

1. Einleitung

1.1 Substrattransport bei Bakterien

Nährstoffe und Substrate gelangen durch Passieren der bakteriellen Zellhülle in das Innere der Bakterienzelle. Die Zellhülle unterscheidet sich bei den Gram-negativen Bakterien von den Gram-positiven Bakterien morphologisch durch eine verhältnismäßig dünne Mureinschicht und einer zweiten äußeren Membran, welche eine Lipid-Doppelschicht darstellt und aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut ist. In diese Phospholipid-doppelschicht sind Proteine eingelagert, die entweder in die Membran eingebettet sein können oder über einen Lipid-Anker in der Membran fixiert sind (Nikaido, 1996A). Diese Membranproteine spielen eine Rolle bei der Zellhüllenstabilisierung, der Proteintranslokation und dem Export von antimikrobiellen Substanzen. Sie können enzymatische Aktivität besitzen und sie sind verantwortlich für die Aufnahme von Nährstoffen und Substraten (Buchanan; 1999; Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000).

Für den Stoffaustausch durch zelluläre Membranen bzw. Membranproteinen gibt es die klassische Einteilung in Diffusion, erleichterte Diffusion und aktiven Transport.

Diffusion

Als Diffusion wird der Stofftransport entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand bezeichnet (Delcour, 2003). Bei diesem passiven Transport sind Membranproteine beteiligt, die einen „offenen“ Kanal in der äußeren Membran bilden, durch den hydrophile Moleküle kleiner als 600 Dalton in die Zelle diffundieren (Nikaido, 1994). Diese auch als unspezifische Porine bezeichnete Proteinklasse umfasst in *E. coli* die Proteine OmpF, OmpC und PhoE, die keine Substratspezifität aufweisen (Nikaido, 1996A). Porine bilden in der äußeren Membran Trimere, wobei jedes Monomer einen eigenen wassergefüllten Kanal darstellt (Klebba und Newton, 1998; Schirmer, 1998). Sie bestehen aus antiparallelen η -Faltblättern, die eine tonnenartige Proteinstruktur in der äußeren Membran ausbilden mit relativ weitem Eintritt und Ausgang und einer starken zentralen Verengung. Die Durchlässigkeit des Kanals wird durch extrazelluläre Schleifen („loops“) reguliert, die in das Innere des η -Barrels zurückfalten (Cowan *et al.*, 1992) und somit nur kleineren Molekülen den Durchfluss gewähren. Lipophile Moleküle werden am Durchtritt durch starke elektrostatische Kräfte gehindert, die von geladenen Aminosäurereste in der Region der Kanalverengung hervorgerufen werden.

Erleichterte Diffusion

Neben der reinen Diffusion durch unspezifische Porine können Substrate auch durch erleichterte Diffusion mit Hilfe spezifischer Porine über die äußere Membran aufgenommen werden. Diese Porine bilden ebenfalls Trimere, besitzen jedoch eine spezifische Affinität zu ihren Substraten. Bei geringen Nährstoffkonzentrationen wird somit die Aufnahme des Substrates durch eine spezifische reversible Bindung erhöht. So gelangen beispielsweise bei *E. coli* Maltose und Maltodextrine durch erleichterte Diffusion über den Membranrezeptor LamB in die Zelle (Benz, 1994). LamB besteht aus 18 antiparallelen η -Faltblättern und bildet in der äußeren Membran ebenfalls eine „Tonnenstruktur“ aus. Wie bei unspezifischen Porinen wird auch hier die Durchlässigkeit des Kanals durch extrazelluläre „loops“, die in das Innere des η -Barrels zurückfalten, reguliert (Schirmer *et al.* 1995; Schirmer, 1998; Braun *et al.*, 2001). Die Substratbindestelle von LamB befindet sich im Zentrum der Kanalverjüngung (Dutzler *et al.*, 1996). Dort bildet eine Abfolge von sechs aromatischen Aminosäureresten eine durchgehende Kette entlang der Längsachse des η -Barrels, die auch als „greasy slide“ bezeichnet wird und der Substratbindung und –weiterleitung dienen. Dabei werden die Maltodextrine am distalen extrazellulären Ende des „greasy slide“ gebunden und diffundieren anschließend durch den Kanal zum periplasmatischen Ende (Van Gelder *et al.*, 2002).

Das Phagen T6-Rezeptorprotein Tsx ist ein weiteres spezifisches Porin (Schneider *et al.*, 1993), durch welches Nukleoside durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangen (Maier *et al.*, 1988; Fsihi *et al.*, 1993).

Aktiver Transport

Essentielle Nährstoffe, deren Molekulargewicht über der Ausschlussgrenze der Porine liegt (ca. 600 Dalton) können nicht durch Diffusion in die Zelle gelangen, sondern müssen über hochaffine energieabhängige Transporter gegen einen Konzentrationsgradienten aufgenommen werden. Bei *E. coli* handelt es sich dabei ausschließlich um Eisen- und Vitamin B₁₂-Aufnahmesysteme. Der Transport stellt hier einen aktiven energieabhängigen Prozess durch sogenannte TonB-abhängige Membranrezeptoren dar.

1.2 Energie-Transduktionskomplexe

Da der Aufbau der äußeren Membran und die in ihr befindlichen Porine keine Ausbildung eines Protonengradienten über die Membran zulassen, müssen Gram-negativen Bakterien die protonenmotorische Kraft der Cytoplasmamembran nutzen, um Substrate aktiv über die äußere Membran in die Zelle aufnehmen zu können (Postle und Kadner, 2003). Bis jetzt wurden in *E. coli* zwei Proteinsysteme nachgewiesen, die die Energie des elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für energieverbrauchende Aufnahmeprozesse der äußeren Membran nutzbar machen.

Das Tol/Pal-System setzt sich aus den Proteinen TolQ, TolR und TolA zusammen, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, dem periplasmatischen Protein TolB und dem in der äußeren Membran verankerten und ins Periplasma reichende Pal-Protein. Diese Proteine können auf vielfältige Weise untereinander wechselwirken (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995). Die Proteine TolQ und TolR nutzen dabei die Energie des Protonengradienten der Cytoplasmamembran und energetisieren TolA, welches die Energie für energieabhängige Prozesse an der äußeren Membran zur Verfügung stellt (Cascales *et al.*, 2001). Das Tol/Pal-System, welches in vielen Gram-negativen Bakterien vorhanden ist (Sturgis, 2001), ist für den Import von Colicinen der A-Gruppe und für den Export von Zellhüllenkomponenten verantwortlich (Braun, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000, Cascales *et al.*, 2000). Außerdem stellt dieses System eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellstabilität der äußeren Membran dar (Bernadac *et al.*, 1998; Cascales *et al.*, 2002).

Homologiestudien zeigten, dass die Transmembrandomäne von TolQ und TolR strukturelle und funktionelle Homologien zu den Proteinen MotA und MotB des Flagellenmotors aufzeigen, welche am basalen Ende des in der Cytoplasmamembran verankerten Flagellums lokalisiert sind (Cascales *et al.*, 2001). Man vermutet, dass MotA und MotB den Stator des Flagellenmotors bilden (Zhou *et al.*, 1998a) und auch hier der Protonengradient der Cytoplasmamembran von MotA und MotB genutzt wird um ein Drehmoment im Motor zu erzeugen (Braun *et al.*, 1999).

Das zweite energietransportierende System ist das TonB/ExbBD-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 (Braun, 1995). Homologe TonB- und ExbBD-Proteine konnten in vielen Gram-negativen Bakterien gefunden werden (Moeck und Coulton, 1998; Larsen *et al.*, 1996). Die Proteine TonB, ExbB und ExbD bilden

einen strukturellen Energietransduktionskomplex in der Cytoplasmamembran. TonB, welches über seinen N-Terminus in der Cytoplasmamembran verankert ist erstreckt sich ins Periplasma und kann mit den Rezeptoren der äußeren Membran über deren sogenannte TonB-Box in Wechselwirkung treten (Kadner, 1990; Postle, 1993). Die Bindung von TonB an äußere Membrantransporter wurde genetisch durch Suppressionsanalysen (Braun, 1995) und chemisch durch Formaldehydvernetzung (Moeck *et al.*, 1997) und durch die *in vivo* Bildung von Disulfidbrücken (Cadieux *et al.*, 1999; Ogierman und Braun, 2003) gezeigt. ExbB stellt ein integrales Membranprotein der Cytoplasmamembran dar (Kampfenkel und Braun, 1993), wohingegen ExbD ebenfalls in der Cytoplasmamembran verankert ist, jedoch einen großen Proteinanteil im Periplasma aufweist (Kampfenkel und Braun, 1992). Die Funktion von TonB ist für die Energetisierung der Rezeptoren 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 völlig aufgeklärt. Ein Modell beschreibt die eigentliche Energieübertragung zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran durch eine Reihe von Konformationsänderungen des Proteins TonB (Letain und Postle, 1997). Dabei ändert sich vermutlich die Konformation von TonB in Abhängigkeit von der protonenmotorischen Kraft der Cytoplasmamembran. Das so energetisierte TonB ist dann in der Lage mit dem Rezeptor der äußeren Membran zu interagieren und diesen durch eine weitere Konformationsänderung in eine energetisierte Form zu überführen (Moeck und Coulton, 1998).

1.3 TonB-abhängige Rezeptoren

TonB-abhängige Rezeptoren sind in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien lokalisiert und für den aktiven Transport von Substraten mit Hilfe des TonB/ExbBD-Komplexes verantwortlich. Röntgenstrukturanalysen verschiedener TonB-abhängiger Rezeptoren zeigen einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau. Sie bestehen alle aus 22 antiparallelen η -Faltblättern, die eine Barrel-Domäne aufbauen und die äußere Membran durchspannen. Charakteristisch ist außerdem der sich von der periplasmatischen Seite her in den von der η -Barrel-Domäne gebildete Kanal zurückfaltende N-Terminus, der den Kanal verschließt und auch als Korkdomäne bezeichnet wird (Ferguson *et al.*, 1998B; 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999; Chimento *et al.*, 2003). Bislang sind TonB-abhängige Energie-gekoppelte Transportsysteme bei *E. coli* nur für die Eisen- und Vitamin B₁₂-

Aufnahme beschrieben 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). Man vermutet, dass eine diffusionskontrollierte Aufnahme über die äußere Membran aufgrund der geringen Konzentration und der Größe der Eisenkomplexverbindungen für die Eisenversorgung nicht ausreicht. Somit werden die Eisenkomplexverbindungen an der Zelloberfläche durch hochspezifische Rezeptorproteine gebunden und nach Bindung aktiv mittels Energieverbrauch durch die äußere Membran ins Periplasma transportiert. Von dort wird das Eisen oder die Eisensiderophorkomplexe durch ABC-Transporter über die Cytoplasmamembran in das Cytoplasma transportiert. Die K_M -Werte für den aktiven Transport durch die äußere Membran liegen im nanomolaren Bereich (Newton *et al.*, 1999). Bei *E. coli* sind bisher sieben TonB-abhängige Rezeptoren für Eisen(III)-Siderophorkomplexe beschrieben worden. Die Rezeptoren FhuA, FhuE und IutA binden die Hydroxamat-Siderophore Ferrichrom bzw. 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). Zwei Vorstufen der Enterochelin-Synthese, Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure werden auch 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 mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein YbiL mit Homologie zum Yersiniabactin-Rezeptor aus *Yersinia enterocolitica* identifiziert werden (Blattner *et al.*, 1997). Außerdem konnten homologe Proteine des Häm-Rezeptors HemR von *Yersinia enterocolitica* in *E. coli* gefunden werden. Ebenso in die Gruppe der unter Eisenmangel stark exprimierten Membranrezeptoren in *E. coli* gehört BtuB, wodurch Vitamin B₁₂ transportiert wird (Bassford *et al.*, 1976; Heller und Kadner, 1985). Die Kristallstrukturen der Rezeptoren FhuA, FecA, FepA und BtuB wurden bestimmt (Ferguson *et al.*, 1998B, 2001, 2002; Locher *et al.*, 1998; Chimento *et al.*, 2003), die Studien zur Aufklärung der Transportmechanismen ermöglichen. 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* sind in anderen Bakterienarten TonB-abhängige Rezeptoren bzw. Transportprozesse wenig charakterisiert. Die fortschreitende Sequenzierung der

Bakteriengenome bestätigt allerdings, dass TonB-abhängige Membranrezeptoren weit verbreitet sind und zum Teil in einer großen Anzahl in den jeweiligen Bakterienarten zu finden sind.

1.4 *Caulobacter crescentus* und seine TonB-abhängigen Rezeptoren

Caulobacter crescentus, ein in die α -Gruppe der Proteobakterien eingeordnetes, stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium lebt ausschließlich in nährstoffarmen Gewässern und stellt dort das am häufigsten zu findende nicht-pathogene Bakterium dar.

Charakteristisch für *C. crescentus* ist sein Differenzierungs- und Zellteilungssystem (Shapiro *et al.* 2002; McAdams und Shapiro 2003). Das Bakterium teilt sich stets asymmetrisch, wobei frei schwimmende Tochterzellen entstehen, die unterschiedliche Polstrukturen aufweisen. Im motilen Stadium ist die „Schwärmerzelle“ an einem Pol begeißelt, wodurch mit Hilfe des chemokinetischen Apparates eine gezielte Bewegung auf chemische Stoffe in Richtung des Konzentrationsgradienten möglich ist. Nach Freisetzung des Flagellums kann sich am selben Pol eine Art Stiel („stalk“) ausbilden, der in Nahrungsquellen ein Anheften an festen Oberflächen, wie z. B. Steinen ermöglicht. In diesem sessilen Stadium kommt es zur DNA-Replikation und Zellteilung. *Caulobacter crescentus* wird dadurch als Modellorganismus für Differenzierungsstudien gesehen.

Über Stoffwechseleigenschaften ist bei *C. crescentus* bislang noch wenig bekannt.

C. crescentus ist obligat aerob, heterotroph und in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zu nutzen (Poindexter, J. S., 1964). Im Vergleich zu anderen Organismen besitzt *C. crescentus* in der äußeren Membran eine Vielzahl von Proteinen, deren Molekulargewicht über 70 kDa liegt (Agabian und Unger, 1978). Interessanterweise weist dieser Organismus die bisher größte Anzahl an vorhergesagten TonB-abhängigen Membranrezeptoren auf. Die Genomsequenz von *C. crescentus* (Nierman *et al.*, 2001) sagt 65 TonB-abhängige Rezeptoren der äußeren Membran voraus, die damit die größte Proteinfamilie in diesem Organismus darstellen. Im Gegensatz dazu werden keine homologen Proteine des in *E. coli* vorkommenden Porin-Typs OmpF, LamB, OmpX, OmpG, OmpC, PhoE und Tsx vorhergesagt (Phadke *et al.*, 2001). Da *C. crescentus* somit kaum klassische Porine besitzt, welche die Diffusion von Nährstoffen erlauben könnte die große Anzahl TonB-abhängiger Rezeptoren als Kompensation dieser Porine gesehen werden (Ireland *et al.*, 2002). Die Homologie der 65 Rezeptoren zu den charakteristischen TonB-abhängigen Transportern ist jedoch gering.