

Osmoregulation

Prolin – vielfältig wie ein Schweizer Taschenmesser

TAMARA HOFFMANN, ERHARD BREMER
LABORATORIUM FÜR MIKROBIOLOGIE, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT
MARBURG

The proteinogenic amino acid proline has multiple functions in living cells. Depending on whether it is used as a building block in proteins, as a nutrient, or as an osmoprotectant, the cytoplasmic proline concentration required for these tasks varies dramatically. The soil bacterium *Bacillus subtilis* solves this problem by precisely regulating and highly integrating catabolic, anabolic, and stress protective processes.

DOI: 10.1007/s12268-013-0381-2
© Springer-Verlag 2013

■ Prolin ist eine von 20 Aminosäuren, aus denen zelluläre Proteine aufgebaut sind. Aufgrund seiner speziellen heterozyklischen Form beeinflusst der Einbau von Prolin in die Polypeptidkette erheblich die dreidimensionale Struktur gefalteter Proteine. Die Prolin-Synthese aus dem Vorläufermolekül L-Glutamat läuft in nahezu allen Organismen nach einem ähnlichen Schema ab. Dabei wird L-Glutamat in drei enzymatischen Schritten zu Prolin umgesetzt. Die in *Bacillus subtilis* dafür benötigten Enzyme sind die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamylphosphat-Reduktase (ProA) und die Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (ProI, ProH) (Abb. 1).

Stressschutz durch Prolin

Prolin liegt in Zellproteinen gebunden, aber auch frei löslich im Zytoplasma vor. Freies Prolin schützt Pflanzen und Bakterien gegen-

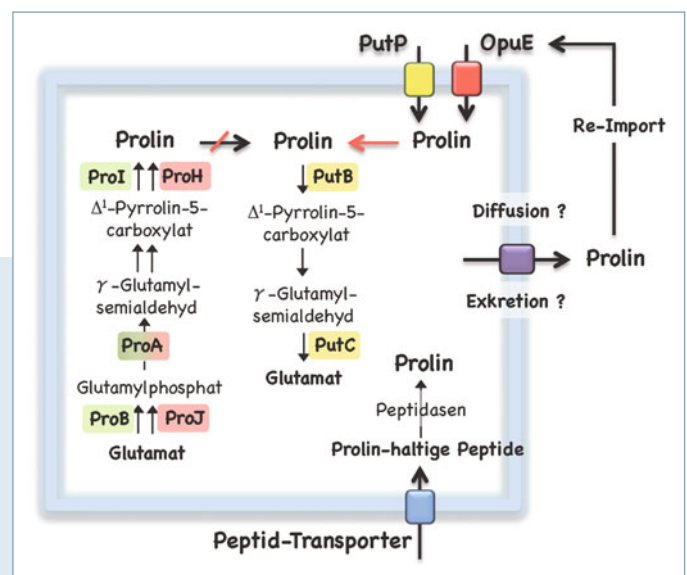
über unterschiedlichen Stresssituationen: Es dient als Schutz gegen Kälte und Frost, gegen die Wirkung von Schwermetallen oder UV-Strahlung und mildert die Effekte von Redoxstress. Besonders eindrucksvoll ist die massive Anhäufung zytoplasmatischen Prolins zum Schutz gegen osmotischen Stress. Osmotischer Stress entsteht, wenn Zellen deutlichen Änderungen der Konzentration osmotisch aktiver Moleküle in ihrer Umgebung ausgesetzt sind. Bei hoher Osmolarität führt dies zu einem Wasserausstrom aus der Zelle, sodass der Zellinnendruck (Turgor) gefährlich instabil werden kann. Dies kompensieren die Zellen, indem sie den osmotischen Gradienten durch die

aktive Akkumulation von gut verträglichen (kompatiblen) Soluten im Zytoplasma ausgleichen. Prolin ist ein solches kompatibles Solut, dessen zytoplasmatische Konzentration in *B. subtilis* unter hochosmolaren Wachstumsbedingungen bis zu 20-fach ansteigt.

