



Annette Sauter (Autor)

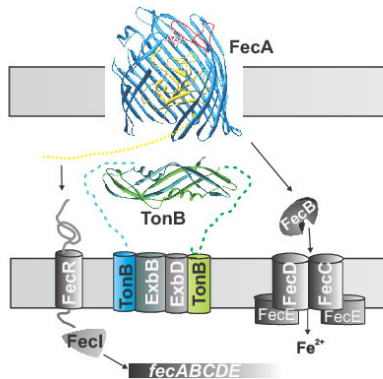
# Dimerisierungsstudien mit TonB und Mutationsanalyse des Transport- und Signalproteins FecA von *Escherichia coli* K-12

Annette Sauter

---

Dimerisierungsstudien mit TonB und  
Mutationsanalyse des Transport- und Signalproteins  
FecA von *Escherichia coli* K-12

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2967>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## Einleitung

### Die Eisenaufnahme bei *Escherichia coli* K-12

Bakterien haben verschiedene Möglichkeiten der Aufnahme von essentiellen Nährstoffen. Porine, in die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien eingelagerte Proteine, dienen als offener Kanal, durch den hydrophile Substrate, die kleiner als 600 Dalton sind, diffundieren. Diese unspezifischen Porine, wie zum Beispiel OmpF und OmpC, besitzen nur eine geringe Substratspezifität. Desweiteren gibt es für die Substrataufnahme über die äußere Membran Proteine für die erleichterte Diffusion. Diese besitzen eine spezifische Affinität zu ihren Substraten und werden deshalb auch spezifische Porine genannt. Ein Beispiel dafür wäre LamB für die Aufnahme von Maltodextrinen.

Viele andere essentielle Nährstoffe, deren Molekulargewicht größer als 600 Dalton ist, müssen jedoch über hochaffine energieabhängige Transporter gegen einen Konzentrationsgradienten aufgenommen werden. Bei *E. coli* sind dies die Eisen- und Vitamin B<sub>12</sub>-Aufnahmesysteme. Außer den Lactobacillen benötigen alle Organismen ausreichende Konzentrationen an Eisenionen. Eisen ist in der Lage zwischen zwei Oxidationsstufen als Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-Ion reversibel zu wechseln. Es kann somit ein Redoxpotential von – 300 mV bis + 700 mV bilden (Braun *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Eigenschaften kommt das Element häufig als Kofaktor von Enzymen vor, da es eine Vielzahl von Redoxreaktionen ermöglicht (Braun, 1985; Crichton und Charloteaux-Wauters, 1987; Earhart, 1996).

Obwohl Eisen das vierthäufigste Element in der Erdkruste ist, fällt es unter aeroben Bedingungen und bei physiologischem pH-Wert jedoch in Form unlöslicher Eisen(III)-Hydroxide aus und ist somit für Mikroorganismen nicht frei verfügbar. Auch bei Infektionsprozessen stellt die Eisenversorgung für Mikroorganismen ein Problem dar, denn im menschlichen Körper ist Eisen an hochaffine Komplexbildner gebunden, im Serum an Transferrin, in den sekretorischen Flüssigkeiten an Lactoferrin und innerhalb der Zelle an Ferritin (Braun *et al.*, 1998). Die Fähigkeiten von pathogenen Mikroorganismen sich in einem tierischen Wirt mit Eisen zu versorgen, stellt deshalb einen wichtigen Virulenzfaktor dar. Deswegen haben Bakterien und Pilze verschiedene Strategien zur Eisenaufnahme entwickelt. Am verbreitetsten ist die Aufnahme mittels Siderophoren (griechisch: Eisenträger). Siderophore sind niedermolekulare (400 bis 1000 Da), eisenspezifische Komplexbildner. Sie werden von Mikroorganis-

men synthetisiert, um Eisen zu binden und in komplexierter Form über spezifische Rezeptoren aufzunehmen. Anhand der chemischen Beschaffenheit der eisenbindenden Gruppen können die Siderophore in drei verschiedene Strukturklassen aufgeteilt werden: Hydroxamate, Catecholate und Hydroxycarboxylate. Bakterien können 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).

