

Membrantransporter/ *solute carrier*

SLC23-Nukleobasentransport entschlüsselt

KATHARINA HOLZHÜTER¹, ERIC. R. GEERTSMA²

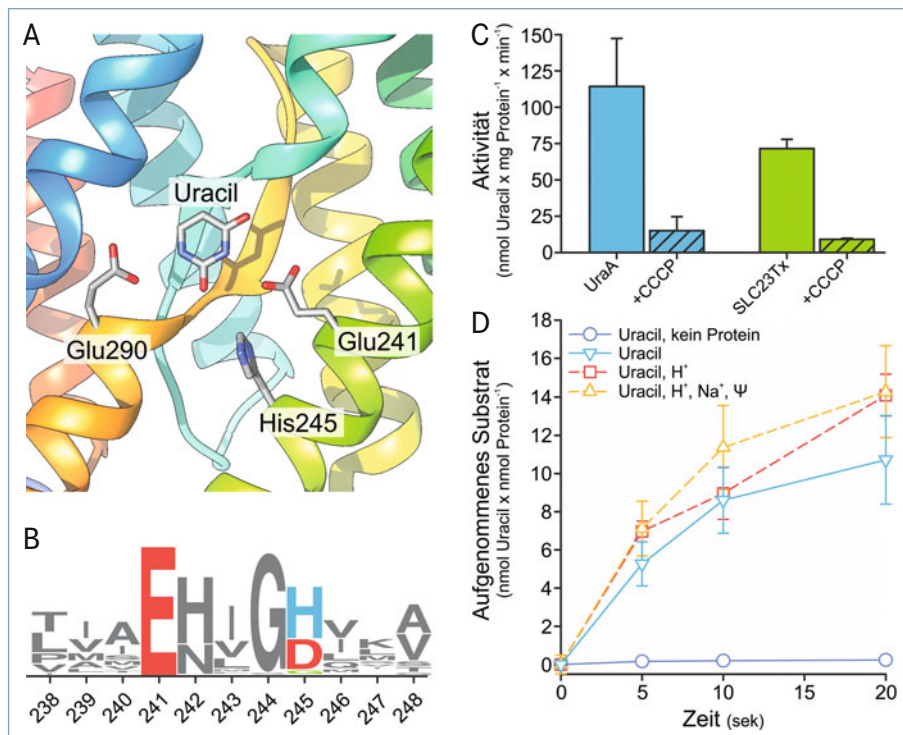
¹ INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

² MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE UND GENETIK, DRESDEN

SLC23 family members transport either nucleobases or vitamin C. While the structure of SLC23 nucleobase transporters is resolved in high detail, their transport mechanism is not: they have been proposed, but not formally shown, to be proton-coupled symporters. Here, by establishing the first *in vitro* transport assay for this protein family, we demonstrate that a representative member of the SLC23 nucleobase transporters operates as a uniporter instead.

