Membrantransport und Kaliumhomöostase

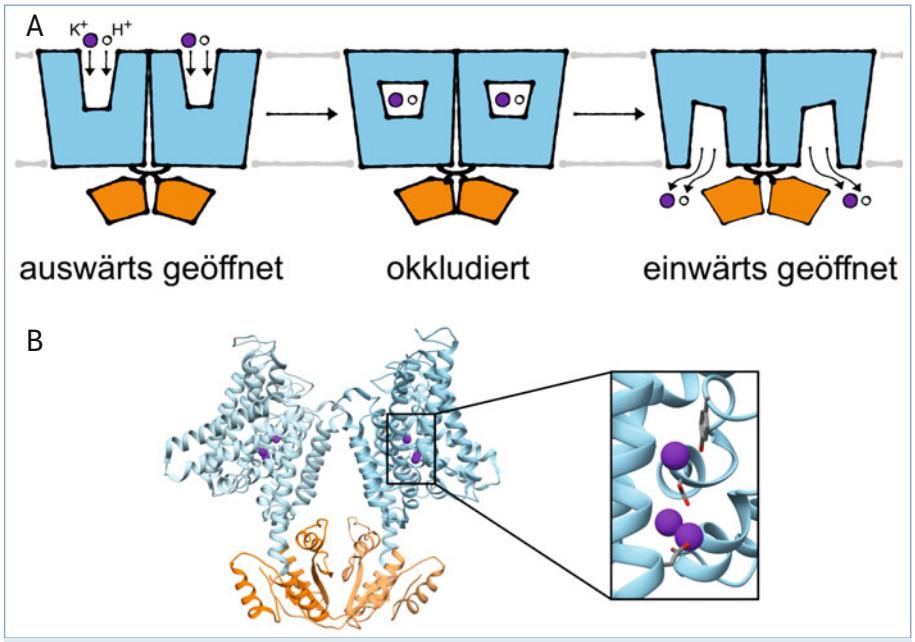
Wie Bakterien die Aufnahme von Kaliumionen regulieren

JAKOB M. SILBERBERG, INGA HÄNELT
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

K^+ plays an essential role in a different cellular processes in bacteria, and is a central player in microbial adaptation towards a number of environmental challenges. Accordingly, K^+ transporters are subject to tight regulation by a diverse set of mechanisms. Here, we discuss three regulatory strategies from three transport systems, as well as the general regulation of K^+ homeostasis by the second messenger c-di-AMP.

