

Nitrat/Nitrit-Antiport: eine schwierige Aufgabe**

Susana L. A. Andrade und Oliver Einsle*

Bioenergetik · Major-Facilitator-Superfamilie ·
Membranproteine · Röntgenbeugung · Stickstoff-
Metabolismus

Mikroorganismen zeigen häufig eine große metabolische Diversität, die es ihnen ermöglicht, sich auf grundsätzliche Änderungen von Energiequellen und Nährstoffen einzustellen. Dies ist besonders für das essenzielle Element Stickstoff von Bedeutung, dessen Verfügbarkeit häufig ein wachstums-limitierender Faktor ist.^[1] In seiner vollständig reduzierten Form, NH_4^+ , kann Stickstoff für biosynthetische Zwecke assimiliert werden. Durch ein Netzwerk von Redoxreaktionen werden verschiedene Modifikationen des Elements ineinander umgewandelt, wobei freie Enthalpie in Form einer protonenmotorischen Kraft gespeichert wird, die die Synthese von Adenosin triphosphat (ATP) antreibt.^[2]

Das Enterobakterium *Escherichia coli*, ein klassisches Labormodell und ein verbreiteter Bewohner des Säugerdarms, hat drei verschiedene Nitratreduktasen (Nar), die Nitrat zu Nitrit reduzieren können, und zwei Nitritreduktasen (Nir), die Nitrit zu bioverfügbarem Ammonium umsetzen (Abbildung 1).^[3] Nars sind große Enzyme mit komplexen Metallzentren, und ihre Anordnung in und um die Cytoplasmamembran bringt ein funktionelles Problem mit sich: Die Enzyme sind im Cytoplasma lokalisiert, da ihre Reaktion (durch Bildung von H_2O) Protonen verbraucht und so zur Erzeugung der protonenmotorischen Kraft beiträgt. Allerdings ist das Reaktionsprodukt Nitrit ein starkes Zellgift, dessen Anreicherung im Zellinneren zu vermeiden ist. *E. coli* nutzt als konstitutive Nitratreduktase das Enzym NarZ/YW und steigt bei Bedarf an respiratorischer Nitratreduktion auf die starke Expression eines zweiten Systems, NarGHI, um. Die ionischen Spezies NO_3^- , NO_2^- und NH_4^+ können biologische Membranen nicht überwinden und benötigen daher spezifische Transportsysteme. Um den Übertritt von Wasser oder Protonen zu verhindern und gleichzeitig in der Lage zu sein, Ionen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten zu transportieren, müssen diese hoch selektiv arbeiten. Realisiert wird dies durch die Nitrat/Nitrit-Antiporter NarK (für NarGHI) und NarU (Abbildung 2; für NarZ/YW), die zur

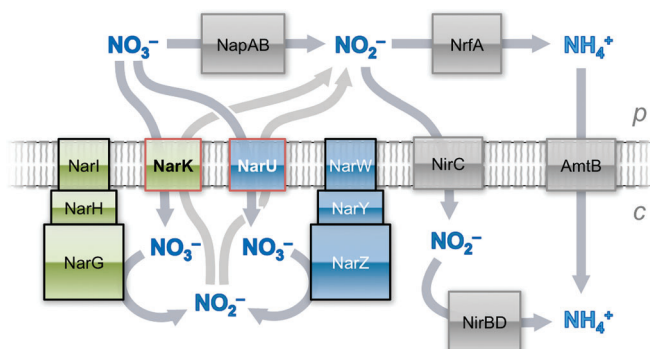


Abbildung 1. N-Stoffwechsel in *Escherichia coli*. Die Nitratreduktasen NarGHI und NarZ/YW weisen ins Cytoplasma. Nitrat wird aufgenommen, und das toxische Produkt Nitrit wird über die Austauscher NarK und NarU exportiert. Die periplasmatischen Nitrat- und Nitritreduktasen NapAB und NrfA dienen der Detoxifikation, während der NH_4^+ -Transporter AmtB und die cytoplasmatische Nitritreduktase NirBD, mit dem zugehörigen Nitritkanal NirC, zur N-Assimilation für Biosynthesen benötigt werden.

