

I Einleitung

Das Cytoplasma Gram-negativer Bakterien ist von einer Zellhülle umgeben, die aus mehreren Komponenten besteht. Neben der Cytoplasmamembran, auf die eine dünne Mureinschicht aufgelagert ist, besitzen Gram-negative Bakterien eine zweite, sogenannte äußere Membran, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht in die Proteine eingelagert sind. Die äußere Membran ermöglicht einen Schutz der Zelle gegen schädliche Agenzien, aber limitiert ebenso den Zugang von vielen Nährstoffen. Dabei geben Proteine die Permeabilität der äußeren Membran für hydrophile Komponenten vor, und können aufgrund ihres Aufnahmemechanismus in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden.

Substrataufnahme über die äußere Membran

Die erste Klasse an Proteinen der äußeren Membran, die allgemeinen Porine, bilden permanent offene wassergefüllte Kanäle, durch die hydrophile Substanzen mit einer Ausschlussgröße bis zu 600 Da frei entlang ihres Konzentrationsgradienten diffundieren können (Schirmer, 1998). In *E. coli* umfasst diese Proteinklasse die Proteine OmpF, OmpC und PhoE. Dabei wird PhoE nur unter Phosphatmangel exprimiert, so dass unter normalen Kulturbedingungen nur OmpF und OmpC in sehr großen Mengen gebildet werden (Nikaido, 1996). Die Porine bilden in der äußeren Membran Trimere, wobei jedes Monomer einen eigenen Kanal bildet (Schirmer, 1998). OmpF und PhoE von *E. coli* besitzen ein β -Barrel, das aus 16 antiparallelen β -Faltblattsträngen gebildet wird, die eine tonnenartige Struktur ausbilden. Der extrazelluläre Loop 3 faltet sich dabei in die Tonnenstruktur zurück, und bildet dort eine Verengungszone der Porine und limitiert somit die Passage durch den Kanal (Cowan *et al.*, 1992).

Über die spezifischen Porine erfolgt die Substrataufnahme durch erleichterte Diffusion, da die dafür verantwortlichen Proteine eine spezifische Affinität für ihre Substrate besitzen. Maltodextrine binden an das LamB Protein von *E. coli* (Schirmer, 1995), Sucrose bindet an das ScrY Protein von *Salmonella typhimurium* (Forst *et al.*, 1998) und Nucleoside und Desoxynucleoside interagieren mit dem Tsx Protein von *E. coli* (Fsihi, 1993). Die Diffusion über die äußere Membran erfolgt dabei ebenfalls entlang des Konzentrationsgefälles und verbraucht keine Energie, wird aber durch die spezifische Bindung des Substrates an das Protein beschleunigt. Die spezifischen Porine bilden ebenso Trimere, wobei die einzelnen Monomere etwas größer

im Vergleich zu den unspezifischen Porinen sind. LamB besteht aus 18 antiparallelen β -Faltblattsträngen, die einen Kanal bilden (Schirmer, 1995; Schirmer *et al.*, 1998). Dabei falten sich die Loops 1, 3, und ein Teil von Loop 6 in das Barrel und bilden dabei eine Einengung, die etwas schmaler (Durchmesser von 5-6 Å) als die Engstelle von OmpF ist (Schirmer *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 2001). LamB erleichtert die Diffusion von kleinen Maltodextrinen in die Zelle, und ist für die Aufnahme höhermolekularer Dextrine wie Maltotetraose und längerer Maltodextrine essentiell. Dabei haben die Maltodextrine unpolaren Kontakt mit sechs vor allem aromatischen Aminosäureresten, die eine sogenannte „greasy slide“ bilden, die den von LamB gebildeten Kanal durchzieht und zur Substratbindung und Weiterleitung dient (Van Gelder *et al.*, 2002). Das ScrY Protein von *Salmonella typhimurium* ermöglicht die Diffusion von Saccharose über die äußere Membran. Die Sequenz von ScrY weist eine hohe Homologie zu LamB auf und unterscheidet sich nur in wenigen wichtigen Aminosäureresten (Forst *et al.*, 1998). Das Tsx Protein hat eine essentielle Funktion bei der Aufnahme von Nucleosiden und Desoxynucleosiden bei Substratkonzentrationen im Medium unter 1 μ M (Fsihi *et al.*, 1993). Dabei binden die Substrate an die stereospezifischen Bindestellen des Tsx Proteins und diffundieren durch den vom Tsx Protein gebildeten Kanal (Maier *et al.*, 1988; Fsihi *et al.*, 1993). Obwohl diese Substrate auch über Porine aufgenommen werden, ist die Aufnahme über das Tsx Protein für eine ausreichende Versorgung der Zelle mit Nucleosiden und Desoxynucleosiden notwendig.

Neben der freien und der erleichterten Diffusion, werden Stoffe unter Verwendung von hochaffinen, energieabhängigen Transportsystemen entgegen eines Konzentrationsgradienten aufgenommen. Bei *E. coli* handelt es sich dabei im Wesentlichen um Eisen- und Vitamin B12 Aufnahmesysteme, die aus einem Rezeptorprotein in der äußeren Membran, einem periplasmatischen Bindeprotein und einem ABC Transporter in der Cytoplasmamembran bestehen. Die Energie für die Translokation über die äußere Membran liefert dabei der sogenannte Ton-Komplex, der in die Cytoplasmamembran integriert ist und aus den Proteinen TonB, ExbB und ExbD besteht (Braun, 1995).

Bedeutung und Transport von Eisen

Mit Ausnahme einiger Lactobacillen (Archibald, 1983) sind alle Organismen auf das Vorhandensein einer ausreichenden Konzentration an Eisenionen im Medium angewiesen. Eisen ist in der Lage zwischen zwei Oxidationsstufen als Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen reversibel zu wechseln und damit ein Redoxpotential von -300 mV bis +700 mV zu bilden (Braun *et al.*, 1998). Daher spielt es eine große Rolle als Co-faktor vieler Proteine in zentralen Stoffwechselprozessen wie z.B. dem Sauerstoff-Metabolismus, der Elektronentransportkette und der RNA-Synthese (Braun, 1997; Ferguson *et al.*, 2001B). Obwohl Eisen mit 4.5 % das am vierthäufigsten vorkommende Element in der Erdkruste darstellt, ist seine biologische Verfügbarkeit häufig stark begrenzt, da es unter Anwesenheit von Sauerstoff bei physiologischem pH nahezu unlösliche Eisen(III)-Hydroxy-Komplexe bildet. Die Konzentration freier Eisenionen liegt dabei in der Größenordnung von 10^{-18} M (Braun *et al.*, 1998). Bakterienzellen benötigen jedoch zum Wachstum etwa 10^5 bis 10^6 Eisenionen pro Zelle, von denen etwa 10 % in Eisen-Schwefel-Zentren und Hämgruppen nachgewiesen wurden, wobei die Lokalisation der restlichen Eisenionen noch nicht aufgeklärt werden konnte (Matzanke *et al.*, 1989; Braun *et al.*, 1998). Die Konzentration an Eisen im Medium, die für bakterielles Wachstum benötigt wird, beträgt ca. 10^{-7} M. Auch bei Infektionsprozessen stellt die Eisenversorgung für Mikroorganismen ein Problem dar, denn im menschlichen Körper ist Eisen an vorhandene extrazelluläre Komplexbildner wie Transferrin (Serum, Lymphe) und Laktotransferrin (sekretorische Flüssigkeiten) gebunden sowie in intrazellulären Eisendeports in Form von Hämoglobin, Ferritin und Hämosiderin, gespeichert. Die Fähigkeit pathogener Mikroorganismen Eisen innerhalb eines tierischen Wirtes nutzen zu können, stellt somit einen Virulenzfaktor dar.

Um Eisen in ausreichender Menge zu erhalten, haben Bakterien verschiedene Strategien entwickelt. Unter anaeroben Bedingungen liegt Eisen hauptsächlich als Fe^{2+} vor, welches löslich genug ist, um anaerobes bakterielles Wachstum zu ermöglichen. Dabei wird Fe^{2+} ohne Komplexbildner von den Zellen aufgenommen. In *E. coli* sind für die Aufnahme von Fe^{2+} die Proteine FeoA und FeoB verantwortlich (Kammler *et al.*, 1993). In saurem Milieu können säuretolerante Bakterien auch Fe^{3+} aufnehmen, da es bei pH 3 eine Löslichkeit von 10^{-8} M hat (Braun und Killmann, 1999). Alternativ bedienen sich Bakterien und Pilze niedermolekularer, eisenkomplexierender Substanzen, den sogenannten Siderophoren, welche Eisen

spezifisch und hochaffin komplexieren. Diese können anhand der chemischen Beschaffenheit der eisenbindenden Gruppen in drei verschiedene Strukturklassen aufgeteilt werden: Hydroxamate, Catecholate und Hydroxycarboxylate. Bakterien können dabei nicht nur die von ihnen selbst synthetisierten Eisen-Komplexbildner nutzen, sondern sind in der Lage, sowohl Siderophore von Pilzen als auch Eisenquellen tierischer Wirte aktiv aufzunehmen (Hantke und Braun, 2000). Die Eisen-Siderophor-Komplexe werden dabei über spezifische Rezeptorproteine in der äußeren Membran mit hoher Affinität gebunden und aktiv in das Periplasma transportiert. Von dort wird das Eisen als Siderophorkomplex mit geringerer Spezifität von periplasmatischen Bindeproteinen gebunden und über ABC-Transportsysteme ins Cytoplasma transportiert. Für *E. coli* K-12, der hinsichtlich molekularbiologischen, biochemischen und strukturellen Eigenschaften der Eisenaufnahme der am besten untersuchte Organismus ist, sind bisher sieben Aufnahmesysteme für Eisen(III)-Siderophorkomplexe beschrieben worden. Die Rezeptoren der äußeren Membran werden unter Eisenmangel verstärkt exprimiert (Chart *et al.*, 1986). Dabei wird Aerobactin über *lutA* (Krone *et al.*, 1985; Wooldridge *et al.*, 1992), Ferrichrom über *FhuA* (Braun und Wolff, 1973; Coulton *et al.*, 1983), Coprogen und Rhodotorulasäure über *FhuE* (Hantke, 1983), Eisendicitrat über *FecA* (Wagegg und Braun, 1981; Pressler *et al.*, 1988), Enterochelin über *FepA* (Lundrigan und Kadner, 1986), Dihydroxybenzoesäure über *Cir* (Nikaido und Rosenberg, 1990) und Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure über *Fiu* (Hantke, 1983; Nikaido und Rosenberg, 1990) ins Periplasma transportiert, wobei nur Aerobactin und Enterochelin von *E. coli* selbst synthetisiert werden. Neben den TonB-abhängigen Rezeptoren für die Siderophoraufnahme wird auch *BtuB*, der Rezeptor für Vitamin B12, unter Eisenmangel verstärkt exprimiert (Heller und Kadner, 1985).

Da Eisen in höheren Konzentrationen cytotoxisch wirkt, muss die Aufnahme von Eisen in die Zelle streng reguliert werden, weshalb die Expression der am Eisen-transport beteiligten Proteine eisenabhängig negativ reguliert wird. Verantwortlich dafür ist in *E. coli* das *Fur* Repressorprotein, welches bei ausreichender Konzentration an freiem Fe^{2+} in der Zelle durch dessen Bindung dimerisiert (Hantke und Braun, 2000). Der aktive Repressor bindet dann an eine Konsensus-Sequenzregion der DNA der sogenannten *Fur-Box*, die Bestandteil aller Promotoren von eisenregulierten Genen ist. Sie besteht aus dem Hexamer GATAAT, welches mindestens dreimal wiederholt wird (Escolar *et al.*, 1998; Hantke und Braun, 2000).

Eine Ausnahme bildet in *E. coli* das Fec-Aufnahmesystem, das neben den Transportgenen *fecABCDE* noch aus den regulatorischen Genen *fecI* und *fecR* besteht, die ebenfalls durch Fur reguliert werden. Dabei ist FecR ein in der Cytoplasmamembran verankerter, positiver Regulator, der durch Wechselwirkung mit dem N-Terminus des beladenen Rezeptors FecA aktiviert wird. FecR aktiviert dann den Sigmafaktor FecI im Cytoplasma, welcher für die Expression der *fec*-Transportgene verantwortlich ist (Enz *et al.*, 2000). In diesem Fall der positiven Regulation muss der Induktor Eisencitrat nicht in die Zelle gelangen, um für die Expression der *fec*-Transportgene zu sorgen. Die Induktion der Expression durch beladenes FecA ist ebenso wie der Transport von Eisencitrat TonB-abhängig (Enz *et al.*, 2000).

Das Fhu-System in *E. coli*

Ferrichrom, ein Siderophor des Hydroxamat-Typs, wird von *E. coli* über das Fhu-System (Ferric hydroxamat uptake) in die Zelle aufgenommen, welches in Abbildung 1 dargestellt ist. Ferrichrom wird von Pilzen der Gattung *Ustilago*, *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet und konnte erstmals 1952 von Neilands in Kulturen von *Ustilago sphaerogena* nachgewiesen werden (Braun und Winkelmann, 1987). Für den Transport von Ferrichrom über die äußere Membran wird der in der äußeren Membran eingelagerte Rezeptor FhuA benötigt. FhuA besitzt ein Molekulargewicht von 78992 Da und konnte bereits im Jahre 1973 isoliert und näher charakterisiert werden (Braun *et al.*, 1973; Braun und Wolff, 1973). Neben Ferrichrom nutzt auch das zu Ferrichrom strukturanaloge Antibiotikum Albomycin das FhuA-Protein als Rezeptor (Hartmann *et al.*, 1979). Außerdem gelangen über FhuA die Peptidantibiotika Microcin J25 (Salomón und Farías, 1993) und Microcin 24 (Braun *et al.*, 2002), das Rifamycinderivat CGP4832 (Wehrli *et al.*, 1987; Pugsley *et al.*, 1987) und das Bacteriocin Colicin M in die Zelle (Braun und Wolff, 1973). Daneben nutzen die Phagen T1, T5, λ 80 und UC-1 den Rezeptor FhuA, um die Zelle zu infizieren (Braun, 1995; Braun *et al.*, 1998).

Aufgrund seiner Multifunktionalität eignet sich FhuA hervorragend als Modellprotein für Untersuchungen zum aktiven Transport von Siderophoren, der Aufnahme von Bacteriocinen, sowie zur Untersuchung der molekularen Interaktion zwischen Bakteriophagen und Wirtszellen.

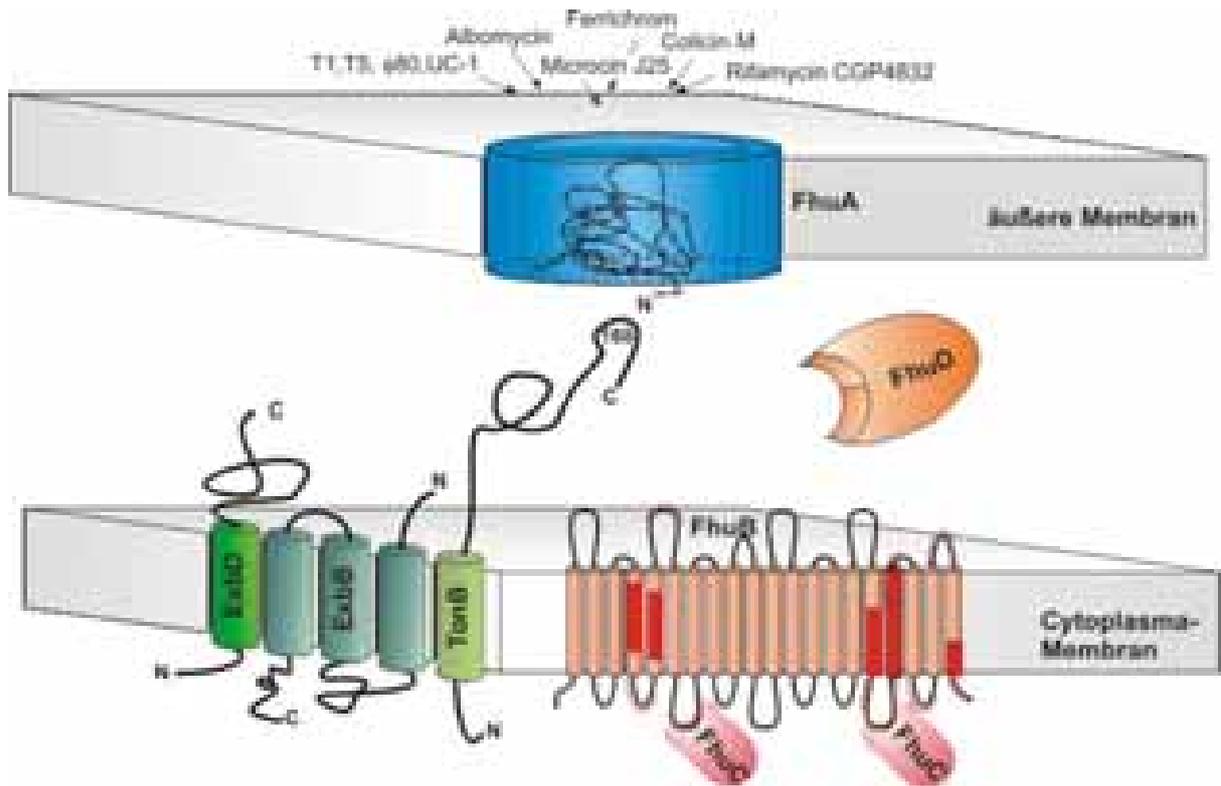


Abb. 1: Schematische Darstellung der Komponenten des Ferrichrom-Aufnahmesystems von *E. coli*. Die Liganden die FhuA als Rezeptor nutzen sind angegeben.