DOI: 10.1007/s12268-022-1690-0

© Die Autorinnen und Autoren 2022



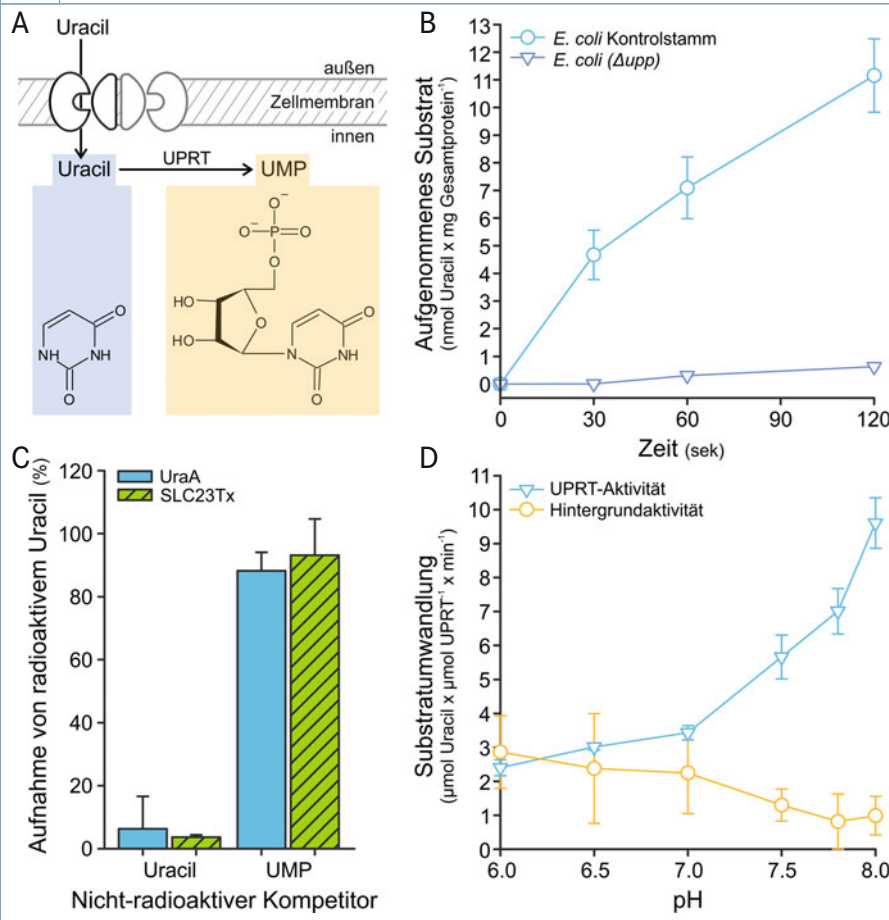
▲ **Abb. 1:** Triebkraft des Transports von Uracil durch SLC23-Transporter. **A**, Struktur der Substratbindestelle in UraA. **B**, Konservierung von Aminosäuren in der Substratbindestelle von SLC23-Nukleobasentransportern. Die Größe des Buchstabens gibt den Grad der Konservierung an und die Zahlen zeigen die Aminosäurepositionen in UraA an. **C**, Der Protonophor CCCP vermindert die Uracil-Transportaktivität von UraA und SLC23Tx in *Escherichia coli*-Zellen. **D**, Transport von Uracil in SLC23Tx-Proteoliposomen in Anwesenheit verschiedener Gradienten (Uracil, Substratgradient; H⁺, Protonengradient; Na⁺, Natriumgradient; Ψ, Membranpotential, innen negativ). Die Datenpunkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Replikaten dar.

■ *Solute carrier* transportieren zahlreiche Metabolite und Ionen über biologische Membranen, die sonst für sie undurchlässig wären. Diese Transporter erfüllen damit eine essenzielle biologische Funktion. Proteine der SLC23-Familie transportieren Nucleobasen, die Bausteine von DNA und RNA, und finden sich in allen Domänen des Lebens. Eine Ausnahme sind die Homologe aus höheren Eukaryoten: Sie transportieren stattdessen Vitamin C.

SLC23-Transporter, deren Funktion bislang untersucht wurde, werden als sekundär aktiv beschrieben, das heißt, sie koppeln die intrazelluläre Akkumulation von Nucleobasen oder Vitamin C gegen deren Konzentrationsgradienten an den – energetisch begünstigten – Influx von Protonen oder Natriumionen. Strukturen von SLC23-Homologen, die des Uraciltransporters UraA aus *Escherichia coli* sowie der von UapA, einer Xanthin-Permease aus *Aspergillus nidulans*, zeigen eine Reihe geladener oder polarer Reste in der Nähe der Substratbindestelle (**Abb. 1A**, [1, 2]). Aufgrund der starken Konservierung dieser Reste nahm man an, dass sie zur Protonenkopplung beitragen würden (**Abb. 1B**). Zellbasierte Transportversuche und molekulardynamische Simulationen deuteten auf eine Bedeutung dieser Reste für den Substrattransport hin, aber die genaue molekulare Grundlage für gekoppelten Nucleobasen- und Protonentransport war bisher nicht bekannt. Wir wollten deshalb zunächst herausfinden, wie diese Kopplung in SLC23-Transportern erreicht wird.

Scheinbarer protonengekoppelter Transport *in vivo*

Der Transport von radioaktiv markierten Nucleobasen in *E. coli* stellt einen unkomplizierten, einfach durchzuführenden Aktivitätsassay für die SLC23-Familie dar. Die Protonenkopplung in dieser Proteinfamilie wurde bislang ausschließlich anhand dieser *in vivo*-Experimente untersucht. Wie andere Forschungsgruppen beobachteten auch wir eine drastische Verringerung des Uracil-



▲ **Abb. 2:** Bedeutung von UPRT für die Aufnahme von Uracil *in vivo*. **A,** In *Escherichia coli* wird aufgenommenes Uracil in UMP umgewandelt. **B,** UPRT, das vom *upp*-Gen codiert wird, ist wichtig für die *in vivo*-Aufnahme von Uracil. Uraciltransport ist im *upp*-Knockout-Stamm reduziert. **C,** Die Zugabe von UMP hemmt die Aufnahme von radioaktivem Uracil nicht, im Gegensatz zur Zugabe von einem Überschuss an nicht radioaktivem Uracil. **D,** Die Aktivität von UPRT ist pH-abhängig. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Replikaten dar.

transports durch UraA nach Zugabe eines Protonophors, einer Verbindung, die eine sofortige Aufhebung des physiologischen Protonengradienten verursacht [3]. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Transport von Nucleobasen durch SLC23-Proteine protonenabhängig ist. Wir sahen eine ähnliche Verringerung des Transports auch bei einem neuen SLC23-Homolog aus *Thalassospira xiamenensis*, SLC23Tx (**Abb. 1C**).

In vitro-Transport von Uracil

Im Gegensatz zu UraA konnte gereinigtes SLC23Tx effizient in Liposomen rekonstituiert werden, was es uns ermöglichte, die treibenden Kräfte des Transports viel detaillierter zu untersuchen als mit einem zellbasierten Assay. Die meisten Zellen pumpen Protonen und Natriumionen hinaus, was zu Konzentrationsgradienten führt, die von Symportern für die Aufnahme von Metaboliten genutzt werden können. Der Export von Kationen aus der Zelle resultiert darüber hinaus in einer höheren Konzentration negativer Ladungen im Inneren der Zelle, was in

einem negativen Membranpotenzial resultiert, das als zusätzliche Antriebskraft wirken kann.

Beim Anlegen aller drei Gradienten beobachteten wir eine robuste Aufnahme von Uracil in Proteoliposomen von SLC23Tx (**Abb. 1D**). Überraschenderweise aber hatte das Fehlen des Membranpotenzials, des Natriumionen- oder des Protonengradienten keine nennenswerten Auswirkungen auf die Uraciltransportrate. Es scheint also, dass der Konzentrationsgradient des Substrats ($[Uracil]_{out} > [Uracil]_{in}$) die einzige Antriebskraft für den Transport ist. Im *in vitro*-Assay funktioniert SLC23Tx daher als Uniporter und nicht als Protonensymporter, wie es der *in vivo*-basierte Uraciltransport nahelegte. Eine wichtige Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass Uniporter im Gegensatz zu Symportern ihr Substrat nicht entgegen des Konzentrationsgradienten akkumulieren können. Der Nettotransport endet, sobald sich die Konzentrationen des Substrats auf beiden Seiten der Membran angeglichen haben ($[Uracil]_{out} = [Uracil]_{in}$).

Eine Erklärung für den protonenabhängigen *in vivo*-Transport

Um die unterschiedlichen Beobachtungen beim Vergleich des Transports *in vivo* und *in vitro* zu erklären, haben wir das Schicksal von Uracil nach seiner Aufnahme in die Zelle untersucht. In *E. coli* befindet sich das Gen für den Uraciltransporter UraA im selben Operon wie *upp*, das für die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT) codiert. Dieses Enzym katalysiert die intrazelluläre Umwandlung von Uracil in Uridinmonophosphat (UMP) (**Abb. 2A**, [4]). Die Aktivität von UPRT erwies sich als äußerst wichtig für den Transport: In einem *upp*-Knockout-Stamm war die Uracilaufnahme durch SLC23Tx oder UraA drastisch reduziert (**Abb. 2B**). Da UMP deutlich größer ist als Uracil, untersuchten wir als nächstes, ob UMP immer noch als Substrat von SLC23Tx oder UraA erkannt werden würde. UMP zeigte weder eine Konkurrenz von Uracil in Zellen, noch erhöhte es die Stabilität der beiden Proteine während der hitzebedingten Entfaltung, im Gegensatz zu dem Substrat Uracil (**Abb. 2C**). Die Phosphoribosylierung von Uracil zu UMP, das nicht länger vom Transporter erkannt wird, ist daher ein effektiver Weg, den Substratgradienten über der Membran aufrecht zu erhalten.

