

Strukturbiologie

Angepasste Individualisten: Bakterielle Transporter im Osmostress

CHRISTINE ZIEGLER

ABTEILUNG FÜR STRUKTURBIOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK
FRANKFURT A. M.

Bakterien sind ständig Osmostress ausgesetzt. In der bakteriellen Osmoadaptation spielen spezifische Osmolyt-Membrantransporter eine wichtige Rolle. Der Betain-Transporter BetP ist dabei ein Paradebeispiel, um die komplexen Mechanismen von Osmosensing und -regulation zu verstehen.

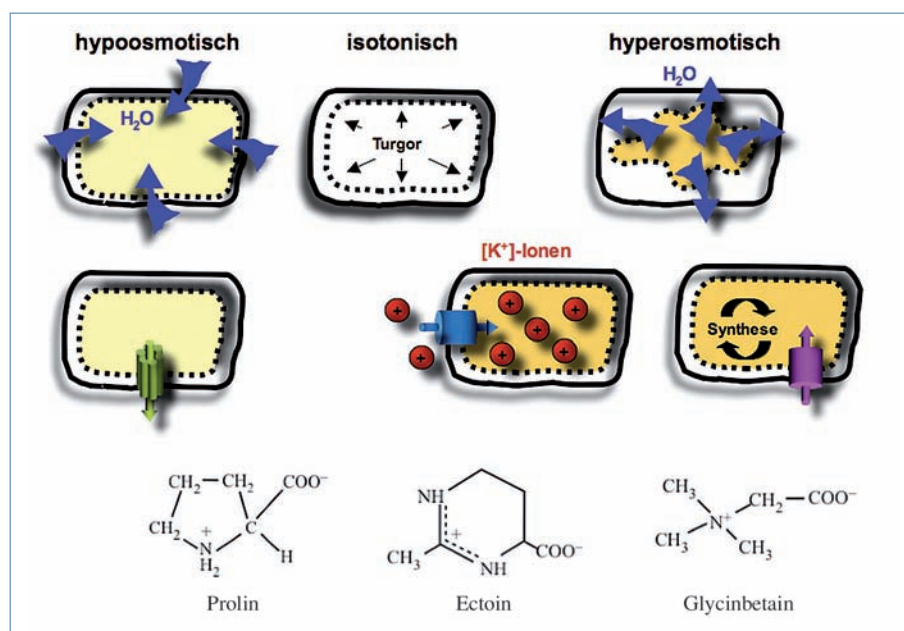
Dryness and sudden rainfalls frequently expose bacteria to osmotic stress. High specific osmolyte membrane transporters play a key role in bacterial osmoadaptation. The betaine transporter BetP is a paradigm to understand the complex mechanism of osmosensing and osmoregulation.

Osmostress in Bakterien

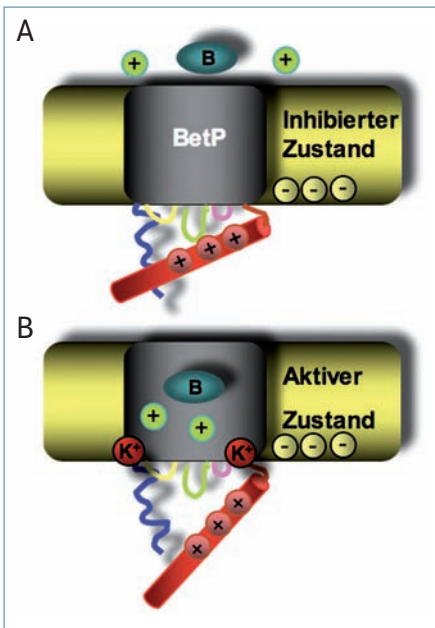
■ Bakterien sind in ihren Habitaten ständig osmotischem Stress ausgesetzt und vor allem Bakterien der oberen Bodenschichten, wie z. B. *Corynebacterium glutamicum*, werden davon tangiert. Der starke Einfluss der externen Osmolalität auf ein Bakterium lässt sich durch die selektive Permeabilität seiner Zytoplasmamembran erklären. Während sie für Wasser durchlässig ist, stellt sie für Makromoleküle und geladene Teilchen eine unüberwindbare Permeabilitätsbarriere dar. Komplementär zum hohen osmotischen Potenzial im Zytoplasma ist das Wasserpotenzial sehr niedrig. Diffundierende Wassermoleküle verursachen einen hydrostatischen Druck, den Zellturgor, der die Zytoplasmamembran gegen die Zellwand drückt, um dem einströmenden Wasser entgegenzuwirken. Der Wasserstrom kommt zum Erliegen sobald Zellturgor und osmotisches Potenzial gleich groß sind (isotonische Bedingungen, **Abb. 1**). Variationen im Zellturgor können lebensbedrohliche mechanische Kräfte erzeugen, die Zellteilung und Wachstum maßgeblich beeinflussen. Daher haben Bakterien im Laufe der Evolution effektive Mechanismen entwickelt, um unter allen Umständen den Turgordruck konstant zu halten. Unter hypoosmotischen Bedingungen (**Abb. 1**) kommt es aufgrund des erhöhten Konzentrationsgefälles über die Zytoplasmamem-

