

Zellbiologie

Räumliche Organisation bakterieller Zellen

MARTIN THANBICHLER
UNIVERSITÄT MARBURG UND MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRISCHE
MIKROBIOLOGIE, MARBURG

VAAM-Forschungspreis 2011

Bakterien haben komplexe regulatorische Mechanismen entwickelt, um die räumliche Verteilung von zellulären Komponenten zu kontrollieren. Diese werden anhand neuer Ergebnisse zur Positionierung der Zellteilungsebene und Regulation der Morphogenese in *Caulobacter crescentus* veranschaulicht.

Bacteria have evolved complex regulatory mechanisms to control the spatial distribution of cellular components. This article highlights new findings on division site selection and the regulation of morphogenesis in *Caulobacter crescentus* that illustrate the underlying principles.

■ Unser Bild von Bakterien hat sich durch die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der prokaryotischen Zellbiologie sowie der Mikroskopie- und Imaging-Technologie fundamental gewandelt. Mittlerweile hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass Bakterien hoch organisierte biologische Systeme darstellen, die ihre Zellform und -polarität gezielt steuern, DNA aktiv in die Tochterzellen segregieren und komplexe Entwicklungszyklen durchlaufen können. Wie in Eukaryoten wird die räumliche und zeitliche Organisation zellulärer Prozesse dabei durch vielschichtige regulatorische Netzwerke kontrolliert, die auf der Aktivität von lokalisierten Proteinkomplexen und dynamischen Zytoskelettelementen beruhen [1, 2].

Das Modell *Caulobacter crescentus*

Das Gram-negative Bakterium *Caulobacter crescentus* hat sich als eines der führenden Modellsysteme für das Studium der bakteriellen Zellbiologie etabliert [3]. Es zeichnet sich durch eine asymmetrische Zellteilung aus, die zur Bildung von zwei verschiedenen Tochterzellen führt (**Abb. 1**). Eine davon, die Stielzelle, zeichnet sich durch einen langen Fortsatz aus, an dessen Ende eine adhäsive Matrix (*holdfast*) abgesondert wird, über die

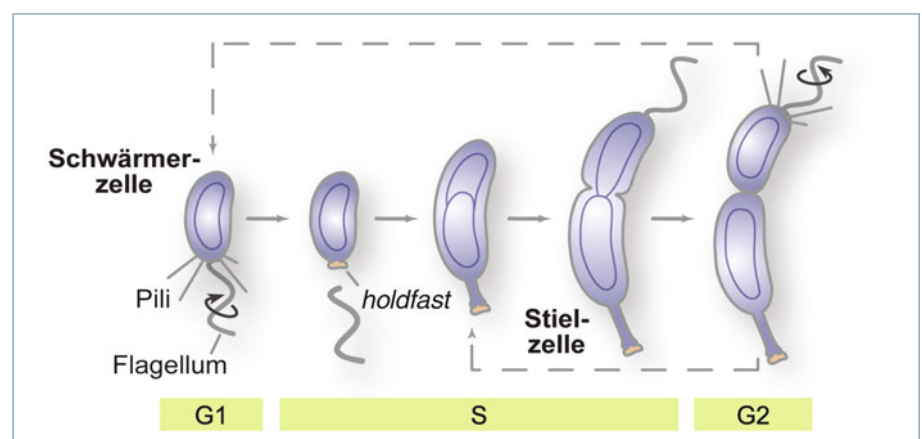
sich die Zelle an Oberflächen anheften kann. Die Schwärmerzelle dagegen besitzt anstelle des Stiels ein einzelnes polares Flagellum, das die Sondierung des Habitats auf Nährstoffe erlaubt. Während die Stielzelle nach

erfolgender Teilung unmittelbar wieder in den nächsten Zellzyklus eintritt, erlangt die Schwärmerzelle die Fähigkeit zur Zellteilung erst, wenn sie das Flagellum abwirft und sich zu einer weiteren Stielzelle differenziert.

