erst die chemo- und phototaktischen Leistungen vieler Bakterien ermöglicht werden, nämlich auf Nährstoff- oder Lichtgradienten durch gesteuerte Schreckreaktionen zu antworten<sup>[74]</sup>. Die scheinbar einfachen bakteriellen Bewegungsorganellen bilden also in Wirklichkeit eine äußerst komplizierte Struktur- und Funktionskette, deren einzelne Glieder noch recht wenig bekannt sind. Vielleicht hat uns die Natur mit dem helicalen Flagellum eine relativ einfache Struktur in die Hand gegeben, die beispielhaft zeigt, wie in der Zelle Informationen über lineare oder zweidimensionale (membranöse) Proteinaggregate auf nichtelektrischem Wege – nämlich durch kooperative Wechselwirkungen in allosterischen Proteinstrukturen – übertragen werden können. Dem Flagellumtubus ähnliche Strukturen sind jedenfalls an Mechano-, Chemo- und Photorezeptoren aufgefunden worden<sup>[75–78]</sup>.

*Herrn Professor J. Engel und Herrn Dipl.-Chem. S. Knofer sei für Kritik und anregende Diskussion gedankt.*

Eingegangen am 27. Dezember 1972 [A 952]

- [1] D. J. Kushner, *Bacteriol. Rev.* 33, 302 (1969) u. zit. Lit.
- [2] D. E. Hooke, J. Randall u. J. M. Hopkins in K. B. Warren: *Formation and Fate of Cell Organelles*. Academic Press, New York 1967, S. 115–173.
- [3] B. A. Newton u. D. Kerridge, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 15, 220 (1965) u. zit. Lit.
- [4] R. W. Smith u. H. Koffler, *Advan. Microbiol. Physiol.* 6, 219 (1971) u. zit. Lit.
- [5] R. E. Burge u. M. E. J. Holwill, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 15, 250 (1965) u. zit. Lit.
- [6] C. Weibull in I. C. Gunsalus u. R. Y. Stanier: *The Bacteria*. Academic Press, New York 1960, Bd. 1, S. 153–205, u. zit. Lit.
- [7] J. Lowy u. M. Spencer, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 22, 215 (1968).
- [8] M. E. Rhodes, *Bacteriol. Rev.* 29, 442 (1965).
- [9] T. M. Joys, Antonie van Leeuwenhoek; *J. Microbiol. Serol.* 34, 205 (1968).
- [10] S. Asakura, *Advan. Biophys.* 1, 99 (1970).
- [11] R. Schmitt, *Biol. Unserer Zeit* 2, 82 (1972).
- [12] E. Leifson: *An Atlas of Bacterial Flagellation*. Academic Press, New York 1960.
- [13] M. L. De Pumphilis u. J. Adler, *J. Bacteriol.* 105, 376, 384, 396 (1971).
- [14] K. Dimitri u. M. I. Simon, *J. Bacteriol.* 108, 282 (1971).
- [15] J. Lowy u. J. Hanson, *J. Mol. Biol.* 11, 293 (1965).
- [16] D. Kerridge, R. W. Horne u. A. M. Glauert, *J. Mol. Biol.* 4, 227 (1962).

- [17] *W. Bode*, Dissertation, Universität München 1971.
- [18] *W. Bode*, *J. Engel* u. *D. Winklmair*, *Eur. J. Biochem.* **26**, 313 (1972) u. zit. Lit.
- [19] *E. J. O'Brien* u. *P. M. Bennett*, *J. Mol. Biol.* **70**, 133 (1972).
- [20] *J. T. Finch* u. *A. Klug*, persönliche Mitteilung.
- [21] *J. N. Champness* u. *J. Lowy* in *W. G. Crewther*: *Symp. Fibrous Proteins*. Butterworths, Sydney 1967, S. 106.
- [22] *K. Wakabayashi* u. *T. Mitsui*, *J. Mol. Biol.* **53**, 567 (1970).
- [23] *J. N. Champness*, *J. Mol. Biol.* **56**, 295 (1971).
- [24] *R. E. Burge* u. *J. C. Draper*, *J. Mol. Biol.* **56**, 21 (1971).
- [25] *G. Swanbeck* u. *B. Forslind*, *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 422 (1964).
- [26] *D. Abram*, *H. Koffler* u. *A. E. Vatter*, 2nd Int. Congr. Biophys., Wien 1966.
- [27] *S. Asakura*, *G. Iguchi* u. *T. Iino*, *J. Mol. Biol.* **35**, 227 (1968).
- [28] *W. Bode* u. *H. P. Zingsheim*, unveröffentlicht.
- [29] *C. Weibull*, *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 351 (1948).
- [30] *D. Abram* u. *H. Koffler*, *J. Mol. Biol.* **9**, 168 (1964).
- [31] *S. Asakura*, *G. Iguchi* u. *T. Iino*, *J. Mol. Biol.* **10**, 42 (1964).
- [32] *M. W. McDonough*, *J. Mol. Biol.* **12**, 342 (1965).
- [33] *S. Asakura*, *G. Iguchi* u. *T. Iino*, *J. Mol. Biol.* **16**, 302 (1966).
- [34] *H. Grossmann* u. *W. Bode*, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **353**, 298 (1972).
- [35] *J. Y. Chang*, *D. M. Brown* u. *A. N. Glazer*, *J. Biol. Chem.* **244**, 5196 (1969).
- [36] *C. R. Parish* u. *G. L. Ada*, *Biochem. J.* **113**, 489 (1969).
- [37] *B. E. Davidson*, *Eur. J. Biochem.* **18**, 524 (1971).
- [38] *O. Lüderitz* u. *O. Westphal*, *Angew. Chem.* **78**, 172 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 198 (1966).
- [39] *R. J. Martinez*, *D. M. Brown* u. *A. N. Glazer*, *J. Mol. Biol.* **28**, 45 (1967).
- [40] *T. Iino* u. *M. Mitani*, *J. Gen. Microbiol.* **49**, 81 (1967).
- [41] *D. Klein*, *M. Yaguchi*, *J. F. Foster* u. *H. Koffler*, *J. Biol. Chem.* **243**, 4931 (1968).
- [42] *D. Klein*, *J. F. Foster* u. *H. Koffler*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 844 (1969).
- [43] *M. Taniguchi*, *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 240 (1970).
- [44] *Y. Uratani*, *S. Asakura* u. *K. Imahori*, *J. Mol. Biol.* **67**, 85 (1972).
- [45] *W. Bode*, noch unveröffentlicht.
- [46] *G. L. Ada*, *C. J. V. Nossal*, *J. Pye* u. *A. Abbot*, *Nature* **199**, 1257 (1963).
- [47] *K. Wakabayashi*, *H. Hotani* u. *S. Asakura*, *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 195 (1969).
- [48] *F. Oosawa* u. *M. Kasai*, *J. Mol. Biol.* **4**, 10 (1962).
- [49] *A. Wegner*, Diplomarbeit, Universität München 1972.
- [50] *J. Engel* u. *G. Schwarz*, *Angew. Chem.* **82**, 468 (1970); *Angew. Chem. internat. Edit.* **9**, 389 (1970).
- [51] *G. Schwarz* u. *J. Engel*, *Angew. Chem.* **84**, 615 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* **11**, 568 (1972).
- [52] *D. L. D. Caspar* in *G. E. W. Wolstenholme* u. *M. O'Conner*: *Principles of Biomolecular Organization*. Churchill, London 1966, S. 7–34.
- [53] *D. Winklmair*, *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 509 (1971).
- [54] *B. R. Gerber* u. *H. Noguchi*, *J. Mol. Biol.* **26**, 197 (1967).
- [55] *S. Chandrasekhar* u. *K. N. S. Rao*, *Acta Cryst. A* **24**, 445 (1968).
- [56] *D. W. Urry* in *D. W. Urry*: *Spectroscopic Approaches to Biomolecular Conformation*. Amer. Med. Ass., Chicago 1970, S. 34–121 u. zit. Lit.
- [57] *A. S. Schneider*, *M.-J. T. Schneider* u. *K. Rosenheck*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **66**, 793 (1970).
- [58] *W. Bode* u. *H. Grossmann*, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 1285 (1970).
- [59] *W. Bode* u. *W. Schalch*, unveröffentlicht.
- [60] *G. Némethy*, *Angew. Chem.* **79**, 260 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* **6**, 195 (1967) u. zit. Lit.
- [61] *M. Pohl*, *Angew. Chem.* **84**, 931 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* **11**, 894 (1972).
- [62] *W. Bode*, *H.-J. Hinz* u. *R. Jaenicke*, noch unveröffentlicht.
- [63] *S. Asakura* u. *T. Iino*, *J. Mol. Biol.* **64**, 251 (1972).
- [64] *B. A. D. Stocker* u. *J. C. Campbell*, *J. Gen. Microbiol.* **20**, 670 (1959).
- [65] *D. Kerridge*, *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 579 (1959).
- [66] *S. V. Emerson*, *K. Tokuyasu* u. *M. I. Simon*, *Science* **169**, 190 (1970).
- [67] *T. Iino*, *H. Suzuki* u. *S. Yamaguchi*, *Nature New Biol.* **237**, 238 (1972).
- [68] *A. Klug* in *K. B. Warren*: *Formation and Fate of Cell Organelles*. Academic Press, New York 1967, S. 1–18.
- [69] *A. Klug*, *F. H. C. Crick* u. *H. W. Wyckoff*, *Acta Cryst. H*, 199 (1958).
- [70] *S. Fujime*, *M. Maruyama* u. *S. Asakura*, *J. Mol. Biol.* **68**, 347 (1972).
- [71] *J. Monod*, *J. Wyman* u. *J.-P. Changeux*, *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
- [72] *C. J. Coakley* u. *M. E. J. Holwill*, *J. Theor. Biol.* **35**, 525 (1972).
- [73] *J. Adler*, *Science* **166**, 1588 (1969).
- [74] *M. Delbrück*, *Angew. Chem.* **84**, 1 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* **11**, 1 (1972).
- [75] *J. A. Vinnikov*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **30**, 293 (1965).
- [76] *V. Thurm*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **30**, 75 (1965).
- [77] *F. O. Schmitt*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **60**, 1092 (1968).
- [78] *A. V. Grimstone*, *Brit. Med. Bull.* **18**, 238 (1962).