

# Wie Bakterien Phosphat auswählen

Roger S. Goody\*

Arsenat · Bindungsstellen · Phosphatbindende Proteine · Proteinstrukturen · Wasserstoffbrücken

Im Jahr 1987 veröffentlichte Frank Westheimer einen aufsehenerregenden Artikel mit dem Titel „Warum die Natur Phosphate wählte“.<sup>[1]</sup> Darin stellt er Überlegungen an, welche anderen Elemente oder Bausteine eine ähnliche Funktion wie Phosphat, dessen Ester und Anhydride erfüllen könnten. Einer dieser Bausteine ist Arsenat, das ebenfalls eine dreibasige Säure ist, die Ester und Anhydride bilden kann, eine ähnliche Größe wie Phosphat aufweist (Arsenat ist nur 4% größer), fast die gleichen  $pK_s$ -Werte wie Phosphat hat und somit bei oberflächlicher Betrachtung eine attraktive Alternative wäre. Dennoch wird die Möglichkeit verworfen, dass Arsenat eine ähnliche Rolle wie Phosphat spielen könnte, weil Arsenatester in Wasser einer extrem schnellen Hydrolyse unterliegen. Einer der entscheidenden Aspekte der Phosphatchemie ist die außergewöhnliche hydrolytische Stabilität von Phosphodiestern (geschätzte Halbwertszeit bei 25°C: 30 Millionen Jahre<sup>[2]</sup>), was ein wichtiger Faktor für die Stabilität der DNA und einer der Gründe dafür ist, dass wir heute noch die 30000 Jahre alte DNA von Neandertalern entschlüsseln können. Chemiker waren daher sehr überrascht, als 2011 Ergebnisse präsentiert wurden, die zu beweisen schienen, dass ein Bakterium vom *Halomonas*-Stamm GFAJ-1 aus dem arsenireichen Mono Lake in Kalifornien in Abwesenheit von Phosphat wachsen und stattdessen Arsenat aufnehmen kann.<sup>[3]</sup> Inzwischen scheint es jedoch wahrscheinlich, dass diese Interpretation unrichtig war, insbesondere weil nachgewiesen wurde, dass die DNA von Bakterien, die unter sehr hohen Arsenatkonzentrationen und sehr geringen Phosphatkonzentrationen gezüchtet wurden, Phosphat, aber kein Arsenat enthielt.<sup>[4]</sup>

Obwohl sich gezeigt hat, dass die Schlussfolgerungen der früheren Arbeit falsch waren, ist der Befund, dass gewisse Bakterien bei sehr hohen Arsenat-Phosphat-Verhältnissen leben können, überaus interessant, und der Mechanismus dieses Effekts fasziniert. In einer neueren Veröffentlichung wurde das Rätsel nun weitgehend gelöst. Tawfik und Mitarbeiter<sup>[5]</sup> untersuchten verschiedene Proteine, die an der Aufnahme von Phosphat in die Bakterien bei geringer Phosphatkonzentration beteiligt sind; sie werden als hochaffine periplasmatische phosphatbindende Proteine (PBPs) bezeichnet. PBPs sind Bestandteil des Pst-Systems (Pst: phos-

phate-specific transport), das auch ein ABC-Transporterprotein (ABC: ATP-binding cassette) beinhaltet, das in der Lage ist, unter Verbrauch von freier Energie aus der ATP-Hydrolyse gegen einen Phosphatgradienten zu pumpen. Im Unterschied zum Pit-System (Pit: phosphate inorganic transport), das geringe Affinität und Spezifität aufweist und bei hohen Phosphatkonzentrationen aktiv ist, sind PBPs hoch spezifisch.

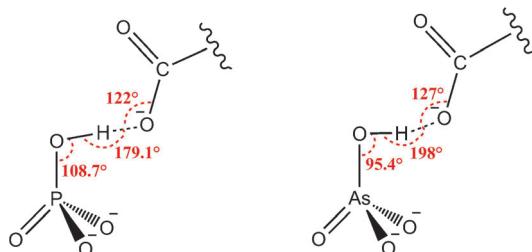
Tawfik und Mitarbeiter verglichen verschiedene PBPs, unter anderem zwei Paraloga von GFAJ-1. Die Autoren wiesen nach, dass all diese Proteine stark gegen Arsenat diskriminierten, in mehreren Fällen mit einem Faktor von ca. 500. Interessanterweise beträgt der Faktor beim Paralogon PBP-2 von GFAJ-1 ca. 4500, was eine fast 10-mal stärkere Diskriminierung gegen Arsenat als durch andere PBPs bedeutet. Zusammen mit dem Befund, dass die Expression von PBP-2 bei niedrigen Phosphatkonzentrationen stark hochreguliert ist, erklärt dies, wie die Bakterien in der Lage sind, bei einem 4000fachen Überschuss an Arsenat gegenüber Phosphat zu wachsen: Tatsächlich wird nur ein geringer Überschuss von intrazellulärem Arsenat gegenüber Phosphat generiert. Dies ist vermutlich auch die Erklärung für die ursprüngliche Fehlinterpretation bezüglich der Fähigkeit des Bakterienstammes zur Aufnahme von Arsenat statt Phosphat.