Die obigen Ausführungen erklären zwar die Bedeutung von UPRT für den Transport von Uracil *in vivo*, nicht aber die Relevanz eines Protonengradienten. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die Zugabe eines Protonophors nicht nur den Protonengradienten aufhebt, sondern auch den intrazellulären pH-Wert so verändert, dass er dem des externen Mediums entspricht [5]. Aufgrund des experimentellen Aufbaus des *in vivo*-Transportassays führt die Inkubation der Zellen mit einem Protonophor zu einer Azidifizierung des Cytoplasmas. Bei der Analyse des pH-abhängigen Aktivitätsprofils von gereinigtem UPRT haben wir festgestellt, dass das Enzym bei einem pH-Wert unter 7,0 nicht mehr aktiv ist (**Abb. 2D**). Unsere Daten deuten daher darauf hin, dass die Wirkung des Protonophors auf die Uracilaufnahme *in vivo* nicht auf die protonengekoppelte Aufnahme von Nucleobasen zurückzuführen ist, sondern auf eine Inaktivierung von UPRT bei niedrigem intrazellulärem pH-Wert [6].

Nucleobasentransporter der SLC23-Familie sind Uniporter

Anstatt als protonengekoppelte Symporter arbeiten SLC23-Uracil-Transporter also auch

in vivo als Uniporter. Die Aufnahme von Uracil unterliegt nur dem Substratgradienten; der Substratgradient wiederum wird durch die Entfernung von intrazellulärem Uracil durch dessen Umwandlung in UMP aufrechterhalten, die von UPRT katalysiert wird. Frühere Veröffentlichungen über die Funktion von SLC23-Transportern mit unterschiedlichen Substratspezifitäten deuten darauf hin, dass nachgeschaltete modifizierende Enzyme auch bei der Aufnahme anderer Nucleobasen, z. B. Adenin und Hypoxanthin, eine Rolle spielen könnten [7, 8].

Die Bedeutung dieser nachgeschalteten Enzyme wurde bisher bei der Untersuchung der SLC23-Transporteraktivität weitgehend vernachlässigt und hat, wie wir exemplarisch für den Transport von Uracil durch SLC23Tx und UraA zeigen, zu der Interpretation dieser Transporter als Protonensymporter geführt. Erst die Etablierung eines *in vitro*-Transportassays, bei dem die Transporterfunktion ohne die Hintergrundaktivität anderer Transportproteine und losgelöst vom zellulären Stoffwechsel untersucht werden kann, ermöglichte die eindeutige Identifizierung der treibenden Kräfte für den Transport von Nucleobasen durch die SLC23-Familie und offenbarte deren Funktion als Uniporter. Dieser Nachweis von Uniport in SLC23-Proteinen ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem mechanistischen Verständnis dieser Transporter, das nicht mehr auf die Relevanz einer Protonenbindestelle ausgerichtet ist.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch SFB807 und das CEF-MC unterstützt. ■

Literatur

- [1] Lu F, Li S, Jiang Y et al. (2011) Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature* 472: 243–247
- [2] Alguet Y, Amillis S, Leung J et al. (2016) Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat Commun* 7: 11336
- [3] Botou M, Lazou P, Papakostas K et al (2018) Insight on specificity of uracil permeases of the NAT/NCS2 family from analysis of the transporter encoded in the pyrimidine utilization operon of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 108: 204–219
- [4] Andersen PS, Frees D, Fast R, Mygind B (1995) Uracil uptake in *Escherichia coli* K-12: isolation of uraA mutants and cloning of the gene. *J Bacteriol* 177: 2008–2013
- [5] Wilks JC, Slonczewski JL (2007) pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol* 189: 5601–5607
- [6] Holzhüter K, Geertsma ER (2022) Uniport, not proton-symport, in a non-mammalian SLC23 transporter. *J Mol Biol*, doi: 10.1016/j.jmb.2021.167393
- [7] Bagnara AS, Finch LR (1974) The effects of bases and nucleosides on the intracellular contents of nucleotides and 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 41: 421–430
- [8] Burton K (1977) Transport of adenine, hypoxanthine and uracil into *Escherichia coli*. *Biochem J* 186: 195–204

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:

Dr. Eric R. Geertsma
 Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik
 Pfotenhauerstraße 108
 D-01307 Dresden
 geertsma@mpi-cbg.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Katharina Holzhüter

Jahrgang 1991. Biochemiestudium an der Universität Frankfurt a. M. Seit 2016 Promotion am Institut für Biochemie, Universität Frankfurt a. M.



Eric R. Geertsma

Jahrgang 1976. Biochemiestudium an der Universität Groningen, Niederlande. 2005 Promotion. 2005–2008 Postdoc an der Universität Groningen. 2008–2013 Postdoc als FEBS- und HFSP-Fellow an der Universität Zürich, Schweiz. 2014–2020 Juniorprofessor am Institut für Biochemie, Universität Frankfurt a. M. Seit 2020 Technology Development Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer