

Wanda Małek^{1*}, Sylwia Wdowiak-Wróbel¹, Małgorzata Targońska¹, Michał Kalita¹, Sebastian Gnat¹

¹Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej,
ul Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Systemy transportu K⁺ do komórki bakteryjnej. 2.1. System Trk. 2.2. System Ktr. 2.3. System Kdp. 2.4. System Kup. 3. Systemy wypływu K⁺ z komórki bakteryjnej. 4. Regulacja systemów transportu K⁺ do komórki bakteryjnej. 4.1. Kontrola systemów transportu K⁺ na poziomie ich aktywności. 4.2. Osmotyczna regulacja transportera Kdp na poziomie transkrypcji. 5. Podsumowanie

Osmoadaptation and potassium transport systems in Gram-negative bacteria

Abstract: Potassium (K⁺) is the major intracellular cation in bacterial cells. It plays a key role in maintaining the cell turgor, pH, adaptation to osmotic conditions, enzyme activation, and gene expression. The intracellular concentration of K⁺ is generally much higher than that in a growth medium and bacteria use a number of transporters and efflux pumps to maintain respective K⁺ concentration in cytoplasm. The best characterized K⁺ uptake systems in Gram-negative bacteria are: Trk, Kup, Ktr, and Kdp. Under hyperosmotic stress, in potassium-replete media at neutral and alkaline pH, the Trk system is the main K⁺ importer. It is a low – affinity, multiunit protein complex encoded by constitutively expressed genes that are. Under acidic conditions, when the activity of Trk is insufficient, a single component, i.e. the constitutive Kup transporter, with the affinity for K⁺ similar to that of the Trk system, is thought to be important. The Ktr transporter, resembling that of the Trk system, is composed of a membrane-spanning protein and a peripheral membrane-associated nucleotide – binding subunit. The Kdp-ATPase is a high affinity K⁺ uptake system that is expressed at very low potassium concentrations in the environment and in response to a decrease in cell turgor. Turgor, which is a signal and end the result of K⁺ import, is involved not only in the regulation of the Kdp transporter expression but also in the control of the activity of potassium uptake systems.

1. Introduction. 2. K⁺ uptake systems in bacterial cells. 2.1. Trk system. 2.2. Ktr system. 2.3. Kdp system. 2.4. Kup system. 3. K⁺ efflux systems in bacterial cells. 4. Regulation of K⁺ uptake systems. 4.1. Control of K⁺ uptake system activities. 4.2. Osmotic regulation of Kdp expression. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakterie Gram-ujemne, osmoadaptacja, systemy importu K⁺: Trk, Kup, Ktr, Kdp

Key words: Gram-negative bacteria, K⁺ uptake systems: Trk, Kup, Ktr, Kdp, osmoadaptation

1. Wstęp

Bakterie należą do najbardziej zróżnicowanych pod względem zamieszkiwanych środowisk organizmów [36, 37]. Występują nawet w tych niszach środowiskowych, które ze względu na niekorzystne warunki nie są zasiedlane przez inne formy żywe. Jednym z czynników środowiskowych wpływających na wzrost organizmów jest jego osmolarność. Wyższe ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki niż podłoża umożliwia komórce utrzymanie turgoru niezbędnego do jej wzrostu i podziału [8, 12]. Zdolność adaptacji bakterii do zmian osmolarności środowiska zewnętrznego wiąże się z rozwojem szeregu strategii, które pozwalają im przeżyć w hiper- i hiposmotycznych warunkach.

Wśród bakterii występują dwa mechanizmy odpowiedzi na wzrost osmolarności podłoża [37]. Wiele halofilnych bakterii i archeonów stosuje K⁺ jako główny, cytoplazmatyczny czynnik osmotycznie czynny. Organizmy te rosną tylko w podłożach o wysokim stężeniu NaCl, a równowagę osmotyczną zapewnia im wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie KCl. W cytoplazmie

Halobacterium sp. stężenie KCl dochodzi do 7 M. Adaptacja do tak wysokiego stężenia soli wiąże się z obecnością w białkach tych organizmów dużej liczby reszt aspartylowych i glutamylowych oraz reszt o słabej hydrofobowości [20, 37].

Większość organizmów prokariotycznych wykorzystuje K⁺ jako czynnik osmotycznie czynny tylko podczas wzrostu przy niskiej osmolarności. Przy wyższej osmolarności podłoża zachodzi dramatyczny wzrost stężenia związków zgodnych w cytoplazmie [7, 8, 22, 26, 31, 36, 37]. Związki zgodne są to małe, wysoce rozpuszczalne cząsteczki, bez ładunku w pH fizjologicznym, które nie wchodzi w reakcje z białkami i nie zaburzają metabolizmu komórki. Poza rolę w równoważeniu ciśnienia osmotycznego związki te funkcjonują jako efektywne stabilizatory enzymów, DNA, błon komórkowych, chronią przed zasoleniem, wysoką temperaturą, a nawet wysuszeniem. W tym przypadku, K⁺ działa jako wtórny przekaznik i stymuluje gromadzenie związków zgodnych.