*Escherichia coli* K-12 ist ein Modellorganismus und daher bisher am besten untersucht. Das Bakterium besitzt sieben unterschiedliche Eisen(III)-Transportsysteme, wobei für jede Siderophorklasse mindestens ein Rezeptor in der äußeren Membran existiert. Die Rezeptoren FhuA, FhuE und IutA binden die Hydroxamat-Siderophore Ferrichrom, Coprogen bzw. Rhodotorulasäure und Aerobactin, einem von *E. coli* selbst gebildeten Siderophor (Fecker und Braun, 1983; Sauer *et al.*, 1987; Krone *et al.*, 1985). Enterochelin, das zu den Catecholaten gehörende endogene Siderophor von *E. coli*, wird über FepA aufgenommen (Lundrigan und Kadner, 1986). Zwei Vorstufen in der Enterochelin-Synthese, Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure können auch über die Rezeptoren FiuA und Cir aufgenommen werden (Hantke, 1990; Nau und Konisky, 1989). Als weitere Möglichkeit kann *E. coli* Eisen-citrat über den Rezeptor FecA, einem Vertreter des Hydroxycarboxylat-Typs, aufnehmen (Pressler *et al.*, 1988). Mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein (YbiL) mit Homologie zum Yersiniabactin-Rezeptor aus *Yersinia enterocolitica* konnte im Rahmen des *E. coli*-Genomprojektes identifiziert werden (Blattner *et al.*, 1997). Unter Eisenmangelbedingungen ist YbiL verstärkt in der äußeren Membran zu finden (Molloy *et al.*, 2000). Schließlich gehört noch der Rezeptor BtuB für Vitamin B<sub>12</sub> in die Gruppe der unter Eisenmangel verstärkt exprimierten äußeren Membranproteine (Heller und Kadner, 1985). Diese spezifischen Rezeptoren in der äußeren Membran haben Molekulargewichte zwischen 74 und 83 kDa. Die meisten dieser Rezeptoren dienen zusätzlich als Bindestellen für verschiedene Phagen, Colicine und Antibiotika (Hantke und Braun, 1975; Wayne und Neilands, 1975; Hancock und Braun, 1976; Hartmann *et al.*, 1979; Konisky, 1982; Pugsley, 1984; Curtis *et al.*, 1988).

## Das energieliefernde Protein TonB: Funktion und Struktur

Für den aktiven Transport von Substanzen über die äußere Membran benötigen Gram-negative Bakterien den Protonengradienten der Cytoplasmamembran, da die äußere Membran aufgrund ihres speziellen Aufbaus und der in ihr befindlichen Porine keinen eigenen elektrochemischen Gradienten aufbauen kann (Postle, 1990; Bradbeer, 1993). Bisher wurden in *E. coli* zwei Proteinsysteme nachgewiesen, die die Energie des elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für energieverbrauchende Aufnahme-Prozesse der äußeren Membran nützen können. Das Tol-System importiert Colicine der A-Gruppe, ist an der Aufnahme von filamentöser Phagen-DNA beteiligt (Braun, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998) und spielt bei der Oberflächenexpression von O-Antigen-Untereinheiten der Lipopolysaccharide eine Rolle (Gaspar *et al.*, 2000). Es besteht aus den drei Proteinen TolQ, TolR und TolA, die in der Cytoplasmamembran verankert sind und vielfältige Interaktionen untereinander eingehen (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995). TolQ und TolR nutzen dabei die Energie des Protonengradienten der Cytoplasmamembran und energetisieren TolA, das die Energie dann für energieabhängige Prozesse an der äußeren Membran zur Verfügung stellen kann (Cascales *et al.*, 2001).