DOI: 10.1007/s12268-022-1748-z
© Die Autorinnen und Autoren 2022

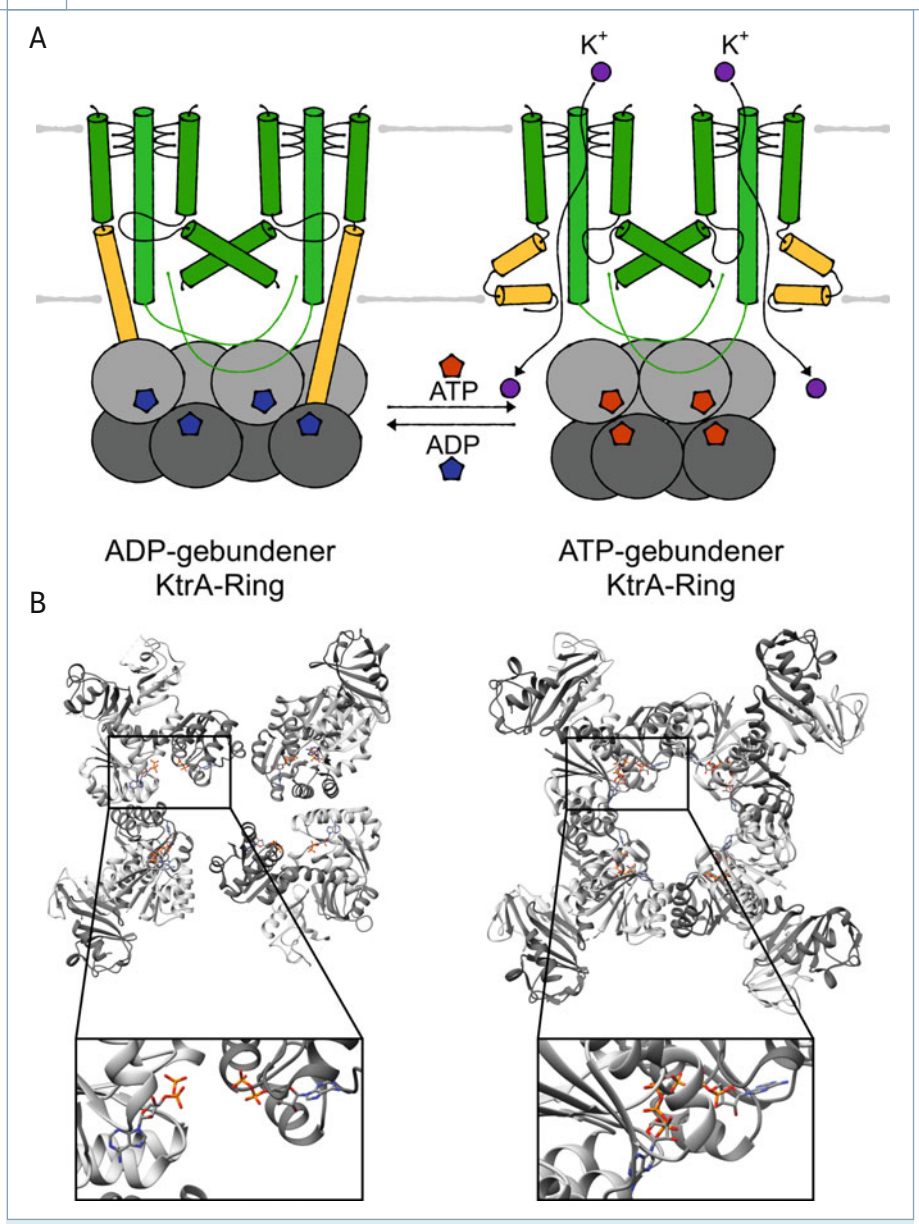
■ Bakterien sind in einer Vielzahl von Umgebungen überlebensfähig und haben es so geschafft, beinahe jedes mögliche Milieu zu erobern. Hierbei müssen sie verschiedenste Hürden überwinden – von extremen Temperaturen oder Trockenheit über saure oder alkalische pH-Werte bis zu hypo- oder hyperosmotischen Umgebungen. Ein Molekül, das zunehmend als zentral in der bakteriellen Adaption betrachtet wird, ist K^+. K^+ spielt eine wichtige Rolle in der Osmoadaption, der Trockenheitsresistenz und der pH-Regulation, bei der Proteinbiosynthese und der Aktivität verschiedener Enzyme sowie in der Homöostase des Membranpotenzials und möglicherweise der damit verbundenen elektrischen Kommunikation. Entsprechend muss das K^+-Niveau in der Zelle strengstens reguliert werden; sowohl zu niedrige als auch zu hohe intrazelluläre Kaliumkonzentrationen sind über einen längeren Zeitraum tödlich. Diverse Membranproteine, die K^+ in die Zelle ein- oder ausschleusen, sorgen für die Kaliumhomöostase, wobei die individuellen Systeme gezielt aktiviert oder inaktiviert bzw. synthetisiert oder abgebaut werden müssen, um eine genaue Abstimmung zu gewährleisten [1]. Hier betrachten wir anhand dreier Systeme verschiedene Regulationsmechanismen, durch die die Kaliumtransportsysteme gesteuert werden, um ihre spezifischen physiologischen Rollen zu erfüllen.



▲ **Abb. 1:** Regulation des K^+/H^+-Symporters KimA mittels Substratinhibition. **A,** Den aktiven Transport von Kaliumionen gegen einen Konzentrationsgradienten stellt KimA sicher, indem es den vorhandenen einwärtsgerichteten Protonengradient nutzt. Der okkludierte Zustand verhindert dabei, dass der Transporter jemals zu beiden Seiten gleichzeitig geöffnet wird, da so Ionen, wie durch einen Kanal, entlang ihres Gradienten hindurchschlüpfen könnten, was die Effizienz des Transports drastisch verringern würde. **B,** Kryo-EM-Struktur [6S3K] mit vergrößertem Ausschnitt der substratinhibierten Bindestelle. Transmembrandomänen türkis, cytoplasmatische Domänen orange.