Potas (K⁺) jest głównym wewnątrzkomórkowym kationem jednowartościowym u wszystkich organizmów żywych [7, 18]. U bakterii, pełni kluczową rolę

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 59 76; e-mail: wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

w adaptacji do zmieniających się warunków osmotycznych środowiska [12], bierze udział w utrzymaniu komórkowego turgoru [12] i cytoplazmatycznego pH [5, 26], reguluje aktywność i ekspresję wielu enzymów [12, 32]. Mimo, że w większości środowisk K^+ występuje w niewielkich ilościach (0.1–10 mM) to w cytoplazmie komórek bakteryjnych jego stężenie jest wysokie (300–500 mM) [3]. Aby utrzymać określone wewnętrzkomórkowe stężenie K^+ , bakterie wykształciły kilka systemów transportujących potas, które różnią się kinetyką, źródłem energii i regulacją. Do najlepiej scharakteryzowanych importerów K^+ u *E. coli* i innych bakterii jelitowych należą systemy: Trk, Kdp, Kup i Ktr [12, 37]. System Trk, charakteryzujący się niskim powinowactwem do K^+ , jest głównym transporterem przy pH obojętnym i alkalicznym [35]. Jest to wielopodjednostkowy kompleks białkowy utworzony przez produkty genów, które ulegają konstytutywnej ekspresji. Transporter Ktr, przypominający system Trk, zbudowany jest z transbłonowego białka spinającego błonę i peryferyjnego białka związanego z błoną wiążącego nukleotydy (ATP, NAD^+ /NADH) [23]. Głównym transporterem K^+ do komórki przy pH kwaśnym jest system Kup o podobnym powinowactwie do K^+ jak system Trk, ale transportuje go 10 razy wolniej [40, 41]. Systemem indukcyjnym, ulegającym ekspresji przy niskim stężeniu K^+ w podłożu, jest transporter Kdp o wysokim powinowactwie do potasu [3, 12]. Aktywność transporterów potasu jest ściśle regulowana przez wewnętrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie K^+ oraz turgor [12]. Jedynie w przypadku systemu Kdp ekspresja wiąże się ściśle ze wzrostem osmolarności podłoża [12]. Spadek ciśnienia turgorowego i/lub redukcja zewnątrzkomórkowego stężenia K^+ powoduje szybki wzrost ekspresji systemu Kdp. Ma to związek z transmisją sygnału przez sensorową kinazę KdpD do regulatora odpowiedzi KdpE, który stymuluje transkrypcję genów *kdp* [3].

2. Systemy transportu K^+ do komórki bakteryjnej

2.1. System Trk

Transporter Trk to wielokomponentowy kompleks zidentyfikowany u bardzo wielu bakterii i kilku gatunków archeonów. Jest to system o umiarkowanym powinowactwie do K^+ tj. ~ 1 mM, wysokiej specyficzności do tego kationu i bardzo wysokim V_{max} co pozwala odtworzyć pulę K^+ w minutę lub dwie [12, 37]. System Trk wyraża się konstytutywnie i w podłożu o stężeniu K^+ większym niż 1 mM jest dominującym transporterem tego kationu. Pobieranie K^+ zachodzi drogą symportu z protonem co energizuje ten proces.

Funkcjonowanie systemu Trk u *E. coli* i innych bakterii jelitowych determinują trzy różne, rozrzucone na chromosomie geny tj. *trkA*, *trkE* i *trkH* (u *Salmonella*

enterica sv. Typhimurium są to odpowiednio geny *sapG*, *sapD* i *sapJ*) [2, 7, 9, 12, 37]. Gen *trkA* koduje peryferyjne białko błonowe zbudowane z 458 aminokwasów, które wiąże NAD i z wyższą aktywnością NADH. Produktem genu *trkE* jest jeden z dwóch wiążących ATP komponentów transportera ABC zwanego Sap, który jako transporter toksycznych peptydów został po raz pierwszy zidentyfikowany u *S. enterica* sv. Typhimurium [28]. Dalsze badania wykazały, że oporność komórek na toksyczne peptydy wiąże się z określonym poziomem K^+ w cytoplazmie determinowanym przez system Trk.

Produktem genu *trkH* jest białko zbudowane z 483 aminokwasów, które spina błonę 10 razy i tworzy transbłonowy kanał translokujący K^+ do komórki [12].