bran zu einem massiven Anstieg des Turgordrucks. Die Zelle droht zu platzen. Um diesem Szenario entgegenzuwirken, muss

das Bakterium das osmotische Potenzial im Zytoplasma rasch reduzieren. Eine weit verbreitete Strategie ist die Freisetzung von Ionen und osmotisch wirksamen Substanzen durch die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle. Erhöht sich die externe Osmolalität unter hyperosmotischen Bedingungen, sinkt das externe Wasserpotenzial, und Wassermoleküle diffundieren entlang des osmotischen Gradienten aus der Zelle heraus (**Abb. 1**). Der Zellturgor sinkt. Die Dehydrierung bedingt eine Änderung der zytoplasmatischen Wasserstruktur und der funktionell wichtigen Hydrathülle zytoplasmatischer Proteine. Um dem entgegenzuwirken, akkumulieren einige Bakterien Kalium-Ionen (K^+) im Zytoplasma. Dies ist nur bedingt möglich, da eine hohe zytoplasmatische Ionenstärke den Zellstoffwechsel negativ beeinträchtigen

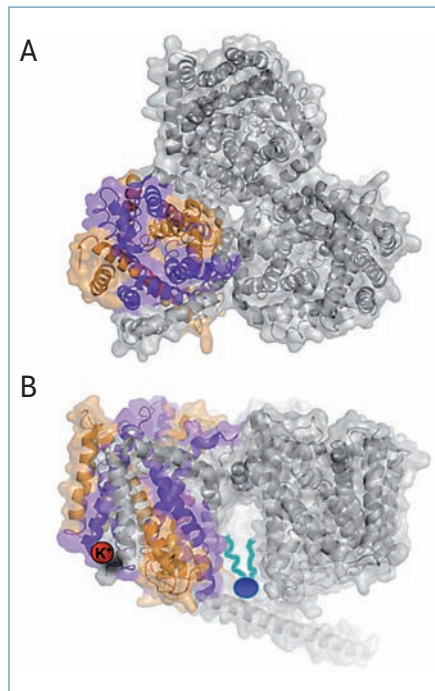


▲ **Abb. 1:** Unter isotonischen Bedingungen sind Zellturgor und osmotisches Potenzial gleich groß. Unter hypoosmotischen Bedingungen kommt es zu einem Wassereinstrom, dem die Zelle durch Aktivierung mechanosensitiver Kanäle (grünes Symbol) entgegnet. Unter hyperosmotischen Bedingungen diffundieren Wassermoleküle entlang des osmotischen Gradienten aus der Zelle heraus. Um dem entgegenzuwirken, werden zuerst K^+ -Ionen und im Folgenden sogenannte kompatible Solute akkumuliert. Kompatible Solute können entweder synthetisiert oder durch spezifische Transportsysteme (violettes Symbol) eingeschleust werden. Prolin, Ectoin und Glycinbetain, auch Betain genannt, sind die am häufigsten vorkommenden kompatiblen Solute.