Regulation des K^+/H^+-Symporters KimA durch Substratinhibition

Die einfachste Taktik zur Steuerung des K^+-Transports ist die direkte Regulation durch das intrazelluläre K^+ selbst. Ein Beispiel für diese Taktik findet sich im sekundär aktiven Transporter KimA (K^+-Importer), der durch Rückkopplungshemmung über K^+ reguliert wird. KimA aus *Bacillus subtilis* ist ein K^+/H^+-Symporter der KUP-Superfamilie, der mit einer apparenten Affinität von 0,2 mM für K^+ dessen Aufnahme bei moderaten K^+-Konzentrationen besonders in sauren Umgebungen bewerkstelligt [2, 3]. KimA bildet ein Homodimer, wobei jedes Monomer funktional in zwei Domänen unterteilt werden kann: eine kaliumtransportierende Transmembrandomäne und eine regulatorische cytoplasmatische Domäne. Beide Transmembrandomänen transportieren Kaliumionen und Protonen mittels eines Kippschalter-Mechanismus: Die Ionen binden von der Außenseite an die durch negativ geladene und aromatische Seitenketten gebildeten Bindestellen. Zu dieser Zeit ist der Transporter nach innen verschlossen. Die Ionenbindung bewirkt, dass die Transmembrandomänen in eine einwärtsgerichtete Konformation alternieren, also das äußere Gate schließt, während das innere öffnet. Nach der Abgabe des Substrats alter-



▲ **Abb. 2:** Metabolitregulation des Kaliumkanals KtrAB. **A**, Gating-Mechanismus von KtrAB. Im ADP-gebundenen Zustand nimmt der KtrA-Ring (grau) eine ovale Konformation ein, in der die verlängerten Helices (gelb) stabilisiert werden. Diese wiederum halten die den Kaliumfluss kontrollierenden Intramembranschleifen in der Kanal-Untereinheit KtrB (grün) in ihrer geschlossenen Konformation. Bei z. B. Salzstress steigt die zelluläre ATP-Konzentration. ATP verdrängt ADP im KtrA-Ring, wodurch dieser eine runde Konformation einnimmt. Hierdurch brechen die verlängerten Helices und die Gating-Schleifen erlauben den Kaliumfluss. KtrA grau, KtrB grün mit verlängerten Helices gelb. **B**, Kristallstrukturen von KtrA im ovalen, ADP-gebundenen Zustand [4J91] und im runden, ATP-gebundenen Zustand [4J90] mit vergrößerten Ausschnitten der Nukleotidbindung.

niert KimA zurück in die auswärtsgerichtete Konformation (**Abb. 1A**). Dieser Transport würde fortgesetzt, solange es das elektrochemische Potenzial erlaubt, was unter vielen Bedingungen dazu führen würde, dass sich die Zellen mit zu hohen Kaliumkonzentrationen vergiften. Um dies zu verhindern, untersteht KimA einer substratmodulierten *trans*-Inhibition: Kaliumionen binden in der zum Cytoplasma geöffneten Konformation unterhalb der Kaliumbindestelle (**Abb. 1B**). Hierdurch wird die Abgabe weiterer Kaliumionen ins Cytoplasma verhindert und KimA in der einwärtsgerichteten Konformationen eingefroren. Der K^+-Spiegel in der Zelle reguliert also selber direkt den K^+-Transport [2].