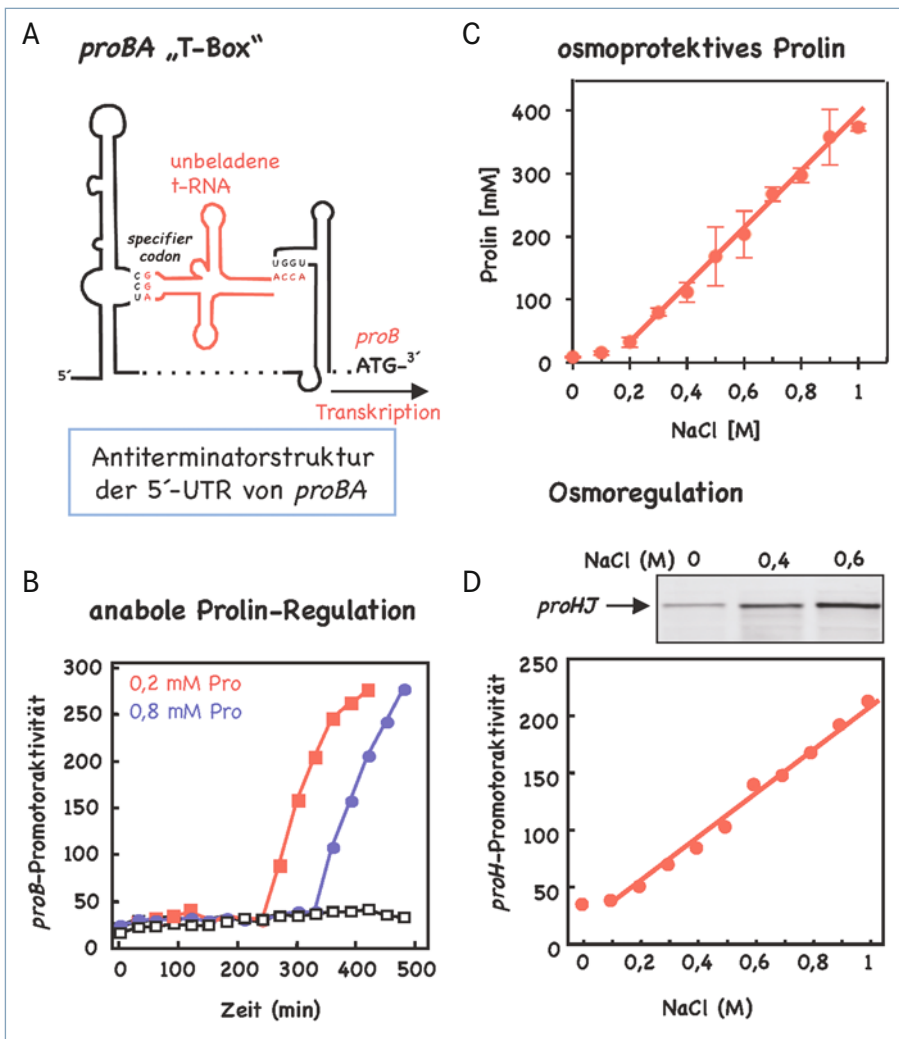
Darüber hinaus erfüllt Prolin eine Nährstofffunktion, da viele Bakterien, darunter auch *B. subtilis*, Prolin aus der Umwelt durch spezifische Transporter aufnehmen und durch die Umkehrung des Prolin-Biosyntheseweges katabolisieren können (Abb. 1).

Proteinbaustein, Stressprotektivum, Nährstoff – Prolin ist multifunktionell in lebenden Zellen. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Zellen es schaffen, die zytoplasmatische Prolinkonzentration für die jeweiligen physiologischen Anforderungen stabil einzustellen.

B. subtilis ist in seinen natürlichen Habitaten, den oberen Schichten des Bodens und der Rhizosphäre, einem wechselnden Nährstoffangebot und schwankender Osmolarität ausgesetzt. Um zu verstehen, wie *B. subtilis* seinen zytoplasmatischen Prolingehalt auf die jeweiligen Anforderungen durch Synthese, Aufnahme und Katabolismus einstellt, wurden die beteiligten Enzyme und Trans-



► **Abb. 1:** Synthese, Abbau, Import und Exkretion von Prolin in *Bacillus subtilis*. Prolin wird aus dem Vorläufermolekül Glutamat über zwei Wege, den anabolen Weg (ProB, ProA, ProI – grün) und den osmotisch regulierten Weg (ProJ, ProA, ProH – rot) synthetisiert. Das so synthetisierte Prolin, wie auch angehäuftes Prolin, das aus importierten Prolin-haltigen Peptiden stammt, führt nicht zur Induktion des PutBC-Abbauweges (gelb), wohingegen extern zugegebenes und über PutP oder OpuE aufgenommenes Prolin über PutB/PutC katabolisiert wird. Der osmotisch regulierte Prolin-Transporter OpuE ist außerdem für den effizienten Re-Import von *de novo* synthetisiertem Prolin verantwortlich, das unter hochosmolaren Bedingungen kontinuierlich an das Medium abgegeben wird.