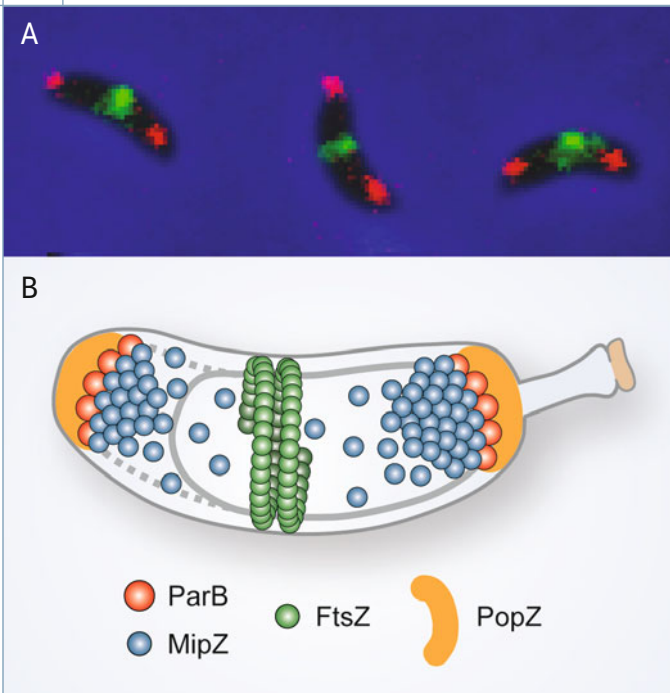
Unsere Gruppe beschäftigt sich mit den Mechanismen, die für die korrekte Lokalisation von Enzymen und regulatorischen Faktoren während der Zellteilung und Morphogenese verantwortlich sind.

Positionierung der Zellteilungsebene

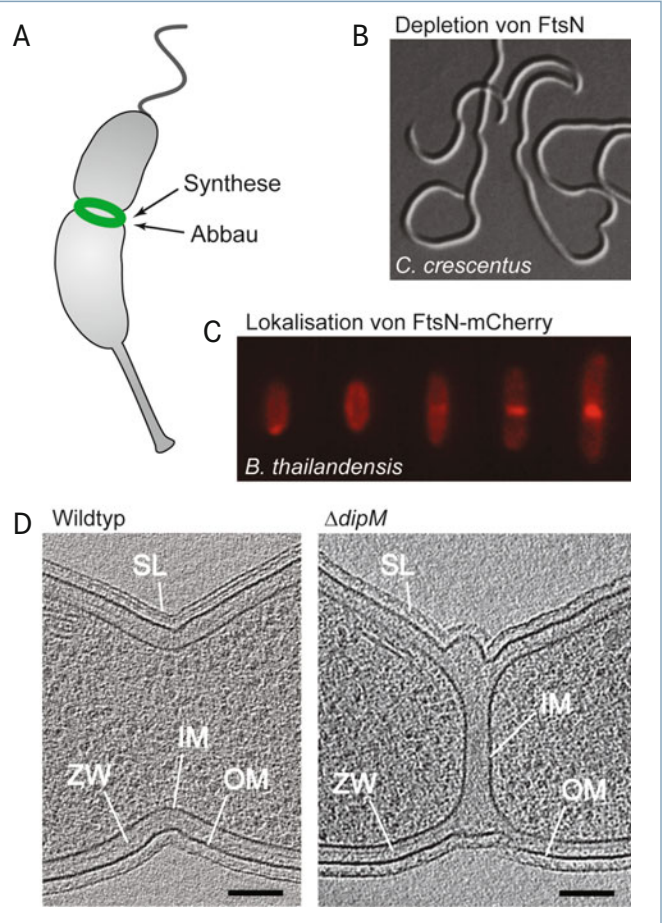
Ein zentrales Problem in der Zellbiologie ist die Positionierung der Teilungsebene. Bei vielen Bakterien, wie auch *C. crescentus*, schnürt sich der Zellkörper nach seiner Verlängerung in der Mitte durch. Die Teilung wird dabei durch einen ringförmigen Komplex aus ungefähr zwei Dutzend Proteinen (dem Divisom) katalysiert, dessen Bildung durch die Polymerisation des Tubulin-Homologs FtsZ am Ort der zukünftigen Zellteilung eingeleitet wird [4]. Die zentrale Rolle von FtsZ beim Teilungsprozess macht dieses Protein zum



▲ **Abb. 1:** Zellzyklus von *Caulobacter crescentus*. Die begeißelte Schwärmerzelle wirft ihr Flagellum ab, zieht die Pili zurück und beginnt mit der Bildung eines Stiels, an dessen Ende eine adhäsive Matrix (*holdfast*) abgesondert wird. Zellkörper und Stiel verlängern sich, und die Zellteilung setzt ein. Nach der Synthese eines neuen Flagellums am nicht gestielten Pol schnüren sich die beiden Tochterzellen voneinander ab. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien ist in *C. crescentus* die Replikation der DNA strikt an den Teilungszyklus gekoppelt. Die Schwärmerzelle enthält exakt ein Chromosom und befindet sich in einer replikativ inaktiven Phase (G1-Phase). Die DNA-Synthese beginnt zeitgleich mit dem Übergang zum Stielzellstadium (S-Phase) und erstreckt sich über den Großteil des restlichen Zellzyklus, sodass am Ende beide Tochterzellen wieder jeweils ein vollständig repliziertes Chromosom erhalten.