Metabolitregulierte K^+-Aufnahme durch den Kaliumkanal KtrAB

Während Substratkontrolle wichtig für eine sehr schnelle und direkte Regulation ist, wird eine robustere Kontrolle von Transportern und Kanälen über Metaboliten ermöglicht, die auch, aber nicht ausschließlich den K^+-Spiegel der Zelle reflektieren können. Ein solcher Liganden-gesteuerter Kanal ist KtrAB (K^+-Transporter). Mit einer apparenten Affinität von 50–100 µM ist KtrAB aus *Vibrio alginolyticus* bzw. *B. subtilis* das favorisierte Kaliumaufnahmesysteme bei moderatem Osmo- und pH-Stress [4, 5]. Anders als in eukaryotischen Zellen, wo das Membranpotenzial über die Membranpermeabilität für K^+ und Na^+ bestimmt wird, definiert in Bakterien hauptsächlich H^+ das Membranpotenzial, da die protonengekoppelte Respiration den größten Beitrag zum Ionenverkehr über die Membran beiträgt. Dadurch entsteht ein elektrischer Gradient, durch den auch Ionenkanäle wie KtrAB K^+ gegen den Konzentrationsgradienten akkumulieren können [1]. KtrAB besteht aus zwei membranständigen Kanaluntereinheiten (KtrB), die auf der cytoplasmatischen Seite mit einem oktameren Ring aus KtrA assoziiert sind. KtrB besitzt einen für K^+-Kanäle typischen Selektivitätsfilter, der jedoch von der kanonischen Aminosäuresequenz (TVGYG) abweicht und nur eine K^+-Bindestelle aufweist [6]. Direkt unter dem Selektivitätsfilter liegt eine Intramembranschleife, die durch eine gebrochene Transmembranhelix gebildet wird. Zusammen mit einem konservierten Arginin blockiert diese Schleife als Gate die Pore des Kanals im geschlossenen Zustand und verhindert den K^+-Fluss [7]. Zum Öffnen des Kanals muss sich also die Intramembranschleife verschieben, um K^+ durch die Pore fließen zu lassen. Dieses Öffnen und das effiziente Verschließen der Poren in KtrB werden durch den KtrA-Ring reguliert: Im geschlossenen Zustand hat der Ring ADP gebunden und nimmt eine ovale Konformation ein. Diese stabilisiert zwei verlängerte Transmembranhelices der Kanaluntereinheiten, welche wiederum die Intramembranschleife in einer geschlossenen Konformation stabilisieren [8]. Bei Salzstress steigen die zelluläre ATP- und vermutlich auch die Na^+-Konzentration transient an. Die Verschiebung des ADP-zu-ATP-Gleichgewichts führt, begünstigt durch ein weiteres, vermutlich membranvermitteltes Signal, zum Austausch des gebundenen ADPs zu ATP. Weiterhin bindet die Kanaluntereinheit Natriumionen [9]. Die ATP-Bindung ruft eine drastische Konformationsänderung im KtrA-Ring hervor: Der Ring adaptiert eine quadratische Struktur, welche die verlängerten Helices brechen lässt [6, 10]. Durch die Natriumbindung stabilisiert ein bislang unklarer Mechanismus schließlich die Intramembranschleife in der geöffneten Konformation (**Abb. 2**). Bei Wiederherstellung des K^+-Gleichgewichts und Absinken der intrazellulären Na^+-Konzentration bindet KtrA wieder ADP und Na^+ dissoziiert möglicherweise

ab, sodass sich der Kanal wieder schließt. Der K^+-Strom durch KtrAB wird also direkt durch die Bindung eines häufigen Metaboliten und eines Ions im Cytoplasma als Signalmoleküle kontrolliert.

Regulation der Pumpe KdpFABC auf transkriptionaler und posttranslationaler Ebene

Die bislang betrachteten Systeme sind verantwortlich für die „alltägliche" K^+-Aufnahme, wofür sie mit ihren moderaten Affinitäten gut geeignet sind. Sinken die Kaliumkonzentrationen der Umgebung jedoch ins Extreme (niedrige mikromolare Konzentrationen) wird ein potenteres Aufnahmesystem benötigt. Diese Rolle füllt in *Escherichia coli* KdpFABC (*K⁺-dependent P-type ATPase*) aus, ein Komplex der K^+ mit einer apparenten Affinität von 5 µM aktiv in die Zelle pumpt. KdpFABC besteht aus der P-Typ-ATPase KdpB und dem kanalähnlichen KdpA sowie den zusätzlichen Untereinheiten KdpF und KdpC. Der Transportprozess wird durch die P-Typ-ATPase bestimmt und folgt dem Post-Albers-Zyklus, der aus den nach außen und innen geöffneten Konformation E1 und E2 sowie den phosphorylierten Intermediaten E1-P und E2-P besteht. Im E1-Zustand tritt K^+ in den Komplex ein, wobei Kanaluntereinheit KdpA über einen Selektivitätsfilter die hohe Spezifität vermittelt. Direkt unterhalb des Selektivitätsfilters werden die Ionen durch ein konserviertes Arginin in einen KdpA mit KdpB verbindenden Tunnel geleitet, der waagerecht zur Membran bis zur kanonischen Substratbindestelle (CBS) in der Transmembrandomäne von KdpB führt. Der Eintritt von Ionen in die CBS wird detektiert und an die cytosolischen N(*Nucleotide binding*)-, P(*Phosphorylation*)-, und A(*Actuator*)-Domänen von KdpB weitergeleitet. Zwischen den N- und P-Domänen wird ATP hydrolysiert, wobei Asp_{307} in der P-Domäne phosphoryliert wird (E1-P-Intermediat). Dieser energiereiche Zustand ist instabil und zerfällt, unter großen Umlagerungen in KdpB, in den nach innen offenen E2-P-Zustand, in dem K^+ in die Zelle entlassen wird. Schließlich dephosphoryliert die A-Domäne über ein konserviertes TGES-Motif die P-Domäne (E2-Zustand), wonach der Transporter wieder in den E1-Zustand zurückkehrt (**Abb. 3A**, [11–13]).

