

1 Einleitung

1.1 Das Bakterium *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das in die Gruppe der α -Proteobakterien eingeordnet wird. Im Gegensatz zu vielen α -Proteobakterien, die parasitisch bzw. endosymbiontisch leben, findet man *C. crescentus* vor allem in nährstoffarmen Gewässern. In diesem Habitat zählt *C. crescentus* zu den am häufigsten vorkommenden nicht-pathogenen Mikroorganismen (Poindexter, 1964). Die im Moment engste phylogenetische Beziehung besteht zu dem α -Proteobakterium *Rickettsia prowazekii*, dem Erreger des Fleckfiebers. Unter den γ -Proteobakterien besitzt *P. aeruginosa* die größte Übereinstimmung zu *C. crescentus* (Niermann *et al.*, 2001).

Caulobacter crescentus zeichnet sich durch eine asymmetrische Zellteilung und einen dreiphasigen Zellzyklus aus und wird diesbezüglich als Modellorganismus für Differenzierungsstudien gesehen (Shapiro *et al.*, 2002; McAdams und Shapiro 2003). Pro Zyklus entstehen zwei Zelltypen, die sich in ihrer Morphologie, Beweglichkeit und der Fähigkeit einen neuen Zellzyklus einzuleiten, unterscheiden (Ireland *et al.*, 2002). Die frei schwimmende Tochterzelle trägt an einem Zellpol ein Flagellum und mehrere Pili. In diesem motilen Stadium kann die „Schwärmerzelle“ mit Hilfe eines chemokinetischen Apparates eine gezielte Bewegung auf neue, nährstoffreiche Regionen entlang eines Konzentrationsgradienten ausüben. Nach Freisetzung des Flagellums der „Schwärmerzelle“ bildet sich am selben Zellpol der Stiel („stalk“) der sessilen Zelle aus und es kann zur DNA-Replikation und Zellteilung kommen. Für den Eintritt in den Zellzyklus müssen die essentiellen Zellzyklusprozesse wie die Replikation des Chromosoms, die DNA-Methylierung und Zellteilung, sowie die dazu gehörenden morphologischen Änderungen reguliert werden (Phadke *et al.*, 2001). Neben der planktonischen Lebensform der „Schwärmerzelle“ findet man *Caulobacter crescentus* auch als Bestandteil von Biofilmen. Die Möglichkeit zur Biofilmbildung verdankt das Bakterium seinem Stiel. Er stellt eine zylindrische Extension der Zellwand dar, an dessen Spitze sich eine Art Flaschenhals

(„holdfast“) befindet, der die Anheftung an abiotische oder biotische Oberflächen vermittelt (Smith *et al.*, 2002). Der Stoffwechsel und die Substrataufnahme sind im Gegensatz zum Zellzyklus bei *C. crescentus* noch kaum untersucht.

Caulobacter crescentus ist ein obligat aerobes, heterotrophes Bakterium, das verschiedene Kohlenstoffquellen nutzen kann (Poindexter, J. S., 1964). Es ist das erste freilebende α -Proteobakterium, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Es besteht aus einem zirkulären Chromosom mit 4,016,942 bp, die für 3,767 Gene codieren und einen G/C-Gehalt von 67,2 % besitzt. Bei *C. crescentus* findet man eine enorm hohe Anzahl TonB-abhängiger äußerer Membranrezeptoren sowie sehr viele Proteine mit einem Molekulargewicht über 70 kDa (Niermann *et al.*, 2001; Agabian und Unger, 1978). In der Genomsequenz werden bis zu 67 TonB-abhängige Membranrezeptoren vorhergesagt (Neugebauer *et al.*, 2005); die damit eine der größten Proteinfamilien in diesem Organismus darstellen (Niermann *et al.*, 2001). Dagegen werden keine homologen Proteine des in *E. coli* vorkommenden Porintyps LamB, OmpF, OmpX, OmpG, OmpC, PhoE und Tsx vorhergesagt (Phadke *et al.*, 2001). In der großen Anzahl TonB-abhängiger Membranrezeptoren kann ein Ersatz der klassischen Porine, die eine Diffusion von Nährstoffen erlauben, gesehen werden (Ireland *et al.*, 2002). Homologievergleiche zu klassischen TonB-abhängigen Rezeptoren zeigen nur eine geringe Übereinstimmung.