◀ **Abb. 2:** Regulation der Zellteilung durch die ATPase MipZ. **A,** Zellen von *Caulobacter crescentus*, in denen der ParB-MipZ-Komplex (rot) und das Tubulin-Homolog FtsZ (grün) durch die Fusion an fluoreszierende Proteine sichtbar gemacht wurden. **B,** Schema der Funktion des MipZ-Systems. Die beiden Kopien des Replikationsursprungs werden mithilfe des Proteins PopZ an den Zellpolen verankert. MipZ interagiert mit dem DNA-bindenden Protein ParB und bildet in der Folge polare Gradienten, welche die Polymerisation von FtsZ auf die Mitte der Zelle beschränken.



▶ **Abb. 3:** Einschnürung der Zellwand während der Zellteilung von *Caulobacter crescentus*. **A,** Der Umbau der Zellwand erfordert die koordinierte Aktivität von synthetischen und lytischen Enzymen. **B,** Das Abschalten der FtsN-Synthese führt in *C. crescentus* zur Blockierung der Zellteilung und Bildung langer Zellfilamente. **C,** Datenbankanalysen erlaubten die Identifikation von FtsN-Homologen in anderen Proteobakterien. Die Markierung eines Kandidatenproteins aus *Burkholderia thailandensis* mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry offenbart das typische Lokalisationsverhalten eines Zellteilungsproteins. Am Anfang des Teilungszyklus ist das Fusionsprotein am neu gebildeten Pol der Tochterzellen zu finden. Es verteilt sich dann gleichmäßig über die Zellhülle und wird schließlich zu Beginn der Einschnürung langsam in die Zellmitte rekrutiert. **D,** Einschnürung der Zellhülle in Wildtyp-Zellen von *C. crescentus* sowie in einer Mutante mit einem Defekt in der Zellwand-Hydrolase DipM. Weitere Details siehe Text. IM: innere Membran; OM: äußere Membran; ZW: Zellwand; SL: surface layer. Balken: 100 nm.

Hauptziel von regulatorischen Mechanismen, die für die räumliche und zeitliche Kontrolle der Einschnürung verantwortlich sind [5, 6].

In *C. crescentus* wurde kürzlich ein neuartiges System identifiziert, das sich die Dynamik der Chromosomensegregation für die Positionierung der Teilungsebene zunutze macht (**Abb. 2**). Es basiert darauf, dass die beiden Kopien des Replikationsursprungs unmittelbar nach Eintritt in die S-Phase voneinander getrennt und stabil an den beiden gegenüberliegenden Zellpolen verankert werden [7]. Ein DNA-bindendes Protein, ParB, bindet an eine bestimmte Region in der Nähe der beiden Replikationsursprünge und bildet dort einen Nukleoproteinkomplex aus. Dieser Komplex interagiert wiederum mit der ATPase MipZ, wodurch diese eine gradientenartige Verteilung mit einem definierten Konzentrationsminimum in der Zellmitte annimmt [8]. Da MipZ die Polymerisation von FtsZ hemmt, kann die Bildung des Divisoms

in der Folge ausschließlich im Zentrum der Zelle erfolgen.

Die polaren MipZ-Gradienten dienen somit als „molekulare Zollstöcke“, mit deren Hilfe die geometrische Mitte zwischen den als Fixpunkten dienenden Replikationsursprüngen definiert wird. Wie aber schafft es die Zelle, trotz der schnellen Diffusion von Proteinen im Zytoplasma diese Gradienten aufrechtzuerhalten? Der Schlüssel dazu sind vermutlich durch ATP-Bindung und -Hydrolyse regulierte Veränderungen im Interaktionsmuster und Diffusionsverhalten von MipZ, die momentan Gegenstand intensiver Untersuchungen sind.

