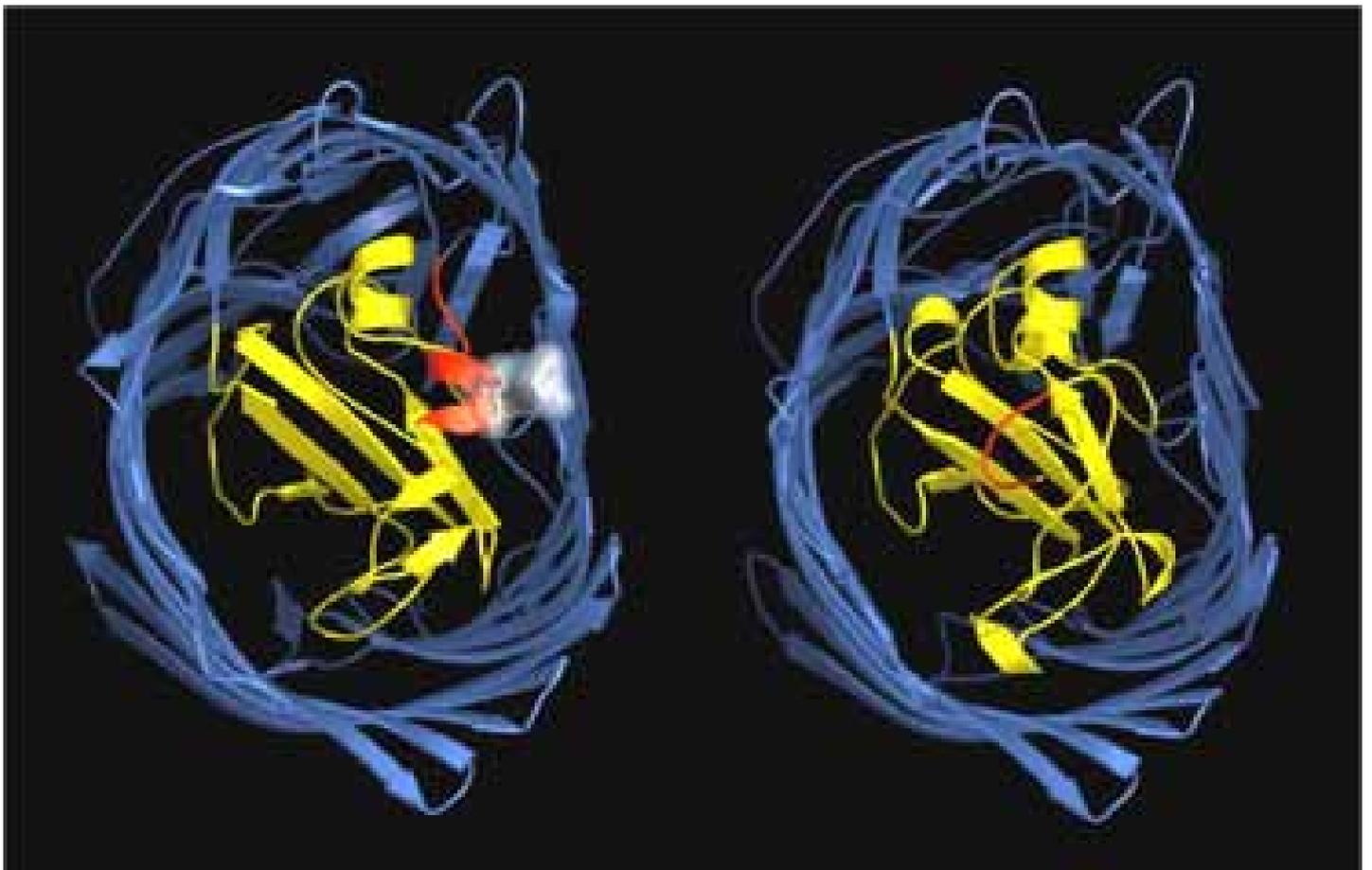


Energiegekoppeltes

Ferrichrom-Transport-Protein FhuA:

Struktur- und Funktionsanalyse



**Energiegekoppeltes
Ferrichrom-Transport-Protein FhuA:
Struktur- und Funktionsanalyse**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

**der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**vorgelegt von
Franziska Endriß
aus Kirchheim/Teck**

2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2004
ISBN 3-86537-166-3

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2004

Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hantke

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-166-3

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Membranphysiologie der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun danke ich für die Überlassung des Themas, für seine großzügige Unterstützung und ständige Gesprächsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Hantke möchte ich mich für hilfreiche Ratschläge, Auskünfte und Informationen bedanken.

Herrn Dr. Michael Braun danke ich für zahlreiche Tipps und Ratschläge bei der Bearbeitung meines Themas, sowie für das Korrekturlesen und das Erstellen von Abbildungen.

Frau Claudia Menzel danke ich für die Bereitstellung von ALF-Sequenziergelen und für das Bereitstellen von Stämmen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkolleginnen Annette Sauter und Dr. Monica Ogierman für die gute Zusammenarbeit in unserem „Ecklabor“. Heidi Brand, Silke Stern und Petra Staubitz danke ich für viele Gespräche die mir im Laboralltag eine wichtige Abwechslung waren.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Mikrobiologie/Membranphysiologie danke ich für die Zusammenarbeit und Ihre Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und meinem Freund Andreas für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Substrataufnahme über die äußere Membran	1
Bedeutung und Transport von Eisen	3
Das Fhu-System in <i>E. coli</i>	5
Die Kristallstruktur des multifunktionellen Rezeptors FhuA	8
Aufgabenstellung	18

Ergebnisse

“Mutant analysis of the Escherichia coli FhuA protein reveals sites of FhuA activity“	19
“In vivo reconstitution of the FhuA transport protein of <i>Escherichia coli</i> K-12“	24
“Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions“	25

Diskussion	29
-------------------	-----------

Literatur	50
------------------	-----------

Eigenanteil an den Publikationen	59
---	-----------

Anhang: Publikationen und Manuskripte	61
--	-----------

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.