1.2 Nährstoffaufnahme bei Bakterien

Um Nährstoffe und Substrate aufnehmen zu können, müssen diese zuerst die bakterielle Zellhülle passieren. Morphologisch unterscheidet sich die Zellhülle Gram-negativer Bakterien gegenüber Gram-positiven Bakterien in dem Fehlen einer dicken Mureinschicht und in dem Vorhandensein einer zweiten äußeren Membran. Diese ähnelt der Cytoplasmamembran (CM), ist jedoch anders zusammengesetzt und besteht aus Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS). Die Proteine können über einen Lipidanker in der

Membran fixiert sein oder einfach in die Membran eingebettet sein (Nikaido, 1996A). Sie dienen der Zellhüllenstabilisierung, der Proteintranslokation, der Signaltransduktion und dem Export von antimikrobiellen Stoffen. Sie können enzymatische Aktivität besitzen und den Transport von Nährstoffen und Substraten vermitteln (Buchanan, 1999; Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000). Nährstoffe und Substrate müssen daher bei Gram-negativen Bakterien erst die äußere Membran, das Periplasma und zuletzt noch die CM überwinden, um in das Zellinnere zu gelangen. Um daher überhaupt Substrate aufnehmen zu können, gibt es sowohl für die äußere Membran, als auch für die Cytoplasmamembran verschiedene Durchtritts - bzw. Transportmöglichkeiten. Für diesen Stoffaustausch gibt es die klassische Einteilung in einfache Diffusion, erleichterte Diffusion sowie den aktiven Transport von Substraten.

1.2.1 Einfache Diffusion

Das unspezifische Eindringen von Stoffen in die Zelle entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand wird als einfache oder passive Diffusion bezeichnet (Delcour, 2003). Die Aufnahmegeschwindigkeit ist sehr gering und es kann zu keiner Substratanhäufung im Zellinneren kommen. Verantwortlich für den passiven Substrattransport sind integrale Membranproteine in der äußeren Membran, die als Porine bezeichnet werden. Sie bilden einen „offenen“ Kanal, durch den hydrophile Moleküle, die kleiner als 600 Dalton sind, in die Zelle diffundieren können (Nikaido, 1994). Diese unspezifische Proteinklasse umfasst in *E. coli* die Proteine OmpF, OmpC und PhoE (Nikaido, 1996A). Porine bestehen aus Trimeren, wobei jedes Monomer einen eigenen wassergefüllten Kanal bildet (Klebba und Newton, 1998; Schirmer, 1997). Antiparallele β -Faltblätter bilden die tonnenartige Struktur der Kanäle mit einer Verengung in der Mitte. Extrazelluläre Schleifen („loops“) stülpen sich nach außen und vergrößern die Oberfläche der Porine. Loop 3 faltet sich in das Innere der Porine zurück, wodurch die Kanalverengung gebildet wird und reguliert die Durchlässigkeit der Porine (Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000; Cowan *et al.*, 1992). Intrazelluläre Schleifen („turns“) verbinden

die β -Faltblätter auf der periplasmatischen Seite (Schirmer, 1997). Geladene Aminosäurereste in der zentralen Kanalverengung verhindern über elektrostatische Kräfte den Durchtritt lipophiler Moleküle (Nikaido, 1994).

1.2.2 Erleichterte Diffusion

Wie bei der passiven Diffusion kann auch bei der erleichterten Diffusion ein Substrat nicht gegen seinen Konzentrationsgradienten in der Zelle angehäuft werden. Die Transportgeschwindigkeit ist von der Substratkonzentration im Medium abhängig und verläuft ohne Energieverbrauch. Für die Aufnahme sind spezifische Porine verantwortlich, die ebenfalls Trimere bilden, jedoch eine hohe Affinität zu ihrem jeweiligen Substrat besitzen. Bei einer geringen Nährstoffkonzentration im Medium erhöht die spezifische reversible Bindung eines Substrats an das Porin dessen Aufnahme. Ein Beispiel für die erleichterte Diffusion ist die Aufnahme von Maltose bei dem Gram-negativen Bakterium *E. coli*. Hier werden Maltose und Maltodextrine durch erleichterte Diffusion über den Membranrezeptor LamB in die Zelle aufgenommen (Benz, 1994). LamB besteht aus 18 antiparallelen β -Faltblättern und bildet eine Tonnenstruktur in der äußeren Membran. Auch hier wird die Durchlässigkeit über extrazelluläre Loops, die sich in das Innere des β -Barrels zurückfalten, reguliert (Schirmer *et al.*, 1995; Schirmer, 1997; Braun *et al.*, 2001). Im Zentrum der Kanalverjüngung befindet sich die Substratbindestelle (Dutzler *et al.*, 1996), an der eine Abfolge von 6 aromatischen Aminosäureresten eine Kette entlang der Längsachse des β -Barrels bilden und als „greasy slide“ bezeichnet werden. Sie dienen der Substratbindung und -weiterleitung, wobei die Maltodextrine am distalen Ende der „greasy slide“ gebunden werden und durch den Kanal zum periplasmatischen Ende konzentrationsabhängig diffundieren (Van Gelder *et al.*, 2002). Ebenfalls über erleichterte Diffusion werden Nukleoside über das spezifische Phagen T6-Rezeptorporin Tsx aufgenommen (Schneider *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1988; Fsihi *et al.*, 1993), während Sucrose über das Plasmid codierte spezifische ScrY-Porin aufgenommen wird (Hardesty *et al.*, 1991; Koebnik *et al.*, 2000).