Wegen der hohen Affinität und des aktiven Transports ist es wichtig, dass KdpFABC so reguliert wird, dass es nur bei akutem K^+-Mangel aktiv ist. Dies wird ermöglicht durch Regulation auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene. Da KdpFABC nur unter extremem K^+-Mangel benötigt wird, wird der Transporter auch nur unter den Bedingungen produziert. Hierzu wird das *kdpFABC*-Operon durch das Zwei-Komponenten-System KdpDE kontrolliert. KdpD ist eine membranständige Sensorkinase, die intra- und extrazelluläre K^+-Konzentration detektiert. Bei geringen K^+-Konzentrationen phosphoryliert sie den Transkriptionsfaktor KdpE, der daraufhin die Transkription von *kdpFABC* aktiviert. Bei wiederhergestellten K^+-Konzentrationen dephosphoryliert KdpD den Transkriptionsfaktor wieder, um weitere, unnötige Transkription zu verhindern. Die Produktion des Transporters ist also direkt an den K^+-Bedarf der Zelle gekoppelt [14].

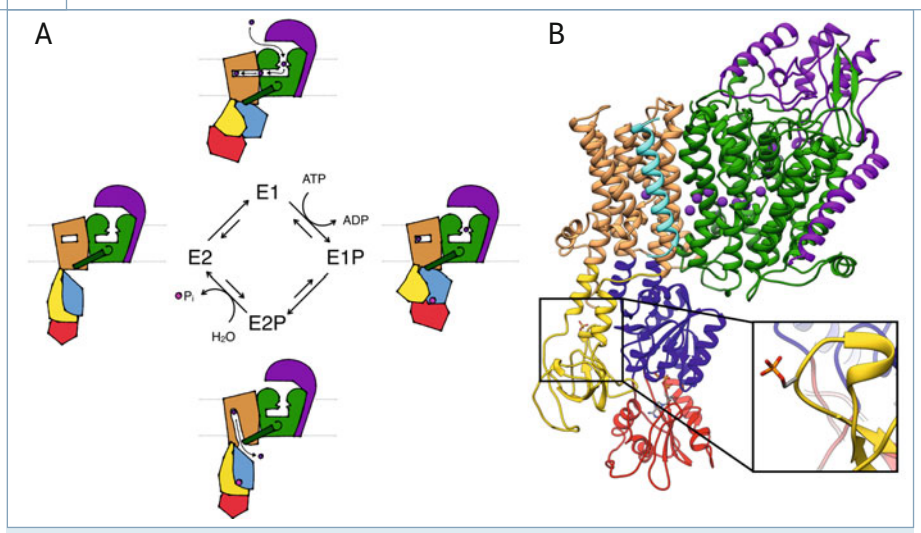
Doch selbst das vorhandene KdpFABC würde ausreichen, um die Zellen mit Kalium zu vergiften, es muss also abgeschaltet werden. Dies wird erreicht durch eine K^+-abhängige Phosphorylierung von Ser_{162} im TGES-Motif von KdpB, welches für die Dephosphorylierung des E2-P-Zustands verantwortlich ist. Diese Phosphorylierung verhindert die Annäherung der A- und P-Domänen im E2-P-Zustand und arretiert die ATPase somit im E1-P-Zustand, wodurch kein weiteres K^+ aufgenommen wird (**Abb. 3B**, [15]). Welche Kinase diese Phosphorylierung vermittelt und wie der Komplex im eigentlich instabilen E1-P-Zustand gehalten werden kann, ist bislang unklar. Solche posttranslationalen Modifikationen als Regulationsmechanismus sind in Bakterien vergleichsweise selten, aber spielen, wie bei KdpFABC, trotzdem eine wichtige Rolle.