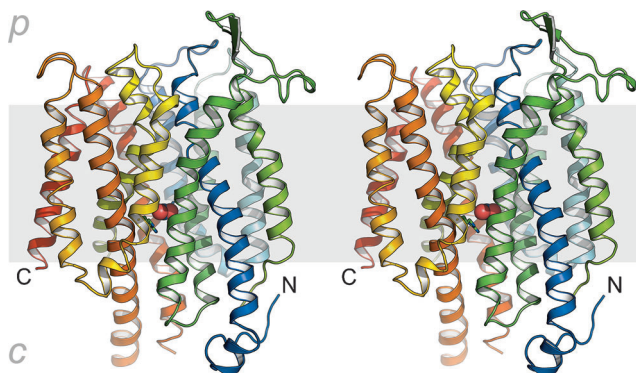


Abbildung 2. Raumstruktur des Nitrat/Nitrit-Antiporters NarU aus *E. coli* (PDB-ID 4IU8).^[5] Die Stereo-Abbildung zeigt eine Cartoon-Darstellung, eingefärbt von Blau am N-Terminus zu Rot am C-Terminus. NarU arbeitet nach dem statistischen „rocker-switch“-Mechanismus, bei dem eine Bindestelle für die transportierten Moleküle Nitrat und Nitrit abwechselnd hin zu verschiedenen Seiten der Membran exponiert wird. p steht für das Periplasma, die „Außenseite“, während c das Cytoplasma, die „Innenseite“, markiert.

[*] Prof. S. L. A. Andrade, Prof. O. Einsle
Institut für Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
und
BIOS Centre for Biological Signalling Studies
Hebelstraße 25, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: einsle@bio.chemie.uni-freiburg.de
Homepage: <http://www.xray.uni-freiburg.de>

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Europäischen Forschungsrat für finanzielle Unterstützung.

Nitrat/Nitrit-Porterfamilie (NNP) innerhalb der Major-Facilitator-Superfamilie (MFS) der Transportproteine gehören, durch den NO_2^- -Kanal NirC, ein Mitglied der Formiat/Nitrit-

Transporterfamilie, und durch die NH_4^+ -Transporter der Amt/Rh-Familie.^[3,4]

Während reichlich Informationen über Amt-Proteine^[4] und über NirC^[6] verfügbar sind, war bis vor kurzem nichts über die Struktur eines Nitrat/Nitrit-Austauschers bekannt. Dies hat sich nun mit den kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen von NarU^[5] und NarK^[7] aus *E. coli* geändert, die unabhängig voneinander in den Arbeitsgruppen von Shi bzw. Gonen bestimmt wurden. Interessanterweise enthält die Struktur von NarK ein gebundenes Nitrition, während NarU mit Nitrat kristallisiert wurde. Zusammengefasst ermöglichen diese Daten damit nun erstmals eine direkte Analyse, wie die Transportproteine die entscheidende Fähigkeit erlangen, zuverlässig zwischen zwei so ähnlichen Molekülen wie NO_3^- und NO_2^- zu unterscheiden.

Nitrat/Nitrit-Austauscher sind insofern typische MFS-Proteine, als dass eine invertierte Wiederholung von fünf transmembranären α -Helices zwei Domänen erzeugt, die über eine pseudo-zweizählige Rotationsachse in der Membranebene miteinander verbunden sind (Abbildung 3A). Transport setzt dann eine Bewegung der beiden Proteinhälften relativ zueinander voraus, die eine Bindestelle im Zentrum entweder zur „Außenseite“ (dem bakteriellen Periplasma) oder zur „Innenseite“ (dem Cytoplasma) hin exponiert. Diese extremen Konformationen sind durch geschlos-