1.2.3 Aktiver Transport

Bei dem aktiven Transport können Substrate entgegen ihres Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch in der Zelle angehäuft werden. Vor allem essentielle Nährstoffe mit einem Molekulargewicht über 600 Dalton oder stark hydrophobe Substanzen können so aufgenommen werden. Die für den Transport verantwortlichen äußeren Rezeptorproteine besitzen eine sehr hohe Affinität für ihr jeweiliges Substrat. Dieser aktive, energieabhängige Transport wurde bisher sehr gut für die Eisen und Vitamin B₁₂-Aufnahme in *E. coli* untersucht und wird durch TonB-abhängige Membranrezeptoren vermittelt.

1.3 Energie-Transduktionskomplexe

Für den Transport diverser Stoffe durch die Cytoplasmamembran ist das Protonenpotential die treibende Energie. Dieses Potential wird durch das ständige Hinauspumpen von Protonen und anderen Ionen aus der Zelle aufrechterhalten. Da die äußere Membran aufgrund der Porine für Ionen durchlässig ist, ist sie für die Ladungstrennung ungeeignet. Um dennoch Substrate aktiv über die äußere Membran in die Zelle aufnehmen zu können, nutzen Gram-negative Bakterien die protonenmotorische Kraft der CM (Postle und Kadner, 2003). Bisher wurden in *E. coli* zwei Proteinsysteme nachgewiesen, welche die Energie des elektrochemischen Gradienten der CM für den energieabhängigen Transport von Substraten über die äußere Membran nutzen. Dabei handelt es sich zum einen um das Tol/Pal-System mit den Proteinen TolQ, TolR, TolA, TolB und Pal sowie um das TonB-ExbB/D-System, welches sich aus den Proteinen TonB, ExbB und ExbD zusammensetzt. Das Tol/Pal-System ist in vielen Gram-negativen Bakterien vorhanden (Sturgis, 2001) und für den Import von Colicinen der A-Gruppe sowie für den Zusammenbau von Zellhüllenkomponenten verantwortlich (Braun, 1994; Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000; Cascales *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Stabilität der Zellhülle eng mit dem Tol/Pal-System verbunden (Bernadac *et al.*, 1998;

Cascales *et al.*, 2002). Die Proteine TolQ, TolR und TolA sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert. TolB befindet sich im Periplasma und das Pal-Protein ist in der äußeren Membran verankert und reicht in das Periplasma hinein. TolQ und TolR nutzen das elektrochemische Potential der Cytoplasmamembran und energetisieren TolA, welches die Energie für energieabhängige Prozesse an der äußeren Membran zu Verfügung stellt (Cascales *et al.*, 2001). Die Proteine des Flagellenmotors MotA und MotB zeigen funktionelle Homologien zu der Transmembrandomäne von TolQ und TolR. Sie befinden sich am basalen Ende des in der Cytoplasmamembran verankerten Flagellums (Cascales *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Proteine den Stator des Flagellenmotors bilden (Zhou *et al.*, 1998a) und der Protonengradient auch hier von MotA und MotB genutzt wird, um ein Drehmoment im Motor der Geißel zu erzeugen (Braun *et al.*, 1999).