▲ **Abb. 2:** Regulation der Prolin-Biosynthese in *Bacillus subtilis*. **A**, T-Box-Struktur der *proBA*-5'-UTR. **B**, anabole Prolin-Regulation. Die *proB*-Promotoraktivität wurde unter limitierten Prolin-Bedingungen in Prolin-auxotrophen Zellen (rot und blau) gemessen, die eine chromosomale *proB*-Reporterfusion tragen, sowie als Kontrolle im entsprechenden Prolin-prototrophen Stamm (schwarz). **C**, osmoprotektives Prolin. Zytoplasmatische Prolinkonzentration in Antwort auf die Salinität im Medium. **D**, Osmoregulation. Induktion der *proHJ*-Transkription in Antwort auf steigende Salinität, gezeigt durch eine Northern-Blot-Analyse sowie die Messung einer chromosomalen *proH*-Reporterfusion.

porter sowie deren Regulation untersucht (**Abb. 1** und **2**).

Katabolismus

In Gegenwart von externem Prolin können die Zellen dieses über hochaffine Transportsysteme (PutP und OpuE) aufnehmen. Für die Nutzung von Prolin als Nährstoff wird der PutP-Transporter genutzt, und die Katabolisierung zu L-Glutamat erfolgt über die Enzyme PutB (Prolin-Dehydrogenase) und PutC (γ -Glutamylsemialdehyd-Dehydrogenase) (**Abb. 1**). Die zugehörigen Gene (*putBCP*) bilden ein Operon, dessen Transkription durch kleinste Mengen Prolin (25 Mikromolar) im externen Medium mithilfe des Akti-

vatorproteins PutR angeschaltet wird [1]. Überraschenderweise kann das *putBCP*-Operon lediglich durch im Medium vorhandenes Prolin angeschaltet werden, nicht jedoch von Prolin, das die *B. subtilis*-Zelle selbst synthetisiert hat [2].

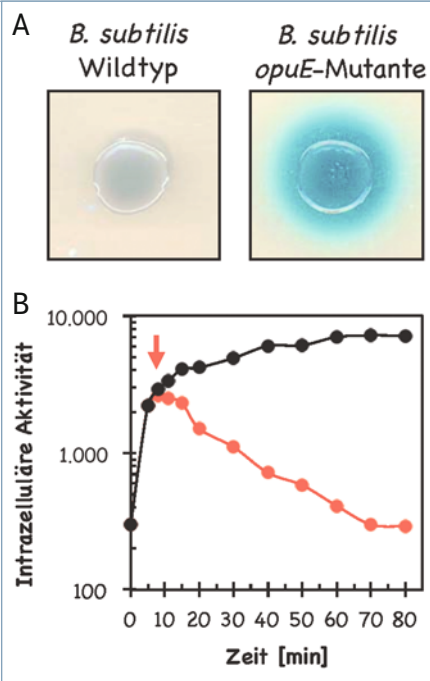
Anabole Synthese

Wachsen *B. subtilis*-Zellen in Abwesenheit von externem Prolin, sind sie in der Lage, Prolin *de novo* zu synthetisieren (**Abb. 1**). Interessanterweise konnten in *B. subtilis* zwei Prolin-Biosynthesewege mit unterschiedlichen physiologischen Aufgaben identifiziert werden [3]: Für anabole Zwecke synthetisieren die *B. subtilis*-Zellen Prolin über den ProB-

ProA-ProI-Syntheseweg (**Abb. 1**). Die Regulation dieses Weges erfolgt transkriptionell sowie posttranslational eng abgestimmt auf den proteinbiosynthetischen Bedarf der Zelle. Dazu steht die Transkription des *proBA*-Operons und des *proI*-Gens unter Kontrolle eines prolin-spezifischen T-Box-Mechanismus [3], einem Regulationsschalter, der auf unterschiedlichen Konformationen des 5'-nicht translatierten Bereiches (5'-UTR) der *proBA*- und *proI*-mRNAs beruht (T-Box). Die vollständige Transkription der nachfolgenden Gene findet nur statt, wenn die 5'-UTR eine Antiterminatorstruktur ausbildet, deren Stabilität die Bindung einer unbeladenen prolin-spezifischen tRNA erfordert (**Abb. 2A**). Die Konzentration unbeladener Prolin-tRNAs steht im direkten Verhältnis zur zytoplasmatischen Prolinkonzentration, die die Zelle so direkt „messen“ kann und dementsprechend die anabolen Prolin-Synthesegene an- oder abschaltet (**Abb. 2B**). Neben dieser transkriptionellen Kontrolle unterliegt ProB einer Feedback-Hemmung durch Prolin. Mithilfe dieser beiden regulatorischen Schalter gelingt es der Zelle, die zytoplasmatische Prolinkonzentration unter iso-osmolaren Bedingungen stabil bei etwa 20 millimolar einzustellen.

Prolin als Osmoprotektivum

Demgegenüber steigt die Prolinkonzentration unter hochosmolaren Bedingungen massiv an (**Abb. 2C**). Dies erfolgt fein abgestimmt in Anpassung an die externe Osmolarität und führt bei einer Salinität von einem Mol NaCl im Medium zu einer zytoplasmatischen Prolinkonzentration von 400 millimolar [4]. Aufgrund der geschilderten regulatorischen Besonderheiten des ProB-ProA-ProI-Weges, können solch hohe zelluläre Prolinkonzentrationen nicht über diesen anabolen Syntheseweg erreicht werden. Daher besitzt die *B. subtilis*-Zelle einen isomeren Biosyntheseweg (ProJ-ProA-ProH) (**Abb. 1**), dessen transkriptionelle und posttranslationale Regulation die hohe zytoplasmatische Prolinkonzentration ermöglicht. Der Schlüssel ist die osmotische Kontrolle des *proHJ*-Operons, dessen Transkription proportional zum Anstieg in der externen Osmolarität gesteigert werden kann (**Abb. 2D**, [5]). Zudem gehört das ProJ-Enzym vermutlich zur Gruppe der Feedback-resistenten Glutamat-Kinasen. Unterbricht man genetisch den ProJ-ProA-ProH-Syntheseweg, werden die Zellen osmosensitiv, was nachhaltig die Bedeutung von Prolin für die Osmostressantwort von *B. subtilis* verdeutlicht.



▲ Abb. 3: Prolin-Exkretion in *Bacillus subtilis*. **A**, Blue eye-Test: Das von der *B. subtilis*-Kolonie exkretierte Prolin führt zum Wachstum Prolin-auxotropher *Escherichia coli*-Zellen, die auf den Minimal-Agarplatten ausplattiert worden waren. Diese erscheinen dann als blauer Kreis, da sie Lac⁺ sind (Details siehe Text). **B**, Eine *B. subtilis*-Wildtyp-Kultur wurde in hochosmolarem Medium für zehn Minuten mit einem millimolar radioaktivem Prolin versetzt. Die zytoplasmatische Prolinkonzentration wurde durch Zählung der Radioaktivität in den Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Dann wurden 100 millimolar nicht-radioaktives Prolin zugegeben (rot), während die Kontrollkultur (schwarz) unbehandelt blieb.

Freisetzung und Re-Import von Prolin unter hochosmolaren Bedingungen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Funktion des osmotisch induzierbaren Prolin-Aufnahmesystems OpuE darin besteht, extern vorhandenes Prolin im Zytoplasma als osmotische Schutzsubstanz anzureichern. In der Tat sind Zellen mit einem defekten OpuE-System nicht mehr durch externes Prolin osmotisch geschützt. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass eine *opuE*-Mutante in einem hochosmolaren Minimalmedium auch ohne zugeführtes Prolin deutlich schlechter wächst als der entsprechende Wildtyp-Stamm. Unsere Messung der zytoplasmatischen Prolinkonzentration zeigte, dass diese in der *opuE*-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert war, was den Wachstumsdefekt erklärte. Das fehlende Prolin fanden wir im Medium. Weitere Untersuchungen ergaben, dass sowohl die *opuE*-Mutante als auch der Wildtyp-Stamm das neu synthetisierte Prolin an das Außenmedium

„verlieren“. Im Wildtyp wird dieses Prolin im Medium aber nicht „sichtbar“, da das hochaffine OpuE-Aufnahmesystem es sofort zurück in die Zelle transportiert (**Abb. 1**, [6]). Durch ein *Escherichia coli*-Kreuzfütterungsexperiment (*blue eye*-Test) konnten wir das exkretierte Prolin auf Agarplatten sichtbar machen (**Abb. 3A**): Dabei werden Prolin-auxotrophe *E. coli*-Zellen auf Minimal-Agarplatten mit moderat erhöhter Osmolarität plattiert. Da die Platten kein Prolin enthalten, kann *E. coli* nicht wachsen. Tropft man aber eine *B. subtilis-opuE*-Mutante (Lac⁻) auf die *E. coli*-Zellen, so führt das von den *B. subtilis*-Zellen freigesetzte Prolin zur Kreuzfütterung der *E. coli*-Zellen. Diese können nun wachsen und erscheinen zusätzlich blau, da die Agarplatten den LacZ-Indikatorstoff X-Gal enthalten und der *E. coli*-Stamm Lac⁺ war (**Abb. 3A**). Der blaue Ring um die *opuE*-Mutante (*blue eye*) weist deutlich auf das exkretierte Prolin hin. Um den Wildtyp findet sich kein blauer Ring, was deutlich die Re-Import-Leistung des hochaffinen OpuE-Systems zeigt (**Abb. 3A**). Titrationsexperimente mit radioaktiv markiertem Prolin verdeutlichen außerdem, dass das im Zytoplasma angereicherte Prolin innerhalb von 60 Minuten komplett ins Medium freigesetzt und über OpuE re-importiert wird (**Abb. 3B**). Dieser Re-Import ist so effektiv, dass auch mit sensitiver HPLC-Aminosäure-Analytik in Wildtyp-Kulturen kein Prolin im Medium nachgewiesen werden kann.

Wie detektiert *Bacillus subtilis* osmotischen Stress?

Die dringendste Frage liegt auf der Hand: Wie misst die *B. subtilis*-Zelle einen Anstieg der externen Osmolarität? Stellt die Zelle die Veränderung externer oder interner Parameter

fest, oder sind membrangekoppelte Prozesse beteiligt? Gibt es einen proteingebundenen spezifischen „Osmosensor/-regulator“, oder bewerkstelligt die Zelle eine osmotische Kontrolle der Genexpression ausschließlich mithilfe spezifischer Promotoren, Veränderungen in der Spiralisierung (*supercoiling*) der DNA und Solut-getriebenen Interaktionen der RNA-Polymerase mit regulatorischen Sequenzen während der Initiation der Transkription? Viele Fragen – und noch keine definitiven Antworten! ■

Literatur

- [1] Moses S, Sinner T, Zapras A et al. (2012) Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *J Bacteriol* 194:745–758
- [2] Belitsky BR (2011) Indirect repression by *Bacillus subtilis* CodY via displacement of the activator of the proline utilization operon. *J Mol Biol* 413:321–336
- [3] Brill J, Hoffmann T, Putzer H et al. (2011) T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 157:977–987
- [4] Hoffmann T, Wensing A, Brosius M et al. (2013) Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol* 195:510–522
- [5] Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M et al. (2011) Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol* 193:5335–5346
- [6] Hoffmann T, von Blohn C, Stanek A et al. (2012) Synthesis, release, and recapture of compatible solute proline by osmotically stressed *Bacillus subtilis* cells. *Appl Environ Microbiol* 78:5753–5762

Korrespondenzadresse:

Dr. Tamara Hoffmann
Molekulare Mikrobiologie
Fachbereich Biologie
Philipps-Universität Marburg
Karl-von-Frisch-Straße 8
D-35032 Marburg
Tel.: 06421-2823486
Fax: 06421-2828979
tamara.hoffmann@uni-marburg.de

AUTOREN



Tamara Hoffmann

1990–1995 Biologiestudium an den Universitäten Gießen und Marburg. 1995–1998 Promotion am Institut für Biochemie der Universität Freiburg. 1999 Postdoc am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Seit 1999 wissenschaftliche Angestellte am Fachbereich Biologie (Molekulare Mikrobiologie) der Universität Marburg.



Erhard Bremer

1974–1980 Biologiestudium an der Universität Tübingen. 1980–1981 Promotion am Max-Planck-Institut für Biologie und der Universität Tübingen. 1982–1984 Postdoc am National Cancer Institute, Frederick, MD, USA. 1984–1992 Hochschulassistent/Dozent (C1/C2) an der Universität Konstanz. 1992–1995 Arbeitsgruppenleiter (C3) am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Seit 1995 Professor (C4) für molekulare Mikrobiologie an der Universität Marburg.