sene („occluded“) Zustände miteinander verbunden, in denen das Anion im Inneren des Transporters eingeschlossen ist. Abbildung 3B zeigt das einfachste Schema eines derartigen Modells des alternierenden Zugangs, bekannt als „rocker-switch“-Mechanismus. Um als strikter Nitrat/Nitrit-Austauscher zu arbeiten und den Uniport eines der Ionen auszuschließen, darf NarK/U den Übergang vom nach außen weisenden zum nach innen weisenden Zustand nicht ermöglichen, wenn kein Ion gebunden ist. NO_3^- und NO_2^- tragen die gleiche Ladung und unterscheiden sich lediglich in einem einzelnen Sauerstoffatom. Es war schwer vorstellbar, wie eine spezifische Bindestelle für Nitrat das kleinere Nitritmolekül unterscheiden sollte. Die Strukturen von NarK und NarU beantworten diese Frage nun mit unerwarteter Klarheit. In NarK/U sind zwei Argininreste für die Ionenbindung essenziell, die Teil eines konservierten Nitrat-Signaturmotifs sind. In der nitritgebundenen Struktur von NarK (Abbildung 3C) gehen beide Argininreste, R89 und R305, kurze Wasserstoffbrücken mit den Anionen ein, die in einer von den aromatischen Seitenketten von F147 und F267 gebildeten Bindetasche liegen. Zwei weitere relevante Reste in dieser Bindetasche sind Y263 und N175. Von den sechs Aminosäure-Seitenketten, die die Ionen umgeben, gehören drei zur einen Hälfte des Transporters (R89, F147, N175) und drei zur anderen (F267, Y263, R305). Die Bindung von Nitrit ermöglicht die Bildung einer H-Brücke zwischen N175 und R305, welche die beiden Hälften von NarK verbindet. Im sehr ähnlichen NarU bindet ein Nitratmolekül in die genau entsprechende Tasche. Dies ist aber nur möglich, indem es einige der Liganden verdrängt, um Platz für das zusätzliche Sauerstoffatom zu schaffen. Während die Interaktionen mit einem Arginin (R87 in NarU) und mit Tyrosin Y261 in der Tat unverändert bleiben, führt das O-Atom zum Bruch eben jener H-Brücke, die R303 und N173 verbindet. Die spezifische Unterscheidung von Nitrat und Nitrit basiert also nicht auf einer starren Bindetasche, sondern vielmehr auf struktureller Flexibilität, die ein exaktes Anpassen an das jeweilige Ion ermöglicht. Die Region um die Bindetasche bildet dabei den Angelpunkt, um den sich die Hälften des Transporters drehen, um von einem Zustand in den anderen zu gelangen. Es lässt sich leicht vorstellen, dass das Brechen einer einzigen Wasserstoffbrücke, entsprechend einer Enthalpieänderung von etwa 20 kJ mol^{-1} , der entscheidende Faktor sein kann.

Obwohl sich die Strukturen von NarK und NarU in idealer Weise ergänzen, um die Ionenbindung in der zentralen Tasche zu beschreiben, bilden sie dennoch nicht die gleiche Struktur ab. Wichtiger noch ist, dass beide Strukturen den nach innen gerichteten Zustand der Proteine darstellen. Die Kristalle von NarU enthielten zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit, die sich strukturell leicht unterscheiden, wobei das zweite Monomer einen substratgebundenen, okkludierten Zustand repräsentierte. Mithilfe von isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmte Bindungsaffinitäten waren 10-mal höher für Nitrat ($K_D = 33 \mu\text{M}$) als für Nitrit ($K_D = 373 \mu\text{M}$). Während dies zu der Beobachtung passt, dass Nitrat an NarU band, Nitrit jedoch nicht, würde man doch erwarten, dass die Konformation mit hoher Nitrataffinität diejenige ist, die nach außen weist, und nicht – wie in der Struktur – nach innen. Andererseits wurde die Struktur von NarK im Kom-