Der zweite Energietransduktionskomplex ist das TonB-ExbB/D-System, welches für den energieabhängigen Transport von Eisensiderophoren und Vitamin B₁₂ in die Zelle verantwortlich ist. Zudem ist es für die Aufnahme von Colicinen der B-Gruppe und der rezeptorvermittelten Infektion einiger Bakteriophagen notwendig (Lazdunski *et al.*, 1998; Braun, 1994). ExbB und ExbD sind in der Cytoplasmamembran verankert, wobei ein großer Teil des ExbD-Proteins in das Periplasma hineinragt (Kampfenkel und Braun, 1993; Kampfenkel und Braun, 1992). Auch die beiden Proteine ExbB/D zeigen eine Homologie zu den Proteinen des Flagellenmotors MotA/B (Zhai *et al.*, 2003). TonB ist über seinen N-Terminus in der CM verankert und erstreckt sich ins Periplasma. Über seinen C-Terminus kann es mit der TonB-Box der äußeren Membranrezeptoren in Wechselwirkung treten (Kadner, 1990; Postle, 1993; Pawelek *et al.*, 2006; Shultis *et al.*, 2006). Dafür ist eine korrekte Faltung des C-Terminus nötig, welche vermutlich über die Proteine ExbB/D kontrolliert wird (Larson *et al.*, 2007). Die Bindung von TonB an äußere Membrantransporter wurde genetisch durch Suppressionsanalysen (Braun, 1994) und chemisch durch Formaldehydvernetzung (Moeck *et al.*, 1997) sowie durch die *in vivo* Bildung von Disulfidbrücken (Cadieux *et al.*, 1999; Ogierman und Braun, 2003) gezeigt. In vielen Gram-negativen Bakterien finden sich homologe TonB- und

ExbB/D-Proteine (Moeck und Coulton, 1998; Larson *et al.*, 1996). Die Funktion von TonB ist für die Energetisierung der äußeren Membran essentiell, während die Funktionen von ExbB und ExbD teilweise durch TolQ und TolR ersetzt werden können (Braun und Herrmann, 1993). Der genaue Mechanismus der Energieübertragung von der Cytoplasmamembran auf die Membranrezeptoren ist noch nicht vollständig untersucht. Zwei Modelle werden aktuell diskutiert: das „Propeller-Modell“ und das „Shuttle-Modell“. Im ersten Modell bleibt das TonB-Protein an die CM gebunden, während sich der C-Terminus, angetrieben durch ExbB/D und der Protonenkraft, wie ein Propeller dreht und schließlich an den Rezeptor der äußeren Membran binden kann (Chang *et al.*, 2001). Das zweite Modell setzt die komplette Dissoziation des TonB-Proteins von der Cytoplasmamembran voraus (Peacock *et al.*, 2007; Postle und Kadner, 2003; Larson *et al.*, 2003). Hier ist das nicht energetisierte TonB-Protein an den ExbB/D-Komplex in der Cytoplasmamembran gebunden. Die Energie aus dem Protonenpotential wird über die Proteine ExbB/D auf das TonB-Protein übertragen. Das energetisierte TonB-Protein kann mit seinem C-Terminus mit dem Rezeptor der äußeren Membran interagieren und diesen durch eine weitere Konformationsänderung in eine energetisierte Form überführen, wodurch das gebundene Substrat vom Rezeptor freigelassen werden kann (Moeck und Coulton, 1998). Die eigentliche Energieübertragung zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran geschieht durch eine Reihe von Konformationsänderungen des Proteins TonB (Letain und Postle, 1997). Die Konformation des energetisierten TonB's unterscheidet sich von dem unenergetisierten Zustand des Proteins. Die Konformationsänderungen des TonB-Proteins hängen vermutlich von der protonenmotorischen Kraft der Cytoplasmamembran ab (Larsen *et al.*, 1999). Erst nach dem Erreichen des Rezeptors wird das Protein TonB aus der CM freigesetzt. Nach der Energieübertragung auf den Rezeptor kann das TonB-Protein wieder in die Cytoplasmamembran integrieren (Postle und Kadner, 2003). TonB-abhängige Rezeptoren Gram-negativer Bakterien befinden sich in der äußeren Membran und sind mit Hilfe des TonB-ExbB/D-Systems für den Transport von Substraten in die Zelle verantwortlich. Der Aufbau dieser hochaffinen Transportproteine

wurde über Röntgenstrukturanalysen bestimmt. Sie durchspannen die äußere Membran mit einer Barrel-Domäne, die aus 22 antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird und damit einen Kanal in der Membran bilden. Von der periplasmatischen Seite stülpt sich der N-Terminus des β -Barrels zurück und bildet die Korkdomäne, die den Kanal verschließt (Ferguson und Deisenhofer, 2004; Schalk *et al.*, 2004; Wiener 2005; Ferguson *et al.*, 1998B; 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999; Chimento *et al.*, 2003). Bislang sind TonB-abhängige, energiegekoppelte Transportsysteme bei *E. coli* und anderen γ -Proteobakterien nur für die Eisen und Vitamin B₁₂-Versorgung nachgewiesen worden. Eisen muss aufgrund seiner Unlöslichkeit mit Hilfe von Siderophorkomplexen, Häm, Hämoglobin, Hämopexin, Myoglobin, Transferrin und Lactoferrin in die Zelle aufgenommen werden (Braun *et al.*, 1998; 2002; Andrews *et al.*, 2003; Postle und Kadner, 2003). Für eine diffusionskontrollierte Aufnahme sind Eisenkomplexbindungen zu groß und liegen in zu geringer Konzentration vor, wodurch eine ausreichende Eisenversorgung der Zellen nicht gewährleistet wäre (Ferguson *et al.*, 1998). Daher werden Eisenkomplexbindungen an der Zelloberfläche über hochaffine Rezeptorproteine gebunden und aktiv mittels Energieverbrauch auch entgegen des Konzentrationsgradienten durch die äußere Membran in das Periplasma transportiert. Von dort wird das Eisen oder die Eisensiderophorkomplexe über ABC-Transporter durch die CM in das Innere der Zelle transportiert. Die K_M -Werte für den aktiven Transport durch die äußere Membran liegen im nanomolaren Bereich (Newton *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003). Bei *E. coli* sind bisher sieben TonB-abhängige Rezeptoren für die Eisen(III)-Siderophorkomplex-Aufnahme beschrieben worden. Die Rezeptoren FhuA, FhuE und IutA binden die Hydroxamat-Siderophore Ferrichrom, Coprogen und Rhodotorulasäure bzw. das von *E. coli* selbst gebildete Aerobactin (Fecker und Braun, 1983; Sauer *et al.*, 1987; Krone *et al.*, 1985). Das zu den Catecholat-Siderophoren gehörende, ebenfalls von *E. coli* synthetisierte Enterobactin wird von dem Rezeptorprotein FepA aufgenommen (Lundrigan und Kadner, 1986). Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure, zwei Vorstufen der Enterochelin-Synthese, werden über die Rezeptoren FiuA und CirA transportiert

(Nau und Konisky, 1989). Für die Aufnahme von Eisencitrat, ein Siderophor des Hydroxycarboxylat-Typs, dient der TonB-abhängige Rezeptor FecA (Pressler *et al.*, 1988). Im Rahmen der Genomsequenzierung von *E. coli* konnte mit YncD mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein mit bisher unbekannter Substratspezifität identifiziert werden (Blattner *et al.*, 1997). Außerdem wurden homologe Proteine des Häm-Rezeptors HemR von *Yersinia enterocolitica* in *E. coli* gefunden. Ein weiteres, TonB-abhängiges äußeres Rezeptorprotein in *E. coli* ist BtuB, welches für den Vitamin B₁₂-Transport verantwortlich ist (Bassford *et al.*, 1976; Heller und Kadner, 1985). Durch die Bestimmung der Kristallstrukturen der Rezeptoren FhuA, FecA, FepA und BtuB (Ferguson *et al.*, 1998B, 2001, 2002; Locher *et al.*, 1998; Chimento *et al.*, 2003) wurden Studien zur Aufklärung der Transportmechanismen ermöglicht. Einige dieser Membrantransporter dienen zusätzlich als Bindestelle und Eintrittspforte für Bakteriophagen (Luria und Delbrück, 1943; Matsushiro, 1963) und Colicine (Lazdunski *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu *E. coli* und *P. aeruginosa* sind in anderen Bakterienarten TonB-abhängige Rezeptoren bzw. Transportprozesse wenig charakterisiert. Die fortschreitende Sequenzierung der Bakteriengenome bestätigt allerdings, dass TonB-abhängige Transportsysteme weit verbreitet sind und oft in einer hohen Anzahl in den jeweiligen Bakterienarten zu finden sind.

1.4 TonB-abhängige Rezeptoren bei *C. crescentus*

Seit 2001 ist das Genom von *Caulobacter crescentus* CB15 durch das Institute for Genome Research in Rockville, MD, USA komplett sequenziert. Mit einer vorhergesagten Anzahl von 67 TonB-abhängigen Rezeptoren der äußeren Membran besitzt *C. crescentus* sehr viele TonB-abhängige Proteine. Nur in dem Genom von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* werden noch mehr TonB-abhängige Proteine vorhergesagt. Die Genomanalyse ergab hier eine vorhergesagte Anzahl von bis zu 72 TonB-abhängige- bzw. TonB-ähnliche Rezeptoren (Blanvillain *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* besitzt lediglich 34 TonB-abhängige Rezeptoren (Stover *et al.*, 2000; Niermann *et al.*, 2001) und