Jonem preferowanym do transportu przez system Trk jest K^+ . System ten nie transportuje jonów Cs^+ , a stopień translokacji Rb^+ jest dziesięciokrotnie niższy niż K^+ [12]. Translokator Trk wymaga do aktywności zarówno siły protonomotorycznej (PMF) jak i ATP [33]. Siłą napędową tego transportera jest PMF, a wejściu jednego jonu K^+ towarzyszy wejście jednego protonu. W systemie Trk ATP nie służy jako źródło energii lecz pełni funkcję regulatorową. Stwierdzono bowiem, że produkt zmutowanego genu *trkE* (*sapD*) jest funkcjonalny i prawdopodobnie wiąże ATP, ale go nie hydrolizuje [12].

W niektórych szczepach *E. coli* K-12, które niosą defektywnego faga *rac*, w systemie Trk zamiast transbłonowego białka TrkH występuje białko TrkG [35]. Sekwencja aminokwasowa TrkG i TrkH jest w 41% identyczna, a niska zawartość GC (37%) w genie *trkG* sugeruje, że został on nabyty drogą horyzontalnego transferu z innego filogenetycznie odległego gatunku bakterii. Każdy z tych dwóch transbłonowych komponentów zapewnia pełną aktywność systemu Trk, ale specyficzność transportera zależy od rodzaju białka transbłonowego. Kiedy TrkG jest obecny, aktywność Trk tylko częściowo zależy od TrkE, jakkolwiek ATP jest niezbędny [14]. Wskazuje to, że komponenty wiążące ATP innych ABC transporterów mogą zastąpić TrkE kiedy TrkG jest obecny.

Systemy Trk, podobne do tych występujących w rodzinie *Enterobacteriaceae*, stwierdzono również u innych bakterii [12, 17]. U halofilnych archeonów zidentyfikowano geny homologiczne do bakteryjnych genów *trk* [23]. Ich produkty umożliwiają utrzymywanie wysokiego stężenia K^+ w cytoplazmie komórki, które równoważy wysoką osmolarność podłoża.

2.2. System Ktr

System Ktr, zidentyfikowany u wielu bakterii, zbudowany jest z dwóch komponentów tj. KtrA i KtrB [25]. KtrA wykazuje niski stopień pokrewieństwa z TrkA, a KtrB z TrkH. Transporter Ktr posiada region homologiczny do domeny wiążącej NAD niektórych dehy-

drogenaz, podobnie jak TrkA. Źródłem energii dla systemu Ktr u *Vibrio alginolyticus* jest symport K^+/Na^+ , a nie jak w przypadku transportera Trk symport K^+/H^+ [39]. Niezbędne są jednak dalsze badania mające na celu wyjaśnienie czy u wszystkich organizmów system Ktr energizowany jest symportem K^+/Na^+ czy tylko u mikroorganizmów morskich. System Ktr wykazuje również zdolność transportu Rb^+ i to z taką samą maksymalną szybkością jak K^+ , jakkolwiek powinowactwo do Rb^+ jest 5-krotnie niższe.

U *Bacillus subtilis* zidentyfikowano dwa systemy Ktr [15]. Jeden z nich, KtrAB ma niskie powinowactwo do K^+ w zakresie 1 mM, podczas gdy powinowactwo systemu KtrCD wynosi około 10 mM. Kiedy oba systemy są zmutowane, bakterie wymagają do wzrostu przynajmniej 25 mM K^+ w środowisku zewnętrznym. Ekspresja systemów Ktr nie zależy od stężenia K^+ w podłożu, ale transkrypcja ich genów jest większa kiedy inne systemy, w wyniku mutacji, nie funkcjonują. Transportery Ktr pełnią istotną rolę w adaptacji bakterii do podwyższonej osmolarności środowiska zewnętrznego zawierającego 2–4 mM K^+ . Adaptacja do wysokiej osmolarności podłoża wymaga obecności w nim odpowiednio zwiększonego stężenia K^+ [12].