Umorganisation der Zellwand während der Zellteilung

Nach der Positionierung von FtsZ an der Teilungsebene und der vollständigen Ausbildung des Divisoms beginnt die Zelle mit ihrer Einschnürung. Dabei müssen alle Schichten der

Zellhülle (innere Membran, Zellwand und äußere Membran) koordiniert separiert werden, um schließlich die beiden neuen Pole der Tochterzellen zu bilden (**Abb. 3A**). Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Umgestaltung der Zellwand dar. Diese muss an der Teilungsebene in einem Prozess kontinuierlicher Hydrolyse und Neusynthese verengt werden, ohne dass dabei Schwachpunkte entstehen, die zu einer Lyse der Zelle führen würden. Obwohl die daran beteiligten Enzyme zum Teil seit Langem bekannt sind, ist die Art und Weise, wie ihre räumliche Positionierung, ihre Aktivität sowie ihr Zusammenspiel gesteuert werden, weitgehend unklar.

Wir identifizierten zwei Proteine, die eine Schlüsselrolle bei der Umgestaltung der Zellwand während der Teilung von *C. crescentus* spielen. Eines davon weist Ähnlichkeiten mit dem aus *E. coli* bekannten Zellteilungsprotein FtsN auf, welches auf Sequenzebene nur

schwach konserviert ist und bisher als ein Spezifikum von Enterobakterien angesehen wurde (**Abb. 3B**). Die auf Struktur- und Funktionsanalysen beruhende Entdeckung des entsprechenden Pendanten in *C. crescentus* erlaubt es, Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur und Domänenzusammensetzung von FtsN-Homologen zu definieren [9]. Mithilfe von Datenbankanalysen konnte anschließend in fast jeder proteobakteriellen Spezies mindestens ein Protein mit vergleichbaren Eigenschaften detektiert werden. Da zellbiologische Analysen nahelegen, dass es sich bei diesen neu gefundenen Kandidaten ebenfalls um Zellteilungsproteine handelte (**Abb. 3C**), kann nun davon ausgegangen werden, dass FtsN-ähnliche Faktoren konservierte Komponenten des Zellteilungsapparats von Proteobakterien darstellen.

Was aber ist die Funktion von FtsN? Das Protein besitzt keine bekannten katalytischen Domänen und dient vermutlich als Adapter, der verschiedene Faktoren mit einer Funktion bei der Einschnürung von Zellwand und äußerer Membran zur Teilungsebene rekrutiert. Wir konnten in der Tat kürzlich eine potenzielle Hydrolase (DipM) identifizieren, die in *C. crescentus* durch FtsN an den Ort der Zellteilung gebracht wird [10]. Sie führt dort zum lokalen Abbau der Zellwand und trägt so maßgeblich zur graduellen Abschnürung der beiden Tochterzellen bei. Eine Inaktivierung von DipM zieht starke Zellteilungs- und Morphologiedefekte nach sich, die darauf beruhen, dass nun die innere Membran deutlich vor den äußeren Schichten der Zellhülle separiert wird (**Abb. 3D**). Eine effiziente Spaltung alten Zellwandmaterials durch hydrolytische Enzyme, die spezifisch mit dem Divisom assoziieren, scheint also wesentlich zum reibungslosen Ablauf des Teilungsprozesses beizutragen.

Neben DipM gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, denen eine Funktion als Zellwand-Hydrolase zugeschrieben wird. Die genaue Aktivität dieser Faktoren und ihre Bedeutung für die Zellteilung sind weitgehend unbekannt. Auch die Mechanismen, die für die Koordination von lytischen