Regulation von K^+-Transportsystemen durch den Sekundärbotenstoff c-di-AMP

Während alle bisher genannten Regulationsmechanismen für einzelne Transportsysteme spezifisch sind, rückt ein Signalmolekül zunehmend in den Fokus als allgemeiner Regulator der K^+-Homöostase in Gram-positiven Bakterien. Als Sekundärbotenstoff bietet zyklisches di-AMP (c-di-AMP) eine zusätzliche Amplifikation des regulatorischen Signals. Bei Aktivierung von Adenylatzyklasen wie CdaA unter hohen K^+-Konzentrationen wird c-di-AMP *en masse* produziert. Durch das Zwischenschalten dieses Enzyms entsteht eine breite Welle des Sekundärbotenstoffs, die schnell eine große Menge an verschiedenen Systemen

Hier steht eine Anzeige.

Springer



▲ **Abb. 3:** Inhibition von KdpFABC durch Serin-Phosphorylierung. **A,** Post-Albers-Transportzyklus von KdpFABC. In der auswärtsgerichteten E1-Konformation binden Kaliumionen am Selektivitätsfilter der Kanaluntereinheit KdpA (grün) und gelangen über einen Halbtunnel zur CBS der P-Typ-ATPase KdpB (sand). Dies löst die Hydrolyse von ATP und die Phosphorylierung eines hochkonservierten Aspartats in der P-Domäne (blau) aus. Damit einhergehende Konformationsänderungen verschließen den äußeren Halbtunnel. Die energiereiche E1P-Konformation relaxiert in die E2P-Konformation, wobei sich die A-Domäne (gelb) zwischen die N- (rot) und die P-Domäne (blau) platziert. Diese Änderungen öffnen den einwärtsgerichteten Halbtunnel und erniedrigen die Affinität der CBS, Kaliumionen werden ins Cytoplasma entlassen. Anschließend dephosphoryliert das TGES-Motif der A-Domäne das katalytische Aspartat und KdpFABC nimmt über die E2-Konformation wieder den auswärtsgerichteten E1-Zustand ein. Die Rolle von KdpC (lila) ist unklar. **B,** Kryo-EM-Struktur [7NNL] mit vergrößertem Auschnitt der regulatorischen Phosphorylierung an Ser_{162} in der A-Domäne von KdpB.

regulieren kann [16]. In *B. subtilis* z. B. wird die K^+-Aufnahme durch KtrAB, KtrCD und KimA durch c-di-AMP-Bindung in KtrA, KtrC bzw. der cytoplasmatischen Domäne von KimA allosterisch inhibiert. Gleichzeitig wird die Genexpression von *kimA* und *ktrAB* durch c-di-AMP-Bindung an den *ydaO*-Riboswitch unterbunden. Die Kaliumeffluxsysteme CpaA and KhtSTU werden dagegen aktiviert. *Staphylococcus aureus* als weiteres Beispiel produziert neben anderen K^+-Aufnahmesystemen auch KdpFABC. Hier wird die Transkription von *kdpFABC* durch c-di-AMP-Bindung an die Sensorkinase KdpD verhindert. Eine Bindung von c-di-AMP an KdpFABC zu dessen direkten Inaktivierung wurde dagegen (noch) nicht beschrieben. Warum aber benötigen Gram-positive Bakterien diese zusätzliche Regulation für Systeme, die auch anderweitig schon durch den K^+-Spiegel kontrolliert werden? Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass c-di-AMP eine übergeordnete Regulation für die gesamte K^+-Homöostase ermöglicht und damit über den anderen Regulationsmechanismen steht. Die Zelle kann alle Systeme gleichzeitig ansteuern, unabhängig von den einzelnen Kontrollsignalen. Dies ermöglicht eine robustere Kontrolle der K^+-Homöostase. Die meisten Gram-negativen Bakterien scheinen kein c-di-AMP zu erzeugen. Mit Hinblick auf die Vorteile eines solchen Systems ist es nicht unmöglich, dass es auch in Gram-negativen Bakterien einen allgemeinen Regulator der Kaliumhomöostase gibt, der bislang jedoch noch nicht identifiziert wurde. ■

Literatur

[1] Stautz J, Hellmich Y, Fuss MF et al. (2021) Molecular mechanisms for bacterial potassium homeostasis. J Mol Biol 433: 166968
[2] Tascon I, Sousa JS, Corey RA et al. (2020) Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family. Nat Commun 11: 626
[3] Gundlach J, Herzberg C, Kaever V et al. (2017) Control of potassium homeostasis is an essential function of the second messenger cyclic di-AMP in Bacillus subtilis. Sci Signal 10: eaal3011
[4] Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N et al. (2003) KtrAB and KtrCD: two K+ uptake systems in Bacillus subtilis and their role in adaptation to hypertonicity. J Bacteriol 185: 1289–1298
[5] Nakamura T, Yuda R, Unemoto T et al. (1998) KtrAB, a new type of bacterial K(+)-uptake system from Vibrio alginolyticus. J Bacteriol 180: 3491–3494
[6] Vieira-Pires RS, Szollosi A, Morais-Cabral JH (2013) The structure of the KtrAB potassium transporter. Nature 496: 323–328
[7] Hänelt I, Löchte S, Sundermann L et al. (2010) Gain of function mutations in membrane region M2C2 of KtrB open a gate controlling K+ transport by the KtrAB system from Vibrio alginolyticus. J Biol Chem 285: 10318–10327
[8] Diskowski M, Mehdipour AR, Wunnicke D et al. (2017) Helical jackknives control the gates of the double-pore K(+) uptake system KtrAB. Elife 6: e24303
[9] Mikusevic V, Schrecker M, Kolesova N et al. (2019) A channel profile report of the unusual K(+) channel KtrB. J Gen Physiol 151: 1357–1368
[10] Teixeira-Duarte CM, Fonseca F, Morais-Cabral JH (2019) Activation of a nucleotide-dependent RCK domain requires binding of a cation cofactor to a conserved site. Elife 8: e50661
[11] Stock C, Hielkema L, Tascon I et al. (2018) Cryo-EM structures of KdpFABC suggest a K(+) transport mechanism via two inter-subunit half-channels. Nat Commun 9: 4971
[12] Huang CS, Pedersen BP, Stokes DL (2017) Crystal structure of the potassium-importing KdpFABC membrane complex. Nature 546: 681–685
[13] Silberberg JM, Corey RA, Hielkema L et al. (2021) Deciphering ion transport and ATPase coupling in the inter-subunit tunnel of KdpFABC. Nat Commun 12: 5098
[14] Schramke H, Tostevin F, Heermann R et al. (2016) A dual-sensing receptor confers robust cellular homeostasis. Cell Rep 16: 213–221
[15] Sweet ME, Dubey V, Zhang X et al. (2020) Serine phosphorylation regulates the P-type potassium pump KdpFABC. Elife 9: e55480
[16] Stüke J, Krüger L (2020) Cyclic di-AMP signaling in bacteria. Annu Rev Microbiol 74: 159–179

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Inga Hänelt
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
Institut für Biochemie
Goethe-Universität Frankfurt a. M.
Max-von-Laue-Straße 9
D-60438 Frankfurt a. M.
Haenelt@biochem.uni-frankfurt.de

AUTORINNEN UND AUTOREN

Jakob M. Silberberg
2014–2017 Bachelorstudium Biochemie an der Goethe-Universität Frankfurt. Dort **2017–2020** Masterstudium Biochemie. Seit **2020** Promotion im Bereich Proteinbiochemie und Strukturbiologie unter Anleitung von Prof. Dr. I. Hänelt.

Inga Hänelt
Biologiestudium und Promotion, Universität Osnabrück. **2010–2012** DFG-Stipendiatin: Membran-Biochemie, Universität Groningen, Niederlande. **2012–2013** Postdoktorandin: Molekulare Mikrobiologie, Goethe-Universität Frankfurt a. M. (GUF). **2014–2015** Nachwuchsgruppenleiterin: SFB807, GUF. **2015–2021** Emmy Noether-Nachwuchsgruppenleiterin und Juniorprofessorin, Institut für Biochemie, GUF. Seit **2021** Heisenberg-Professorin für Membran-Biochemie ebenda.