▲ **Abb. 2:** Aktivierung des Na^+ /Betain-Symporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* **A**, Die positiv geladenen Arginin-Cluster in der C-terminalen Domäne (rot) von BetP wechselwirken unter inhibierenden Bedingungen mit Aminosäureresten in den zytoplasmatischen Loops. Sensing und Regulation über die C-terminale Domäne ist von deren Sekundärstruktur abhängig, welche durch die negativ geladenen Phospholipide in der Membran (gelbe Kreise) stabilisiert wird. **B**, BetP wird bei einer bestimmten zytoplasmatischen K^+ -Konzentration (> 220 mM) aktiviert. N-terminale Domäne: blau; Loop 2: gelb; Loop 4: grün; Loop 8: pink; b: Beatin; + (grün): Natriumionen.

würde. Im weiteren Verlauf der Stressantwort wird Kalium durch sogenannte kompatible Solute ersetzt. Zu ihnen gehören die in **Abbildung 1** dargestellten organischen Substanzen Prolin, Ectoin und Glycinbetain. Kompatible Solute bieten den Vorteil, dass sie selbst in molaren zytoplasmatischen Konzentrationen den zellulären Stoffwechsel nicht beeinflussen. Da sie nahezu keine Wechselwirkung mit der Hydrathülle von Proteinen eingehen, erhöhen sie die lokale Wasserkonzentration an der Proteinoberfläche, was zu einer Stabilisierung der kompakten, nativen Konformation führt. Manche Bakterien sind in der Lage, kompatible Solute zu synthetisieren. Schneller und energetisch günstiger ist die externe Aufnahme über osmotisch regulierte Transportsysteme. Transporter spielen eine Schlüsselrolle in der bakteriellen Osmoadaptation. Da ihre Substrate bevorzugt vom Proteinrückgrat ausgeschlossen sind ist der Osmolyt-Transport ein hochinteressantes Phänomen.



▲ **Abb. 3:** Röntgenstruktur von BetP bei einer Auflösung von 3,35 Å. **A**, Aufsicht auf das BetP-Trimer von der periplasmatischen Seite. **B**, Seitenansicht auf zwei Monomere im Trimer. Negativ geladene Phospholipide (blauer Kreis) können in der hydrophoben Kavität zwischen den Monomeren binden. Bindung von K^+ -Ionen (roter Kreis) erzeugt eine Reorientierung der C-terminalen Domäne.

Osmoregulierte Transporter

Ein Bakterium kann mehrere regulierte Transportsysteme mit unterschiedlichen Substrataffinitäten und Substratspektren, um die höchstmögliche Flexibilität zu gewährleisten. Wie sind nun diese Transporter in der Lage, osmotischen Stress wahrzunehmen und ihre Aktivität entsprechend zu adaptieren, und welches externe Signal dient als Trigger? Unabhängige Untersuchungen an osmoregulierten Transportern zeichnen ein kontroverses Bild [1], und die Liste der osmotischen Reize ist lang und beinhaltet beispielsweise sinkenden Zellturgor, Ionenstärke, Wasseraktivität und Membranspannung. Bisher wurden nur drei Transportsysteme im Detail untersucht: der Na^+ /Betain-Symporter BetP aus *C. glutamicum*, der H^+ /Prolin-Symporter ProP aus *Escherichia coli* und der ABC-Transporter OpuA aus *Lactococcus lactis*, wobei jeder dieser Transporter das Problem der Osmoadaptation scheinbar auf sehr individuelle Art und Weise löst. Erst durch die Röntgenstruktur von BetP [2] war es möglich, einen Teil der Unterschiede in regulativen Mechanismen zu erklären.

Regulation in BetP

Die hervorstechende Eigenschaft von BetP ist die Kalium-abhängige Aktivierung unter hyperosmotischem Stress [3]. Negativ geladene Phospholipide haben einen zusätzlichen Einfluss auf die Aktivierung von BetP. Je mehr negative Lipide in Kontakt zu BetP stehen, desto höher ist die zur Aktivierung benötigte zytoplasmatische K^+ -Konzentration. BetP besitzt jeweils 50 bis 55 Aminosäuren lange hydrophile C- und N-terminale Domänen. Beide Domänen sind direkt in die Transporteraktivierung involviert (**Abb. 2A, B**, [3]). Die C-terminale Domäne konnte als Osmosensor identifiziert werden, welcher in der Lage ist, die zytoplasmatische K^+ -Konzentration zu detektieren und entsprechend dazu den Transport zu inhibieren. Dabei wechselwirken positiv geladene Arginin-Cluster in der C-terminalen Domäne mit Aminosäureresten in zytoplasmatischen Loops (**Abb. 2A**). Sensing und Regulation über die C-terminale Domäne ist von deren Sekundärstruktur abhängig, wobei negativ geladene Lipide stabilisierend wirken. Obwohl die Protagonisten der Transportaktivierung scheinbar bekannt waren, setzten sich alle Mosaiksteinchen erst mithilfe der Struktur zu einem konsistenten Bild zusammen. Kryo-Elektronenmikroskopie an zweidimensionalen Kristallen zeigte, dass BetP ein asymmetrisches Trimer bildet [4]. Die unterschiedlichen Zustände der Monomere bestätigt die funktionelle Bedeutung des Trimers (**Abb. 3A**), und tatsächlich ist der trimere Zustand Dreh- und Angelpunkt der Aktivierung. Die C-terminale Domäne besitzt eine α -helikale Struktur und ragt weit in die zytoplasmatische Seite des benachbarten Monomers (**Abb. 3B**), wo sie mit Loops interagiert, welche wiederum in direktem Kontakt zu Strukturelementen stehen, die den Transport steuern. Aktivierung von BetP lässt sich durch Orientierungs- und Konformationsänderungen der C-terminalen Domäne beschreiben [5]. Negativ geladene Lipide binden in der hydrophoben Kavität der Trimer-Kontaktfläche und beeinflussen zusammen mit der N-terminalen Domäne und spezifisch gebundenen K^+ -Ionen die Stärke der Interaktionen der C-terminalen Domäne eines Monomers mit zytoplasmatischen Loops im Nachbarmonomer. Diese Interaktion erfolgt unabhängig in jedem Monomer, was zu der beobachteten Asymmetrie im Trimer führt. Durch eine gegenseitige Kopplung der Monomere könnten individuell einzelne Monomere vom Transport ausgeschlossen oder dazu geschaltet werden.

Zusammenfassung und Perspektiven

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen erstmals, wie ein Osmolyt-Transporter osmotischen Stress wahrnimmt, verarbeitet und seine Transportaktivität entsprechend moduliert. Sie zeigen aber auch, dass die Wahrnehmung von osmotischem Stress und die Regulation der Transportaktivität mit Strukturelementen von BetP verknüpft sind, die in dieser Art nicht in anderen osmoregulierten Transportsystemen zu finden sind.

Es stellt sich daher die Frage, ob dieser Regulationsmechanismus auch auf andere Transportsysteme anwendbar ist. Ähnliche Konzepte deuten sich bereits jetzt schon an, wie C-terminale Interaktionen und Abhängigkeiten von Lipiden.

Danksagung

Unsere Arbeiten werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt (Sonderforschungsbereich 807). ■

Literatur

- [1] Krämer R (2009) Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 37:487–497
- [2] Ressler S, Terwisscha van Scheltinga AC, Vornheim C et al. (2009) Molecular basis of transport and regulation in the Na(+)/betaine symporter BetP. *Nature* 458:47–52
- [3] Ott V, Koch J, Späte K et al. (2008) Regulatory properties and interaction of the C- and N-terminal domains of BetP, an osmoregulated betaine transporter from *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemistry* 47:12208–12218
- [4] Ziegler C, Morbach S, Schiller D et al. (2004) Projection structure and oligomeric state of the osmoregulated sodium/glycine betaine symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Biol* 337:1137–1147
- [5] Krämer R, Ziegler C (2009) Regulatory interactions of the osmosensing C-terminal domain in the trimeric glycine betaine transporter BetP from *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem* 390:685–691

Korrespondenzadresse:

Dr. Christine Ziegler
 Max-Planck-Institut für Biophysik
 Abteilung Strukturbiologie
 Max-von-Laue-Straße 3
 D-60438 Frankfurt a. M.
 Tel.: 069-6303-3054
 Fax: 069-6303-2209
 Christine.Ziegler@biophys.mpg.de

AUTORIN



Christine Ziegler

Jahrgang 1967. 1986–1991 Physikstudium an der TU Darmstadt. 1992–1996 Dissertation an der GSI Darmstadt/TU Kassel. 1997–1999 Postdoc am Protonentherapie-Zentrum in Orsay, Frankreich. 2000–2002 Postdoc am MPI für Biophysik in Frankfurt a. M. Seit 2002 Gruppenleiter am MPI für Biophysik in Frankfurt a. M.