2.3. System Kdp

Trzeci system transportu K^+ , zidentyfikowany u *E. coli* i innych bakterii, to Kdp [1, 3, 12, 22, 31]. Jest to system indukcyjny o wysokim powinowactwie ($\sim 2 \mu M$) i specyficzności do K^+ . Kdp jest ATPazą typu P zbudowaną z czterech podjednostek: KdpFABC, które związane są z błoną komórkową [1, 3, 12]. KdpF jest małym 29 aminokwasowym peptydem hydrofobowym prawdopodobnie istotnym dla stabilności i być może składania transportera Kdp, ale nie dla jego funkcjonowania. KdpA to transbłonowy, 557 aminokwasowy peptyd spinający błonę w formie 12 α -helikalnych segmentów i uczestniczący w wiązaniu K^+ (peryplazmatyczne pętle między transbłonowymi helisami 2–3, 4–5 i 10–11) i jego translokacji przez błonę wewnętrzną (helisy 5, 6, 7 i 8). Podjednostką katalityczną, homologiczną z dużą podjednostką innych ATPaz typu P, jest podjednostka KdpB, która składa się z 682 aminokwasów i zawiera wysoce konserwatywne miejsce fosforylacji. Jest to integralne białko błonowe z sześcioma α -helisami spinającymi błonę, z dwiema cytoplazmatycznymi domenami i małym peryplazmatycznym regionem. Na podstawie podobieństwa sekwencji KdpB i innych ATPaz typu P można wnioskować, że: miejsce fosforylacji zaczyna się od asparaginy w pozycji 307, a w pętli wiążącej ATP mieszczą się trzy reszty asparaginianowe: Asp447, Asp473 i Asp522. KdpC to 190 aminokwasowe białko, które jedną helisą położoną blisko końca NH_2 , spina błonę komórkową. Pozostała część tego białka znajduje

się wewnątrz komórki w formie dwóch antyrównoległych β -kartek i jednej amfipatycznej α -helisy przy końcu COOH. Funkcją KdpC jest składanie kompleksu Kdp.

2.4. System Kup

Jest to system konstytutywny (wcześniej znany jako TrkD) o niskim powinowactwie i szybkości transportu K^+ do komórki ($K_m \sim 0.5 \text{ mM}$, $V_{max} 0.1 \mu\text{mol } K^+/\text{min}/\text{mg}$ białka), który kodowany jest przez gen *trkD* [40]. System ten tworzy pojedyncze, 622 aminokwasowe białko zbudowane z dwóch domen tj. transbłonowej, która spina błonę komórkową 12 razy i C-terminalnej, 182 aminokwasowej, ulokowanej na cytoplazmatycznej stronie błony [41]. System Kup działa dzięki sile protonomotorycznej i przy niskim pH, kiedy aktywność transportera Trk jest niewystarczająca, a system Kdp, o wysokim powinowactwie do K^+ , nie jest indukowany [41].

3. Systemy wypływu K^+ z komórki bakteryjnej

Jednym z argumentów przemawiających za istnieniem systemów eksportu K^+ z komórki bakteryjnej jest konieczność redukcji stężenia tego jonu kiedy turgor w szoku hipoosmotycznym staje się niebezpiecznie wysoki [23]. Ponadto, stopniowy wypływ K^+ zachodzi również przy wysokiej osmolarności podłoża zawierającego tzw. związki zgodne (betaina glicynowa, ektoina), które transportowane są do komórki i działają osmoprotekcyjnie. Aby zapobiec nadmiernemu wzrostowi turgoru, wynikającego z obecności związków zgodnych w cytoplazmie, K^+ eksportowany jest z komórki.

U *E. coli* i innych bakterii Gram-ujemnych dokładnie scharakteryzowano dwa systemy eksportu K^+ : KefB i KefC [13]. Każdy z nich jest dużym białkiem, z N-terminalnym transbłonowym regionem i dużą C-terminalną domeną, prawdopodobnie cytoplazmatyczną, która wiąże nukleotydy. Oba transportery mają ponadto mniejsze rozpuszczalne białko, YheR i YabF. Ich brak wiąże się z bardzo niską aktywnością systemów KefB i KefC.

W wypływie K^+ bardzo ważną rolę pełnią antyportery K^+/H^+ obecne u większości bakterii [6]. Mają one umiarkowane powinowactwo do K^+ ($K_m \sim 2.5 \text{ mM}$) i niską specyficzność substratową, a z eksportem K^+ konkurują jony Na^+ , Rb^+ i Li^+ . Mutanty, które nie mają aktywności antyporterowej K^+/H^+ są niezdolne do wzrostu przy wysokiej osmolarności i wysokim pH podłoża [29].

W eksporcie K^+ z komórki bakteryjnej uczestniczą również specjalne kanały homologiczne z kanałami eukariotycznymi. Są to między innymi: kanał KcsA *Streptomyces lividans* bramkowany protonami i MthK *Methanobacterium thermoautotrophicum* bramkowany Ca^{2+} [10, 16]. Kanał KcsA wykazuje najwyższą przewodność dla K^+ , nieco niższą dla Rb^+ , Tl^+ oraz NH_4^+

i ponad 1000 razy niższą przewodność dla Na^+ , Li^+ i Cs^+ [21]. Kanał MthK bardziej preferuje jony K^+ niż Na^+ [16]. Fizjologiczna funkcja tych kanałów nie jest dotychczas poznana.

Innym rodzajem bakteryjnych kanałów jonowych są mechanoczułe kanały reagujące na naprężenia błony komórkowej, które chronią bakterie przed nagłym spadkiem ciśnienia osmotycznego w środowisku [4, 12, 19]. U *E. coli* zidentyfikowano trzy typy tych kanałów tj. MscL, MscS i MscM, odpowiednio o dużej (3 nS-nano-siemens), średniej (1 nS) i małej (0.3 nS) przewodności, z których MscL i MscS należą do najlepiej poznanych kanałów mechanoczułych [38]. Struktura krystaliczna kanału MscL *Mycobacterium tuberculosis* pokazała, że jest to homopentamer, a każda podjednostka zbudowana jest z dwóch helis transbłonowych TM1 i TM2 [4]. Przejście ze stanu zamkniętego do otwartego wiąże się ze zmianą kąta nachylenia helisy TM1 do osi kanału z 32 do 71. W otwartej konformacji kanał ten ma por o średnicy 30–40 Å. Z kolei analiza struktury krystalicznej kanału MscS *E. coli* wykazała, że jest to heptamer z trzema transbłonowymi helisami: TM1, TM2 i TM3 w każdej monomerycznej podjednostce z silnie rozbudowanymi cytoplazmatycznymi regionami, których funkcja nie jest znana [19]. Por kanału MscS i jego bramkę tworzą helisy TM3. Ochronną funkcję kanałów mechanoosmotycznych potwierdza fakt, że szok hipoosmotyczny przeżywa tylko 10% mutantów, które nie syntetyzują MscL i MscS i aż 90% komórek dzikiego typu oraz komórek, które nie syntetyzują MscL lub MscS.

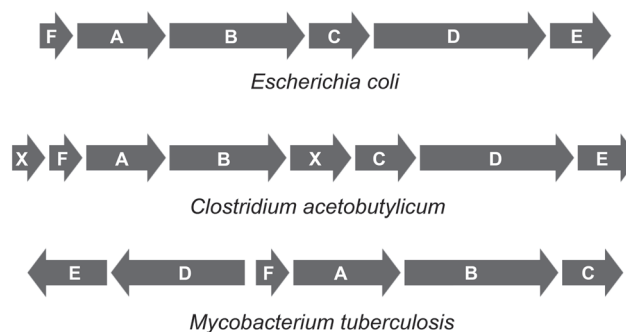
4. Regulacja systemów transportu K^+ do komórki bakteryjnej

4.1. Kontrola systemów transportu K^+ na poziomie ich aktywności

Ponad pół wieku temu stwierdzono, że u *E. coli* wraz ze wzrostem osmolarności podłoża wzrasta transport K^+ do komórki zachodzący w stopniu odwrotnie proporcjonalnym do stężenia tych jonów w cytoplazmie [27]. Fakt ten potwierdzono także u innych gatunków bakterii [12]. Dokładny mechanizm regulacji tego procesu nie jest znany, ale przyjmuje się, że spadek turgoru, w odpowiedzi na wzrost ciśnienia osmotycznego podłoża, powoduje aktywację białek transportujących K^+ do komórki. Model ten wyjaśnia przejściowy wzrost pobierania potasu tj. do momentu przywrócenia w komórce turgoru. Zgodnie z tym modelem, podczas normalnego wzrostu, turgor w komórce jest nieco poniżej optymalnego co zapewnia stałą stymulację transportu K^+ na poziomie odpowiednim do potrzeb komórki. Kiedy wzrost bakterii zostaje zahamowany, turgor komórki zwiększa się w niewielkim stopniu i import K^+ ustaje [11].

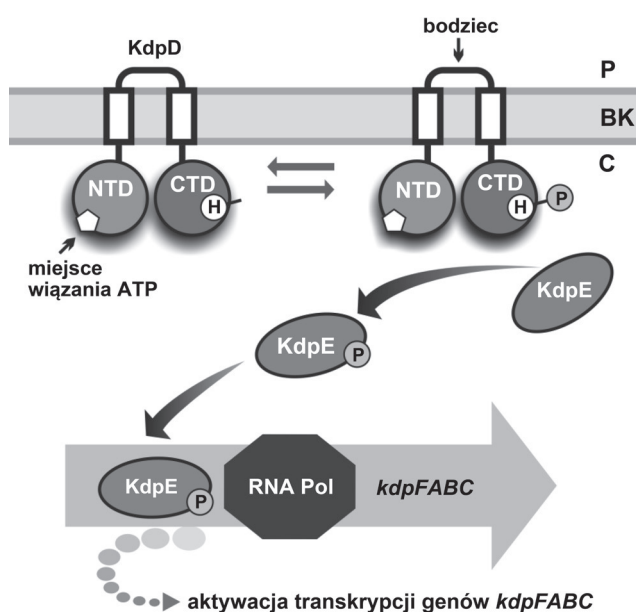
4.2. Osmotyczna regulacja transportera Kdp na poziomie transkrypcji

