

I Einleitung

Im Vergleich zu höheren Organismen besitzen Bakterien im Verhältnis zu ihrem Volumen eine sehr große Oberfläche. Dieses hohe Oberflächen / Volumenverhältnis zusammen mit sehr kurzen intrazellulären Transportwegen aufgrund fehlender Kompartimentierung begünstigt eine hohe Stoffwechselleistung sowie einen regen Stoffaustausch mit der Umwelt. Die bakterielle Zellhülle spielt dabei eine wichtige Rolle, da sie den Eintritt zellschädigender Substanzen verhindert, sowie die Aufnahme von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten ermöglicht. Eine Besonderheit bilden dabei die Gram-negativen Bakterien wie z. B. *Escherichia coli*. Gram-negative Bakterien unterscheiden sich morphologisch von den Gram-positiven durch ein verhältnismäßig dünnes Murein, gebildet aus wenigen Schichten und einer zweiten, äußeren Membran, bestehend aus einer internen Lipid-Doppelschicht von Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) in der äußeren Schicht. LPS besteht aus einer proximalen hydrophoben Lipid A-Region, einer Kernzone, gebildet aus Oligosacchariden, sowie der distalen hydrophilen O-Antigen Polysaccharid-Region, die in das Medium hineinragt (Nikaido, 1996A; Beveridge, 1999). Dabei ist die LPS-Schicht im wesentlichen für die Resistenz Gram-negativer Bakterien gegenüber Antibiotika, Detergenzien und Gallensalzen verantwortlich. Eine Verankerung der äußeren Membran mit der Zellwand wird durch das Murein-Lipoprotein vermittelt (Braun und Rehn, 1969; Braun und Wolff, 1970; Hantke und Braun, 1973).

Etwa die Hälfte der Masse der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien besteht aus Proteinen, die als integrale Proteine in die Membran eingebettet sein können oder über einen Lipid-Anker in der Membran fixiert sind. Dabei erfüllen diese Proteine vielfältige Funktionen, darunter Stabilisierung der Zellhülle, enzymatische Aktivität, passive und aktive Aufnahme von Nährstoffen und Substraten, Proteintranslokation sowie Export von antimikrobiellen Substanzen (Buchanan, 1999; Koebnik *et al.*, 2000; Schulz, 2000). Interessanterweise treten alle bisher strukturell aufgeklärten äußeren Membranproteine als sogenannte " β -Barrels" auf, das heißt sie bilden eine geschlossene Tonnenstruktur aus antiparallelen β -Faltblättern. Die Gestalt des β -Barrels sowie die Länge und Anzahl der strukturegebenden einzelnen β -Faltblattsträngen variiert dabei von Protein zu Protein. Typischerweise werden die einzelnen β -Faltblattstränge auf periplasmatischer Seite von kurzen Proteinsequenzen ungeordneter Sekundärstruktur, den periplasmatischen "Turns", verbunden, während auf extrazellulärer Seite wesentlich längere und untereinander verschiedenere "Loops", welche durch weitere Sekundärstrukturen unterbrochen sein können, die β -Faltblattstränge verbinden. Aufgrund ihrer exponierten Lage und Diversität bilden die "Loop"-Strukturen dabei eine wichtige Rolle in der Substratbindung und Adhäsion (Buchanan, 1999; Koebnik *et al.*, 2000). Die von den β -Faltblättern gebildete Tonnenstruktur durchspannt dabei die Membranebene, innerhalb derer sie durch hydrophobe Seitenketten in Interaktion mit den Phospholipiden und Lipopolysacchariden tritt. Dabei wurden bei äußeren Membranproteinen typischerweise zwei Gürtel aus aromatischen Aminosäureresten beobachtet, welche eine hydrophobe Interaktionszone mit dem LPS