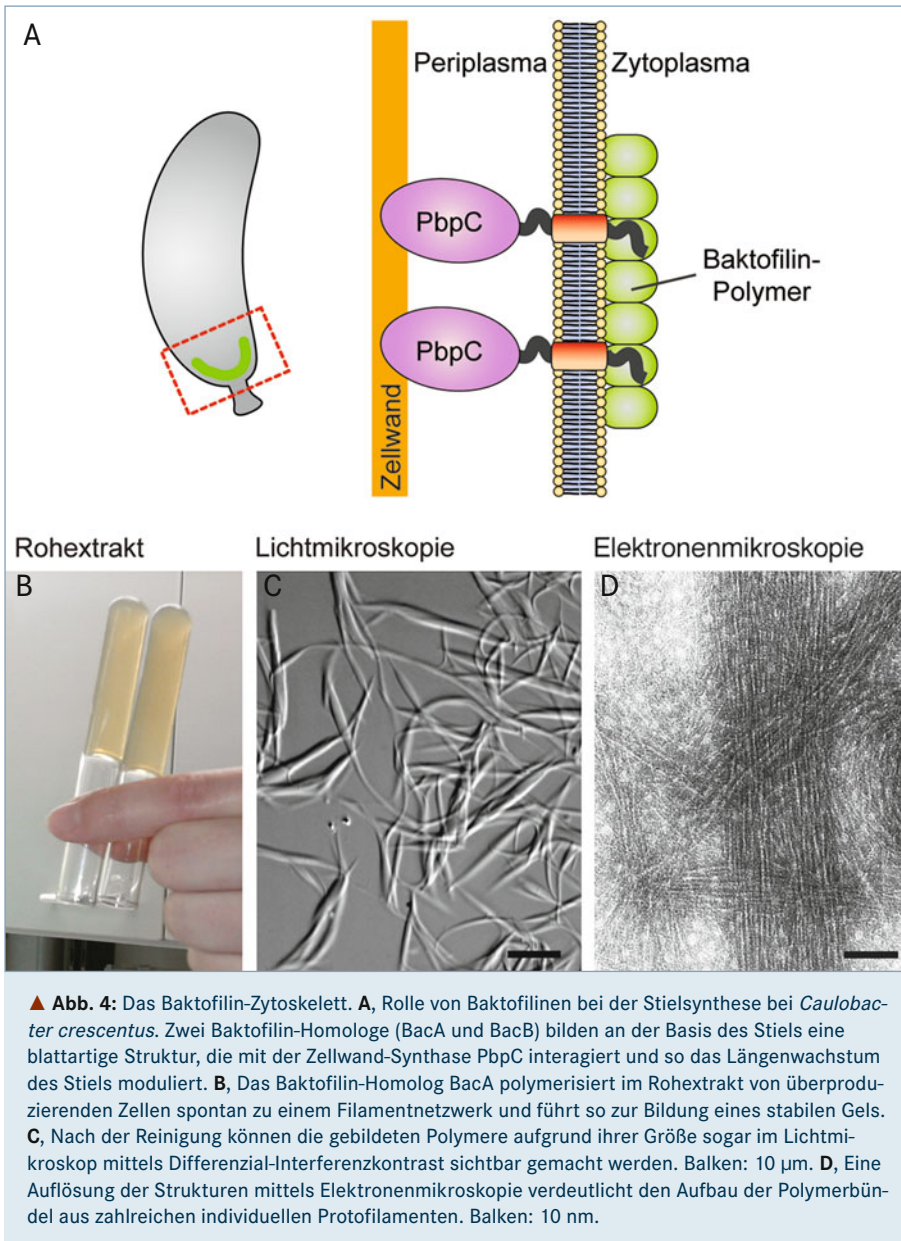
und synthetischen Enzymaktivitäten verantwortlich sind, sowie die Rolle von FtsN in diesem Prozess bedürfen noch intensiver Forschung.

Regulation der Morphogenese

Neben der mit dem Teilungsprozess verbundenen Zellwandbiosynthese existiert in stäbchenförmigen Bakterien meist ein weiterer, vom Divisom unabhängiger Wachstumsmodus. Dieser wird durch Polymere des Aktin-Homologs MreB gesteuert und führt zum punktuellen Einsetzen von neuem Zellwandmaterial entlang der gesamten Längsachse der Zelle. In *C. crescentus* wird das Wachstum der Zellwand durch das Intermediärfilament-Protein Crescentin einseitig verlangsamt, wodurch die typische Sichelform dieser Spezies zustande kommt [4].

Ein weiteres Charakteristikum von *C. crescentus* ist sein Stiel, welcher eine von der normalen Zellhülle umgebene Ausstülpung des Zellkörpers darstellt. Die Suche nach Faktoren, die an der Stielbiogenese beteiligt sind, führte kürzlich zur Entdeckung einer weiteren Klasse von Zytoskelettproteinen, die wir Baktofiline taufte [11]. Zwei Baktofilin-Homologe von *C. crescentus* werden an die Basis des Stiels rekrutiert, wo sie als Lokalisationsfaktor für eine Zellwand-Synthase dienen, die am Längenwachstum des Stiels beteiligt ist (**Abb. 4**). Überexpressionsexperimente ergaben erste Hinweise auf die polymere Natur der Baktofiline. Wurde ihre Konzentration in der Zelle stark erhöht, dehnten sich die normalerweise punktförmigen Komplexe zu langen filamentartigen Strukturen aus, die an der inneren Membran entlang verliefen und zu einer starken Verzerrung der Zellform führten. Tatsächlich lagern sich die Proteine auch in gereinigter Form spontan zu ausgedehnten Polymernetzwerken zusammen, die sogar im Lichtmikroskop deutlich zu erkennen sind.

Baktofiline sind bei Bakterien weit verbreitet. Untersuchungen an Homologen aus anderen Spezies bestätigten, dass sie generell polymerbildende Eigenschaften besitzen, aber deutliche Unterschiede in der zellulären Verteilung der gebildeten Filamente aufweisen können [11]. Es wird sehr auf-



▲ **Abb. 4:** Das Bactofilin-Zytoskelett. **A,** Rolle von Bactofilinen bei der Stielsynthese bei *Caulobacter crescentus*. Zwei Bactofilin-Homologe (BacA und BacB) bilden an der Basis des Stiels eine blattartige Struktur, die mit der Zellwand-Synthese PbpC interagiert und so das Längenwachstum des Stiels moduliert. **B,** Das Bactofilin-Homolog BacA polymerisiert im Rohextrakt von überproduzierenden Zellen spontan zu einem Filamentnetzwerk und führt so zur Bildung eines stabilen Gels. **C,** Nach der Reinigung können die gebildeten Polymere aufgrund ihrer Größe sogar im Lichtmikroskop mittels Differenzial-Interferenzkontrast sichtbar gemacht werden. Balken: 10 µm. **D,** Eine Auflösung der Strukturen mittels Elektronenmikroskopie verdeutlicht den Aufbau der Polymerbündel aus zahlreichen individuellen Protofilamenten. Balken: 10 nm.

schlussreich sein, das Funktionsspektrum dieser neuartigen Zytoskelettproteine zu analysieren und ihre Dynamik sowie die Mechanismen ihrer Positionierung zu untersuchen.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich auf meinem bisherigen wissenschaftlichen Weg begleitet, gefördert und geprägt haben. Hervorheben möchte ich dabei August Böck und Lucy Shapiro, in deren Gruppen ich viele spannende

und lehrreiche Jahre verbringen konnte, sowie meine Marburger Kollegen, die mir die Rückkehr nach Deutschland und den Übergang in die Selbstständigkeit leicht gemacht haben. Mein herzlicher Dank gilt außerdem allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Gruppe, ohne deren Engagement die hier vorgestellten Arbeiten nicht möglich gewesen wären. ■

Literatur

- [1] Thanbichler M, Shapiro L (2008) Getting organized – how bacteria move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol* 6:28–40
- [2] Shapiro L, McAdams HH, Losick R (2009) Why and how bacteria localize proteins. *Science* 326:1225–1228
- [3] Thanbichler M (2009) Spatial regulation in *Caulobacter crescentus*. *Curr Opin Microbiol* 12:715–721
- [4] Cabeen MT, Jacobs-Wagner C (2010) The bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Genet* 44:365–392
- [5] Lutkenhaus J (2007) Assembly of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76:539–562
- [6] Thanbichler M (2010) Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000331
- [7] Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT et al. (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9257–9262
- [8] Thanbichler M, Shapiro L (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126:147–162
- [9] Möll A, Thanbichler M (2009) FtsN-like proteins are conserved components of the cell division machinery in proteobacteria. *Mol Microbiol* 72:1037–1053
- [10] Möll A, Schlimpert S, Briegel A et al. (2010) DipM, a new factor required for peptidoglycan remodeling during cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 77:90–107
- [11] Kühn J, Briegel A, Mörschel E et al. (2010) Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* 29:327–339

Korrespondenzadresse:

Dr. Martin Thanbichler
Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10
D-35037 Marburg
Tel.: 06421-178300
Fax: 06421-178229
thanbichler@mpi-marburg.mpg.de
www.mpi-marburg.mpg.de/thanbichler

AUTOR



Martin Thanbichler

1992–1998 Biologiestudium an der LMU München. 1998–2002 Promotion an der LMU München. 2002–2006 Postdoc an der Stanford University, CA, USA. Seit 2007 Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Seit 2008 Juniorprofessor für Mikrobiologie an der Universität Marburg.