Wśród bakteryjnych transporterów K^+ jedynie ekspresja systemu Kdp regulowana jest na poziomie transkrypcji genów [3, 12]. Indukcja strukturalnych genów tego translokatora zachodzi przy udziale dwóch białek, KdpD i KdpE, które tworzą dwuskładnikowy system transdukcji sygnału. Wszystkie bakteryjne operony *kdp* są represowane podczas wzrostu w podłożu o wysokim stężeniu K^+ ($[\text{K}^+]_o$), a u *E. coli*, ekspresja genów *kdp* zachodzi przy zewnątrzkomórkowym stężeniu K^+ poniżej 2 mM [3]. Regulatorowe białka KdpD/E *E. coli* kodowane są przez operon, który zachodzi na operon genów kodujących funkcjonalne komponenty transportera Kdp, tj. *kdpE*, *kdpA*, *kdpB* i *kdpC* [1, 3]. W genie *kdpC* mieści się względnie słaby promotor i miejsce startu transkrypcji operonu *kdpD/E*, z tym że większość transkrypcji rozpoczynających się w promotorze operonu *kdpFABC* kończy się w genie *kdpD*, ale niektóre obejmują również gen *kdpE*. Ułożenie genów strukturalnych *kdpABC* w operonie jest generalnie podobne u wielu bakterii w przeciwieństwie do różnej lokalizacji genów regulatorowych *kdpD/E* (Rys. 1). Geny operonu regulatorowego kodują parę białek tj. duże białko sensorowe KdpD, związane z błoną komórkową o aktywności autokinazy, fosfotransferazy i fosfatazy oraz mniejsze cytoplazmatyczne białko efektorowe KdpE, zwane „regulatorem odpowiedzi”, które jest fosforylowane na reszcie aspartylowej przez białko sensorowe [30]. Ufosforylowane białko KdpE (KdpE~P) staje się transkrypcyjnym aktywatorem, wiąże się do sekwencji leżącej powyżej promotora operonu *kdpABC* i indukuje jego transkrypcję (Rys. 2). Sensorowe białko KdpD działa również jako fosfataza i usuwając resztę fosforanową z KdpE~P znosi jego aktywność transkrypcyjną. W sekwencji aminokwasowej 98.5-kD białka KdpD *E. coli* można wyróżnić duże cytoplazmatyczne terminalne regiony COOH i NH_2 przedzielone czterema transbłonowymi domenami. W domenie N-terminalnej



Rys. 1. Organizacja operonu *kdp* u bakterii

Strzałki wskazują kierunek transkrypcji określony na podstawie sekwencji nukleotydowej (Rysunek pochodzi z pracy: Ballal A., Basu B., Apte S.K., *J. Biosci.* 32, 559–568 (2007) za zgodą redakcji czasopisma)



Rys. 2. Aktywacja operonu *kdpFABC* przez dwuskładnikowy system transdukcji sygnału KdpD/KdpE

P – peryplazma, BK – błona komórkowa, C – cytoplazma, NTD – domena N-terminalna, CTD – domena C-terminalna, H – konserwatywna histydyna, P – fosforylacja, RNA Pol – polimeraza RNA (Rysunek pochodzi z pracy: Ballal A, Basu B., Apte S.K., *J. Biosci.* 32, 559–568 (2007) za zgodą redakcji czasopisma)

stwierdzono dwa motywy bardzo podobne do motywów „Walker A” i „Walker B”, które wiążą ATP i prawdopodobnie pełną ważną rolę w dostosowywaniu aktywności KdpD do aktualnych potrzeb komórki bakteryjnej. W domenie C-terminalnej występuje konserwatywna reszta histydynowa, która ulega fosforylacji. Przyjmuje się, że ulokowane w błonie komórkowej białko KdpD jest sensorem napięcia błonowego, które odzwierciedla wielkość ciśnienia turgorowego. Konformacyjne zmiany błony komórkowej, związane ze spadkiem ciśnienia turgorowego, indukują autofosforylację białka sensorowego KdpD. Wykazana *in vitro* autofosforylacja KdpD i transfer reszty fosforanowej na białko KdpE, które wiąże się z DNA [1], potwierdza ideę, że ciśnienie turgorowe poprzez fosforylację dwukomponentowego systemu KdpD/E jest sygnałem do ekspresji genów *kdp*. Model ten nie może być jednak precyzyjnie badany z powodu trudności mierzenia turgoru w komórkach bakteryjnych.