Substrate wie Siderophore und Vitamin B<sub>12</sub>, die aktiv durch Transport- und Rezeptorproteine der äußeren Membran importiert werden, benötigen ein System aus den Proteinen TonB, ExbB und ExbD (TonB-System). Dieses ist auch für die Aufnahme von Colicinen der B-Gruppe und für die Sensitivität von Zellen gegenüber gewissen Phagen verantwortlich (Braun, 1995; Kadner, 1990; Postle, 1993). Zu den Proteinen des TonB-Systems wurden in Gram-negativen Bakterien viele Homologe identifiziert (Moeck und Coulton, 1998; Larsen *et al.*, 1996). Der N-Terminus (Reste 13 bis 32) des 239 Aminosäuren langen TonB-Proteins von *E. coli* ist in der Cytoplasmamembran verankert (Postle und Skare, 1988). Der größte Teil des Proteins befindet sich jedoch im Periplasma. Dort finden auch die Interaktionen mit den Transportern der äußeren Membran statt (Cadieux und Kadner, 1999; Günter und Braun, 1990; Moeck *et al.*, 1997; Schöffler und Braun, 1989). Das integrale Membranprotein ExbB besitzt drei Transmembranbereiche und einen großen cytoplasmatischen Anteil (Kampfenkel und Braun, 1993), während ExbD die Cytoplasmamembran nur einmal durchspannt und der größte Teil des Proteins im Periplasma lokalisiert ist (Kampfenkel und Braun, 1992; Ahmer *et al.*, 1995). TonB ist essentiell für die Energetisierung der äußeren Membranrezeptoren, während die Rollen von ExbB und

ExbD teilweise durch TolQ und TolR übernommen werden können (Braun und Herrmann, 1993). *E. coli* *exbB tolQ*- und *exbD tolR*-Doppelmutanten sind jedoch ebenso wie *tonB*-Mutanten inaktiv hinsichtlich ihres TonB-abhängigen Transports (Braun *et al.*, 1998). TonB, ExbB und ExbD bilden einen Komplex, dessen Stöchiometrie noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Unter Eisen-reichen Bedingungen beträgt die Kopienzahl der TonB-, ExbB- und ExbD-Proteine pro Zelle vermutlich ungefähr 335:2463:741 (1:7:2) (Higgs *et al.*, 2002). Die TonB-, ExbB- und ExbD-Proteine interagieren hauptsächlich mittels ihrer Membrangänge miteinander (Ahmer *et al.*, 1995; Braun und Herrmann, 1993; Braun *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1989; Larsen und Postle, 2001; Larsen *et al.*, 1999). Formaldehyd-Crosslinking zeigte, daß ExbB und ExbD TonB-unabhängig Homodimere und Homotrimere bilden (Higgs *et al.*, 1998).

TonB besitzt innerhalb seiner Transmembrandomäne ein SXXXH-Sequenzmotiv, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Dieses Motiv wurde als das minimale Motiv identifiziert, das für eine Kopplung von TonB an den elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran notwendig ist (Larsen und Postle, 2001). Im mittleren Sequenzbereich besitzt das TonB-Protein zwei hintereinanderliegende, charakteristische X-Pro-Dipeptidmotive (EPEPEPEPIPEP und KPKPKPKPKPKP), die dem Molekül in diesem Bereich eine stabförmige Struktur verleihen (Brewer *et al.*, 1990). Mit dieser Domäne durchspannt TonB möglicherweise als starre Struktur das Periplasma und zeigt vermutlich deshalb ein ungewöhnliches Laufverhalten im Proteingel, da diese Struktur im SDS-Gel nicht oder nur unvollständig denaturiert wird (Hannavy *et al.*, 1990). Für die Funktion von TonB scheint die prolinreiche  $\beta$ -Faltblattstruktur entbehrlich zu sein, sofern der periplasmatische Raum nicht durch besondere osmotische Bedingungen erweitert ist (Traub *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1993). Die Wechselwirkung von TonB mit den Rezeptoren der äußeren Membran und mit den Colicinen der B-Gruppe erfolgt über den C-Terminus des Proteins um Aminosäure 160 (Traub *et al.*, 1993). Alle eisenregulierten, TonB-abhängigen Rezeptoren und Colicine der B-Gruppe besitzen für diese Interaktion einen N-terminalen, stark konservierten Sequenzbereich, die sogenannte TonB-Box (Lundrigan und Kadner, 1986; Schramm *et al.*, 1987; Kadner, 1990; Postle, 1993). Mutationen in der TonB-Box verschiedener Rezeptoren, die zu einem *tonB*-negativen Phänotyp führten, konnten durch eine Punktmutation in TonB, meist um Position 160, supprimiert werden (Heller *et al.*, 1988; Schöffler und Braun, 1989; Günter und Braun,

1990; Bell *et al.*, 1990). Bei einer anderen Mutationsanalyse wurden Cysteine in die TonB-Box des Vitamin B<sub>12</sub>-Transporters BtuB eingeführt, die *in vivo* mit eingeführten Cysteinresten in der Region von Gln160 von TonB Disulfidbrücken ausbilden, was die genetische Suppressoranalyse chemisch bestätigte (Cadieux und Kadner, 1999). Auch die C-terminalen 48 Aminosäurereste von TonB sind essentiell für den Kontakt mit den Rezeptoren der äußeren Membran (Larsen *et al.*, 1997).

Für den C-terminalen Teil von TonB von Aminosäure 164 bis 239 wurde eine Kristallstruktur bestimmt, derzufolge diese Domäne ein kompaktes Dimer aus zwei Proteinketten bildet (Chang *et al.*, 2001; Abb. 1). Jedes Monomer besteht aus drei  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix. Beide Monomere sind zylinderförmig ineinander verwunden und alle sechs  $\beta$ -Faltblätter bilden ein großes antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Die Wechselwirkungen zwischen beiden Monomeren sind ungewöhnlich stark ausgeprägt, so daß die Interaktionsfläche etwa 41 % der jeweiligen Monomeroberfläche ausmachen (Chang *et al.*, 2001). Es bleibt bisher jedoch noch unklar, ob diese Art der Dimerisierung auch *in vivo* vorliegt, da noch keine Kristallstruktur für das gesamte Protein aufgeklärt werden konnte. Für zwei C-terminal verkürzte TonB-Fragmente (TonB154-239 und TonB163-239) konnte eine Homodimerisierung *in vitro* nachgewiesen werden. Längere C-terminale TonB-Fragmente (TonB114-239, 124-239, 134-139 und 144-239) hingegen bildeten bei Ultrazentrifugationsanalysen Monomere (Koedding *et al.*, 2004). Ebenfalls anhand von Ultrazentrifugationsanalysen wurde nachgewiesen, daß TonB(32-239) als Monomer sedimentiert, der C-Terminus von TonB (Reste 155-239) hingegen als Dimer (Khursigara *et al.*, 2004). Außerdem liegt der Ferrichrom-Transporter FhuA im Komplex mit zwei TonB-Proteinen vor (Khursigara *et al.*, 2004). Periplasmatische, überexprimierte TonB-Fragmente hemmen *in vivo* die Funktionen von Wildtyp-TonB, indem sie vermutlich mit Wildtyp-TonB um die Bindestellen an den Rezeptoren der äußeren Membran konkurrieren oder mit Wildtyp-TonB gemischte funktionslose Dimere bilden (Howard *et al.*, 2001).

Der Reaktionsmechanismus wie TonB die Energie aus dem Protonengradienten der Cytoplasmamembran auf die Rezeptoren überträgt ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es wurde allerdings ein Modell vorgeschlagen, in dem TonB als Energieüberträger zwischen der Cytoplasmamembran und der äußeren Membran eine Serie von verschiedenen Konformationsänderungen einnimmt (Letain und Postle, 1997). Vermutlich ändert sich dabei die Konformation von TonB abhängig von der proto-