bilden (Nikaido, 1996A; Ferguson *et al.*, 2000B; Ferguson *et al.*, 2001B). Dieser Grundbauplan unterscheidet sich grundlegend von den Proteinen in der Cytoplasmamembran. Diese Membranproteine besitzen als Transmembranbereiche α -Helices. Beide Konformationen von Transmembrandomänen genügen dabei den durch ihre hydrophobe Umgebung bedingten energetischen Anforderungen, nämlich einem Netzwerk von intramolekularen Wasserstoffbrücken, welches den Energieverlust, hervorgerufen durch die Insertion in die Membran, kompensiert (Bowie, 2000; Faraldo-Gómez *et al.*, 2002). Eine β -Faltblatt-Architektur ist dann energetisch begünstigt, wenn der Anteil an hydrophoben Aminosäuren relativ gering ist, eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Translokation des für die äußere Membran bestimmten Proteins durch die Cytoplasmamembran und das Periplasma (Nikaido, 1996A; Koebnik *et al.*, 2000).

Membrananker und Adhäsine

OmpA in der äußeren Membran ist eines der am häufigsten in *E. coli* vorkommenden Proteine überhaupt. Es ist verantwortlich für die Stabilisierung der äußeren Membran (Sonntag *et al.*, 1978), nimmt an der bakteriellen Konjugation teil (Ried und Henning, 1987), dient Bakteriophagen und Colicinen als Rezeptor (Morona *et al.*, 1985; Foulds und Barret, 1973) und ist zudem ein Virulenz- und Pathogenitätsfaktor (Weiser und Gottschlich, 1991; Prasadarao, 1996). Der C-Terminus von OmpA geht eine feste Bindung mit dem Peptidoglykan des Periplasmas ein (Koebnik, 1995), während der N-Terminus eine β -Barrel-Domäne in der äußeren Membran bildet. Die Struktur der N-terminalen Transmembrandomäne wurde aufgeklärt (Pautsch und Schulz, 1998; Pautsch und Schulz, 2000; Arora *et al.*, 2002). OmpA zählt zu den kleineren äußeren Membranproteinen, seine N-terminale Membrandomäne wird aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen gebildet. Das Barrel-Lumen zeigt eine Vielzahl geladener Seitenketten, welche ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken und Salzbrücken bildet und somit zur Stabilität des Proteins beiträgt (Pautsch und Schulz, 2000). Trotz dieser Vielzahl an intramolekularen Bindungen kann OmpA auch als Ionenkanal fungieren (Sugawara und Nikaido, 1992; Saint *et al.*, 1993; Arora *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel für ein Adhäsine in *E. coli* ist OmpX. Es ist strukturell der Transmembrandomäne von OmpA sehr ähnlich. Die Teilnahme dieses Proteins an der bakteriellen Adhäsion geschieht vermutlich durch eine Verlängerung von 4 seiner 8 antiparallelen β -Faltblättern, welche daraufhin eine β -Faltblatt-Ebene mit exponierter Randzone bilden, die mit externen Proteinen assoziieren kann, sofern diese über komplementäre β -Faltblätter verfügen (Vogt und Schulz, 1999). Diese Fähigkeit der β -Barrel-Domäne von OmpX ist ein Beispiel für die Flexibilität, die eine vermeintlich starre Struktur wie ein β -Barrel besitzen kann.

Enzyme der äußeren Membran

Ein Beispiel für ein in die äußere Membran integriertes Enzym ist die Outer Membrane Phospholipase A (OMPLA) aus *E. coli*. Dabei ist OMPLA das erste dieser wenigen Enzyme, dessen Struktur aufgeklärt werden konnte. OMPLA bildet ebenfalls eine β -Barrel-Domäne, die mit 12 antiparallelen β -Faltblättern größer als diejenige der Adhäsine ist.

im submikromolaren Konzentrationsbereich im Medium, so ist die Expression von Tsx essentiell für ihre Aufnahme.

Kanalbildende sekretorische Proteine

Der Export einer großen Anzahl an Proteinen durch die Zellhülle Gram-negativer Bakterien geschieht in einem einzigen energieabhängigen Schritt. Dabei treten Proteine der Cytoplasmamembran, sogenannte Translokasen, in Interaktion mit einem Protein der TolC-Familie in der äußeren Membran. Die Translokasen vermitteln dabei die Energetisierung und die Substratspezifität (Thanabalu *et al.*, 1998). Nach dem Export des Substrates löst sich der Export-Komplex auf und die beteiligten Komponenten kehren in den separaten Ursprungszustand zurück. Die räumliche Struktur von TolC aus *E. coli* wurde aufgeklärt. Das Protein besteht aus drei identischen Untereinheiten, die sich so zusammenfallen, dass sie ein β -Barrel in der äußeren Membran bilden mit einem langen periplasmatischen Kanal mit einem Durchmesser von etwa 35 Å und einer Länge von ca. 10 nm, der aus α -helicalen Bündeln gebildet wird und am Ende verschlossen ist (Koronakis *et al.*, 2000). Der Kanal wird vermutlich erst durch Interaktion mit den Translokasen geöffnet und somit dem Exportsubstrat zugänglich. Diese Art des Export bildet keine periplasmatischen Zwischenschritte und unterscheidet sich damit generell von Prozessen, welche eine schrittweise Ausschleusung über innere und äußere Membran durchführen. Dieser von TolC und den Translokasen durchgeführte Export, auch als Typ I Sekretionssystem bezeichnet, umfasst Toxine wie z. B. Cyclolysin (M_r 170000 Da) (Glaser *et al.*, 1988), Enzyme, Detergenzien, Schwermetalle und Antibiotika (Nikaido, 1996B). TolC ist damit eine wichtige Komponente in der Entwicklung von Pathogenität und mehrfacher Antibiotikaresistenz ("multidrug resistance"). Der Verlust von TolC vermindert die Überlebensfähigkeit der Bakterien und schwächt ihre Virulenz (Stone und Miller, 1995).

TonB-abhängige Rezeptoren: Aktive Aufnahme von Eisen-Siderophorkomplexen

Die Aufnahme von essentiellen Nährstoffen, deren Molekulargewicht über der Ausschlussgrenze der Porine liegt (ca 600 Da), ist durch passive Diffusion nicht möglich. Auch eine Aufnahme über die spezifischen Porine ist im Falle einer niedrigen Konzentration des benötigten Substrates von unzureichendem Wirkungsgrad. Daher werden solche Stoffe über hochaffine energieabhängige Transporter gegen ein Konzentrationsgradienten aufgenommen. Bei *E. coli* handelt es sich dabei im wesentlichen um Eisen- und Vitamin B12-Aufnahmesysteme. Alle Organismen, mit Ausnahme einiger Lactobacillen, sind auf das Vorhandensein ausreichender Konzentration an Eisenionen im Medium angewiesen. Als Übergangselement ist Eisen 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). Es spielt daher eine große Rolle als Cofactor vieler Proteine in zentralen Stoffwechselprozessen wie z.B. dem Sauerstoff-Metabolismus, insbesondere der Auflösung hochreaktiver Sauerstoffzwischenstufen, der Elektronentransportkette und der RNA-Synthese (Braun, 1997; Ferguson *et al.*, 2001B). Obwohl Eisen massenmäßig das vierthäufigste 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, so dass die Konzentration freier Eisenionen in der Größenordnung von 10^{-18} M liegt (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 Funktion 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. Ein weiteres Eisenversorgungsproblem stellt sich für Bakterien innerhalb des tierischen Organismus. Im menschlichen Körper ist Eisen hochaffin im Serum durch Transferrin, in Sekreten an Lactoferrin und innerhalb der Zelle durch Ferritin (Braun *et al.*, 1998) gebunden. Die Fähigkeit pathogener Mikroorganismen, Eisen innerhalb eines tierischen Wirtes nutzen zu können, stellt somit einen Virulenzfaktor dar.

Um sich ausreichend mit Eisen versorgen zu können, 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 können Bakterien und Pilze eine Vielzahl von niedermolekularen Substanzen bilden, welche Eisen spezifisch hochaffin komplexieren, die sogenannten Siderophore. Diese können anhand der chemischen Beschaffenheit der eisenbindenden Gruppen in drei verschiedene Strukturklassen aufgeteilt werden: Hydroxamate, Catecholate und Hydroxycarboxylate. Die Konzentration an freiem Fe^{3+} in Gleichgewicht mit Siderophoren liegt bei 10^{-24} M und ist damit deutlich unterhalb der Konzentration an freiem Fe^{3+} im Gleichgewicht mit Eisen(III)Hydroxykomplexen. 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). *E. coli* ist der bislang am besten untersuchte Organismus hinsichtlich der molekularbiologischen, biochemischen und strukturellen Eigenschaften der Eisenaufnahme sowie des Eisenstoffwechsels. 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. Bei *E. coli* sind bisher sieben Aufnahmesysteme für Eisen(III)-Siderophorkomplexe beschrieben worden, wobei für jede Siderophorklasse mindestens ein Rezeptor in der äußeren Membran existiert. Als Rezeptoren für Hydroxamatsiderophore dienen IutA, welches von *E. coli* selbst gebildetes Aerobactin transportiert (Krone *et al.*, 1985), FhuA, der Rezeptor für Ferrichrom (Coulton *et al.*, 1986) und FhuE, der Rezeptor für Coprogen und Rhodotorulasäure (Sauer *et al.*,

1987). Rezeptoren für Siderophore des Catechol-Typs sind FepA, welches ebenfalls von *E. coli* synthetisiertes Enterobactin transportiert (Lundrigan und Kadner, 1986), CirA, der Rezeptor für Dihydroxybenzoesäure (Nau und Konisky, 1989), einer Vorstufe des Enterobactin, sowie Fiu, das Rezeptorprotein für Dihydroxybenzoylserin und Dihydroxybenzoesäure (Nau und Konisky, 1989). Desweiteren existiert in *E. coli* mit FecA ein Rezeptor für Eisencitrat, ein Siderophor des Hydroxycarboxylat-Typs (Pressler *et al.*, 1988). Im Rahmen der Genom-Sequenzierung von *E. coli* wurde mindestens ein weiteres hypothetisches Rezeptorprotein (YbiL) mit Homologie zum Yersiniabactin-Rezeptor aus *Yersinia enterocolitica* identifiziert (Blattner *et al.*, 1997), welches unter Eisenmangel verstärkt in der äußeren Membran zu finden ist (Molloy *et al.*, 2000). Ebenso in die Gruppe der unter Eisenmangel verstärkt exprimierten äußeren Membranproteine in *E. coli* gehört BtuB, der Rezeptor für Vitamin B12 (Heller und Kadner, 1985). Da Eisen in höheren Konzentrationen cytotoxisch wirkt, muss die Aufnahme von Eisen in die Zelle streng reguliert werden. Daher wird die Expression der Gene der am Eisentransport beteiligten Proteine eisenabhängig negativ reguliert. 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). Eine Ausnahme von der negativen Regulation durch Fur bildet in *E. coli* das Fec-Aufnahmesystem. Neben den Genen des Transportsystems *fecABCDE* existieren noch zwei durch Fur regulierte regulatorische Gene *fecI* und *fecR*. Dabei ist FecR ein in der Cytoplasmamembran lokalisierter positiver Regulator, der durch Wechselwirkung mit dem N-Terminus des beladenen Rezeptors FecA aktiviert wird. FecR aktiviert dann seinerseits 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).

TonB-abhängige Rezeptoren: Funktion und Struktur von TonB

Da die äußere Membran aufgrund ihres speziellen Aufbaus und der in ihr befindlichen Porine keinen elektrochemischen Gradienten aufbauen kann, müssen Gram-negative Bakterien den Protonengradienten der Cytoplasmamembran nutzen, um Substanzen aktiv über die äußere Membran aufnehmen zu können (Postle, 1990). In *E. coli* wurden bis jetzt zwei Proteinsysteme nachgewiesen, welche in der Lage sind, die Energie des elektrochemischen Gradienten der Cytoplasmamembran für energieverbrauchende Aufnahme-Prozesse der äußeren Membran nutzbar zu machen. Für den Export von Komponenten der Zellhülle sowie die Aufnahme von Colicinen der Gruppe A ist dabei das Tol-System verantwortlich (Braun, 1995; Lazdunski *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2000). Die Proteine TolQ, TolR und TolA sind in der Cytoplasmamembran verankert und gehen viel-