Ferrichrom wird aktiv unter Energieverbrauch von FhuA über die äußere Membran transportiert. Da die äußere Membran keinen elektrochemischen Gradienten besitzt, der für eine Energiegewinnung genutzt werden kann, muss ein Energiekoppler zwischen Cytoplasmamembran und der äußeren Membran vorhanden sein. Diese Aufgabe wird von den Proteinen TonB, ExbB und ExbD übernommen. Eine Schlüsselrolle bei der Energieübertragung von der Cytoplasmamembran zur äußeren Membran kommt dabei dem hauptsächlich im Periplasma lokalisierten TonB-Protein zu, das wie ExbD über den Aminoterminus in der Cytoplasmamembran verankert ist (Kampfenkel und Braun, 1992; Postle und Skare, 1988). Bei ExbB handelt es sich um ein integrales Membranprotein, bei dem drei Membrandurchgänge nachgewiesen werden konnten, dabei befindet sich der größte Teil von ExbB im Cytoplasma (Kampfenkel und Braun, 1993). Es wird angenommen, dass angetrieben durch den Protonengradienten der Cytoplasmamembran, TonB den Rezeptor FhuA in einen energetisierten Zustand überführt und in Folge dessen ein Kanal gebildet wird, durch den der Transport von Ferrichrom ins Periplasma erfolgt (Postle und Kadner, 2003). Der Aufnahmemodus mit Hilfe der Proteine TonB,

ExbB und ExbD ist insofern einmalig, als dass er nur für Eisen-Siderophorkomplexe und Vitamin B12 beschrieben wurde. Neben Ferrichrom benötigen alle über FhuA in die *E. coli* Zelle aufgenommenen Liganden die Mitwirkung des Ton-Systems, mit Ausnahme des Phagen T5, der auch *tonB* Mutanten infizieren kann (Hancock und Braun, 1976; Braun *et al.*, 1998). Die Quantifizierung von TonB, ExbB und ExbD ergab ein ungefähres Verhältnis von 1:7:2 (Higgs *et al.*, 2002).

Die Kristallstruktur eines C-terminalen periplasmatischen Fragments (Aminosäure 164 bis 239) von TonB konnte bestimmt werden und zeigte eine zylinderförmige Struktur, bei der zwei Proteinketten ein kompaktes Dimer bilden (Chang *et al.*, 2001). Die Dimerisierung des gesamten TonBs konnte mit Hilfe eines bakteriellen Two-Hybrid-System gezeigt werden (Sauter *et al.*, 2003). Es konnte außerdem über analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden, dass Wildtyp-TonB einen 2:1 Komplex mit FhuA bildet (Khursigara *et al.*, 2004), welches ein weiteres Indiz für die Dimerisierung *in vivo* darstellt.

Der genaue Mechanismus, mit dem TonB die Energie aus dem Protonengradienten der Cytoplasmamembran auf die Rezeptoren überträgt, ist noch nicht aufgeklärt, es wurden jedoch zwei Modelle vorgeschlagen: das Propellermodell und das Pendelmodell (Postle und Kadner, 2003; Khursigara *et al.*, 2004).

Beim Propeller Modell sind zwei TonB Moleküle ineinander verdreht, die eine Drehbewegung vollziehen, sobald sie in Kontakt mit einem TonB-abhängigen Rezeptor der äußeren Membran treten. Die Drehbewegung wird an der Cytoplasmamembran von den Proteinen ExbB und ExbD unter Ausnutzung des Protonengradienten ausgelöst. Diese Bewegung bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb FhuA, wodurch ein Transport des an den Rezeptor gebundenen Liganden in das Periplasma erfolgt. Das zweite Modell beschreibt das Pendeln von TonB zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran, in dem TonB die Rolle eines „mobile messenger“ spielt, der an der Cytoplasmamembran durch Konformationsänderungen in eine Art „energetisierten“ Form überführt wird, die es in der äußeren Membran an die Rezeptoren weitergibt und nachfolgend wieder zurück zur Cytoplasmamembran pendelt. Essentiell für die Interaktion zwischen äußerem Membranrezeptor und TonB ist die N-Terminal gelegene, sogenannte TonB-Box, von FhuA, deren Sequenz unter TonB-abhängigen Rezeptoren und Colicinen der B-Gruppe konserviert ist und deren Aminosäurereste mit der Region um Aminosäure 160 von TonB wechselwirkt (Kadner, 1990; Postle, 1993).