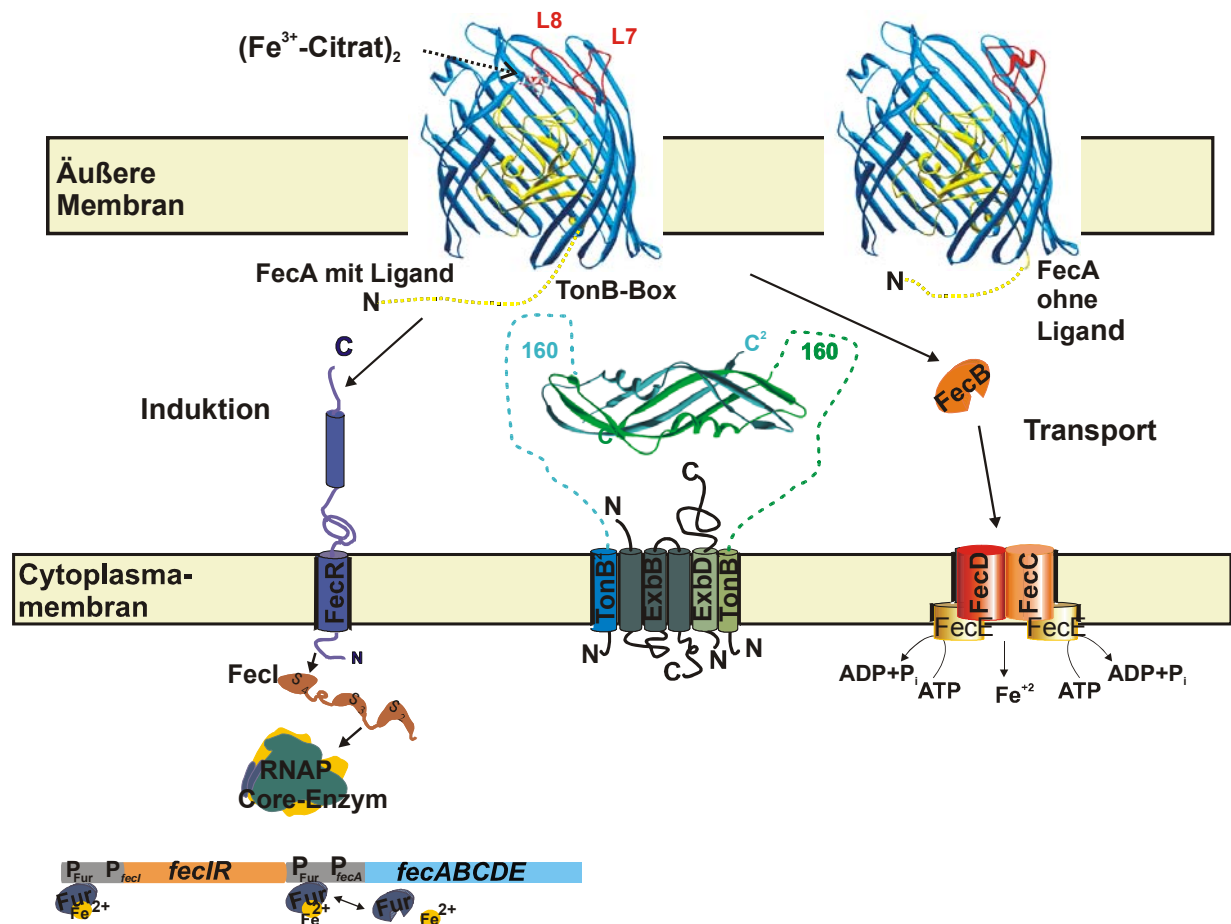
nenmotorischen Kraft der Cytoplasmamembran. Außerdem wird nach dem Kontakt von TonB mit einem Rezeptorprotein der äußeren Membran dieses durch mindestens eine weitere Konformationsänderung energetisiert (Moeck und Coulton, 1998).

### **Ein TonB-abhängiger Rezeptor des Eisentransportes:**

#### **FecA, das Transportprotein für dinukleares Eisendicitrat**

*E. coli* K-12 kann mit Citrat komplexiertes Eisen [(Fe<sup>3+</sup>-Citrat)<sub>2</sub>, zukünftig als Eisencitrat bezeichnet] aufnehmen (Frost und Rosenberg, 1973; Hussein *et al.*, 1981). Dieses Transportsystem ist im Gegensatz zu den anderen Siderophorsystemen von *E. coli* durch den Eisenkomplex induzierbar (Frost und Rosenberg, 1973). Weitere substratinduzierbare Eisenaufnahmesysteme wurden bisher bei *Pseudomonas sp.* und bei *Vibrio anguillarum* beschrieben (Gensberg *et al.*, 1992; Dean und Poole, 1993; Koster *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996).

Das Eisencitrat-Transportsystem (kurz *fec* für *ferric citrate uptake*) wurde bei 97,3 Minuten auf dem *E. coli* K-12 Chromosom kartiert (Veitinger und Braun, 1992). Dieses System besteht aus der regulatorischen Einheit *fecIR* und aus den Transportgenen *fecABCDE* (Abb. 1; Pressler *et al.*, 1988; Staudenmaier *et al.*, 1989, Van Hove *et al.*, 1990). Vor beiden Operons ist jeweils ein Promotor geschaltet, wobei die *fecIR* Transkription von dem primären  $\sigma^{70}$ -Faktor und die Transkription von *fecABCDE* von dem Sigmafaktor FecI abhängt (Enz *et al.*, 1995). Der Transport des Eisens in die Zelle beginnt mit der Bindung des Eisencitrats an den äußeren Membranrezeptor FecA (Wagegg und Braun, 1981). Anschließend erfolgt der Transport in das Cytoplasma mit Hilfe des periplasmatischen Bindeproteins FecB, den zwei hydrophoben Proteinen FecC und FecD, die an der Cytoplasmamembran lokalisiert sind und der hydrophilen ATP-Hydrolase FecE, die in der Membran verankert ist (Pressler *et al.*, 1988; Staudenmaier *et al.*, 1989; Schultz-Hauser *et al.*, 1992). Da Eisen in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt (Wooldridge und Williams, 1993; Braun, 1997), unterliegt die Aufnahme von Eisen einer stringenten Kontrolle. Daher wird die Expression der Gene der am Eisentransport beteiligten Proteine eisenabhängig negativ reguliert. Verantwortlich dafür ist in *E. coli* das Fur-Repressorprotein (*ferric uptake regulation*), das bei ausreichender Konzentration an freiem Fe<sup>2+</sup> in der Zelle durch dessen Bindung dimerisiert (Hantke und Braun, 2000). So wird auch das *fec*-System über den Fur-Repressor reguliert. Sowohl der Promotor von *fecIR* als auch der von *fecABCDE* besitzt eine Fur-Box. Ist Fe<sup>2+</sup> in der Zelle vorhanden, bindet es an



**Abb. 1:** Modell des  $(\text{Fe}^{3+}\text{-Citrat})_2$ -Transport- und Regulationssystems und der Anordnung des TonB-ExxB-ExbD-Komplexes in der Zelloberfläche von *Escherichia coli* K-12. Bei FecA sind das  $\beta$ -Barrel blau, der Korken gelb und die Loops 7 (L7) und 8 (L8), die nach der Bindung von dinuklearem Eisendicitrat, ihre Struktur verändern, rot gezeichnet. Einige  $\beta$ -Faltblattstränge des  $\beta$ -Barrels sind entfernt worden, um einen besseren Einblick auf den Korken zu ermöglichen. Der Ligand  $(\text{Fe}^{3+}\text{-Citrat})_2$  ist in der linken FecA-Struktur rot-weiß eingezeichnet. Die Kristallstruktur der C-terminalen TonB-Domäne zeigt die beiden Monomere in grün und in blau. Die Transportproteine FecBCDE des *fec*-Systems sind rechts dargestellt, die Regulationsproteine FecR und FecI links. RNAP bezeichnet die RNA-Polymerase. Im untersten Teil ist das *fec*-Operon mit den Fur-Repressorproteinen zu sehen. Ausführliche Erläuterungen finden sich im Text.

Fur und das eisenbeladene Fur-Dimer bindet an die Fur-Box und reprimiert damit die Expression. Sinkt die Eisenkonzentration innerhalb der Zelle, zerfällt der Eisen-Fur-Komplex und die Gene werden für die Transkription freigegeben (Zimmermann *et al.*, 1984; Abb. 1).

Das besondere des *fec*-Systems ist die Induktion des *fec*-Operons, die durch extrazelluläres Eisencitrat hervorgerufen wird. Dabei muß der Induktor nicht in das Zellinnere gelangen, sondern bindet an den äußeren Membranrezeptor FecA, wodurch die Signalkaskade ausgelöst wird. Der 79 Aminosäuren lange N-Terminus von FecA befindet sich wahrscheinlich komplett im Periplasma und interagiert mit dem