Die Diskriminierung zwischen Phosphat und Arsenat ist eine bemerkenswerte Eigenschaft angesichts der Ähnlichkeit dieser beiden Ionen. Um die Grundlage für diese Spezifität besser zu verstehen, kristallisierten Tawfik und Mitarbeiter PBPs aus *Pseudomonas fluorescens* jeweils mit Phosphat oder Arsenat und bestimmten die Strukturen mittels Röntgenkristallographie. Bei der anfänglichen Betrachtung der Strukturen zeigte sich eine identische Bindungsweise der zweibasigen (d.h. einfach protonierten) Form der Anionen mit einer großen Zahl an Wasserstoffbrücken zu den Phosphat- bzw. Arsenat-Sauerstoffatomen. Erfreulicherweise wurde die Strukturen mit Auflösungen besser als 1 Å bestimmt; dadurch gelang die Identifizierung einzelner Wasserstoffatome, was bei geringerer Auflösung nicht möglich ist. Auch hier konnte für die meisten Wechselwirkungen kein Unterschied festgestellt werden, an einem Punkt zeigte sich jedoch eine deutliche Differenz. Für die Wechselwirkung des einfach protonierten Sauerstoffs vom Phosphat oder Arsenat mit der Seitenkette von Aspartat 62 des PBP wurde eine kurze Wasserstoffbrücke beobachtet (in beiden Fällen ca. 2.5 Å), was mit einer früheren Studie übereinstimmt.<sup>[6]</sup> Die Wechselwirkung wurde als eine Wasserstoffbrücke mit geringer Barriere charakterisiert, spezifisch eine heteromole-

[\*] Prof. Dr. R. S. Goody

Abteilung Physikalische Biochemie  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: goody@mpi-dortmund.mpg.de

kulare, von einer negativen Ladung unterstützte Wasserstoffbrücke. In solchen Wasserstoffbrücken teilen sich die beiden Sauerstoffatome das Wasserstoffatom. Die phosphatgebundene Struktur scheint einen Idealfall dieses Bindungstyps darzustellen, da der Abstand des Wasserstoffatoms zu den beiden Sauerstoffatomen fast identisch ist und nahezu ideale Bindungslängen und Bindungswinkel vorliegen (Abbildung 1). In der Arsenatstruktur führt hingegen die längere



**Abbildung 1.** Vergleich der kurzen Wasserstoffbrücke in den Phosphat- (links) und Arsenatkomplexen (rechts) von PBP aus *Pseudomonas fluorescens*. Nur eine der zwölf Wasserstoffbrücken ist dargestellt.

As-O-Bindung zu einer Verzerrung der Struktur, sodass die Winkel von ihren normalen Werten abweichen und das Wasserstoffatom dichter am Arsenat lokalisiert ist als das Carboxylat. Die Bindung scheint durch die Starrheit des aktiven Zentrums in diese energetisch ungünstige Geometrie gezwungen zu werden, wobei die Position der Phosphat- oder Arsenationen durch die große Zahl an anderen Wasserstoffbrücken (11 plus die kurze Bindung) und einen sterischen Effekt (siehe unten) bestimmt wird. Dieser Mangel an Flexibilität lässt sich an den niedrigen kristallographischen *B*-Faktoren in der Umgebung des aktiven Zentrums ablesen. Wasserstoffbrücken zu NH-Gruppen des Gerüsts in definierten Bereichen der Polypeptidkette und zu stabil befestigten kurzen Seitenketten tragen zur starken Fixierung der Anionen bei. Der Mangel an Flexibilität in der Anionbindung wird durch ungünstige Wechselwirkungen des Phosphats mit den C- $\beta$ -Atomen von Alanin 7 und Leucin 9 noch verstärkt. Diese Wechselwirkungen werden dann beim Arsenat noch ungünstiger. Interessanterweise reduziert sich die Diskriminierung gegen Arsenat um den Faktor 4, wenn einer der Reste durch Glycin ersetzt wird, was die Annahme stützt, dass ein eng begrenztes aktives Zentrum wichtig für den Diskriminierungsmechanismus ist.

Des Weiteren wurde die Rolle der kurzen Wasserstoffbrücke zum Aspartat 62 weiter untersucht, indem die Aminosäure durch Asparagin ersetzt wurde. Dies führte zu einer Verringerung der Diskriminierung gegen Arsenat um den Faktor 10. Studien zur gleichen Mutation in PBP aus *E. coli* zeigten, dass in diesem Fall die Affinität zu Phosphat unverändert bleibt. Daraus wurde gefolgert, dass die kurze Wasserstoffbrücke nicht besonders stark sein kann, ein Argument, das in der Sichtweise von Tawfik und Mitarbeitern seinen Nachhall findet. Dort wird resümiert, dass „diese strukturellen Merkmale die Annahme stützen, dass Anionen-

bindung und Anionenselektivität zwei unabhängig evolvierte Eigenschaften sind“. Dies ist im Augenblick nicht einfach zu verstehen. Wenn die kurze Wasserstoffbrücke nicht signifikant zur Affinität (für Phosphat) beiträgt, warum sollte dann eine Verzerrung dieser Bindung (im Fall von Arsenat) die Affinität (im Vergleich zum Phosphat) drastisch verringern? Könnte es bedeuten, dass die kurze Wasserstoffbrücke beim Arsenat negativ zur Bindungsenergie beiträgt und nur gebildet wird, weil dies die einzige Lösung für das sterische Problem ist, das die starre Bindungsstelle dem System aufzwingt? Vielleicht werden die bislang nicht bestimmten Strukturen der Phosphat- und Arsenatkomplexe des noch spezifischeren PBP-2 helfen, den Mechanismus genauer zu verstehen.

Wie auch immer die mechanistischen Details der Arsenatdiskriminierung aussehen mögen: Klar scheint, dass der Effekt durch ein Feintuning der Wechselwirkungen des aktiven Zentrums in einer engen Bindungsstelle, die vollständig vor Wasser geschützt ist, evolvierte. Diese starke Enge ermöglichte es, dass die Selektion auf der Grundlage des möglicherweise einzigen verwertbaren Unterschieds zwischen den beiden Anionen, nämlich des geringen Größenunterschieds, erfolgen kann. Dies ist vielleicht eine noch bemerkenswertere Leistung als die Diskriminierung von Kalium- gegen Natriumionen durch Kaliumkanäle, denn hier unterscheiden sich die Ionenradien um rund 40%, im Vergleich zu nur 4% zwischen Phosphat und Arsenat. Interessanterweise gibt es sowohl Parallelen als auch Unterschiede zwischen diesen beiden Situationen. So weisen auch Kaliumkanäle sehr starre ionische Bindungsstellen auf, die günstige Wechselwirkungen mit den größeren Kaliumionen eingehen. Weil aber der starre Kanal nicht schrumpfen kann, sind keine günstigen Wechselwirkungen des Gerüstcarbonyls mit den kleineren Natriumionen möglich.<sup>[7]</sup> Im Falle der PBPs scheint es so zu sein, dass die Phosphatgruppe gerade so in das starre Bindungszentrum hineinpasst, und dass die nötige Ausdehnung des Zentrums, um dem nur geringfügig größeren Arsenat Platz bieten zu können, nicht möglich ist. In beiden Fällen ist die Diskriminierung ein wesentlicher Aspekt der Wirkungsweise des entsprechenden Proteins.

Eingegangen am 23. November 2012  
Online veröffentlicht am 16. Januar 2013

- [1] F. H. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178 („Why Nature chose Phosphates“).
- [2] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4052–4055.
- [3] F. Wolfe-Simon, J. Switzer Blum, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoeft, J. Pett-Ridge, J. F. Stoltz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. Davies, A. D. Anbar, R. S. Oremland, *Science* **2011**, *332*, 1163–1166.
- [4] M. L. Reaves, S. Sinha, J. D. Rabinowitz, L. Kruglyak, R. J. Redfield, *Science* **2012**, *337*, 470–473.
- [5] M. Elias, A. Wellner, K. Goldin-Azulay, E. Chabriere, J. A. Vorholt, T. J. Erb, D. S. Tawfik, *Nature* **2012**, *491*, 134–137.
- [6] Z. Wang, H. Luecke, N. Yao, F. A. Quiocio, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 519–522.
- [7] R. MacKinnon, *Biosci. Rep.* **2004**, *24*, 75–100.