

Bakterielle Organellen

Polyphosphat – ein unterschätztes Molekül

DIETER JENDROSSEK, JENNIE C. HILDENBRAND
ZENTRUM FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK, INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE,
UNIVERSITÄT STUTTGART

Polyphosphate (polyP) is an inorganic biopolymer ubiquitously present in all species. It has a variety of functions ranging from that of a reservoir for phosphorus in many microorganisms to functions in blood coagulation and plays a role in neurodegenerative diseases in humans. Here, we provide a summary of the structure and functions that have been addressed to polyP in microorganisms.

DOI: 10.1007/s12268-022-1856-9
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Polyphosphat (PolyP) besteht aus Phosphatresten, die durch energiereiche Phosphoanhydrid-Bindungen verknüpft sind. Es kann in linearer, verzweigter oder auch zyklischer Form (Ultrapolyphosphat) vorliegen [1]. PolyP besteht häufig aus nur wenigen bis einigen Dutzend P_i -Resten, kann aber auch in hochmolekularer Form mit mehreren hundert P_i -Resten vorkommen. Aufgrund seiner abiotischen Entstehung, etwa bei Vulkanausbrüchen, und des daraus abgeleiteten präbiotischen Vorkommens wird vermutet, dass PolyP an der Entstehung des Lebens als gut verfügbare, chemisch-physikalisch regenerative Energiequelle beteiligt gewesen sein könnte.

PolyP ist eine polyanionische Molekülkette und liegt in Bakterien mit Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+) komplexiert, meist unlöslich in Form von *inclusion bodies* vor. Die PolyP-Granula sind in der Regel 50–200 Nanometer (selten über 500 nm) im Durchmesser und wurden früher aufgrund ihres reichlichen Vorkommens im Süßwasserbakterium *Spirillum volutans* als Voluntin-Granula bezeichnet. Sie lassen sich gut mit basischen Farbstoffen (Neisser-Färbung), aber auch mit DAPI anfärben und licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch einfach nachweisen (DAPI-PolyP fluoresziert bei ca. 520–540 nm, während DAPI-DNA- und DAPI-RNA-Komplexe bei kürzeren Wellenlängen emittieren). Im Elektronenmikroskop erscheinen PolyP-Granula dunkler

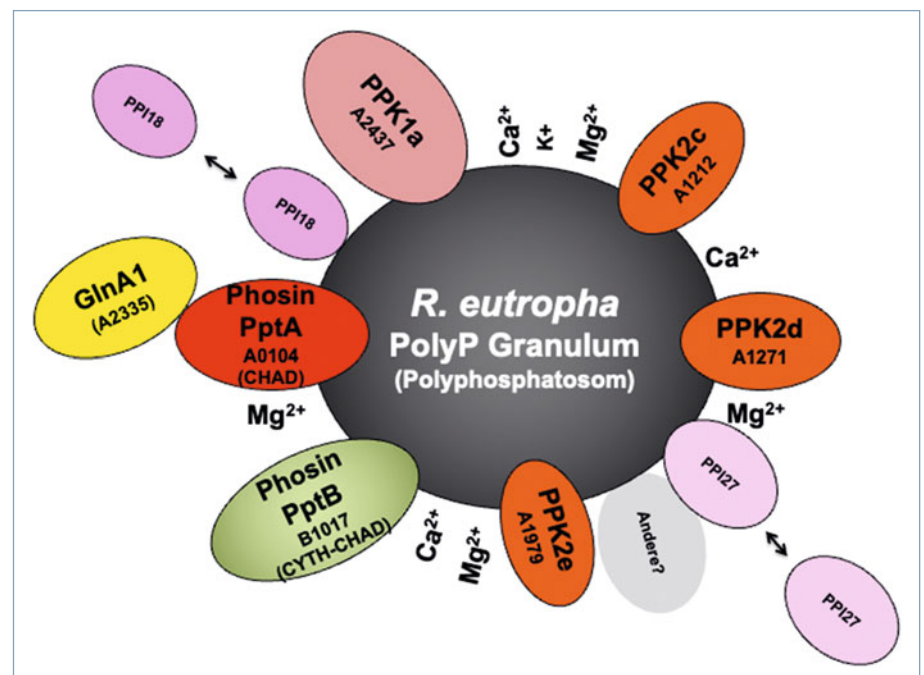
(elektronendichter) als das umgebende Cytoplasma.

Polyphosphatkinasen

Bakterien synthetisieren PolyP aus Nucleosidtriphosphaten (NTPs) mithilfe von PolyP-

Kinasen (PPKs). Es sind zwei Typen von PPKs bekannt: Typ I-PPKs (80-kDa-Proteine) nutzen ATP (oder andere NTPs) zur PolyP-Synthese, während Typ II-PPKs (30–40-kDa-Proteine) *in vivo* in der Regel PolyP zur Phosphorylierung von GDP (oder NDP) nutzen (Übersichten in [2, 3]).

In den vergangenen Jahren stieg das Interesse für PolyP und die Reaktionen von PPKs deutlich. Wir und andere Gruppen konnten zeigen, dass PPKs nicht nur die Regeneration von NTPs mittels PolyP als P_i -Donor ermöglichen, sondern dass PPKs (insbesondere PPK2s) Nucleotide zumindest *in vitro* zu oligophosphorylierten, bis hin zu nonaphosphorylierten Nucleotiden katalysieren [4]. Die PPKs aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Ralstonia eutropha* sind vergleichsweise unspezifisch und können nicht nur alle NDPs umsetzen [5], sondern sind sogar in der Lage, Thiaminphosphat (Th1P) und Thiamindi-



▲ **Abb. 1:** Modell eines Polyphosphatosoms in *Ralstonia eutropha*. PolyP-assoziierte Proteine sind als Ellipsen mit Proteinbezeichnung und Gennummer dargestellt. Die Pfeile weisen darauf hin, dass diese Proteine nicht permanent mit dem PolyP-Granulum assoziiert sind. Die Proteine sind in Relation zur PolyP-Granula-Größe der Übersichtlichkeit halber stark vergrößert dargestellt. Modifiziert aus [8].

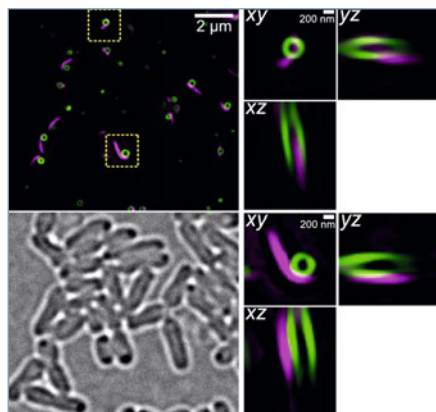
phosphat (Th2P) (Vitamin B1) zu höher phosphorylierten Verbindungen umzusetzen [6]. Inwieweit diese bislang nur *in vitro* nachgewiesenen Aktivitäten auch *in vivo* stattfinden und welche Funktionen die oligophosphorylierten Nucleotide und oligophosphorylierten Thiaminderivate haben, ist unbekannt. Zumindest Thiamintriphosphat (Th3P) wurde in *Escherichia coli* und in Geweben höherer Eukaryoten nachgewiesen [7]. Für *E. coli* ist bekannt, dass die intrazellulären Konzentrationen von Th3P nach einem die *stringent response* hervorrufenden Wechsel von Komplexmedium auf Aminosäure-freies Mineralmedium (*nutrient downshift*) stark ansteigen. Da PolyP (neben (p)ppGpp) ein Produkt der *stringent response* in *E. coli* ist, ist es denkbar, dass Th3P ein (Neben-)Produkt der PolyP-abhängigen Phosphorylierung durch die *E. coli*-PPK ist. Dass die *E. coli*-PPK *in vitro* Th1P und Th2P – wenn auch nur mit geringer Effizienz – phosphorylieren kann, konnten wir kürzlich zeigen [6].

Funktion und Aufbau von PolyP-Granula

PolyP-Granula stellen in Bakterien einen wichtigen Phosphor- bzw. Phosphatspeicher nebst zugehörigen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}) dar [2]. Es gibt vielfältige Hinweise, dass PolyP neben der Speicherfunktion diverse weitere Funktionen hat und etwa in *Mycobacterium tuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa* an der Pathogenität und Resistenz gegenüber diversen Stressfaktoren (Sauerstoffradikale, Schwermetalle) beteiligt ist (aktuelle Zusammenfassung siehe [8]).

Einschlusskörper in Bakterien stellen generell subzelluläre Kompartimente bzw. supramolekulare Komplexe dar, die spezielle physiologische Funktionen ausüben und häufig von der Zelle determiniert subzellulär positioniert sind [9]. Magnetosomen und Granula aus Polyhydroxybuttersäure (PHB) und (allgemeiner) PHA-Granula sind zwei bekannte Beispiele solcher Organell-ähnlichen Kompartimente: Erstere sind Phospholipidmembran-umhüllte Eisenoxidkristalle und dienen der Orientierung magnetotaktischer Bakterien im Magnetfeld, letztere sind Phospholipidmembran-freie, aber mit einer Proteinschicht umhüllte Polyester aus 3-Hydroxybuttersäure- bzw. Hydroxyalkansäure-Einheiten. Dies erlaubt ein Überleben auch bei Abwesenheit exogener C-Quellen.

Für die Funktion der Magnetosomen und PHB/PHA-Granula (Carbonosomen) ist die Anwesenheit spezifischer Proteine in der



▲ **Abb. 2:** 3D-SIM-Aufnahme von *Agrobacterium tumefaciens* (pBBR1MCS2-ppk1_{AT}-mCherry und pTrc200-P_{lac}-eyfp-ppk2_{AT}). Overlay des mCherry und GFP-Kanals (oben links), Durchlicht (unten links). Die Ausschnitte (rechts) zeigen vergrößerte Darstellungen der oben links markierten Quadrate in xy-, yz- und xz-Richtung. Die Aufnahmen weisen auf eine homogene Bindung von eYFP-PPK2_{AT} (grün) und eine partielle Assoziation von PPK1_{AT}-mCherry (pink) an der Oberfläche von PolyP-Granula hin. Foto: D. Pfeiffer und C. Frank. Aus [13], verändert.

jeweiligen Membran- bzw. Proteinhüllschicht charakteristisch und essenziell. Ob PolyP-Granula ebenfalls von einer spezifischen Hüllschicht umgeben sind und welche Funktionen die in ihr enthaltenen Moleküle haben könnten, war bis vor kurzem kaum untersucht. Fluoreszenzmikroskopische Versuche an PolyP-Granula in *R. eutropha* H16 – ein aufgrund seiner starken PHB-Granula-Produktion und seiner Befähigung zur Lithoautotrophie in vielen Arbeitsgruppen verwendeter Modellorganismus – zeigen, dass bis zu acht verschiedene Proteine zumindest zeitweise *in vivo* an der Oberfläche von PolyP-Granula lokalisiert sind (**Abb. 1**). Bei vier von ihnen handelt es sich um PPKs, die für die PolyP-Synthese und für die Verwertung von PolyP zur Regeneration von NTPs zuständig sind. Zwei der PolyP-assoziierten Proteine (PptA, PptB) weisen ein CHAD-Motiv auf (*conserved alpha helical domain*) und werden in Analogie zu PHB/PHA-Granula-assoziierte PHOsine klassifiziert [10]. Phosine sind bei Bakterien weit verbreitet und weisen aufgrund ihres mit positiv geladenen Aminosäureresten ausgekleideten zentralen Tunnels [11] eine extrem starke Bindung zu PolyP sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf; die Funktion der beiden übrigen spezifisch PolyP-assoziierten Proteine in *R. eutropha* ist unbekannt.

Darüber hinaus ist in *R. eutropha* eine von drei Glutaminsynthetasen (GlnA1) durch Bindung an das Phosin PptA indirekt an PolyP gebunden (**Abb. 1**). Dieser Befund deutet auf eine mögliche Verknüpfung des P- mit dem N-Stoffwechsel hin. Alle Versuche des Nachweises einer Phospholipidmembran um PolyP-Granula verliefen erfolglos. Die in der Literatur postulierte Anwesenheit von PolyP in Phospholipidmembran-umhüllten Acidocalcisomen in Vertretern der α -Proteobakterien (*Rhodospirillum rubrum*, *A. tumefaciens*) wird daher als Artefakt angesehen [12]. *A. tumefaciens* verfügt über zwei PPKs (je eine PPK1 und eine PPK2). Während PPK2_{AT} an die Oberfläche von PolyP-Granula gleichmäßig gebunden ist, ist PPK1_{AT} nur zeitweise (während der PolyP-Synthese) mit dem PolyP-Granulum an einer Seite assoziiert (**Abb. 2**, [13]).

Zellbiologische Aspekte von PolyP

A. tumefaciens-Zellen weisen in der Regel nur ein PolyP-Granulum auf, das in unmittelbarer Nähe des alten Zellpols lokalisiert ist. *A. tumefaciens* unterscheidet sich von den meisten übrigen bakteriellen Spezies durch seinen polaren Wachstumsmodus, der mit jeder Zellteilung eine Neuorganisation des wechselnden Wachstumspols erfordert. Zeitraffer-Untersuchungen zeigen, dass PolyP-Granula kurz vor der Zellteilung vom alten Zellpol zum (neuen) Wachstumspol migrieren können [13]. Möglicherweise ist der Bedarf an Phosphorylierungskapazität in der Nähe des Wachstumspols zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus besonders hoch und kann durch die Anwesenheit von PolyP gedeckt werden. Für *R. eutropha* und andere Spezies ist eine Wanderung von PolyP-Granula nicht bekannt (oder nicht untersucht). Allerdings wurde kürzlich mit AlgP in *P. aeruginosa* ein neues PolyP-assoziiertes Protein beschrieben, das an der subzellulären Positionierung von PolyP beteiligt ist [14].

Das Polyphosphatosom – ein bakterielles Organell

PolyP-Granula in Bakterien sind supramolekulare Komplexe aus einem PolyP-Kern mit mehreren PolyP-assoziierten Proteinen unterschiedlicher Funktionen, für die die Bezeichnung Polyphosphatosom vorgeschlagen wurde [10]. Die subzelluläre Positionierung dieser Polyphosphatosomen variiert in verschiedenen Spezies (häufig in der Nucleoidregion oder in Zellpolnähe), erfolgt in daraufhin untersuchten Spezies aber nicht zufällig.

In *A. tumefaciens* (und möglicherweise auch in anderen Spezies mit polarem Wachstumsmodus) können PolyP-Granula in Abhängigkeit vom Zellzyklus wandern. Die bisher bekannten Befunde zum Aufbau und zur Funktion von Polyphosphatosomen sind unvollständig. Die Bestimmung der Polyphosphatosom-Proteome und die phänotypische Analyse von Defektmutanten (im PolyP-Proteom) sollte in Zukunft in verschiedenen Spezies vorgenommen werden. ■

Literatur

- [1] Jessen HJ, Dürr-Mayer T, Haas TM et al (2021) Lost in condensation: poly-, cyclo-, and ultraphosphates. *Acc Chem Res* 54: 4036–4050
- [2] Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem* 78: 605–647
- [3] Neville N, Roberge N, Jia Z (2022) Polyphosphate kinase 2 (PPK2) enzymes: structure, function, and roles in bacterial physiology and virulence. *Int J Mol Sci* 23: 670
- [4] Frank C, Teleki A, Jendrossek D (2020) Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* PPKs reveals the formation of oligophosphorylated products up to nucleoside nona-phosphates. *Appl Microbiol Biotechnol* 265: 11734–11710
- [5] Hildenbrand JC, Teleki A, Jendrossek D (2020) A universal polyphosphate kinase: PPK2c of *Ralstonia eutropha* accepts purine and pyrimidine nucleotides including uridine diphosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 265: 11734–11739
- [6] Hildenbrand JC, Sprenger GA, Teleki A et al (2022) Polyphosphate kinases phosphorylate thiamine phosphates. *Microb Physiol*, DOI: 10.1159/000526662
- [7] Bettendorff L (2021) Update on thiamine triphosphorylated derivatives and metabolizing enzymatic complexes. *Biomolecules* 11: 1645
- [8] Jendrossek D (2020) Polyphosphate granules and acidocalcisomes. In: Jendrossek D (Hrsg.) *Bacterial organelles and organelle-like inclusions*. Springer, New York, 1–17
- [9] Greening C, Lithgow T (2020) Formation and function of bacterial organelles. *Nat Rev Microbiol* 18: 677–689
- [10] Tumlirsch T, Jendrossek D (2017) Proteins with CHADs (Conserved Histidine α -Helical Domains) are attached to polyphosphate granules *in vivo* and constitute

- a novel family of polyphosphate-associated proteins (phosins). *Appl Environ Microbiol* 83: e03399-16
- [11] Lorenzo-Orts L, Hohmann U, Zhu J, Hothorn M (2019) Molecular characterization of CHAD domains as inorganic polyphosphate-binding modules. *Life Sci Alliance* 2: e201900385
- [12] Frank C, Jendrossek D (2020) Acidocalcisomes and polyphosphate granules are different subcellular structures in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 86: e02759-19
- [13] Frank C, Pfeiffer D, Aktas M, Jendrossek D (2022) Migration of polyphosphate granules in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microb Physiol* 32: 71–82
- [14] Chawla R, Klupt S, Patsalo V et al (2022) The histone H1-like protein AlgP facilitates even spacing of polyphosphate granules in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 13: e0246321

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:

Prof. Dr. Dieter Jendrossek
Universität Stuttgart
Zentrum für Bioverfahrenstechnik
Institut für Mikrobiologie
Allmandring 31
D-70569 Stuttgart
dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Dieter Jendrossek

Biologiestudium (Diplom) an der Universität Göttingen. 1988 Promotion und 1995 Habilitation bei Prof. Dr. H. G. Schlegel (Göttingen). 1995 Kurzaufenthalt AG Prof. Dr. H. Schrempf an der Universität Osnabrück. Seit 1999 apl. Professor an der Universität Stuttgart. 2005 Visiting Professor an der German University Cairo (GUC), Ägypten. Seit 2017 im Sprecherteam der Fachgruppe Mikrobielle Zellbiologie.



Jennie C. Hildenbrand

2011–2017 Biologiestudium an der Universität Hohenheim. Seit 2018 Promotion an der Universität Stuttgart in der AG Mikrobielle Zellbiologie und Biopolymere unter Anleitung von apl. Prof. Dr. D. Jendrossek.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer