

Bakterienzellwand

Enthüllt: die äußere Membran von Mykobakterien

CHRISTIAN HOFFMANN, HARALD ENGELHARDT

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED

Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany

Tel. +49 89 8578 2650, Fax +49 89 8578 2641, engelhar@biochem.mpg.de

Kryo-Elektronentomographie und vitrifizierte Ultradünnschnitte zeigen erstmals die native Zellwandstruktur von Mykobakterien. Sie besitzen eine äußere Membran, die sich von der Gram-negativer Bakterien unterscheidet.

Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the native cell wall structure and the outer membrane of mycobacteria.

Mykobakterien zählen zu den *Actinobacteria* und damit zu den Gram-positiven Mikroorganismen. Sie haben eine bemerkenswert komplexe Zellwand entwickelt, die aus einem Peptidoglycan-Arabinogalactan-Polymer besteht und kovalent gebundene, langkettige Fettsäuren, die Mykolsäuren, enthält. Sie werden durch verschiedene extrahierbare Lipide ergänzt. Die Zellwand bildet eine außerordentlich wirkungsvolle Permeabilitätsbarriere und trägt so zu der hohen Resistenz der Mykobakterien gegenüber Antibiotika bei [1]. Wegen der medizinischen Bedeutung von *Mycobacterium tuberculosis* – täglich sterben weltweit etwa 4000 Menschen an Tuberkulose – wird die Struktur mykobakterieller Zellhüllen seit langem intensiv untersucht.

Im bisher weitgehend akzeptierten Zellwand-Modell bilden die Mykolsäuren mit je einem C₃₀- und C₆₀-Ast die innere Lage einer asymmetrischen Doppelschicht. Die Kopfgruppen bestehen aus Arabinosemolekülen, die die Mykolsäure-Einheiten miteinander verknüpfen und sie kovalent über das Arabinogalactan an das Peptidoglycan binden. Lipide mit verschiedenen Kopfgruppen liefern die äußere, mit den Mykolsäuren interkalierende Schicht. Die gesamte Struktur hat eine erwartete Stärke von 10 nm und wird als dickste bekannte biologische Membran angesehen [2]. Dieser Vorstellung stehen aber experimentelle

Beobachtungen entgegen. Das in der Zellwand befindliche Porenprotein MspA aus *M. smegmatis* hat eine zu kurze hydrophobe Oberfläche, um eine dicke Membran zu durchspannen [3]. Und es ist bisher nie gelungen, die Lipid-Doppelschicht einer äußeren Membran von Mykobakterien im Elektronenmikroskop (EM) sichtbar zu machen.

Kryo-Elektronentomographie zeigt die native Zellhüllen-Architektur

Konventionelle Ultradünnschnitte erhält man nach chemischer Fixierung, Dehydratisierung, Färbung und Kunststoff-Einbettung der Bakterien mit der Folge, dass Einbußen bei der Strukturhaltung auftreten. Diese kann man mit Kryo-EM vermeiden, welche die Probe im wässrigen Milieu belässt und weder fixiert noch gefärbt bei –180 °C abbildet. Struktur und Anordnung der Makromoleküle bleiben erhalten, wenn die Zellen so gefroren werden, dass Wasser in einen amorphen (vitrifizierten) Eiszustand übergeht. Kombiniert man die Präparation mit dem Prinzip der Tomographie, der Aufnahme einer Serie von Projektionen aus verschiedenen Richtungen, so steht eine nicht-invasive Methode zur Verfügung, die Zellstrukturen mit einer Auflösung von wenigen Nanometern dreidimensional abbilden kann [4]. Mithilfe von Kryo-Elektronentomographie konnten wir jetzt die native Struktur der mykobakteriellen Zellwand enthüllen [5] (Abb. 1).

Abb. 1B zeigt einen x-y-Schnitt aus dem Tomogramm von *M. bovis* BCG; der attenuierte Impfstamm "Bacille Calmette-Guerin" ist zu *M. tuberculosis* nahe verwandt und dient als Modellorganismus. Deutlich ist der mehrschichtige Aufbau der Zellwand zu erkennen. Bei intakten Zellen gelingt es normalerweise nicht, Membranen als Doppelschichten darzustellen.

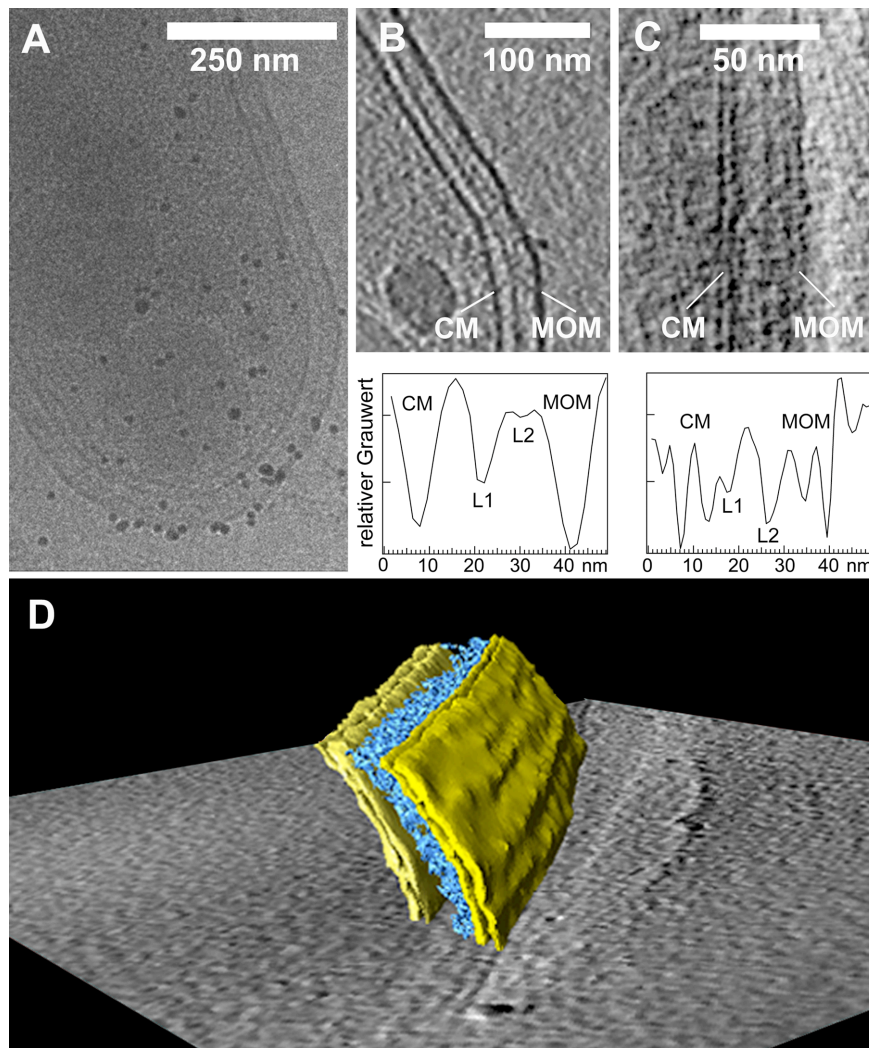


Abb. 1:
 Kryo-Elektronentomographie von *M. bovis* BCG.
 A, Originalprojektion,
 B,C, x-y-Schnitte aus Tomogrammen mit Dichteprofilen der Zellhülle. CM: Plasmamembran, MOM: mykobakterielle äußere Membran, L1, L2: periplasmatische Schichten.
 D, 3D-Rekonstruktion der Zellhülle.

Gründe hierfür sind die Zelldicke, die wegen Strahlenschädigung begrenzte Anzahl der Projektionen und Fokusbedingungen, die ausreichenden Bildkontrast erzeugen. Durch geschicktes Anpassen der EM-Einstellungen und durch Nutzung der vollen Information im Tomogramm konnten wir die Zellhüllenstruktur weiter auflösen. Im x-y-Schnitt und im gemittelten Dichteprofil (Abb. 1C) zeigen sich nun die Doppelschichten der Plasmamembran und erstmals auch der mykobakteriellen äußeren Membran. Sie ist mit 7–8 nm dünner als bisher angenommen.

Weil die 3D-Rekonstruktion der Membranstruktur noch kein Standardverfahren der Kryo-Elektronentomographie ist, haben wir die Ergebnisse mit Schnitten vitrifizierter Proben überprüft, die wir durch Kryo-Ultramikrotomie^[6] herstellten. Wegen der im Vergleich zu intakten Zellen stark reduzierten Probendicke (35 nm) erreicht man eine höhere Erkennbarkeit struktureller Details im EM-Bild. Die Kryo-Schnitte bestätigten die Existenz und Struktur der

äußeren Membran von *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG (Abb. 2 A, B). Der identische Kontrast der beiden Kopfgruppenregionen der äußeren Membran deutet darauf hin, dass sie eine ähnliche Massenverteilung aufweisen. Der Befund spricht gegen eine strenge Anordnung extrahierbarer Lipide ausschließlich in der äußeren Membranschicht. Die fehlende morphologische Asymmetrie unterscheidet die mykobakterielle äußere Membran klar von der Gram-negativer Bakterien.

Mykolsäuren als unverzichtbarer Bestandteil der äußeren Membran

Um den Beitrag der Mykolsäuren zur äußeren Membran zu untersuchen, ist eine Mykolsäurefreie Mutante hilfreich. Dieser "Knockout" wirkt bei Mykobakterien letal, doch bleiben entsprechende Mutanten der verwandten Corynebakterien lebensfähig. An vitrifizierten Ultradünnschnitten von *Corynebacterium glutamicum* konnten wir ebenfalls die Struktur einer äußeren Membran nachweisen und zeigen, dass der

Zellwand der Mykolsäure-freien Mutante die Doppelschicht fehlt und die Zellhülle um 5–8 nm dünner ausfällt (Abb. 2 C, D). Dieses Ergebnis legt nahe, dass Mykolsäuren für die Stabilität der äußeren Membran unverzichtbar sind und sie nicht ausschließlich aus freien Lipiden aufgebaut werden kann.

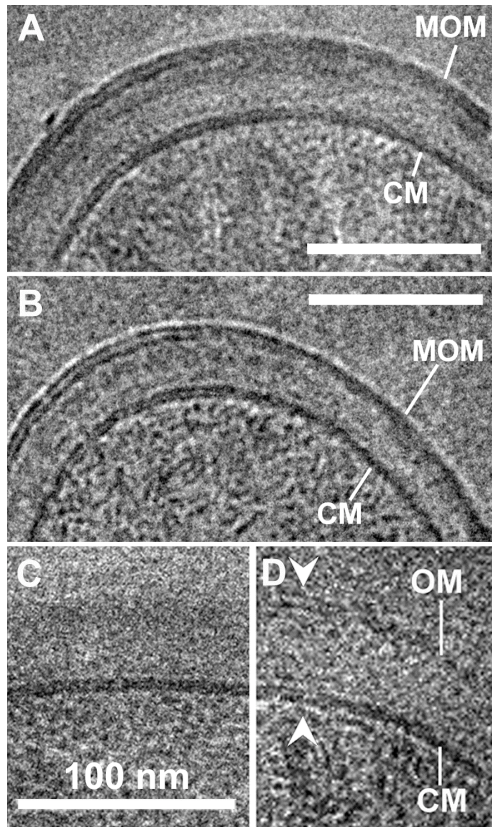


Abb. 2: Vitrifizierte Ultradünnschnitte von **A**, *M. smegmatis*, **B**, *M. bovis* BCG, **C**, Mykolsäure-freie Mutante von *C. glutamicum*, **D**, Wildtyp mit OM: äußerer Membran.

Die periplasmatischen Schichten sind ähnlich wie bei Mykobakterien in Domänen organisiert, die man so noch nicht beobachtet hatte (Abb. 2). Ihre Zuordnung zu bekannten Bestandteilen der Zellwand bleibt zu untersuchen.

Modelle der mykobakteriellen äußeren Membran

Es sind wesentliche Änderungen notwendig, um das geltende Modell mit unseren Ergebnissen in Einklang zu bringen. Die morphologische Symmetrie lässt sich durch Verteilung extrahierbarer Lipide auf beide Hälften der äußeren Membran erklären. Schwieriger ist die geringere Dicke der Membran zu verstehen, denn Röntgenstruktur-Analysen zufolge sind die Mykolsäuren in

gestreckter Anordnung dicht gepackt^[7]. Sollte diese Konformation zutreffen, so bleiben zwei theoretische Möglichkeiten: Entweder durchspannen die Meromykolate, die lange C-Kette der Mykolsäuren, den hydrophoben Bereich komplett, oder nur das verlängerte Ende der Meromykolate trägt zur inneren Schicht bei, während sich der Rest unter der Membran befindet (Abb. 3). Die kovalent gebundenen Mykolsäuren "verankern" dann die äußere Membran. Beide Vorstellungen stehen mit der Struktur des Porins MspA im Einklang.

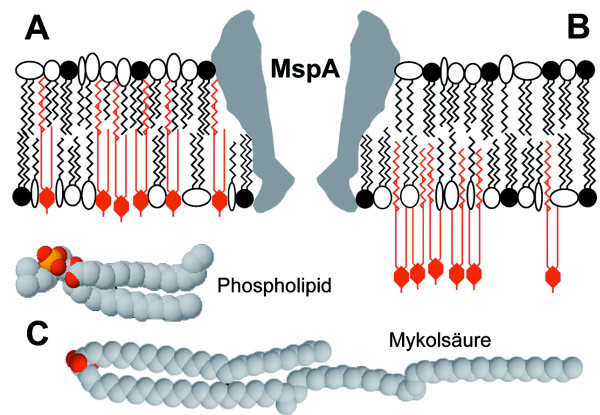


Abb. 3 A, B: Modelle der mykobakteriellen äußeren Membran. **C**, Lipide im Vergleich.

Der Nachweis einer mykobakteriellen äußeren Membran lässt nach der Existenz periplasmatischer und weiterer Membranproteine fragen, die den Stoffaustausch über die Zellwand vermitteln. Genomvergleiche liefern keine Ähnlichkeiten mit Proteinen der Gram-negativen Bakterien. Da auch das Porenprotein MspA als Oktamer eine bisher einzigartige Struktur aufweist, ist zu erwarten, dass bei einer gezielten Suche weitere neue Membranproteine zu entdecken sind. Sie dürften für das Verständnis mykobakterieller Transportwege, insbesondere für antibiotische Substanzen bei *M. tuberculosis* von Bedeutung sein.

Danksagung

Wir danken unseren Kollegen für ihre Hilfe und für die Förderung im Network of Excellence for Wir danken unseren Kollegen für ihre Hilfe und für die Förderung im Network of Excellence for 3D Electron Microscopy des 6. Rahmenprogramms der EU.

Literatur

- [1] Brennan, P. J., Nikaido, H. (1995): The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
- [2] Minnikin, D. (1982): Complex lipids: their chemistry, biosynthesis, and roles. In: Tatledge, C. and Standford, J. (Hrsg.) *The Biology of Mycobacteria*. Academic Press, London, Vol. 1, 94-184.
- [3] Faller, M., Niederweis, M., Schulz, G. E. (2004): The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* 303: 1189-1192.
- [4] Plitzko, J. M., Engelhardt, H. (2003): Zelluläre Kryo-Elektronenmikroskopie – Weg zur strukturellen Proteom- und Interaktionsanalyse. *Biospektrum* 9: 484-485.
- [5] Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., Engelhardt, H. (2008): Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3963-3967.
- [6] Al-Amoudi, A., Chang, J. J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L. M., Norlén, L. P. O., Richter, K., Sartori Blanc, N., Studer, D., Dubuchet, J. (2004): Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J.* 23: 3583-3588.
- [7] Nikaido, H., Kim, S.-H., Rosenberg, E.Y. (1993): Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol. Microbiol.* 8: 1025-1030.