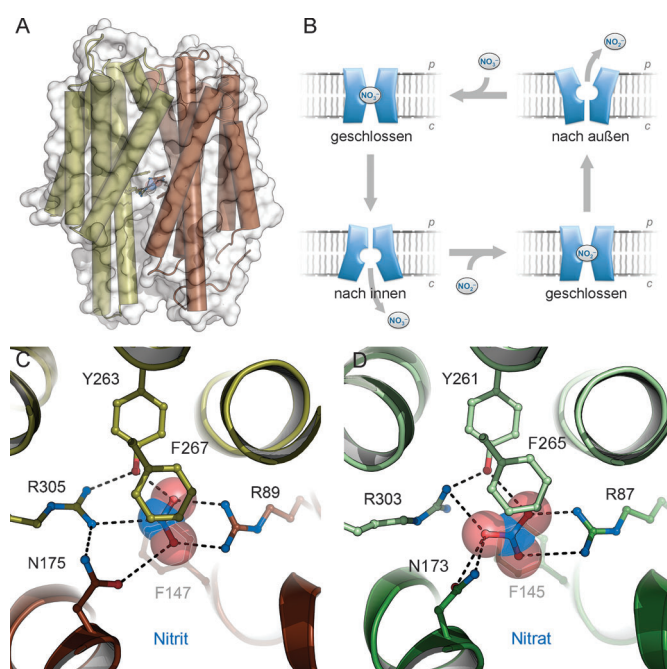


Abbildung 3. Transportmechanismus der Nitrat/Nitrit-Austauscher. A) Wie viele andere Transporter ist auch *E.-coli*-NarK aus zwei homologen, invertiert-wiederholten Hälften aufgebaut. B) Das Modell des alternierenden Zugangs („rocker-switch“) für Membrantransport basiert auf Konformationsänderungen zweier Halbkanäle. C) Struktur von NarK mit gebundenem Nitrit, erhalten durch Kokristallisation mit dem F_{ab} -Fragment eines Antikörpers. Eine kurze (2.9 Å) H-Brücke verbindet N175 und R305 aus verschiedenen Hälften des Proteins. D) Nitratbindung in der Struktur von NarU. Das zusätzliche O-Atom von NO_3^- interferiert mit den umgebenden Liganden und bricht die H-Brücke zwischen R303 und N173.

plex mit dem F_{ab}-Fragment eines monoklonalen Antikörpers erhalten, der die Kristallbildung unterstützte. Auch sie zeigt eine nach innen gerichtete Konformation, aber in diesem Fall mag die starke Wechselwirkung zwischen Transporter und Antikörper die Flexibilität des Transporters in der Tat eingeschränkt haben. Damit bleiben einige Fragen zum Mechanismus der Nitrat/Nitrit-Austauscher weiterhin offen, und es wird von besonderer Bedeutung sein, NarK und NarU in den verbleibenden Konformationen zu kristallisieren, um das Ausmaß der konformativen Umlagerungen genau beschreiben zu können. Obwohl eine Reihe von Strukturen von MFS-Transportern in verschiedenen Konformationen verfügbar ist,^[8] ermöglicht es die Strukturvariabilität innerhalb der Familie bislang kaum, generelle Rückschlüsse auf Transportmechanismen zu ziehen, ohne die anderen Familienmitglieder individuell in Augenschein zu nehmen.

Eingegangen am 24. Juni 2013

Online veröffentlicht am 9. August 2013

- [1] a) D. E. Canfield, A. N. Glazer, P. G. Falkowski, *Science* **2010**, 330, 192–196; b) O. Einsle, P. M. H. Kroneck, *Biol. Chem.* **2004**, 385, 875–883.
- [2] J. Simon, M. G. Klotz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, 1827, 114–135.
- [3] S. Clegg, F. Yu, L. Griffiths, J. A. Cole, *Mol. Microbiol.* **2002**, 44, 143–155.
- [4] S. L. A. Andrade, O. Einsle, *Mol. Membr. Biol.* **2007**, 24, 357–365.
- [5] H. Yan, W. Huang, C. Yan, X. Gong, S. Jiang, Y. Zhao, J. Wang, Y. Shi, *Cell Rep.* **2013**, 3, 716–723.
- [6] a) W. Lü, N. J. Schwarzer, J. Du, E. Gerbig-Smentek, S. L. A. Andrade, O. Einsle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 18395–18400; b) W. J. Jia, N. Tovell, S. Clegg, M. Trimmer, J. Cole, *Biochem. J.* **2009**, 417, 297–304; c) W. Lü, J. Du, N. J. Schwarzer, T. Wacker, S. L. Andrade, O. Einsle, *Biol. Chem.* **2013**, 394, 715–727.
- [7] H. Zheng, G. Wisedchaisri, T. Gonen, *Nature* **2013**, 497, 647–651.
- [8] H. Krishnamurthy, E. Gouaux, *Nature* **2012**, 481, 469–480.