5. Podsumowanie

Jon potasu jest jednym z najważniejszych, jednowartościowych kationów występujących w cytoplazmie komórki, który służy jako wewnątrzkomórkowy osmolit utrzymujący turgor komórki [12]. U bardzo wielu gatunków bakterii, wewnątrzkomórkowe stężenie K^+ jest proporcjonalne do osmolarności podłoża i wykazuje

pozytywną korelację ze stopniem osmotolerancji mikroorganizmu [8, 12, 37]. U *E. coli*, będącej w logarytmicznej fazie wzrostu, stężenie K^+ w cytoplazmie zwiększa się z 0.15 do 0.55 M przy wzroście osmolarności podłoża z 0.1 do 1.2 osm. Korelacja ta ma miejsce jedynie w przypadku związków osmotycznie czynnych, które nie przenikają przez błonę komórkową (NaCl, sacharoza, glukoza), nie występuje zaś w przypadku związków, które swobodnie dyfundują przez błonę komórkową (glicerol) [8]. Wskazuje to, że sygnałem do akumulacji K^+ nie jest spadek aktywności wodnej cytoplazmy, a utrata turgoru. U większości bakterii, gromadzenie K^+ po szoku hiperosmotycznym jest tylko przejściowe i po 30 minutach od jego wystąpienia rozpoczyna się usuwanie K^+ z komórki, a funkcję ochronną przejmują tzw. związki zgodne [8].

W celu utrzymania odpowiedniego wewnątrzkomórkowego stężenia potasu, bakterie wykształciły wiele różnych systemów transportujących ten kation do i z komórki [12, 37]. Do najlepiej poznanych importerów K^+ u bakterii Gram-ujemnych należą transportery: Trk, Kdp, Ktr i Kup. System Trk, o niskim powinowactwie do K^+ , jest głównym importerem tego jonu do komórek rosnących w podłożu o pH obojętnym i zasadowym oraz wysokim stężeniu K^+ . Jest to wielopodjednostkowy kompleks białkowy wyrażany konstytutywnie. Podobne powinowactwo do K^+ , jak system Trk ma transporter Kup zbudowany z pojedynczego białka, który jest głównym importerem potasu w podłożu o pH kwaśnym. U wielu bakterii, u których nie stwierdzono transportera Trk, jak np. *Mycoplasma pneumoniae*, *Deinococcus radiodurans*, jak i tych posiadających ten transporter funkcjonuje Na^+/K^+ symporter Ktr. Importer ten zbudowany jest z transbłonowego białka KtrB i peryferyjnego białka KtrA związanego z błoną wiążącego nukleotydy. Kiedy aktywność opisanych transporterów potasu jest niewystarczająca, z powodu niskiego stężenia K^+ , indukcji ulega system Kdp o wysokim powinowactwie do substratu, który należy do ATPaz typu P. Jest to kompleks czterech białek błonowych: KdpF, KdpA, KdpB i KdpC kodowanych przez operon *kdpFABC*, który ulega ekspresji w odpowiedzi na spadek ciśnienia turgorowego. Niski turgor jest sygnałem aktywującym dwukomponentowy system transdukcji sygnału, zbudowany z sensorowej kinazy KdpD i regulatora odpowiedzi KdpE kontrolującego ekspresję operonu *kdpFABC*.

Związek między transportem K^+ u bakterii, a turgorem wskazuje, że homeostatyczny mechanizm przywracania turgoru przy wzroście osmolarności podłoża wiąże się ze zwiększonym importem potasu. Osmotycznie indukowana akumulacja K^+ , będąca główną lub pierwszą fazą osmoadaptacji, zachodzi poprzez szybką aktywację systemów transportu o niskim i wysokim powinowactwie do K^+ , a w przypadku transportera Kdp także na poziomie transkrypcji kodujących go genów.

Piśmiennictwo

- Altendorf K., Siebers A., Epstein W.: The KDP ATPase of *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 228–243 (1992)
- Bakker E.P.: Low-affinity K⁺ uptake systems (w) Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes, red. E.P. Bakker, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993, s. 253
- Ballal A., Basu B., Apte S.K.: The KDP-ATPase system and its regulation. *J. Biosci.* **32**, 559–568 (2007)
- Blount P., Moe P.C.: Bacterial mechanosensitive channels: integrating psychology, structure and function. *Trends Microbiol.* **10**, 420–424 (1999)
- Booth I.R.: Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359–378 (1985)
- Brey R.N., Ronsen B.P., Sorensen E.N.: Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*: absence of potassium/proton antiporter. *J. Biol. Chem.* **255**, 39–44 (1980)
- Corratgé-Faillie C., Jabnourne M., Zimmermann S., Véry A.-A., Fizames C., Sentenac H.: Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2511–2532 (2010)
- Csonka L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147 (1989)
- Dosch D.C., Helmer G.L., Sutton S.H., Salvacion F.F., Epstein W.: Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium. *J. Bacteriol.* **173**, 687–696 (1991)
- Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A.L., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69–77 (1998)
- Epstein W.: Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS*, **39**, 73–78 (1986)
- Epstein W.: The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**, 293–320 (2003)
- Ferguson G.P.: Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **7**, 242–247 (1999)
- Harms C., Domoto Y., Celik C., Rahe E., Stumpe S., Schmidt R., Nakamura T., Bakker E.P.: Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K⁺-uptake systems Trk^H and Trk^G from *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **147**, 2991–3003 (2001)
- Haltmann G., Bakker E.P., Uozumi N., Bremer E.: KtrAB and KtrCD: two K⁺-uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* **185**, 1289–1298 (2003)
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.: Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515–522 (2002)
- Johnson H.A., Hampton E., Lesley S.A.: The *Thermotoga maritima* Trk potassium transporter- from frameshift to function. *J. Bacteriol.* **191**, 2276–2284 (2009)
- Kem D.C., Trachewsky D.: Potassium metabolism (w) Potassium: its biologic significance, red. R. Wang, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1983, s. 23
- Koprowski P., Grajkowski W., Kubalski A.: Bakteryjne kanały jonowe jako struktury modelowe. *Kosmos*, **54**, 373–37 (2005)
- Lanyi J.K., Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272–290 (1974)
- LeMasurier M., Heginbotham L., Miller C.: KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**, 303–313 (2001)
- Luttman D., Heermann R., Zimmer B., Hillmann A., Rampp I.S., Jung K., Gorke B.: Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **72**, 978–994 (2009)
- Meury J., Kohiyama M.: ATP is required for K⁺ active transport in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *Arch. Microbiol.* **151**, 530–536 (1989)
- Meury J., Robin A., Monnier-Champeix P.: Turgor-controlled K⁺ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **151**, 613–619 (1985)
- Nakamura T., Yuda R., Unemoto T., Bakker E.P.: KtrAB, a new type of bacterial K⁺-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **180**, 3491–3494 (1998)
- Ochrombel I., Ott L., Krämer R., Burkovski A., Marin K.: Impact of improved potassium accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 444–450 (2011)
- Ørskov S.L.: Experiments in active and passive permeability of *Bacillus coli* communis. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **25**, 277–283 (1948)
- Parra-Lopez C., Lin R., Aspedon A., Groisman E.A.: A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *EMBO J.* **13**, 3964–3972 (1994)
- Plack R.H., Rosen B.P.: Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*: absence of potassium/proton antiporter activity in a pH-sensitive mutant. *J. Biol. Chem.* **225**, 3824–825 (1980)
- Polarek J.W., Williams G., Epstein W.: The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the KDP ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 2145–2151 (1992)
- Prell J., Mulley G., Haufe F., White J.P., Williams A., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S.: The PTS^{Ntr} system globally regulates ATP-dependent transporters in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **84**, 117–129 (2012)
- Prince W.S., Villarejo M.R.: Osmotic control of *proU* transcription is mediated through direct action of potassium glutamate on the transcription complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 17673–17679 (1990)
- Rhoads D.B., Epstein W.: Energy coupling to net K⁺-transport in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **252**, 1394–1401 (1977)
- Schleyer M., Bakker E.: Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that K⁺ uptake protein Kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.* **175**, 6925–6931 (1993)
- Schlösser A., Meldorf W., Stumpe S., Bakker E.P., Epstein W.: TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 1908–1910 (1995)
- Shabala L., Bowman J., Brown J., Ross T., McMeekin T., Shabala S.: Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic. *Environ. Microbiol.* **11**, 137–148 (2009)
- Sleator R.D., Hill C.: Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 49–71 (2001)
- Sukharev S.I., Martinac B., Arshavsky V.Y., Kung Ch.: Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys. J.* **65**, 177–183 (1993)
- Tholema N., Bakker E.P., Suzuki A., Nakamura T.: Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two order of magnitude decrease in the affinities for both K⁺ and Na⁺ of the Na⁺-dependent K⁺ uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEMS Lett.* **450**, 2170220 (1999)
- Trchounian A., Kobaya shi H.: Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyperosmotic stress at low pH. *FEMS Lett.* **447**, 144–148 (1999)
- Zakharyan E., Trchounian A.: K⁺ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H⁺ efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 61–64 (2001)