

Molekulare Analyse des pleiotropen ABC-Transporters Pdr5 aus *S. cerevisiae*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Petra Küppers
aus Heinsberg

Düsseldorf

2010

Aus dem Institut für Biochemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Lutz Schmitt
Koreferent: PD. Dr. Ulrich Schulte

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2010

Zusammenfassung

Der ATP-binding cassette (ABC)-Transporter Pdr5 ist der Hauptvertreter der pleiotropen Drogenresistenz (PDR) der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Er gehört zu einer besonders vielfältigen Familie von Membrantransportproteinen, die durch die Hydrolyse von ATP den Transport einer Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedlicher Substanzen über die Membranen vermitteln. ABC-Transporter sind ubiquitär und kommen in allen Bereichen des Lebens vor. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die hohen Expressionslevel von Pdr5 in einem genetisch modifizierten *PDR1-3* Expressionsstamm genutzt, um eine allgemein anwendbare Klonierungskassette zur Expression und Reinigung unterschiedlicher Membranproteine über einen Affinitätstag zu etablieren. Die Evaluation erfolgte dabei durch eine standardisierte Aufreinigung unterschiedlicher Transportsysteme der Hefe, die den Einsatz der entwickelten Strategie als *High-Throughput* Methode bestätigen konnte. Im zweiten Teil wurde der PDR ABC-Transporter Pdr5 als Modellsystem detailliert untersucht. Die Bedeutung dieser Transportsysteme in klinisch relevanten Erkrankungen ist eindeutig definiert, allerdings ist das molekulare Verständnis bezüglich der exakten Mechanismen in der Bereitstellung der Energie und der engen Verknüpfung von Substraterkennung und –translokation bislang noch sehr limitiert. In diesem zentralen Teil der Arbeit wurde der Exporter durch gezielte Mutationen funktionell *in vivo* und in angereicherten Plasmamembran Präparationen auf seine ATPase- und Transportaktivität untersucht. Eine katalytische Dyade aus einem Histidin und einem Glutamat als funktionelle Einheit des ATP-Hydrolyse Mechanismus konnte dabei für Pdr5 eindeutig ausgeschlossen werden, obwohl dieses Wirkprinzip bislang mit den meisten analysierten ABC-Transportern in Einklang gebracht werden konnte. Lediglich das Glutamat ist für die Pdr5 spezifische Aktivität essentiell, während das Histidin keinen Einfluss auf die basale ATPase Aktivität ausübt. Stattdessen beeinflusste die Mutation des konservierten Histidins (H1068A) selektiv den Substrattransport, die eine Entkopplung der ATPase Aktivität in Pdr5 vom Transport bestimmter Substrate wie Rhodamin 6G belegte. Des Weiteren wurde die PDR spezifische Degeneration der ansonsten konservierten Konsensussequenzen analysiert, die eine funktionelle Asymmetrie der NBDs mit einer katalytisch aktiven (C-Terminus) und einer regulatorischen ATP-Bindungstasche (N-Terminus) bestätigte. Die Rekonstruktion der degenerierten

Motive zur Generierung symmetrischer NBDs führte zum vollständigen Verlust der Aktivität, während die Mutation einzelner Motive teilweise gar keinen Effekt bewirkten. Einen Einblick in die Mechanismen der Substratselektivität der pleiotropen ABC-Transporter wurde durch die gezielte Analyse der proteinspezifischen Interaktionen mit Substraten, Modulatoren und Energiequellen ermöglicht. Dabei wurde nicht nur die tatsächliche Funktion des Modulators FK506 als Substrat von Pdr5 identifiziert, sondern auch die spezifische sensorische Funktion eines konservierten Serins in der putativen Substratbindetasche. Die Substratselektivität wird dabei ebenfalls durch die NBDs definiert, sei es durch eine Mutation wie z.B. beim *H-loop* (H1068A) oder durch die Wahl der Energiequelle, die jeweils zu einer Verschiebung des Substratspektrums führen können. Der Einfluss wird dabei vermutlich durch eine Kombination von physikalisch, thermodynamischen und kinetischen Faktoren bestimmt, die in einem vereinfachten Kinetik Model zusammengefasst werden können. Letztlich scheint die nicht-stimulierbare, hohe ATPase Aktivität der PDR ABC-Transporter in Kombination mit der konservierten Degeneration in den NBDs die Funktionalität und Selektivität dieser besonderen Familie von MDR-Transportern zu definieren, was sich auch in dem differentiellen Hydrolysemechanismus widerspiegelt.

Summary

The major player of the Pleiotropic Drug Resistance (PDR) in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the ATP-binding cassette (ABC)-transporter Pdr5. ABC-transporters such as Pdr5 are ubiquitous membrane transport proteins utilizing the energy derived by ATP hydrolysis to translocate a multiplicity of structural and functional diverse substances across biological membranes. In the first part of this thesis, the high expression levels of Pdr5 in the genetically modified *PDR1-3* transcription background were exploited to establish a versatile cloning cassette for expression and purification of any membrane protein by affinity chromatography. Different yeast transport systems were genetically modified and purified by a simple standard protocol establishing this strategy as a convenient *High Throughput* method. The detailed analysis of the PDR ABC-transporter Pdr5 as a model system is described in the second part of the thesis. The crucial role of ABC-transporters in clinical relevant diseases is clearly defined, however, knowledge about the exact mechanistic features in energy allocation and its tight coupling to substrate recognition and translocation is still limited. To address these questions, the exporter Pdr5 was investigated intensively by directed mutagenesis in combination with functional assays *in vivo* and in highly enriched plasma membrane preparations by ATPase and Rhodamine 6G transport measurements. Contrary to the general acceptance of a catalytic dyad consisting of a conserved histidine and glutamate as the functional unit in ATP-hydrolysis, the existence of such a functional linchpin in Pdr5 can be excluded. In contrast to the histidine, which had no impact on the basal ATPase activity, the derived data clearly assigned the necessity of the conserved glutamate adjacent to the Walker B motif for functional activity. The H-*loop* mutation (H1068A) rather affected selectively the transport of Rhodamine 6G, thus supporting an uncoupling of the Pdr5 specific ATP-hydrolysis from the transport of certain substances. Additionally, the functional analysis of the PDR specific degeneration of the consensus sequences revealed a functional asymmetry of the NBDs with a catalytic C-terminal and a regulatory N-terminal ATP-binding pocket. The reconstruction of the degeneration for a symmetric NBD motor domain abrogated Pdr5 specific ATPase and transport activity completely, whereas single reconstructed motives had no effect. Further insights into the mechanisms of the substrate selection processes in pleiotropic ABC-transporters were achieved by a systematic

analysis of the protein specific interactions with substrates, modulators and energy resources. By this approach, for the first time the definite role of the modulator FK506 as a substrate of Pdr5 was affirmed. Moreover, the specific sensory function of a conserved serine located in the putative substrate binding pocket could be delineated in the concrete mode of communication between the functional domains of Pdr5. Furthermore, structure-function relations clearly assigned an important role of the NBDs in substrate selectivity as well. Mutations within the conserved sequences such as the *H-loop* mutant as well as the application of different nucleotides led to a dramatic shift in substrate selectivity. Summarized in a simplistic kinetic substrate selection model, the selectivity is regulated by thermodynamic and kinetic parameters in the protein specific interactions. Finally, the characteristic, non-stimulateable steady state ATPase activity combined with the highly conserved degeneration of the NBDs in the PDR ABC-transporters seem to define the functionality and selection process in this special kind of MDR transport systems, which can be mirrored in the differential mechanism of ATP hydrolysis.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
A. EINLEITUNG	1
1. Membranproteine	1
2. Membrantransport	2
3. <u>A</u> TP- <u>B</u> inding <u>C</u> assette (ABC)-Transporter und ihre Bedeutung	4
4. Klassifizierung und Aufbau von ABC-Transportern	6
5. Die NBDs - Motordomänen der ABC-Transporter	8
6. Der Mechanismus der ABC-Transporter	11
7. Substrate und Modulatoren in der Multidrogenresistenz	19
8. Die Pleiotrope Drogenresistenz (PDR) der Hefe	20
9. Der PDR ABC-Transporter Pdr5 aus <i>S. cerevisiae</i>	23
10. Motivation und Zielsetzung	28
B. MATERIAL UND METHODEN	29
1. MATERIAL	29
1.1. Chemikalien	29
1.2. Enzyme und Proteine	33
1.3. Plasmide	33
1.4. <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> Stämme	34
1.5. Oligonukleotide	35
1.6. Allgemeine Medien und Puffer	38
1.7. Geräte	42
2. METHODEN	43
2.1. Molekularbiologische Methoden	43
2.1.1. Kultivierung und Herstellung von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> Stammkulturen	43
2.1.2. Transformation von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	44
2.1.3. DNA-Präparationen (Isolation, Restriktion, Ligation und Amplifikation)	45
2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR-Methode)	47
2.2. Klonierungsstrategien für die homologe Überexpression von Pdr5 und zur Reinigung verschiedener Proteine über Affinitätstags	48
2.3. Gelelektrophorese und Proteindetektion	49
2.3.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	49
2.3.2. SDS- Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.3.3. Western Blot Analyse (Immunodetektion)	51

2.4. Proteinüberexpression und Reinigung	52
2.4.1. Ganzzellysate	52
2.4.2. Präparation von Gesamtmembranen zur Reinigung	53
2.4.3. Präparation von Plasmamembranen zur Reinigung	53
2.4.4. Präparation von ER-Mikrosomen zur Reinigung	54
2.4.5. Anreicherung von Golgi-Membranen zur Reinigung	54
2.4.6. Präparation angereicherter Plasmamembranen	55
2.4.7. Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie	56
2.5. Elektronenmikroskopie	57
2.6. Mikrobiologische und biophysikalische Methoden zur Aktivitätsbestimmung	57
2.6.1. Resistenztest auf Agarplatten und in Flüssigkulturen	57
2.6.2. Fluoreszenzbasierte Transportmessungen mit ganzen Hefezellen	58
2.6.3. Radioaktive Transportmessungen mit ganzen Hefezellen	59
2.6.4. Rhodamin 6G Transport in angereicherten Plasmamembranen	60
2.6.5. ATPase Aktivitätsmessungen	61
2.6.6. Bindungsstudien mit radioaktiv markierten 8-Azido-ATP	63
C. ERGEBNISSE	65
1. DAS ÜBEREXPRESSIONSSYSTEM VON PDR5 - EXPRESSION UND REINIGUNG VON HEFEPROTEINEN	65
1.1. Das Klonierungssystem der N14HIS-Kassette	65
1.2. Expression und Reinigungseffizienz der N14HIS-Kassette für verschiedene Hefeproteine	68
1.2.1. Das Fusionsprotein N14HIS-Pdr5	68
1.2.2. Die Fusionsproteine N14HIS-Yor1 und N14HIS-Rsb1	69
1.2.3. Die Fusionsproteine N14HIS-Mdl1 und N14HIS-Drs2	71
2. FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES PDR ABC-TRANSPORTERS PDR5 IN S. CEREVISIAE	75
2.1. Mutagenesestudien des ABC-Transporters Pdr5	76
2.2. Analyse der katalytisch relevanten Aminosäuren in Pdr5	79
2.2.1. Funktionsanalyse in lebenden Hefezellen	79
2.2.1.1. Drogenresistenztests	80
2.2.1.2. Rhodamin 6G Transport aus ganzen Hefezellen	84
2.2.2. Charakterisierung der PDR5 Varianten in angereicherten Plasmamembran Präparationen	87
2.2.2.1. ATPase- und Transportaktivität	89
2.3. Funktionelle Analyse der Degeneration in Pdr5	94
2.3.4. Multidrogenresistenz	97
2.3.5. Aktivitätsbestimmung der Konsensusmutanten von Pdr5	100
2.3.1.1. Rhodamin 6G Transport Aktivität der Pdr5 Konsensusmutanten	101
2.3.1.2. Analyse der ATPase Aktivität	105

2.4. Biochemische und biophysikalische Untersuchung der Verknüpfung zwischen NBDs und TMDs	109
2.4.1. Interaktionsstudien mit dem Immunsuppressor FK506	109
2.4.1.1 Multidrogenresistenz der S1360F Mutante	109
2.4.1.2 Charakterisierung des Rhodamin 6G-Transports von Pdr5	113
2.4.1.3 Funktionsanalyse des Immunsuppressivums FK506	118
2.4.1.4 ATPase Aktivität von Pdr5 und der S1360F Mutante im Vergleich	121
2.4.1.5 Analyse des FK506 Transport	125
2.4.2. Alternative Energiequellen für Hydrolyse und Transport	127
D. DISKUSSION	131
1. Eignung der Klonierungs-und Reinigungsstrategie über die N14HIS-Klonierungskassette in <i>S. cerevisiae</i>	131
2. Funktionelle Charakterisierung des MDR ABC-Transporters Pdr5 in <i>S. cerevisiae</i>	136
2.1. Die Konstitution der Pdr5 NBDs	136
2.1.1. Katalysemechanismus der ATP-Hydrolyse	136
2.1.2. Die Bedeutung der Degeneration und die funktionelle Asymmetrie in den NBDs	140
2.1.3. Gibt es eine Verknüpfung zwischen der Konstitution der NBDs und dem Substratspektrum?	142
2.2. Proteinspezifische Interaktionen mit Substraten, Modulatoren und Energieressourcen	145
2.2.1. Die Bedeutung der S1360F Mutante	145
2.2.2. Energieressourcen als Substratsensor?	149
2.3. Substratselektion über ein vereinfachtes Kinetik-Model	150
Ausblick	156
LITERATURVERZEICHNIS	158
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	165
PLASMIDKARTEN	167
DANKSAGUNG	168
LEBENS LAUF	169

A. Einleitung

1. Membranproteine

Membranproteine sind für viele zellbiologische und physiologische Funktionen von fundamentaler Bedeutung. Nach einer genomweiten Studie in Bakterien, Archaeen und eukaryotischen Organismen kodieren ungefähr ein Drittel aller Gene integrale Membranproteine (1). Dabei garantieren diese als Struktur-, Transport- und Signaltransduktionsproteine in den unterschiedlichsten biologischen Membranen die Funktion und damit das Überleben von der Zelle bis zum komplexen Organismus. Pharmakologisch betrachtet, stellen sie somit interessante *Targets* bei der Entwicklung geeigneter Medikamente zur Behandlung vieler ernsthafter Erkrankungen wie z.B. Parkinson, Alzheimer oder Krebs dar, die direkt oder indirekt mit der Funktion bzw. Fehlfunktion dieser Proteine verbunden sind (2, 3).

Abgesehen von ihrer therapeutischen Relevanz ist eine molekulare Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen dieser Proteine von zentralem Interesse. Die Schwierigkeit bei der biochemischen und strukturellen Analyse von Membranproteinen, im Gegensatz zu löslichen Proteinen, liegt jedoch in der geringen natürlichen Verfügbarkeit der Proteine, die durch geeignete Expressionssysteme und Modellorganismen ansatzweise kompensiert werden kann. Die große Herausforderung stellt dabei die Gewährleistung der funktionalen Aktivität der Membranproteine in möglichst hoher Reinheit dar. Die Aktivität wird dabei einerseits durch post-translationale Modifikationen in dem entsprechenden Modellorganismus bestimmt, kann aber andererseits auch durch die Wahl der Proteinaufreinigung, verbunden mit den entsprechenden Detergenzien zur Solubilisation der hydrophoben membranintegralen Bestandteile beeinflusst werden (4). Die gängigen Expressionssysteme zur homologen oder heterologen Expression sind Bakterien (*Escherichia coli* (*E. coli*), *Lactococcus Lactis* (*L. Lactis*)), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)), Viren, Insektenzellen oder Säugetierzelllinien. Jedes System hat dabei seine eigenen Vor- und Nachteile, was z.B. die Kultivierung, die Verträglichkeit der Proteine für den Organismus oder die systemspezifischen *Targeting*-, Faltungs- und Insertionsmechanismen betrifft. Aber auch die Möglichkeit zur genetischen Modifikation der Membranproteine durch Mutagenese oder durch eine Fusion der Proteine mit verschiedenen funktionellen

Gruppen wie Affinitätstags oder fluoreszierenden Proteinen für biophysikalische Analysen zählen dazu. In den letzten Jahren konnten mit Hilfe geeigneter Überexpressions- und Reinigungssysteme bis zu 251 Strukturen unterschiedlichster Membranproteine aufgelöst werden, was jedoch in Relation zu den löslichen Proteinen weniger als 0,4% der hinterlegten Strukturen in der PDB-Datenbank ausmacht (siehe http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html, die beschriebenen Angaben beziehen sich auf den Stand vom 30. Juli 2010).

2. Membrantransport

Besonderes Augenmerk gilt den Membrantransportproteinen, die erst die charakteristische Funktion der biologischen Membranen als hochselektive Permeabilitationsschranken ermöglichen (5). Die Lipiddoppelschicht der Membranen, bestehend aus unterschiedlichen Anteilen glyzerin- und sphingosinhaltiger Phospholipide und Glykolipide, lässt aufgrund ihres hydrophoben Kerns von 30-40Å nur wenige hydrophile Moleküle passieren, während sie für Ionen und geladene Moleküle undurchlässig ist (6). In Prokaryoten trennt die Plasmamembran das Zytosol vom extrazellulären Raum, während in eukaryotischen Zellen durch die Kompartimentierung weitere Reaktionsräume wie die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder der Golgi-Apparat geschaffen wurden. Dabei zeichnet sich jede der Membranen durch eine spezifische Zusammensetzung hochorganisierter Lipid- und Proteinkomplexe aus, die die strukturelle und funktionelle Asymmetrie der Membranen in den individuellen Kompartimenten definiert. Die unterschiedlichen Transportsysteme regulieren dabei das Zellvolumen und garantieren vor allem die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten, die für viele zellbiologische Prozesse wie z.B. die ATP-Synthese oder die aktive Aufnahme extrazellulärer Substanzen wie Glukose essentiell ist. Gleichzeitig vermitteln sie den selektiven Austausch von Nährstoffen, Ionen, genetischen Informationen bzw. den Export von Giftstoffen oder Abbauprodukten sowie Antibiotika (Abbildung A 1).

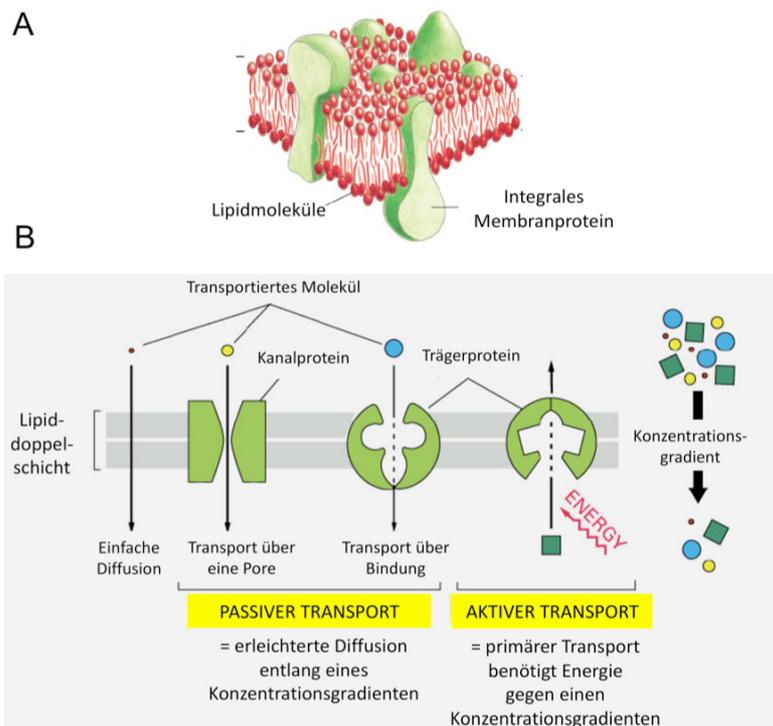


Abbildung A 1: Biologische Membranen und ihre Transportmechanismen

A) Skizze der Doppellipidschicht einschließlich unterschiedlicher integraler Membranproteine. **B)** Die verschiedenen Transportmöglichkeiten über die biologischen Membranen anhand des aktiven und passiven Transports sind schematisch dargestellt. Die Abbildungen sind entnommen und angepasst aus (7).

Die Transportsysteme können in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Der passive Transport kleiner geladener Moleküle und Ionen erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten über Kanäle und Porine. Die mit Wasser gefüllten Kanäle regulieren die Diffusion durch ihren Öffnungszustand und können sehr hohe Diffusionsgeschwindigkeiten ermöglichen. Dabei kann der Öffnungszustand durch die Bindung von Liganden, wie z.B. beim Acetylcholinrezeptor (8), oder über ein elektrisches Membranpotenzial und somit spannungskontrolliert reguliert werden. Dazu zählen vor allem die neuronalen Natrium- (9) und Kaliumkanäle in den Neuronen und Muskelzellen der Herz- und Skelettmuskulatur (10). Die erleichterte Diffusion wird durch so genannte sekundäre Transporter, die auch zur Klasse der Trägerproteine gehören, vermittelt. Aufgrund intensiver Interaktionen mit dem Substrat erfahren diese Transporter Konformationsänderungen, die den Transfer über die Membran in drei verschiedenen Modifikationen ermöglichen. Sie können als Uniporter wirken, indem sie ein Substrat entlang eines Gradienten transportieren. Für

den Transport eines Moleküls gegen ein Konzentrationsgefälle wird dieser Prozess mit dem Transport eines weiteren Moleküls, zumeist von Protonen oder Natriumionen, entlang dessen elektrochemischen Gradienten gekoppelt. Symporter, wie z.B. der Natrium-Kalzium Austausch, transportieren beide Substrate in die gleiche Richtung, während Antiporter die Translokation in entgegengesetzte Richtungen vermitteln (11). Die *Major facilitator Superfamily* (MFS) repräsentiert dabei die größte Familie der Sekundärtransporter, die Vertreter aller drei Transportmechanismen umfasst (12). Die aktiven primären Transportsysteme, auch Membranpumpen genannt, gehören ebenfalls zu den Trägerproteinen. Sie nutzen die Lichtenergie, wie z.B. das Bacteriorhodopsin (13), oder die chemische Energie aus energiereichen Molekülen wie ATP, um den Transport gegen einen Konzentrationsgradienten zu ermöglichen. Dabei übernehmen einige Vertreter auch die zentrale Aufgabe, Gradienten zu erzeugen, die von den Sekundärtransportern genutzt werden können, wie beispielsweise die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe (14). Zu den klassischen Vertretern der primären Transportsysteme gehört die Proteinklasse der ATP-binding cassette (ABC)-Transporter (15), aber auch die verschiedensten P-Typ ATPasen. Dazu zählen auch Lipidtransporter, wie beispielsweise der Phospholipidtransporter Drs2 aus *S. cerevisiae* (16), die für die Aufrechterhaltung der Lipidasymmetrie in den Membranen verantwortlich sind. Die Proteinfamilie der P-Typ ATPasen treibt dabei den Transport durch Konformationsänderungen voran, die mit der ATP-abhängigen Phosphorylierung und Dephosphorylierung der entsprechenden Aspartatreste in den Proteinen verbunden ist (17).

3. ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter und ihre Bedeutung

ABC-Transporter gehören zur Superfamilie der ABC-Proteine und repräsentieren neben den Vertretern der MF-Superfamilie die größte Proteinfamilie unter den Membrantransportproteinen. Noch vor Rezeptoren und Regulatoren stellen die ABC-Transporter die Hauptvertreter dieser Superfamilie dar und finden sich in allen Bereichen des Lebens, von Bakterien, in denen sie fast 5% des gesamten Genoms ausmachen (18), über Archaeen bis hin zu den Eukaryoten (19). Sie sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, in denen sie die chemische Energie aus der Bindung und Hydrolyse von ATP zum

aktiven Transport der unterschiedlichsten Substanzen über biologische Membranen nutzen (20). Dazu gehören neben Ionen und kleinen Molekülen wie Aminosäuren oder Zuckern auch Vitamine, Lipide, organische oder anorganische Abbauprodukte, Antibiotika und auch makromolekulare Peptide und ganze Proteine (21-25). Im Menschen sind ABC-Transporter z.B. an der adaptiven Immunabwehr beteiligt (26), aber auch an der Sekretion von Insulin (27) oder dem Transport von Gallensalzen aus der Leber (28). Fehlfunktionen von ABC-Transportern aufgrund von Mutationen bilden daher auch oft die Grundlage von Erbkrankheiten. Bis heute konnten 18 bekannte Krankheiten mit genetischen Defekten in ABC-Transportern in Verbindung gesetzt werden (29). Dazu gehört z.B. die Mukoviszidose ((Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)) oder die Intrahepatische Cholestase PFIC2 ((Bile Salt Export Pump) BSEP).

Abgesehen von der großen Substratvielfalt variiert die Substratspezifität der verschiedenen ABC-Transporter je nach Funktion enorm. Während einige Transporter sehr selektiv ausschließlich eine Substanz transportieren, zeichnen sich z.B. die ABC-Transporter in Krebszellen durch eine sehr breite Substratspezifität für chemisch und strukturell unterschiedliche Substanzen aus (30, 31).

Die Überexpression dieser ABC-Transporter führt zur Entwicklung eines ernsthaften pathophysiologischen Phänomens, das als Multidrogenresistenz (MDR) bezeichnet wird. Insbesondere in der Krebstherapie stellt die MDR ein großes Problem dar, da diese Transporter den Export der gängigen Chemotherapeutika vermitteln und somit die intrazelluläre Konzentration dieser Toxine unter die Wirkungsgrenze senken. Die Transporter verleihen den entarteten Zellen eine Kreuzresistenz gegenüber strukturell verschiedenen, aber auch in ihrem Wirkmechanismus nicht verwandten Substanzen (32, 33). Die bekanntesten Vertreter sind z.B. das humane P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2) oder das Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), die im gesunden Organismus normalerweise eine Schutzfunktion z.B. in der Leber, der Niere oder dem Darm übernehmen (34). Auch in Bakterien und Pilzen wird dieses Phänomen maßgeblich durch die Substratvielfalt von ABC-Transportern geprägt, so dass die Multidrogenresistenz dieser Organismen gerade bei immunsupprimierten Menschen, wie z.B. AIDS-, Krebs- oder Transplantationspatienten für die ansteigende Mortalitätsrate verantwortlich ist (35, 36).

Eine molekulare Aufklärung der mechanistischen Abläufe des Energietransfers und der Substratselektion und –translokation in den ABC-Transportern steht vor diesem Hintergrund im Zentrum der aktuellen Forschung.

4. Klassifizierung und Aufbau von ABC-Transportern

Grundsätzlich lassen sich die verschiedenen ABC-Transporter aufgrund der Transportrichtung ihrer Substrate in Importer und Exporter unterteilen. In eukaryotischen Systemen kommen ausschließlich Exporter vor, die den Transport der Substrate in das extrazelluläre Medium vermitteln. Importer wurden bislang nur in Archaeen und Bakterien identifiziert. Klassische Vertreter dieser Gruppe, die für die Aufnahme von Nährstoffen verantwortlich sind, stellen z.B. der Maltosetransporter MalFGK₂E (37) oder die Histidin Permease HisQMP₂J (24) dar, die gleichzeitig auch zu den ersten charakterisierten ABC-Transportern zählen.

Die minimale Grundstruktur eines funktionellen ABC-Transporters lässt sich unabhängig von der Transportrichtung oder dem Substratspektrum aus zwei nukleotidbindenden Domänen (NBDs) und zwei transmembranständigen Domänen (TMDs) beschreiben (38). Dabei bilden die beiden hydrophilen NBDs die charakteristische ATP-binding cassette (ABC)-Einheit aus und dienen der Energiegewinnung durch die Bindung und Hydrolyse von ATP. Die NBDs sind im Zytosol lokalisiert und somit direkt für die ATP-Moleküle der Zelle zugänglich. Die Substratbindestelle als auch der Translokationsweg der Substanzen über die jeweilige Membran werden durch die beiden α -helikalen TMDs gebildet. Die zugrunde liegende Architektur besteht demzufolge aus vier Untereinheiten, die entweder als einzelne Polypeptide kodiert sind oder fusioniert vorliegen ((20), Abbildung A 2). In Eukaryoten sind die vier Domänen meist fusioniert, so dass die ABC-Transporter als so genannte *full-size* Transporter wie z.B. dem MDR ABC-Transporter P-gp (Abbildung A 2 G) vorkommen. Bei einigen ABC-Transportern ist jedoch nur eine NBD mit einer TMD fusioniert, die somit als *half-size* Transporter bezeichnet werden. Entsprechende Beispiele für *half-size* Transporter sind das TAP-System (Abbildung A 2 E) oder das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2), welches zur ABCG-Familie der ABC-Transporter gehört (39). *Half-size* Transporter können entweder als Homo- oder Heterodimere assembliert sein. Die

Reihenfolge der einzelnen Domänenorganisation kann dabei variieren. Die klassische Topologie der *full-size* Exporter vom N-Terminus zum C-Terminus entspricht TMD-NBD-TMD-NBD. Allerdings gibt es auch Ausnahmen, so zeichnen sich gerade in Pilzen viele ABC-Transporter, die in der Multidrogenresistenz involviert sind, durch eine inverse Topologie (NBD-TMD-NBD-TMD) aus, wie z.B. der ABC-Transporter Pdr5 aus *S. cerevisiae* (Abbildung A 2 F). Bei Importern, die ausschließlich in Prokaryoten und Archaeen vorkommen, sind die Untereinheiten oft einzeln kodiert. Sie verfügen neben den vier Untereinheiten auch über ein zusätzliches Substratbindeprotein auf der extrazellulären Seite, das es ihnen ermöglicht, Nährstoffe aus dem Medium an die TMDs weiterzuleiten.

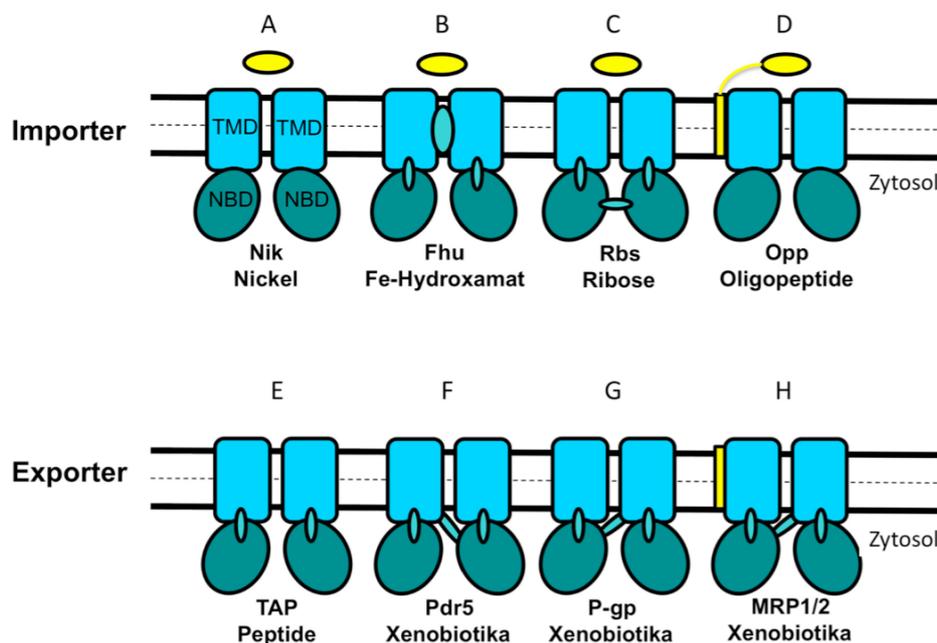


Abbildung A 2: Domänenorganisation ausgewählter ABC-Transporter

Die Anordnung der vier Untereinheiten entsprechend ihrer genetischen Kodierung sind für einige Importer (**A-D**) und Exporter (**E-H**) gezeigt. Zusätzliche Domänen sind in gelb farblich hervorgehoben. Die Bezeichnungen der jeweiligen Transporter einschließlich der transportierten Substanzgruppen sind in der Abbildung angeführt.

Neben den klassischen vier Untereinheiten verfügen manche ABC-Transporter auch über zusätzlich fusionierte Domänen an den TMDs, die meist regulatorische Funktionen übernehmen (40). Aufgrund von topologischen Analysen auf der Basis von Hydrophobizitätsplots setzt sich die kanonische TMD eines Exporters aus sechs Transmembranhelices (TMHs) zusammen. Diese Anzahl kann aber auch aufgrund der geringen Sequenzhomologie in den TMDs variieren. Bei den Importern variiert die Anzahl der TMHs sogar zwischen 5-10 pro TMD. Diese

Diversität reflektiert wahrscheinlich die große Substratvielfalt der verschiedenen ABC-Transporter.

5. Die NBDs - Motordomänen der ABC-Transporter

Entsprechend dem Namen zeichnen sich die NBDs der verschiedenen ABC-Transporter durch hochkonservierte Sequenzmotive aus, die die charakteristische ABC-Einheit zur Bereitstellung der essentiellen Energie für den vektoriellen Transport definieren (38). Diese Homologie in der Primärsequenz der NBDs in den unterschiedlichen ABC-Transportern lässt daher auch einen generellen Mechanismus der ATP-Hydrolyse zur Kopplung der Energie für den Substrattransport vermuten. Die kennzeichnenden Motive sind dabei das für viele ATPasen typische Walker A (G-X-X-(G)-X-G-K-S-T) und Walker B ($\Phi\Phi\Phi\Phi$ D, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann und Φ für eine hydrophobe Aminosäure steht) Motiv (41), aber vor allem das Signaturmotiv der ABC-Proteine, der *C-loop* mit der Konsensussequenz LSGGQ. Durch die Existenz dieses Motivs, das zwischen dem Walker A und Walker B Motiv lokalisiert ist, wird eine Zuordnung der Transporter in die Familie der ABC-Proteine erst möglich. Zusätzlich existieren neben diesen drei Motiven auch weitere konservierte Regionen in den NBDs, die einzigartig für die Familie der ABC-Transporter sind, der *Q-loop*, der *D-loop* sowie der *H-loop* (42).

In den letzten 12 Jahren wurden mehrere hochaufgelöste Strukturen von isolierten NBDs in An- und Abwesenheit von Nukleotiden veröffentlicht, die in Kombination mit intensiven biochemischen Analysen wesentlich zum molekularen Verständnis der mechanistischen Abläufe beitragen konnten (43-46). Beispielsweise wurden für die NBDs des Maltosetransporters MalK aus *E. coli* (47-50) oder des ABC-Transporters CFTR (51, 52) mehrere Strukturen publiziert, die in An- und Abwesenheit von ATP oder ADP kristallisiert wurden. Zusätzlich zu den monomeren Strukturen der unterschiedlichen Transporter konnten für die bakteriellen ABC-Transporter MJ0796 aus *Methanococcus Jannaschii*, MalK und HlyB aus *E. coli* aber auch hochaufgelöste Strukturen der NBDs in einer dimeren ATP-bindenden Konformation erhalten werden (48, 53, 54). So konnten aufgrund dieser Daten und insbesondere durch die biochemischen und strukturellen Analysen der HlyB-NBDs für einzelne Aminosäuren in den charakteristischen Motiven bestimmte Funktionen in

der Bindung und Hydrolyse von ATP postuliert werden; welche Bedeutung sie aber für den gesamten Substraterkennungs- und Translokationsmechanismus haben, ist noch nicht geklärt.

Die publizierten Strukturen beschrieben dabei übereinstimmend eine L-förmige Anordnung der konservierten Motive in den monomeren NBDs (43, 45, 47), wobei sich die katalytisch aktiven Motive für die Energiegewinnung erst in einer ATP-induzierten dimeren Konformation ergänzen (48, 53-56). In Abbildung A 3 ist der NBD Dimer der isolierten NBDs des bakteriellen Exporters HlyB aus *E. coli* gezeigt. Die beiden NBDs sind dabei in einer *head to tail* Orientierung angeordnet (54). Die beiden Arme eines jeden Monomers werden einerseits durch das Walker A und das Walker B Motiv, sowie den D- und H-loop definiert (Arm I), während der zweite Arm (Arm II) das charakteristische Signaturmotiv und eine weniger konservierte Region, die vermutlich die Schnittstelle zwischen den NBDs und den TMDs darstellt (44), enthält. Die Gelenkregion zwischen den beiden Armen eines Monomers werden durch den Prolin-loop (Sequenz in HlyB NPK) und den Q-loop (Sequenz in HlyB LQDNVLLN) vermittelt. Die Bezeichnung der *loops* wurde dabei durch die hochkonservierten Aminosäuren, dem Prolin und dem Glutamin, abgeleitet.

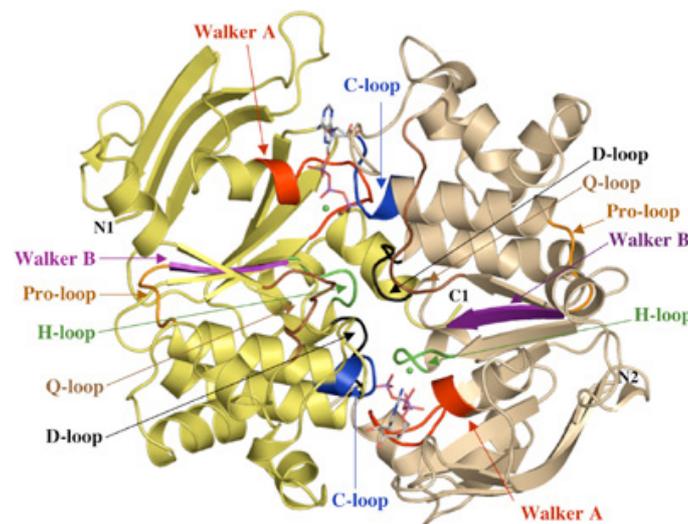


Abbildung A 3: Kristallstruktur der dimeren HlyB (H662A) NBDs mit gebundenen ATP-Molekülen

Die beiden Monomere des ATP induzierten NBD-Dimers von HlyB sind in gelb und beige dargestellt. Die hochkonservierten Motive sind entsprechend ihrer Farbkodierung in der Struktur in der Abbildung angegeben. Die gebundenen ATP Moleküle an der Schnittstelle zwischen den beiden NBDs sind in Kombination mit den Mg^{2+} Ionen (grüne Kugeln) als Stabmodelle skizziert. Die Abbildung wurde entnommen aus Zaitseva et. al 2005 (54).

In der dimeren geschlossenen Konformation wirken die ATP-Moleküle als 'molekularer Klebstoff' zwischen den beiden Domänen und werden primär durch das Walker A Motiv der einen NBD und das Signaturmotiv der anderen NBD stabilisiert. Das Aspartat des Walker B Motivs dient zur Koordination des Magnesiumions, während das γ -Phosphat in einem Komplex aus dem H-loop und einem konservierten Glutamat, welches direkt dem Walker B Motiv folgt, komplexiert wird. Letzteres koordiniert gleichzeitig ein Wassermolekül, weswegen lange Zeit vermutet wurde, dass die Hydrolyse des γ -Phosphats über die Carboxylatgruppe des Glutamats als katalytisch wirksames Nukleophil abläuft ((57), Abbildung A 4. A). Hingegen deuten die strukturellen und thermodynamischen Analysen der NBDs des bakteriellen ABC-Transporters HlyB (54, 56) sowie die biochemischen Analysen des humanen ABC-Transporters TAP (58) darauf hin, dass die Hydrolyse durch eine Substrat-assistierte Katalyse stattfindet (Abbildung A 4 B). Dabei polarisiert das ATP-Molekül selbst das Wassermolekül, während das Histidin des H-loops gemeinsam mit dem Glutamat eine stabilisierende Wirkung als katalytische Dyade ausübt (Abbildung A 4 C).

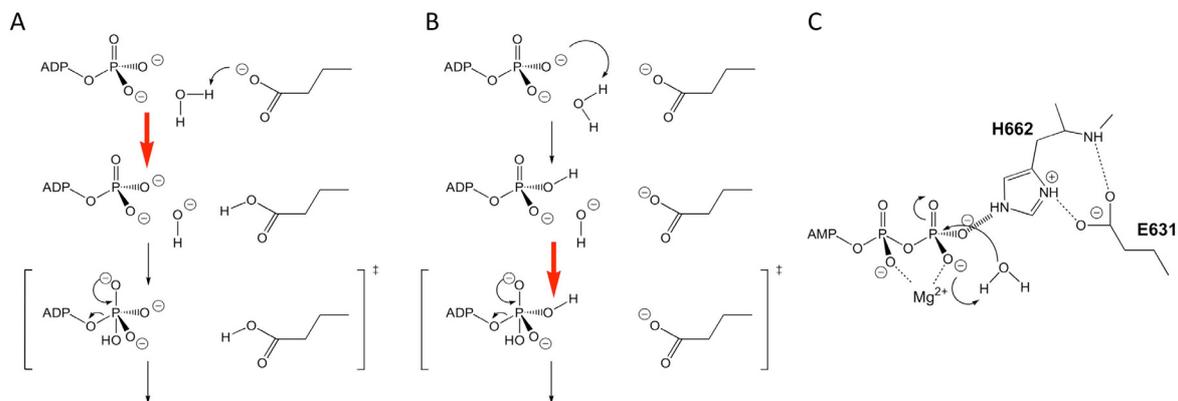


Abbildung A 4: Katalytische Übergangszustände der beiden Modelle zur ATP-Hydrolyse

Links im Bild ist der schematische Ablauf der Hydrolyse nach dem Mechanismus der allgemeinen Basenkatalyse (**A**) und der Substrat-assistierte Katalyse (**B**) dargestellt. Der rote Pfeil markiert den ratenlimitierten Schritt. Rechts im Bild (**C**) ist auf molekularer Ebene die thermodynamische und strukturelle Analyse der isolierten HlyB-NBD zusammengefasst. Die einzelnen Schritte der Hydrolyse über die Elektronenumlagerung und Protonenabstraktion einschließlich des nukleophilen Angriffs durch das Wassermolekül sind in der Abbildung skizziert. Die Abbildungen A und B sind aus Zaitseva et. al. 2005a (54) und Abbildung C Zaitseva et. al. 2005b (56) entnommen.

Welches der beiden Modelle nun die Grundlage für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse bildet, ist noch offen. Im Hinblick auf eine Aufklärung des gesamten Transportmechanismus stellt aber gerade die Beobachtung der ATP-induzierten Konformationsänderung in den NBDs eine wichtige Erkenntnis dar. Der Vergleich verschiedener Strukturen im nukleotidfreien oder ADP- bzw. ATP-gebundenen Zustand zeigte, dass die Bindung von ATP zu einer Rotationsbewegung der helikalen Domäne, d.h. dem Arm I über die Scharnierregionen dem Q- und Pro-loop zum Arm II führt, während im nukleotidfreien bzw. in Anwesenheit von ADP eine solche Konformationsänderung nicht beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen wurden auch durch intensive biochemische Analysen bestätigt (59, 60). Dabei deuten die Ergebnisse darauf, dass zunächst die Bindung von ATP über die Dimerisierung an die TMDs gekoppelt ist und der Zerfall des NBD-Dimers nach der Hydrolyse durch den Verlust des γ -Phosphats erfolgt (56).

6. Der Mechanismus der ABC-Transporter

Im Hinblick auf einen übergreifenden Mechanismus zwischen Energiesynthese und Substrattransport besteht eine enge Verknüpfung zwischen den Konformationsänderungen in den NBDs und dem Substrattransport, der über die TMDs vermittelt wird. In diesem Zusammenhang konnte anhand der wenigen Strukturen von vollständigen ABC-Transportern in Anwesenheit verschiedener Nukleotide gezeigt werden, dass die TMDs der Importer und Exporter mindestens zwei grundsätzlich verschiedene Konformationen einnehmen können (23, 61-66). Für einige Transporter wie z.B. für den putativen Molybdäatransporter ModB₂C₂ aus *Archaeoglobus fulgidus* wurde eine Konformation beschrieben, in der die Substratbindestelle im Kern des TMD-Dimers nur von der zytoplasmatischen Seite zugänglich ist (62). Die Struktur des bakteriellen MDR ABC-Transporter Sav 1866 aus *Staphylococcus aureus* hingegen beschreibt eine zur extrazellulären Seite geöffnete Konformation (63). In Analogie zum *Alternating Access Model*, das bereits in den 60er Jahren von Jardetzky (67) für Membranpumpen postuliert wurde, kann somit der prinzipielle Transportvorgang der Substrate über die Membran beschrieben werden. Die Importer und Exporter besitzen dabei entsprechend ihrer Transportrichtung entgegengesetzte Substrataffinitäten in den jeweiligen Konformationen und können somit einen Gradienten über die Membran aufbauen

(58, 59). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung A 5 die beiden Konformationen dargestellt. Es handelt sich dabei um die Struktur des Multidrogentransporters P-gp aus *Mus musculus* (64) und die des Exporters Sav1866 aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* (63).

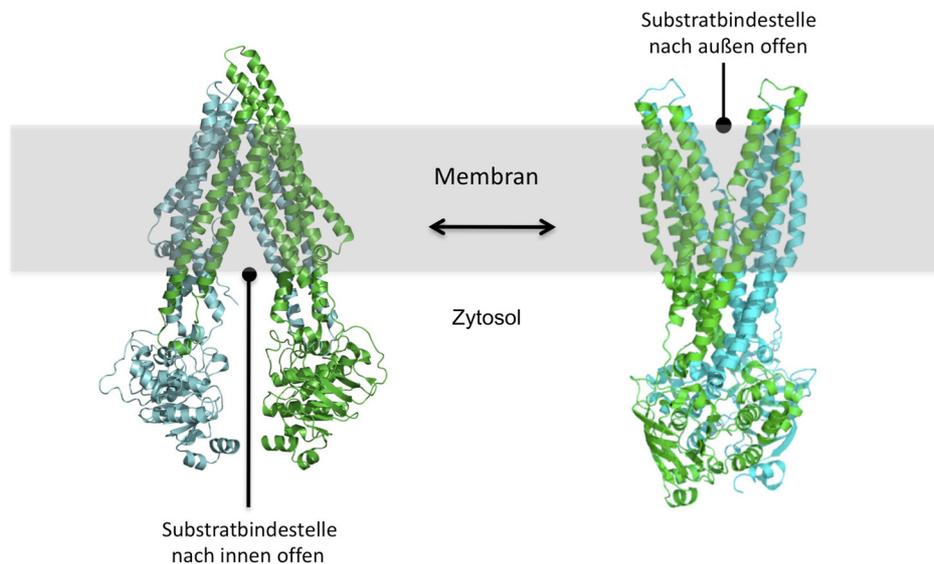


Abbildung A 5: Alternating Access Model der ABC-Transporter

Die Kristallstruktur des MDR ABC-Transporters P-gp auf der linken Seite repräsentiert die Zugänglichkeit der Substratbindestelle vom Zytosol aus, während die rechte Kristallstruktur des MDR ABC-Transporters Sav1866 aus *Staphylococcus aureus* die Konformation der TMDs beschreibt, die nur von der extrazellulären Seite zugänglich ist. Die Abbildung ist adaptiert nach Ernst R., Kueppers P. et al. 2009 (68)

Verschiedene Modelle wurden basierend auf den biochemischen und strukturellen Analysen der unterschiedlichen ABC-Transporter etabliert, um den Transportvorgang und dessen Energetisierung durch die ATP-Hydrolyse in den NBDs zu beschreiben (59, 67, 69-74). Einige zentrale Aspekte in der Aufklärung der mechanistischen Abläufe sind jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Wie ist diese alternierende Zugänglichkeit der Substratbindestelle in den TMDs mit den verschiedenen funktionalen Zuständen der ATP-Hydrolyse in den NBDs gekoppelt? Wie kommunizieren die beiden katalytischen Domänen miteinander? Dabei ist auch immer noch unklar, wie viele ATP-Moleküle pro Transportzyklus benötigt bzw. pro Substratmolekül hydrolysiert werden.

Die Biochemie des katalytischen Hydrolysezyklus wurde erstmals durch die Etablierung des *Alternating catalytic side* Modells beschrieben. Die Pionierarbeit auf diesem Gebiet wurde vor allem durch Bindungsstudien des ATPase Zyklus im Multidrogentransporter P-gp geleistet (70, 75). Dabei wurde postuliert, dass die beiden katalytischen ATP-Bindungstaschen der NBDs alternierend ATP binden und hydrolysieren können. Unter diesen Bedingungen wurde vermutet, dass nur ein ATP-Molekül pro transportiertem Substrat hydrolysiert wird. Ähnliche Modelle wurden auch aufgrund der biochemischen Analysen von Heterodimeren bzw. durch Simulationen der bakteriellen Histidin und Maltose Importsysteme beschrieben, die eine alternierende Funktion der katalytischen ATP-Bindungstaschen unterstützen (71, 72). Die Möglichkeit abwechselnd Nukleotide zu binden und zu hydrolysieren, bedeutet jedoch nicht zwingend, dass die beiden katalytischen Zentren in den NBDs unabhängig voneinander an den einzelnen Schritten im Transportprozess beteiligt sind. Biochemische Analysen des Maltose Transportsystems MalFGK₂ beispielsweise belegten eine positive Kooperativität zwischen den katalytischen Zentren und zeigten somit, dass beide Bindungstaschen essentiell für den Transport sind (76). Nicht zuletzt die Strukturdaten der isolierten HlyB-NBDs, einschließlich der geschlossenen Konformation mit zwei gebundenen ATP-Molekülen, lassen dabei eine enge Wechselwirkung zwischen den katalytisch aktiven Zentren vermuten, die den Transportprozess bestimmen (54, 56, 77).

Ein wesentlicher Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass einige Vertreter der ABC-Transporter spezifische Degenerationen in den katalytisch aktiven Motiven aufweisen. Dies hat zur Folge, dass die Bindungs- und Hydrolyseeffizienzen der beiden katalytischen Zentren nicht äquivalent sind. Biochemische Studien des ABC-Transporters CFTR z.B. zeigten, dass dieser nur eine katalytisch aktive Bindungstasche benötigt, um den Kanal und damit den Chlorid-„Transport“ zu regulieren (78, 79). Neben dem humanen ABC-Transporter CFTR zeichnet sich auch der Peptidtransporter TAP (80) durch Mutationen einzelner Aminosäuren in den Konsensussequenzen aus. Vor allem aber die Vertreter der MRP (Multidrug Resistance Protein)-Familie oder viele ABC-Transporter in Pilzen, die an der Multidrogenresistenz beteiligt sind, weisen eine stark konservierte Degeneration ihrer NBDs auf (68, 81). Welche Bedeutung diese Degenerationen für den katalytischen Hydrolysezyklus und den Transportprozess im Ganzen hat, ist dabei ebenso unklar wie die Frage, wie viele ATP-Moleküle nun für den Transport eines Substrats

hydrolysiert werden. Für den bakteriellen Importer OpuA aus *L. lactis* konnte beispielsweise anhand experimenteller Daten gezeigt werden, dass pro Transportvorgang zwei ATP Moleküle benötigt werden (82).

Entgegen früheren Studien (83) implizieren die biochemischen und strukturellen Analysen der isolierten NBDs, dass die Freisetzung der Energie aus der ATP-Hydrolyse nicht simultan mit der Konformationsänderung in den TMDs abläuft. Eine Annahme, die auch als *Power Stroke* bezeichnet wurde (84). Vielmehr deuten die verschiedenen Strukturdaten der isolierten NBDs als auch der vollständigen Transporter in An- und Abwesenheit von ATP bzw. ADP darauf hin, dass die ATP-induzierte Dimerisierung und der anschließende Zerfall des NBD Dimers nach der Hydrolyse den Transportprozess über die Membran regulieren (47, 53, 64, 70, 71).

Im Einklang mit den biochemischen Analysen verschiedener ABC-Transporter und dem *Alternating Access Model* der TMDs konnte somit in verschiedenen Modellen wie dem *ATP-Switch* (69) oder dem *Processive Clamp Model* (59) ein möglicher mechanistischer Ablauf für den Substrattransport beschrieben werden. So geht man davon aus, dass im monomeren Zustand der NBDs, wenn ein Austausch der Nukleotide möglich ist, die TMDs eine Konformation aufweisen, in der die hochaffine Substratbindestelle zugänglich ist. Bei einem Exporter würde dies bedeuten, dass die TMDs eine dem Zytosol zugewandte offene Konformation einnehmen. Das Substrat kann unter diesen Bedingungen von der Membran oder dem Zytosol aus an den Transporter binden (Abbildung A 6 Schritt 1). Die ATP-induzierte Dimerisierung führt dann zum Wechsel der Konformationen in den TMDs, so dass das Substrat nun auf der anderen Seite der Membran aufgrund einer geringeren Affinität freigesetzt werden kann (Abbildung A 6 Schritt 2 und 3). Die Dissoziation der NBDs nach der Hydrolyse führt dann wieder zum Wechsel der Konformationen in den TMDs in den Ausgangszustand (Abbildung A 6 Schritt 4 und 5).

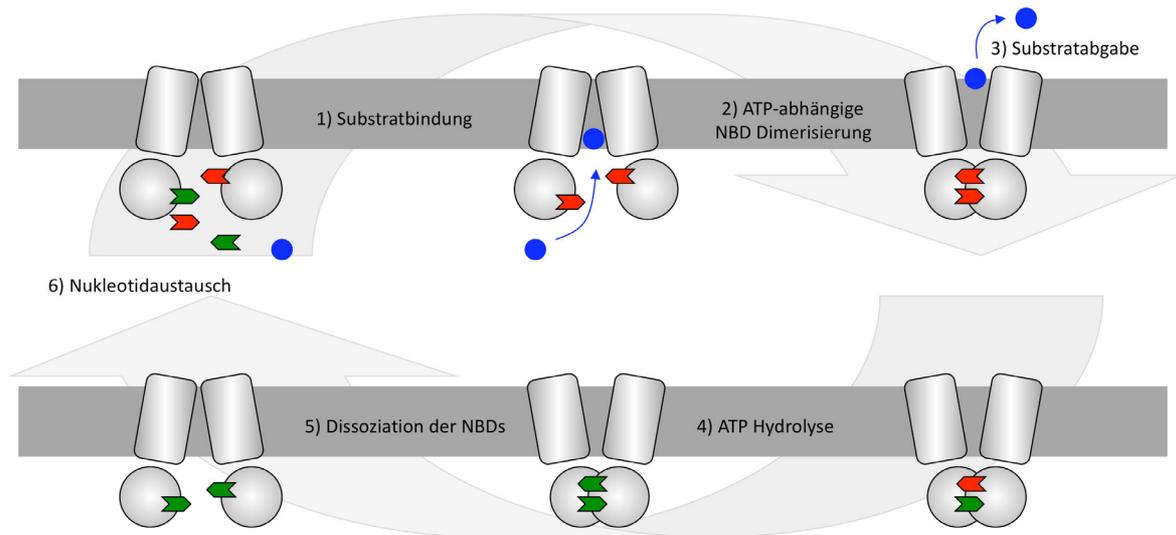


Abbildung A 6: Skizzierung des *Processive clamp Models* für Exporter

1) Im Ausgangszustand sind die TMDs der Exporter zum Zytosol hin geöffnet und die NBDs ebenfalls, so dass sie die Nucleotide austauschen können. 2) Nach Anlagerung des Substrats führt die ATP-Bindung zur Dimerisierung und zur Konformationsänderung der TMDs. 3) Das Substrat dissoziiert von der gering affinen Bindungsstelle, während durch die sequenzielle ATP-Hydrolyse (Schritt 4) die NBDs dissoziieren (Schritt 5) und die Nucleotide wieder ausgetauscht werden können (Schritt 6). Die TMDs wechseln dabei wieder zurück in den Ausgangszustand. Die Skizze des Modells wurde nach Ernst R., Kueppers P., et al. (68) adaptiert.

Im Vergleich postulieren die Modelle übereinstimmend einen kontinuierlichen Ablauf des katalytischen Zyklus über eine sequentielle Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen, die mit der Freisetzung des Substrats von der gering affinen Bindestelle verknüpft ist. In der Beschreibung der einzelnen Zwischenschritte unterscheiden sich die Modelle jedoch maßgeblich. Beim *ATP-Switch Model* z.B. werden auch nukleotidfreie Intermediate postuliert, und man geht davon aus, dass beide katalytischen Zentren ATP hydrolysieren und somit den Transportvorgang energetisieren (69).

Ein Vergleich unterschiedlicher Kristallstrukturen vollständigerer ABC-Transporter in unterschiedlichen Stadien des Transportzyklus könnte einen besseren Einblick in die Intermediate zulassen. Aufgrund der Schwierigkeiten, die mit der Isolierung und Kristallisation von Membranproteinen verbunden sind (85), wurde allerdings bislang nur eine Struktur eines vollständigeren ABC-Transporters veröffentlicht, die ein katalytisches Intermediat beschreibt (66). Dabei handelte es

sich um das Maltoseimportsystem MalFGK₂ aus *E. coli*, das im Komplex mit seinem Substratbindeprotein MalE und dem Substrat Maltose im ATP-gebundenen Zustand kristallisiert werden konnte. Die Stabilisierung des ATP-bindenden NBD-Dimers wurde durch eine Mutation in den NBDs (E159Q) ermöglicht, die eine ATP-Hydrolyse verhinderte. Das Substrat Maltose konnte dabei an der Schnittstelle zwischen den beiden TMDs in der extrazellulär zugewandten Konformation identifiziert werden. Das Maltoseimportsystem MalFGK₂E wurde bereits intensiv strukturell, biophysikalisch und biochemisch analysiert und zählt vermutlich zu den am besten charakterisierten ABC-Transportern der Prokaryoten (86). Der Transportzyklus der Importer beinhaltet im Gegensatz zu dem der Exportsysteme einen weiteren essentiellen Schritt, in dem das Substrat zunächst durch das Substratbindeprotein (SBP) gebunden werden muss. In dieser Arbeit wird dieser Aspekt jedoch nicht näher beschrieben. Die Erkenntnisse bezüglich der strukturellen und biochemischen Analysen werden umfassend von Jumpertz et al (87) beschrieben. Analog zum *ATP-Switch* (69) bzw. *Processive Clamp Model* (59) konnte der Transportvorgang für die Importsysteme, über die initiale Bindung des Substrats am SBP beschrieben werden, wobei der Transporter in der dem Zytosol zugewandten offenen Konformation vorliegt (74). Die Dimerisierung der NBDs stellt dabei stets den Schlüsselschritt im Transportmechanismus dar. Doch wie durch diese Konformationsänderung die nötige Energie für den Transport der Substrate auf die TMDs übertragen wird, ist bislang nicht geklärt und führt zur zentralen Frage nach der Kommunikation zwischen den Prozessen in den NBDs und den TMDs.

Mögliche Schnittstellen zwischen den NBDs und TMDs wurden aufgrund von Sequenzvergleichen und den Strukturdaten der vollständigen ABC-Transporter, aber auch anhand der isolierten NBDs beschrieben. Trotz der großen Variabilität in der Primärsequenz der TMDs konnte dabei gerade bei den Importern ein konserviertes EAA Motiv im zytoplasmatischen *Loop* zwischen der 4. und 5. Transmembranhelix (TMH) identifiziert werden (88). Alle Strukturen der bakteriellen Importer wie z.B. dem Maltoseimportsystem MalFGK₂ (66), dem Vitamintransporter BtuC₂D₂ (23) oder dem Metall-Chelat-Transporter HI1470/1471(61) weisen auch α -helikale Segmente auf, die parallel zur Membran verlaufen. Die korrespondierende Kontaktfläche, ausgehend von den NBDs, wird dabei durch den *Q-loop* und die SDR- (*structural diverse region*) Region vor dem *C-loop* gebildet (44).

Die beiden Strukturen der Exporter Sav1866 und P-gp unterscheiden sich allerdings wesentlich. In der Struktur des MDR ABC-Transporters P-gp sind die Schnittstellen wie bei den Strukturen der Importer jeweils zwischen einer NBD und einer TMD, die beiden NBDs sind jedoch mit $\sim 30\text{\AA}$ sehr weit auseinander (64). Diese Beobachtung wurde erstmals auch für den ABC-Exporter MsbA beschrieben, dessen Kristallstrukturen jedoch zurückgezogen wurden. 2007 wurden die Strukturen erneut publiziert, jedoch mit einer sehr geringen Auflösung (89). In der Sav1866 Struktur hingegen sind die beiden TMDs gegenüber dem NBD Dimer verdreht, so dass in diesem Transporter jede TMD über die intrazellulären *Loops* 1 und 2 (ICL1 und ICL2) an beide NBDs grenzt (Abbildung A 7 ; (63, 65)). In Analogie zu den Importern wird die Schnittstelle zwischen den TMDs und NBDs durch vier Helices definiert.

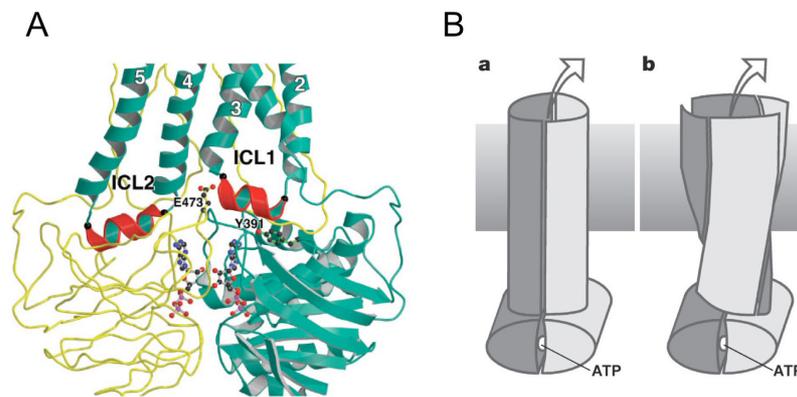


Abbildung A 7: Schnittstelle zwischen den NBDs und TMDs des Exporters Sav 1866₂

A) Ausschnitt der Sav1866₂ Struktur, bei der nur ein Monomer des Dimers in der Ribbon-Darstellung gezeigt ist, um die Schnittstelle zwischen den TMDs und den NBDs über die ICLs 1 und 2 hervorzuheben (rote Helices). **B)** Schematische Darstellung zweier Exporter entsprechend der physikalischen Verknüpfung zwischen den Domänen auf der Basis der bisherigen Strukturdaten von P-gp (a) und dem Exporter Sav 1866 (b). Im Gegensatz zum Klappmechanismus deutet die Verknüpfung im Exporter Sav 1866 auf einen Rotationsmechanismus für den Translokationsprozess über die Membran. Die Abbildungen wurden aus Dawson et. al. 2006 entnommen (63).

Im Hinblick auf den Übergang von der hoch affinen zur gering affinen Konformation wirft diese Beobachtung eine weitere Frage auf. Während man beispielsweise aufgrund der Struktur des MDR Exporters P-gp einen Klappmechanismus vermuten könnte, deutet die Sav1866 Struktur darauf, dass der Übergang durch ein Verdrillen der TMHs erfolgt (Abbildung A 7 B). Möglicherweise ist diese Rotation allerdings auch in der Topologie des Transporters begründet, da der Transporter Sav1866 im Gegensatz zum Exporter P-gp als *half-size* Transporter

kodiert ist. Dieser Aspekt ist allerdings reine Spekulation. Vor dem Hintergrund der physikalischen Verknüpfung seitens der NBDs tragen auch in den Exportern die Regionen um den *Q-loop* zu den Schnittstellen bei. Zusätzlich wurde aufgrund der Analysen des Sav1866 ABC-Transporters eine konservierte TEVGERG Sequenz, die als *X-loop* bezeichnet wird, in der SDR-Region der NBDs als möglicher Vermittler identifiziert (63).

Diese beobachteten Unterschiede zwischen den Schnittstellen bei den Importern und Exportern, könnten möglicherweise einen unterschiedlichen Mechanismus der Kraftübertragung zwischen den NBDs und den TMDs für die Importer im Gegensatz zu den Exportern bedeuten. Weitere Struktur-Funktions-Analysen sind nicht zuletzt deswegen zwingend notwendig, will man den vollständigen Transportmechanismus und vor allem die Kommunikation zwischen den funktionellen Domänen beschreiben und verstehen. Ein wesentlicher Aspekt bei der Aufklärung der molekularen Prozesse stellt dabei auch die Substratvielfalt der ABC-Transporter dar. Dies gilt vor allem vor dem Hintergrund der bislang ungeklärten Regulations- und Selektionsmechanismen in der Multidrogenresistenz.

7. Substrate und Modulatoren in der Multidrogenresistenz

Charakteristisch für die ABC-Transporter in der Multidrogenresistenz ist die breite Substratspezifität, die gerade die Pharmaindustrie in der Entwicklung geeigneter Arzneistoffe bei der Behandlung von Krebspatienten oder infektiösen Pilzkrankungen vor ein großes Problem stellt. Das Substratspektrum eines MDR ABC-Transporters umfasst eine Vielzahl strukturell und chemisch unterschiedlicher Substanzen, wie verschiedene Fungizide oder Zytostatika, aber auch fluoreszierende Verbindungen wie Hoechst 33342 oder Rhodamine (Abbildung A 8).

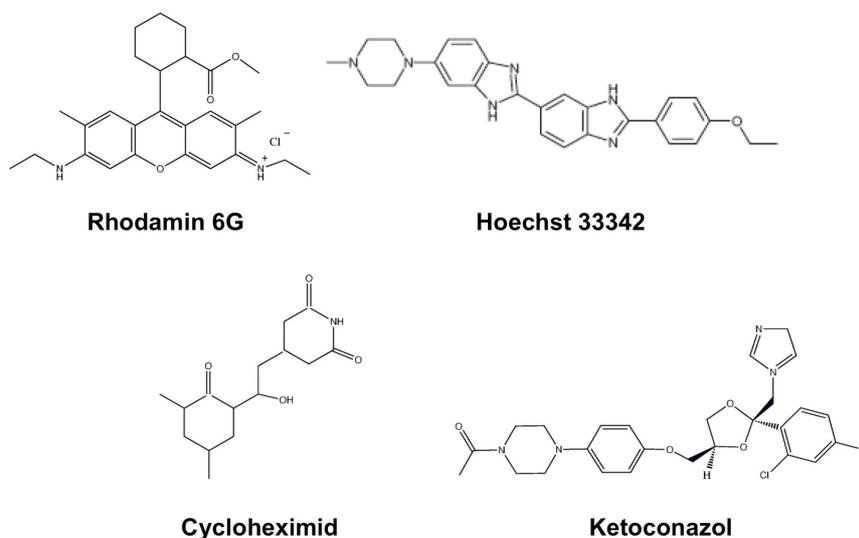


Abbildung A 8: Strukturformeln einiger Substrate der Multidrogentransporter

Rhodamin 6G und Hoechst 33342 gehören zu den Fluoreszenzfarbstoffen. Cycloheximid ist ein Zytostatikum und Ketoconazol ein Fungizid.

Zu den ersten und gleichzeitig zu einem der am besten charakterisierten MDR ABC-Transportern zählt das P-Glykoprotein (P-gp), dessen intensive biochemische und biophysikalische Untersuchungen grundlegend zur Etablierung der verschiedenen Hydrolyse- und Transport-Modelle beigetragen haben (90, 91). Neben der funktionellen und strukturellen Analyse der Nukleotidbindung und -hydrolyse wurden im Hinblick auf die Substratvielfalt insbesondere die Substratbindestellen dieses Transporters untersucht, mit dem Ziel die Funktion der Proteine zu verstehen, aber auch um geeignete Inhibitoren zu entwickeln. Anhand von Substratscreenings und Mutationsstudien, kombiniert mit verschiedenen biophysikalischen Methoden wie der Photoaffinitätsmarkierung (*Photoaffinity*

labelling) (84, 85) oder Quervernetzungsexperimenten (*Cross-linking* Verfahren) (92-94), konnten mögliche Bindungsstellen lokalisiert werden. Insbesondere die *Cross-linking* Studien in P-gp und die Kristallstruktur von P-gp (64) deuten darauf hin, dass besonders die TMHs 5 und 6 wie die TMHs 11 und 12 maßgeblich an der Substratbindung beteiligt sind (95, 96). Dabei geht man davon aus, dass die Transporter vermutlich über eine Substratbindetasche mit mehreren Substratbindesstellen verfügen, die sich teilweise überschneiden und negativ oder auch positiv miteinander kooperieren (97-99).

Im Zuge der Substratstudien in unterschiedlichen MDR ABC-Transportern in Krebszellen, Bakterien und Pilzen konnten verschiedene Modulatoren identifiziert werden, die einen direkten oder indirekten inhibitorischen Effekt auf das Resistenzverhalten der ABC-Transporter ausüben. Dabei handelt es sich größtenteils um zytotoxische oder invasive Substanzen, die oft auch metabolische Nebeneffekte besitzen, wie z.B. die Immunsuppressiva Cyclosporin A (100) und FK506 (101) oder auch verschiedene Ionophore, Antibiotika, Enniatin oder Curcuminoide (102, 103). Für das Verständnis der Funktionalität der Transporter können diese Modulatoren und Inhibitoren von großer Bedeutung sein. Im Zuge der biochemischen Analysen der MDR ABC-Transporter für die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen sind sie allerdings noch wenig erforscht, so dass nur wenige Kenntnisse über ihre inhibitorischen und modulatorischen Effekte vorliegen.

8. Die Pleiotrope Drogenresistenz (PDR) der Hefe

Geeignete Modellsysteme zur Analyse der molekularen Prozesse in der Substraterkennung und Translokation stellen die ABC-Transporter in Bakterien und Pilzen dar. Neben ihrer Bedeutung, für die mit diesen Organismen verbundenen pathogenen Phänomenen, lassen sich die biochemischen und biophysikalischen Erkenntnisse auch auf andere Organismen übertragen. Die Genetik der Bakterien und Hefepilze als auch das breite Methodenspektrum ist dabei ein wesentlicher Vorteil.

Das vollständig sequenzierte Genom der nicht-pathogenen Hefe *S. cerevisiae* beinhaltet beispielsweise insgesamt 30 verschiedene ABC-Transporter, die in 5 Unterfamilien unterteilt werden können. Dabei ist mindestens ein Drittel der ABC-Transporter an der Multidrogenresistenz der Zellen beteiligt (98). Das Phänomen der Multidrogenresistenz wird in der Hefe *S. cerevisiae* als Pleiotrope Drogenresistenz (PDR) bezeichnet, welches analog zur humanen MDR in Krebszellen eine umfassende Schutzfunktion für den Organismus bedeutet. Die Hefe verfügt dabei neben verschiedenen anderen Schutzmechanismen, die eine Inaktivierung, Modulation oder reduzierte Aufnahme der Toxine bedeuten, vor allem über ein regulatorisches Netzwerk von Proteinen, um Xenobiotika aus der Zelle zu schleusen. Dieses Netzwerk wird auch als PDR-Netzwerk bezeichnet und setzt sich im Prinzip aus drei Klassen von Proteinen zusammen: den ABC-Transportern, verschiedenen Sekundärtransportern, die zur Major facilitator Superfamilie (MFS) (104, 105) gehören und einer Vielzahl spezifischer Transkriptionsfaktoren (106-108). Die Schutzfunktion der Zelle wird dabei hauptsächlich durch die ABC-Transporter der PDR- und MRP/CFTR-Unterfamilie ausgeführt, die in der Plasmamembran lokalisiert sind (109). Dabei weisen die ABC-Transporter große Homologien zu den Hauptvertretern der MDR-vermittelnden ABC-Transporter in humanen Krebszellen auf. Aber vor allem zeichnen sich viele dieser Transporter auch durch eine hohe Sequenzidentität mit den ABC-Transportern in infektiösen Pilzarten wie z.B. den verschiedenen *Candida* Spezies aus, die an der Multidrogenresistenz beteiligt sind (110, 111).

Die Expression der ABC-Transporter im PDR-Netzwerk der Hefe wird durch eine Vielzahl von Stress-Antwort-Faktoren und Transkriptionsfaktoren reguliert, wobei die beiden wichtigsten Regulatorproteine die Transkriptionsfaktoren *Pdr1* und *Pdr3* sind (Abbildung A 9). Deletionen oder genetische Modifikationen dieser im Zellkern lokalisierten Transkriptionsfaktoren haben einen signifikanten Einfluss auf das Resistenzverhalten der Zellen (112).

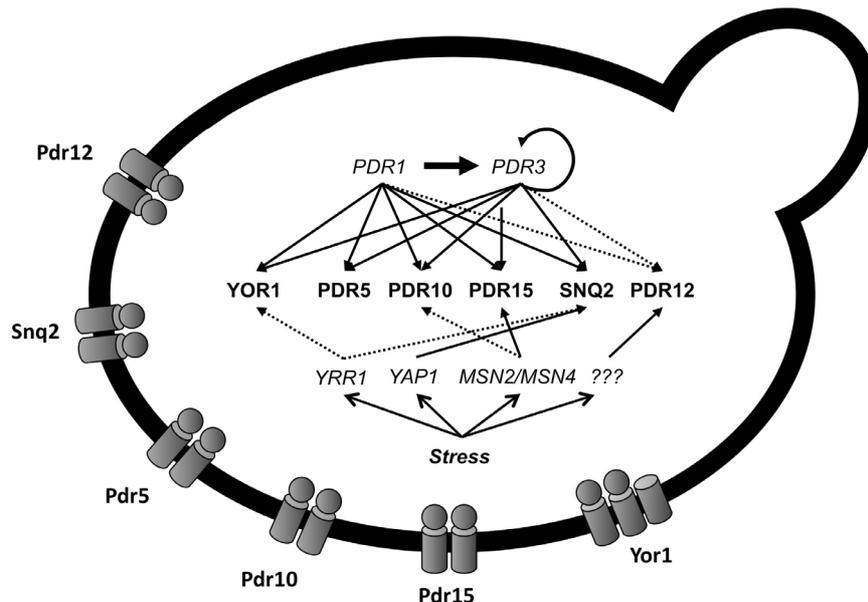


Abbildung A 9: Schematische Darstellung der ABC-Transporter im PDR-Netzwerk

Exemplarisch ist für verschiedene ABC-Transporter des PDR-Netzwerks die Genregulation durch die Transkriptionsfaktoren *Pdr1* und *Pdr3* einerseits und durch die unterschiedlichen Stressfaktoren andererseits gezeigt. Die Lokalisation der ABC-Transporter in der Plasmamembran der Hefezelle ist entsprechend in der Abbildung dargestellt. Die Abbildung ist adaptiert nach Bauer et. al. (113)

Die beiden Transkriptionsfaktoren zählen aufgrund ihres molekularen Aufbaus, zu den Zinkfingertranskriptionsfaktoren ($\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$) (114). Zur Regulation der Expression binden sie über ihr Zinkfinger-Motiv an so genannte pleiotrope Drogenresistenz Elemente (PDREs) in den Promotoren ihrer Zielgene, die im Optimalfall eine palindromische Sequenz 5'-TCCGCGGA-3' aufweisen. Die Transkriptionsfaktoren erkennen aber auch PDREs, die verschiedene Abweichungen von der palindromischen Sequenz aufweisen und können zwischen einem und vier PDREs parallel binden (113, 115). Die Regulationsmechanismen sind dabei recht komplex, da die Transkriptionsfaktoren neben den ABC-Genen auch eine Vielzahl anderer PDR-vermittelnder Gene regulieren (116). Dazu gehören auch verschiedene Proteine, die im Membranmetabolismus zur Aufrechterhaltung der Lipidasymmetrie und Zellwandmetabolismus beteiligt sind (117, 118).

Die Expression der ABC-Transporter ist jedoch nicht zwingend von beiden Transkriptionsfaktoren *Pdr1* und *Pdr3* abhängig, wie anhand der Deletionsmutanten ΔPDR1 , ΔPDR3 oder $\Delta\text{PDR1}/\Delta\text{PDR3}$ gezeigt werden konnte (119, 120). Die beiden Transkriptionsfaktoren können Homo- und Heterodimere bilden und somit spezifische Kombinationen der PDREs binden (113). Demzufolge kann eine Deletion

eines Transkriptionsfaktors, abhängig von der PDRE Kombination im Promotoren, einen unterschiedlichen Effekt auf die Expression verschiedener ABC-Transporter haben. Anders formuliert können *Pdr1* und *Pdr3* positiv und negativ die Expression der ABC-Transporter regulieren, je nach PDRE bzw. PDRE-Kombination.

Vor dem Hintergrund des breiten Spektrums, das durch die verschiedenen PDR ABC-Transporter der Hefe abgedeckt wird, repräsentiert diese unterschiedliche Regulation der Expression eine perfekte Anpassung des Systems. Der ABC-Transporter Yor1 aus der MRP/CFTR-Familie z.B. vermittelt eine Resistenz gegen Oligomyzin, organischen Anionen und ist für den Transport von Schwermetallen wie Cadmium verantwortlich (121, 122). Der PDR ABC-Transporter Pdr12 hingegen transportiert beispielsweise schwache organische Säuren (123, 124). So genannte *gain of function* Mutationen in PDR1 und PDR3 führten dabei zur selektiven Überexpression einzelner ABC-Transporter. Dazu wurden Mutationen in die Inhibitions motive von PDR1 bzw. in die aktivierende saure Domäne am C-Terminus des Transkriptionsfaktorgens PDR3 eingeführt und über ihren phänotypischen Effekt gegenüber einigen klassischen Fungiziden analysiert (125). Die PDR1 Mutationen führten zur verstärkten Überexpression der ABC-Transporter Pdr5, Snq2 und Yor1. Insbesondere die *PDR1-3* Mutation führte zu einer hohen Überexpression des ABC-Transporters Pdr5, der bereits im Wildtyp mit über 42000 Molekülen pro Zelle der stärkste Vertreter unter den ABC-Transportern in der Hefe ist ((126, 127), <http://yeastgfp.ucsf.edu>).

9. Der PDR ABC-Transporter Pdr5 aus *S. cerevisiae*

Der ABC-Transporter Pdr5 gehört, wie bereits beschrieben, zu den häufigsten ABC-Transportern in der Hefe und zählt wie sein humanes Homolog P-gp zu einem der wichtigsten Proteine in der Multidrogenresistenz. Pdr5 ist neben Snq2 der Hauptvertreter der PDR-Unterfamilie der Hefe und ist wie fast alle ABC-Transporter in *S. cerevisiae* ein *full-size* Transporter. Er setzt sich aus zwei NBDs und zwei TMDs zusammen, mit 12 TMHs zur Ausbildung des Translokationspfades über die TMDs. Charakteristisch für Pdr5, wie für alle Mitglieder der PDR-Unterfamilie, ist eine inverse Topologie der vier Domänen. Am N-Terminus des Genprodukts ist zunächst eine NBD kodiert ((NBD-TMD)₂), während die kanonische Topologie mit einer TMD beginnt ((TMD-NBD)₂ siehe auch Abbildung A 2). Dieses

Merkmal korreliert mit der hohen Sequenzidentität von Pdr5 mit den Hauptvertretern Cdr1 und Cdr2 in infektiösen Pilzen wie den verschiedenen *Candida* und *Aspergillus* Spezies und zeichnet ihn nicht zuletzt deswegen als interessanten Modellorganismus aus.

Das Substratspektrum von Pdr5 umfasst in Analogie zu den anderen MDR ABC-Transportern eine Vielzahl von hydrophoben Verbindungen und Xenobiotika wie verschiedene Azolderivate, Zytostatika, Steroide und auch Phospholipide (101, 128-131). Letztere führten gerade im Zusammenhang mit der hohen Kopienzahl von Pdr5 in der exponentiellen Wachstumsphase dazu, dass für Pdr5 eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der Lipidasymmetrie in der Plasmamembran vermutet wurde (132). Bemerkenswert ist jedoch, dass eine Deletion des PDR5 Gens die Proliferation der Hefezellen unter optimalen Bedingungen, also in Abwesenheit jeglicher Art von Zellgiften, nicht signifikant beeinflusst.

Zur Charakterisierung der Funktionalität von Pdr5 wurden vor allem ungezielte aber auch gezielte Mutagenesestudien in Kombination mit Wachstums- oder fluoreszenzmikroskopischen Analysen durchgeführt. Dabei wurden meist verschiedene Azolderivate und andere Zellgifte wie z.B. Cycloheximid verwendet, die als gängige Fungizide die Proliferation der Zellen normalerweise unterbinden (101). Andererseits dienten auch fluoreszenzbasierte Transport- und Akkumulationsverfahren in ganzen Hefezellen oder Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Substanzen zur Analyse der Aktivität von Pdr5 (132-134). In einer eleganten Studie zum Rhodamin 6G Transport in Plasmamembranen konnte dabei erstmalig der aktive Transport eines Substrats durch den ABC-Transporter Pdr5 nachgewiesen werden (133). Diese Studie lieferte somit auch den eindeutigen Nachweis, dass Fluoreszenzfarbstoffe wie die Rhodamine analog zum MDR Exporter P-gp auch für Pdr5 zu den Substraten zählen. Einige wenige Studien verfolgten auch die Analyse von Pdr5 im isolierten System auf der Basis der *PDR1-3* vermittelten Überexpression und anschließenden Solubilisation (135). Dabei konnte mit Hilfe von Saccharosegradienten auch eine ATPase Aktivität detektiert werden, die scheinbar unabhängig von der Plasmamembran Pumpe Pma1 auf die Aktivität von Pdr5 zurückzuführen war. Allerdings ließ der gleichzeitige Nachweis einer ADPase Aktivität eine mögliche Überlagerung durch Verunreinigungen vermuten. Die meisten Studien zur Funktionalität von Pdr5 und zur Analyse der Kommunikation zwischen

der Energiesynthese und dem Transportprozess wurden daher lange Zeit hauptsächlich auf *in vivo* Daten gestützt.

Auf diese Weise wurden verschiedene Mutanten konstruiert und klassifiziert, die die Faltung, Substratspezifität oder auch Inhibitoranfälligkeit von Pdr5 modifizierten (101, 136). Eine Cysteinsubstitution im extrazellulären *Loop* (ECL) 6 zwischen der 11. und 12. TMH durch ein Tyrosin führte z.B. zu einer Missfaltung und Retention des Proteins im ER und einer vollständigen Degradation durch Polyubiquitinierung (137). Daher geht man davon aus, dass für die korrekte Faltung und Funktionalität von Pdr5 die Existenz von Disulfidbrücke(n) notwendig ist. Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu den Analysen des MDR ABC-Transporters P-gp, bei dem auch eine cysteinfreie Mutante vollständig funktionsfähig ist (138).

Unter den identifizierten Mutanten, die einen Einfluss auf die Substratspezifität hatten, zählten die konservierten Glyzine (G906/G908) im Walker A Motiv der zweiten NBD von Pdr5. Sie führten vielmehr zum vollständigen Verlust der Multidrogenresistenz (101). Vor dem Hintergrund der katalytischen Funktion des Walker A in der ATP-Hydrolyse bedeutet diese Beobachtung, dass die ATP-Bindungstasche aus dem N-terminalen Walker A Motiv für einen Transport unzureichend ist. In diesem Zusammenhang könnte gerade die Degeneration in den katalytischen Motiven der beiden NBDs von Pdr5 relevant sein. Dieses Phänomen ist jedoch nicht nur ein wesentliches Merkmal von Pdr5, sondern ist gleichermaßen auch in allen homologen ABC-Transportern des PDR-Netzwerks und vor allem in den pathogenen Pilzen konserviert. Die Bedeutung der Degeneration in der ATP-induzierten Dimerisierung und somit auch in der Verknüpfung und Kommunikation zwischen den funktionellen Domänen im Selektions- und Transportprozess in der ABC-Transporter-vermittelten Multidrogenresistenz der Pilze ist bislang völlig unerforscht. Doch gerade aufgrund der Problematik, die von der Multidrogenresistenz der pathogenen Pilze ausgeht, rückt dieser Punkt ins Zentrum der aktuellen Forschung.

Im Rahmen dieser ungerichteten Mutagenesestudie wurden auch andere Mutanten in der Region von konservierten Motiven in den NBDs identifiziert, die teilweise selektiv das Resistenzverhalten von Pdr5 modifizierten. Dazu zählen beispielsweise die Mutationen G302D, G1009C in der Region um den *C-loop* oder

G1040D im *D-loop* der C-terminalen NBD (101). Ähnliche Veränderungen des Phänotyps wurden auch für verschiedene Mutanten in den intra- bzw. extrazellulären *loops* (ICL, ECL) zwischen den einzelnen TMHs identifiziert. Ob diese an der Faltung des Proteins oder der Kommunikation zwischen Energiesynthese und Substrattransport beteiligt sind, sei dabei dahingestellt. Möglicherweise könnten auch Überlappungen des Substratspektrums durch andere Transportsysteme eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf die Substratvielfalt und Selektivität von Pdr5 ist besonders die Mutagenese eines Serins (S1360) in der TMH 11 von Pdr5 nennenswert. Diese Aminosäure wurde durch unterschiedliche Aminosäuren substituiert, die dabei in Abhängigkeit von der Polarität und Größe der Aminosäuren einen unterschiedlichen Effekt auf das Resistenzverhalten gegenüber verschiedenen Azolen, Mycotoxin und Cycloheximid vorwies. Konsistent mit den Analysen zur Substratbindestelle in P-gp wurde aufgrund der Lokalisation in der TMH11 vermutet, dass die Aminosäure an der lipidabgewandten Seite der Helix liegt und direkt an der Substraterkennung beteiligt ist (101, 139).

Grundsätzlich wird vermutet, dass in Pdr5, ähnlich wie auch in P-gp, eine große Substratbindetasche mit mindestens drei Substratbindestellen existiert. Dies wurde aufgrund intensiver Substratteststudien und Kompetitionsstudien mit verschiedenen chemischen Derivaten, die sich vor allem in der Größe unterschieden, gezeigt (134, 136, 140, 141). Dabei ist nicht eindeutig, ob diese überlappen oder auch regulatorische Bindungsstellen einschließen. Charakteristisch für Pdr5 ist auf jeden Fall, dass im Kontrast zu P-gp nicht die Hydrophobizität der Substrate ausschlaggebend ist, sondern die Größe und das Volumen der Substanz (141). Allerdings scheint dabei auch die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken ein wichtiger Faktor zu sein (134).

Bezug nehmend auf die charakteristische Serin in der TMH 11 wurde auch der Phänotyp gegenüber einigen Translationshemmern und Fungiziden in Anwesenheit verschiedener Modulatoren wie FK506 oder Enniatin getestet (101, 139, 142). Dabei konnte gezeigt werden, dass die konstruierten Serinmutanten auch in unterschiedlichem Maße die inhibierende Wirkung modifizierten, wobei die Substitution des Serins durch ein Phenylalanin die inhibierende Wirkung der

Modulatoren vollständig aufhob. Diese Beobachtung war besonders bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass die Mechanismen der inhibitorischen Wirkung dieser Modulatoren wie bereits angedeutet kaum erforscht sind (32). Bei der Identifizierung neuer Inhibitoren steht meist eher die Etablierung geeigneter Testverfahren im Vordergrund (143, 144). Bei vielen Modulatoren ist zudem unklar, ob sie nur regulatorisch wirken oder selbst als Substrat für den Transporter fungieren. Daher ist auch fraglich, welche Wechselwirkungen durch die Substitution des Serins mit dem Phenylalanin zur Aufhebung der inhibierenden Wirkung führen, und wie dies zum Verständnis der Funktionalität des Transporters beitragen kann.

Jüngere Studien zur Analyse der Funktionalität von Pdr5 umfassten auch ATPase Aktivitätsbestimmungen in Plasmamembranen in Kombination mit Pdr5 spezifischen Inhibitoren wie Vanadat oder Oligomycin, um die Pdr5-vermittelte ATPase Aktivität zuordnen zu können (145). Dabei wurde interessanterweise auch eine TMD Mutante in der TMH2 von Pdr5 entdeckt, die neben einer veränderten Substratspezifität zu einer Entkopplung der ATPase Aktivität führte. Gleichzeitig postulierten die Autoren einen möglichen Interaktionspartner in der SDR- Region der N-terminalen NBD, die allem Anschein nach diesen Effekt wieder aufheben konnte. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie wichtig eine Charakterisierung der Hydrolyseaktivität für die Struktur-Funktions-Analysen ist, um eine Aufklärung der molekularen Zusammenhänge zu ermöglichen. Ein interessanter Aspekt stellt dabei die Fähigkeit von Pdr5 dar, andere Nukleotide abgesehen von ATP hydrolysieren zu können (133, 135, 146). Inwiefern diese Energie allerdings in dem Transport von Substraten umgesetzt werden kann, steht zur Zeit zur Diskussion. Eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen Effekte, die durch Interaktionen mit Substraten, Modulatoren oder auch durch die Wahl des Nukleotids induziert werden, könnte daher neue Einblicke in die komplexe Funktionsweise dieses Transporters ermöglichen. Gleichmaßen gilt dies auch für die Identifizierung und Charakterisierung einzelner Aminosäuren oder Motive, die an der Verknüpfung und Kommunikation zwischen den funktionalen Domänen direkt oder indirekt beteiligt sind.

10. Motivation und Zielsetzung

Membranproteine, insbesondere Membrantransportsysteme, sind essentiell für das Überleben von einzelligen bis zu höheren Organismen. ABC-Transporter spielen dabei eine besondere Rolle, da ihre Funktionen viele physiologische und pathophysiologische Prozesse bestimmen. Die Aufklärung der Funktionsweise dieser Proteine in der Energiesynthese und insbesondere im Hinblick auf ihre breite Substratvielfalt und Spezifität stellt jedoch eine große Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit steht daher einerseits die Entwicklung und Evaluation eines Expressionssystems zur Überexpression und Reinigung von Membranproteinen. Das Hauptaugenmerk liegt jedoch in der detaillierten biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des ABC-Transporters Pdr5 aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, der zu einem der Hauptvertreter in der pleiotropen Drogenresistenz (PDR) zählt. Stellvertretend für seine homologen Transporter in der Multidrogenresistenz (MDR) in Krebszellen oder infektiösen Pilzen, soll dieses Modellsystem genutzt werden, um einen Einblick in die Selektions- und Transportmechanismen dieser Transporter zu gewähren.

In gezielten Mutagenesestudien, die in Einklang mit den homologen Transportern konservierte Aminosäuren betreffen, sollen die molekularen Mechanismen der ATP-Hydrolyse als auch die Bedeutung der wesentlichen Charakteristika in den ABC-Transportern der Pilze wie ihre konservierte Degeneration analysiert werden. Dazu werden verschiedene biochemische und biophysikalische Methoden angewendet, etabliert und evaluiert. Ein zentraler Punkt ist dabei die Analyse der Verknüpfung und Kommunikation zwischen der Bereitstellung der Energie und der Umsetzung im Substraterkennungs- und Transportprozess dar. Vor diesem Hintergrund werden insbesondere auch die verschiedenen Interaktionen zwischen dem Protein und den äußeren Komponenten wie Substraten, Modulatoren und auch differentiellen Energiequellen auf ihren Einfluss untersucht. Mit Hilfe dieser Methoden sollen somit neue Erkenntnisse, die zum besseren Verständnis der Funktionsweise dieser Transporter beitragen, gewonnen werden.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Agar-Agar	Serva
Adenin	Fluka
Ammoniumsulfat	J.T. Baker
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Glukose	Caesar & Loretz
Hefe-Extrakt	Difco/Roth
L-Arginin	AppliChem
L-Histidin	Fluka
L-Glutamat	Roth
L-Isoleucin	Roth
L-Leucin	Merck
L-Phenylalanin	Merck
L-Valin	Roth
L-Threonin	Merck
L-Tryptophan	Roth
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich
Trypton-Pepton aus Casein	Difco/Roth
Uracil	Serva
Yeast Nitrogen Base (YNB)	Difco

Lösungsmittel, Puffersubstanzen, Salze und Färbemittel

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1 30%	Roth
Agarose GTQ	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Bio-Rad
2-Deoxyglukose	Sigma-Aldrich
ddH ₂ O Milli-Q ⁵⁰ PlusAnlage	Millipore
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	VWR
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO) hochrein	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Normapur
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth

ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham
EDTA-Dinatriumsalz	AppliChem
Emulsifier Szintillationscocktail	Perkin Elmer
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Normapur
Ethanol techn.	Fluka
Ethanol abs. für Molekularbiologie	Normapur
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka
Formaldehyd 37%	Roth
Glyzerin 98%	Caesar & Loretz
Glycin	Roth
Harnstoff	Riedel-de Haën
HellmaEx	Hellma
Hepes	AppliChem
(4-(2-hydroxyethyl)-1piperazin-ethanesulfonsäure)	
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Normapur
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
L-Histidin	Fluka
Litiumacetat (LiOAc)	Fluka
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Riedel-de Haën
Malachitgrün	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Roth
MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	Fluka
Methanol	Roth
Natriumacetat (NaOAc)	Fluka
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natrium-Dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Natrium-Dithionit (Na ₂ S ₂ O ₄)	Sigma-Aldrich
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva
Polyethylenglykol 4000 (PEG-4000)	Fluka
Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete [®] Tabletten)	Roche
Salzsäure, 37% (HCl)	Riedel-de Haën
Schwefelsäure, 96% (H ₂ SO ₄)	Fisher
Silbernitrat (Ag ₂ NO ₃)	Fluka
Sukrose	AppliChem
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Tween 20	Fluka
Xylencyanol	Roth

Detergenzien und Lipide

Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM)	Glycon
Deoxychololat (Na-Salz)	Sigma Aldrich
Foscholin 14	Anatrace
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Triton X-100	Roth
Tween-20	Roth
Asolectin aus Sojabohne	Fluka

Substrate und Inhibitoren

Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Sigma Aldrich
Adenosin-5'-monophosphat (AMP)	Fluka
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma Aldrich
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Fluka
8-Azidoadenosin-5'-[γ ³² P]-triphosphat ([γ ³² P]-8-N ₃ -ATP (320-360 GBq/mmol))	Hartmann Analytics
Cycloheximid (Actidion)	Fluka
Cytosin-5'-triphosphat (CTP)	Sigma Aldrich
FK506 (Tacrolimus)	Alexis
[³ H]-FK506 ([³ H]-Tacrolimus (185 GBq/mmol))	Hartmann Analytics
Flukonazol (FLC)	Sigma Aldrich
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	Sigma Aldrich
Kaliumnitrat (KNO ₃)	Sigma-Aldrich
Ketokonazol (KTC)	Sigma Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	Fluka
Oligomyzin A,B und C (60:30:10)	Sigma Aldrich
Rhodamin123 (R123)	Sigma-Aldrich
Rhodamin6G (R6G)	Sigma-Aldrich
Uridin-5'-triphosphat (UTP)	Sigma Aldrich

Größenmarker für DNA und Proteine

Native Page Marker	Invitrogen
PageRuler 100bp Ladder MBI Fermentas/NEB	
PageRuler 1000bp Ladder	MBI Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

Klonierungs- und Reinigungs-Kits

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
NucleoBond Xtra Plasmid Midi Kit	Macherey Nagel

Säulenmaterial und Säulen

Zn ²⁺ oder Ni ²⁺ /IDA 1ml HiTrapChelating	GE Healthcare
HR 10/30 Superose6	GE Healthcare

Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra 15 (MWCO 100 kDa)	Millipore
Amicon Ultra 15 (MWCO 30 kDa)	Millipore
Biomax Films MS/XAR	Kodak
Mikrotiterplatte, 96 Well (steril, unsteril, schwarz)	Greiner
0.5mm Glas-Beads	Bio- One/VWR
0.5mm Zirkonia-Beads	BioSpec Products
PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Transfermembran	Roth
Whatman-3MM-Filterpapier	Pall Gelman Laboratory
	Whatman

1.2. Enzyme und Proteine

Antarktische Phosphatase	NEB
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	NEB
BSA (Rinder Serum Albumin) Standard	Roth
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma
Lysozym	Fluka
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas
<i>Phusion</i> DNA Polymerase	Finnzyme
Restriktionsenzyme	Fermentas & NEB
<i>Apal</i> , <i>DpnI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>Hind III</i> , <i>NdeI</i> , (<i>Fast Digest</i>), <i>SpeI</i> , <i>XhoI</i> , (<i>Fast Digest</i>)	
inklusive der entsprechenden Puffer gemäß den Herstellerangaben	
<i>Taq</i> DNA Polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Polynukleotidkinase	NEB

Antikörper

α -Pdr5	aus Kaninchen	Prof. K. Kuchler, Wien
α -Drs2	aus Kaninchen	Prof. J. Holthuis, Utrecht
α -Mdl1	aus Kaninchen	Prof.R. Tampé, Frankfurt
α -His	aus Maus	Qiagen
α -Kaninchen-HRP	aus Ziege	Sigma Aldrich
α -Maus-HRP	aus Ziege	Pierce

1.3. Plasmide

pRE2	Ernst 2007
pRE3-14His	diese Arbeit (Ernst 2007)
pRE5- <i>SpeI</i>	Ernst 2007
pRE5-PDR5_H1068A- <i>SpeI</i>	Ernst 2007

1.4. *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme

E. coli

BL21 (DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3[<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene1 ind1sam7 nin5</i>]) (Novagen)
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ (Invitrogen)
XL-1 Blue	<i>endA1 gyrA96</i> (nalR) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> F' [::Tn10 <i>proAB+lacIq</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) (Stratagene)
XL10-Gold®	Tet ^R D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^R) Amy Cam ^R] (Stratagene)

S. cerevisiae

YALF A1 (Elternstamm)	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
YHW A5 (Δ 5) (Δ PDR5)	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3; Δ PDR5:: <i>TRP1</i>
YRE1000 (Δ P) (Δ PDR5prom)	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3; Δ PDR5prom:: <i>TRP1</i>
YRE1001 (Δ PP) (Δ PDR5 Δ PDR5prom)	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3; Δ PDR5prom, Δ PDR5:: <i>TRP</i>
Pdr5-EGFP-10HIS	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
Pdr5-C199A-14HIS	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
Pdr5-K911A-14HIS	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
N14HIS-Pdr5- C199AK911A	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
N14HIS-Pdr5-E1036Q	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
N14HIS-Pdr5-H1068A	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3
N14HIS-Pdr5- H1068AE1036Q	MATa; <i>ura3-52;trp1-1;leu2-3,112;his3-11,15;ade2-1</i> ; PDR1-3

1.5. Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die unterschiedlichen Klonierungsansätze sind in den Tabellen des folgenden Abschnitts dargestellt. Alle Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech AG bezogen und entsprechend den Herstellerangaben in ddH₂O gelöst und auf eine Konzentration von 100pmol/μl eingestellt.

In der ersten Tabelle B1 sind die Oligonukleotide zur Etablierung des Klonierungssystems zur homologen Überexpression und Reinigung von Membranproteinen in *S. cerevisiae* mittels N-terminalen Affinitätstag aufgelistet. Dabei wurden die Hefepoteine Yor1, Rsb1, Mdl1 Δ59, Drs2 und Pdr5 ausgewählt.

Tabelle B1: Klonierungs- und Sequenzierprimer der Klonierungskassette pRE3 14HIS und der Hefepoteine - Drs2, Mdl1Δ59, Rsb1, Yor1 und Pdr5

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Art
N14-HIS-FWD	TCATCACCATCATCACCATCATCACCATCATCATCA CCATGGTGGTGGTATTGAAGGTAGAATGCCCGAGGC	K
N14-HIS-REV	TAAGGCCTCGGGCATTCTACCTTCAATACCACCACC ATGGTGATGATGATGGTGATGATGGTGATGATGGT	K
N10HIS-Drs2-S*	CGTAAATCACTGAAATCTTCTGATCACGTGATTGGC TTTCATCGATGAATTCGAGCTCG	K
N10HIS-Drs2-AS*	CGTGTCGTCCTCCCCAGGTTTCCTCTTTGGGGGGGT TTCTCTGTCGTCATTTCTACCTTCAATACCACCACCA	K, S
N10HIS-Mdl1-S*	GGCGTCGCGTTTCGTTTAGGGCGCATCGAGCCGAGA CTTCATCGATGAATTCGAGCTCG	K, S
N10HIS-Mdl1-AS*	GGGCTTGGTGGACTTCTTTCTTTCGCGCAATGTCTGA TTGTCTACCTTCAATACCACCACCATGGTGATG	K, S
N10HIS-Rsb1-S*	CGACGTTGCCTAGTAGTTGTGGCAGCTCCGATAGTT GACATTCTCATCGATGAATTCGAGCTCG	K, S
N10HIS-Rsb1+28AS*	GGCAAAAGACTGCCTAACGTATTATTTGTTGCGTTGG ATCTACCTTCAATACCACCACCATGGTGATG	K, S
N10HIS-Yor1-S*	CGCTTCTATTTTCTCCCCACCGCGAGGCGGAAATG TCATCGATGAATTCGAGCTCG	K, S
N10HIS-Yor1-AS*	CCAGCTCCGTCTCCGAAACTGCATCCCCACGGTAA TCGTTCTACCTTCAATACCACCACCATGGTGATG	K, S
N10HIS-Pdr5-S*	CCTATTACAATAAACAATTAAGCCATACTCGCAACAA TTTGCCTCATCGATGAATTCGAGCTCG	K, S
N10HIS-Pdr5-AS*	CGTCGTTGACGTTATTGTTAAGCTTGGCCTCGGGCA TTCTACCTTCAATACCACC	K, S
PDR5+180AS	GAGCATCACTTTTGTGGGTGCCGATTGAG	S
Heukan2	GTCAAGACTGTCAAGGAGGG	S
CheckProm_pRK3	TTGGCAACTAGGAACTTTTCG	S

K= Klonierungsprimer; S=Sequenzierungsprimer;

*Homologie zur HIS-Klonierungskassette

Die folgende Tabelle B2 beinhaltet die Sequenzen der Oligonukleotide zur Mutagenese und Sequenzierung des ABC-Transporters Pdr5 auf der Basis des pRE5 Plasmids zur homologen Überexpression in *S. cerevisiae*.

Tabelle B2: Mutageneseprimer zur Erzeugung der PDR5 Mutationen

Bezeichnung	Mutation	Sequenz (5'→3')	Richtung
P195S_PDR5	P195S Walker A, NBD1	GCTAGTCGTTTTAGGTAGAT C AGGCTCTGGCAAAC	S*
		GTTTTGCCAGAGCCT G ATCTACCTAAAACGACTAGC	AS*
C199K_pdr5	C199K Walker A, NBD1	CGTTTTAGGTAGACCAGGCTCTGGC AAA ACTACTTT ATAAAAATCCATCTCTTC	S*
		GAAGAGATGGATTTTAATAAAGTAGTTTTGCCAGAGC CTGGTCTACCTAAAACG	AS*
P5CK_PDR5	P195S, C199K Walker A, NBD1	CGTAGTCGTTTTAGGTAGAT C AGGCTCTGGC AAA AC TACTTTATTAATAATCCATCTCTTC	S*
		GAAGAGATGGATTTTAATAAAGTAGTTTTGCCAGAGC CTG ATCTACCTAAAACGACTACG	AS*
N334E_PDR5	N334E Walker B, NBD1	GATCCAAATTTCAATGCTGGGAT G AAGCTACAAGGG GTTTGGATTC	S*
		GAATCCAAACCCCTTGTAGCT T CATCCCAGCATTGAA ATTTGGATC	AS*
Y367H_PDR5	Y367H H-loop, NBD1	CTGCCACAGTGGCCATC C ATCAATGTTCTCAAGATG	S*
		CATCTTGAGAACATT G ATGGATGGCCACTGTGGCAG	AS*
N1011S_PDR5	N1011S C-loop, NBD2	GTTGTTGGTGTGCTGGTGAAGGTTTAT C TGTTGAAC AAAGAAAAAGATTAACCATTG	S*
		CAATGGTTAATCTTTTTCTTTGTTCAAC A GATAAACCT TCACCAGCAACACCAACAAC	AS*
V1012G_PDR5	V1012G C-loop, NBD2	GTTGCTGGTGAAGGTTTAAAC G GTAACAAAGAAAA AGATTAACC	S*
		GGTTAATCTTTTTCTTTGTT C ACCGTTTAAACCTTCAC CAGCAAC	AS*
E1013G_PDR5	E1013G C-loop, NBD2	GTTGCTGGTGAAGGTTTAAACGTT G GTCAAAGAAAA GATTAACCATTGGTG	S*
		CACCAATGGTTAATCTTTTTCTTT G ACCAACGTTTAAA CCTTCACCAGCAAC	AS*
NVE_PDR5	N1011S, V1012G, E1013G C-loop, NBD2	CTGTTGTTGGTGTGCTGGTGAAGGTTTAT C CGGTG G ACAAAGAAAAAGATTAACCATTGGT	S*
		ACCAATGGTTAATCTTTTTCTTT G TCCACCGGATAAA CCTTCACCAGCAACACCAACAACAG	AS*
QA_PDR5	Q1068A NBD2	GGTCAAGCAATTCTATGTACTATTCAC G CACCCTCTG C	S*
		GCAGAGGGT G CGTGAATAGTACATAGAATTGCTTGA CC	AS*
HAQA_PDR5	H1068A, Q1069A H-loop, NBD2	GCAATTCTATGTACTATT G CCGCACCCTCTGC	S*
		GCAGAGGGT G CGGCAATAGTACATAGAATTGC	AS*
SF_PDR5	S1360F TMH 11, TMD2	GTGCAGCTAACTTAGCCT T CTTGTGTTTACAATGTC	S*
		GACATTGTAAACAACA G AAGGCTAAGTTAGCTGCA C	AS*

Die markierten Nukleotide entsprechen den mutierten Aminosäuren,
S*=Sense, AS*=Antisense,

Neben den bereits in den Tabellen gekennzeichneten Sequenzierungsprimern (S) wurden zur Verifizierung der Nukleotidsequenz des ABC-Transporters Pdr5 weitere Oligonukleotide verwendet. Diese sind in Tabelle B3 aufgelistet und dienen zur Überprüfung der Mutagenese und Klonierung auf Plasmidebene und/oder auch nach Rekombination in das Hefegenom durch Kolonie-PCR.

Tabelle B3: Zusätzliche Sequenzierungsprimer zur Verifizierung der Nukleotidsequenz des PDR5 Gens

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Richtung
RE1	TCGTATCCGCTCGTTCGAAAG	S*
RE2	CGGCACCCAACAAAAGTG	S*
RE3	GGTGCTTCCGCAGATGTC	S*
RE4	GCGGCTACTCAGGTGATG	S*
RE5	GTTGGTAACGACATCGTC	S*
RE6	CTACTATGGCCCCGCCGA	S*
RE7	GAAAGAAGTCGACCAACG	S*
RE8	GGGTAAGTGTAGTATGGC	S*
RE9	ATCATCGCTGTTTGCTTC	S*
RE10	CTACGTTGGTCTAAATGG	S*
RE11	GTTTCGGTATTGGTATGG	S*
RE12	GAGGAATCCGATACTTACG	S*
RE13	GGTCAATGGTATTCCTCCG	S*
RE14	TGGTGTTGCTGGTGAAGG	S*
RE15	ACTGTCTACTTTGGCGAC	S*
RE16	CGATAACTGCAGCTGAGG	S*
RE17	CCTATTCTACAACAATACC	S*
RE18	GTTGCATGAAAGGGGTGC	S*
RE19	GCGCTGATTACGAATTGC	S*
RE21	GTACCGATGAGATAACCTAGG	AS*
RE22	CGGATGGTGGTGTGAATTCTAGC	S*
RE23	CCATGGTGGTGGTATTGAAGGT	S*
RE24	GGTTCTCTCAGAGGGACTTGT	AS*
RE25	GTAGAAAGCTCGCTGAATTAAG	AS*

S*=Sense, AS*=Antisense,

1.6. Allgemeine Medien und Puffer

Medien zur Kultivierung von Bakterien- und Hefekulturen

Die verwendeten Medien, Lösungen und Additive zur Anzucht von Bakterien- und Hefekulturen wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren (20 min, 120°C) oder Filtrieren mit 0,45µm Filtern sterilisiert. Additive wie z.B. Glukose, Salze oder Antibiotika wurden separat sterilisiert und nach dem Autoklavieren des Mediums steril zugefügt. Die Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben auf ein Volumen von 1 Liter Medium.

E. coli

LB-Medium

10g Trypton/Pepton aus Casein
5g Hefeextrakt
10g Natriumchlorid

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

Sterile separate Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100mg/ml).

SOC-Medium

20g Trypton/Pepton
5g Hefeextrakt
0,5g NaCl
2,5mM KCl

Sterile separate Zugabe von 10mM MgCl₂ und 20mM steriler Glukose unmittelbar vor Gebrauch.

Puffer für Agarose - Gelelektrophorese

TAE-Puffer

40mM Tris-Acetat pH
1mM EDTA

10x Probenpuffer

40% (v/v) Glycerin
0,25% Xylencyanol
0,25% Bromphenolblau
in 10x TAE-Puffer

Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Trenngelpuffer

1,5M Tris-HCl pH 8,85
4g/l SDS

5x Probenpuffer

20% (v/v) Sammelgelpuffer
3,2% (w/v) SDS
0,02%(w/v) Bromphenolblau
40% (v/v) 98% Glycerin

Sammelgelpuffer

0,5M Tris-HCl pH 6,8
4g/l SDS

5x Probenpuffer für Membranproteine

5x Probenpuffer mit 6M Harnstoff

10x Laufpuffer

0,5M Tris-HCl pH 8,3
10g/l SDS
1,9M Glycin

5x Spezial-SDS Probenpuffer

5x Probenpuffer f. Membranproteine
1M Tris-HCl pH 8,0 und ddH₂O
im Verhältnis 1:1:3

Vor Gebrauch wurden die Probenpuffer mit reduzierenden Agentien wie DTT (20mM) oder β -Mercaptoethanol (143mM) versetzt.

Coomassie Färbelösung

40% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure
 0,25%(w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250

Entfärbelösung

40% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure

Fixierlösung für Silberfärbung

30% (v/v) Ethanol
 10% (v/v) Essigsäure

Thiosulfatpuffer

30% (v/v) Ethanol
 0,1M NaOAc pH 6,0
 1g/l Thiosulfat unmittelbar
vor Gebrauch hinzufügen

Silbernitratlösung

0,1% (w/v) AgNO₃
 0,25% (v/v) Formaldehyd (37%)
unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen

Entwicklerlösung

2,5% (w/v) Na₂CO₃
 0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)
frisch vor Gebrauch ansetzen

Puffer für Western Blot-Analysen

Transferpuffer (Blotpuffer)

10% (v/v) 10x Laufpuffer
 20% (v/v) Methanol

TBS- bzw. TBST-Puffer (Waschpuffer)

20mM Tris-HCl pH 8,0
 250mM NaCl
 bzw. incl. 0,1% (w/v) Tween® 20

Blockpuffer

3% (w/v) BSA oder 5 bzw. 7% (w/v) Milchpulver und 0,05% (v/v) NaN₃
 in TBST-Puffer

1.7. Geräte

Blot-Apparatur (<i>Trans-Blot SemiDry</i>)	BIO-RAD
Brutschränke	Heraeus/Bachofer
Chromatographiesysteme	
Äkta Prime Plus/Basic	GE Healthcare
FPLC System (P-500 pump/LCC-500 plus unit)	GE Healthcare
Crosslinker 1800	Stratalinker
Elektronenmikroskop	Zeiss
ELISA-Lesegerät Polarstar Galaxy	BMG Labtech
Fluoreszenzspektrometer Fluorolog II und III	Horiba
Fluoreszenzküvetten	Hellma
Gel-Elektrophoreseapparaturen (DNA und Protein)	Technische Werkstätten
	Universität Düsseldorf
Imager Chemi Genius ²	Syngene
Netzteil EPS 200 oder LKB EPS 500/400	GE Healthcare
Netzteil PowerPac HC	BioRad
pH-Meter	WTW
Photometer CO 8000	WPA Biowave
Schüttelinkubatoren	Infors
Szintillationszähler Beckman 3801	Beckman
Spectrophotometer NanoDrop-1000	Jasco
Thermocycler T-Personal	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
UV-VIS-Spektrometer Cary 50 Bio	Varian
Waagen	Kern/Sartorius
Zellaufschluss	
French Press + Zelle	Aminco
Zellaufschlussmaschine Basic Z System	Constant Systems
Bead-Beater	Biospec
Zentrifugen	
Beckman L-7 65	Beckman Coulter
Beckman L-7 65	Beckman Coulter
Eppendorf 5415C	Eppendorf
Eppendorf 5417R	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus
Sorvall Evolution RC	Thermo
Sorvall Discovery M120 SE	Thermo
Sorvall Discovery 90 SE	Thermo

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Kultivierung und Herstellung von *E. coli* und *S. cerevisiae* Stammkulturen

E. coli

Die Anzucht von *E. coli* Zellkulturen erfolgte in LB-Medium, dem zur Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz entweder Ampicillin (100µg/ml) zugesetzt war. Zum Animpfen der Medien wurden stets Einzelkolonien verwendet, die durch Ausstreichen der Zellkulturen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika und Inkubation bei 37°C über Nacht im Brutschrank erhalten wurden. Flüssigkulturen zur Plasmidisolierung wurden 12-16 Stunden bei 37°C und 220upm (Umdrehungen pro Minute) im Schüttelinkubator inkubiert. Bakterienkulturen auf Agarplatten wurden 2-4 Wochen bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung plasmidtragender Bakterien wurden Stammkulturen hergestellt. Dazu wurden stationäre Übernachtkulturen mit 50%igem sterilen Glycerin versetzt (Endkonzentration 15% (v/v)), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

S. cerevisiae

Einzelkolonien der *S. cerevisiae* Hefestämme wurden durch Ausstreichen der Hefezellkulturen auf YPD-Agarplatten, oder je nach Auxotrophie des verwendeten Stammes, auf -HIS bzw. -TRP Agarplatten erhalten. Dazu wurden die Platten 2-3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Nach einer maximalen Lagerungszeit von 1 Woche bei 4°C wurden die Kolonien neu auf Selektionsplatten ausgestrichen. Zur Kultivierung in Flüssigkulturen wurde ausschließlich YPD-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte dabei unter konstantem Schütteln bei 200 upm und routinemäßig bei einer Temperatur von 25°C oder 30°C. Zur Verbesserung der Sauerstoffzufuhr wurden Erlenmeyerkolben mit eingelassenen Schikanen verwendet, die maximal zu 2/5 befüllt wurden. Vorkulturen für mikrobiologische Analysen wurden mindestens 18 Stunden inkubiert. Entsprechend den Angaben zur Erzeugung von *E. coli* Stammkulturen wurden die so genannten *S. cerevisiae* Cryostocks aus

stationären Übernachtskulturen mit sterilem Glycerin auf 15% (v/v) eingestellt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2. Transformation von *E. coli* und *S. cerevisiae*

E. coli

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Stämme (siehe B1.4) verwendet. Die Zellen wurden entweder kommerziell erworben oder nach der RbCl₂-Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983) transformations-kompetent gemacht. Zellalliquote mit einem Volumen von 100µl wurden auf Eis für 10min aufgetaut und mit 10ng–1µg Plasmid DNA (maximal 10% (v/v) des Transformationsansatzes) versetzt und für 10-20min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen einem Hitzeschock von 60s bei 42°C oder 5min bei 37°C unterzogen und für 2min auf Eis inkubiert. Die Regeneration erfolgte durch Zugabe von 750µL SOC-Medium oder 1ml LB-Medium und konstantem Schütteln mit 180-200upm bei 37°C für 1 Stunde. Nach Sedimentieren der Zellen durch Zentrifugation (5min, 2500xg, RT) wurden die Zellen in 100µl LB-Medium bzw. im Rückfluss resuspendiert und auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

S. cerevisiae

Kompetente Hefezellen der *S. cerevisiae* Stämme ΔP und ΔPP (siehe B1.4) wurden stets frisch, maximal nach 3 Tagen Lagerung bei 4°C zur Transformation verwendet. Um kompetente Hefezellen zu erhalten, wurde eine 50ml YPD Kultur mit einer 3ml Übernachtskultur einer frischen Einzelkolonie des gewünschten Stammes auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Die Zellen wurden unter Schütteln (200upm) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8–1,0 angezogen und durch Zentrifugation (5min, 2500xg, 4°C) geerntet. Anschließend wurden die Hefezellen mit 20ml sterilem ddH₂O gewaschen und in 1ml LATE Puffer aufgenommen und alliquotiert (50µl/10OD₆₀₀). Zur Transformation wurden 8-10µg DNA (präzipitiert und getrocknet) mit einem Alliquot (50µl) kompetenter Zellen vermischt und vorsichtig mit 300µl PLATE-Puffer vermengt. Nach einer Inkubationszeit von 20min bei 30°C (ohne Schütteln!) erfolgte ein Hitzeschock von 20 min bei 42°C, wobei die Suspension alle 5 min durch

Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig durchmischt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 2500xg, RT) zur Regeneration in 1ml YPD-Medium resuspendiert und 1,5-2 Stunden bei 30°C leicht geschüttelt (180 upm). Darauf wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (5min, 2500xg, RT) im Rückfluss (50µl YPD) resuspendiert und auf –HIS Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden mindestens 3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert bis die Einzelkolonien der Transformanten gut sichtbar waren. Einzelkolonien wurden gepickt und erneut auf –HIS Platten ausgestrichen. Erst dann wurden die transformierten Zellen weiter kultiviert und analysiert (Abschnitt B 2.1.4).

2.1.3. DNA-Präparationen (Isolation, Restriktion, Ligation und Amplifikation)

Zur Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA, genomischer DNA oder DNA-Fragmenten wurden kommerziell erwerbliche Kits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel verwendet.

Plasmid-DNA wurde im *Mini* und *Midi*-Maßstab aus stationären 5ml bzw. 100ml Bakterienkulturen entsprechend der Produkthanleitung inklusive optionaler Waschschriffe präpariert. Die DNA wurde entweder in ddH₂O resuspendiert und direkt weiter aufgearbeitet oder in leicht gepufferten Lösungen (5-10mM Tris-HCl pH 8,0) bei -20°C gelagert. Analog wurde genomische DNA aus stationären Hefekulturen gewonnen und behandelt. Konzentration und Reinheit der präparierten DNA wurde spektrophotometrisch mit dem NanoDrop-1000 bestimmt. Die Absorptionskoeffizienten für reine DNA-Proben betragen $Abs_{280/260} = 1,8-2$ und $Abs_{280/260} < 1$.

Analytische und präparative Restriktionsansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers unter den empfohlenen Bedingungen (Konzentration, Additive, Temperatur) mit den vorgefertigten, enzymspezifischen Puffersystemen der Firmen NEB bzw. Fermentas angesetzt. Um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten wurden für präparative Zwecke die Reaktionsansätze über Nacht inkubiert. Bei analytischen Ansätzen betrug die Inkubationsdauer zwischen 1 bis 3 Stunden bei der enzymspezifischen optimalen Temperatur. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze durch Erhitzen inaktiviert und die DNA entweder über präparative Agarosegele oder mittels des QIAquick PCR Purification-Kits (Qiagen) aufgereinigt.

DNA-Proben wurden zur Analyse mittels Agarose - Gelelektrophorese zuvor im Verhältnis 1:10 mit 10x Probenpuffer versetzt. Je nach Fragmentgröße wurden zur Auftrennung 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer mit den entsprechenden Größenmarkern verwendet und die Fragmente bei 12V/cm aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Banden mit Ethidiumbromid (1µg/ml in TAE-Puffer) angefärbt und konnten auf diese Weise ggf. aus dem Gel extrahiert und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction -Kits (Qiagen) isoliert werden.

Zur Präzipitation von DNA-Proben wurden diese mit 1/10 Volumen 1M NaOAc (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen -20°C kaltem, absoluten Ethanol versetzt und mindestens 20min bei -80°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 20000xg, 4°C) sedimentiert, mit -20°C kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen und vollständig getrocknet. Zur Resuspension der getrockneten DNA wurde entweder ddH₂O oder 5-10mM Tris-HCl pH 8,0 verwendet.

Bei der Ligation von DNA-Molekülen durch die Verknüpfung der 3'-Hydroxylgruppe und dem 5'-Phosphatrest zur Phosphodiesterbindung wurde zur Katalyse die T4 DNA *Ligase* unter den enzyspezifischen Reaktionsbedingungen verwendet. Je nachdem welcher Klonierungsansatz verfolgt wurde, wurden die DNA-Moleküle zuvor entsprechend den Herstellerempfehlungen mit einer T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert oder mit einer Phosphatase dephosphoryliert. Letztere diente insbesondere zur Vorbeugung von möglichen Religationen bei geschnittenen Vektoren. Bei der Ligation von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten in einen geschnittenen Vektor wurden diese im Verhältnis 3:1 bzw. 10:1 eingesetzt und unter ATP Verbrauch, bei 4°C bzw. 16°C über Nacht inkubiert. Um eine definierte Orientierung eines Inserts im Vektor zu gewährleisten, wurden bei zuvor geschnittenen Ligationspartnern verschiedene Restriktionsenzyme verwendet bzw. Enzyme gewählt die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Die T4 *Ligase* wurde vor der weiteren Analyse bzw. Präparation durch Erhitzen des Ansatzes für 10min bei 65°C deaktiviert.

2.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR-Methode)

Die Amplifikation definierter DNA-Sequenzen zu analytischen und präparativen Zwecken wurde durch die Polymerase Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) erzielt. Dabei wurde die Insertion flankierender DNA-Sequenzen wie z.B. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und/oder Affinitätstags durch den Einsatz der *Phusion* DNA-Polymerase oder einer Enzymkombination aus *Taq* und *Pfu* DNA Polymerase (9:1) katalysiert. Diese minimieren durch ihre 3'-5'Exonuklease Aktivität die Fehlerquote zufälliger Mutationen. Zur Vervielfältigung großer DNA-Mengen für DNA Sequenzierungen oder zur Überprüfung von Klonierungsansätzen auf der Basis von ganzen Zellkolonien (Kolonie-PCR) wurde die *Taq* DNA Polymerase verwendet. Die Vorbereitung der DNA bei der Kolonie-PCR erfolgte durch Erhitzen der Zellkolonie in einer handelsüblichen Mikrowelle für 2,5min, bevor das Zellmaterial mit dem PCR Ansatz versetzt wurde. Die Insertion von Punktmutationen durch die PCR-Methode wurde mit Hilfe des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) in Anlehnung an die Angaben der Produkthanleitung durchgeführt. Grundsätzlich wurden die Bedingungen für die einzelnen Schritte der PCR in Abhängigkeit vom katalysierenden Enzym, den Charakteristika der eingesetzten Oligonukleotide (wie z.B. der Schmelzpunkt) und entsprechend der Größe der verwendeten DNA-Matrize gewählt. Routinemäßig wurden 30-35 Reaktionszyklen für die Vervielfältigung durchgeführt. Für Ligationsansätze und Transformationen wurden die Ansätze zum Verdau der parentalen DNA-Matrize mit dem Restriktionsenzym *DpnI* versetzt, welches lediglich methylierte DNA erkennt. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss über Agarose-Gelelektrophorese analysiert und ggf. zur weiteren Verwendung entsprechend aufgereinigt.

2.2. Klonierungsstrategien für die homologe Überexpression von Pdr5 und zur Reinigung verschiedener Proteine über Affinitätstags

Die Klonierungskassette zur homologen Überexpression und Reinigung über einen N-terminalen 14Histidin-Affinitätstag wurde auf der Basis des pRE2 Plasmids etabliert. Dazu wurde das Plasmid mit dem konstitutiven PDR5 Promotor und einem Histidin Auxotrophiemarkergen aus *Sz. pombe* (*his5+*) mit den Restriktionsenzymen *NsiI* und *PacI* geöffnet und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Die Sequenz für den entfernbaren 14Histidin-Affinitätstag wurde durch die Ligation mit den zuvor hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotiden N14-HIS-FWD und N14-HIS-Rev eingefügt. Das resultierende pRE3-14HIS Plasmid wurde nach der Sanger Didesoxy-Methode sequenziert (BMFZ, Düsseldorf).

Die Funktionalität der 14HIS-Klonierungskassette zur Überexpression und Reinigung wurde anhand der 5 verschiedenen Hefeproteine Pdr5, Yor1, Mdl1 Δ 59, Drs2 und Rsb1 untersucht. Dazu wurde die Kassette in einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert, die Homologien sowohl zur Kassette als auch zum Promotor und Gen des jeweiligen Proteins aufwiesen (siehe B1.5 Tabelle B1). Die Insertion der Kassette erfolgte im Anschluss durch Transformation des PCR Produktes in den speziellen *S. cerevisiae* Klonierungsstamm Δ P durch homologe Rekombination. Dieser Klonierungsstamm trägt das Allel für den mutierten Transkriptionsfaktor *PDR1-3* zur Gewährleistung der Überexpression durch den PDR5 Promotor. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Existenz eines Tryptophan-Auxotrophiemarkers anstelle des chromosomalen PDR5 Promotors, so dass eine Rekombination an unerwünschter Stelle verhindert wurde. Die korrekte Insertion der Kassette in das Hefegenom wurde über das Wachstum der Transformanden auf –HIS und –TRP Agarplatten (ausgenommen für die Klonierung von Pdr5) und mit Hilfe von Kolonien-PCR und DNA-Sequenzierungen verifiziert.

Der gezielte Austausch von Aminosäuren zu Mutagenesestudien in Pdr5 durch PCR wurde auf der Grundlage des pRE5 Plasmids mit Hilfe des QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt (siehe B1.5 Tabelle B2). Die Überprüfung der modifizierten DNA-Sequenz wurde durch Sequenzierungen mit den in B1.5 Tabelle B3 aufgeführten Primern vollzogen. Die Transformation in Hefezellen oblag wiederum dem Prinzip der homologen Rekombination. Dazu wurde das zu transformierende DNA-Fragment (sog. Knock-in Kasette), welches den Auxotrophiemarker *his5+*, den PDR5 Promotor, den 14Histidin-Affinitätstag und das modifizierte PDR5-Gen enthält durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Apal* und *SpeI* gewonnen. Die Transformation erfolgte jedoch bei dieser Klonierungsstrategie in den *S. cerevisiae* Klonierungsstamm Δ PP, welcher weder den PDR5 Promotor noch das PDR5 Gen enthält, jedoch einen Tryptophan-Auxotrophiemarker. Erfolgreich transformierte Zellen wuchsen auf –HIS aber nicht auf –TRP-Agarplatten. Die korrekte Insertion in das Genom wurde durch Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierungen bestätigt.

2.3. Gelelektrophorese und Proteindetektion

2.3.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford Methode (Bradford 1976) mit dem Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit von Bio-Rad bestimmt. Als Standard diente Serumalbumin vom Rind (bovine serum albumin, BSA) in unterschiedlichen Verdünnungsreihen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte spektrophotometrisch in 96well Platten mit Hilfe des ELISA-Lesegeräts bei 584nm.

2.3.2. SDS- Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde durch die Elektrophorese von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) diente dabei zur Entfaltung der Proteine und gleichmäßigen Maskierung der Proteinladung durch seine negative Ladung proportional zur Größe der Polypeptidketten. Die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld wurde durch den Molekularsiebeffekt abhängig von der Dichte des

Polyacrylamid-Netzwerks bestimmt. Dadurch wurden die Proteine im Sammelgel zunächst fokussiert und die optimale Auflösung der unterschiedlichen Größen im Trenngel durch den erhöhten Anteil des verwendeten Polyacrylamids erzielt. In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Komponenten und Volumina zur Herstellung der verschiedenen SDS-Gele dargestellt.

Tabelle B4: Zusammensetzung für Sammel- und Trenngel für 9 Gele

Komponente	Sammelgel	Trenngel		
		4.5%	7%	10%
(Bis-)Acrylamid-Lösung (30%) [®]	5.25 ml	17.5 ml	25 ml	37.5 ml
Sammelgelpuffer	5 ml			
Trenngelpuffer		18.75 ml	18.75 ml	18.75 ml
H ₂ O	28 ml	38.75 ml	31.25 ml	18.75 ml
APS	210 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl

Zuerst wurde das Trenngel gegossen, nachdem die Polymerisation durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Die Lösung wurde mit Isopropanol überschichtet, welches nach vollständiger Polymerisation entfernt wurde. Dann wurde das Sammelgel angesetzt. Nach Initiieren der Polymerisation wurden die Trenngele überschichtet und zügig zur Ausbildung von Auftragstaschen Platzhalter aus Teflon in die Sammelgele gesteckt.

Für Membranproteine wurde vor der Elektrophorese zur Denaturierung 5xProbenpuffer mit 6M Harnstoff verwendet und die Proben 10min bei 65°C inkubiert. Ganzzelllysate von *S. cerevisiae* wurden nach TCA-Fällung (B2.4.1) in Spezial-SDS Probenpuffer resuspendiert und 10min bei 65°C aufgekocht.

Die Proteinbanden wurden routinemäßig mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt, indem die Gele in Coomassie-Färbelösung mindestens 1 Stunde bei RT geschwenkt wurden. Die Entfernung von ungebundenem Farbstoff erfolgte durch wiederholtes Schwenken des Gels in Entfärbelösung bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes.

Die 10-100fach sensitivere Silberfärbung wurde angewendet, um geringe Proteinmengen sichtbar zu machen. Dazu wurden die Gele nahezu vollständig entfärbt und zunächst 15 min in Fixierlösung und 15min in Thiosulfatpuffer inkubiert.

Die Gele wurden 4x für 5min mit ddH₂O gewässert und für 25min in Silbernitratlösung geschwenkt. Nach zwei kurzen Waschschritten (1x ddH₂O, 1x Entwicklerlösung) wurden die Gele in Entwicklerlösung zur Reduktion der Silberionen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eisessig (1-2ml) gestoppt sobald die Proteinbanden eindeutig sichtbar waren. Die Dokumentation erfolgte durch Einscannen der Gele.

2.3.3. Western Blot Analyse (Immunodetektion)

Die Western Blot Methode diente dem immunochemischen Nachweis der Proteine nach Auftrennung über eine SDS-PAGE. Sogleich nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden nach dem Halbtrockenverfahren (*semi-dry-method*) von dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden 6 Lagen Whatman Filterpapier, das Polyacrylamid Gel, sowie die mit Methanol aktivierte Membran in Transferpuffer (Blotpuffer) getränkt. Die Membran und das Gel wurden zwischen drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei in der Blotapparatur übereinander gelegt, so dass nach Anlegen eines konstanten Stromes (0,1A pro Blot, 1h15min) die Proteine zur Anode wanderten und auf der hydrophoben Membran immobilisiert wurden. Um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation (mindestens 30min) in Blockpuffer mit 3% (w/v) BSA oder 5% (w/v) Milchpulver abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Erst-Antikörper/Antiserum inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Erst-Antikörper folgten mehrere Waschschriffe von 5min mit TBS bzw. TBST-Puffer (je nach Antikörper), bevor die Membran mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper inkubiert (45-60min) werden konnte. Dabei wurden HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Zwei-Antikörper verwendet, welche die vom Erst-Antikörper markierten Proteinbanden identifizierten. Nach mehrmaligem Waschen für 5min der Membran wurde die Detektion der Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Advanced Kits (GE Healthcare) durchgeführt. Die Bedingungen für die verwendeten Nachweise sind in Tabelle B5 aufgelistet.

Tabelle B5: Verwendete Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen

Antikörper	Organismus	Verdünnung		Waschschritte
α -Pdr5	Kaninchen	1:20000	TBST 3% BSA	3x TBST
α -Drs2	Kaninchen	1:5000	TBST 3% BSA	3x TBST
α -Mdl1	Kaninchen	1:500	TBST 2% Milchpulver	3x TBST
α -HIS	Maus	1:1000	TBS 3% BSA	2xTBST, 1xTBS
α -Kaninchen-HRP	Ziege	1:10000	TBST	2xTBST, 1xTBS
α -Maus-HRP	Ziege	1:20000	TBS 10% Milchpulver	4x 10min TBST

2.4. Proteinüberexpression und Reinigung

2.4.1. Ganzzelllysate

Die Proteinexpression in *S. cerevisiae* Zellen nach erfolgreicher Klonierung und Transformation wurde in Ganzzelllysaten untersucht. Dazu wurden 5ml YPD-Vorkulturen mit frischen Einzelkolonien der zuvor gepickten und vereinzelt Transformatanten angeimpft und über Nacht bei 200rpm und 30°C geschüttelt. Am Folgetag wurden aus den Vorkulturen 3ml YPD-Flüssigkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 1) angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert und mit YEX-Puffer (1,85M NaOH; 7,5% (v/v) β -Mercaptoethanol) lysiert (10min, 4°C). Im Anschluss wurden die Proteine mit 50% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) gefällt (10min, 4°C) und abzentrifugiert (10min, 20000xg, 4°C). Zur Analyse mittels SDS-PAGE (B2.3.2) und Western Blot (B2.3.3) wurden die Pellets zunächst mit -20°C kaltem Aceton gewaschen bevor sie in 5x Spezial SDS Probenpuffer resuspendiert wurden. Für die Analysen wurden OD₆₀₀ Aliquote zwischen 0,5 und 0,9 verwendet.

2.4.2. Präparation von Gesamtmembranen zur Reinigung

Präparative Zellmengen für die chromatographische Aufreinigung der Hefeproteine wurden in 4-6l Expressionskulturen angezogen. Dabei wurden 2l YPD-Medium in 5l Schikanekolben mit einer frischen Vorkultur auf eine Start OD_{600} von 0,05 (≥ 16 h bei 25°C) bzw. 0,2 (≥ 8 h bei 30°C) angeimpft und bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase $OD_{600}=2,5$ kultiviert. Die Zellen wurden zur Ernte zentrifugiert (15min, $8000\times g$, 4°C), mit Puffer A (50mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM NaCl; 10%(w/v) Glyzerin) oder ddH_2O gewaschen und konnten bei -20°C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Isolierung der Hefemembranen wurden bei 4°C durchgeführt, um den Abbau der Proteine zu minimieren.

Zur Präparation von Gesamthefemembranen wurde die Zellaufschlussmaschine Basic Z verwendet. Dazu wurden die aufgetauten Hefezellen vor dem Aufschluss mit eiskaltem Puffer A (15ml pro Liter Zellkultur) resuspendiert und die Zellen in zwei Durchgängen mit 2,7 kbar aufgebrochen. Zellkerne und restliche Zelltrümmer wurden in zwei Zentrifugationsschritten à 10min mit $5000\times g$ (4°C) abgetrennt. Die Gesamtmembranen wurden im Anschluss aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation bei $180000\times g$ (75min, 4°C) sedimentiert. Zur Aufnahme der Membranen wurden 5ml Puffer A pro Liter Zellkultur verwendet und die Proteinkonzentration wie unter Abschnitt B2.3.1 beschrieben zur weiteren Vorbereitung für die Proteinaufreinigung bestimmt.

2.4.3. Präparation von Plasmamembranen zur Reinigung

Die Präparation von Plasmamembranen wurde in Anlehnung an das Protokoll von L. Serrano (147) nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation aus 4-6l Zellkulturen (10-30g) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C . Die aufgetauten Zellen wurden mit ddH_2O gewaschen, resuspendiert und bis zu einem Volumen von 84ml mit ddH_2O aufgefüllt. Die Suspension wurde dann unter konstantem Rühren mit 5ml 1M Tris-HCl pH 8,0 und 1ml 0,5M EDTA versetzt. Zum Aufbrechen der Zellen wurde die Suspension in einem Beadbeater mit 200-300ml Glas-Beads und Proteaseinhibitoren heftig durchmischt. Der physikalische Aufschluss erfolgte in 5 Durchgängen á 1min mit entsprechenden Pausenschritten (1min). Die Glas-Beads wurden mit Hilfe einer Glasfritte abgetrennt und zweimal mit 90ml TEG-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7,8; 0,2mM EDTA; 20% (w/v) Glyzerin)

nachgewaschen. Die vollständige Abtrennung der Zellkerne- und trümmer erfolgte in zwei 10minütigen Zentrifugationsschritten bei 700xg (4°C). Die Plasmamembranen konnten dann aus dem Überstand durch Zentrifugation bei 20000xg (20min, 4°C) gewonnen werden. Nach Resuspendieren der Membranen in 2ml Puffer A pro Liter Kultur wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (B2.3.1) bestimmt und die Suspension bis zur anschließenden Aufreinigung auf Eiswasser gelagert.

2.4.4. Präparation von ER-Mikrosomen zur Reinigung

Die Isolation von ER-Mikrosomen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Fischl und Carman (148) in Kombination mit dem Serrano Protokoll (147) zur Plasmamembranisolierung. Hefezellen aus 6-8l (30-50g) Expressionskulturen wurden aufgetaut und mit 12ml Lysispuffer (TES-Puffer: 50mM Tris-HCl pH 7,8; 1mM EDTA; 0,3M Sucrose; 10mM β -Mercaptoethanol) pro Liter Zellkultur gewaschen. Die Zellen wurden in 50ml TES-Puffer resuspendiert. Zum Aufschluss wurde der Bead-Beater mit 200-300ml Glasbeads und Proteaseinhibitortabletten eingesetzt (5x 1min mit entsprechender Pause). Nach dem Abtrennen der Glas-Beads wurde mit 50ml TES-Puffer nachgewaschen und die Zelltrümmer durch zwei Zentrifugationsschritte für 10min bei 1500xg (4°C) abgetrennt. Im Anschluss wurde die Suspension 10min bei 27000xg (4°C) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert und auf Eis gestellt. Die Pellets wurden mit 100ml TES-Puffer gewaschen (10min, 27000xg, 4°C) und verworfen, die vereinten Überstände dienten zur Sedimentation der Mikrosomen durch Zentrifugation (75min, 180000xg, 4°C). Die Aufnahme der Membranen zur weiteren Aufreinigung erfolgte in 15ml Puffer A mit 15mM β -Mercaptoethanol. Die Konzentration wurde entsprechend bestimmt (B2.3.1).

2.4.5. Anreicherung von Golgi-Membranen zur Reinigung

Um Proteine besser isolieren zu können, die in den Sekretionsvesikeln des Golgi-Apparates lokalisiert sind, wurde das Protokoll nach Serrano mit der Methode zur Präparation von Gesamtmembranen kombiniert. Hefezellen aus 6-8l Expressionskulturen wurden entsprechend dem modifizierten Protokoll nach Serrano (siehe B2.4.3) aufgeschlossen und bis zum Sedimentationsschritt der Plasmamembranen bei 20000xg (20min, 4°C) präpariert. Anstelle der Membranen wurde nun der Überstand weiter verarbeitet und dazu vollständig durch Dekantieren

abgenommen. Im Anschluss wurden die Membranen wie bereits für die Präparation von Gesamtmembranen beschrieben (B2.4.2) aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation gewonnen (75min, 180000xg, 4°C) und in 2ml Puffer A pro Liter Kultur resuspendiert. Die weitere Vorbereitung der Proteinproben zur Aufreinigung erfolgte analog den Präparationen aus Plasmamembranen oder Mikrosomen (B2.4.4).

2.4.6. Präparation angereicherter Plasmamembranen

Neben der klassischen Proteinanalyse über die chromatographische Aufreinigung diente die Präparation stark angereicherter Plasmamembran Präparationen auch als Grundlage für verschiedene Methoden zur Aktivitätsbestimmung des ABC-Transporters Pdr5. Die Kombination der Protokolle nach L. Serrano und A. Goffeau zur Plasmamembran Präparation ermöglichte ein Verfahren um hochhomogene Plasmamembranen zu erhalten. Dazu wurden die Hefezellen statt durch Zusatz von Tris-HCl pH 8,0 in einem Puffer aus Tris-Acetat pH 7,5 und EDTA gemäß dem Verfahren nach Serrano aufgeschlossen (B2.4.3). Zum Nachwaschen der Glas-Beads wurde dementsprechend TAE-G-Puffer (10mM Tris-Acetat pH7,5; 0,2mM EDTA, 20% (w/v) Glyzerin) verwendet. Die Suspension wurde anschließend in zwei Zentrifugationsschritten á 5min bei 1000xg (4°C) und einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 3000xg (5min, 4°C) von Zellkernen und Zelltrümmern befreit. Die Plasmamembranen wurden in einem 40minütigen Zentrifugationsschritt bei 20000xg (4°C) sedimentiert und in 4ml TAE-Puffer (10mM Tris-Acetat pH 7,5; 0,2mM EDTA) pro Liter Zellkultur resuspendiert. Nach Bestimmung und Einstellen der Konzentration (B2.3.1) auf 5mg/ml wurde zusätzlich ein leicht abgewandeltes Verfahren zur Abtrennung der Mitochondrien nach A.Goffeau angewendet. Eine drastische pH-Senkung auf pH 5,2 durch Zugabe weniger ml des Puffer B (1M Tris-Acetat pH 5,2) unter konstantem Rühren, erlaubte die Sedimentation der Mitochondrien durch Zentrifugation (5min, 6900xg, 4°C). Direkt im Anschluss wurde der Überstand durch Zusatz von Puffer C (2,5M Tris-Acetat pH 7,5) wieder auf den neutralen pH 7,5 eingestellt und die stark angereicherten Plasmamembranen konnten nun aus dem Überstand durch Zentrifugation (30min, 26500xg, 4°C) gewonnen werden. Die angereicherten Plasmamembranen wurden in 1ml 50mM Hepes pH 7,0 (mit Proteaseinhibitor) pro

Liter Zellkultur resuspendiert und die Proteinkonzentration gemäß B2.3.1 bestimmt. Für spätere Aktivitätsbestimmungen wurden die Membranen auf eine Konzentration von ungefähr 1mg/ml eingestellt und aliquotiert. Zur Lagerung bei -80°C wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.7. Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Zur Reinigung der Hefeproteine über den N-terminalen 14Histidin-Affinitätstag (IMAC) wurden die Proteine nach der jeweiligen Membranpräparation mit einem Detergenz solubilisiert. Dazu wurden die Membransuspensionen (Abschnitt B2.4.2 - 2.4.6 in Puffer A) zunächst homogenisiert und auf eine Konzentration von 10mg/ml eingestellt. Die Solubilisation erfolgte unter konstantem Rühren der Suspension für 1 Stunde bei 4°C nach Zusatz des Detergenz im Massenverhältnis 1:1 (Protein:Detergenz). Im Anschluss wurden die nicht-solubilierten Proteine durch Ultrazentrifugation (45min-1h, 180000xg, 4°C) abgetrennt und der Überstand mit der solubilierten Proteinfraction zur Reinigung verwendet. Für die Reinigungen wurden mit Zn²⁺-Ionen beladene HiTrapChelating Säulen (1ml) eingesetzt, die zunächst mit Low-Histidin-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,8; 500mM NaCl; 2,5mM L-Histidin, 0,05% bzw. 0,1% Detergenz) bei einem Fluss von 2ml/min equilibriert wurden. Die solubilierte Proteinfraction wurde mit einem Fluss von 0,6ml/min auf die Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Hilfe eines Stufengradienten durch unterschiedliche Mischverhältnisse von Low- und High-Histidin-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,8; 500mM NaCl; 100mM L-Histidin; 0,05% bzw. 0,1% Detergenz) mit einem Fluss von 1-2ml/min gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Fluss von 1ml/min durch einen signifikant erhöhten Anteil des High-Histidin-Puffers (50% (v/v) High-Histidin-Puffer, 51,25mM L-Histidin). Die einzelnen Fraktionen wurden mit 4mM TCEP und 20mM DTT versetzt und die Reinigung mit Hilfe der SDS-PAGE Analysemethoden (2.3.2, 2.3.3) untersucht.

Für eine anschließende Gelfiltration wurden die Elutionsfraktionen vereint und mittels Amicon Ultrafiltrationseinheiten (100kDA und 30kDA MWCO) aufkonzentriert.

Die Größenausschlusschromatographie wurde für die Hefeproteine mit einer Säule des Typs HR 10/30 Superose 6 (GE Healthcare) durchgeführt. Die Säule wurde dazu vor dem Beladen mit 2,5 Säulenvolumen Puffer A + variierende % (w/v)

Anteile Detergenz equilibriert. Der Fluss zum Beladen und zur Auftrennung der Proteine betrug zwischen 0,2 und 0,25 ml/min. Die Analyse erfolgte entsprechend den Angaben zur Aufreinigung mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC).

2.6. Elektronenmikroskopie

Angereicherte Plasmamembranen wurden elektronenmikroskopisch auf den Zustand der Membranen untersucht. Dazu wurde ein Aliquot einer 1mg/ml Plasmamembran Präparation in 50mM Hepes pH 7,0 in unterschiedlichen Verhältnissen verdünnt (1:100 – 1:10000). Ni 75 Pioloform beschichtete Grids mit einem Durchmesser von 3,05 mm wurden zur Vorbereitung mit wenigen μ l 50mM Hepes pH 7.0 vorbehandelt und dann mit 2 μ l der Verdünnungen betropft. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit auf Filterpapier wurde wiederum 2x mit Wasser nachgewaschen. Zur Negativfärbung der Membranen wurden die Grids optional mit Uranylacetat betropft. Die eingetrockneten Membranen wurden im Anschluss mit einem Zeiss Elektronenmikroskop bei unterschiedlichen Vergrößerungen analysiert und fotografiert.

2.7. Mikrobiologische und biophysikalische Methoden zur Aktivitätsbestimmung

2.6.1. Resistenztest auf Agarplatten und in Flüssigkulturen

In Wachstumsstudien auf toxischen YPD-Agarplatten und in Flüssigkulturen wurde das Resistenzverhalten des Multidrogentransporters Pdr5 aus *S. cerevisiae* und seiner genetisch modifizierten Varianten gegenüber verschiedenen Substanzen untersucht. 3ml YPD-Kulturen wurden mit Übernachtskulturen aus frischen Einzelkolonien der verschiedenen Stämme auf eine Start OD_{600} von 0,3 angeimpft und bis zur logarithmischen Phase ($OD_{600} = 1$) kultiviert.

Für den Resistenztest auf Agarplatten wurden die zu untersuchenden Substanzen aus entsprechenden Stammkulturen in 50ml YPD-Agar auf die gewünschte Konzentration eingestellt und blasenfrei gleichmäßig auf 2 Petrischalen

verteilt. Nach dem vollständigen Aushärten wurden jeweils 5µl der 1:5 verdünnten Hefekulturen ($OD_{600}=0,2$) auf die Platten getropft. Gegebenenfalls wurden auch Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:5; 1:50 und 1:500 untersucht. Im Anschluss wurden die Platten 2-3 Tage im 30°C Brutschrank inkubiert und die Qualität des Zellwachstums für die einzelnen Ansätze dokumentiert.

Die quantitative Analyse der vermittelten Drogenresistenz erfolgte in 250µl Flüssigkulturen in sterilen 96well Platten. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Stammlösungen der verschiedenen Substanzen sequenzielle Verdünnungsreihen mit sterilem ddH₂O (u.U. mit Ethanol) angesetzt. Jeweils 180µl YPD-Medium pro well wurden mit 20µl der jeweiligen Verdünnungsreihen versetzt und mit 50µl einer 1:4 Verdünnung der entsprechenden Hefekulturen (Start $OD_{600}=0,05$) angeimpft. Die Platten wurden 48 Stunden bei 30°C inkubiert und die Zelldichte photometrisch mit Hilfe des ELISA Lesegeräts bestimmt. Anschließend wurden die erhaltenen Daten graphisch gegen die Endkonzentration der untersuchten Substanzen aufgetragen und ausgewertet.

Die Stammlösungen der Substanzen wurden abhängig von der Löslichkeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln angesetzt: Cycloheximid (CHX), Ketoconazol (KTC) und Fluconazol (FLC) in DMSO; FK506 und die Rhodamine 123 bzw. 6G in Ethanol. Dabei wurde gewährleistet, dass die eingesetzten Konzentrationen der Lösungsmittel DMSO und Ethanol keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hatten.

2.6.2. Fluoreszenzbasierte Transportmessungen mit ganzen Hefezellen

Ganze Hefezellen der unterschiedlichen Pdr5 Hefestämme wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs R6G auf ihre Exporteffizienz untersucht. Analog zu den Beschreibungen unter B2.6.1 wurden die Hefekulturen bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. 1 OD_{600} Äquivalente der verschiedenen Zellkulturen wurden durch Zentrifugation (30s, 20000xg, 4°C) geerntet und 4x mit ddH₂O gewaschen. Die Suspensionen wurden mit 400µl De-Energetisierungspuffer (50mM HEPES pH 7,0; 5mM 2-Deoxyglukose, 5µM R6G und optional 25µM FK506) resuspendiert und 2 Stunden bei RT (25°C) im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Die beladenen Zellen wurden anschließend zweimal mit 50mM HEPES pH 7,0 gewaschen und in 1ml aufgenommen. Jeweils 2 Messungen pro Ansatz konnten

durchgeführt werden. Dazu wurde 480µl im Verhältnis 1:1 mit 50mM Hepes 7,0 verdünnt und die Intensität der Fluoreszenz mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers Fluorolog II bzw. III (Horiba) in einer Fluoreszenzküvette bei 30°C vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 529nm bei einer Spaltbreite von 1nm und die Emission wurde bei 553nm und einer Spaltbreite von 2nm detektiert. Durch die Zugabe von 20mM Glukose wurde der R6G Efflux initiiert und die Fluoreszenz detektiert. Die zweite Messung diente zur Negativkontrolle, bei der die Probe anstelle von Glukose mit ddH₂O versetzt wurde.

Bei allen Zentrifugationsschritten wurden die Überstände stets auf ein konstantes Restvolumen von 100µl abgenommen, um identische Zellmengen für die einzelnen Ansätze zu garantieren. Zur Auswertung wurden die Rohdaten normiert und mit Hilfe der GraphPad software ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.6.3. Radioaktive Transportmessungen mit ganzen Hefezellen

In Anlehnung an den fluoreszenzbasierten R6G Transport in lebenden Zellen wurde auf der Basis von Tritium markiertem FK506 die Funktionalität der Substanz an sich als auch die der Pdr5 Hefestämme untersucht. Identische Zellmengen (8OD₆₀₀ Äquivalente) in der exponentiellen Wachstumsphase wurden wie unter (B2.6.1) beschrieben geerntet und 4x mit ddH₂O gewaschen. Die Zellen wurden als 5%ige Zellsuspensionen mit YP2D-Medium (5mM 2-Deoxyglukose in YP-Medium), welches unterschiedliche Mengen Tritium markiertes und nicht-markiertes FK506 (1:250) enthielt, resuspendiert und 2 Stunden bei 30°C de-energetisiert. Die gesättigten Zellen wurden 4x mit YP2D-Medium gewaschen (30s, 20000xg, 4°C) und ein Drittel der in YP2D resuspendierten Proben zur internen Kontrolle mit 2ml Szintillationslösung (Perkin Elmer) versetzt und mit dem Beckman Szintillationszähler LS 3801 vermessen. Die restlichen zwei Drittel wurden nach Zentrifugation in YP-Medium resuspendiert und in zwei Ansätze aufgeteilt. Parallel wurde ein Ansatz mit 20mM Glukose und der andere als Negativkontrolle mit 5mM 2-Deoxyglukose versetzt. Die Ansätze wurden bei 35°C unter Schütteln für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und die Radioaktivität in Überstand und Zellpellet mit Hilfe des Szintillationszählers analog zur internen Kontrolle mit Szintillationslösung versetzt und vermessen. Optional wurden nach dem viermaligen Waschen der Proben mit YP2D-Medium, die verwendeten Medien der nachfolgenden Schritte zusätzlich mit nicht-markiertem

FK506 (100 μ M) versetzt. Die graphische Auswertung der Daten erfolgte nach Normierung über die interne Kontrolle mit Hilfe der GraphPad software.

2.6.4. Rhodamin 6G Transport in angereicherten Plasmamembranen

Zur Analyse des aktiven R6G Transports der Pdr5 Varianten wurden hochhomogene Plasmamembranen wie unter B2.4.6 beschrieben präpariert. Die energetisch bedingte Auslöschung der R6G Fluoreszenz durch den transportbedingten Anstieg der R6G Konzentration wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers (Fluorolog II bzw. III, Geräteeinstellung siehe 2.6.2) detektiert. Dazu wurden in einer Fluoreszenzküvette 20 μ g der isolierten Plasmamembranen in 1ml Transportpuffer (50mM Hepes 7,0, 10mM MgCl₂, 10mM NaN₃ und 0-450nM R6G) aufgenommen und bei 35°C mit Hilfe einer Rührereinheit vermischt. Nach Einstellen eines konstanten Fluoreszenzsignals wurde der aktive Transport von R6G durch Zugabe von 50 μ l einer 0,2M ATP-Lösung (pH 7-8) gestartet. Optional wurden weitere Nukleotide in unterschiedlichen Konzentrationen zur Energetisierung des R6G Transports untersucht. Der Abbruch der Transportreaktion wurde durch die Zugabe geeigneter Inhibitoren wie EDTA, Oligomycin oder FK506 erzielt. Für Inhibitionsstudien wurde dem Transportpuffer in variierenden Konzentrationen vor der Initiierung der Reaktion durch ATP zugesetzt. Die graphische Analyse der Fluoreszenzdaten erfolgte mit Hilfe der GraphPad software. Parallel dazu wurde der aktive Transport in Mikrotiterplatten vermessen. Dabei wurden die Volumina der Reaktionspuffer als auch die eingesetzte Protein- sowie ATP-Konzentration entsprechend angepasst. Die Messung erfolgte mit Hilfe des ELISA Lesegerätes bei einer Anregungswellenlänge von 530nm und zur Detektion der Emission wurde ein Filter mit 570nm verwendet. Die Messungen wurden bei 35°C durchgeführt.

Die kinetische Auswertung der Transportdaten wurde nach Michaelis Menten gemäß Gleichung (1) über die Michaelis Menten Konstante K_m durchgeführt.

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot c_{R6G}}{(K_m + c_{R6G})} \quad (1)$$

Die Transportrate Y ergab sich aus der Steigung des linearen Bereichs des gemessenen, gequenchten R6G Fluoreszenzsignals gegen die Zeit, in Abhängigkeit

von der verwendeten R6G Konzentration c_{R6G} im Transportpuffer. B_{max} repräsentiert demzufolge die maximale Transportrate bei unendlich hoher R6G Konzentration.

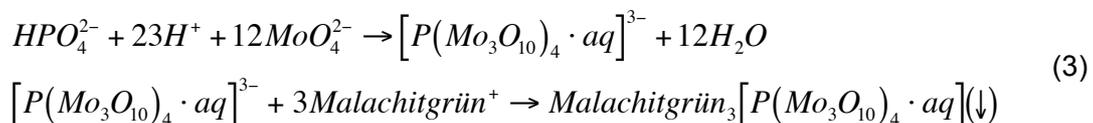
Der IC_{50} Wert, d.h. die Konzentration des Inhibitors bei 50%iger Inhibition des R6G Transports wurde nach der nicht-linearen Regression gemäß Gleichung (2) berechnet.

$$Y = B_{min} + \frac{(B_{max} - B_{min})}{\left(1 + 10^{([\text{Inhibitor}] - \log IC_{50})}\right)} \quad (2)$$

Die Variablen entsprechen den gleichen Größen, wie bereits für Gleichung (1) beschrieben. Dabei steht [Inhibitor] für die verwendete Inhibitorkonzentration und B_{min} entspricht der Transportrate bei unendlich kleiner Inhibitorkonzentration.

2.6.5. ATPase Aktivitätsmessungen

Die Hydrolyseaktivität eines Proteins nach der chromatographischen Aufreinigung oder in hochhomogenen Plasmamembranen wurde mit Hilfe der Malachitfärbereaktion über die im Zuge der Hydrolyse freigesetzte Phosphatmenge bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der Reaktionsansatz (25µl) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 30°C durch die Zugabe von 175µl eiskalter, verdünnter Schwefelsäure (1x 20mM bzw. 2x 40mM H_2SO_4) gestoppt. Bei der anschließenden Zugabe der Färbelösung (50µl) wurde das freigesetzte anorganische Phosphat in der Färbereaktion mit dem Ammoniummolybdat komplexiert und dem Malachitgrün für die photometrische Bestimmung gefällt (3).



Die Färbelösung wurde dabei stets frisch aus dem Konzentrat (0,122% (w/v) Malachitgrün, 20% (v/v) H_2SO_4) der Ammoniummolybdat-Lösung (7,5% (w/v)) und der Tween20-Lösung (11% (v/v)), im Verhältnis 50:12,5:1 angesetzt. Die Messung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Bei chromatographisch aufgereinigten Proteinproben setzte sich der Ansatz aus 10µl der Proteinprobe (10 – 450µg/ml), 10µl des entsprechenden Elutionspuffers mit 0,05%-0,1% (w/v) Detergenz (ggf. 0,5mg/ml Asolectin und/oder 10mM NaN_3) und

5µl ATP/Mg²⁺ (10mM/25mM) zum Starten der Reaktion zusammen. Alternativ wurde auch AMP anstelle von ATP zur Analyse verwendet. Zum Stoppen der Reaktionsansätze nach der gewünschten Inkubationszeit bei 30°C wurde eiskalte 1x Stopplösung (20mM H₂SO₄) verwendet.

Die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität in angereicherten Plasmamembran Präparationen wurde mit Hilfe des Pdr5 spezifischen Inhibitors Oligomyzin über die Differenz der gemessenen ATPase Aktivität in Abwesenheit und der in Anwesenheit von Oligomyzin (20µg/ml) bestimmt. Demzufolge wurden stets zwei Reaktionsansätze à 25µl vermessen. Dabei wurden pro Reaktionsansatz 10µl eines Puffersystems aus 750mM MES-Tris oder Tris-Glyzin mit pH Werten zwischen 4 und 12 verwendet. Die zu untersuchende Probe wurde in Form von 10µl eines Plasmamembran/Inhibitor-Mix mit einer Proteinkonzentration von 5-10µg/ml eingesetzt. Der Mix setzte sich neben der Plasmamembran Präparation aus 125mM KNO₃, 25mM NaN₃, 0,5mM Ammoniummolybdat zur Inhibition von Fremdproteinen und 25mM MgCl₂ zusammen. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5µl ATP (20mM) oder einem ATP/Oligomyzin-Mix.

Um den Effekt verschiedener Substanzen auf die Oligomyzin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 zu untersuchen, wurden 5µl des 2fach konzentrierten Protein/Inhibitor-Mix verwendet und dementsprechend 5µl der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Optional wurden auch andere Nukleotide wie CTP, GTP und UTP genutzt, um die Aktivität des Transporters zu untersuchen. Bei der Analyse der Plasmamembran Präparationen wurde aufgrund des starken Puffersystems stets 2x Stopplösung (40mM H₂SO₄) verwendet.

Die Messung der freigesetzten Phosphatmenge erfolgte nach der Färbung und einer Inkubationszeit von 15min bei RT mit Hilfe des ELISA Lesegerätes durch die Absorption bei 620nm. Als Standardreihe dienten wässrige NaH₂PO₄-Lösungen mit 0-0,192µmol/ml anorganischem Phosphat. Hintergrundsignale durch z.B. Phosphatkontaminationen im Puffer oder Lösungsmittel wurden durch entsprechende Kontrollansätze ohne Protein bzw. mit EDTA durchgeführt.

Die Kinetik in Abhängigkeit von der Nukleotidkonzentration wurde mit Hilfe der GraphPad software über nicht-lineare Regression nach Michaelis und Menten ermittelt (4).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_{NTP}}{(K_m + c_{NTP})} \quad (4)$$

Dabei steht v für die spezifische ATPase Aktivität in nmol/min*mg bei der verwendeten Nukleotidkonzentration c_{NTP} . v_{max} steht dementsprechend für die maximale spezifische Aktivität bei unendlich hoher NTP Konzentration. Der inhibierende Effekt (K_i) verschiedener Substanzen auf die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 und entsprechenden Varianten wurde in Anlehnung an das *steady state* Kinetikmodell für P-gp gemäß Gleichung (5) mit Hilfe der GraphPad software über nicht-lineare Regression berechnet.

$$v = 100 \cdot \left(\frac{1 - [\text{Inhibitor}]}{K_i + [\text{Inhibitor}]} \right) \quad (5)$$

Dabei entspricht K_i der Inhibitorkonzentration, die zu einer 50%igen Inhibition der basalen ATPase Aktivität führt. $[\text{Inhibitor}]$ steht für die unterschiedlichen Konzentrationen der inhibierenden Substanzen, die zur Bestimmung des K_i – Wertes verwendet wurden.

2.6.6. Bindungsstudien mit radioaktiv markierten 8-Azido-ATP

Die Bindung von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ an Pdr5 und PDR5-Varianten wurde mit Hilfe hochhomogener Plasmamembran Präparationen (B2.4.6) untersucht. In einem Gesamtvolumen von 30 μl wurden 2,5 μg der isolierten Plasmamembran Präparationen in Reaktionspuffer (50mM Hepes pH 7,0; 10mM NaN_3 ; 50mM KNO_3 ; 0,2mM Ammoniummolybdat und 10mM MgCl_2) aufgenommen und mit 2-10 μM $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ versetzt, 10min auf Eis inkubiert. Die Photoaktivierung (Cross-linken) des Azido ATPs zur Bindung an das Protein erfolgte im Anschluss durch Bestrahlung mit UV Licht (254nm, 5cm) für 8min (Stratalinker 1800 Crosslinker). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μM DTT gestoppt. Im Anschluss wurden die Proteine mit 7,5% (w/v) TCA und 0,015% (w/v) Deoxycholat präzipitiert, um nicht gebundenes $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ zu entfernen. Die getrocknete Probe wurde in 5x Spezial SDS Puffer resuspendiert und eine SDS-PAGE (B2.3.2) durchgeführt. Die Detektion der photoaktivierten Bindung des Azido ATPs an das Protein erfolgte mittels Autoradiographie durch Exposition der Radioaktivität im Gel für mindestens 24 Stunden bei -20°C auf Kodak Biomax Filme. Nach Entwicklung der Filme wurde der Anteil des gebundenen $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATPs}$

densitometrisch bestimmt und mit Hilfe der Fujifim MultiGauge V3 software quantifiziert.

Für Interaktionsstudien wurde 5 μ M [γ^{32} P]-8-Azido-ATP in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen nicht-markiertem ATP oder ADP photoaktiviert und entsprechend analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach nicht-linearer Regression mit Hilfe der GraphPad software nach Gleichung (6). Der IC₅₀ Wert entspricht dabei der ATP bzw. ADP Konzentration, die nötig ist um 50% des gebundenen [γ^{32} P]-8-Azido-ATPs zu verdrängen.

$$Y = B_{\min} + \frac{(B_{\max} - B_{\min})}{\left(1 + 10^{([\text{Kompetitor}] - \log IC_{50})}\right)} \quad (6)$$

Dabei entspricht Y dem Anteil gebundenen [γ^{32} P]-8-Azido-ATP in Anwesenheit der verwendeten ATP bzw. ADP Konzentration angegeben als [Kompetitor]. B_{max} und B_{min} stellen dementsprechend die maximale bzw. minimale Bindungskapazität dar.

C. Ergebnisse

1. Das Überexpressionssystem von Pdr5 - Expression und Reinigung von Hefeproteinen

Eine große Herausforderung für die biochemische und biophysikalische Analyse integraler Membranproteine in der Erforschung ihrer physiologischen und pathophysiologischen Funktionen stellt die Generierung ausreichender Proteinmengen mit möglichst hoher Reinheit dar (85). Die Verfügbarkeit geeigneter Expressions- und Reinigungssysteme stellt dabei eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinanalyse dar. Die Einheit aus dem genetisch modifizierten *PDR1-3* Transkriptionshintergrund und dem *PDR5* Promotor in *S. cerevisiae* Stämmen bietet die besten Voraussetzungen nicht nur zur Generierung ausreichender Proteinmengen des MDR ABC-Transporters Pdr5, sondern auch als Grundlage zur Etablierung einer allgemein einsetzbaren Klonierungsstrategie (127, 131, 149). Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System auf der Basis der beschriebenen Klonierungseinheit zur Überexpression und Reinigung verschiedener Proteine über einen integrierten Affinitätstag etabliert und auf seine Anwendbarkeit getestet.

1.1. Das Klonierungssystem der N14HIS-Kassette

Bereits vor Beginn meiner Arbeit konnte auf der Basis des eigens dazu konstruierten pRE3-10HIS Plasmids eine Strategie zur Überexpression und Reinigung des *full-size* ABC-Transporters Pdr5 über einen chromosomal insertierten 10Histidin-Affinitätstag entwickelt werden (150). Um die Klonierungseinheit mit dem konstitutiven *PDR5* Promotor in dem ΔP ($\Delta PDR5$ prom) Klonierungsstamm auch für andere Proteine anwenden zu können, wurde die Klonierungskassette durch den Einsatz eines 14Histidin-Affinitätstags optimiert. Mit der Insertion eines 14Histidin-Affinitätstags wurde das Ziel verfolgt, die Bindungskapazität des Fusionsproteins an die Säule zu erhöhen und somit eine verbesserte Ausbeute und eine höhere Reinheit des gewünschten Proteins durch die IMAC (Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie) zu ermöglichen. Die Existenz spezifischer

Restriktionserkennungsstellen wie z.B. einer Faktor X_a Schnittstelle zwischen dem Histidintag und dem jeweiligen Proteingen oder die in eukaryotischen Genen selten vorkommende *SfiI* Erkennungssequenz ermöglichen gleichzeitig den Einsatz des Plasmids als Grundlage für weiterführende Klonierungssysteme wie etwa die heterologe Expression eukaryotischer Proteine. Die 2-Phasen-Klonierungsstrategie, bestehend aus dem PCR Schritt zur Amplifizierung der Kassette und der homologen Rekombination zur Insertion in das Hefegenom, ist in Abbildung C 1 schematisch dargestellt.

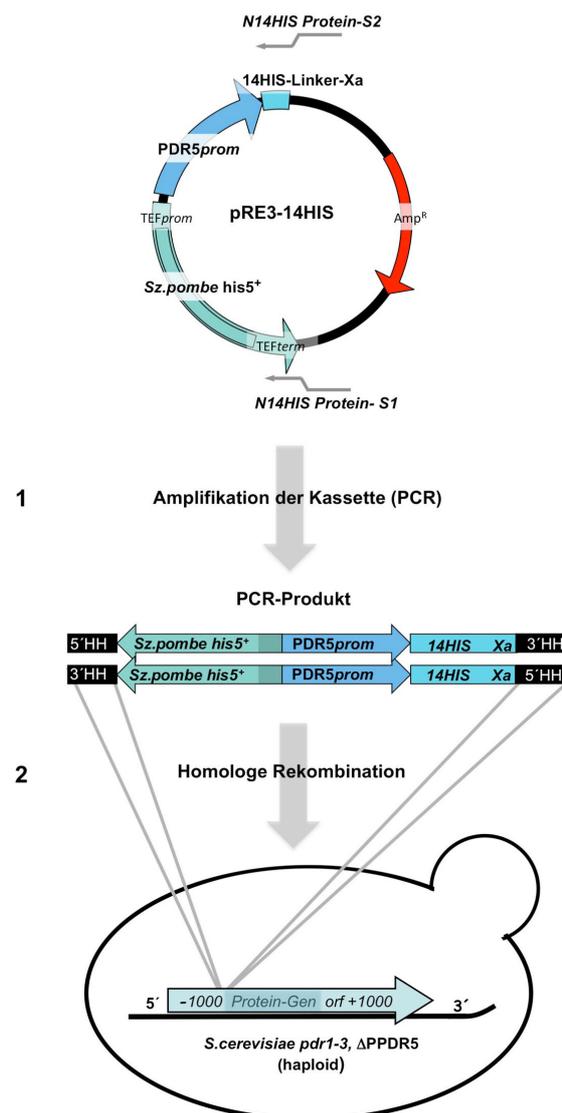


Abbildung C 1: Klonierungsstrategie der N14HIS-Kassette

1) PCR mit den proteinspezifischen Primern zur Amplifikation der Kassette und den entsprechenden Homologien zum Protein im Chromosom. 2) Homologe Rekombination in der Hefezelle durch Transformation

Zur Überprüfung der Klonierungsstrategie wurden neben Pdr5 vier weitere integrale Membranproteine der Hefe ausgewählt, die unterschiedliche Funktionen in der Hefezelle übernehmen. Abhängig von ihrer spezifischen Signalsequenz sind bzw. sollten sie entweder in der Plasmamembran, dem ER oder in Vesikeln des Golgi Apparates der Hefezelle lokalisiert sein (Tabelle C1).

Tabelle C1: Ausgewählte Membranproteine aus *S. cerevisiae* zur Überprüfung der N14HIS-Klonierungsstrategie

Protein		Substrate / Funktion	Lokalisation
Pdr5	ABC-Transporter	Xenobiotika/ Multidrogenresistenz	Plasmamembran
Yor1	ABC-Transporter	Xenobiotika/Schwermetalle Multidrogenresistenz	Plasmamembran
Rsb1	Lipid- transportierender Exporter (LTE)	<i>Sphingoid long chain bases</i> / Membranasymmetry	Plasmamembran
Mdl1_Δ59*	ABC-Transporter	Peptide	ER-Mikrosomen
Drs2	P4-Typ-ATPase	Phospholipide	Golgivesikel

*Die Modifikation Δ59 beschreibt die Deletion der mitochondrialen Signalsequenz aus 59 Aminosäuren am N-Terminus (151). Zur Vereinfachung wird weiterhin nur der Proteinname Mdl1 verwendet.

Die korrekte Insertion des 14Histidin-Affinitätstags am N-Terminus des jeweiligen Gens im ΔP Stamm wurde durch Kolonie PCR und anschließende DNA-Sequenzierung verifiziert. Die Selektion erfolgreich transformierter Hefezellen mit der entsprechend modifizierten Kasette Yor1, Rsb1, Mdl1 und Drs2 erfolgte sowohl auf –HIS als auch auf –TRP Agarplatten. Der Transformationsstamm ΔP trägt anstelle des chromosomalen PDR5 Promotors ein Tryptophan-Auxotrophiemarkergen, so dass im Fall dieser Proteine die Hefezellen eine zusätzliche Histidin-Auxotrophie erhielten. Bei der Klonierung von Pdr5 wurde die Tryptophan-Auxotrophie auf dem Chromosom durch die Histidin-Auxotrophie der Kasette ersetzt. Die Modifikation des PDR5-Gens erlaubte demzufolge nur ein Wachstum der Hefezellen auf -HIS Agarplatten, aber nicht auf -TRP Agarplatten.

1.2. Expression und Reinigungseffizienz der N14HIS-Kassette für verschiedene Hefeproteine

Die Quantität und Qualität der Proteinexpression und Aufreinigung über den insertierten N-terminalen Affinitätstag (IMAC) wurde in einem standardisierten Verfahren auf der Basis des bereits etablierten Reinigungsprotokolls für das Pdr5 - 10HIS Fusionsprotein untersucht. Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden entsprechend ihrer Lokalisation die jeweiligen Membranen, wie im Material und Methodenteil beschrieben, präpariert und aufgereinigt (Abschnitt B.2.4). Für alle Proteine wurde ein Stufengradient mit steigenden Histidin-Konzentrationen angewendet und die Proteine mit 50% (v/v) des High Histidinpuffers (100mM Histidin) eluiert. Unter Verwendung proteinspezifischer Antikörper, falls vorhanden, konnte die Expression bereits in Ganzzelllysaten nachgewiesen werden. Der Histidin-Antikörper konnte lediglich nach der Reinigung der Proteine verwendet werden, da in den Hefe-Ganzzelllysaten starke Kreuzreaktionen auftraten (Daten nicht gezeigt).

1.2.1. Das Fusionsprotein N14HIS-Pdr5

Der Einsatz der N14HIS-Klonierungskassette wurde zuerst anhand der Überexpression und Reinigungseffizienz des Fusionsproteins N14HIS-Pdr5 getestet. Das überexprimierte Pdr5 konnte eindeutig durch Detektion der Proteinbande mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers mit einer Größe von 170kDa im Ganzzelllysat nachgewiesen werden (Abbildung C 2 A). Dabei war die Expressioneffizienz vergleichbar mit der Expression des 10Histidin-Fusionsproteins aus früheren Studien. Für die Aufreinigung wurde Pdr5 in 4L Expressionskulturen kultiviert und zur Vorreinigung wie unter Abschnitt B 2.4.3 beschrieben aus Plasmamembran-Präparationen durch Solubilisation mit DDM im Massenverhältnis 1:1 (Detergenz:Protein) isoliert. Zur Erhöhung der Stabilität der Hefeproteine wurde zusätzlich 0,5 mg/ml Asolectin verwendet. Die verwendeten Puffer für die Reinigung über die IMAC waren dementsprechend anstatt mit 0,05% (w/v) mit 0,1% (w/v) DDM versetzt.

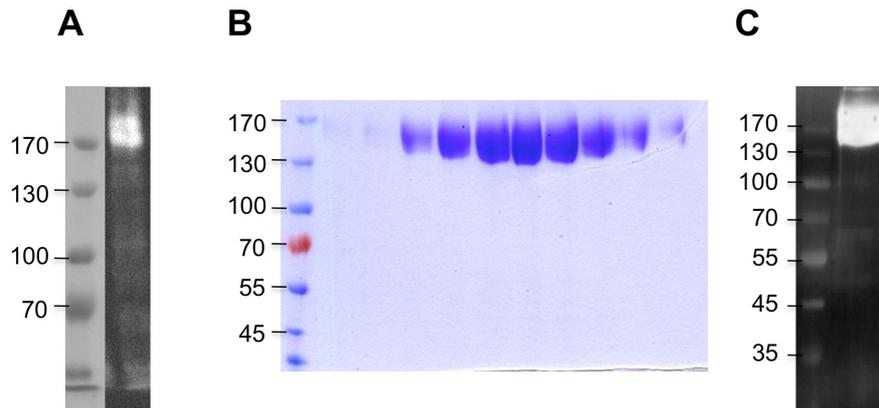


Abbildung C 2: Überexpression und Aufreinigung von N14HIS-Pdr5

A) Western-Blot Detektion der Pdr5 Ganzzelllysate (0,5 OD₆₀₀ Äquivalent) mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5-Antikörpers. Die Auftrennung erfolgte über eine 10% SDS-PAGE. **B)** Coomassie Brilliant-Blau gefärbte 7% SDS-PAGE der Elutionsfraktionen nach der IMAC mit 0,1% (w/v) DDM und 0,5mg/ml Asolectin. **C)** Western Blot Detektion der IMAC-Peakfraktion mittels des polyklonalen α -Pdr5-Antikörpers. Der Größenstandard ist jeweils in kDa angegeben.

Unter den optimierten Bedingungen konnte bei der Elution des N14HIS-Pdr5 Fusionsproteins ungefähr 1mg hoch reines Protein pro Liter Kultur erhalten werden (Abbildung C 2 B). Neben der prominenten Pdr5 Bande in den Elutionsfraktionen konnte keine weitere Proteinbande nachgewiesen werden. Das Protein wurde auch nicht im Zuge der Aufreinigung wesentlich abgebaut, was durch eine immunochemische Analyse der Elutionsfraktionen mit dem polyklonalen α -Pdr5-Antikörper bestätigt werden konnte (Abbildung C 2 C).

1.2.2. Die Fusionsproteine N14HIS-Yor1 und N14HIS-Rsb1

Des Weiteren wurde der Einsatz der Kasette bei dem *full-size* ABC-Transporter Yor1 und dem putativen LTE-(*Lipid Translocating Exporter*)-Transporter Rsb1 (118, 152, 153) untersucht. Beide Proteine sind in der nativen Hefezelle in der Plasmamembran lokalisiert (154, 155) und werden unter anderem (121) auch unter der Kontrolle der PDR Transkriptionsfaktoren PDR1 und PDR3 exprimiert, die auch maßgeblich an der Steuerung des Sphingolipid Metabolismus beteiligt sind (117, 118). Daher wurden beide Fusionsproteine analog zum Aufreinigungsprotokoll für N14HIS-Pdr5 aus isolierten Plasmamembranen mit DDM solubilisiert und unter den gleichen Bedingungen (0,01% (w/v) DDM, 0,5mg/ml Asolectin) gereinigt.

Die Expression des Fusionsproteins N14HIS-Yor1 unter der Kontrolle des Pdr5 Promotors konnte sowohl über die SDS-PAGE Analyse als auch durch das

Ergebnis der Western-Blot Detektion mit Hilfe des α -HIS Antikörpers bei einer Größe von ~ 166 kDa bestätigt werden (Abbildung C 3 A). Obwohl unter den standardisierten Reinigungsbedingungen auch Abbaubanden erkennbar waren (Abbildung C 3 B), konnten doch insgesamt $\sim 250\mu\text{g}$ des Fusionsproteins pro Liter Zellkultur erhalten werden.

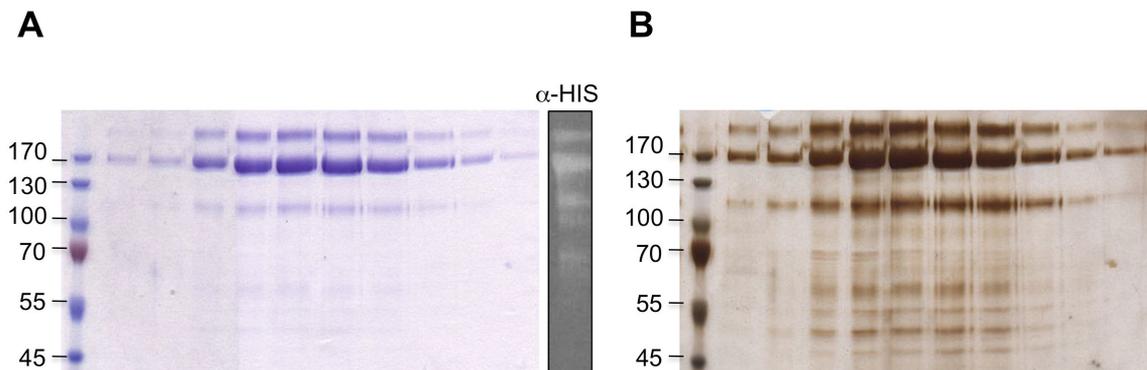


Abbildung C 3: Aufreinigung und Nachweis der N14HIS-Yor1 Überexpression

A) 7%ige SDS-PAGE der IMAC Elutionsfraktionen nach Coomassie Färbung. Der Western Blot der Peakfraktion mit einem α -HIS Antikörper bestätigt die Expression von Yor1.
B) Silberfärbung der 7%igen SDS-PAGE.

Im direkten Vergleich dazu wurde bei der Expression und Aufreinigung des vermeintlichen LTE-Transporters Rsb1 unter den verwendeten Bedingungen $>60\mu\text{g}$ N14HIS-Rsb1 pro Liter Zellkultur erhalten. Die Proteinmenge ist zwar geringer, jedoch konnte das Protein mit einer hohen Reinheit gewonnen werden (Abbildung C 4 A). Das Chromatogramm einer anschließend durchgeführten Gelfiltration bestätigte die Monodispersität des Proteins (Abbildung C 4 B und C). Dazu wurden die Elutionsfraktionen entsprechend vereinigt und das Protein in einem Amicon Ultra 4 Konzentrator mit einem MWCO von 30kDa ankonzentriert. Die Gelfiltration erfolgte gemäß den Angaben im Material und Methodenteil (Abschnitt B.2.4.7). Die Qualität des Proteins konnte auch anhand einer Silberfärbung und entsprechender Western Blot Analyse mit Hilfe des α -His Antikörpers in der Peakfraktion der Gelfiltration nachgewiesen werden (Abbildung C 4 C).

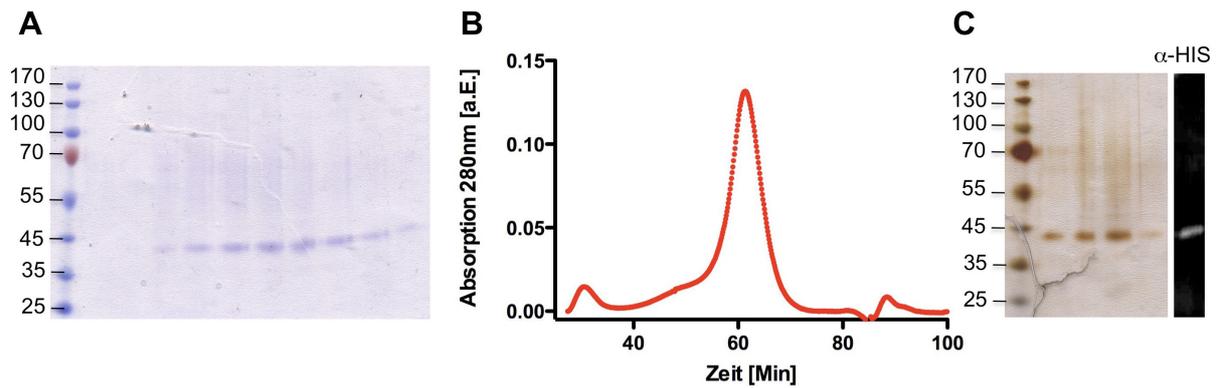


Abbildung C 4: Ausbeute der IMAC und Gelfiltration von N14HIS-Rsb1

A) 10%ige SDS-PAGE der IMAC Elutionsfraktionen nach Coomassie Färbung **B)** Gelfiltration der ankonzentrierten IMAC Elutionsfraktionen mittels einer Superose 6 HR 10/30 bei einem Fluss von 0,2ml/min. Gezeigt ist die Absorption bei 280nm. **C)** Silberfärbung der 10%igen SDS-PAGE nach Auftrennung der Peakfraktionen der Gelfiltration und Ausschnitt der Western Blot Analyse der Peakfraktion mit dem α -His-Antikörper.

1.2.3. Die Fusionsproteine N14HIS-Mdl1 und N14HIS-Drs2

Die Aufreinigung der Membranproteine Drs2 und Mdl1 nach Insertion der N14HIS-Klonierungskassette erzielte unter den standardisierten Bedingungen nur geringe Proteinmengen. Der genetisch modifizierte *half-size* ABC-Transporter Mdl1 sollte aufgrund der entfernten Signalsequenz am N-Terminus ($\Delta 59$) in den ER-Mikrosomen lokalisiert sein (151). In der nativen Zelle ist der Transporter in den Mitochondrien lokalisiert und ist vermutlich unter anderem verantwortlich für die Qualitätskontrolle (156, 157) im Peptidtransport (158), bzw. ist an der Regulation der Zellresistenz bei oxidativem Stress (159) beteiligt. Zur Aufreinigung wurde daher zum einen die Mikrosomenpräparation nach Fischl und Carman (160) angewendet und zum anderen die Präparation von Gesamtmembranen (Abschnitte B 2.4.2 und 2.4.4). Dabei wurde neben DDM auch Fos14 zur Solubilisation verwendet. Ein Großteil des Proteins lag dennoch in Aggregaten vor, so dass lediglich mittels der Gesamtmembran-Präparation das Protein in monomerer bzw. dimerer Form mit einer Größe von ~62 kDa bzw. ~130 kDa über den α -Mdl1 Antikörpers nach der Reinigung detektiert werden konnte. Die monomere und dimere Konformation sind in Abbildung C 5 entsprechend durch rote Markierungen hervorgehoben.

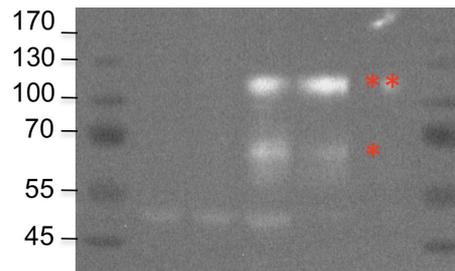


Abbildung C 5: Western-Blot-Detektion der IMAC-Elution für N14IS-Mdl1

Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit Hilfe des α -Mdl1 Antikörpers nach Auftrennung der IMAC-Elutionsfraktionen mit 0,05% (w/v) Fos14 über eine 10%ige SDS-PAGE. Die gekennzeichneten Banden entsprechen dem Monomer (*) bzw. Dimer (**), die untere Bande mit einer Größe von 50kDa ist dem Mdl1 Aggregat zuzuordnen. Dieses konnte auch schon in den Waschfraktionen detektiert werden.

Im Gegensatz dazu, war eine Expression der P4-Typ ATPase Drs2 auf der Basis der Klonierungsstrategie mit Hilfe des α -Drs2 Antikörpers bereits in Ganzzelllysaten nachweisbar (Abbildung C 6 A). Zur Aufreinigung wurden Gesamtmembranen und alternativ eine Kombination des Serrano Protokolls zur Isolierung von Plasmamembranen und dem Protokoll zur Präparation von Gesamtmembranen verwendet, um eine entsprechende Vorreinigung und Anreicherung der Golgi-Membranen zu erzielen. Drs2 ist wie viele andere P4-Typ ATPasen der APLT-Familie (Aminophospholipid Translocase) (161, 162) an der Aufrechterhaltung der Phospholipidasymmetrie in Membranen beteiligt (16) und ist in den Membranen des Golgi-Apparats der Hefe lokalisiert (161).

Nach der Reinigung aus den angereicherten Golgi-Membranen konnten geringe Proteinmengen über die SDS-PAGE-Analyse detektiert werden, jedoch konnten die Proteinbanden mit Hilfe des α -Drs2 Antikörpers identifiziert werden (Abbildung C 6 B, oberer Bereich). Die Problematik der geringen Reinigungseffizienz ist möglicherweise im Fehlen essentieller Interaktionspartner wie dem Membranprotein CDC50 begründet, das als nicht-katalytische Untereinheit des funktionalen Drs2 gilt (163, 164).

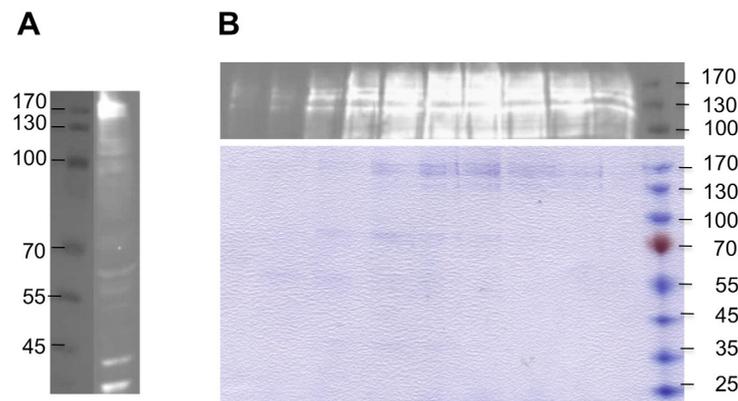


Abbildung C 6: Ganzzelllysate und IMAC Aufreinigung von N14HIS-Drs2

A) 0,4 OD₆₀₀ Äquivalente wurden über eine 10%ige SDS PAGE aufgetrennt und Drs2 mit Hilfe des α -Drs2 Antikörpers nachgewiesen. **B)** Coomassie Brilliant Blau gefärbte 10%ige SDS-Page der IMAC Elutionsfraktionen, ein Ausschnitt der entsprechenden Western Blot Detektion über den α -Drs2 Antikörpers ist in der Abbildung oberhalb des Gelbildes angeordnet.

Zusammengefasst konnte mit Hilfe des standardisierten Reinigungsverfahrens in kurzer Zeit gezeigt werden, ob die verschiedenen Membranproteine mittels der N14HIS-Klonierungsstrategie exprimiert und gereinigt werden konnten. Eine Übersicht der Reinigungseffizienz für die verschiedenen Membranproteine ist in Abbildung C 7 gezeigt.

Die erzielte Quantität und Qualität der Membranproteine Pdr5, Yor1 und Rsb1 ermöglichen den Einsatz der generierten *S. cerevisiae* auch als Grundlage für weitere biochemische und biophysikalische Analysen (Abbildung C 7 A). So konnten z.B. für die beiden Proteine Yor1 und Rsb1 auch erste ATPase Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Für die beiden Membranproteine Mdl1 und Drs2, die nur über einen spezifischen Antikörper detektierbar waren (Abbildung C 7 B und C), müssten weitere Optimierungen und entsprechende Anpassungen der Reinigungsbedingungen durchgeführt werden.

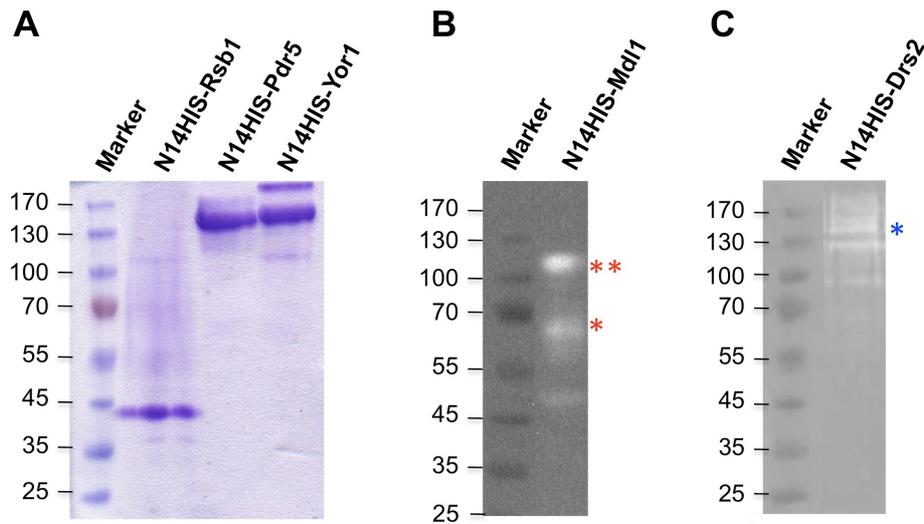


Abbildung C 7: Quantität und Qualität der Klonierungsstudien mit der N14HIS-Kassette

A) Coomassie Brilliant Blau-gefärbte 10%ige SDS-PAGE der gereinigten Fusionsproteine N14HIS-Rsb1, N14HI-Pdr5 und N14HIS-Yor1. Es wurde jeweils 5 μ g Protein aufgetragen. **B** und **C**) Auszug der Western Blot Detektion der IMAC Peakfraktionen von N14HIS-Mdl1 (**B**) und N14HIS-Drs2 (**C**) mit Hilfe der proteinspezifischen α -Mdl1 Antikörper bzw. α -Drs2-Antikörper. Die Markierungen entsprechen der monomeren (*) bzw. dimeren (**) Form von Mdl1 bzw. markieren die Proteinbande von Drs2 (*).

2. Funktionelle Charakterisierung des PDR ABC-Transporters Pdr5 in *S. cerevisiae*

Die Fähigkeit eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Substanzen zu erkennen und effizient zu exportieren, beschreibt das charakteristische Merkmal der Transportsysteme in der Multidrogenresistenz (97). Im Fokus der funktionellen Charakterisierung des PDR ABC-Transporters Pdr5 steht daher die molekulare Aufklärung der Prozesse in der Generierung der nötigen Energie durch die ATP Hydrolyse in den NBDs und dem Informationstransfer zur Substratselektion und Translokation in den TMDs. Obwohl die Bereitstellung der chemischen und mechanischen Energie durch die Dimerisierung und hydrolyseabhängige Dissoziation der NBDs allgemein akzeptiert ist, steht die Aufklärung des exakten Mechanismus und die Identifizierung der beteiligten Aminosäuren für die unterschiedlichen Transportsysteme noch aus. Dies gilt sowohl für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse als auch für die Identifizierung von Aminosäuren außerhalb der Konsensussequenzen in den NBDs, die an der Vermittlung der Energie für die Translokation über die TMDs beteiligt sind.

Die funktionelle Analyse des ABC-Transporters Pdr5 schließt sowohl geeignete Studien *in vivo* wie auch *in vitro* ein. Dabei bedarf es neben einer ausreichend großen Proteinmenge vor allem auch eines funktionell aktiven Proteins. Obwohl Pdr5 durch die Aufreinigung in großen Mengen und zu 95% rein erhalten wurde (Abbildung C 2), konnte keine proteinspezifische ATPase Aktivität des Proteins in der Detergenzmizelle nachgewiesen werden, auch wenn parallel durchgeführte CD-Spektroskopische Untersuchungen eine korrekte Sekundärstruktur des solubilisierten Proteins vermuten lassen (150). Die detaillierte Charakterisierung des Transporters auf seine Funktionalität wurde daher im nativen System, d.h. in angereicherten Plasmamembran Präparationen durchgeführt. Dazu wurden spezifische biochemische und biophysikalische Methoden in Kombination mit den entsprechenden Kontrollmutanten, wie dem Deletionsstamm Δ PDR5 (Δ 5) und/oder ATPase bzw. Transport inaktiven Mutanten, etabliert und angewendet.

2.1. Mutagenesestudien des ABC-Transporters Pdr5

Pdr5, wie auch viele andere MDR ABC-Transporter des PDR Netzwerks in *S. cerevisiae* und anderen Pilzen, weist eine stark konservierte Degeneration in den Konsensussequenzen der NBDs auf. Um den Einfluss einzelner Aminosäuren als auch die Bedeutung der Degeneration für die Funktionalität des Transporters im Allgemeinen besser zu verstehen, wurden auf der Grundlage von Sequenzvergleichen verschiedene Einzel- und Mehrfachmutanten generiert und auf ihre Hydrolyseaktivität und Substratselektivität untersucht (Abbildung C 8).

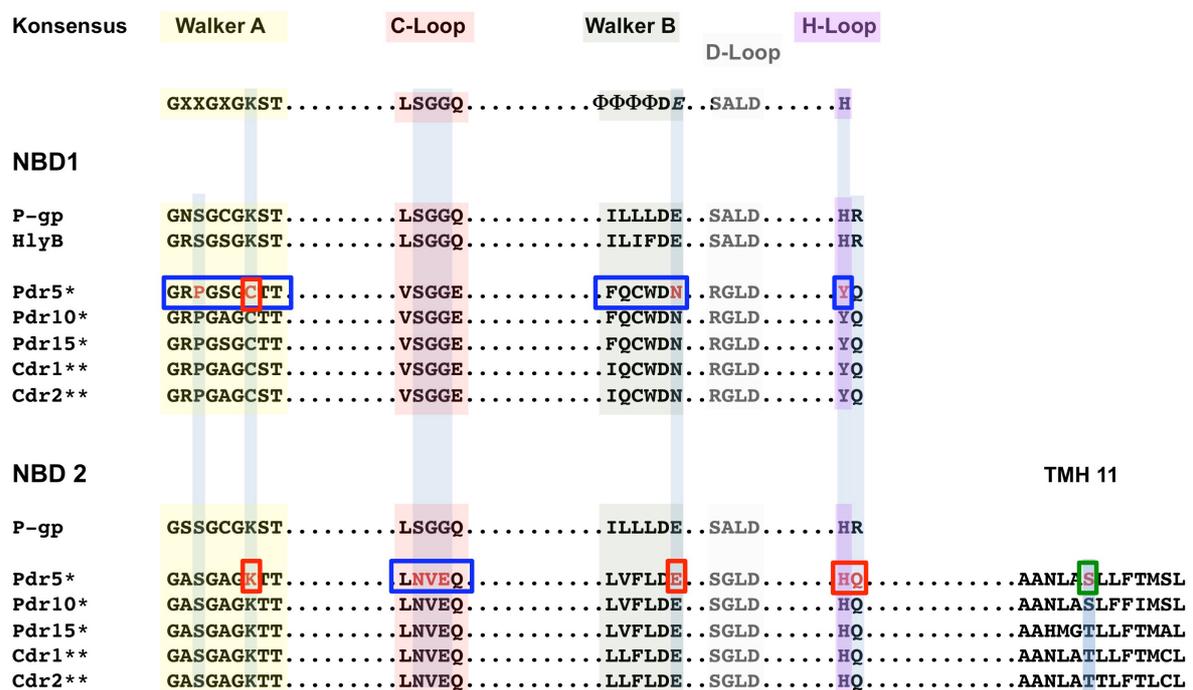


Abbildung C 8: Sequenz-Alignment von verschiedenen ABC-Transportern

Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe der ClustalW Software generiert und zeigt Auszüge aus den NBDs des humanen ABC-Transporters P-gp und des bakteriellen ABC-Transporters HlyB im Vergleich mit einigen ABC-Transportern der PDR-Familie aus *S. cerevisiae* (*) und *C. albicans* (**). Die farblich unterlegten Sequenzen entsprechen den Konsensussequenzen. Die senkrechten Balken markieren die Aminosäuren im Vergleich, die in dieser Arbeit mutiert wurden. Die mutierten Aminosäuren in den einzelnen Motiven sind durch rote Markierungen nochmals hervorgehoben und entsprechend den verschiedenen Mutagenesestudien durch eine rote, grüne und blaue Umrandung gekennzeichnet.

In drei unterschiedlichen Mutagenesestudien wurden verschiedene Fragestellungen hinsichtlich des Mechanismus der ATP-Hydrolyse und der Kommunikation zwischen den NBDs und TMDs zur Substratselektion und Translokation verfolgt. Die entsprechenden Aminosäuren in den unterschiedlichen Mutagenesestudien, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind in dem Sequenzvergleich farblich markiert und durch Kästen hervorgehoben (Abbildung C 8).

Bislang wurden aufgrund biochemischer und biophysikalischer Analysen der ABC-Transporter BmrA und HlyB zwei verschiedene Modelle für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse im katalytischen Zyklus postuliert. Diese beschreiben einerseits das „katalytische Carboxylat“ des konservierten Glutamats im direkten Anschluss zum Walker B Motiv (57) und andererseits die „katalytische Dyade“ aus dem Glutamat und dem konservierten Histidin des H-loops (54) als katalytisch wirkende Einheit. In Bezug auf die Frage, ob und welches der beiden postulierten Modelle bei der ATP-Hydrolyse in dem MDR-ABC-Transporter Pdr5 gültig ist, wurden die als katalytisch relevant postulierten Aminosäuren des Walker B und des H-loops mutiert. In diesem Zusammenhang wurde auch das bei den PDR-Vertretern hoch konservierte Glutamin in direkter Nachbarschaft zum H-loop berücksichtigt. Aufgrund seines nukleophilen Charakters könnte das Glutamin ähnlich wie das Histidin möglicherweise als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen bei der ATP-Hydrolyse fungieren. Die Mutagenese der benannten Aminosäuren beschränkte sich dabei zunächst auf die zweite NBD des ABC-Transporters, da Pdr5 wie auch die anderen ausgewählten Vertreter des PDR Netzwerks lediglich in der C-terminalen NBD konservierte Walker A, B und H-loop Sequenzen aufweist. In der ersten NBD sind diese Motive hingegen degeneriert, wie der Vergleich mit dem humanen MDR ABC-Transporter P-gp und dem bakteriellen *half-size* ABC-Transporter HlyB zeigt (Abbildung C 8). Das hochkonservierte Lysin des Walker A Motivs gilt aufgrund biochemischer Studien in den ABC-Transportern wie z.B. dem Peptidtransporter TAP1 ebenfalls als eine essentielle Aminosäure bei der ATP-Hydrolyse (165, 166). Im Hinblick auf eine mögliche funktionelle Asymmetrie der beiden NBDs in der ATP Hydrolyse wurden daher zusätzlich das in den MDR ABC-Transportern der Pilze konservierte Cystein des Walker A Motivs in NBD1 und das entsprechende

hochkonservierte Lysin in NBD2 mutiert und analysiert. Die entsprechenden Aminosäuren sind in Abbildung C 8 durch rote Kästen hervorgehoben.

Um die Bedeutung der Degeneration in den NBDs für die Funktionalität des Transporters zu verstehen, wurde durch die sequenzielle Mutagenese der zentralen Sequenzmotive die Rekonstruktion eines symmetrischen ABC-Transporters angestrebt. In dem Sequenzvergleich der verschiedenen MDR ABC-Transporter und dem bakteriellen ABC-Transporter HlyB (Abbildung C 8) zeigte sich, dass die Abweichungen lediglich in den zentralen Motiven, dem Walker A und B Motiv und dem C- und H-*loop* auftreten und dort auch konserviert sind. Der D-*loop* hingegen ist z.B. nicht betroffen. Fraglich ist, im Bezug auf die Energiegewinnung und Umsetzung, welchen Vorteil diese eukaryotischen Organismen durch diesen evolutionären „Stillstand“ haben. Die entsprechenden Motive sind in Abbildung C 8 durch blaue Kästen markiert.

In einem weiteren Ansatz wurde durch die Mutation der Aminosäure S1360 im hydrophilen Kern der TMH 11 (Abbildung C 8 grüner Kasten) das Ziel verfolgt, die Verknüpfung zwischen der ATP-Hydrolyse zur Bereitstellung der Energie einerseits und die Substratselektion und Translokation andererseits näher zu beleuchten. Bereits in früheren Studien kristallisierte sich diese Aminosäure aufgrund eines veränderten Phänotyps in Abhängigkeit von der jeweiligen Substitution in Anwesenheit unterschiedlicher Substanzen heraus (101, 139). Im direkten Vergleich mit dem unmodifizierten Pdr5 Hefestamm stand im Fokus dieser Studie die Untersuchung der zugrunde liegenden Kinetiken und Thermodynamiken durch den gezielten Einsatz von Substraten und Modulatoren mittels verschiedener biochemischer und biophysikalischer Methoden.

Die Konstruktion der unterschiedlichen Mutationen erfolgte durch gerichtete Mutagenese in der *Knock-in* Kasette des pRE5 Plasmids, welche neben dem Proteingen auch die Promotorsequenz enthält. Nach Extraktion der Kasette, durch die Restriktionsenzyme *ApaI* und *SpeI* wurde das modifizierte Protein einschließlich seines Promotors durch homologe Rekombination in das Chromosom des Klonierungsstamms $\Delta PDR5\Delta PDR5prom$ (ΔPP) inseriert. In diesem Stamm sind sowohl das Gen als auch die Promotorsequenz deletiert und durch einen

Tryptophan-Auxotrophiemarker ersetzt, um unerwünschte Rekombinationen zu vermeiden. Die generierten Stämme weisen, wie der Hefestamm N14HIS-Pdr5, der über das pRE3-14HIS Plasmid erhalten wurde, neben einem N-terminalen 14Histidin-Affinitätstag auch den his⁵⁺ Auxotrophiemarker aus *Schizosaccharomyces pombe* auf. Die konstruierten PDR5 Mutanten konnten so nach der Transformation auf –HIS Agarplatten selektiert und anschließend mittels molekularbiologischer Methoden (Kolonie-PCR, DNA-Sequenzierungen) verifiziert werden. Zum Vergleich sind die Plasmidkarten pRE3-14HIS und pRE5 im Anhang dargestellt.

2.2. Analyse der katalytisch relevanten Aminosäuren in Pdr5

2.2.1. Funktionsanalyse in lebenden Hefezellen

Für die Funktionsanalyse der möglicherweise katalytisch aktiven Aminosäurereste, wurden die Einzel- und Doppelmutanten zunächst *in vivo* mit Hilfe von Wachstumsstudien in Anwesenheit verschiedener Substanzen und aufgrund fluoreszenzbasierter Transportmessungen auf ihre Aktivität untersucht. In Tabelle C2 sind die Mutationen und ihre Lokalisation im PDR5 Gen noch mal zusammengefasst dargestellt.

Tabelle C2: Mutanten zur Analyse der katalytischen Funktion der NBDs

Mutation	Motiv	Domäne
C199A	Cystein im Walker A	NBD1
K911A	Lysin im Walker A	NBD2
C199A K911A	Cystein und Lysin des Walker A	NBD1 + 2
E1036Q	Glutamat im Anschluss zum Walker B	NBD2
H1068A	Histidin des H-loop	NBD2
H1068A E1036Q	Histidin des H-loop + Glutamat des Walker B	NBD2
Q1068A	Glutamin im Anschluss zum H-loop	NBD2
H1068 Q1069A	Histidin des H-loop + Glutamin im Anschluss zum H-loop	NBD2

Dazu wurde zunächst die Pdr5 Expression in den unterschiedlichen *S. cerevisiae*-Stämmen mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5-Antikörpers in Ganzzelllysaten überprüft (Abbildung C 9). Als Kontrollen dienten Ganzzelllextrakte des Klonierungsstammes Δ PP und des Deletionsstammes Δ 5.

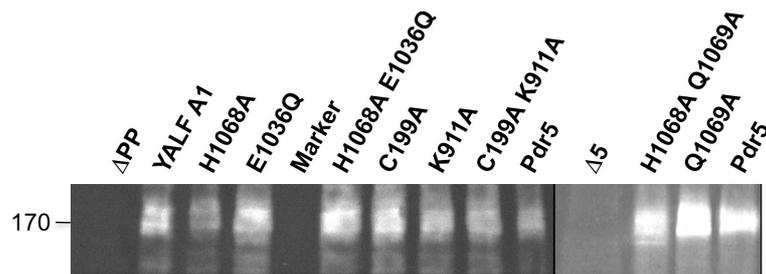


Abbildung C 9: Western Blot Detektion der Pdr5 Ganzzelllysate

Äquivalente Zellmengen ($OD_{600}=0,5$) wurden lysiert und gefällt und über eine 7%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Pdr5 Proteinbande erfolgte anhand des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers. Gezeigt sind die Ausschnitte zweier Western Blot Analysen.

Im Vergleich mit dem Klonierungsstamm ΔPP und dem Deletionsstamm $\Delta 5$, bei denen erwartungsgemäß kein Pdr5-Signal detektiert werden konnte, zeigte sich, dass alle generierten Mutanten das Protein exprimierten (Abbildung C 9).

Die Expression der getesteten Mutanten war vergleichbar mit der des „wildtypischen“ Pdr5-Stammes (N14HIS-Pdr5) und des Elternstranges YALF A1, der keinen Affinitätstag besitzt. Die Modifikation des Proteins durch den N-terminalen Histidin-Affinitätstag hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Als Negativkontrolle in den *in vivo* und *in vitro* Studien in dieser Arbeit diente der „Knock-out“ Stamm $\Delta 5$. Gelegentlich wurde auch der Elternstrang YALF A1 als weitere Positivkontrolle bei der Analyse der unterschiedlichen PDR5 Modifikationen mitgeführt.

2.2.1.1. Drogenresistenztests

Die Pdr5-vermittelte Drogenresistenz wurde auf qualitativer und quantitativer Ebene analysiert. Dazu wurden die Pdr5 exprimierenden Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase entsprechend den Beschreibungen im Material und Methodenteil (Abschnitt B 2.6.1.) geerntet und in bzw. auf YPD-Medium kultiviert, das mit verschiedenen Substanzen versetzt war. Zur qualitativen Analyse wurde die Ausbildung von Zellkolonien auf so genannten „Drug-Agarplatten“ beobachtet. In Flüssigkulturen wurde das Zellwachstum quantitativ über die Zelldichte bestimmt. Dabei wurden die unterschiedlichen Hefestämme simultan bei 12 verschiedenen Substanzkonzentrationen vermessen (Abbildung C 10).

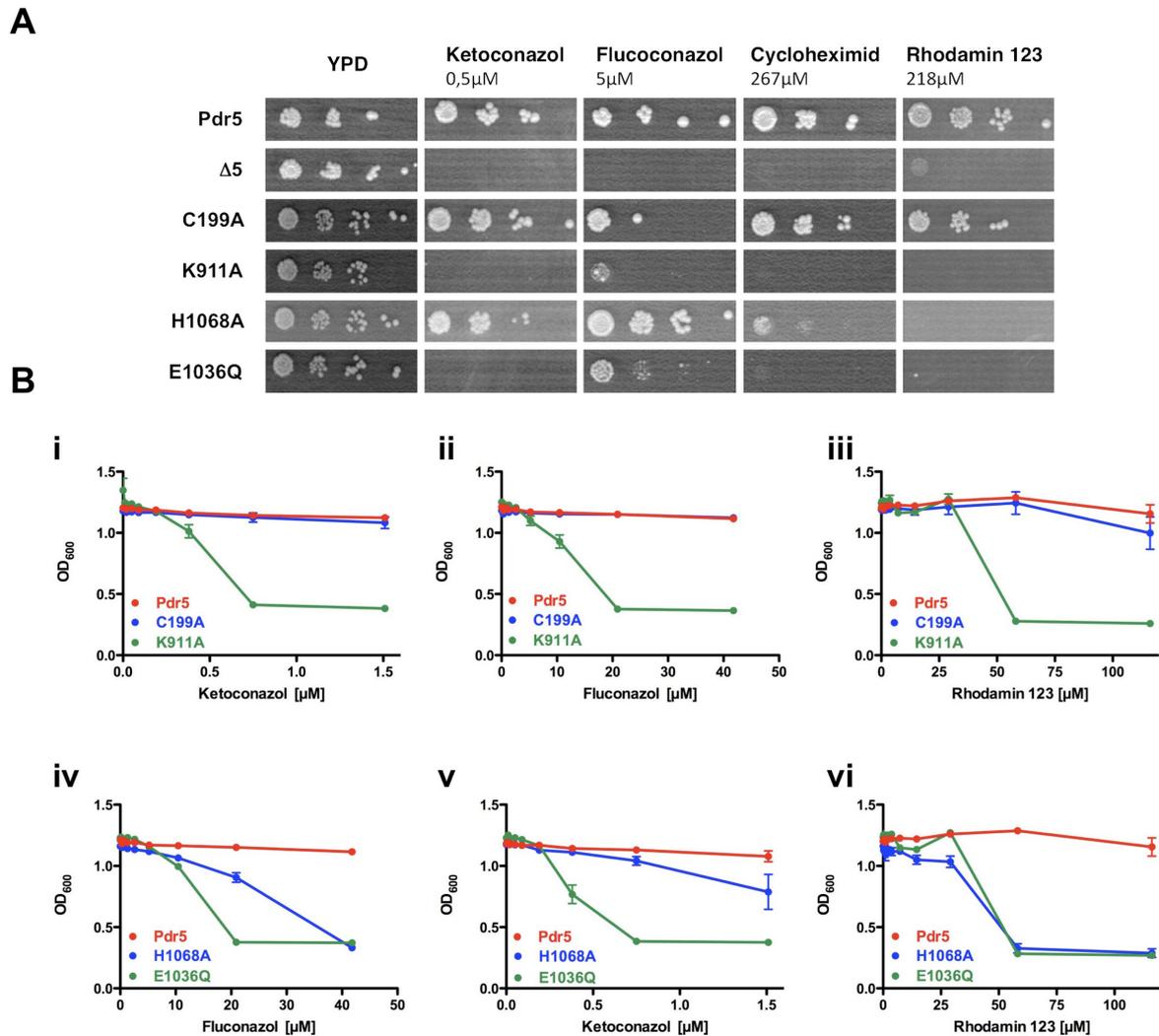


Abbildung C 10: Drogen-Resistenztest verschiedener PDR5 Mutanten

A) Wachstumstest verschiedener PDR5-Varianten auf Agarplatten, die mit unterschiedlichen Substanzen versetzt waren. Die Kulturen wurden bei einer OD_{600} von 1 geerntet und auf eine Start- OD_{600} von 0,2 eingestellt und im Verhältnis 1:10 weiter verdünnt. Jeweils 5µl der Verdünnungen wurden auf die Platten getropft (167). **B)** YPD-Flüssigkulturen mit sequenziellen Verdünnungen der unterschiedlichen Zellgifte: Fluconazol (i und iv); Ketoconazol (ii und v) und Rhodamin 123 (iii und vi). Die Kulturen wurden mit den unterschiedlichen Hefekulturen mit einer Start OD_{600} von 0,25 angeimpft. Die gezeigten Daten ergaben sich aus minimal zwei unabhängigen Experimenten.

Hefezellen, die das genetisch unveränderte PDR5-Gen exprimierten, konnten in Anwesenheit der getesteten Substanzen sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkulturen wachsen. Die Zellen des Deletionsstammes $\Delta 5$ waren hingegen nicht in der Lage in Anwesenheit der Antimykotika Ketoconazol (KTC) und Fluconazol (FLC), dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (R123) oder dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) zu wachsen.

Die Einzelmutanten der verschiedenen konservierten Aminosäurereste in den beiden NBDs hatten unterschiedlich starke Effekte auf die Pdr5-vermittelte Resistenz. Während die C199A Mutation des konservierten Cysteins im Walker A Motiv in NBD1 einen vergleichbaren Phänotyp zum Wildtyp-Stamm (Pdr5) zeigte, führte die Mutation des entsprechenden Lysins in der zweiten NBD zu einer drastischen Reduktion der Resistenz. Bereits bei geringen Konzentrationen aller getesteten Toxine waren die Zellen der K911A Mutante nicht mehr in der Lage zu wachsen (Abbildung C 10 A, B i-iii).

Die beiden anderen Mutationen in den konservierten Motiven der NBD2 führten ebenfalls zu einer Verschlechterung des Zellwachstums. Durch die Substitution des Glutamats im Walker B (E1036) mit einem Glutamin stellte sich das Wachstum der Zellen nahezu komplett ein. Lediglich in Anwesenheit geringer Konzentrationen Fluconazol waren noch Kolonien auf den Agarplatten erkennbar. Die Mutation des putativ katalytisch aktiven Histidins des H-loops in NBD2 hatte hingegen eine veränderte Substratspezifität zur Folge. So konnte in Anwesenheit geringer Mengen der Antimykotika Fluconazol (<40 μ M) und Ketoconazol (<3 μ M) noch eine erhöhte Zelldichte vermessen werden (Abbildung C 10 B iv-v). Gegenüber dem Translationshemmer Cycloheximid und dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin zeigten die Zellen jedoch keine Widerstandsfähigkeit mehr (Abbildung C 10 A und B,vi). Die erhöhte Empfindlichkeit der H1068A Mutante war vergleichbar mit der Suszeptibilität der K911A und der E1036Q Mutante (Abbildung C 10 B iii, vi).

Die Phänotypen der Doppelmutanten C199A K911A und H1068A E1036Q unterstützten die Annahme einer funktionellen Asymmetrie der beiden NBDs. Das Wachstumsverhalten der Doppelmutanten konnte in beiden Fällen auf die Einzelmutation mit der höheren Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Substanzen zurückgeführt werden, wie anhand der CHX-Agarplatten gezeigt werden konnte (Abbildung C 11 A). Im Hinblick auf die Existenz einer möglichen katalytischen Dyade mit dem benachbarten Glutamin des H-loops als funktionelle Einheit der ATP-Hydrolase in Pdr5 wurde auch die Q1069A Mutante und die entsprechende Doppelmutante analysiert. Jedoch zeigte sich eindeutig, dass die Q1069A Mutation keinen Einfluss auf die Pdr5-vermittelte Drogenresistenz hatte, während die Auswirkung der Doppelmutation H1068A Q1069A auf den Effekt der H068A Einzelmutante begründet schien (Abbildung C 11 B).

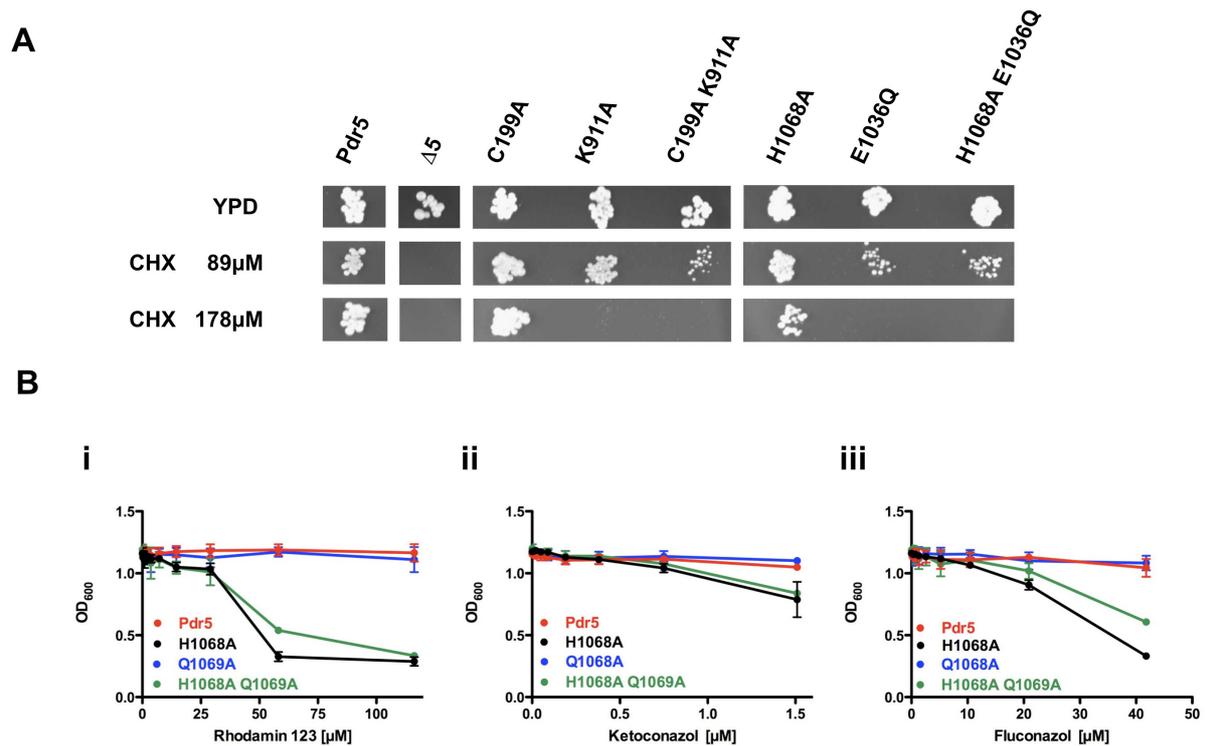


Abbildung C 11: Wachstumsverhalten der Pdr5-Mutanten im Vergleich

A) Vergleich des Zellwachstums der Pdr5 Mutanten in Anwesenheit von drei verschiedenen Cycloheximid (CHX)-Konzentrationen auf Agarplatten. 5μl der auf $OD_{600} = 0,2$ eingestellten Zellkulturen wurden auf die Platten getropft. **B)** Resistenztest der mutierten Aminosäuren der putativen katalytischen Dyade in Pdr5. Sequenzielle Verdünnungen der verschiedenen Toxine: Rhodamin 123 (i), Ketoconazol (ii) und Fluconazol (iii) wurden in YPD-Flüssigkulturen mit 50μl der unterschiedlichen Hefekulturen ($OD_{600} = 0,25$) angeimpft. Gezeigt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken von minimal zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst, konnte anhand der Agarplatten und Flüssigkulturen in Anwesenheit der verschiedenen Substanzen die Pdr5-vermittelte Drogenresistenz eindeutig gezeigt werden. Zudem konnte anhand des Wachstumstests auf den CHX-Agarplatten auch exemplarisch ein möglicher Effekt des 14Histidin-Affinitätstags auf die Funktionalität von Pdr5 ausgeschlossen werden. Sowohl der Elternstrang YALF A1 als auch der „wildtypische“ Pdr5 Stamm, der wie die anderen PDR5-Mutanten mit einem 14Histidin-Affinitätstag fusioniert ist, wuchsen in gleichem Ausmaß in Anwesenheit verschiedener CHX-Konzentrationen (Abbildung C 11 A).

2.2.1.2. Rhodamin 6G Transport aus ganzen Hefezellen

Zusätzlich zu den Wachstumsstudien wurde zur Analyse der Exporteffizienz der unterschiedlichen PDR5-Varianten in Echtzeit das fluoreszenzbasierte Transportmessverfahren von Rhodamin 6G (R6G) in ganzen Hefezellen nach Kolaczowski optimiert und angewendet (133). R6G wirkt als Inhibitor der mitochondrialen ATP-Synthase (168) und wird durch MDR ABC-Transporter wie Pdr5 oder Cdr1 aus den Zellen exportiert (133, 169). Das indirekte Messverfahren beruht auf der konzentrationsabhängigen Auflösung von nicht-fluoreszierenden R6G Excimeren. Die Ausbildung der Excimere wurde durch die De-Energetisierung der Hefezellen in Anwesenheit von 2-Deoxyglukose, einem Hemmstoff der Glykolyse und dem Fluoreszenzfarbstoff R6G eingeleitet, so dass das hydrophobe R6G verstärkt in die Zellen diffundieren und dort ungehindert akkumulieren konnte. Erst durch die Zugabe von Glukose wurde eine Normalisierung des intrazellulären ATP-Gehalts und damit auch ein ATP-abhängiger Export von R6G ermöglicht. Die Abnahme der R6G Konzentration in den Zellen führte schließlich zum Zerfall der nicht-fluoreszierenden Excimere, und der R6G Transport aus der Zelle konnte indirekt durch den Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden (Abbildung C 12A).

Als Negativkontrolle diente die Zugabe von ddH₂O anstelle von Glukose, so dass einfache Diffusionseffekte als Ursache für einen beobachteten Fluoreszenzanstieg ausgeschlossen werden konnten. Zudem wurde auch der Deletionsstamm $\Delta 5$ bei den Messungen mitgeführt, um in Relation zu Pdr5 auch den möglichen Einfluss anderer primärer oder sekundärer Transporter berücksichtigen zu können.

Unter diesen Bedingungen und unter der vereinfachten Annahme, dass die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals proportional zur exportierten R6G Konzentration ist, konnte über die Steigerungsrate eine semi-quantitative Aussage bezüglich der Exporteffizienz der verschiedenen PDR5 Modifikationen getroffen werden (Abbildung C 12 B-C). Die Zellen der verschiedenen *S. cerevisiae* Stämme wurden in äquivalenten Mengen eingesetzt und die Volumina in allen Schritten streng kontrolliert um eine Vergleichbarkeit der Messungen gewährleisten zu können.

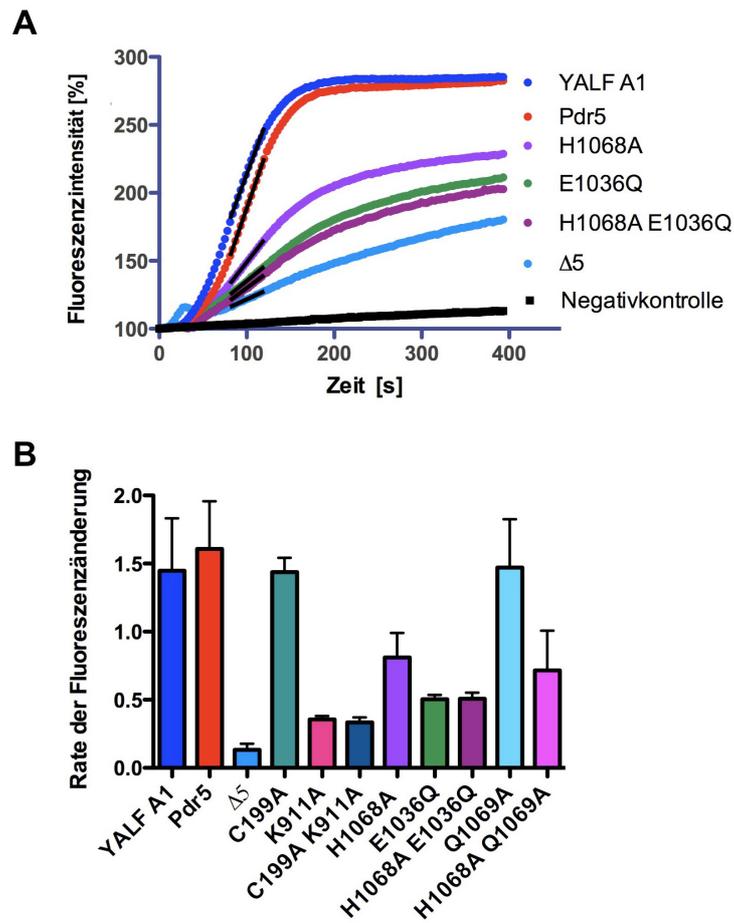


Abbildung C 12: R6G Export-Bestimmung in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen

A) Gezeigt ist exemplarisch die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals für verschiedene Hefestämme nach Energetisierung der Zellen mit Glukose bzw. nach ddH₂O Zugabe (B 2.8.2.). Die Fluoreszenz wurde auf den jeweiligen Startwert zum Zeitpunkt der Energetisierung (0s) normiert. Die schwarzen Geraden indizieren die lineare Regression für die unterschiedlichen Messungen. **B)** Graphische Darstellung der Steigungsraten des Fluoreszenzsignals für alle vermessenen Hefestämme. Die Bestimmung erfolgte mittels linearer Regression mit Hilfe der GraphPad software von mindestens 3 unabhängigen Messungen.

Für beide „wildtypischen“ PDR5 Varianten, mit und ohne Affinitätstag, konnte eine vergleichbar starke Zunahme des Fluoreszenzsignals vermessen werden, während bei der Negativkontrolle kaum eine Zunahme zu verzeichnen war. Für den Deletionsstamm $\Delta 5$ konnte zwar ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden, jedoch mit einer wesentlich langsameren Kinetik. Die Steigungsraten betrug weniger als 1/10 im Vergleich zu den Zellen des Pdr5 und YALF A1 Hefestammes (Abbildung C 12 B). Demzufolge war der Fluoreszenzanstieg hauptsächlich auf die Aktivität des ABC-Transporters Pdr5 zurückzuführen und wurde durch den Affinitätstag nicht beeinflusst.

Der Vergleich der Steigungsraten für die verschiedenen Mutationen im Walker A Motiv und den Aminosäuren der möglichen katalytischen Dyade in NBD2 bestätigten die bisherigen Ergebnisse der Resistenztests. So zeigte die Einzelmutante C199A eine vergleichbare Exporteffizienz wie der Wildtyp, während die Zellen der korrespondierenden K911A Mutante in der zweiten NBD und der Doppelmutante C199A K911A kaum in der Lage waren, den Farbstoff zu extrudieren. Bei den Mutanten der putativ katalytischen Dyade zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Die Exporteffizienz der H1068A Mutante betrug ungefähr 50% des Wildtyps, während die Effizienz der E1036Q Mutante etwas höher als die der K911A Mutante war. Sowohl das Lysin des Walker A Motivs als auch das Glutamat beim Walker B Motiv wurden als katalytisch relevante Aminosäuren klassifiziert. Im Vergleich scheint aber eine Mutation des Lysins eine bedeutendere Rolle für die Funktionalität des Proteins zu haben. Die ermittelten Steigungsraten der Doppelmutanten entsprachen dabei jeweils der Effizienz der inaktiveren Einzelmutante (Abbildung C 12 B). Dies konnte auch für die beiden zusätzlichen Mutanten Q1069A und H1068A Q1069A bestätigt werden.

Im Vergleich zum Deletionsstamm wurde für die Lysinmutante als auch für die Glutamatmutante noch ein geringer Fluoreszenzanstieg beobachtet. Dieser Effekt könnte zu diesem Zeitpunkt nur spekulativ erklärt werden. Da der Efflux von R6G unter den gegebenen nativen Bedingungen mit dem Konzentrationsgefälle abläuft, ist es schwierig, die einzelnen Einflüsse auf den konzentrationsbedingten Fluoreszenzanstieg eindeutig zu identifizieren und durch geeignete Kontrollen auszuschließen. Im Resistenztest war eine Proliferation der beiden Mutanten in Anwesenheit von Rhodamin kaum möglich. Der beobachtete Unterschied in den Exportraten zum Deletionsstamm scheint demzufolge andere Ursachen zu haben.

Nichtsdestotrotz konnte mit Hilfe des fluoreszenzbasierten R6G Efflux Verfahren eine alternative Methode etabliert werden, um die Ergebnisse der Resistenztests zu belegen. Zudem ermöglichten die erhaltenen Transportdaten *in vivo* einen ersten Einblick auf die Exportkinetiken des ABC-Transporters und deuten einmal mehr darauf hin, dass in Pdr5 eine funktionelle Asymmetrie der NBDs vorliegt und insbesondere die zweite NBD von großer Bedeutung für den Substrattransport zu sein scheint. Die Existenz einer katalytischen Dyade als notwendige funktionelle Einheit wurde analog zu den Wachstumsstudien aufgrund der Daten nicht

unterstützt. Der beobachtete Effekt durch den Verlust des Carboxylats des Glutamats beim Walker B Motiv hingegen deutet eindeutig auf eine katalytisch relevante Funktion der Aminosäure für den ABC-Transporter. Aufgrund der bisherigen Daten konnte die besondere Rolle des Histidins im H-loop noch nicht eindeutig geklärt werden. Einerseits zeigte die Mutante eine 50%ige Aktivität in den R6G Fluoreszenzmessungen, und andererseits führte die Mutation des Histidins zu einem Alanin zu einem veränderten Substratspektrum. Dieses Phänomen wurde bislang nur bei Modifikationen innerhalb der TMDs erwartet. Erst eine Analyse des Proteins *in vitro* könnte Aufschluss über die Funktion der einzelnen Aminosäuren im katalytischen Zyklus geben.

2.2.2. Charakterisierung der PDR5 Varianten in angereicherten Plasmamembran Präparationen

Die detaillierte Funktionsanalyse von Proteinen *in vitro* erfolgt gewöhnlich mit Hilfe von Proteinproben, die mit Hilfe der klassischen bioanalytischen Methoden bis zur Monodispersität aufgereinigt wurden. Alternativ werden die Proteine auch nach der Reinigung in geeignete Liposomen rekonstruiert, um das Protein in einer möglichst nativen Umgebung analysieren zu können. Im Fall des Membranproteins Pdr5 wurden die *in vitro* Analysen in hochhomogenen Plasmamembran Präparationen mit speziell angepassten biochemischen und biophysikalischen Messmethoden zur Bestimmung der ATPase- und Transportaktivität durchgeführt.

Dazu wurden die unterschiedlichen Pdr5 überexprimierenden *S. cerevisiae* Stämme zunächst in 4L Expressionskulturen über Nacht bei 25°C kultiviert, jedoch in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 1,5 zusätzlich mit einer frischen Stickstoffquelle versetzt (100ml 5xYP/I). Die Kulturen konnten so bis zu einer OD₆₀₀ von 3,5 kultiviert werden, ohne dass der MDR ABC-Transporter Pdr5 abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt). Wachstumsstudien zur Analyse der limitierenden Faktoren bei der Proteinexpression zeigten, dass Pdr5 in der späten logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ > 2,8), d.h. ohne Stickstoffquelle normalerweise abgebaut wird, während der homologe ABC-Transporter Pdr15 verstärkt exprimiert wird. Die optimierten Expressionsbedingungen führten zu einer Erhöhung der Proteinausbeute. Die Präparation der angereicherten Plasmamembranen wurde entsprechend den Angaben unter Abschnitt B 2.4.6

durchgeführt, so dass nach Abtrennung der Mitochondrien für alle PDR5 Varianten nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation hoch homogene Plasmamembran Präparationen erhalten wurden.

Mit Ausnahme des Deletionsstammes $\Delta 5$, konnte für die verschiedenen PDR5 Expressionsstämme eine dominante Pdr5-Bande mit einer Größe von 170kDa nachgewiesen werden. Zusätzlich war in allen Präparationen eine weitere dominante Proteinbande erkennbar, die mit Hilfe der Massenspektrometrie eindeutig als Plasmamembran Protonenpumpe Pma1 identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Der Proteingehalt des PDR ABC-Transporters Pdr5 war dabei für alle PDR5 Mutanten innerhalb geringfügiger Variationen, bedingt durch die Präparationsdurchführung, identisch. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung C 13 eine SDS-PAGE und entsprechende Western Blot Analyse mittels des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers gezeigt.

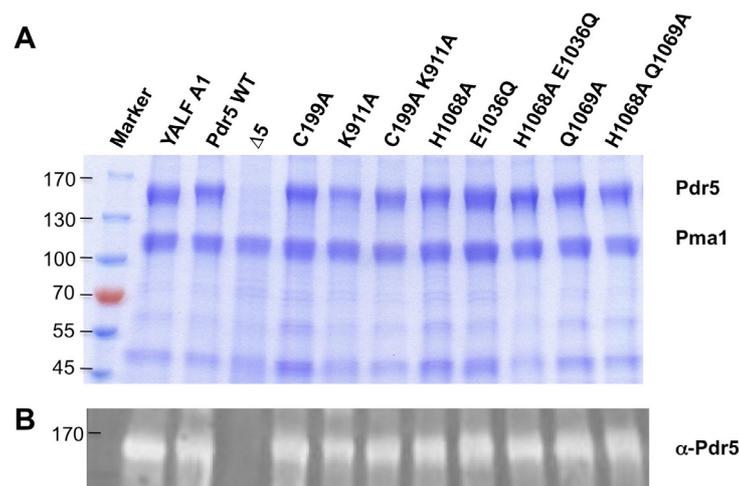


Abbildung C 13: SDS-PAGE und Western Blot Detektion der angereicherten Plasmamembran Präparationen verschiedener PDR5 Varianten

A) 7%ige SDS-PAGE der angereicherten Plasmamembran Präparationen nach Coomassie-Brilliant Blau Färbung. Es wurden jeweils 12 μ g aufgetragen. Die Proteinbanden der beiden Membranproteine Pdr5 und Pma1 sind am rechten Bildrand entsprechend beschriftet. **B)** Ausschnitt der Western Blot-Detektion mit dem polyklonalen α -Pdr5 Antikörper nach Auftrennung der Plasmamembran-Präparationen über eine 7%ige SDS-PAGE ist gezeigt. Dabei wurden 6 μ g der verschiedenen Proben aufgetragen.

2.2.2.1. ATPase- und Transportaktivität

Die *in vitro* Analyse der konservierten Aminosäurereste erlaubte eine direkte Gegenüberstellung der Effekte auf die ATPase Aktivität einerseits und auf die Transportaktivität andererseits. Unmittelbar nach der Präparation der angereicherten Plasmamembranen wurden die Einflüsse der PDR5 Modifikationen auf beide Aktivitäten untersucht.

Dabei wurde zur Analyse der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität der Inhibitor Oligomycin verwendet (135). Die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 konnte über die Differenz der vermessenen freien Phosphatmenge in Abwesenheit und Anwesenheit des Pdr5 Inhibitors bestimmt werden. Zur Verringerung störender Hintergrundsignale durch verbliebene ATPasen und/oder Phosphatasen in der Plasmamembran wurden zusätzliche Hemmstoffe bei den Reaktionsansätzen eingesetzt. So wurde stets Natriumazid zur Inhibition der F_1F_0 -ATPase und anderer P-Typ ATPasen verwendet, Kaliumnitrat wurde zur Inhibition vakuolärer ATPasen eingesetzt und Ammoniummolybdat zur Blockierung saurer Phosphatasen (170). Zudem diente die Deletionsmutante $\Delta 5$ als Kontrolle für die Identifizierung der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität.

Nach dem gleichen Prinzip wurde auch der Pdr5-vermittelte R6G Transport in den hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen ermittelt, d.h. auch bei diesem Verfahren konnte zur Überprüfung der Transportaktivität von Pdr5 der Inhibitor Oligomycin eingesetzt werden (133, 167). Jedoch wurde im Gegensatz zum R6G Transport in ganzen Zellen der aktive Transport von R6G durch Pdr5 vermessen und nun über eine Fluoreszenzauslöschung, also über die Abnahme des Fluoreszenzsignals, detektiert. Aufgrund einer elektronenmikroskopischen Analyse der Pdr5 Plasmamembran-Präparationen schienen die Plasmamembranen durch das Präparationsverfahren neben Plasmamembran-Bruchstücken überwiegend in Vesikeln vorzuliegen (Daten nicht gezeigt).

Bei einer Fluoreszenzauslöschung durch den R6G Transport werden die R6G-Moleküle in die Vesikel transportiert, nachdem der Transporter durch die Zugabe von ATP aktiviert worden war. Die voluminösen NBDs sind dabei aufgrund des begrenzten Raumes in den Vesikeln nach außen gekehrt, während sie in der Zelle im Zytosol lokalisiert sind. Zudem wurde der Transport nun *in vitro* gegen ein Konzentrationsgefälle vermessen. Die Membranen wurden nur für kurze Zeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert, bis zur Einstellung eines stabilen Fluoreszenzsignals

bedingt durch das Diffusionsgleichgewicht. Erst dann wurde die ATP/Mg²⁺ abhängige Fluoreszenzabnahme detektiert.

Die Pdr5 sensitive ATPase konnte über einen relativ breiten pH Bereich detektiert werden, mit einem Optimum bei pH 9,5. Hingegen in Membranen des Kontrollstammes $\Delta 5$, in denen das PDR5 Gen deletiert war, wurde keine nennenswerte ATPase Aktivität vermessen. Entsprechend, konnte auch nur in den Pdr5 Membranen ein aktiver R6G Transport detektiert werden, die eine basale ATPase Aktivität aufwiesen (Abbildung C 14 A und D). Der Transport des R6G durch den ABC-Transporter Pdr5 konnte auch durch Zugabe des Inhibitors Oligomycin blockiert werden und die Reversibilität über die Rückdiffusion des Fluoreszenzfarbstoffs verfolgt werden (Daten hier nicht gezeigt, siehe Abschnitt 2.4.2.).

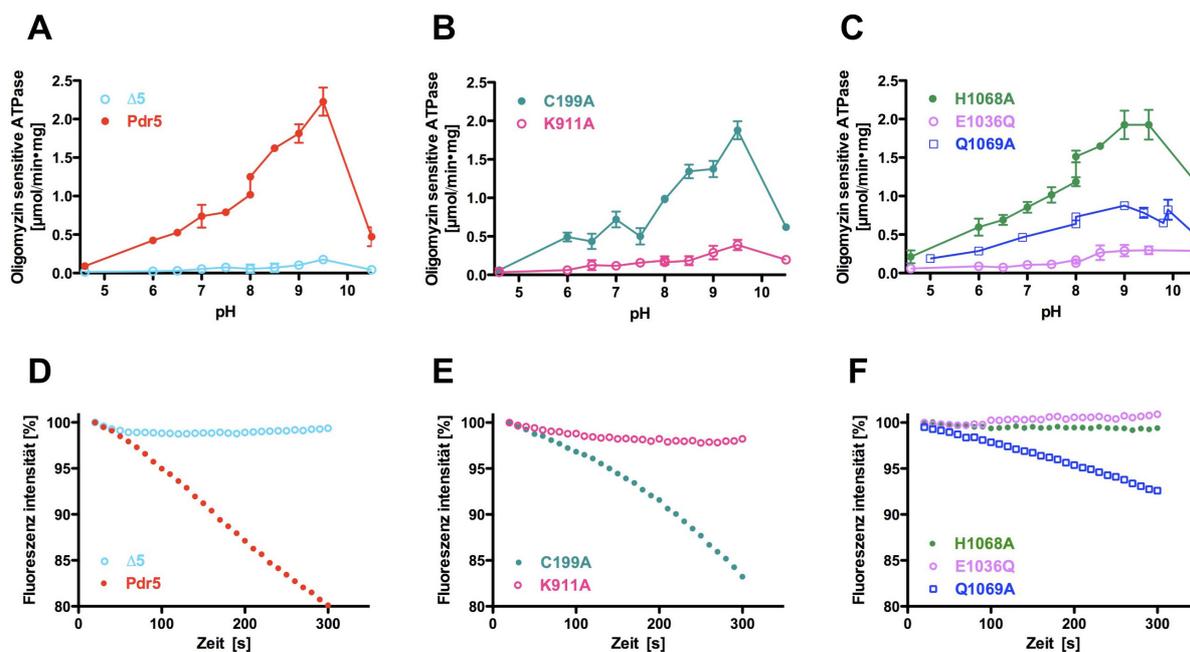


Abbildung C 14: Pdr5 spezifische ATPase Aktivität und R6G Transport

A-C) Gezeigt ist die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität der verschiedenen Einzelmutanten bei unterschiedlichen pH Werten zwischen pH 4,5 und pH 11. Die aufgetragene ATPase Aktivität entspricht der Differenz der vermessenen Aktivität in An- und Abwesenheit von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligomycin. Zudem wurden verschiedene Inhibitoren wie Azid, Kaliumnitrat und Ammoniummolybdat zur Hemmung möglicher störender Komponenten in den Plasmamembran-Präparationen verwendet. **D-F)** Der ATP/Mg²⁺-abhängige R6G Transport vermittelt durch den ABC-Transporter Pdr5 ist für die verschiedenen Mutanten dargestellt. Der Reaktionsansatz bestand aus der Proteinprobe (30 μg) in 50mM HEPES pH 7,0, 150nM R6G, 5mM MgCl₂, 10mM NaN₃. Ansonsten wurden die Messungen analog zu den Beschreibungen im Material und Methodenteil durchgeführt.

Die C199A Mutante in NBD1 besaß eine vergleichbare ATPase- und R6G Transportaktivität zu „wildtypischem“ Pdr5. Im Gegensatz dazu wies die korrespondierende Mutation des Lysins in NBD2 nur eine marginale ATPase Aktivität auf, und es konnte auch kein R6G Transport nachgewiesen werden (Abbildung C 14 B und E). Der Effekt der Walker A Doppelmutante C199A K911A wurde dabei eindeutig durch den Einfluss der K911A Einzelmutante in der NBD2 dirigiert (Abbildung C 15). Diese Daten sprechen für die Notwendigkeit eines funktionalen Walker A Motivs in der C-terminalen NBD für den aktiven Multidrogentransporter Pdr5, während die N-terminale NBD vermutlich eher regulatorische Funktionen übernimmt.

Ein ganz anderes Bild zeichnete sich bei der Analyse der putativen katalytischen Dyade ab. In Einklang mit den *in vivo* Daten zeigte die E1036Q Mutante weder eine basale ATPase Aktivität noch eine Transportaktivität für das Toxin R6G. Entsprechend verhielt sich auch die Q1069A Mutante des Glutamins in direkter Nachbarschaft zum H-loop. In einer katalytischen Dyade könnte auch das Glutamin alternativ zum Histidin des H-loops als Wasserstoffbrückendonator fungieren. Die Q1069A Mutante zeigte zwar eine geringere ATPase Aktivität als der Wildtyp, war aber auch eindeutig in der Lage R6G zu transportieren. Die H1068A Mutation hingegen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität (Abbildung C 14 C), während der R6G Transport komplett geblockt zu sein schien. Analog zum Resistenztest auf rhodaminhaltigen Agarplatten konnte kein R6G Transport nachgewiesen werden (Abbildung C 10 und Abbildung C 14 F). Auch die entsprechende Doppelmutante H1068A Q1069A verhielt sich wie die H1068A Einzelmutante, während die Aktivität der H1068A E1036Q Mutante ähnlich gering wie die der E1036Q Mutante war (Abbildung C 15).

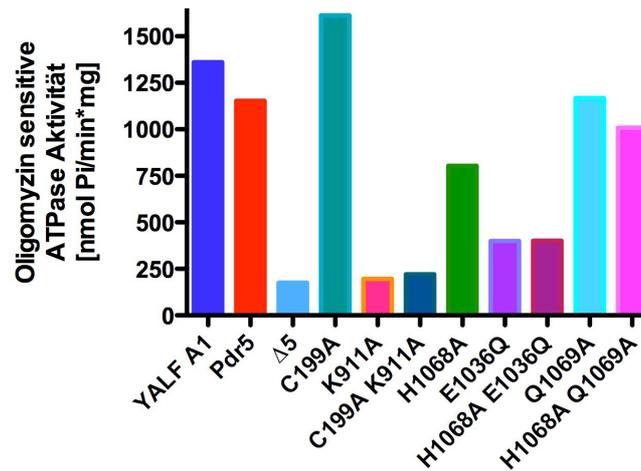


Abbildung C 15: Pdr5-spezifische ATPase Aktivität

Die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität der verschiedenen PDR5 Varianten wurde im direkten Vergleich bei einem pH von 9,5 vermessen.

In Kombination mit den gesammelten *in vivo* Daten deuten diese Ergebnisse darauf, dass das Histidin des H-loops (H1068A) für die ATP-Hydrolyse in dem PDR ABC-Transporter Pdr5 keine essentielle Rolle übernimmt. Auch eine mögliche Übertragung der Funktion als Wasserstoffbrückendonator auf das benachbarte Glutamin (Q1069A), scheint aufgrund der Daten unwahrscheinlich.

Dennoch konnte mit Hilfe der verschiedenen Analysemethoden *in vivo* und *in vitro* für das Histidin des H-loops in NBD2 eine besondere Rolle der Aminosäure für die Funktion des Transporters festgestellt werden. Obwohl das Histidin unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität des Transporters ausübt, führte die Substitution des Histidins zu einem veränderten Substratspektrum, wie am Beispiel der Drogenresistenztests gezeigt werden konnte (Abbildung C 10). Diese Beobachtungen könnten einerseits zu dem Schluss führen, dass die beiden Mechanismen in der Mutante unabhängig voneinander ablaufen und die gemessene ATPase Aktivität nicht zwingend mit dem Substrattransport in den TMDs verknüpft ist. Andererseits deutet der Effekt der H1068A Mutante auf das Substratspektrum auf einen direkten Einfluss der Aminosäure in der NBD auf die Prozesse in den TMDs. Demzufolge scheint das Histidin des H-loops in der NBD2 mehr oder weniger unmittelbar an der Kopplung zwischen den beiden funktionalen Domänen beteiligt zu sein.

In einer parallelen Analyse der ATPase Aktivität des Wildtyps Pdr5 und der H1068A Mutante wurde die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Toxine vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 durch relativ voluminöse Toxine wie R6G, KTC oder dem Macrolacton FK506, einem bekannten Inhibitor in der Multidrogenresistenz, gehemmt werden konnte. Im Vergleich waren jedoch für die H1068A Mutante teilweise höhere Substratkonzentrationen nötig, um eine 50%ige Inhibition (K_i -Wert) der ATPase Aktivität zu erreichen. Diese Daten unterstützen die These, dass das Histidin im *H-loop* an der Kommunikation zwischen der ATP-Hydrolyse und Substrattransport beteiligt ist (167).

2.3. Funktionelle Analyse der Degeneration in Pdr5

Im Kontrast zu vielen MDR ABC-Transportern zeichnet sich Pdr5 und auch seine homologen Vertreter in anderen meist pathogenen Pilzen durch eine konservierte Degeneration der NBDs aus (siehe Sequenzvergleich in Abschnitt 2.1 Abbildung C 8). Die drei zentralen Motive, das Walker A Motiv, das Walker B Motiv und der *H-loop* der N-terminalen NBD, als auch das Signaturmotiv in der C-terminalen NBD sind degeneriert, während ihre entsprechenden Gegenstücke konserviert sind. Bei der Analyse der katalytisch aktiven Aminosäuren in Abschnitt 2.2 konnte bereits eine funktionale Asymmetrie der NBDs in Pdr5 durch die Mutagenese der konservierten Motive in der C-terminalen NBD beobachtet werden. In Ergänzung dazu wurden nun in Pdr5 die konservierten jedoch degenerierten Sequenzmotive das Walker A und B Motiv, der *H-loop* der N-terminalen NBD aber auch der degenerierte *C-loop* der C-terminalen NBD zurückmutiert, um die Bedeutung dieses evolutionären Unterschieds für die Funktionalität der eukaryotischen Einzeller zu analysieren.

Die Auswahl der verschiedenen Mutationen wurde dabei, wie unter Abschnitt 2.1 beschrieben (Abbildung C 8), auf der Grundlage von Sequenzvergleichen mit verschiedenen ABC-Transportern getroffen. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung C 16 ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs in Kombination mit einem schematischen Topologiemodel von Pdr5 gezeigt, in dem die degenerierten und mutierten Aminosäuren in den einzelnen Motiven farblich (orange) hervorgehoben sind.

Die Klonierung erfolgte analog den bisher beschriebenen Mutanten auf der Grundlage des pRE5 Plasmids und der anschließenden Rekombination in den Klonierungsstamm $\Delta PDR5\Delta PDR5prom$ (ΔPP). Für die Rekonstruktion des Walker A Motivs wurde das bereits in Abschnitt 2.2 beschriebene Cystein nun in das korrespondierende Lysin mutiert. Nachträglich wurde auch das Prolin an Position 195 im Walker A Motiv der N-terminalen NBD ausgewählt und in das bei den meisten ABC-Transportern vorkommende Serin mutiert. Im Gegensatz zu vielen anderen ABC-Transportern ist in den PDR-Vertretern anstelle des Serins ein Prolin im Walker A Motiv der N-terminalen NBD konserviert. Das Prolin hat aufgrund seiner Ringstruktur einen großen Einfluss auf die Flexibilität des Motivs und könnte somit auch einen direkten oder indirekten Effekt auf die Aktivität des Transporters ausüben.

Für den ABC-Transporter HlyB konnte z.B. aufgrund biochemischer und struktureller Analysen eine besondere Rolle für das korrespondierende Serin im Walker A Motiv in der Koordination von TNP-ADP nachgewiesen werden (171). Gleichzeitig diente es dabei auch als Koordinationspartner zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Aspartat des D-loops. Der Walker B und der H-loop in der ersten NBD wurden durch die komplementäre Substitution mit einem Glutamat (N334E) und einem Histidin (Y367H) zurückmutiert. Im C-loop wurden die degenerierten Aminosäuren Asparagin, Valin und Glutamat durch ein Serin und zwei Glyzine ersetzt.

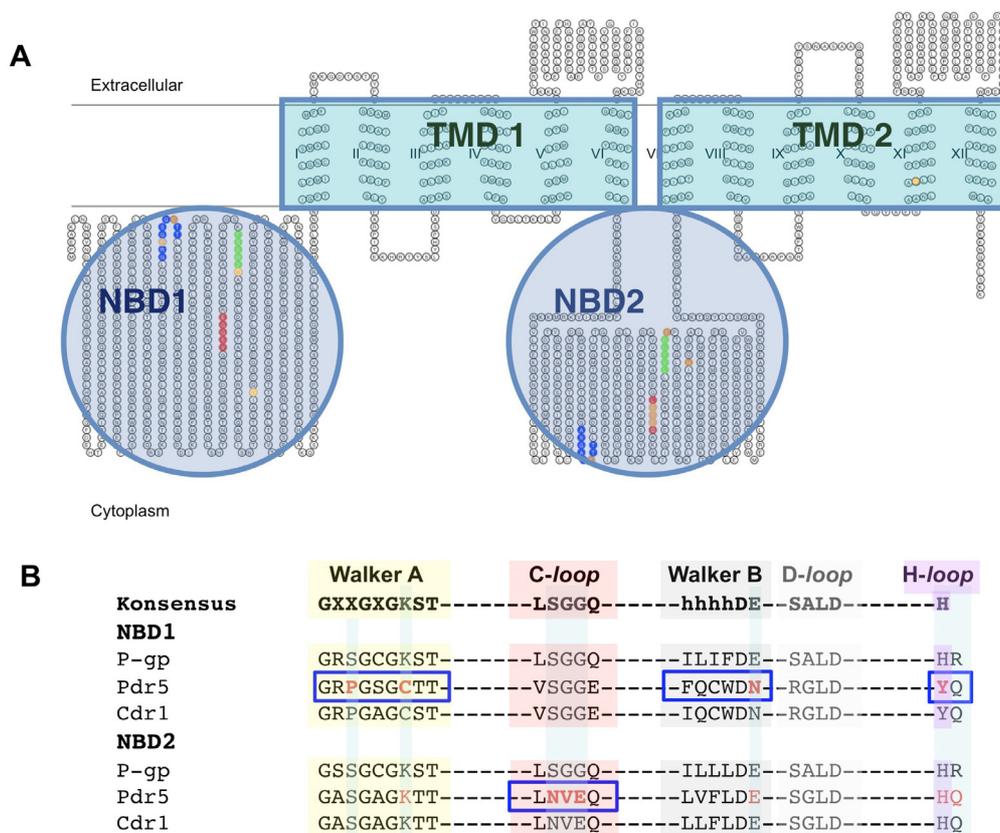


Abbildung C 16: Schematische Darstellung von Pdr5 und Lokalisation der degenerierten Aminosäuren in den NBDs

A) Das Topologiemodell wurde mit Hilfe des TMHMMfix Algorithmus auf der Grundlage von Hydrophobizitätsplots erstellt (167). **B)** Ausschnitt des Sequenzvergleichs von Pdr5, seinem homologen Vertreter Cdr1 aus *C. albicans* und dem humanen MDR ABC-Transporter P-gp. Die zentralen Sequenzmotive, die von einer Degeneration betroffen sind, sind in blau gekennzeichnet. Die entsprechenden Motive sind in dem Topologiemodell farblich hervorgehoben. Die Lokalisation der mutierten Aminosäuren sind in der schematischen Darstellung von Pdr5 in orange gekennzeichnet.

Zur Charakterisierung der Degeneration wurden zunächst die einzelnen Motive zurückmutiert. Der vollständig zurückmutierte Transporter wurde im Anschluss generiert und analysiert. Zusätzlich wurden auch verschiedene Mehrfachmutanten geplant, generiert und analysiert, bestehend aus dem zurückmutierten H- und C-loop. Die unterschiedlichen Mutanten sind in Tabelle C 3. aufgelistet.

Tabelle C3: Mutanten zur Rekonstruktion der Konsensussequenzen

Die farblich hinterlegte Mehrfachmutante wurde auf Plasmidebene generiert und durch Sequenzierungen verifiziert, konnte jedoch nicht erfolgreich in das Hefegenom des Klonierungsstammes rekombiniert werden.

Mutation	Motiv	Abkürzung	Domäne
P195S	Pro im Walker A		NBD1
C199A	Cys im Walker A	A [#]	NBD1
P195S C199K	Pro, Cys im Walker A	Walker A [A]	NBD1
N334E	Asn im Walker B	Walker B [B]	NBD1
Y367H	Tyr im H-loop	H-loop [H]	NBD1
N1011S	Asn im C-loop		NBD2
V1012G	Val im C-loop		NBD2
E1013G	Glu im C-loop		NBD2
N1011S V1012G E1013G	Asn, Val, Glu im C-loop	C-loop [C]	NBD2
Y367H	Tyr im C-loop	HC	NBD1/2
N1011S V1012G E1013G	Asn, Val, Glu im C-loop		
C199A	Cys im Walker A	A [#] HC	NBD1/2
Y367H	Tyr im C-loop		
N1011S V1012G E1013G	Asn, Val, Glu im C-loop		
<i>P195S C199A</i> <i>Y367H</i> <i>N1011S V1012G E1013G</i>	<i>Pro, Cys im Walker A</i> <i>Tyr im C-loop</i> <i>Asn, Val, Glu im C-loop</i>	<i>AHC</i>	<i>NBD1/2</i>
C199A N334E Y367H N1011S V1012G E1013G	Cys im Walker A Asn im Walker B Tyr im C-loop Asn, Val, Glu im C-loop	A [#] BHC	NBD1/2
P195S C199A Y367H N1011S V1012G E1013G	Pro, Cys im Walker A Tyr im H-loop Asn, Val, Glu im C-loop	ABHC	NBD1/2

Die Expression von Pdr5 in den einzelnen Mutanten wurde mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers in Ganzzelllysaten der generierten Hefestämme überprüft. Für alle generierten Hefestämme konnte bis auf eine Ausnahme der Transporter mit Hilfe des Antikörpers nachgewiesen werden. Die A[#]HC Mutante konnte zwar erfolgreich sequenziert werden, jedoch konnte keine Expression des ABC-Transporters Pdr5 nachgewiesen werden. Zudem wurde bei der E1013G Mutante eine trunkierte Formation von Pdr5 exprimiert, wie anhand des Western Blots zu sehen ist. Die Sequenzierung ergab ein StoppCodon unmittelbar nach dem

C-loop der C-terminalen NBD. Demzufolge wurden diese beiden Mutanten in der weiteren funktionellen Analyse nicht berücksichtigt. Die Expression für alle anderen Varianten war dabei vergleichbar mit der Expression im Wildtyp-Stamm Pdr5 (Abbildung C 17).

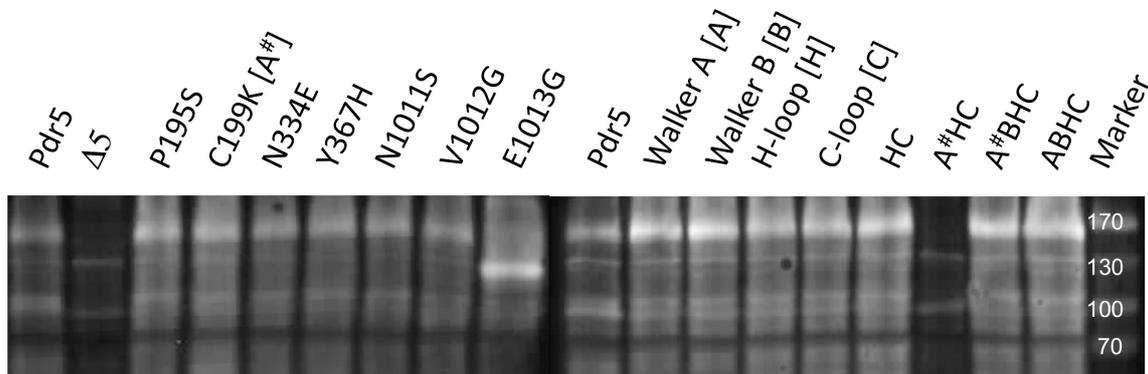


Abbildung C 17: Western Blot Analyse der Pdr5 Expression

0,5 OD₆₀₀ Äquivalente der verschiedenen *S. cerevisiae* Stämme wurden nach der Fällung der Ganzzelllysate über eine 7%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western Blot Analysen erfolgten im Anschluss mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil. Es ist die Expression von Pdr5 für die verschiedenen Hefestämme mit den entsprechend zurückmutierten Sequenzmotiven gezeigt.

2.3.4. Multidrogenresistenz

Um die Bedeutung der Degeneration in den NBDs für die Funktionalität des ABC-Transporters aufzuklären, wurden die verschiedenen Mutanten auf ihre Multidrogenresistenz untersucht. Dazu wurde das Wachstumsverhalten der Hefestämme in Anwesenheit der Zellgifte Cycloheximid (CHX), Fluconazol (FLC) und R6G in Relation zueinander und im direkten Vergleich zum Wildtyp Pdr5 beobachtet und ausgewertet.

Zunächst wurden die Effekte der einzelnen Mutationen in NBD1 im Bezug auf den Walker A, den Walker B und den H-loop ausgewertet. Die Mutationen im Walker A Motiv führten im Vergleich zum Wildtyp zu einer höheren Empfindlichkeit des Transporters gegenüber dem Fungizid Fluconazol. Dabei konnte der Effekt nicht auf eine der mutierten Einzelmutanten zurückgeführt werden, da die P195S Mutante abgesehen von der Resistenz gegenüber Cycloheximid keinen gravierenden Unterschied zum Wildtyp zeigte. Die C199K Mutante hingegen zeigte jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine bessere Verträglichkeit gegenüber Fluconazol (Abbildung C 18 A-C). Der zurückmutierte Walker B führte interessanterweise zu einer

verstärkten Resistenz gegenüber R6G und Fluconazol. Ein analoger Effekt konnte auch für den zurückmutierten *H-loop* beobachtet werden.

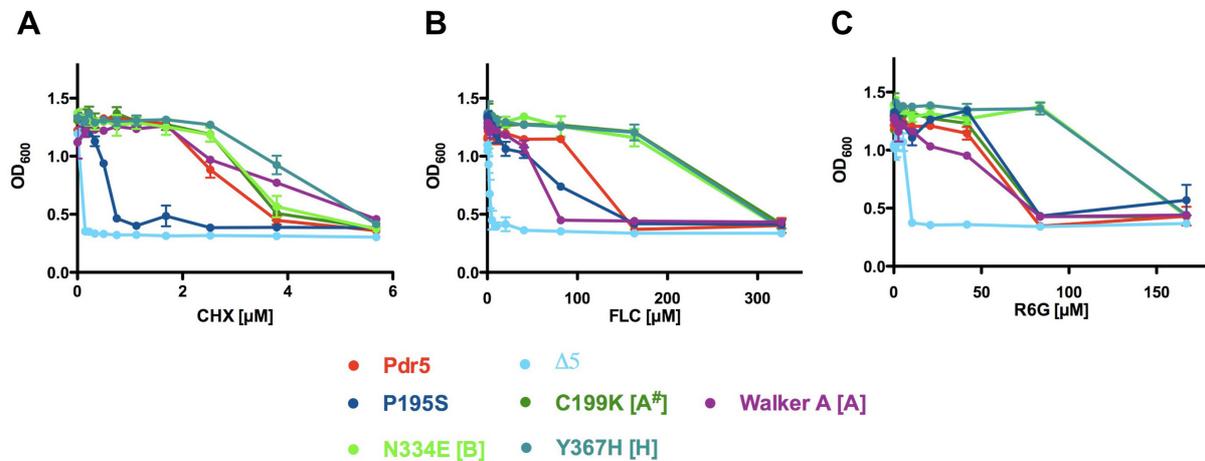


Abbildung C 18: Multidrogenresistenz der Mutationsstudie in der NBD1

A) Resistenztest der mutierten Aminosäuren in den degenerierten Sequenzmotiven der NBD1 von Pdr5. Das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Hefekulturen wurde in Anwesenheit sequenzieller Verdünnungen der verschiedenen Toxine CHX (**A**), FLC (**B**) und R6G (**C**) in YPD-Flüssigkulturen nach einer Inkubationszeit von 48h vermessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken von minimal sechs unabhängigen Experimenten.

Die Rekonstruktion des *C-loops* in der C-terminalen NBD von Pdr5 führte zu keinem erkennbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten der Hefezellen in Anwesenheit der verwendeten Substanzen (Abbildung C 19 A-B). Dabei war jedoch auffallend, dass die Substitution des Asparagins an Position 1011 zu einer verstärkten Resistenz gegenüber allen drei Substraten führte. Während diese Mutante auch bei erhöhten Konzentrationen des Fungizids Fluconazol, dem Translationshemmer Cycloheximid oder dem F_1F_0 ATPase Hemmstoff R6G noch wachsen konnte, verhielt sich die V1012 G Mutante in Anwesenheit der benannten Substrate analog zum Wildtyp. Der positive Effekt der N1011S Mutation scheint in dem vollständig rekonstruierten *C-loop* möglicherweise durch den Einfluss der anderen Mutationen überlagert zu werden.

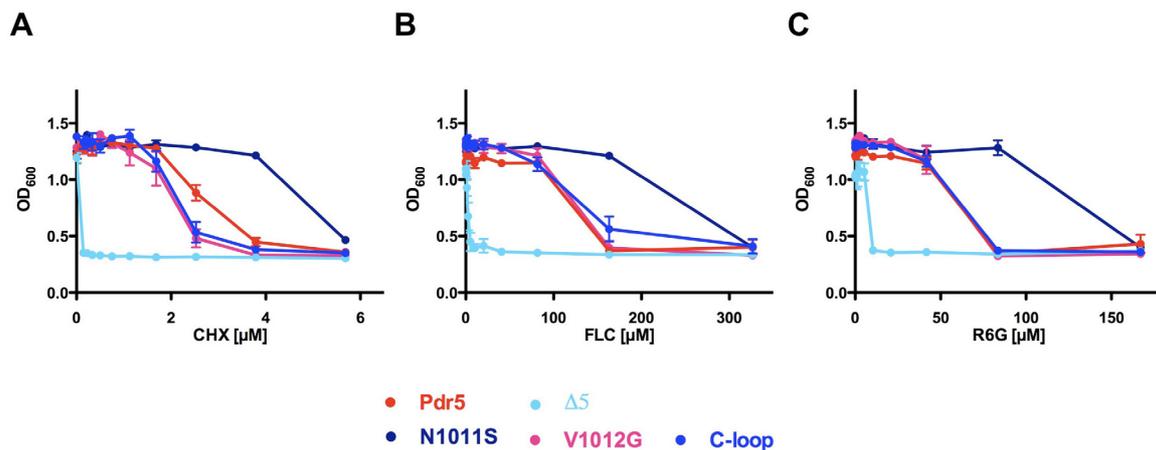


Abbildung C 19: Drogenresistenztest der C-loop Mutanten in NBD2 von Pdr5

Das Wachstumsverhalten der C-Loop Mutanten in NBD2 von Pdr5 wurde entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil in Anwesenheit ansteigender Toxinkonzentrationen dokumentiert. Gezeigt sind die ermittelten Zelldichten aus mindestens 6 unabhängigen Experimenten für die verschiedenen Mutanten bei CHX (A), FLC (B) und R6G (C) nach 48h

Im Anschluss wurden die verschiedenen Mutationen kombiniert untersucht. In Relation zum Wachstumsverhalten der kombinierten Mehrfachmutanten in Anwesenheit der Zellgifte zeigte sich, dass die Rekonstruktion der einzelnen Motive entweder keinen Einfluss auf die Pdr5-vermittelte Multidrogenresistenz hatte oder sogar zu einer Verstärkung (Hyperresistenz) führte (Abbildung C 18, Abbildung C 19). Die einzige Ausnahme stellte dabei das reduzierte Wachstumsverhalten der Walker A Mutante gegenüber Fluconazol dar. Eine Kombination der vollständigen Konsensussequenzen hatte hingegen eine Verschlechterung der Toxinverträglichkeit zur Folge (Abbildung C 20). So zeigte z.B. die HC (H- und C-loop)- Mutante gegenüber allen getesteten Substraten eine stärkere Empfindlichkeit, während die H-loop Mutation allein sogar zu einer verbesserten Resistenz geführt hatte. Die rekonstruierte Mutante A[#]BHC, in der das Walker A Motiv noch das Prolin enthält, verhielt sich ähnlich wie die HC-Mutante oder schlechter. Im Kontrast dazu war die ABHC Mutante mit den vollständig rekonstruierten NBDs im Vergleich kaum noch in der Lage, in Anwesenheit der Substrate zu wachsen.

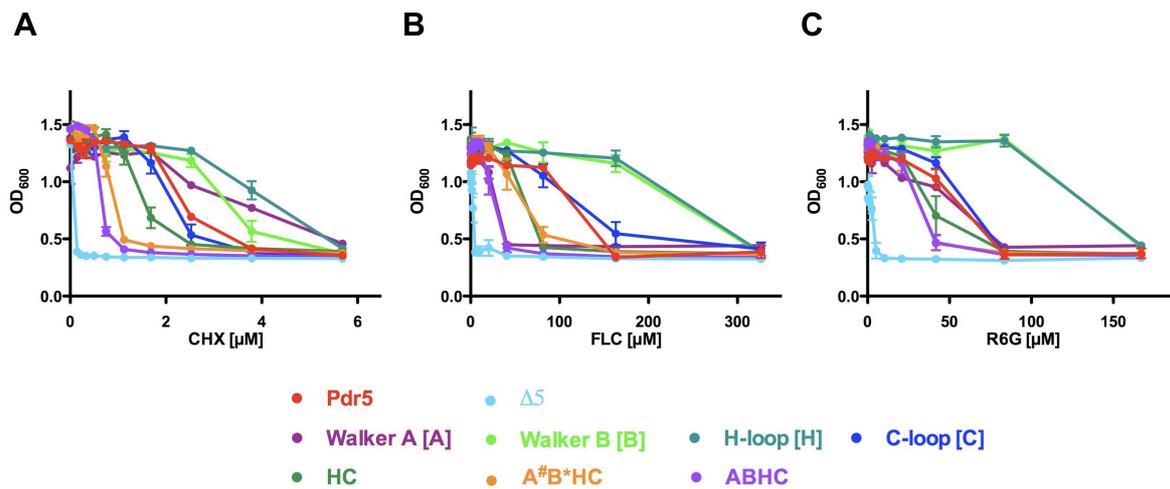


Abbildung C 20: Wachstumsverhalten der rekonstruierten Pdr5 Hefestämme

Die Zellproliferation der unterschiedlichen Hefestämme mit den rekonstruierten Konsensussequenzen wurde in Flüssigkulturen mit variierenden Toxinkonzentrationen CHX (A), FLC (B) oder R6G (C) bestimmt und gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Die Datenanalyse erfolgte anhand von mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

Eine Kombination der rekonstruierten Motive hatte demzufolge nahezu einen vollständigen Verlust des resistenten Phänotyps von Pdr5 zur Folge. Zur weiteren Analyse der beobachteten Effekte durch die Rekonstruktion der konservierten Motive wurden im Anschluss die Aktivitäten der Mutanten *in vitro* untersucht.

2.3.5. Aktivitätsbestimmung der Konsensusmutanten von Pdr5

Die *in vitro* Analyse wurde wie bereits beschrieben in angereicherten Plasmamembran-Präparationen durchgeführt. Dabei wurden für die Aktivitätsbestimmungen die Mutanten mit den jeweils vollständig rekonstruierten Sequenzmotiven präpariert und auch die entsprechenden Kombinationsmutanten HC und ABHC. Zusätzlich wurde auch die N1011S Einzelmutante des C-loops ausgewählt und präpariert, da sie in den Resistenztests im Gegensatz zu den anderen Einzelmutanten im Walker A oder C-loop zu einer Verstärkung der Pdr5-vermittelten Multidrogenresistenz gegenüber allen getesteten Substraten führte.

Das Ergebnis der Plasmamembran-Präparationen für die verschiedenen Mutanten ist in Abbildung C 21 gezeigt. Die Präparationen wurden über eine 7%ige SDS PAGE aufgetrennt und der Pdr5 Gehalt mit Hilfe des polyklonalen Pdr5 Antikörpers verifiziert.

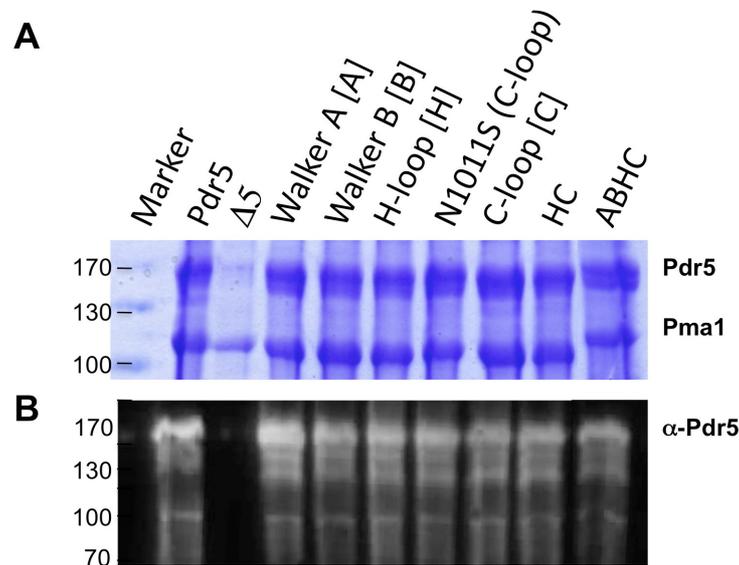


Abbildung C 21: SDS-PAGE und Western Blot- Analyse der NBD-Mutanten

A) Jeweils 15µg der einzelnen Plasmamembran-Präparationen wurden mittels eines 7%igem SDS-Gel aufgetrennt und auf ihre Proteinzusammensetzung geprüft. Die beiden dominanten Proteinbanden für Pdr5 und Pma1 sind in dem Coomassie gefärbten Gel in allen Präparationen erkennbar, abgesehen von der Pdr5 Negativkontrolle $\Delta 5$. **B)** Entsprechende Western Blot Detektion nach der Auftrennung der Proben mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers.

2.3.1.1 Rhodamin 6G Transport Aktivität der Pdr5 Konsensusmutanten

In Ergänzung zum Resistenztest *in vivo* wurde die Funktionalität der Mutanten *in vitro* über die R6G Transport Aktivität untersucht. Dazu wurde der aktive Transport von R6G durch die verschiedenen Pdr5 Modifikationen direkt im Anschluss an die Plasmamembran-Präparationen der unterschiedlichen Mutanten vermessen. Die Detektion erfolgte dabei, wie bereits beschrieben, über die ATP-abhängige Fluoreszenzauslöschung durch die konzentrationsabhängige Ausbildung von nicht fluoreszierenden R6G-Excimeren. Als Negativkontrolle und zur Zuordnung der Pdr5-

vermittelten Aktivität dienten die Deletionsmutante $\Delta 5$ und auch der Einsatz von EDTA.

Im Zuge der Transportanalysen der verschiedenen Mutanten wurden neben der Verwendung des Fluoreszenzspektrometers die Transportaktivitäten zusätzlich auch mit Hilfe eines simultanen Messverfahrens in Mikrotiterplatten gemessen. Die Durchführung wurde dabei im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten in Anlehnung an das Messverfahren mit dem sensitiveren Fluorolog an das ELISA Lesegerät angepasst (Abschnitt B 2.6.4). Dabei wurde jedoch das Fluoreszenzsignal in größeren Zeitintervallen detektiert und diente aufgrund der geringeren Sensitivität des Geräts lediglich zur qualitativen Analyse der Transportaktivität. Die somit gewonnenen Daten konnten dennoch durch die exaktere Vermessung des Fluoreszenzsignals über das Fluorolog bestätigt werden.

In Konsistenz zum Resistenzverhalten gegenüber R6G in Flüssigkulturen konnte in den Plasmamembran-Präparationen der Walker A, Walker B und H-*loop* Mutante der NBD1, wie auch für die beiden C-*loop* Mutanten in NBD2 ein aktiver Transport von R6G durch den ABC-Transporter Pdr5 nachgewiesen werden (Abbildung C 22 A-D). Im Gegensatz dazu konnte bei der verwendeten R6G Konzentration von 300nM sowohl für die HC-Mutante als auch für die ABHC-Mutante mit dem vollständig zurückmutierten NBDs kein aktiver R6G Transport beobachtet werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal war identisch mit dem der „Knock out“ Mutante $\Delta 5$ (Abbildung C 22 E und F). Im Vergleich dazu konnte für beide Mutanten im Gegensatz zur Deletionsmutante auch noch bei geringen R6G Konzentrationen ein Wachstum verzeichnet werden.

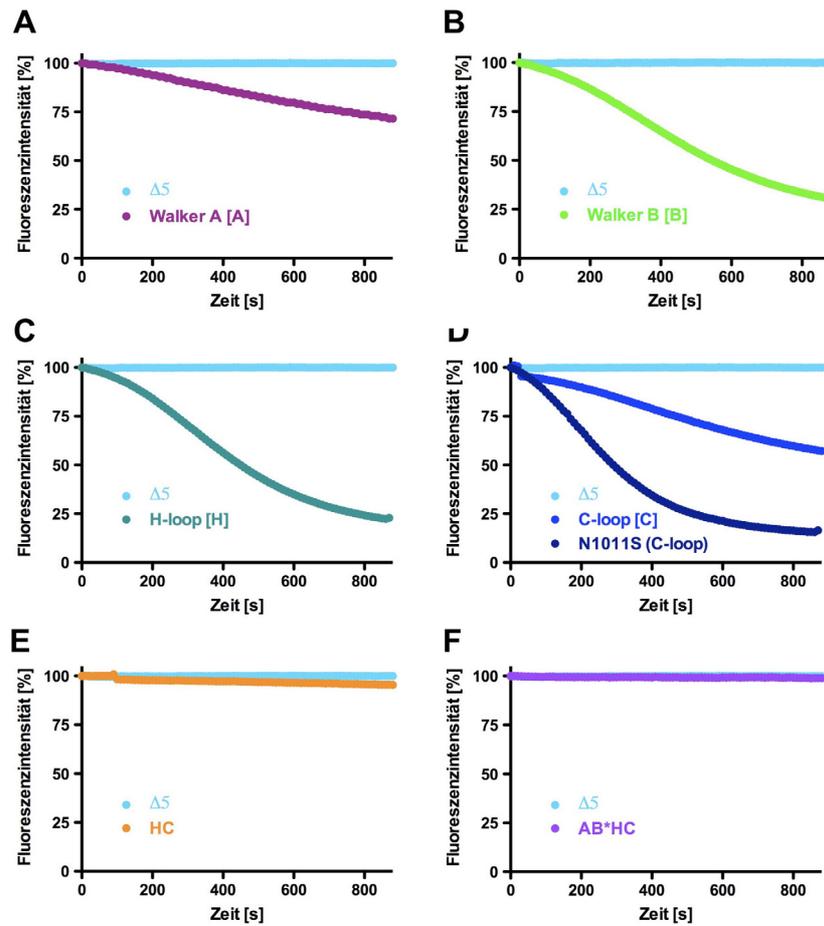


Abbildung C 22: Aktiver R6G Transport in Plasmamembran-Präparationen der NBD-Mutanten

Plasmamembran-Präparationen (20 μ g) wurden in Reaktionspuffer mit 300nM R6G und 10mM $MgCl_2$ zur Initiierung des Transports mit 10mM ATP versetzt und das Fluoreszenzsignal detektiert. Für die Walker A (A), Walker B (B), H-loop (C) und C-loop (D) Mutanten konnte auch eine Rückdiffusion des R6G Farbstoffs nach Zugabe von EDTA beobachtet werden (nicht gezeigt).

In Relation zum Resistenztest scheint sich der positive Effekt der Walker B, H-loop und N1011S Mutation des C-loop auch im zeitabhängigen Verlauf der Fluoreszenzauslöschung widerzuspiegeln, da für die benannten Mutanten entsprechend ihrer Hyperresistenz gegenüber R6G eine rasche Fluoreszenzabnahme und daraus impliziert eine hohe R6G Transportrate beobachtet werden konnte. Eine Aussage über die tatsächliche Transporteffizienz kann allerdings nur über eine kinetische Analyse getroffen werden. Dazu wurde der Pdr5-vermittelte Transport bei verschiedenen R6G Konzentrationen vermessen und die Transportraten über die zeitabhängige Fluoreszenzabnahme zur Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten herangezogen.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung C 23 die kinetische Analyse des Pdr5-vermittelten R6G Transports durch den Pdr5 Wildtyp dargestellt.

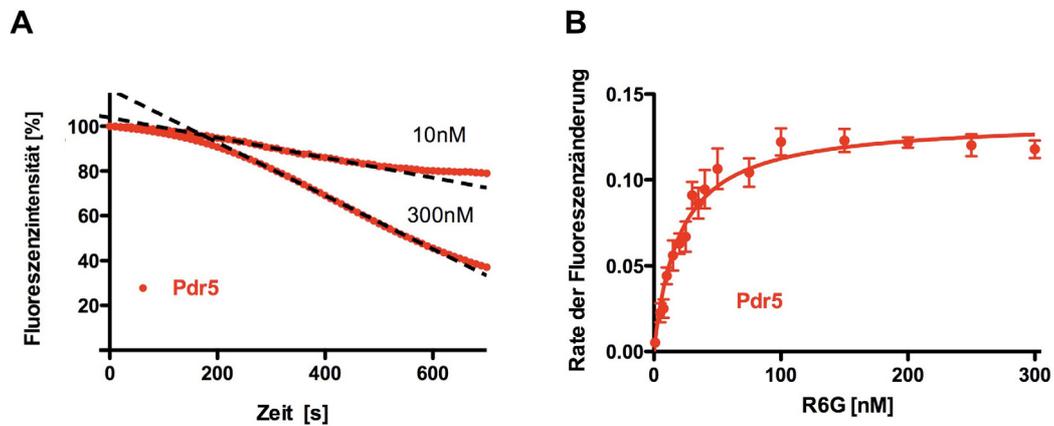


Abbildung C 23: Kinetische Analyse des Pdr5-vermittelten R6G Transports

A) Der zeitabhängige Verlauf der ATP-abhängigen Fluoreszenzauslöschung durch den Pdr5-vermittelten R6G Transport in Plasmamembran-Präparationen des Pdr5 Wildtyps ist exemplarisch bei zwei verschiedenen R6G Konzentrationen gezeigt. Der Transport wurde jeweils durch die Zugabe von 10mM ATP zum Reaktionspuffer gestartet und das Fluoreszenzsignal detektiert. Die lineare Regression zur Bestimmung der Transportrate ist entsprechend im Kurvenverlauf hervorgehoben. **B)** Michaelis Menten Kinetik des R6G Transports durch den Wildtyp. Die Transportraten sind in Abhängigkeit von der verwendeten R6G Konzentration im Reaktionspuffer aufgetragen. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der GraphPad software entsprechend den Beschreibungen im Material und Methodenteil. Die Michaelis Menten Konstanten für den Wildtyp Pdr5 als auch für die unterschiedlichen Modifikationen sind in Tabelle C5 dargestellt.

Die ermittelten K_m Werte waren dabei im Rahmen des experimentellen Fehlers für alle Mutanten vergleichbar mit dem K_m Wert des Wildtyps Pdr5 (Tabelle C4). Folglich konnte der beobachtete Effekt für die isolierten Konsensusmutanten im Resistenztest aufgrund der K_m Werte nicht erklärt werden. Der Vergleich der dimensionslosen maximalen Transportraten scheint jedoch auf einen Unterschied hinzudeuten. So konnten für die H-loop und die N1011S C-loop Mutante erhöhte Werte in Relation zum Wildtyp ermittelt werden, während die entsprechenden Werte für die Walker A und C-loop Mutante um mehr als die Hälfte kleiner waren. Hingegen für die Walker B Mutante N334E konnte kein Unterschied in der Kinetik festgestellt werden.

Tabelle C4: Michaelis Menten Kinetik des R6G Transports der NBD Mutanten

Die Parameter wurden mit Hilfe der GraphPad software aufgrund der Transportraten von minimal zwei Datensätzen generiert

PDR5 - Variante	K_m [mM]	v_{max} [Δ% /s]
Pdr5	20,1 ± 2,9	0,135 ± 0,01
Walker A [A]	25,3 ± 6,6	0,041 ± 0,003
Walker B [B]	21,4 ± 3,3	0,119 ± 0,01
H-loop [H]	18,7 ± 3,4	0,155 ± 0,01
N1011S (C-loop)	21,1 ± 4,5	0,325 ± 0,02
C-loop [C]	20,2 ± 7,5	0,051 ± 0,005

Die Bedeutung der Rekonstruktion der einzelnen Konsensusmotive für die ATPase Aktivität von Pdr5 wurde im Anschluss analysiert. Erste Daten, die eine funktionelle Asymmetrie der NBDs bestätigen, konnten bereits in Abschnitt 2.2 aufgrund der funktionellen Analyse der Cysteinmutante C199A im Walker A in Relation zur korrespondierenden Lysinmutante K911A in der zweiten NBD, generiert werden. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob und wenn ja welchen Effekt die kombinierte Rekonstruktion der Sequenzmotive auf die Hydrolyse Aktivität von Pdr5 hat.

2.3.1.2 Analyse der ATPase Aktivität

In Einklang mit den gewonnenen Daten aus dem Resistenztest und dem aktiven R6G Transport konnte für die Walker A, Walker B und H-loop Mutante der NBD1 wie auch für die beiden C-loop Mutanten in NBD2 eine Pdr5 spezifische ATPase Aktivität ermittelt werden (Abbildung C 24). Die gemessenen Aktivitäten waren dabei für alle fünf Mutanten in Relation zum Wildtyp in der gleichen Größenordnung. Im Kontrast zur symmetrischen ABHC Mutante konnte auch für die HC-Mutante eine Pdr5 spezifische ATPase Aktivität bestimmt werden. Jedoch war die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp etwas niedriger. Die Analyse der Oligomycin-sensitiven ATP-Hydrolyse der ABHC Mutante ergab nur eine geringe Aktivität, die im

experimentellen Fehler vergleichbar mit der Restaktivität der Pdr5 Negativkontrolle $\Delta 5$ war.

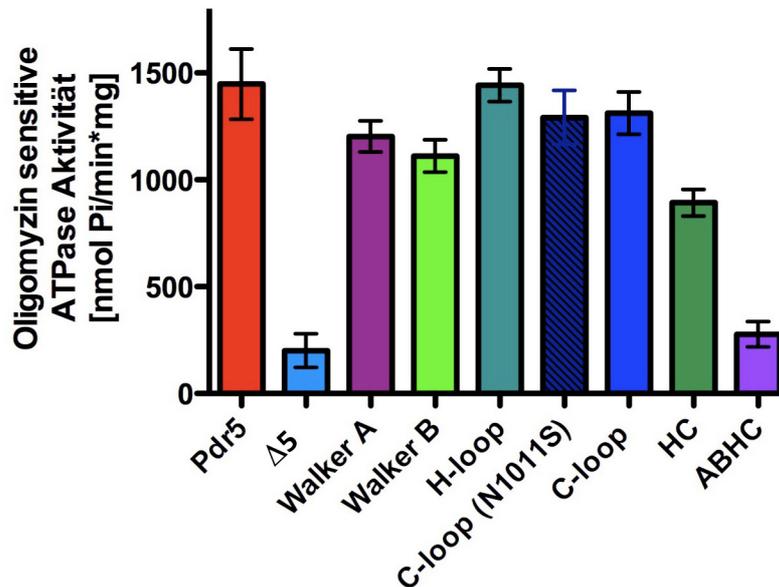


Abbildung C 24: Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität der Konsensusmutanten

Die verschiedenen Konsensusmutanten wurden entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil auf ihre Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität bei einem pH von 9,5 untersucht.

Vor dem Hintergrund das eventuelle Unterschiede in der Umsatzzahl zu einer veränderten Transportaktivität geführt haben könnten, wurde auch eine kinetische Analyse der ATP-Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität der unterschiedlichen Mutanten bei einem pH von 9,5 und unterschiedlichen ATP Konzentrationen bestimmt und mit der Aktivität des wildtypischen Pdr5 Stammes verglichen.

Die Analyse der Michaelis Menten Kinetik der basalen ATPase Aktivität von Pdr5 und den verschiedenen NBD Mutanten konnte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten aufzeigen (Tabelle C5). Eine Ausnahme stellten lediglich die kinetischen Parameter der *H-loop* Mutante im Vergleich zum Wildtyp dar. Im Hinblick auf die Umsatzzahl der ATP Hydrolyse sollte sich jedoch der Effekt wieder nivellieren, da sowohl der K_m als auch der v_{max} den 2fachen Wert im Vergleich zu den anderen PDR5 Varianten betrug.

Tabelle C5: Michaelis Menten Kinetik der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität

Die Parameter wurden mit Hilfe der GraphPad software aufgrund der Transportraten von minimal zwei Datensätzen generiert

PDR5 - Variante	K_m [mM]	v_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$]
Pdr5	1,71 \pm 0,71	1,33 \pm 0,23
Walker A [A]	1,06 \pm 0,27	1,50 \pm 0,13
Walker B [B]	1,97 \pm 0,5	1,15 \pm 0,13
H-loop [H]	4,08 \pm 1,49	2,09 \pm 0,46
N1011S (C-loop)	1,46 \pm 0,31	1,34 \pm 0,11
C-loop [C]	1,36 \pm 0,46	1,33 \pm 0,17
HC	1,04 \pm 0,23	1,37 \pm 0,10
ABHC	1,80 \pm 0,59	0,21 \pm 0,03

Demzufolge scheinen die einzelnen Mutationen gar keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität zu haben, während die Transportkinetik für R6G durch die Rekonstruktion einzelner Motive teilweise verändert wurde. Es liegt daher nahe, dass die Degeneration der Konsensusmotive eine regulatorische Bedeutung für den Transportprozess hat. Bemerkenswert sind die beobachteten Parallelen zwischen der im Abschnitt 2.1 beschriebenen Analyse der H1068A Mutante in der C-terminalen konservierten NBD und der HC-Mutante der entsprechenden degenerierten Motive. Während die Einzelmutante zu einem verstärkten Phänotypen führte, zeigte die Kombination des rekonstruierten H-loops mit dem C-loop einen gegenteiligen Effekt. Analog zu den Beobachtungen, die bei der Analyse der H1068A Mutante in NBD2 gemacht wurden, zeigte die HC-Mutante zwar eine basale ATPase Aktivität, wies aber keine Transportaktivität mehr für R6G auf. Zudem zeigte eine Analyse der R6G-vermittelten Inhibition der ATPase Aktivität der HC-Mutante, dass im Vergleich zum Wildtyp wesentlich höhere R6G Konzentrationen benötigt werden (Abbildung C 25).

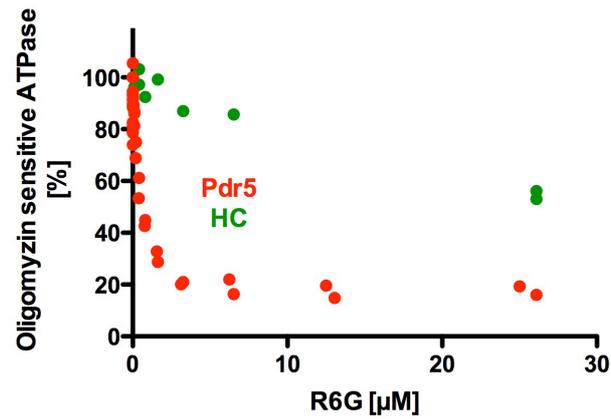


Abbildung C 25: Inhibition der basalen Aktivität durch R6G

Die ATP-Hydrolyse in Plasmamembran-Präparationen des Wildtyps Pdr5 und der HC-Mutante wurde in Anwesenheit ansteigender R6G Konzentrationen gemessen und entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil B 2.6.5 analysiert. Die Inhibition der ATPase Aktivität ist in Relation zur Ausgangsaktivität in Abwesenheit des Toxins gegen die eingesetzte R6G Konzentration aufgetragen.

2.4. Biochemische und biophysikalische Untersuchung der Verknüpfung zwischen NBDs und TMDs

Um die Art der Kommunikation zwischen der Energiesynthese in den NBDs und der Substratselektion und Substrattranslokation in den TMDs besser zu verstehen, wurde der MDR ABC-Transporter Pdr5 auf spezifische Interaktionen hin untersucht. Im Detail bedeutet das, dass neben der funktionellen Analyse des Transporters auch die Substrate, also die Toxine und die möglichen Energiequellen in Relation zur Aktivität des Transporters charakterisiert wurden.

2.4.1. Interaktionsstudien mit dem Immunsuppressor FK506

2.4.1.1 Multidrogenresistenz der S1360F Mutante

Zunächst wurden die Interaktionen des makrozyklischen Lactons FK506 mit dem ABC-Transporter Pdr5 im direkten Vergleich mit der Serinmutante S1360F im Detail analysiert. Bereits aus früheren Studien war bekannt, dass das Immunsuppressivum FK506 sowie einige seiner Derivate inhibierend auf die von ABC-Transportern vermittelte Multidrogenresistenz wirkt (129, 172). Die S1360F Mutation in Pdr5 stellte jedoch eine Ausnahme dar, da diese Mutante auch in Anwesenheit des Immunsuppressivums FK506 ihre Funktion als Multidrogentransporter beibehält (101). Die Mutation ist entgegen früheren Annahmen in der 11. Transmembranhelix (TMH) der zweiten TMD lokalisiert, einer Region, die vermutlich an der Substraterkennung und Translokation beteiligt ist (101). Das hydrophile Serin gehört abgesehen von anderen polaren Aminosäuren im Kern dieser Helix zu den wenigen konservierten Aminosäuren in den TMDs der PDR Vertreter (Abbildung C 26).

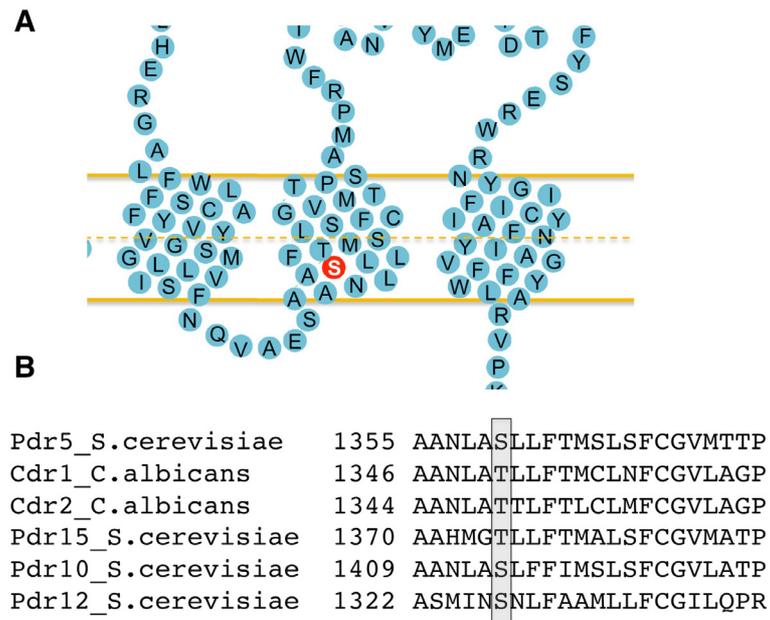


Abbildung C 26: Lokalisation der S1360F Mutante

A) Schematische Darstellung der TMHs 10-12 in der C-terminalen TMD von Pdr5. **B)** Ausschnitt eines Sequenzvergleichs verschiedener PDR-Vertreter für die TMH 11. Die Position des Serins ist entsprechend hervorgehoben.

Aufgrund dieser Eigenschaften wurde diese Mutante ausgewählt, um die Funktionalität aber auch die Interaktionen des MDR ABC-Transporters Pdr5 unter dem Einfluss von FK506 genauer zu untersuchen. Die S1360F Mutante wurde dazu analog zu den bisher beschriebenen Mutanten in den Δ PP Klonierungsstamm kloniert und somit chromosomal mit einem 14Histidin-Affinitätstag fusioniert. Die Expression von Pdr5 in der S1360F Mutante war dabei übereinstimmend mit dem wildtypischen Pdr5 (Abbildung C 27).

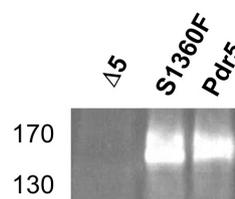


Abbildung C 27: Western Blot Detektion der Pdr5 Ganzzelllysate

0,5 OD Äquivalente der verschiedenen PDR5 Varianten wurden nach dem Lysieren der Zellen über eine 7%ige SDS-PAGE aufgetrennt und die Pdr5 Expression mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers nachgewiesen.

Für die detaillierte Analyse der Interaktionen mit dem Immunsuppressor FK506 wurde vorab die Funktionalität von Pdr5 und der klonierten S1360F Mutante im direkten Vergleich über ihr Resistenzverhalten in Flüssigkulturen überprüft. Der Resistenztest wurde wie in Abschnitt B 2.6.1 beschrieben mit sequenziellen Verdünnungen der Zellgifte durchgeführt. Dabei verhielt sich die S1360F Mutante gegenüber den verschiedenen getesteten Substanzen meist analog zum Wildtyp Pdr5. Erst bei höheren Konzentrationen zeigten die Zellen der Mutante eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber den Toxinen mit Ausnahme von KTC. Dieses Substrat wirkte bei beiden Stämmen gleichermaßen auf das Zellwachstum. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung C 28 die gemessenen Zelldichten der Hefestämme exemplarisch bei relativ geringen (Abbildung C 28A) und bei stark erhöhten Toxinkonzentrationen (Abbildung C 28 B) gegenübergestellt. Das Immunsuppressivum FK506 an sich hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Pdr5 und S1360F Zellen (siehe rote Pfeile Abbildung C 28). In Übereinstimmung mit früheren Studien schien demzufolge die S1360F Mutation die Substratspezifität des Transporters für manche Substanzen zu beeinflussen (101, 139).

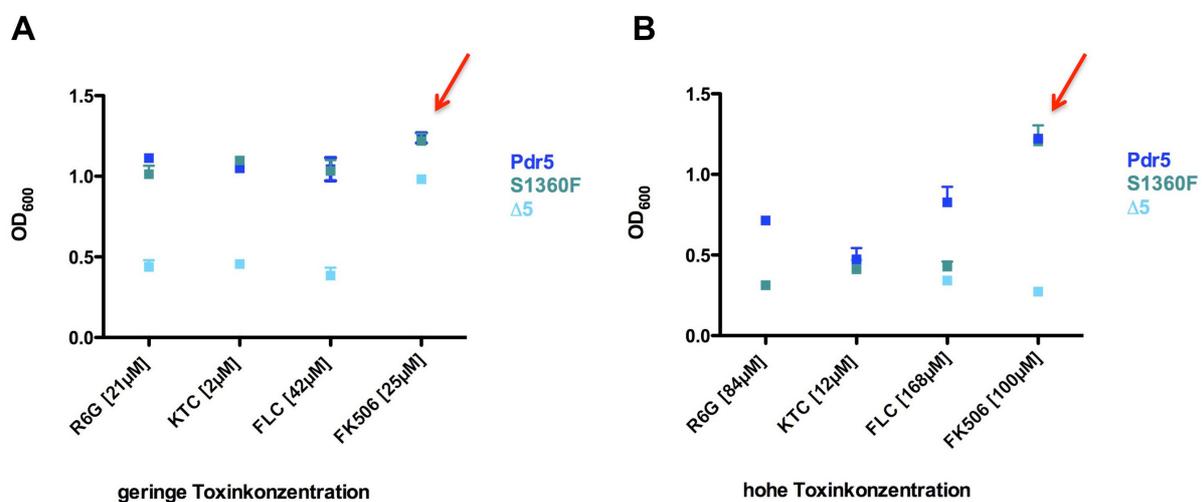


Abbildung C 28: Multidrogenresistenz der S1360F Mutante im Vergleich

Exemplarisch ist die Zelldichte (OD_{600}) der Pdr5, S1360F und $\Delta 5$ YPD-Flüssigkulturen im Vergleich bei zwei unterschiedlichen Toxinkonzentrationen für R6G, KTC, FLC und FK506 dargestellt. Der Resistenztest wurde entsprechend den Beschreibungen im Material und Methodenteil (Abschnitt B 2.6.1) durchgeführt. In **A**) ist die Zelldichte (OD_{600}) bei relativ geringen Toxinkonzentrationen und in **B**) bei sehr hohen Toxinkonzentrationen gezeigt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken aus zwei unabhängigen Experimenten. Die roten Pfeile markieren im Vergleich das äquivalente Wachstumsverhalten des Wildtyps Pdr5 und der S1360F Mutante in Anwesenheit geringer und sehr hoher FK506 Konzentrationen.

Der inhibierende Effekt von FK506 auf das Resistenzverhalten von Pdr5 wurde anschließend in einem erweiterten Wachstumstest in Flüssigkulturen untersucht. Dazu wurden die Substrate R6G, KTC und FLC in einer konstanten Konzentration eingesetzt und mit ansteigenden Konzentrationen des Immunsuppressors kombiniert. Die Konzentration der Substrate wurde dabei so gewählt, dass beide Pdr5-Hefestämme ein identisches Resistenzverhalten vorwiesen (Abbildung C 28 A). Dadurch sollte garantiert werden, dass ein beobachteter Effekt ausschließlich auf die Interaktion mit FK506 zurückgeführt werden kann und nicht etwa durch zusätzliche Wechselwirkungen seitens der Mutante mit den Substraten überlagert wird. In Anwesenheit von bis zu 40 μM FK506 konnte kein Unterschied im Zellwachstum zwischen den Zellen des Wildtyps Pdr5 und der S1360F Mutante festgestellt werden. Ab diesem Schwellenwert zeigten die Zellen des Wildtyps eine Hypersensitivität gegenüber allen getesteten Toxinen R6G, KTC und FLC, während die Proliferation der S1360F Mutante durch FK506 nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung C 29 A-C).

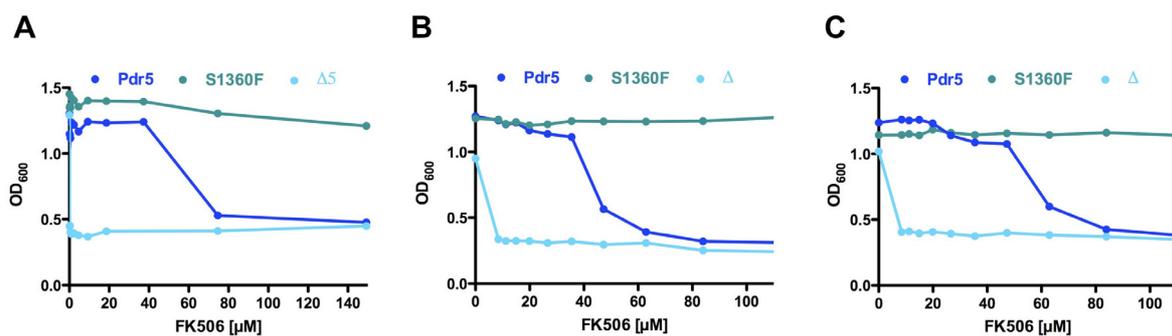


Abbildung C 29: FK506 induzierte Inhibition der Multidrogenresistenz

YPD-Flüssigkulturen mit sequenziellen FK506 Verdünnungen und einer konstanten Konzentration eines weiteren Toxins wurden mit Zellen des Pdr5, S1360F und $\Delta 5$ Stammes mit einer Start OD₆₀₀ von 0,25 angeimpft und das Wachstum nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 30°C über die OD₆₀₀ bestimmt. In **A**) ist das Wachstumsverhalten gegenüber 1,5 μM KTC in Anwesenheit steigender FK506 Konzentrationen, in **B**) gegenüber 41,8 μM FLC kombiniert mit verschiedenen FK506 Konzentrationen und in **C**) analog zu A und B mit 15,7 μM R6G gezeigt.

Der inhibitorische Effekt von FK506 und seine Aufhebung durch die S1360F Mutation wurden somit auch für die klonierten Pdr5-Stämme mit dem fusionierten 14Histidin-Affinitätstag in dem genetisch modifizierten *PDR1-3* Transkriptionshintergrund nachgewiesen. Im Anschluss wurde nun die Aktivität des ABC-Transporters Pdr5 im Hinblick auf den Einfluss von FK506 auf seine Funktionalität anhand verschiedener biochemischer Methoden charakterisiert.

2.4.1.2 Charakterisierung des Rhodamin 6G-Transports von Pdr5

Die detaillierte Analyse der Transportaktivität des MDR ABC-Transporters Pdr5 wurde mit Hilfe des R6G Transports in Abwesenheit und Anwesenheit des Modulators FK506 untersucht. Dabei wurde zuerst der R6G Efflux Assay aus ganzen Hefezellen durchgeführt, um einen ersten Einblick auf den Effekt des Modulators auf den R6G Transport in Echtzeit zu bekommen. Gemäß den Beschreibungen in Abschnitt B 2.8.2 wurde das Messverfahren an die Bedingungen angepasst und äquivalente Zellmengen des Pdr5 und S1360F Stammes simultan mit oder ohne FK506 im 5fachen Überschuss zum Farbstoff inkubiert. Die Detektion des R6G Exports erfolgte wie beschrieben indirekt über den Anstieg des Fluoreszenzsignals bedingt durch den konzentrationsabhängigen Zerfall der R6G Excimere. In Korrelation zur Deletionsmutante $\Delta 5$ konnte sowohl für den Wildtyp Pdr5 als auch für die S1360F Mutante ein vergleichbarer R6G Efflux beobachtet werden, der maßgeblich durch den ABC-Transporter Pdr5-vermittelte wurde (Abbildung C 30 A). Nach Inkubation der Zellen in Anwesenheit des Modulators FK506 war hingegen für den Wildtyp ein drastischer Effekt auf die zeitliche Fluoreszenzänderung des R6G Efflux erkennbar. Die Analyse der Raten zeigte, dass der Pdr5-vermittelte R6G Efflux im Wildtyp in Anwesenheit von FK506 bis zu 75% gehemmt wurde (Abbildung C 30 B). Die Exportraten der S1360F Mutante waren im Gegensatz dazu unter den verwendeten Bedingungen nahezu identisch. FK506 schien demzufolge, im Einklang mit dem Ergebnis des modifizierten Resistenztests keinen Einfluss auf die Exporteffizienz der S1360F Mutante für R6G zu haben.

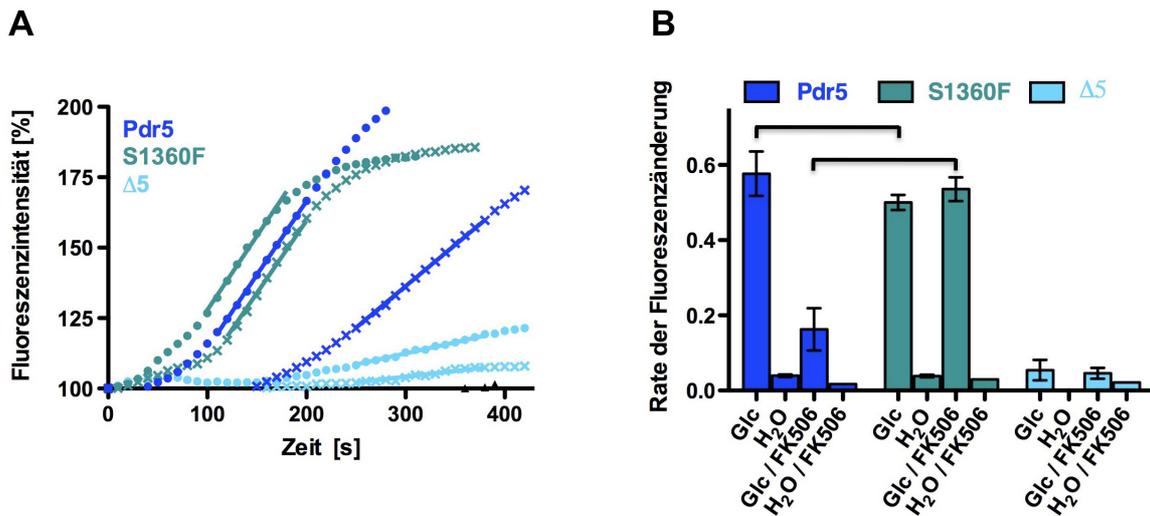


Abbildung C 30: R6G Efflux in ganzen Hefezellen in Anwesenheit von FK506

Äquivalente Zellmengen der S1360F Mutante, des Wildtyps Pdr5 und der Deletionsmutante $\Delta 5$ wurden mit $5\mu\text{M}$ R6G und ggf. in Anwesenheit von $25\mu\text{M}$ FK506 für 2,5 Stunden de-energetisiert. Zur Energetisierung wurden die Proben mit Glukose versetzt und der Efflux über den Fluoreszenzanstieg verfolgt. **A)** Gezeigt sind die repräsentativen zeitlichen Verläufe des Fluoreszenzsignals für die drei Hefestämme nach Energetisierung mit Glukose. Die Kreuzsymbole markieren den Verlauf nach Inkubation mit FK506. Die linearen Bereiche sind entsprechend in den Kurvenverläufen angedeutet. **B)** Steigungsraten der korrespondierenden linearen Regressionen für den R6G Export von drei unabhängigen Experimenten in Ab- und Anwesenheit von FK506 sind dargestellt, einschließlich der Negativkontrollen durch die Zugabe von ddH_2O anstelle von Glukose (Glc). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der GraphPad software.

Für die quantitative Analyse des inhibitorischen Effekts von FK506, aber auch, um die Rolle der S1360F Mutante besser verstehen zu können, wurde der aktive R6G Transport in angereicherten Plasmamembranen gemessen, da nur unter diesen isolierten Bedingungen auch eine kinetische Betrachtung der Transporteffizienz möglich ist. Dazu wurden angereicherte Plasmamembranen der S1360F Mutante und des Wildtyps Pdr5 isoliert und direkt im Anschluss auf ihre Aktivität untersucht. Der Pdr5-Gehalt in den Präparationen war dabei stets vergleichbar, wie in Abbildung C 31 gezeigt werden konnte. Der aktive Transport wurde, wie bereits beschrieben, durch die Zugabe von ATP als Energiequelle initiiert und über die Fluoreszenzauslöschung detektiert. Als Negativkontrollen für die Transportaktivität des ABC-Transporters dienten neben dem Deletionsstamm $\Delta 5$ auch Membranen der inaktiven PDR5-Mutanten K911A und E1036Q. Dabei wurden für die kinetische Charakterisierung des Pdr5-vermittelten R6G Transports die Fluoreszenzabnahme in Analogie zu den NBD-Mutanten bei unterschiedlichen R6G Konzentrationen vermessen.

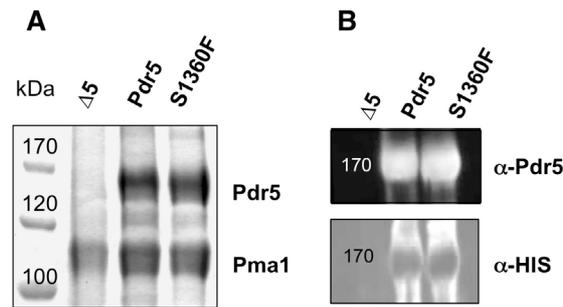


Abbildung C 31: SDS-PAGE und Western Blot Analyse von S1360F

Die isolierten Plasmamembran-Präparationen (15µg) wurden über eine 7%ige SDS-PAGE aufgetrennt und die Pdr5 Expression durch Western Blot Analyse mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5 Antikörpers und des α -His Antikörpers im Anschluss nachgewiesen.

Erwartungsgemäß konnte im Einklang mit den R6G Efflux Daten aus ganzen Hefezellen der aktive R6G Transport *in vitro* auch für die S1360F Mutante nachgewiesen werden (Abbildung C 32 A). Die anschließende kinetische Analyse der Transportraten ergab dabei für die S1360F Mutante und den Wildtyp identische Michaelis Menten Konstanten (Abbildung C 32 B), obwohl die S1360F Mutante in den Drogenresistenztests eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber R6G bei erhöhten Konzentrationen gezeigt hatte (Abbildung C 28 B).

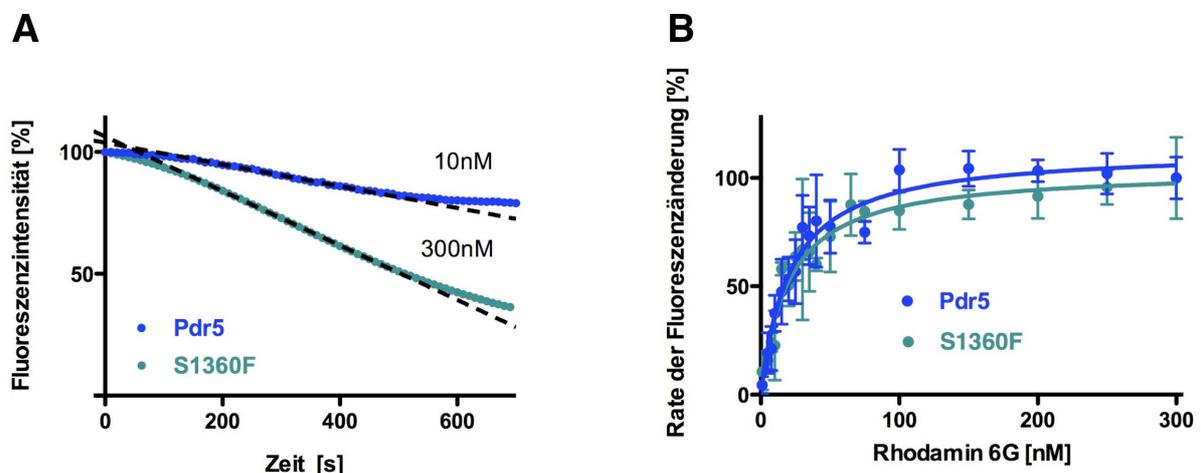


Abbildung C 32: Kinetische Analyse des aktiven R6G Transports für Pdr5 und S1360F

Der ATP/Mg^{2+} -abhängige R6G Transport in angereicherten Pdr5 und S1360F Plasmamembran-Präparationen wurde entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil durchgeführt. **A)** Zur Veranschaulichung ist die Fluoreszenzauslöschung des R6G Transports durch Pdr5 und die S1360F Mutante bei zwei verschiedenen R6G Konzentrationen gezeigt. Die lineare Regression zur Bestimmung der Transportrate ist entsprechend in dem Kurvenverlauf angedeutet. **B)** Bestimmung der Michaelis Menten Konstanten über die R6G Transportraten. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der GraphPad software über nicht-lineare Regression von minimal drei verschiedenen Experimenten. Die K_m Werte für beide PDR5 Varianten waren identisch innerhalb des experimentellen Fehlers. K_m (Pdr5) = 21 ± 3 nM und K_m (S1360F) = 20 ± 3 nM.

Zur Überprüfung der Reversibilität des R6G Transports durch geeignete Inhibitoren wie Oligomycin oder EDTA wurde auch FK506 als Inhibitor eingesetzt. Interessanterweise konnte dabei auch für die S1360F Mutante eine Rückdiffusion des Farbstoffs durch FK506 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zur quantitativen Analyse der inhibierenden Wirkung des Modulators wurden daher im Anschluss die Transportraten für beide PDR5-Proteine in Anwesenheit variierender FK506 Konzentrationen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bereits bei FK506 Konzentrationen im nanomolaren Bereich der Transport in Membranen des Wildtyps vollständig gehemmt werden konnte (Abbildung C 33 A). Im Vergleich dazu waren für die S1360F Mutante wesentlich höhere Konzentrationen nötig, um einen erkennbaren Effekt auf die ATP/Mg²⁺-abhängige Fluoreszenzauslöschung zu erzielen (Abbildung C 33 B). Die Berechnung der IC₅₀-Werte für Pdr5 und die S1360F Mutante ergab mit einem IC₅₀ von 10 ± 0.1 nM für Pdr5 und einem IC₅₀ von 450 ± 80 nM für die S1360F Mutante einen fast 50fachen Unterschied (Abbildung C 33 C). Offensichtlich konnte also auch die S1360F Mutante in ihrer Fähigkeit, R6G zu transportieren, durch FK506 gehemmt werden, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaße.

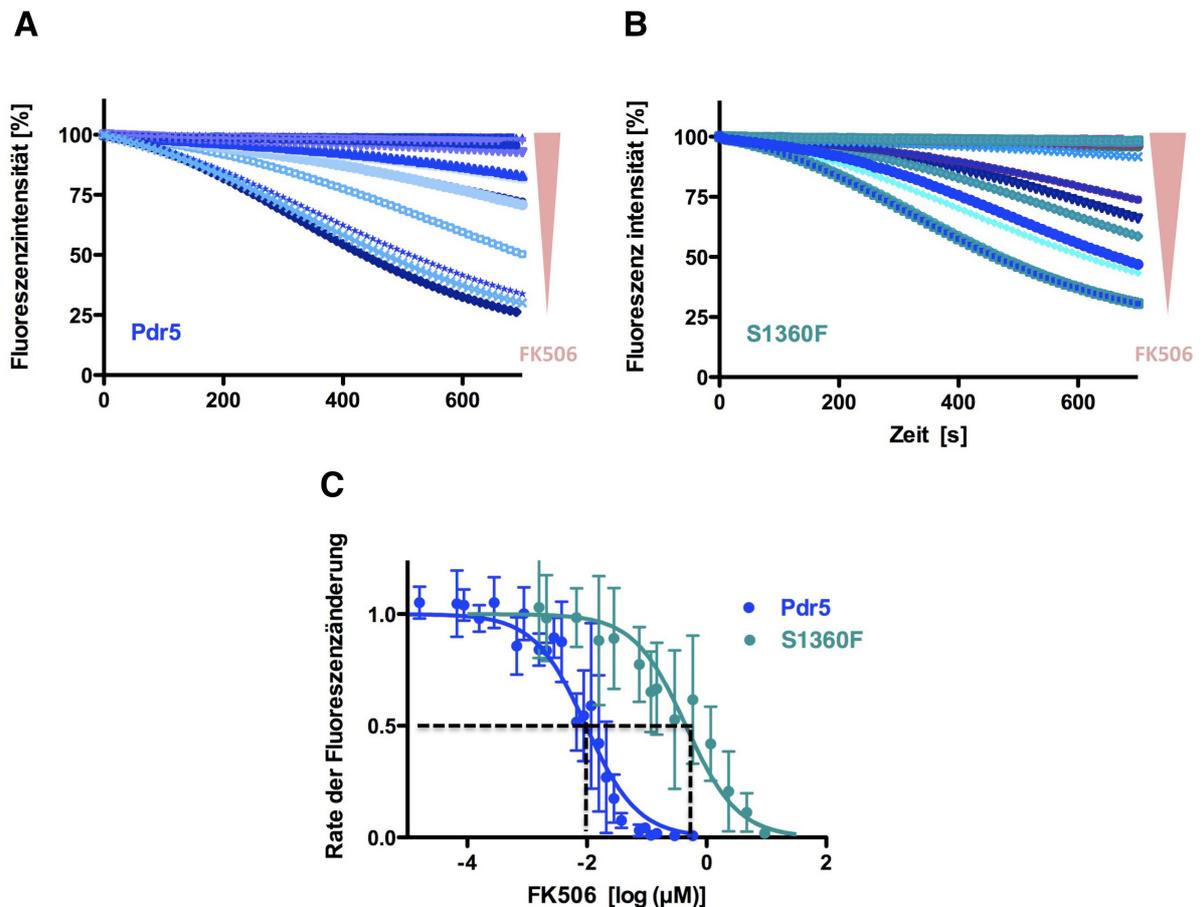


Abbildung C 33: FK506-vermittelte Inhibition des R6G Transports

Aktiver R6G Transport in hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen im Reaktionspuffer mit 300nM R6G. Gezeigt sind die Kurvenverläufe der Fluoreszenzauslöschung für den R6G Transport des Pdr5 Wildtyps (A) und der S1360F Mutante (B). Der Keil repräsentiert die Höhe der eingesetzten FK506 Konzentrationen. (C) Kinetische Analyse der Transportraten für Pdr5 und die S1360F Mutante Gezeigt ist der sigmoidale Kurvenverlauf der nicht-linearen Regression gemäß der „Dose-Response“-Gleichung [2]. Minimal drei unabhängige Datensets dienen zur Berechnung der IC₅₀-Werte mit Hilfe der GraphPad software. IC₅₀ (Pdr5) = 10 ± 0.1 nM und IC₅₀ (S1360F) = 450 ± 80 nM.

Eine direkte Beteiligung der S1360F Mutante an den proteinspezifischen Wechselwirkungen mit dem Modulator FK506 wurde somit eindeutig bestätigt. Zudem wurde aber auch anhand beider Transportverfahren gezeigt, dass Pdr5 und die S1360F Mutante identische Transporteffizienzen für R6G in Abwesenheit von FK506 aufwiesen. Für die Charakterisierung der Pdr5 spezifischen Interaktionen im Hinblick auf den modulatorischen Einfluss von FK506 könnte dieser Aspekt von großer Bedeutung sein. Die S1360F Mutation, ist wie bereits beschrieben, in einer Region lokalisiert, die vermutlich an der Substraterkennung beteiligt ist. Daher stellt sich die Frage, welche Rolle die strukturelle Veränderung der TMDs durch die

S1360F Mutation für den Wirkmechanismus von FK506 spielt und ob die beobachtete Differenz in der Inhibition durch FK506 allein darauf zurückgeführt werden kann. In diesem Zusammenhang musste jedoch zunächst geklärt werden, ob das Immunsuppressivum FK506 auch selbst als Substrat für den MDR ABC-Transporter Pdr5 fungieren kann und somit möglicherweise durch Pdr5 transportiert wurde.

2.4.1.3 Funktionsanalyse des Immunsuppressivums FK506

Um die funktionale Rolle von FK506 als mögliches Substrat von Pdr5 zu analysieren, wurde auf der Grundlage des R6G Efflux Assays eine Methode entwickelt um den Export von Tritium markiertem FK506 aus ganzen Hefezellen zu bestimmen. Dazu wurden äquivalente Zellmengen der *S. cerevisiae* Stämme Pdr5 und S1360F und zur Kontrolle auch des Deletionsstammes $\Delta 5$ unter de-energetisierenden Bedingungen mit Tritium markierten FK506 inkubiert und die Radioaktivität nach Energetisierung der Zellen mit Glukose im extrazellulären Überstand bestimmt (Abschnitt B 2.6.3.). Die verwendete Gesamtkonzentration des Toxins von 25 μ M setzte sich dabei aus markiertem und unmarkiertem FK506 zusammen. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von intrinsischen Kontrollmessungen vor der Energetisierung der Zellen zur Bestimmung der messbaren Gesamtradioaktivität, durch die parallel durchgeführten Negativkontrollmessungen mit Deoxyglukose anstelle von Glukose und auch durch die Messung der verbliebenen Radioaktivität in den Zellpellets nach der Abtrennung des Überstandes.

Für die Zellen des Wildtyps Pdr5 und auch für die der S1360F Mutante wurde im extrazellulären Medium eine Radioaktivität von fast 70% der Gesamtradioaktivität detektiert (Abbildung C 34). Diese lag dabei fast 30% über der vermessenen Radioaktivität des Deletionsstammes. Unter de-energetisierten Bedingungen betrug die detektierte Radioaktivität für Pdr5 und S1360F überexprimierende Zellen sogar weniger als die Hälfte. Im Fall des Knock-out Stammes wurde dabei nur eine geringfügig kleinere Radioaktivität im Überstand ermittelt. Bei der Vermessung der Zellpellets wurde der gegenteilige Effekt beobachtet, so war die Radioaktivität in den energetisierten Zellen kleiner als in denen, die mit Deoxyglukose versetzt worden waren (Daten nicht gezeigt).

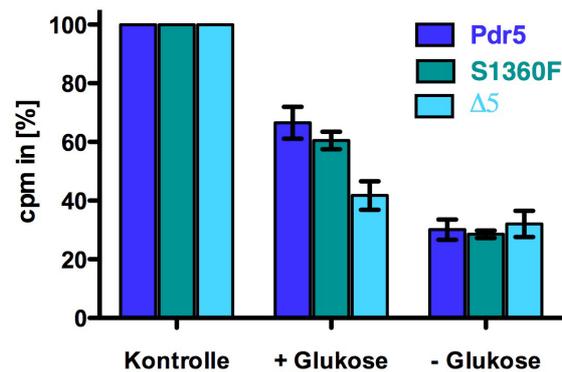


Abbildung C 34: Transport von FK506 in Hefezellen

Äquivalente Zellmengen wurden mit 25µM FK506 (100nM ^3H -FK506) unter de-energetisierten Bedingungen 2h bei 30°C inkubiert. Ein Drittel der Zellsuspension diente als interne Kontrolle, die beiden anderen beiden Drittel wurden zur parallelen Transportmessung mit Glukose (+) bzw. mit Deoxyglukose (-) versetzt. Die Radioaktivität wurde 15min nach Energetisierung im Überstand und im Pellet bestimmt. Gezeigt sind die gemittelten Werte der vermessenen Radioaktivität im Überstand aus drei unabhängigen Messungen.

Obwohl auch in diesem Messverfahren der Export mit dem Konzentrationsgefälle nachgewiesen wurde, scheinen diese Daten die Funktion von FK506 als Substrat von Pdr5 zu belegen. Unter diesem Aspekt und im Hinblick auf den Unterschied des inhibitorischen Effekts von FK506 auf die Funktionalität von Pdr5 und der S1360F Mutante in der Multidrogenresistenz wäre ein direkter Einfluss der Mutation in der TMD auf die Transporteffizienz von FK506 eine logische Schlussfolgerung. Daher wurde im nächsten Schritt der Export von FK506 nach verschiedenen Zeitpunkten vermessen. In Anlehnung an die verwendete FK506 Konzentration im R6G Efflux Assay mit 25µM wurden im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten verschiedene Konzentrationen zwischen 0,25µM und 40µM des radioaktiven FK506 untersucht. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung C 35 gezeigt, dass unter den getesteten Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen der Exporteffizienz von Pdr5 und der S1360F Mutante für FK506 beobachtet werden konnte.

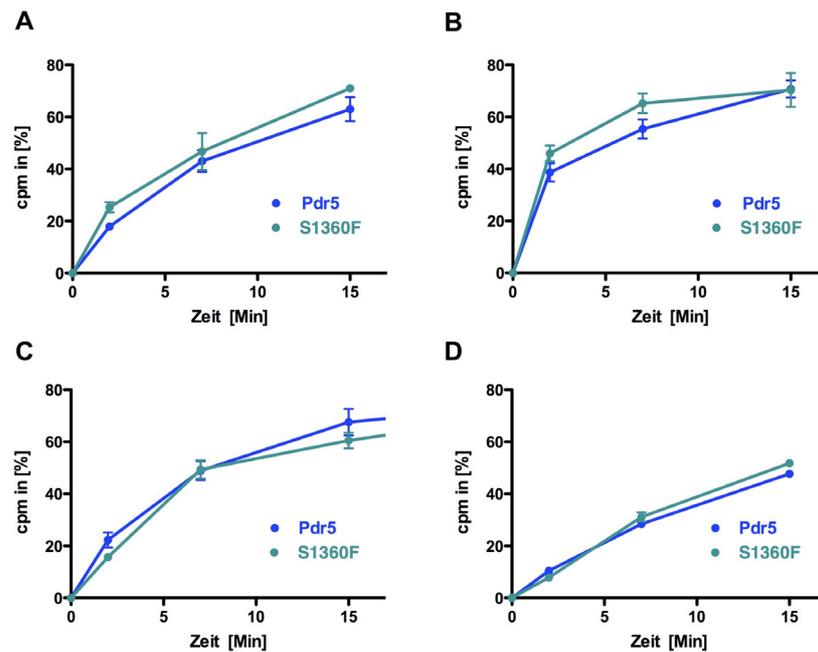


Abbildung C 35: Zeitabhängiger Export von FK506 durch Pdr5 und S1360F

Die Zellen wurden entsprechend den Beschreibungen im Material und Methodenteil (Abschnitt B 2.6.3) mit verschiedenen FK506 Konzentrationen inkubiert und die Radioaktivität nach Energetisierung der Zellen bei unterschiedlichen Zeitpunkten im Überstand und Zellpellet bestimmt. In den Diagrammen ist die ermittelte Radioaktivität des exportierten FK506 im Überstand für die verwendeten FK506 Konzentrationen 0,25µM (A), 2,5 µM (B), 25µM (C) und 40µM (D) gegen die Zeit aufgetragen. Die gezeigten Daten wurden aus 4 unabhängigen Experimenten gemittelt.

Zusammenfassend konnten auf der Grundlage des neu etablierten Messverfahrens Daten gewonnen werden, die eine Funktion des Modulators FK506 auch als Substrat von Pdr5 unterstützen. Zudem wurde gezeigt, dass unter den getesteten Bedingungen also bei FK506 Konzentrationen, die beim Wildtyp Pdr5 zu einer Inhibition des R6G Efflux geführt haben, die S1360F Mutation scheinbar keinen Effekt auf die Exporteffizienzen für FK506 ausübt. Vor dem Hintergrund, dass beide PDR5 Proteine bei dem Transport von R6G *in vitro* einen inhibitorischen Effekt durch FK506 erfuhren, könnte dieser Effekt möglicherweise in veränderten Transportaffinitäten durch z.B. allosterische Interaktionen begründet sein. Solche oder ähnliche Interaktionen zwischen multiplen Bindungsstellen und/oder regulatorischen Bindungsstellen wurden z.B. in Kompetitionsstudien des humanen ABC-Transporters P-gp gefunden (99). Um jedoch ein vollständiges Bild über die Auswirkung der Pdr5 spezifischen Wechselwirkungen mit dem Modulator FK506 und einem weiteren Substrat wie R6G zu erhalten, wurde im nächsten Schritt die Pdr5

spezifische ATPase Aktivität des Wildtyps und der S1360F Mutante unter dem Einfluss der beiden Toxine analysiert.

2.4.1.4 ATPase Aktivität von Pdr5 und der S1360F Mutante im Vergleich

Für viele ABC-Transporter wie dem humanen P-gp konnte eine Substrat-induzierte Stimulation der ATPase Aktivität gezeigt werden (173, 174). Hingegen konnte dieser Effekt für Pdr5 bislang nicht beobachtet werden. Die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 wurde jedoch durch voluminöse Substanzen wie z.B. R6G inhibiert, wie bereits bei der Analyse des konservierten Histidins der putativ katalytischen Dyade in Abschnitt 2.2.2.1. beschrieben wurde. Kleine Toxine wie CHX oder FLC hingegen schienen keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität zu haben (167). Pdr5 verfügt demzufolge nur über eine basale ATPase Aktivität, die zwar inhibitorisch aber allem Anschein nach nicht stimulatив durch Toxine moduliert werden kann.

Zur Analyse des inhibierenden Effekts von FK506 auf die ATPase Aktivität von Pdr5 und der S1360F Mutante wurde die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität beider PDR5 Proteine bei einem pH von 9,5 in Anwesenheit variierender Konzentrationen FK506 aber auch zusätzlich von R6G gemessen. Letztere diente dazu, um in Ergänzung zu den ermittelten Michaelis Menten Kinetiken des R6G Transports auch eine Aussage bezüglich der ATPase Aktivität in Anwesenheit von R6G treffen zu können. Die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität der S1360F Mutante konnte gleichermaßen, wie für den Wildtyp über einen breiten pH Bereich nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für R6G und das Makrolacton FK506 wurde, wie erwartet, für beide PDR5 Proteine eine Inhibition der ATPase Aktivität beobachtet (Abbildung C36). Zur Inhibition der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität der S1360F Mutante waren dabei 2-3fach höhere Konzentrationen des Substrats R6G erforderlich (Abbildung C 36 A). Diese Differenz erschien jedoch vernachlässigbar klein im Vergleich zu einer beobachteten Inhibition im Fall von FK506 (Abbildung C 36 B). Die berechnete Hemmkonstante K_i für den Wildtyp betrug $0.05 \pm 0.007 \mu\text{M}$, während für die S1360F Mutante ein K_i -Wert von $4.9 \pm 0.36 \mu\text{M}$ berechnet wurde. Demzufolge wurde eine fast 100fach höhere FK506 Konzentration benötigt, um die ATPase Aktivität der S1360F Mutante um 50% zu reduzieren.

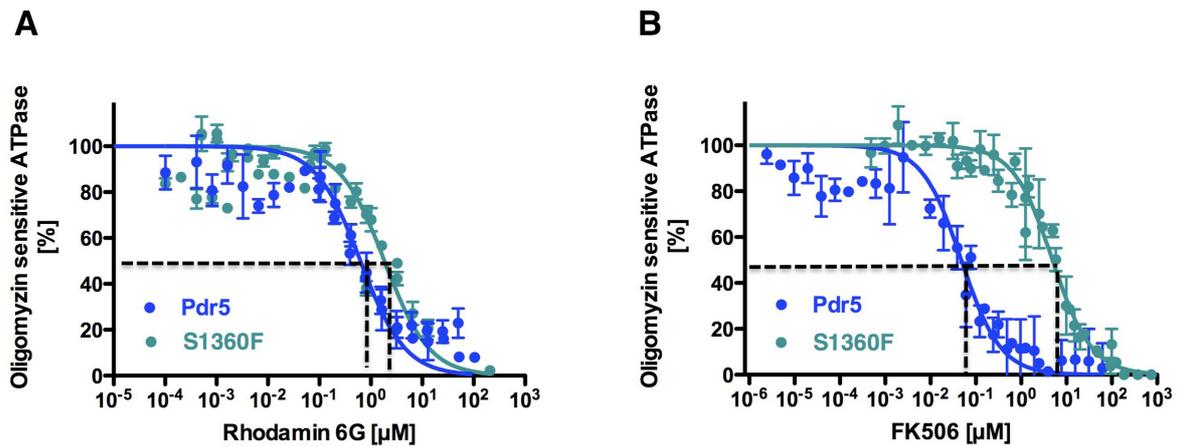


Abbildung C 36: Toxin induzierte Inhibition der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität

Die Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 und der S1360F Mutante wurde in Anwesenheit variierender R6G (A) bzw FK506 (B) Konzentrationen entsprechend den Beschreibungen im Material und Methodenteil Abschnitt B 2.8.5 bei einem pH von 9,5 bestimmt und gegen die eingesetzte Toxinkonzentration aufgetragen. Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten zur Bestimmung der Hemmkonstante K_i durch nicht-lineare Regression nach Gleichung [5] sind dargestellt. Die berechneten K_i -Werte betragen für R6G $0.63 \pm 0.07 \mu\text{M}$ für den Wildtyp und $1.82 \pm 0.17 \mu\text{M}$ für die S1360F Mutante; für FK506 wurde für Pdr5 ein K_i -Wert von $0.05 \pm 0.007 \mu\text{M}$ und für die Mutante $4.91 \pm 0.36 \mu\text{M}$ erhalten. Der Unterschied in den K_i -Werten ist anhand der gestrichelten Linien hervorgehoben.

Dieses Ergebnis vermittelt den Eindruck, dass die S1360F Mutation in Anwesenheit des Modulators FK506 einen Effekt auf die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität ausübt. Möglicherweise wurde der beobachtete Effekt durch modifizierte Wechselwirkungen mit dem Modulator verursacht, allerdings könnte auch die Mutation an sich zu einer Veränderung der Prozesse in der NBD geführt haben. In biochemischen Studien des humanen MDR ABC-Transporters P-gp konnte z.B. gezeigt werden, dass die einzelnen Schritte wie Nukleotidbindung und Hydrolyse durch Mutationen in der Transmembrandomäne verändert werden konnten (96, 175). Daher wurde zunächst die Kinetik der Hydrolyse beider PDR5 Varianten untersucht, indem die basale ATPase Aktivität beider Proteine mit unterschiedlichen ATP Konzentrationen bestimmt wurde. Zur Gewährleistung der optimalen Hydrolysebedingungen wurde dabei die Magnesiumkonzentration im Reaktionsansatz erhöht. Im Vergleich zeigten die ermittelten Michaelis Menten Konstanten eindeutig, dass die S1360F Mutation keinen Effekt auf die Kinetik der basalen ATPase Aktivität von Pdr5 hatte. Die ermittelten Konstanten waren für beide PDR5-Proteine gleich (Abbildung C 37).

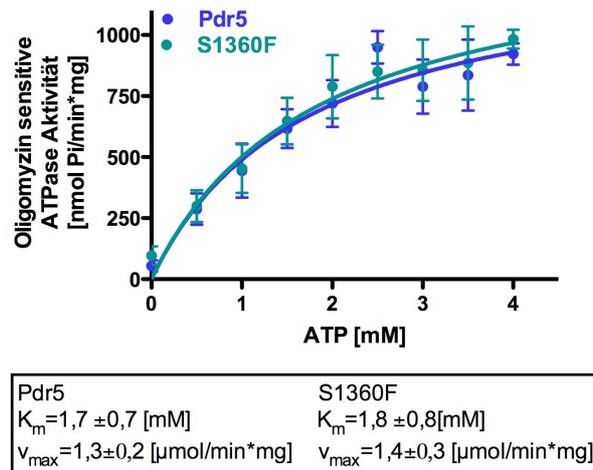


Abbildung C 37: Michaelis Menten Kinetik der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität

Oligomycin-sensitive ATPase Aktivität von Pdr5 und der S1360F Mutante in Abhängigkeit von der ATP Konzentration bei pH 9,5. Die Berechnung der Michaelis Menten Konstanten erfolgte mit Hilfe der GraphPad software. auf der Basis von minimal drei unabhängigen Messungen.

Ein möglicher Einfluss der S1360F Mutation in der TMH 11 auf die Bindungsaffinitäten von Pdr5 wurde mit Hilfe von photoaktivierbarem [γ 32 P]-8-Azido-ATP untersucht. Dazu wurde die Bindung des radioaktiv markierten 8-azido ATPs in Anwesenheit steigender ATP, aber auch ADP Konzentrationen in angereicherten Plasmamembran-Präparationen des Wildtyps Pdr5 und der S1360F Mutante autoradiographisch detektiert und über die Signalintensität analysiert. Das verwendete Messverfahren war dabei in Anlehnung an die Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität wie z.B. den pH des Reaktionspuffers und die geeignete Wahl der Inhibitoren entsprechend optimiert worden, um eine quantitative Bestimmung in den Plasmamembran-Präparationen zu ermöglichen (Abschnitt B 2.6.6). Die simultane Durchführung der Experimente für Pdr5 und die S1360F Mutante erfolgte dabei bei 4°C, um eine Hydrolyse zu unterbinden.

Bei den Kompetitionsstudien zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp Pdr5 als auch die S1360F Mutante das [γ 32 P]-8-Azido-ATP gleichermaßen binden konnten und dieses auch durch nicht radioaktives ATP und ADP verdrängt werden konnte. Dies ist in Abbildung C 38 anhand der Autoradiogramme gezeigt. Bei zunehmender ATP bzw. ADP Konzentration nahm die Signalintensität des gebundenen [32 P] γ -8-Azido-ATPs ab. Für den quantitativen Vergleich wurden anhand der detektierten Signalintensitäten in Abhängigkeit von der eingesetzten ATP bzw. ADP

Konzentration für beide Proteine die IC_{50} Werte berechnet. Bei der Verdrängung durch ATP betrug der IC_{50} für den Wildtyp $48 \pm 7 \mu\text{M}$ und $51 \pm 5 \mu\text{M}$ für die S1360F Mutante. Demzufolge schien die Bindungsaffinität beider Proteine für ATP innerhalb des experimentellen Fehlers identisch zu sein (Abbildung C 38 A). Bei der Verdrängung durch ADP wurden IC_{50} Werte im millimolaren Bereich ermittelt. Der Einsatz von ADP diente dem Zweck, auch eine mögliche Aussage bezüglich der Nukleotidfreisetzung nach der Hydrolysereaktion durch die NBDs treffen zu können. Dabei wurde für den Wildtyp ein IC_{50} von $0.30 \pm 0.06 \text{ mM}$ und für die Mutante von $0.38 \pm 0.07 \text{ mM}$ ermittelt (Abbildung C 38 B). Dieses Ergebnis deutete daraufhin, dass auch die Bindungsaffinität in beiden PDR5 Proteinen gleich für ADP ist.

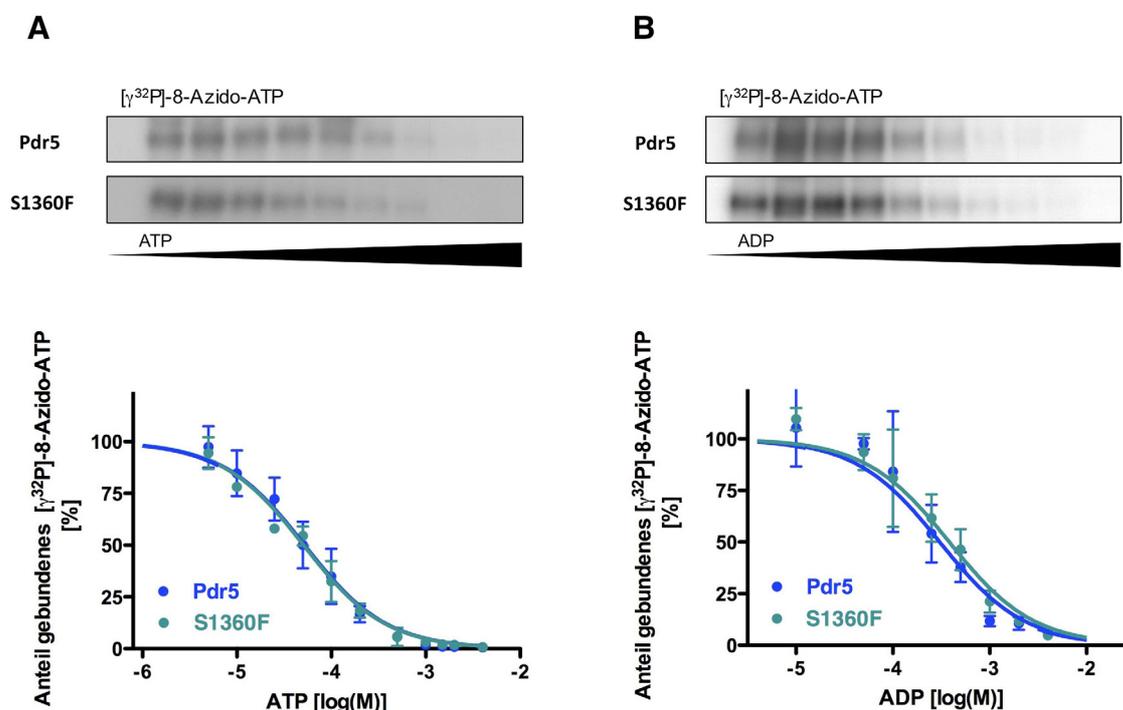


Abbildung C 38: Konkurrenz von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ mit ATP und ADP

Angereicherte Plasmamembranen ($2,5\mu\text{g}/30\mu\text{l}$) wurden unter nicht-hydrolysierbaren Bedingungen mit $5\mu\text{M}$ $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ in Anwesenheit unterschiedlicher ATP (**A**) und ADP (**B**) Konzentrationen markiert. Im oberen Teil der Abbildung sind exemplarisch die Autoradiogramme zur Veranschaulichung der Verdrängung des $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-8-Azido-ATP}$ s durch ATP bzw. ADP gezeigt. Die sigmoidalen Kurvenverläufe der generellen „dose response“ Analyse von 4 unabhängigen Experimenten gemäß Gleichung [6] zur Bestimmung der IC_{50} Werte sind im unteren Teil der Abbildung gezeigt mit einem $IC_{50}(\text{Pdr5}) = 48 \pm 7 \mu\text{M}$ bzw. $IC_{50}(\text{S1360F}) = 51 \pm 5 \mu\text{M}$ für ATP und einen $IC_{50}(\text{Pdr5}) = 0.30 \pm 0.06 \text{ mM}$ bzw. $IC_{50}(\text{S1360F}) = 0.38 \pm 0.07 \text{ mM}$ für ADP.

In Kombination mit den Kinetikdaten der ATPase Aktivitätsanalyse deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die S1360F Mutation in der TMH11 von Pdr5 in Abwesenheit von Toxinen auch keinen Einfluss auf die Mechanismen in den NBDs hat. Dennoch konnte anhand der bisherigen Analysen im Resistenztest und anhand der R6G Transportdaten eindeutig ein Unterschied in den proteinspezifischen Interaktionen mit dem Modulator FK506 gezeigt werden.

2.4.1.5 Analyse des FK506 Transport

Hinsichtlich des *Alternating Access Models* (67) besteht eine intensive Verknüpfung zwischen dem Mechanismus der ATP Hydrolyse einerseits und dem Substrattransport andererseits. Bei der Analyse der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität in Anwesenheit von FK506 konnte bei hohen Toxinkonzentrationen eine stärkere Hemmung der ATPase Aktivität des Wildtyps im Gegensatz zur S1360F Mutante gezeigt werden. Mit Bezug zum alternierenden Model nach Jardetzky (67) stellte sich nunmehr die Frage, ob ein ähnlicher Effekt auch beim Transport von FK506 nachweisbar wäre. Um dieser Fragestellung nachzukommen, wurde daher zur Analyse der Kopplung zwischen der Inhibition der ATPase Aktivität und dem FK506 Transport das radioaktive Messverfahren des FK506 Transports in ganzen Hefezellen angewendet und entsprechend modifiziert.

Dazu wurden äquivalente Hefezellen des Wildtyps und der S1360F Mutante analog den Beschreibungen im Material und Methodenteil (Abschnitt B 2.6.3) mit radioaktiv markierten FK506 (25 μ M) inkubiert und de-energetisiert und anschließend der Export in Anwesenheit einer hohen Konzentration nicht-markiertem FK506 (100 μ M) im extrazellularen Medium mit Glukose initiiert. Es wurden analog zum unmodifizierten Transportverfahren die gleichen Kontrollmessungen durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde entsprechend Deoxyglukose verwendet. Die Radioaktivität wurde im Anschluss im Überstand und auch im Zellpellet vermessen. Dabei zeigte sich, dass die vermessene Radioaktivität im Überstand nach Glukosezugabe oder nach Zugabe von Deoxyglukose gleich war. Hingegen für die S1360F Mutante wurde ein anderer Effekt beobachtet. Nach der Energetisierung konnte im Vergleich zur Negativkontrolle mit Deoxyglukose immer noch ein signifikanter Prozentsatz der Gesamtradioaktivität im extrazellularen Medium

nachgewiesen werden. In Abbildung C 39 ist das Ergebnis des Experiments im direkten Vergleich mit dem Ergebnis des Exports in Abwesenheit einer hohen extrazellulären FK506 Konzentration graphisch dargestellt. Der Unterschied zwischen den beiden PDR5 Varianten ist in der Graphik entsprechend hervorgehoben. In diesem Zusammenhang konnte nun auch der aktive Export von FK506 gegen ein Konzentrationsgefälle eindeutig gezeigt werden und somit die Funktion von FK506 nicht nur als Inhibitor, sondern auch als Substrat von Pdr5 identifiziert werden.

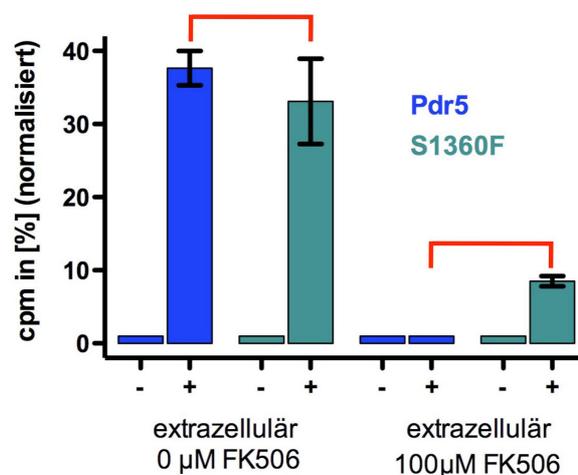


Abbildung C 39: Inhibition des FK506 Transports von FK506 in Hefezellen

Der Glukose-induzierte Export von FK506 wurde über den Anteil des radioaktiv markierten FK506 im extrazellulären Medium für Zellen des Wildtyps Pdr5 und der S1360F Mutante analysiert. Zur besseren Veranschaulichung der Exporteffizienz wurde die vermessene Radioaktivität im Überstand nach Energetisierung auf die der Negativkontrollen normiert. Die gezeigten Daten entsprechen den Ergebnissen aus 2 unabhängigen Experimenten.

Im Einklang mit den ermittelten K_i -Werten der ATPase Inhibition durch FK506 konnte anhand des modifizierten FK506 Transportverfahrens gezeigt werden, dass der MDR ABC-Transporter Pdr5 durch sein eigenes Substrat FK506 sowohl in der ATPase Aktivität als auch in seiner Transportaktivität durch hohe Konzentrationen gehemmt werden kann. Die S1360F Mutation scheint dabei einen Einfluss auf die inhibitorische Bindungsstelle und somit auf den Wirkmechanismus von FK506 zu haben. Demzufolge könnte diese Aminosäure für eine Schlüsselfunktion in den Pdr5-spezifischen Interaktionen mit dem Modulator FK506 verantwortlich sein.

2.4.2. Alternative Energiequellen für Hydrolyse und Transport

Bezug nehmend auf die Bedeutung der beschriebenen Interaktionen zwischen Pdr5 und seinen Substraten und Modulatoren könnte möglicherweise auch die Art der Energiequelle von Relevanz für die Funktionalität des ABC-Transporters sein. Jedes System ist an seine natürliche Umgebung optimal angepasst, daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass alternative Energiequellen möglicherweise nicht so effektiv ausgenutzt werden können oder sogar zu einer Veränderung der proteinspezifischen Eigenschaften führen. Auf der Basis der etablierten biochemischen Methoden zur Bestimmung der ATPase Aktivität und der Transportaktivität *in vitro* wurde daher der Einfluss verschiedener Nukleotide als alternative Energiequellen für den MDR ABC-Transporter Pdr5 analysiert.

Zunächst wurde der ABC-Transporter Pdr5 auf seine Fähigkeit getestet, unterschiedliche Nukleotide zu hydrolysieren. Dazu wurde die Oligomycin-sensitive NTPase Aktivität in angereicherten Plasmamembranen anstelle von ATP auch mit CTP, GTP und UTP als Energiequelle bei einem pH von 9,5 simultan unter den gleichen Bedingungen und einer Nukleotidkonzentration von 4mM mit den entsprechenden Negativkontrollen gemessen. Für alle vier Nukleotide konnte eine Pdr5 spezifische ATPase Aktivität Plasmamembran-Präparationen des Wildtyps Pdr5 ermittelt werden, jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen (Abbildung C 40). Dabei wurde für die drei alternativen Nukleotide im Vergleich zu ATP eine reduzierte Hydrolyseaktivität unter den gegebenen Bedingungen gemessen. Während CTP im Vergleich zu ATP noch mit einer Effektivität von 50% hydrolysiert wurde, konnte für UTP und GTP in Bezug zur ATP-hydrolyse nur noch eine 30 %ige Aktivität ermittelt werden. Die gleiche Beobachtung wurde auch in Plasmamembran-Präparationen der S1360F Mutante gemacht (Daten nicht gezeigt).

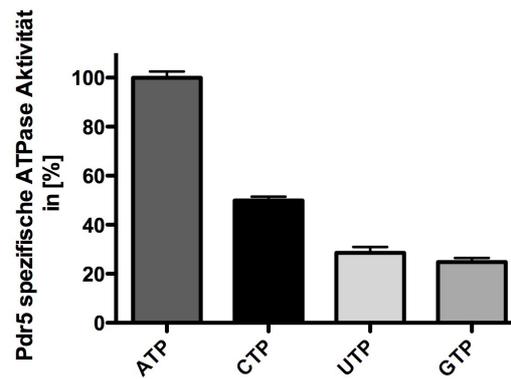


Abbildung C 40: Oligomycin-sensitive NTPase Aktivität von Pdr5

Die Bestimmung der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität von Pdr5 wurde entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil mit einer NTP Konzentration von 4mM bei einem pH von 9,5 durchgeführt. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen sind dargestellt.

Zusätzlich wurde auch die Kinetik der NTP-Hydrolyse für die verschiedenen Nukleotide untersucht, um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied in der Hydrolyse auf unzureichende Nukleotidkonzentrationen zurückgeführt werden könnte. Dazu wurde die Hydrolyseaktivität von Pdr5 analog zu seiner kinetischen Analyse der ATPase Aktivität (siehe Abschnitt B 2.6.5, C 2.3.4 Abbildung C 37) bei unterschiedlichen NTP Konzentrationen vermessen. Die ermittelten Michaelis Menten Konstanten waren innerhalb des experimentellen Fehlers vergleichbar mit dem K_m Wert für ATP, lagen jedoch etwas unterhalb (Tabelle C6). Demzufolge wurde der Vergleich zwischen den Nukleotiden für die NTPase Aktivität mit 4mM definitiv unter gesättigten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle C6: Michaelis Menten Kinetik der NTPase Aktivität von Pdr5

NTP	K_m [mM]	v_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]
ATP	$1,7 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,2$
CTP	$1,1 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,07$
GTP	$1,1 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,04$
UTP	$1,0 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,2$

Um nun zu überprüfen, ob die gewonnene Energie durch die Hydrolyse der Nukleotide auch für den Pdr5-vermittelten Transport von Substraten verwendet werden kann, wurde das Messverfahren zur Analyse des aktiven R6G Transport in Plasmamembran-Präparationen angewendet. Dabei wurde die konzentrations-

abhängige Fluoreszenzänderung von R6G in Reaktionspuffer mit 300nM und auch mit 150nM R6G verfolgt. Standardgemäß wurde der Transport durch die Zugabe von 10mM des jeweiligen Nukleotids initiiert. Die Kurvenverläufe sind exemplarisch für die Transportmessung mit 300nM R6G in Abbildung C 41 gezeigt. Im Vergleich zum ATP energetisierten R6G Transport konnte für die drei anderen Nukleotide kaum eine Fluoreszenzauslöschung beobachtet werden. Allerdings konnte für alle Nukleotide eine geringfügige Rückdiffusion des Farbstoffs nach der Zugabe von Oligomycin detektiert werden. Dieses Ergebnis deutete doch letztlich daraufhin, dass Pdr5 die Energie aus den alternativen Energiequellen nicht effizient umsetzen konnte. Parallel dazu wurden auch Plasmamembran-Präparationen der S1360F Mutante untersucht. Doch auch für die Mutante wurde der gleiche Effekt beobachtet (Daten nicht gezeigt).

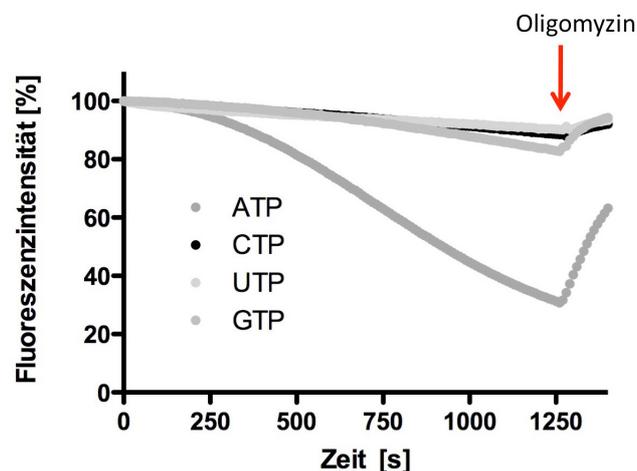


Abbildung C 41: NTP-abhängige Fluoreszenzauslöschung in Pdr5 Plasmamembran-Präparationen

Der NTP abhängige R6G Transport wurde entsprechend den Angaben im Material und Methodenteil durchgeführt. Angereicherte Plasmamembranen (20µg) wurden in Reaktionspuffer mit 300nM R6G mit 10mM ATP, CTP, GTP oder UTP versetzt. Die zeitabhängige Fluoreszenzauslöschung wurde detektiert und nach 1250s wurde die Reaktion durch Zugabe von 20µg/ml Oligomycin abgebrochen, indiziert durch den roten Pfeil in der Abbildung.

Da im Gegensatz zur Bestimmung der Hydrolyse Aktivität nun die 2,5fache Nukleotidkonzentration zur Energetisierung des Transporters eingesetzt wurde, wurde für eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden der Transport unter den gleichen Bedingungen vermessen. Zusätzlich wurde auch eine höhere Nukleotidkonzentration eingesetzt um zu gewährleisten, dass der beobachtete Effekt ähnlich wie bei den NTPase Aktivitätsmessungen nicht in unzureichenden

Nukleotidkonzentrationen begründet ist. Die ermittelten Raten der Fluoreszenzauslöschung waren jedoch im Vergleich noch geringer. Eine kinetische Analyse des NTP abhängigen Transports war daher aufgrund der geringen Veränderungen des Fluoreszenzsignals nicht sinnvoll möglich (Daten nicht gezeigt). Der ATP-abhängige R6G Transport wurde mit einer Nukleotidkonzentration von 10mM unter optimierten Bedingungen gemessen.

Zusammenfassend belegen die gewonnenen Daten, dass der MDR ABC-Transporter Pdr5 im Stande ist unterschiedliche Nukleotide zu hydrolysieren. Jedoch scheint der Transporter nur in der Lage zu sein die freigesetzte Energie aus der ATP Hydrolyse effizient für den Substrattransport von R6G umsetzen zu können. Im Hinblick auf eine enge Verknüpfung der Prozesse in den NBDs mit denen in den TMDs scheinen die proteinspezifischen Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Nukleotiden möglicherweise auch einen Einfluss auf die Abläufe in den TMDs zu haben. Bei der Analyse der proteinspezifischen Interaktionen von Pdr5 mit seinen Substraten wurde ein inhibierender Effekt auf die ATPase Aktivität des Transporters beobachtet. Eine analoge Inhibition der NTPase Aktivität von Pdr5 oder der S1360F Mutante konnte auch für die Hydrolyse von GTP und CTP beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Vor diesem Hintergrund wird die Verknüpfung der Prozesse in den NBDs und TMDs möglicherweise durch eine Kombination von proteinspezifischen Interaktionen mit dem Substrat und den proteinspezifischen Interaktionen mit den zur Energiesynthese benötigten Nukleotiden definiert.

D. Diskussion

Geeignete Modellsysteme und Analysestrategien bilden die Grundlage für eine stetige Erweiterung des molekularen Verständnisses der Funktionsweise von Membrantransportproteinen. Im Forschungsgebiet der ABC-Transporter konnten somit durch biochemische und strukturelle Analysen bakterieller und eukaryotischer ABC-Transporter grundlegende Einblicke in den katalytischen Transportprozess dieser Proteine gewonnen werden (20, 34, 59, 73, 77, 97). Eine Vielzahl von Fragestellungen konnte dennoch bislang nicht aufgeklärt werden. Dazu zählt neben dem Mechanismus der Energiegewinnung und der breiten Substratspezifität der ABC-Transporter in der Multidrogenresistenz vor allem die Frage nach der Kommunikation zwischen den funktionellen Domänen in den NBDs und den TMDs (176). Vor diesem Hintergrund stand die detaillierte biochemische und funktionelle Charakterisierung des MDR ABC-Transporters *Pdr5* aus *S. cerevisiae* im Fokus dieser Arbeit. Zudem wurde mit Hilfe dieses Modellsystems die Etablierung einer allgemein anwendbaren Klonierungs- und Reinigungsstrategie angestrebt und durch den Einsatz verschiedener Hefeproteine evaluiert.

1. Eignung der Klonierungs- und Reinigungsstrategie über die N14HIS-Klonierungskassette in *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein etablierter Modellorganismus, der sich bereits in der Vergangenheit in vielerlei Forschungsbereichen wie der Molekular-, Zell- und Entwicklungsbiologie bewährt hat. Die vollständige Sequenzierung des Hefegenoms als eines der ersten eukaryotischen Organismen in Kombination mit ihrer leichten Kultivierbarkeit und den genetischen Modifikationsmöglichkeiten repräsentieren dabei die wesentlichen Vorteile des Systems (177-180). Zudem ist die Kultivierung der Hefe im Vergleich zu Insekten- oder Säugetierzellen wesentlich kostengünstiger und kann auch in industriellem Maßstab genutzt werden. Besonders in dem Forschungsgebiet der ABC-Transporter-vermittelten Multidrogenresistenz eröffnete die Identifizierung und intensive Charakterisierung des PDR-Netzwerks der Hefe neue Möglichkeiten (108, 181). Die gezielte Mutagenese der beiden Haupttranskriptionsfaktoren *Pdr1* und *Pdr3* erlauben über ihre Zielgene eine

Steuerung der Expressionslevel der nachgeschalteten ABC-Transporter ((117, 125) siehe Einleitung). Dabei wurde als ergiebigste Kombination die Einheit aus dem mutierten *PDR1-3 Allel* und dem Pdr5 Promotor, der die Expression des meist vertretenen ABC-Transporters in der Hefe induziert, identifiziert (127). Es stellte sich somit die Frage, ob dieses System auch zur Expression anderer Membranproteine genutzt werden kann. In dieser Arbeit wurde daher auf der Basis dieser funktionellen Einheit eine Klonierungs- und Reinigungsstrategie zur Etablierung einer allgemein anwendbaren Methode entwickelt und verwendet (149). Gleichzeitig wurde durch den Einsatz eines abtrennbaren 14Histidin-Affinitätstags eine Option zur Verfügung gestellt, um nach dem klassischen Reinigungsverfahren der Affinitätschromatographie rasch ausreichende Mengen gereinigtes Protein zu erhalten (Abbildung C 1).

Verschiedene Transportsysteme aus der Hefe wurden ausgewählt, die sich in ihrer Lokalisation und ihrer Funktion unterscheiden, um eine Evaluierung des Systems zu gestatten (Tabelle C1). Dabei zeigte sich, dass durch das PDR Netzwerk eine Expression unterschiedlicher Proteine über den vorgeschalteten Pdr5 Promotor grundsätzlich möglich ist (Abschnitt C 1.2). Für drei von fünf ausgewählten Transportsystemen konnte neben der Expression auch eine erfolgreiche Reinigung nach dem vereinfachten Standardreinigungsverfahren gezeigt werden (Abbildung C 2 - Abbildung C 4 und Abbildung C 7). Bei diesen Transportern handelte es sich um die PDR ABC-Transporter Pdr5 und Yor1 und den putativen LTE- (Lipid Translocating Exporter) Transporter Rsb1. Diese werden auch unter nativen Bedingungen durch die Transkriptionsfaktoren des PDR-Netzwerks reguliert und sind in der Plasmamembran lokalisiert (115, 118, 121). Eine Modifikation dieser Hefeproteine durch Glykosylierungen oder auch durch regulatorische Wechselwirkungen mit Stresssensoren oder Interaktionspartnern zur Faltung und korrekten Lokalisation konnte daher auch unter den genetisch modifizierten Bedingungen gewährleistet. Beispielsweise ist für den LTE-Transporter Rsb1 bekannt, dass er über minimal zwei essentielle Glykosylierungsstellen verfügt (154). Bei den beiden anderen Membranproteinen, dem *half-size* ABC-Transporter Mdl1 und der P4-Typ ATPase Drs2, führte die Aufreinigung unter den standardisierten Bedingungen nur zu geringen Proteinkonzentrationen (Abbildung C 5 und C 6). Dies konnte jedoch mehrere Ursachen haben und muss nicht zwingend gegen das System der Klonierungs- und Reinigungsstrategie über die N14HIS-Kassette

sprechen. Bei dem *half-size* ABC-Transporter Mdl1 handelte es sich um ein modifiziertes Genprodukt, bei dem eine N-terminale Signalsequenz (Leitsequenz) deletiert war, die normalerweise zur Lokalisation des Transporters in den Mitochondrien führt. Aufgrund des Verlusts dieser Leitsequenz sollte das Protein über einen modifizierten Signalweg in den Membranen des ER lokalisiert sein (151). Inwiefern dieser Aspekt bei der Expression und vor allem bei der korrekten Faltung, Lokalisation und dem Abbau des Proteins unter den Regulationsmechanismen des PDR-Netzwerks von Bedeutung ist, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. In einer Studie wurde unabhängig von der Lokalisation eines verwendeten Affinitätstags beobachtet, dass die Deletion der Leitsequenz zu einer reduzierten Mdl1 Proteinkonzentration führte (151, 182). Ein negativer Einfluss auf die korrekte Prozessierung und Lokalisation des Proteins durch den N-terminal fusionierten 14Histidin-Affinitätstag in das ER gilt daher als eher unwahrscheinlich, auch wenn die Länge und Position eines Affinitätstags die Faltung und somit die Funktionalität eines Proteins grundsätzlich beeinflussen kann (183). Für eine biochemische Analyse des modifizierten ABC-Transporters Mdl1 wird die beschriebene Kasette zur Zeit von einer anderen Arbeitsgruppe genutzt und mit Hilfe entsprechender Optimierungen der Reinigungsparameter individuell an das Protein angepasst.

Die P4-Typ-ATPase Drs2 konnte unter dem Pdr5 Promotor erfolgreich exprimiert werden. Die Ausbeute nach der Aufreinigung gemäß dem Standardprotokoll war jedoch sehr gering und nur durch entsprechende Antikörper eindeutig nachweisbar (Abbildung C 6). Verschiedene Studien des putativen Phospholipid Transporters (PLT) Drs2 zeigten, dass für die korrekte Expression und Lokalisation des Proteins ein weiteres integrales Membranprotein benötigt wird, das Protein CDC50 (163, 184, 185). Eine Deletion des CDC50 führte dabei zu einer Retention der P4-Typ ATPase Drs2 im ER. CDC50 und seine homologen Vertreter gelten als nichtkatalytische Untereinheiten der putativen PLTs, welche einen Komplex mit dem entsprechenden Transporter ausbilden und für die korrekte Funktionalität in der Phospholipid Translokation und ATPase Aktivität essentiell sind (186). Dies wurde jüngst auch für vergleichbare P4-Typ ATPasen in anderen Organismen, beispielsweise in *Leishmania* Parasiten, bestätigt (187, 188). Diese belegten, dass auch unterschiedliche Expressionslevel des Transportproteins im Vergleich zur nicht-katalytischen Untereinheit die Funktionalität des Transporters beeinträchtigen können. Die Variabilität der Expression von Drs2 unter der Kontrolle

des *PDR1-3* Transkriptionshintergrundes in Relation zur Expression von CDC50 in dieser Arbeit könnte demzufolge die Ursache für die geringe Ausbeute des Transporters nach der Aufreinigung sein. Eine entsprechende Anpassung der Expressionsbedingungen durch den zusätzlichen Einsatz eines Expressionsplasmids zur verstärkten Expression des Interaktionspartners CDC50 in Kombination mit einer optimierten Reinigungsstrategie könnte eine funktionelle Analyse der P4-Typ ATPase Drs2 ermöglichen. Der Einsatz unterschiedlicher Selektionsmarker erlaubt dabei eine Differenzierung zwischen chromosomaler und plasmidbasierter Expression. Die mit der Kasette modifizierten Stämme werden durch eine Histidinauxotrophie selektiert (149, 189). Dies ist ein wesentlicher Faktor, der eine Verifizierung der gezielten Modifikation der Zielgene durch diese Klonierungsstrategie erst möglich macht. Die wertvolle Eigenschaft des Modellorganismus zur homologen Rekombination bildet dabei die Grundlage. In Kombination mit der Klonierungskasette eröffnet diese Klonierungsstrategie auch die Möglichkeit zur gezielten Mutagenese, die eine biochemische Charakterisierung eines Membranproteins maßgeblich voran treibt. Eine heterologe Expression und Reinigung von Membranproteinen sollte mit diesem System auch möglich sein, auch wenn unter diesen Bedingungen gerade die regulatorischen und proteinspezifischen Eigenschaften wesentlich stärker ins Gewicht fallen, um eine erfolgreiche Isolierung und Analyse zu ermöglichen. Genetische Manipulationen der Kasette wie z.B. den Einsatz unterschiedlicher Affinitätstags als auch des Klonierungsstammes durch eventuelle Deletionen oder genetische Manipulationen im Bezug auf die Expression von Interaktionspartnern und Chaperonen sind gerade in dem Modellorganismus der Bäckerhefe leicht zugänglich (189, 190).

Auf der Grundlage der Klonierungs- und Reinigungsstrategie des PDR ABC-Transporters Pdr5 kann im Prinzip die Expression über das PDR-Netzwerk für jedes Protein in einem standardisierten Verfahren evaluiert werden. Im Anschluss kann somit die individuelle Anpassung der präparativen Bedingungen erleichtert werden. Ein wesentlicher Faktor, der über den Erfolg der Proteinisolierung bestimmt, stellt dabei beispielsweise die Wahl des Puffersystems oder der Einsatz von Stabilisatoren oder Proteaseinhibitoren dar. Eine erfolgreiche Expression und Reinigung ist dabei kein Garant für den Erhalt eines funktionell aktiven Proteins, wie am Beispiel des ABC-Transporters Pdr5 gezeigt werden konnte (Abbildung C 2). Trotz hoher Quantität und Qualität war im solubilisierten Zustand keine Aktivität nachweisbar.

Damit wird deutlich, dass auch die Solubilisations- und Reinigungsbedingungen kritische und proteinspezifische Faktoren in der Proteinisolierung darstellen. Die Wahl des Detergenz spielt dabei eine besondere Rolle und kann je nach Art des Detergenz nicht nur den Grad der Solubilisation, sondern auch maßgeblich die Funktionalität eines Proteins beeinflussen (191). Die Ca^{2+} -ATPase aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum z.B. ist nach Solubilisation mit mittelkettigen polyoxyethylenglycol-haltigen Detergenzien funktionell stabil, während kurzkettige Detergenzien und viele zwitterionische Detergenzien zwar eine Solubilisation ermöglichen, allerdings zu einer Inaktivierung des Proteins führen (192). Zudem ist auch das Massenverhältnis zwischen Detergenz und Protein von Bedeutung. Im Fall von Pdr5 wurde durch das Detergenz DDM allem Anschein nach der Transporter entweder in einer funktionell inaktiven Konformation arretiert oder möglicherweise oligomerisiert. MALS (Multi Angle Light Scattering) Analysen (193) des gereinigten Pdr5 in Kombination mit einer Größenausschlusschromatographie zeigten beispielweise stets ein breites Elutionsprofil und dementsprechend auch variierende Werte für das absolute Molekulargewicht des Proteins in der Detergenzmizelle (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Methode wird das mittlere Molekulargewicht eines Proteins über dessen Einfluss auf die Lichtstreuung ermittelt. In Anwesenheit des Detergenz DDM konnte Pdr5 ATP weder binden noch hydrolysieren, was auch in Bindungsstudien mit ATP-Agarose bestätigt werden konnte (150).

Die Isolierung und Reinigung eines beliebigen Membranproteins, sei es aus der Hefe oder eventuell auch aus einem anderen Organismus, kann letztlich durch die beschriebene Klonierungs- und Reinigungsstrategie über die N14HIS-Klonierungskassette in Kombination mit dem genetisch modifizierten Klonierungsstamm ermöglicht werden. Dabei kann alternativ auch unabhängig von der Option zur Reinigung über die Affinitätschromatographie die Kassette als Basis für funktionelle biochemische und biophysikalische Analysen genutzt werden.

2. Funktionelle Charakterisierung des MDR ABC-Transporters Pdr5 in *S. cerevisiae*

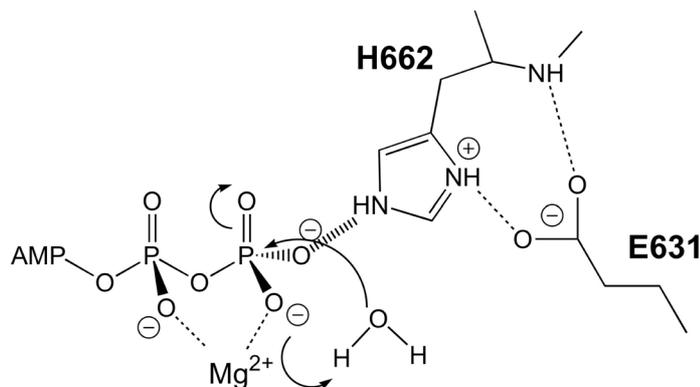
Die Generierung ausreichender Proteinmengen bildet die Grundlage für biochemische und biophysikalische Analysen. In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die N14HIS-Klonierungskassette die funktionelle Einheit aus dem konstitutiven Pdr5 Promotor und einem spezifischen *PDR1-3* Deletionsstamm genutzt, um auf molekularer Ebene den ABC-Transporter Pdr5 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in angereicherten Plasmamembran-Präparationen detailliert zu analysieren. ABC-Transporter repräsentieren eine besondere Art von Membranproteinen, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen übernehmen und sich durch eine breite Substratvielfalt und Substratelektivität auszeichnen. Alle Vertreter dieser Familie weisen eine gemeinsame Grundstruktur auf und gewinnen die nötige Energie für den Substrattransport über die TMDs durch die Hydrolyse von ATP in den hoch konservierten NBDs (20). In intensiven biochemischen und strukturellen Analysen unterschiedlichster ABC-Transporter wurde die Funktionsweise dieser Systeme in der Generierung der Energie aus der ATP-Hydrolyse und ihrer Umsetzung im Transportprozess auf molekularer Ebene hinterfragt und beleuchtet. Auf diese Weise wurden verschiedene Postulate und Modelle aufgestellt, um die mechanistischen Abläufe und Verknüpfungen in diesen Transportern einschließlich ihrer breiten Substratspezifität zu beschreiben (54, 57, 59, 69, 72, 73, 99, 194). Inwiefern diese Postulate auch für die Vertreter der PDR ABC-Transporter gültig sind und welchen Beitrag die Analyse des ABC-Transporters Pdr5 für das Verständnis dieser Systeme liefern kann, gehörte zu einer der Fragestellungen, die in dieser Arbeit verfolgt wurden.

2.1. Die Konstitution der Pdr5 NBDs

2.1.1. Katalysemechanismus der ATP-Hydrolyse

Aufgrund der hohen Konservierung der Motordomänen innerhalb der unterschiedlichen ABC-Transporter liegt die Vermutung nahe, dass die Energiegewinnung aus der Hydrolyse des terminalen Phosphoanhydrids von ATP über einen generellen Mechanismus ablaufen könnte. Die Dimerisierung der beiden NBDs repräsentiert dabei den initialen Schritt, der erst die Koordination und Hydrolyse von ATP durch die katalytisch aktiven Motive ermöglicht (34, 72, 77). Auf

molekularer Ebene wurden dabei gerade durch die intensiven Struktur-Funktions-Analysen isolierter NBDs bakterieller ABC-Transporter wie dem Hämolyisin (Hly)-System in *E. coli* (195), oder dem ABC-Transporter BmrA aus *Bacillus subtilis* (57) bzw. dem Transporter MJ0796 aus *Methanococcus Jannaschii* (53) zwei putativ essentielle Aminosäuren identifiziert. Die Rede ist vom konservierten Glutamat im direkten Anschluss zum Walker B und dem Histidin des H-loops, die möglicherweise in kontroversen Mechanismen an der Hydrolyse beteiligt sind. In Kombination wurden die beiden Aminosäuren als katalytische Dyade beschrieben (54, 56). Beide Aminosäurereste sind in unmittelbarer Nachbarschaft zum γ -Phosphat des ATP und können auch untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, wie anhand verschiedener NBD-Kristallstrukturen beispielsweise des Transporters HlyB, MalK oder des TAP-Systems gezeigt werden konnte (47, 54, 165). In der katalytischen Dyade wird dem Glutamat eine orientierende Funktion durch eine Koordination des Histidins zugesprochen. Letzteres kann somit als Stabilisator des transienten dimeren Übergangszustands durch eine gezielte Wasserstoffbrückenbindung mit dem γ -Phosphat einen Angriff des Wassermoleküls begünstigen (Abbildung D 1; (56)).



**Abbildung D 1: Die katalytischen Dyade am Beispiel der HlyB-NBD.
Entnommen aus (56)**

Diesem Substrat-assistierten Mechanismus (SAC) (196) steht der basenkatalysierte Hydrolyse-Mechanismus (197) gegenüber, der allein in der polarisierenden Wirkung des Glutamats begründet ist (siehe Abschnitt A 5; Abbildung A 4). Das Carboxylat des Glutamats wirkt dabei als generelle Base und deprotoniert das Wassermolekül im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion, welches den nukleophilen Angriff als Hydroxidation ermöglicht (57, 60). Die meisten

biochemischen Analysen verschiedenster isolierter NBDs der ABC-Proteine können in Einklang mit der Existenz einer katalytischen Dyade gebracht werden. Eine Substitution des Histidins durch eine Aminosäure, die keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, führte in diesen Systemen zum Verlust der ATPase Aktivität. Bei der Mutation des Glutamats hingegen konnten ganz unterschiedliche Effekte beobachtet werden, die einen vollständigen Aktivitätsverlust wie im Transporter Mdr3 aus *Mus musculus* (198) oder eine Reduktion wie z.B. im humanen P-gp (199) zu Folge hatten. Die Ursache dafür wird im Ausmaß der erhöhten Flexibilität des Histidins vermutet, welches ohne das Glutamat nicht effizient das γ -Phosphat koordinieren und stabilisieren kann. Eine Ausnahme stellt das DNA Reparaturprotein MutS aus *E. coli* dar, welches sogar eine Aktivitätssteigerung der ATP-Hydrolyse bei einer Mutation des Histidins zeigte (200). Bei der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung der beiden konservierten Aminosäuren in dem *full-size* Transporter Pdr5 wurden ebenfalls gegenteilige Beobachtungen gemacht. Bereits die *in vivo* Analyse auf der Basis von Drogenresistenztests als auch die Analyse des R6G Efflux in ganzen Hefezellen zeigten, dass zumindest in der Hierarchie die Mutation des Glutamats (E1036Q) die Funktionalität des Transporters stärker beeinflusste (Abschnitt C 2.2.1; Abbildung C 10 und Abbildung C 12). Die Einführung der H1068AE1036Q Doppelmutation führte auch nicht zu einem verstärkten Effekt, sondern verhielt sich analog zur Glutamatmutante (E1036Q). Im Gegensatz zur H1068A Mutante zeigten die Glutamat-Mutanten gegenüber allen getesteten Substraten eine hohe Sensitivität, so dass man einen nahezu vollständigen Verlust des resistenten Phänotyps von Pdr5 beobachten konnte. Der Nachweis, dass das Histidin nicht essentiell für die Hydrolyse von ATP in Pdr5 ist, wurde mit Hilfe des ATPase Aktivitäts-Assays in Plasmamembranen gezeigt. Es konnte keinerlei Beeinträchtigung der basalen ATPase Aktivität durch die H1068A Mutante beobachtet werden, während die E1036Q Mutation und die Doppelmutante zum vollständigen Verlust der Aktivität sowohl in der ATP-Hydrolyse als auch im aktiven R6G Transport in Plasmamembranen führte (siehe Abschnitt C 2.2.2 Abbildung C 14).

Ein Sequenzvergleich der verschiedenen PDR- und auch homologen MDR-Vertreter ließ vermuten, dass eine mögliche katalytische Dyade gegebenenfalls durch das dem Histidin benachbarte Glutamin möglich wäre (siehe Abschnitt C 2.2.1; Abbildung C 8). Beispielsweise konnte in einem Vergleich der Kristallstrukturen

verschiedener ATPasen an der entsprechenden Position des Histidins andere Wasserstoffbrückendonoren gefunden werden, die als katalytisch essentiell gelten (54). Dazu zählt z.B. auch ein Glutamin (Q194) im bakteriellen DNA Reparaturprotein RecA aus *E. coli* (201). Grundsätzlich gilt der Substrat-assitierte Hydrolyse Mechanismus als sehr wahrscheinlich, da er auch die Vermeidung einer unerwünschten frühzeitigen Hydrolyse von ATP vor der Bildung des Dimers erklären kann. Dies konnte am Beispiel von der HlyB-NBD gezeigt werden, da eine Hydrolyse, durch einen Wasserstoffbrückendonator wie Histidin oder Glutamin nur bei einem bestimmten pH-Wert stattfindet, der erst im Dimer erreicht wird (202). Doch auch durch die Analyse des konservierten Glutamins von Pdr5 mit Hilfe der verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Methoden konnte die Existenz einer katalytischen Dyade in Pdr5 nicht nachgewiesen werden (Abbildung C 11, Abbildung C 12 und Abbildung C 14). Unter diesen Umständen scheint der Hydrolyse-Mechanismus in Pdr5 vermutlich über das Carboxylat des Glutamats abzulaufen. Dieser Basen katalysierte Mechanismus wurde in früheren funktionellen und strukturellen Studien der isolierten NBDs der ABC-Transporter MJ0796 und MJ1267 aus *Methanococcus Jannaschii* postuliert (53, 60) und auch durch die biochemische Charakterisierung des DNA Reparaturproteins MutS unterstützt (203). Erst kürzlich konnten ähnliche Beobachtungen wie in Pdr5 im Hinblick auf das konservierte Histidin und Glutamat in der NBD2 auch für den homologen ABC-Transporter Cdr1 des pathogenen Pilzes *Candida albicans* gemacht werden. Eine Mutation des konservierten Histidins hatte auch in diesem System keinen Einfluss auf die basale ATP-Hydrolyse (Persönliche Kommunikation Prof. Prasad, Jawaharlal Nehru Universität, Neu Delhi). Dies deutet zumindest in den MDR-Transportern der Pilze auf einen generellen Mechanismus hin, auch wenn zu diesem Zeitpunkt der exakte Mechanismus über eine Basenkatalyse noch nicht eindeutig bestätigt werden kann. Gleichzeitig wirft diese Beobachtung allerdings auch die Frage auf, nach welchem Mechanismus der vollständige katalytische Transportzyklus in den MDR ABC-Transportern abläuft bzw. ob und wie eine frühzeitige ATP-Hydrolyse verhindert wird. Dazu müssen jedoch zunächst alle Fakten zusammengetragen und evaluiert werden, um eine mögliche Aussage anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse treffen zu können.

2.1.2. Die Bedeutung der Degeneration und die funktionelle Asymmetrie in den NBDs

Ein wesentliches Merkmal der PDR ABC-Transporter als auch der homologen Vertreter in anderen Pilzen ist eine Degeneration der charakteristischen Motive in den beiden NBDs, die in hohem Maße unter den Vertretern dieser ABC-Transporter konserviert ist ((68, 111); siehe Abschnitt C 2.1, Abbildung C 8). Dabei lässt sich bereits aus der Primärsequenz der NBDs eine funktionelle Asymmetrie zwischen den beiden katalytischen ATP-Bindungstaschen feststellen, wie sie auch schon für ABC-Transporter anderer Spezies aufgedeckt werden konnte (80, 204, 205). Die gewonnenen Daten aus der Mutagenese des Glutamats im Anschluss an den Walker B (E1036Q) sowie des konservierten Lysins im Walker A Motiv der NBD2 (K911A) unterstützen im Einklang mit früheren Mutagenesestudien des Walker A Motivs in Pdr5 diese These (101). Bereits die Einzelmutanten führten zum Verlust des resistenten Phänotyps (siehe Abschnitt C 2.2, Abbildung C 10, Abbildung C 12). Auch in den Aktivitätsbestimmungen *in vitro* konnte weder eine ATP-Hydrolyse noch ein aktiver Pdr5-vermittelter R6G Transport nachgewiesen werden (Abbildung C 14). In Konsistenz zu diesen Beobachtungen, belegten Wachstumsstudien des entsprechend mutierten Lysins in dem homologen ABC-Transporter Cdr1 aus *Candida glabrata* ebenfalls einen vollständigen Verlust der Cdr1-vermittelten Resistenz als auch der ATPase Aktivität (81). Eine entsprechende Substitution des konservierten Cysteins anstelle des Lysins durch ein Alanin im Walker A Motiv der NBD1 (C199A) von Pdr5 hatte hingegen gar keinen Einfluss auf die Aktivität, soweit das anhand der verwendeten Methoden beurteilt werden konnte (Abbildungen C10, C12, C14 und C15). Sowohl im Wachstums- wie auch im Transportverhalten *in vitro* und in der ATPase Aktivität konnten keine qualitativen Unterschiede beobachtet werden. Die entsprechende Doppelmutante C199AK911A verhielt sich dabei vollständig wie die K911A Einzelmutante, so dass ein additiver Effekt der beiden Mutationen ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu und auch zu den Ergebnissen des ABC-Transporters Cdr1 in *Candida glabrata* wurde für die Cysteinmutante in Cdr1 des Pilzes *Candida albicans* eine funktionell essentielle Rolle postuliert, da in diesem Fall eine eindeutige Einbuße in der ATPase Aktivität beobachtet wurde (206, 207). Dennoch wurde auch für dieses System eine funktionelle Asymmetrie beschrieben, bei der für einzelne Aminosäuren wie dem Cystein im Walker A und dem Aspartat im Walker B Motiv der degenerierten NBD1

distinkte Funktionen postuliert wurden (208, 209). Allerdings scheinen die Autoren in diesem System nicht von einer regulatorischen Funktion der degenerierten ATP-Bindungstasche auszugehen, da die Mutationen in diesem System einen direkten Effekt auf die Hydrolyse Aktivität bewirkten, während die Bindung von ATP durch die entsprechenden Mutationen des Cysteins und des Aspartats nicht beeinflusst wurden.

Die Ergebnisse der Rekonstruktionsstudie der einzelnen degenerierten Motive in Pdr5 unterstützen jedoch die These einer funktionellen Asymmetrie und gleichzeitig einer regulatorischen Funktion der degenerierten ATP-Bindungstasche in Pdr5. Die Rekonstruktion der degenerierten Motive Walker A, dem Glutamat im Anschluss zum Walker B und des H-loops in der N-terminalen NBD sowie dem C-loop der C-terminalen NBD hatten jeweils für sich keinen Effekt auf die Pdr5-vermittelten ATPase Aktivität (siehe Abschnitt C 2.3.5, Abbildung C 24, Tabelle C5). Allerdings konnte die Notwendigkeit der degenerierten ATP-Bindungstasche für die Funktionalität des PDR ABC-Transporters Pdr5 erstmalig durch die biochemischen und biophysikalischen Ergebnisse des vollständig rekonstruierten Systems belegt werden. Dabei wurde durch die vollständige Rekonstruktion der Konsensusmotive das Ziel verfolgt, einen Transporter mit funktionell „symmetrischen“ NBDs zu generieren. Bereits die funktionelle Analyse dieses Genprodukts *in vivo* führte zum nahezu vollständigen Verlust des resistenten Phänotyps von Pdr5, und auch *in vitro* konnte kein R6G Transport mehr detektiert werden (Abbildung C 20 und C24). In Analogie dazu wurde die ATP-Hydrolyse Aktivität des Transporters durch die Mutationen komplett eingestellt (Abbildung C 24). Interessanterweise war der somit konstruierte „symmetrische“ Transporter Pdr5 jedoch immer noch in der Lage, ATP zu binden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen deuten auf eine enge Wechselwirkung zwischen den beiden ATP-Bindungstaschen, die erst eine effiziente Hydrolyse und damit eine ausreichende Energiegewinnung möglich machen. Bislang wurden einige Bestrebungen unternommen, um den Mechanismus des Hydrolysezyklus in asymmetrischen Systemen aufzuklären (165). Für einige Systeme wie dem Chloridkanalregulator CFTR oder auch dem TAP-System konnten z.B. Strukturen isolierter NBDs erzeugt werden (43, 51). Entsprechende Intermediate des Hydrolysezyklus konnten aber auch hier bislang noch nicht kristallisiert werden. Im Hinblick auf den Dimerisierungsprozess in den asymmetrischen Transportern wird vermutet, dass die regulatorische ATP-Bindungstasche konstant ATP gebunden hält

und somit als Scharnier wirkt um den Dimer zu stabilisieren. Konsistent dazu wurde eine Studie zur Analyse des katalytischen Zyklus des MDR ABC-Transporters P-gp veröffentlicht, die diese These einer möglichen Dimerisierungsplattform durch ein gebundenes ATP Molekül unterstützt (210). Ob dies wirklich zutrifft und ob diese Vermutung auch für die Vertreter der PDR-Familie bzw. die homologen Transporter in den Pilzen gültig ist, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Allerdings steht diese Theorie im Einklang mit der beobachteten hohen basalen ATPase Aktivität von Pdr5, bei der das System im Prinzip stets in Bereitschaft ist und kontinuierlich ATP hydrolysiert (167). Bislang existieren keine biochemischen oder strukturellen Daten isolierter NBDs der PDR ABC-Transporter, die einen konkreten Einblick in den ATP-Hydrolyse Mechanismus dieser Familie von MDR ABC-Transportern gewähren könnten. Eine biochemische und biophysikalische Analyse der isolierten NBDs von PDR ABC-Transportern wird allerdings zur Zeit angestrebt.

2.1.3. Gibt es eine Verknüpfung zwischen der Konstitution der NBDs und dem Substratspektrum?

Im Zuge der Rekonstruktionsstudie der Pdr5 Degeneration wurden für die einzelnen rekonstruierten Motive teilweise unterschiedliche Effekte auf den charakteristischen Phänotyp von Pdr5 beobachtet. Beispielsweise führte die Wiederherstellung des degenerierten Glutamats im Anschluss zum Walker B der N-terminalen NBD von Pdr5 zu einer Hyperresistenz gegenüber Fluconazol und dem Fluoreszenzfarbstoff R6G. Der rekonstruierte H-loop vermittelte dagegen eine Hyperresistenz gegenüber allen getesteten Substanzen (siehe Abschnitt C 2.3; Abbildung C 18). Andererseits ergaben einzelne Substitutionen in den degenerierten Motiven Walker A oder C-loop gegenteilige Effekte auf den Phänotyp, die sich im vollständig rekonstruierten Motiv wieder nivellierten (Abbildung C 18/Abbildung C 19). Sowohl der rekonstruierte Walker A als auch der C-loop hatten keine Auswirkung auf das Pdr5-vermittelte Resistenzverhalten der Zellen. Eine entsprechende kinetische Analyse *in vitro* über den aktiven R6G Transport konnte die Beobachtungen in gewissem Maße bestätigen (Abbildung C 23, Tabelle C4). Während die Michaelis-Menten Konstanten keinen Unterschied aufwiesen, konnten teilweise in Analogie zum Resistenzverhalten *in vivo* erhöhte Transportgeschwindigkeiten ermittelt werden. Ähnliche Beobachtungen im Wachstumsverhalten konnten auch in Mutagenesestudien des degenerierten C-loops in der C-terminalen NBD des ABC-

Transporters Cdr1 aus *Candida albicans* beobachtet werden (211). Je nach Substitution der Aminosäuren wurden dabei selektive Unterschiede in Resistenzverhalten beobachtet. Ist es also möglich, dass spezifische Degenerationen die Substratvielfalt mitbestimmen? Das Spektrum der unterschiedlichen ABC-Transporter im PDR-Netzwerk überschneidet sich (212), wie auch die konservierte Degeneration. Ausnahmen gibt es aber auch dort, wie z.B. die ABC-Transporter Aus1 oder Pdr11. Diese Transporter weichen von der konservierten Degeneration in einigen Motiven ab und sind vermutlich für den Lipid Transport und somit für die Gewährleistung der Membranasymmetrie verantwortlich (213). Möglicherweise besteht demzufolge eine Verknüpfung zwischen der Degeneration einzelner Aminosäuren und dem Substratspektrum.

Kritisch betrachtet könnte vermutet werden, dass die beobachteten Wachstumsunterschiede in den Hefezellen durch andere Transportsysteme im PDR-Netzwerk begründet sind, die durch die genetische Manipulation des Transkriptionshintergrundes in ihrer Expression beeinflusst wurden (116, 127). Im Gegensatz zu vielen anderen Studien wurde jedoch in dieser Arbeit ein Hefestamm verwendet der keine Deletionen von ABC-Transportern aufweist (132, 208). Jüngere Studien belegten in diesem Zusammenhang, dass gerade diese Deletionen zu signifikanten Veränderungen der Expressionslevel der Transportsysteme im PDR Netzwerk führen. und somit Fehlinterpretationen trotz entsprechender Kontrollmutanten wahrscheinlicher werden können (214). Im konkreten Fall der Degenerationsanalyse sprechen jedoch die parallelen Ergebnisse aus unterschiedlichen Systemen mit differenzierten genetischen Hintergründen gegen eine zufällige Beobachtung (211).

Ein eindeutiger Effekt auf das Substratspektrum durch die Mutagenese einzelner Aminosäuren in den NBDs konnte zudem auch durch die entsprechenden *in vitro* Analysen belegt werden. Dabei kristallisierten sich gerade der H-loop und der C-loop als charakteristische Motive aus. Die H1068A Mutation des konservierten H-loops in der C-terminalen NBD, der zuvor als Bestandteil einer katalytischen Dyade in Pdr5 ausgeschlossen werden konnte, führte zum selektiven Verlust der Pdr5-vermittelten R6G und Rhodamin 123 Resistenz (siehe Abschnitt C 2.2; Abbildung C 10). Während die basale ATPase Aktivität unverändert war, konnte auch kein aktiver R6G Transport durch die Mutante beobachtet werden (Abbildung C 14).

Analog dazu verhielt sich auch die Kombinationsmutante aus den beiden degenerierten Motiven, dem *H-loop* der NBD1 und dem *C-loop* aus NBD2 (HC-Mutante). Trotz basaler ATPase Aktivität konnte kein R6G Transport *in vitro* detektiert werden (siehe Abschnitt C 2.3, Abbildung C 22 und C24).

Verschiebungen des Substratspektrums durch Mutationen in den NBDs wurden auch schon in anderen Systemen beschrieben, wobei dieser Effekt stets in einer entsprechenden Beeinflussung der basalen ATPase Aktivität durch Substrat-induzierte Stimulation oder Inhibition widergespiegelt wurde (215). Für Pdr5 konnte eine solche Stimulation der basalen ATPase Aktivität bislang nicht gezeigt werden, allerdings eine Substrat-vermittelte Inhibition (167). Beide beschriebenen Mutanten konnten in ihrer Hydrolyse Aktivität durch R6G gehemmt werden, wobei sie sich in ihrer Inhibition signifikant zum Wildtyp unterschieden (siehe Abschnitt C 2.2.2.1 (167) und Abschnitt C 2.3.2.2, Abbildung C 25). Der *C-loop* als auch die SDR-Region übernehmen allem Anschein nach eine tragende Rolle in der Kommunikation zwischen dem NBD Dimer und den TMDs, wie bereits aufgrund biochemischer Analysen verschiedener Systeme wie z.B. dem TAP-System (80) oder HlyB (44) beschrieben wurde. Der rekonstruierte *C-loop* in Pdr5 allein verhielt sich allerdings wie der Wildtyp, so dass erst die Kombination aus H- und *C-loop* diesen Effekt bewirkte. Der *H-loop* hingegen repräsentiert eine Region, die normalerweise direkt an der Schnittstelle zwischen den NBDs und dementsprechend nicht in unmittelbarer Nähe zu den TMDs liegt. Es ist demzufolge fraglich, welche Funktionen diese Motive im Hydrolyse Mechanismus übernehmen und vor allem, wie der Einfluss ihrer Interaktionen untereinander und mit den Substraten auf die Selektivität in den TMDs ausgeübt wird. Die Mutagenese des *H-loops* im homologen Transporter Cdr1 in *Candida albicans* führte auch zu einer Verschiebung der R6G Substratselektivität (Persönliche Kommunikation Prof. Prasad, Jawaharlal Nehru Universität, Neu Delhi). Für das humane TAP-System, welches ebenfalls über eine charakteristische Degeneration in den NBDs verfügt, wurde ebenfalls ein signifikanter Einfluss des konservierten *H-loops* auf den Peptidtransport beschrieben (205). Vor diesem Hintergrund und der hohen Konservierung der verschiedenen Motive in den NBDs nicht nur in den PDR ABC-Transportern und ihren homologen Vertretern scheint die Kommunikation zwischen der ATP-Hydrolyse und dem Transportprozess nach einem konservierten Mechanismus abzulaufen. Die beiden Regionen übernehmen dabei

gewissermaßen eine tragende Funktion. Die Substratspezifität wird daher nicht allein durch die Konstitution der TMDs bestimmt.

2.2. Proteinspezifische Interaktionen mit Substraten, Modulatoren und Energieressourcen

2.2.1. Die Bedeutung der S1360F Mutante

Zur Aufklärung der Kommunikation zwischen den NBDs und den TMDs auf einer molekularen Ebene können gerade die proteinspezifischen Wechselwirkungen mit Substraten, Modulatoren oder auch Energiequellen von zentraler Bedeutung sein. Die Funktionsweise der ABC-Transporter wird dabei wesentlich durch die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Toxinen in den TMDs geprägt. Dies spiegelt sich z.B. in der Substrat-induzierten Stimulation oder Inhibition der ATPase Aktivität einiger Transportsysteme wie P-gp (173, 174) oder LmrA (216, 217) wider. Neben der Analyse der Degeneration in den NBDs wurden in dieser Arbeit daher auch gezielt die Interaktionen zwischen dem Modulator FK506 und Pdr5 bzw. der S1360F Mutante in der putativen TMH 11 untersucht (101, 139). Die Pdr5 exprimierenden Zellen zeigten eine erhöhte Sensibilität in Anwesenheit von FK506 gegenüber unterschiedlichen Toxinen wie z.B. Ketoconazol und Fluconazol, Rhodaminen oder auch Cycloheximid, während die Zellen der S1360F Mutante nicht betroffen waren. Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abschnitt C 2.4.1; Abbildung C 29). In homologen Systemen wie dem ABC-Transporter Cdr1 befindet sich an der Position des Serins auch eine polare Aminosäure, ein Threonin, bei dessen Mutation zu einem Phenylalanin analog zur S1360F Mutante in Pdr5 eine Aufhebung des modulatorischen Effekts auf den Phänotyp beobachtet werden konnte (218, 219). Eine tragende Funktion in der Ausbildung der Substratbindetasche und somit eine direkte oder indirekte Beteiligung an den Interaktionen zwischen den Toxinen und dem Transporter ist daher sehr wahrscheinlich. Welche Funktion die S1360F Mutante in der Vermittlung des inhibitorischen Einflusses von FK506 hat und wie dies zum Verständnis des allgemeinen Transportmechanismus in der Verknüpfung zwischen den Prozessen in den TMDs und den NBDs der ABC-Transporter beitragen kann, stand daher im Zentrum der Analyse.

Durch den gezielten Einsatz von biochemischen Analysemethoden *in vivo* und *in vitro* wurde der modulatorische Effekt von FK506 auf die Funktionalität von Pdr5 und der S1360F Mutante charakterisiert. Vor allem wurde die Modulation des Pdr5-vermittelten R6G Transports detailliert untersucht, da dieser sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden kann (133). Ein indirekter Einfluss durch FK506 bedingte Nebeneffekte auf den Metabolismus der Hefezellen konnte dabei bereits im Vorfeld ausgeschlossen werden. FK506 wirkt auf die Peptidyl-Prolyl Isomerase FKBP12 (FK506 Bindeprotein 12) und hemmt im Komplex mit dieser die Calcineurin Phosphatase (220, 221), die besonders in Stresssituationen einer Zelle von Bedeutung ist. Eine elegante Studie belegte jedoch, dass die primären Ziele, die FKBP's, nicht für den modulatorischen Effekt durch FK506 auf die Pdr5-vermittelte Resistenz verantwortlich sind (139).

Die quantitative Analyse des R6G Transports der beiden Pdr5 Modifikationen im Vergleich zeigte, dass auch die S1360F Mutante in ihrer Aktivität R6G zu transportieren, durch FK506 beeinflusst wurde. Dabei wurden jedoch im Gegensatz zum Wildtyp 50fach höhere Konzentrationen des Modulators benötigt, um eine 50%ige Inhibition zu erzielen. In Abwesenheit von FK506 wurde bei der kinetischen Analyse des R6G Transports hingegen kein Unterschied in der R6G Transporteffizienz beobachtet. Die Michaelis Menten Konstanten für Pdr5 und die S1360F Mutante waren nahezu identisch, so dass der beobachtete Unterschied in der Inhibition allem Anschein nach nicht in einer Überlagerung durch veränderte Interaktionen mit dem Substrat R6G in der S1360F Mutante begründet ist (Abbildung C 32 und C33). Vor dem Hintergrund der vermeintlichen Lokalisation der Mutation in der Schnittstelle verschiedener Substratbindestellen deuten diese Beobachtungen vielmehr darauf, dass die Mutante direkt an den proteinspezifischen Interaktionen mit dem Modulator involviert ist.

Bei der parallelen Analyse der FK506-vermittelten Inhibition der ATPase Aktivität wurde ein signifikanter Unterschied, ähnlich dem beobachteten Phänomen in der Inhibitionsstudie des aktiven R6G Transports beobachtet. Für eine 50%ige Inhibition der basalen ATPase Aktivität in Plasmamembranen der S1360F Mutante mussten 100fach höhere Konzentrationen eingesetzt werden (Abbildung C 36). Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Unterschied in der Hemmung bereits in Abwesenheit des Modulators durch die in der TMD lokalisierten S1360F Mutante verursacht wurde. Sowohl die Kinetik der Hydrolyse Aktivität als

auch die ATP- und ADP Bindungsaffinitäten waren für beiden PDR5 Varianten übereinstimmend (Abbildung C 37 und Abbildung C 38). Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Funktion der S1360F Mutante in der Interaktion mit dem Modulator FK506 in den TMDs, die zu den beobachteten Effekten im Transportverhalten von R6G und dem Unterschied in der Inhibition der ATPase Aktivität führten.

Die Bedeutung der S1360F Mutante für das Verständnis des inhibitorischen Mechanismus von FK506 im Transportprozess von Pdr5 wurde aber erst durch die eindeutige Identifizierung der Funktion von FK506 möglich. Der Modulator wirkt nicht nur als Inhibitor, sondern ist auch ein Substrat von Pdr5. Für den orthologen MDR ABC-Transporter P-gp wurde bereits früher gezeigt, dass Modulatoren wie FK506 oder Cyclosporin A zu den Substraten der MDR ABC-Transporter zählen (222). Für Pdr5 wurde zwar aufgrund von Wachstumsstudien vermutet, dass FK506 möglicherweise als Substrat dienen könnte, aber der experimentelle Nachweis fehlte bislang (139). Erst durch die Analyse des Transports in ganzen Hefezellen mit radioaktiv markiertem FK506 wurde dies möglich (siehe Abschnitt C 2.4.1.3 und C 2.4.1.5). Auf dieser Basis konnte auch das Transportverhalten der S1360F Mutante im Vergleich zum Wildtyp für FK506 untersucht werden. Die Analyse des zeitabhängigen FK506 Transports zeigte, dass bei den verwendeten Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede im Transportverhalten des Wildtyps oder der S1360F Mutante beobachtet werden konnten (Abbildung C 35). Interessanterweise konnte jedoch eine Inhibition des Pdr5 vermittelten Transports von FK506 in den Zellen des Wildtyps durch den Einsatz einer extrem hohen extrazellulären FK506 Konzentration detektiert werden, während die S1360F Mutante unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst wurde (Abbildung C 39). Diese Beobachtungen sind konsistent mit den Ergebnissen aus der Inhibitionsstudie der ATPase Aktivität und lassen die besondere Funktion der S1360F Mutante in den proteinspezifischen Interaktionen erkennen.

Bezug nehmend auf das *Alternating Access Model* (67) können mit Hilfe dieses Schlüsselexperiments (Abschnitt 2.4.1.5; Abbildung C39) in Kombination mit den Ergebnissen aus den anderen biochemischen und biophysikalischen Analysen zwei wesentliche Aspekte beschrieben werden, die die besondere Funktion der S1360F Mutante in dem inhibitorischen Mechanismus untermauern. Nach dem *Alternating Access Model* startet der Transportprozess bei einem Exporter wie Pdr5 indem der Transporter in der dem Zytosol zugewandten Konformation vorliegt. Die Bindung des Substrats, in diesem Fall FK506, erfolgt dabei an der hoch affinen Bindungsstelle. Die Freigabe des Substrats erfolgt in der extrazellulär zugewandten Konformation über die gering affine Bindungsstelle. In Relation zu den erhaltenen Ergebnissen impliziert demzufolge das äquivalente Transportverhalten der S1360F Mutante und des Wildtyps im zeitabhängigen FK506 Transport, dass die Bindung von FK506 an der hoch affinen Bindungsstelle gleich ist (Abbildung C 35). Das Ergebnis des Schlüsselexperiments deutet hingegen in Relation zum Modell darauf hin, dass die Freigabe des Substrats über die gering affine Bindungsstelle in beiden Systemen unter unterschiedlichen Bedingungen abläuft und somit die Inhibition über die gering affine Bindungsstelle erfolgt (Abbildung C 39). Über die tatsächlichen Bindungsaffinitäten kann aufgrund der Datenlage nur spekuliert werden. Die Ergebnisse implizieren jedoch, dass die Inhibition durch eine Arretierung des Transporters in der extrazellulär zugewandten offenen Konformation erfolgt, vergleichbar mit einer Produktinhibition bei Enzymen (223). Der Transportzyklus im Wildtyp wird durch eine Sättigung der gering affinen Bindungstasche und der erhöhten extrazellulären FK506 Konzentration blockiert, im Kontrast zur S1360F Mutante, deren gering affine Bindungstasche unter diesen Bedingungen scheinbar nicht gesättigt vorliegt. Der wildtypische Transporter kann somit weder FK506 noch andere Substrate transportieren, die dementsprechend in der Zelle akkumulieren und ihre toxische Wirkung auf das Zellwachstum entfalten können. In Anlehnung an das *Processive Clamp* oder *ATP-Switch Model* führt diese Arretierung der extrazellulären Konformation dazu, dass die NBDs ebenfalls in einer Konformation fixiert sind, die einen Austausch der Nukleotide nicht mehr möglich macht (59, 69). Dies spiegelt sich dann auch in der Inhibition der basalen ATPase Aktivität wider.

Die S1360F Mutante übernimmt in diesem Modell eine sensorische Funktion, da sie zu einer differenziellen Besetzung im Vergleich zum Wildtyp zwischen den beiden Konformationen in den TMDs führt und somit gleichzeitig durch die Interaktion mit dem Modulator FK506 die Kopplung mit den NBDs bestimmt. Dies äußert sich letztlich in den unterschiedlichen Inhibitionskonstanten der Pdr5 spezifischen ATPase Aktivität und unterstützt im Einklang mit den bislang beschriebenen Transportmodellen wie dem *Switch* (69) oder *Processive Clamp Model* (59) die Annahme, dass der initiiierende Schritt die Interaktion mit Substrat über die TMDs ist. Die Theorie, dass Substrate oder Modulatoren über distinkte Kommunikationswege mit den NBDs interagieren, wird auch durch die biochemischen Analysen anderer MDR ABC-Transporter wie P-gp unterstützt. Dabei wurden im Einklang mit der strukturellen Analyse von P-gp gezielte Cysteinmutanten in den TMHs 6 und 12 analysiert, die maßgeblich den Translokationspfad über die TMDs ausbilden (64, 96, 175). Die Identifizierung funktionell relevanter Interaktionspartner wie Aminosäuren oder Modulatoren bietet demzufolge ein großes Potential, um die Aufklärung der molekularen Verknüpfung im Transportprozess zu unterstützen und gleichzeitig einen Einblick in den Prozess der Substratselektion zu ermöglichen (68, 96, 145, 167, 175, 224).

2.2.2. Energieressourcen als Substratsensor?

Die Substratvielfalt wird jedoch nicht nur durch die proteinspezifischen Interaktionen über strukturelle Faktoren wie der S1360F Mutante in der Substratbindetasche oder auch der charakteristischen Konstitution der NBDs definiert. Ebenso bedeutend können auch die proteinspezifischen Interaktionen mit den unterschiedlichen Energiequellen den Selektions- und Translokationsprozess beeinflussen (68). Die Fähigkeit zur Energetisierung des Substrattransports wurde bereits in einigen Systemen (206) wie z.B. dem humanen ABCG5/G8 Transporter untersucht (225). Auch für Pdr5 wurde in einer früheren Studie postuliert, dass der Transporter in der Lage ist, GTP zur Energetisierung des Clotrimazoltransports zu nutzen (226). Bemerkenswerterweise offenbarte die Analyse der Pdr5 spezifischen Hydrolyse Aktivität verschiedener Nukleotide in Kombination mit dem R6G Transport Verfahren einen distinkten Unterschied in der Umsetzung der gewonnenen Energie im Substrattransport (siehe Abschnitt C 2.4.2). So konnte gezeigt werden, dass Pdr5

ausschließlich die Energie aus der ATP-Hydrolyse effizient für den Transport des Substrats R6G umsetzen konnte, obwohl auch die anderen Nukleotide CTP, GTP oder UTP hydrolysiert werden konnten (Abbildung C 41). Es wurden zwar Unterschiede in der basalen Hydrolyse Aktivität der Nukleotide beobachtet, jedoch ergab eine kinetische Analyse der NTPase Aktivität, dass die Michaelis Menten Konstanten für alle getesteten Nukleotide gleich waren und eine prinzipielle Nutzung der unterschiedlichen Energieressourcen somit möglich sein sollte (Abbildung C 40, Tabelle C6). Eine entsprechende Inhibition durch Substrate wie FK506 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Inhibitionskonstanten in Einklang mit dem differenziellen Transportvermögen auch variierten (Daten nicht gezeigt). In einer früheren Studie konnte z.B. beobachtet werden, dass die UTPase Aktivität von Pdr5 im Gegensatz zur ATPase Aktivität durch Prenylflavonoide unterschiedlich gehemmt wurde (227). Pdr5 differenziert demzufolge zwischen der gewonnenen Energie aus der ATP-Hydrolyse und der Energie aus der CTP, GTP oder UTP Hydrolyse. Die Frage bleibt jedoch offen, nach welchem Mechanismus diese Selektion abläuft.

2.3. Substratselektion über ein vereinfachtes Kinetik-Model

Vor dem Hintergrund der gesammelten Ergebnisse wird die Aktivität und Selektivität des ABC-Transporters Pdr5 aus einer Kombination von proteinspezifischen Interaktionen mit den Substraten und Modulatoren in den TMDs einerseits und denen mit den Nukleotiden in den NBDs andererseits definiert. Dabei stellt sich jedoch die zentrale Frage, wie diese Interaktionen miteinander vernetzt sind. Wie ist es möglich, dass beispielsweise einzelne Aminosäuren in den NBDs die Selektivität beeinflussen, obwohl sie an konkreten Konformationsänderungen nicht beteiligt sind? Bezug nehmend auf die *H-loop* Mutante konnte z.B. anhand der strukturellen Analysen der isolierten NBDs des bakteriellen ABC-Transporters HlyB (54) oder des humanen ABC-Transporters TAP1 (165) gezeigt werden, dass durch eine Mutation dieser Aminosäure kein signifikanter Effekt auf die Struktur der NBDs ausgeübt wird.

Unter der Annahme, dass die Verknüpfung zwischen den funktionellen Domänen nicht nur thermodynamischer, sondern auch kinetischer Natur ist, könnte der Mechanismus der Substratselektion in PDR ABC-Transportern mit Hilfe eines stark vereinfachten Kinetikmodells beschrieben werden (68). In Anlehnung an das *Alternating Access Model* oder das *Processive Clamp Model* erfolgt die Substratselektion dabei simultan mit der Substratbindung über die hochaffine Bindungsstelle in der zytosolisch zugewandten Konformation (59, 69). Ein wesentlicher Aspekt dabei ist, dass PDR ABC-Transporter wie Pdr5 über eine konstante basale ATPase Aktivität verfügen und somit vermutlich auch kontinuierlich in Abwesenheit von Substraten zwischen den beiden gegensätzlichen Konformationen wechseln (135, 167, 228). Vor diesem Hintergrund ist es daher unwahrscheinlich dass der raten-limitierende Schritt die Substratbindung darstellt. Viel eher repräsentiert vermutlich die Freigabe des Substrats den raten-limitierenden Schritt über die extrazellulär zugewandte Konformation. Dies steht auch im Einklang mit der beobachteten Inhibition durch FK506 in dem Schlüsselexperiment (siehe Abschnitt 2.4.1.5; Abbildung C 39) und wird gleichzeitig durch den Befund bestätigt, dass die Pdr5 spezifische ATPase Aktivität nicht stimuliert, aber inhibiert werden kann (167). Vor dem Hintergrund der kontinuierlichen Konformationsänderungen des Transporters, wird die Substratselektion dabei durch die Equilibrierungszeit der unterschiedlichen Substrate in Abhängigkeit von der zur Verfügung gestellten Zeit, die der Transporter benötigt, um zwischen den beiden Konformationen zu wechseln, definiert. Die Substratselektion stellt somit einen hochdynamischen Prozess dar, der durch die kinetischen und thermodynamischen Parameter der unterschiedlichen Interaktionen bestimmt wird. Jeder Effekt, der die Dauer der Equilibrierung beeinflusst, sei es die Kinetik in den Zwischenschritten des katalytischen Hydrolysezyklus oder auch veränderte Bindungs- bzw. Dissoziationsraten während der Substratbindung bzw. Freigabe, trägt zum Selektionsprozess bei (68).

Bezug nehmend auf die beobachteten Ergebnisse in der Analyse des R6G Transports der unterschiedlichen PDR5 Mutanten würde man beispielsweise annehmen, dass R6G eine recht langsame Bindungs- und Dissoziationskinetik besitzt. Im konkreten Beispiel bedeutet dies, dass das Substrat eine relativ lange Zeit benötigt, um mit der hochaffinen Bindungsstelle in der intrazellulär geöffneten Konformation zu equilibrieren. Überträgt man dies auf die Ergebnisse der Analyse

der H1068A oder HC-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung C 14 und Abbildung C 22), so würde eine verkürzte Equilibrierungszeit durch die spezifischen Interaktionen in der jeweiligen Mutante im Kontrast zum Wildtyp den Verlust des Transports erklären. Da den Molekülen nicht genügend Zeit zur Verfügung steht um die hoch affine Bindungsstelle ausreichend zu besetzen, wird ein effizienter Transport des Substrats verhindert. Analog würde auch der Verlust des R6G Transport bei der Energetisierung durch die Nukleotide CTP, GTP und UTP erklärt (Abbildung C 41). Schematisch ist der Unterschied in Abbildung D 1 zwischen einer ausreichend langen Equilibrierungszeit (A) und einer verkürzten Equilibrierungszeit (B) am Beispiel des Substrats R6G dargestellt.

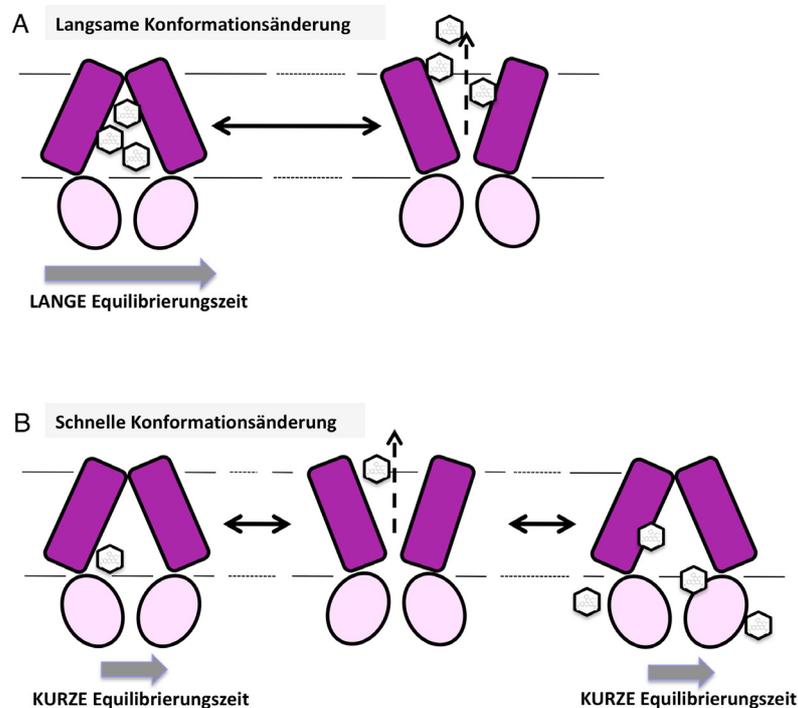


Abbildung D 2: Schematische Darstellung des Kinetikmodells für R6G

A) Die langsame Konformationsänderung erlaubt dem Substrat R6G, welches in dem Modell als ein langsam bindendes und dissoziierendes Substrat klassifiziert wurde effizient zu binden und dementsprechend auch auf der anderen Seite der Membran zu dissoziieren. **B)** Bei einer schnellen Konformationsänderung kann das langsam bindende Substrat R6G kaum binden bzw. wird aufgrund seiner langen Dissoziationszeit nicht effizient transportiert und akkumuliert in der Zelle

Gleichzeitig führt die langsame Bindungs- und Dissoziationskinetik des Substrats R6G in Kombination mit der schnellen Konformationsänderung dazu, dass auch die niedrig-affine Bindungsstelle nicht ausreichend besetzt werden kann. Dies erklärt, dass in der beobachteten Inhibition der basalen ATPase Aktivität durch R6G für die H1068A Mutante oder auch die HC-Mutante höhere Konzentrationen benötigt wurden ((167) und Abbildung C 25). Eine Sättigung der Bindungsstellen ist in diesen Systemen unter den beschriebenen Bedingungen von der intrazellulären Seite her nicht möglich, so dass die Arretierung des Transporters ausschließlich durch erhöhte Konzentrationen von der extrazellulären Seite her erfolgen kann. Im Kontrast dazu kann im Wildtyp eine inhibitorische Besetzung der extrazellulären niedrig affinen Bindungsstelle von beiden Seiten der Membran erreicht werden. Nach diesem Prinzip der Populationsdynamik der niedrig affinen Bindungsstelle wurde auch die Inhibition der P-gp vermittelten ATPase Aktivität durch eine Arretierung des Transporters in der extrazellulär zugewandten Konformation erklärt (73, 229). Verschiedene kinetische Modelle zur Erklärung des katalytischen Transportprozesses in P-gp wurden mitunter vor diesem Hintergrund entwickelt, wobei zusätzlich zur Inhibition auch eine Stimulation der ATPase Aktivität berücksichtigt wird und das System somit komplexer wird.

Welche konkreten Parameter zur Verschiebung der Equilibrierungszeit führen kann mit Hilfe des Modells nicht geklärt werden, vor allem auch da Kompetitionen an multiplen Bindungsstellen zwischen den Substraten nicht berücksichtigt werden. Dennoch könnte man das vereinfachte Modell auch zur Beschreibung des sensorischen Effekts der S1360F Mutante im inhibitorischen Mechanismus von FK506 anwenden. Der Transport der beiden Substrate wird dabei isoliert betrachtet. Mögliche Interaktionen zwischen den beiden Substraten werden zunächst vernachlässigt, obwohl sie die Selektivität des Transporters wahrscheinlich maßgeblich beeinflussen können. Gleichzeitig werden zur Vereinfachung für beide Substrate vergleichbare Bindungsaffinitäten vorausgesetzt. In Anbetracht der gesammelten biochemischen Ergebnisse wird im Gegensatz zu R6G für FK506 eine sehr schnelle Bindungs- und Dissoziationskinetik angenommen, so dass auch in einer kurzen verfügbaren Zeit die Bindung effektiv ist und die Moleküle aus der Zelle transportiert werden können. In der schematischen Darstellung in Abbildung D 3 sind die beiden Bedingungen für die unterschiedlichen Substrate im direkten Vergleich

gezeigt. Während bei einer langen Equilibrierungszeit sowohl R6G und FK506 transportiert werden können (Abbildung D 3 B), ist dies bei einer kurzen verfügbaren Zeit nur für FK506 möglich (Abbildung D 3 A).

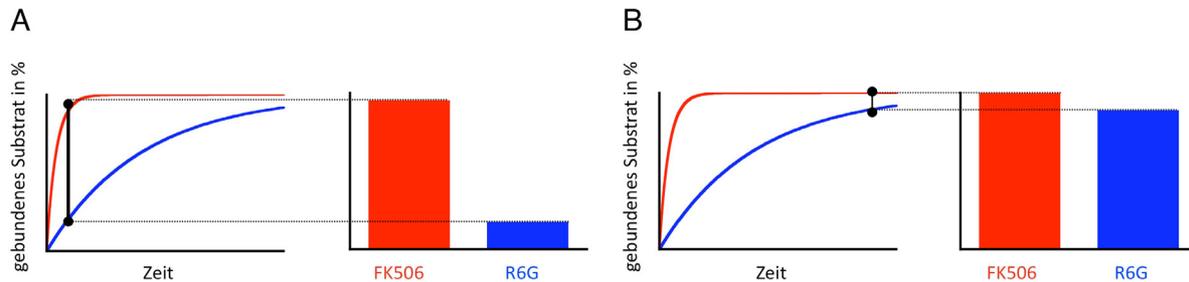


Abbildung D 3: Beschreibung der Transporteffizienz für FK506 und R6G über das vereinfachte Kinetik Modell

Schematische Darstellung der Assoziationskurven für FK506, welches in dem Modell als ein Substrat mit schneller Bindungs- und Dissoziationskinetik angenommen wird, und R6G, für das eine entsprechend langsame Kinetik angenommen wird. **A)** Erfolgt der Konformationswechsel von der zytosolisch zugewandten Seite zur extrazellulär zugewandten Seite in relativ kurzer Zeit, wird nur FK506 effizient transportiert. **B)** Bei einem langsamen Konformationswechsel können die R6G Moleküle ausreichend mit der hochaffinen Bindungsstelle equilibrieren, so dass im Vergleich, sowohl FK506 als auch R6G effizient aus der Zelle transportiert werden können.

Die S1360F Mutante wirkt in diesem Fall einer verkürzten Equilibrierungszeit, die durch die proteinspezifischen Interaktionen mit FK506 induziert werden, entgegen. Während die S1360F Mutante noch R6G und FK506 transportieren kann, wird im Fall des Wildtyps der R6G Transport durch die verkürzte Equilibrierungszeit eingestellt. Bezug nehmend auf die Ergebnisse des Resistenztests und des R6G Efflux Verfahrens in Anwesenheit von FK506 (siehe Abschnitte C2.4.1.1 und 2.4.1.2) beschreibt dieser Mechanismus wie das Toxin R6G in den Zellen des Wildtyps akkumulieren kann. Im Einklang mit der beschriebenen Inhibition des FK506 Transports im Wildtyp wird dieses Modell der besonderen Funktion der S1360F Mutante gerecht. Der FK506 Transport durch den Wildtyp wird im Vergleich zur S1360F Mutante durch die verkürzte Equilibrierungszeit relativ betrachtet begünstigt. Dies führt dazu, dass letztlich eine niedrigere FK506 Konzentration zur vollständigen Sättigung der Bindungsstellen und somit zur Arretierung des Transporters führt.

Zusammenfassend beschreibt das Kinetik Model eine Möglichkeit, wie der Prozess der Substratselektion in MDR ABC-Transportern wie Pdr5 stattfinden könnte. Dabei ist offensichtlich, dass es nur eine vereinfachte Beschreibung des Mechanismus ist und gerade vor dem Hintergrund der großen Substratvielfalt nicht zwingend für alle Substrate gelten muss. Eine Manipulation der Equilibrierungszeit würde beispielweise für ein Substrat, dessen Bindungs- und Dissoziationskinetik wesentlich schneller, ist als der Transporter zwischen seinen Konformationen wechseln kann, keine Auswirkungen auf die Selektivität haben. Dennoch werden mit dem Modell wesentliche Aspekte der molekularen Verknüpfung im Selektions- und Transportprozess ersichtlich. Es sind demzufolge nicht nur die strukturellen und thermodynamischen Faktoren, die den Prozess definieren, sondern vor allem auch die Kinetiken der unterschiedlichen proteinspezifischen Interaktionen in den TMDs und NBDs. Als Basis für das Verständnis der Substratselektion könnte eine Erweiterung des Modells durch die verschiedenen Zwischenschritte des katalytischen Hydrolysezyklus zur Entwicklung eines umfassenden Kinetik Modells beitragen. Dies wäre besonders von Interesse vor dem Hintergrund, dass viele MDR ABC-Transporter wie P-gp zwischen zwei katalytischen Modi in der ATP-Hydrolyse wechseln, dem basalen und dem stimulierten Mechanismus (228).

Ausblick

Die biochemische und biophysikalische Charakterisierung der Pdr5 NBDs einerseits und der proteinspezifischen Interaktionen andererseits deckten wesentliche Merkmale der molekularen Prozesse in der Energiesynthese und der Substratselektion und Translokation dieser besonderen Gruppe der MDR ABC-Transporter auf. Im Hinblick auf die Energiesynthese im katalytischen Zyklus stellt dabei besonders die Erkenntnis, dass eine katalytische Dyade wie sie in den meisten Systemen, die die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen, in Pdr5 nicht benötigt, ein Novum dar. Dieser Aspekt scheint ein gemeinsames Merkmal der PDR ABC-Transporter zu sein, das ebenso wie die hochkonservierte Degeneration der NBDs mit der Existenz einer hohen nicht stimulierbaren basalen ATPase Aktivität in Relation steht. Vor dem Hintergrund, dass auch andere Systeme wie das TAP-System oder CFTR eine funktionelle Asymmetrie in den NBDs vorweisen, erscheint eine gemeinsame Basis für den Mechanismus des katalytischen Hydrolysezyklus prinzipiell zu existieren (79, 80). Diese Systeme verfügen wie auch die symmetrischen ABC-Transporter wie z.B. P-gp über eine katalytische Dyade (58, 198). Wahrscheinlich ist jedoch, dass gerade die Kombination der konstitutionellen und funktionellen Merkmale in den NBDs der PDR ABC-Transporter für den Unterschied zwischen den beiden Modifikationen einer ausschließlich basalen und einer stimulierbaren gekoppelten ATPase Aktivität in MDR ABC-Transportern von Bedeutung ist. Inwiefern sich die einzelnen katalytischen Zwischenschritte wie z.B. der Dimerisierungsprozess der NBDs in der ATP Hydrolyse tatsächlich unterscheiden, wäre eine Frage, die es noch zu beantworten gilt. Eine Aufklärung der tatsächlichen kinetischen Zwischenschritte im katalytischen Zyklus könnte möglicherweise auch den Selektionsprozess wie im Kinetik Modell beschrieben, klarer definieren. In diesem Zusammenhang war gerade die Identifizierung der S1360F Mutante als Sensor in den proteinspezifischen Interaktionen mit dem Modulator und Substrat FK506 von enormer Bedeutung. Einerseits da sie zum Verständnis der inhibitorischen Mechanismen beitragen konnte, andererseits aber auch, da sie die Anwendbarkeit des Kinetik Modells als Basis zur Entschlüsselung des Selektions- und Transportprozesses maßgeblich unterstützt. Das Kinetik Modell schließt allgemein alle Faktoren ein, die die Equilibrierungszeit der Substrate mit ihrer Bindungsstelle beeinflussen (68). Eine distinkte Aufklärung einzelner

thermodynamischer und kinetischer Faktoren wie z.B Bindungsaffinitäten oder die Bindungs- und Dissoziationskinetik könnte dazu beitragen, die determinierenden Parameter zu identifizieren. Dabei stehen im Prinzip mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Geeignete Kandidaten stellen dabei vor allem das Histidin des konservierten *H-loops* oder die Kombinationsmutante aus dem *H-* und *C-loop* der degenerierten Motive dar. Mit Hilfe biochemischer und struktureller Analysen dieser Motive könnte das Kinetik Model erweitert werden. Gleichzeitig könnte ein entsprechender Vergleich mit stimulierbaren Systemen wie P-gp, dessen katalytischer Zyklus bereits intensiv analysiert wurde (73, 228) und wird, möglicherweise zur Aufklärung beitragen. Warum manche Systeme zwischen diesen beiden Modi unterscheiden und wie dies mit der Substratvielfalt verknüpft ist, könnte somit möglicherweise auch geklärt werden. Andererseits könnten gerade die distinkten Aminosäuren in den TMDs, die an der Ausbildung des Translokationsweges beteiligt sind, durch eine detaillierte Analyse der proteinspezifischen Interaktionen mit strukturell und chemisch unterschiedlichen Modulatoren zusätzliche Informationen bezüglich der proteinspezifischen Kopplungsmechanismen liefern (136). Dies schließt auch den Einsatz unterschiedlicher Nukleotide in Kombination mit verschiedenen Substraten und Modulatoren ein.

Literaturverzeichnis

1. Wallin E & von Heijne G (1998) *Protein Sci* **7**, 1029-1038.
2. Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, Schuille P, Schulz JB, Schroeder C, Simons M, *et al.* (2008) *Science* **320**, 520-523.
3. Overington JP, Al-Lazikani B, & Hopkins AL (2006) *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996.
4. Wagner S, Bader ML, Drew D, & de Gier JW (2006) *Trends Biotechnol* **24**, 364-371.
5. Nagle JF & Scott HL, Jr. (1978) *Biochim Biophys Acta* **513**, 236-243.
6. Singer SJ & Nicolson GL (1972) *Science* **175**, 720-731.
7. B. Alberts AJ, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2002) *Molecular Biology Of The Cell* (Garland Publishing, Inc).
8. Unwin N (2005) *J Mol Biol* **346**, 967-989.
9. Marban E, Yamagishi T, & Tomaselli GF (1998) *J Physiol* **508 (Pt 3)**, 647-657.
10. MacKinnon R (2003) *FEBS Lett* **555**, 62-65.
11. Philipson KD & Nicoll DA (2000) *Annu Rev Physiol* **62**, 111-133.
12. Pao SS, Paulsen IT, & Saier MH, Jr. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-34.
13. Lanyi JK (2004) *Annu Rev Physiol* **66**, 665-688.
14. Sachs JR (1977) *J Physiol* **273**, 489-514.
15. Boyer PD (1997) *Annu Rev Biochem* **66**, 717-749.
16. Zhou X & Graham TR (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16586-16591.
17. Pomorski T & Menon AK (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**, 2908-2921.
18. Linton KJ & Higgins CF (1998) *Mol Microbiol* **28**, 5-13.
19. Dassa E & Bouige P (2001) *Res Microbiol* **152**, 211-229.
20. Higgins CF (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
21. Holland IB & Blight MA (1999) *J Mol Biol* **293**, 381-399.
22. Blight MA & Holland IB (1990) *Mol Microbiol* **4**, 873-880.
23. Locher KP, Lee AT, & Rees DC (2002) *Science* **296**, 1091-1098.
24. Ames GF, Nikaido K, Wang IX, Liu PQ, Liu CE, & Hu C (2001) *J Bioenerg Biomembr* **33**, 79-92.
25. Albers SV, Elferink MG, Charlebois RL, Sensen CW, Driessen AJ, & Konings WN (1999) *J Bacteriol* **181**, 4285-4291.
26. Schmitt L & Tampe R (2000) *Chembiochem* **1**, 16-35.
27. Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, Morita K, Kioka N, & Amachi T (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**, 305-313.
28. Kusters A & Karpen SJ (2008) *Xenobiotica* **38**, 1043-1071.
29. Dean M & Annilo T (2005) *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 123-142.
30. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, & Deeley RG (1992) *Science* **258**, 1650-1654.
31. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, & Bates SE (2000) *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**, 2011-2021.
32. Ozben T (2006) *FEBS Lett* **580**, 2903-2909.
33. Crowley E, McDevitt CA, & Callaghan R *Methods Mol Biol* **596**, 405-432.
34. Linton KJ (2007) *Physiology (Bethesda)* **22**, 122-130.
35. Pfaller MA & Diekema DJ (2007) *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.
36. Taubes G (2008) *Science* **321**, 356-361.
37. Davidson AL & Nikaido H (1990) *J Biol Chem* **265**, 4254-4260.
38. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, *et al.* (1986) *Nature* **323**, 448-450.
39. Kusuvara H & Sugiyama Y (2007) *Pflugers Arch* **453**, 735-744.
40. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, & Poolman B (2006) *FEBS Lett* **580**, 1023-1035.
41. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, & Gay NJ (1982) *Embo J* **1**, 945-951.
42. Schmitt L & Tampé R (2002) *Cur. Opin. Struc. Biol.* **12**, 754-760.
43. Gaudet R & Wiley DC (2001) *Embo J* **20**, 4964-4972.

44. Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB, & Stubbs MT (2003) *J Mol Biol* **330**, 333-342.
45. Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ, & Thunnissen AM (2003) *J Mol Biol* **330**, 343-358.
46. Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, & Hunt JF (2001) *J Biol Chem* **276**, 32313-32321.
47. Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonrhein C, Boos W, & Welte W (2000) *Embo J* **19**, 5951-5961.
48. Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, & Quioco FA (2003) *Mol Cell* **12**, 651-661.
49. Lu G, Westbrooks JM, Davidson AL, & Chen J (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17969-17974.
50. Ose T, Fujie T, Yao M, Watanabe N, & Tanaka I (2004) *Proteins* **57**, 635-638.
51. Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, *et al.* (2004) *EMBO J* **23**, 282-293.
52. Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, *et al.* (2005) *J Biol Chem* **280**, 1346-1353.
53. Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, & Hunt JF (2002) *Mol Cell* **10**, 139-149.
54. Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, & Schmitt L (2005) *EMBO J* **24**, 1901-1910.
55. Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, & Hunt JF (2001) *Structure* **9**, 571-586.
56. Zaitseva J, Jenewein S, Wiedenmann A, Benabdelhak H, Holland IB, & Schmitt L (2005) *Biochemistry* **44**, 9680-9690.
57. Orelle C, Dalmas O, Gros P, Di Pietro A, & Jault JM (2003) *J Biol Chem* **278**, 47002-47008.
58. Ernst R, Koch J, Horn C, Tampe R, & Schmitt L (2006) *J Biol Chem* **281**, 27471-27480.
59. Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C, & Tampe R (2003) *J Biol Chem* **278**, 26862-26869.
60. Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, & Thomas PJ (2002) *J Biol Chem* **277**, 21111-21114.
61. Pinkett HW, Lee AT, Lum P, Locher KP, & Rees DC (2007) *Science* **315**, 373-377.
62. Hollenstein K, Frei DC, & Locher KP (2007) *Nature* **446**, 213-216.
63. Dawson RJ & Locher KP (2006) *Nature* **443**, 180-185.
64. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, *et al.* (2009) *Science* **323**, 1718-1722.
65. Dawson RJ & Locher KP (2007) *FEBS Lett* **581**, 935-938.
66. Oldham ML, Khare D, Quioco FA, Davidson AL, & Chen J (2007) *Nature* **450**, 515-521.
67. Jardetzky O (1966) *Nature* **211**, 969-970.
68. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, & Schmitt L *FEBS J* **277**, 540-549.
69. Higgins CF & Linton KJ (2004) *Nat Struct Mol Biol* **11**, 918-926.
70. Senior AE & Gadsby DC (1997) *Semin Cancer Biol* **8**, 143-150.
71. Nikaido K & Ames GF (1999) *J Biol Chem* **274**, 26727-26735.
72. Jones PM & George AM (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12639-12644.
73. Al-Shawi MK & Omote H (2005) *J Bioenerg Biomembr* **37**, 489-496.
74. Oldham ML, Davidson AL, & Chen J (2008) *Curr Opin Struct Biol* **18**, 726-733.
75. Senior AE, al-Shawi MK, & Urbatsch IL (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27**, 31-36.
76. Davidson AL, Laghaeian SS, & Mannering DE (1996) *J Biol Chem* **271**, 4858-4863.
77. Zaitseva J, Oswald C, Jumpertz T, Jenewein S, Wiedenmann A, Holland IB, & Schmitt L (2006) *Embo J* **25**, 3432-3443.
78. Gadsby DC, Vergani P, & Csanady L (2006) *Nature* **440**, 477-483.
79. Csanady L *J Gen Physiol* **135**, 395-398.
80. Chen M, Abele R, & Tampe R (2004) *J Biol Chem* **279**, 46073-46081.

81. Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, Niimi M, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, & Monk BC (2005) *J Biol Chem* **280**, 94-103.
82. Patzlaff JS, van der Heide T, & Poolman B (2003) *J Biol Chem* **278**, 29546-29551.
83. Mimmack ML, Gallagher MP, Pearce SR, Hyde SC, Booth IR, & Higgins CF (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8257-8261.
84. Sauna ZE & Ambudkar SV (2001) *J Biol Chem* **276**, 11653-11661.
85. Seddon AM, Curnow P, & Booth PJ (2004) *Biochim Biophys Acta* **1666**, 105-117.
86. Davidson AL & Chen J (2004) *Annu Rev Biochem* **73**, 241-268.
87. Jumpertz THB, Schmitt L. (2009) *ABC Transporters in Microorganisms: Research, Innovation and Value As Targets Against Drug Resistance* (Caister Academic Press Norfolk, UK).
88. Mourez M, Hofnung M, & Dassa E (1997) *EMBO J* **16**, 3066-3077.
89. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, & Chang G (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19005-19010.
90. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, & Gottesman MM (1999) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 361-398.
91. Juliano RL & Ling V (1976) *Biochim Biophys Acta* **455**, 152-162.
92. Loo TW, Bartlett MC, & Clarke DM (2004) *J Biol Chem* **279**, 7692-7697.
93. Loo TW & Clarke DM (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**, 315-325.
94. Loo TW & Clarke DM (2000) *J Biol Chem* **275**, 5253-5256.
95. Ueda K, Taguchi Y, & Morishima M (1997) *Semin Cancer Biol* **8**, 151-159.
96. Crowley E, O'Mara ML, Reynolds C, Tieleman DP, Storm J, Kerr ID, & Callaghan R (2009) *Biochemistry* **48**, 6249-6258.
97. Higgins CF (2007) *Nature* **446**, 749-757.
98. Shapiro AB & Ling V (1997) *Eur J Biochem* **250**, 130-137.
99. Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, & Callaghan R (2000) *Mol Pharmacol* **58**, 624-632.
100. Demeule M, Wenger RM, & Beliveau R (1997) *J Biol Chem* **272**, 6647-6652.
101. Egnér R, Rosenthal FE, Kralli A, Sanglard D, & Kuchler K (1998) *Mol Biol Cell* **9**, 523-543.
102. Chearwae W, Shukla S, Limtrakul P, & Ambudkar SV (2006) *Mol Cancer Ther* **5**, 1995-2006.
103. Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandigama K, Ambudkar SV, & Limtrakul P (2004) *Biochem Pharmacol* **68**, 2043-2052.
104. Jacquot C, Julien R, & Guilloton M (1997) *Yeast* **13**, 891-902.
105. Teixeira MC & Sa-Correia I (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 530-537.
106. Balzi E & Goffeau A (1991) *Biochim Biophys Acta* **1073**, 241-252.
107. Balzi E & Goffeau A (1994) *Biochim Biophys Acta* **1187**, 152-162.
108. Balzi E & Goffeau A (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27**, 71-76.
109. Bauer BE, Schüller C, & Kuchler K (2003) in *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, ed. I Barry Holland SPC, Karl Kuchler and Christopher F Higgins (Academic Press - Elsevier Science, Amsterdam), pp. 295-316.
110. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, & Butler G (2006) *BMC Evol Biol* **6**, 99.
111. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, & Monk BC (2009) *Clin Microbiol Rev* **22**, 291-321, Table of Contents.
112. Delaveau T, Delahodde A, Carvajal E, Subik J, & Jacq C (1994) *Mol Gen Genet* **244**, 501-511.
113. Bauer BE, Wolfger H, & Kuchler K (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**, 217-236.
114. Katzmann DJ, Burnett PE, Golin J, Mahe Y, & Moyer-Rowley WS (1994) *Mol Cell Biol* **14**, 4653-4661.
115. Katzmann DJ, Hallstrom TC, Mahe Y, & Moyer-Rowley WS (1996) *J Biol Chem* **271**, 23049-23054.
116. Nawrocki A, Fey SJ, Goffeau A, Roepstorff P, & Larsen PM (2001) *Proteomics* **1**, 1022-1032.
117. DeRisi J, van den Hazel B, Marc P, Balzi E, Brown P, Jacq C, & Goffeau A (2000) *FEBS Lett* **470**, 156-160.

118. Manente M & Ghislain M (2009) *FEMS Yeast Res* **9**, 673-687.
119. Meyers S, Schauer W, Balzi E, Wagner M, Goffeau A, & Golin J (1992) *Curr Genet* **21**, 431-436.
120. Wolfger H, Mahe Y, Parle-McDermott A, Delahodde A, & Kuchler K (1997) *FEBS Lett* **418**, 269-274.
121. Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, & Moye-Rowley WS (1995) *Mol Cell Biol* **15**, 6875-6883.
122. Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, & Miyakawa T (1996) *J Biol Chem* **271**, 14712-14716.
123. Hazelwood LA, Tai SL, Boer VM, de Winde JH, Pronk JT, & Daran JM (2006) *FEMS Yeast Res* **6**, 937-945.
124. Piper P, Mahe Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Muhlbauer M, Coote P, & Kuchler K (1998) *EMBO J* **17**, 4257-4265.
125. Simonics T, Kozovska Z, Michalkova-Papajova D, Delahodde A, Jacq C, & Subik J (2000) *Curr Genet* **38**, 248-255.
126. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, & Weissman JS (2003) *Nature* **425**, 737-741.
127. Carvajal E, van den Hazel HB, Cybularz-Kolaczowska A, Balzi E, & Goffeau A (1997) *Mol Gen Genet* **256**, 406-415.
128. Conseil G, Perez-Victoria JM, Renoir JM, Goffeau A, & Di Pietro A (2003) *Biochim Biophys Acta* **1614**, 131-134.
129. Kralli A & Yamamoto KR (1996) *J Biol Chem* **271**, 17152-17156.
130. Bissinger PH & Kuchler K (1994) *J Biol Chem* **269**, 4180-4186.
131. Balzi E, Wang M, Leterme S, Van Dyck L, & Goffeau A (1994) *J Biol Chem* **269**, 2206-2214.
132. Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, & Goffeau A (1998) *J Biol Chem* **273**, 12612-12622.
133. Kolaczkowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, Soumillion JP, Konings WN, & Goffeau A (1996) *J Biol Chem* **271**, 31543-31548.
134. Hanson L, May L, Tuma P, Keeven J, Mehl P, Ferez M, Ambudkar SV, & Golin J (2005) *Biochemistry* **44**, 9703-9713.
135. Decottignies A, Kolaczkowski M, Balzi E, & Goffeau A (1994) *J Biol Chem* **269**, 12797-12803.
136. Tutulan-Cunita AC, Mikoshi M, Mizunuma M, Hirata D, & Miyakawa T (2005) *Genes Cells* **10**, 409-420.
137. Plemper RK, Egner R, Kuchler K, & Wolf DH (1998) *J Biol Chem* **273**, 32848-32856.
138. Taylor AM, Storm J, Soceneantu L, Linton KJ, Gabriel M, Martin C, Woodhouse J, Blott E, Higgins CF, & Callaghan R (2001) *Br J Pharmacol* **134**, 1609-1618.
139. Egner R, Bauer BE, & Kuchler K (2000) *Mol Microbiol* **35**, 1255-1263.
140. Golin J, Ambudkar SV, Gottesman MM, Habib AD, Sczepanski J, Ziccardi W, & May L (2003) *J Biol Chem* **278**, 5963-5969.
141. Golin J, Ambudkar SV, & May L (2007) *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 1-5.
142. Hiraga K, Yamamoto S, Fukuda H, Hamanaka N, & Oda K (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 1119-1125.
143. Hendrych T, Kodedova M, Sigler K, & Gaskova D (2009) *Biochim Biophys Acta* **1788**, 717-723.
144. Kolaczkowski M, Kolaczowska A, Motohashi N, & Michalak K (2009) *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1516-1527.
145. Sauna ZE, Bohn SS, Rutledge R, Dougherty MP, Cronin S, May L, Xia D, Ambudkar SV, & Golin J (2008) *J Biol Chem* **283**, 35010-35022.
146. Decottignies A, Lambert L, Catty P, Degand H, Epping EA, Moye-Rowley WS, Balzi E, & Goffeau A (1995) *J Biol Chem* **270**, 18150-18157.
147. Serrano R (1988) *Methods Enzymol* **157**, 533-544.
148. Fischl AS & Carman GM (1983) *J Bacteriol* **154**, 304-311.
149. Ernst R, Klemm R, Schmitt L, & Kuchler K (2005) *Methods Enzymol* **400**, 460-484.

150. Ernst R (2007) in *Institut für Biochemie* (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf).
151. Gompf S, Zutz A, Hofacker M, Haase W, van der Does C, & Tampe R (2007) *FEBS J* **274**, 5298-5310.
152. Kihara A & Igarashi Y (2004) *Mol Biol Cell* **15**, 4949-4959.
153. Kihara A & Igarashi Y (2002) *J Biol Chem* **277**, 30048-30054.
154. Panwar SL & Moyer-Rowley WS (2006) *J Biol Chem* **281**, 6376-6384.
155. Katzmann DJ, Epping EA, & Moyer-Rowley WS (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 2998-3009.
156. Hofacker M, Gompf S, Zutz A, Presenti C, Haase W, van der Does C, Model K, & Tampe R (2007) *J Biol Chem* **282**, 3951-3961.
157. Galluhn D & Langer T (2004) *J Biol Chem* **279**, 38338-38345.
158. Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, & Langer T (2001) *Science* **291**, 2135-2138.
159. Chloupkova M, LeBard LS, & Koeller DM (2003) *J Mol Biol* **331**, 155-165.
160. Carman GM & Fischl AS (1992) *Methods Enzymol* **209**, 305-312.
161. Chen CY, Ingram MF, Rosal PH, & Graham TR (1999) *J Cell Biol* **147**, 1223-1236.
162. Natarajan P, Wang J, Hua Z, & Graham TR (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10614-10619.
163. Saito K, Fujimura-Kamada K, Furuta N, Kato U, Umeda M, & Tanaka K (2004) *Mol Biol Cell* **15**, 3418-3432.
164. Kishimoto T, Yamamoto T, & Tanaka K (2005) *Mol Biol Cell* **16**, 5592-5609.
165. Procko E, Ferrin-O'Connell I, Ng SL, & Gaudet R (2006) *Mol Cell* **24**, 51-62.
166. Szabo K, Welker E, Bakos, Muller M, Roninson I, Varadi A, & Sarkadi B (1998) *J Biol Chem* **273**, 10132-10138.
167. Ernst R, Kueppers P, Klein CM, Schwarzmüller T, Kuchler K, & Schmitt L (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5069-5074.
168. Wieker HJ, Kuschmitz D, & Hess B (1987) *Biochim Biophys Acta* **892**, 108-117.
169. Maesaki S, Marichal P, Vanden Bossche H, Sanglard D, & Kohno S (1999) *J Antimicrob Chemother* **44**, 27-31.
170. Wada S, Niimi M, Niimi K, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, & Uehara Y (2002) *J Biol Chem* **277**, 46809-46821.
171. Oswald C, Jenewein S, Smits SH, Holland IB, & Schmitt L (2008) *J Struct Biol* **162**, 85-93.
172. Rao US & Scarborough GA (1994) *Mol Pharmacol* **45**, 773-776.
173. Urbatsch IL, al-Shawi MK, & Senior AE (1994) *Biochemistry* **33**, 7069-7076.
174. al-Shawi MK, Urbatsch IL, & Senior AE (1994) *J Biol Chem* **269**, 8986-8992.
175. Storm J, O'Mara ML, Crowley EH, Peall J, Tieleman DP, Kerr ID, & Callaghan R (2007) *Biochemistry* **46**, 9899-9910.
176. Callaghan R *FEBS J* **277**, 529.
177. Wells L & Fridovich-Keil JL (1996) *SAAS Bull Biochem Biotechnol* **9**, 83-88.
178. Levy J (1994) *Yeast* **10**, 1689-1706.
179. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, *et al.* (1996) *Science* **274**, 546, 563-547.
180. Bassett DE, Jr., Basrai MA, Connelly C, Hyland KM, Kitagawa K, Mayer ML, Morrow DM, Page AM, Resto VA, Skibbens RV, *et al.* (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**, 763-766.
181. Wolfger H, Mamnun YM, & Kuchler K (2001) *Res Microbiol* **152**, 375-389.
182. Gompf S (2007) in *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie* (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main).
183. Mohanty AK & Wiener MC (2004) *Protein Expr Purif* **33**, 311-325.
184. Chen S, Wang J, Muthusamy BP, Liu K, Zare S, Andersen RJ, & Graham TR (2006) *Traffic* **7**, 1503-1517.
185. Muthusamy BP, Natarajan P, Zhou X, & Graham TR (2009) *Biochim Biophys Acta* **1791**, 612-619.
186. Lenoir G, Williamson P, Puts CF, & Holthuis JC (2009) *J Biol Chem* **284**, 17956-17967.

187. Paulusma CC, Folmer DE, Ho-Mok KS, de Waart DR, Hilarius PM, Verhoeven AJ, & Oude Elferink RP (2008) *Hepatology* **47**, 268-278.
188. Furuta N, Fujimura-Kamada K, Saito K, Yamamoto T, & Tanaka K (2007) *Mol Biol Cell* **18**, 295-312.
189. Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, Rebischung C, & Philippsen P (1997) *Yeast* **13**, 1065-1075.
190. Wach A, Brachat A, Pohlmann R, & Philippsen P (1994) *Yeast* **10**, 1793-1808.
191. Garavito RM & Ferguson-Miller S (2001) *J Biol Chem* **276**, 32403-32406.
192. Lund S, Orłowski S, de Foresta B, Champeil P, le Maire M, & Møller JV (1989) *J Biol Chem* **264**, 4907-4915.
193. Slotboom DJ, Duurkens RH, Olieman K, & Erkens GB (2008) *Methods* **46**, 73-82.
194. Chen J, Sharma S, Quijoco FA, & Davidson AL (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1525-1530.
195. Zaitseva J, Jenewein S, Wiedenmann A, Benabdelhak H, Holland IB, & Schmitt L (2005) *Biochemistry* **44**, 9680-9690.
196. Dall'Acqua W & Carter P (2000) *Protein Sci* **9**, 1-9.
197. Fersht A (1997).
198. Carrier I & Gros P (2008) *FEBS J* **275**, 3312-3324.
199. Tomblin G, Bartholomew LA, Tyndall GA, Gimi K, Urbatsch IL, & Senior AE (2004) *J Biol Chem* **279**, 46518-46526.
200. Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, & Yang W (2001) *Mol Cell* **7**, 1-12.
201. Story RM & Steitz TA (1992) *Nature* **355**, 374-376.
202. Hanekop N, Zaitseva J, Jenewein S, Holland IB, & Schmitt L (2006) *FEBS Lett* **580**, 1036-1041.
203. Baitinger C, Burdett V, & Modrich P (2003) *J Biol Chem* **278**, 49505-49511.
204. Karttunen JT, Lehner PJ, Gupta SS, Hewitt EW, & Cresswell P (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7431-7436.
205. Perria CL, Rajamanickam V, Lapinski PE, & Raghavan M (2006) *J Biol Chem* **281**, 39839-39851.
206. Shukla S, Rai V, Banerjee D, & Prasad R (2006) *Biochemistry* **45**, 2425-2435.
207. Jha S, Karnani N, Dhar SK, Mukhopadhyay K, Shukla S, Saini P, Mukhopadhyay G, & Prasad R (2003) *Biochemistry* **42**, 10822-10832.
208. Jha S, Dabas N, Karnani N, Saini P, & Prasad R (2004) *FEMS Yeast Res* **5**, 63-72.
209. Rai V, Gaur M, Shukla S, Ambudkar SV, Komath SS, & Prasad R (2006) *Biochemistry* **45**, 14726-14739.
210. Siarheyeva A, Liu R, & Sharom FJ *J Biol Chem* **285**, 7575-7586.
211. Kumar A, Shukla S, Mandal A, Ambudkar SV, & Prasad R *Biochim Biophys Acta*.
212. Kolaczowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, & Goffeau A (1998) *Microb Drug Resist* **4**, 143-158.
213. Wilcox LJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, & Sturley SL (2002) *J Biol Chem* **277**, 32466-32472.
214. Kolaczowska A, Kolaczowski M, Goffeau A, & Moye-Rowley WS (2008) *FEBS Lett* **582**, 977-983.
215. Beaudet L, Urbatsch IL, & Gros P (1998) *Biochemistry* **37**, 9073-9082.
216. Balakrishnan L, Venter H, Shilling RA, & van Veen HW (2004) *J Biol Chem* **279**, 11273-11280.
217. Reuter G, Janvilisri T, Venter H, Shahi S, Balakrishnan L, & van Veen HW (2003) *J Biol Chem* **278**, 35193-35198.
218. Shukla S, Ambudkar SV, & Prasad R (2004) *J Antimicrob Chemother* **54**, 38-45.
219. Saini P, Prasad T, Gaur NA, Shukla S, Jha S, Komath SS, Khan LA, Haq QM, & Prasad R (2005) *J Antimicrob Chemother* **56**, 77-86.
220. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, & Schreiber SL (1991) *Cell* **66**, 807-815.
221. Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship JR, Del Poeta M, Davis D, Cardenas ME, Perfect JR, McCusker JH, & Heitman J (2002) *EMBO J* **21**, 546-559.

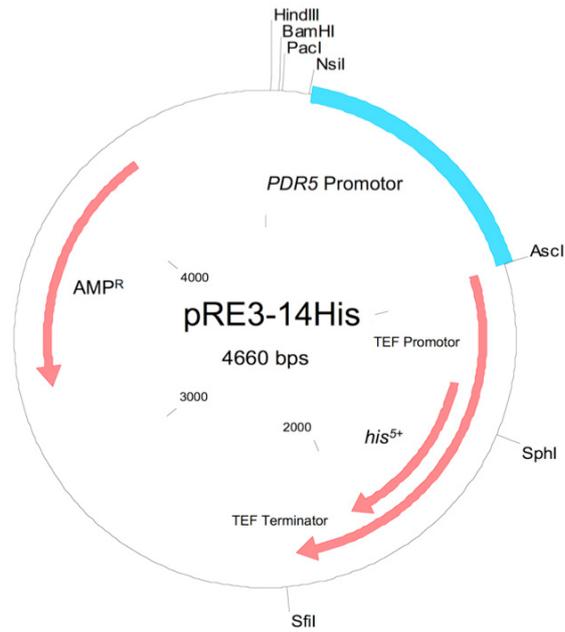
222. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, & Komano T (1993) *J Biol Chem* **268**, 6077-6080.
223. Pall ML & Kelly KA (1971) *Biochem Biophys Res Commun* **42**, 940-947.
224. Ananthaswamy N, Rutledge R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Dine E, Nelson E, Xia D, & Golin J *Biochemistry* **49**, 4440-4449.
225. Wang J, Sun F, Zhang DW, Ma Y, Xu F, Belani JD, Cohen JC, Hobbs HH, & Xie XS (2006) *J Biol Chem* **281**, 27894-27904.
226. Golin J, Kon ZN, Wu CP, Martello J, Hanson L, Supernavage S, Ambudkar SV, & Sauna ZE (2007) *Biochemistry* **46**, 13109-13119.
227. Conseil G, Decottignies A, Jault JM, Comte G, Barron D, Goffeau A, & Di Pietro A (2000) *Biochemistry* **39**, 6910-6917.
228. Al-Shawi MK, Polar MK, Omote H, & Figler RA (2003) *J Biol Chem* **278**, 52629-52640.
229. Omote H & Al-Shawi MK (2002) *J Biol Chem* **277**, 45688-45694.

Abkürzungsverzeichnis

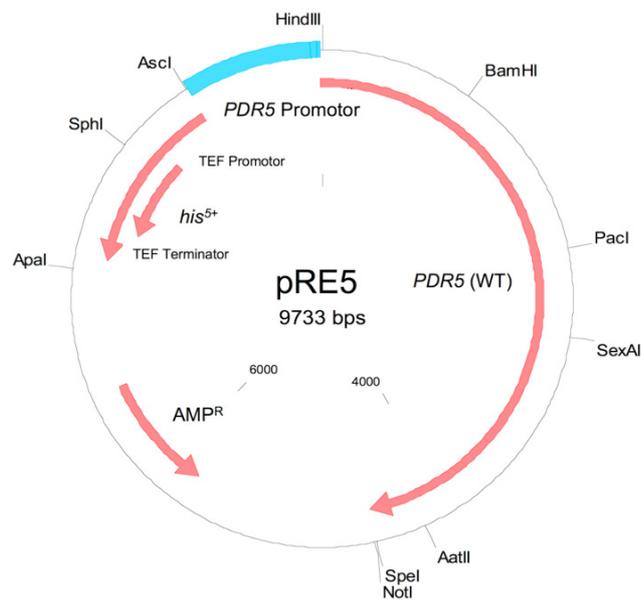
ABC	ATP-Binding Cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APLT	Aminophospholipid Translokase
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BSA	Bovine Serum Albumin - Rinderserumalbumin
BSEP	Bile Salt Export Pump
<i>C. albicans/ glabrata</i>	<i>Candida albicans/ glabrata</i>
CPM	Counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat
CYC	Cycloheximid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DDM	Dodecyl- β -maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Extrazellulärer <i>loop</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GTP	Guanosintriphosphat
FLC	Fluconazol
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
ICL	Intrazellulärer <i>Loop</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen Chromatographie
KTC	Ketoconazol
<i>L. Lactis</i>	<i>Lactococcus Lactis</i>
LTE	Lipid Translocating Exporter
MDR	Multidrogenresistenz
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MFS	Multi Facilitator Superfamilie
MWCO	Molecular weight cut off
Min	Minute
NBD	Nukleotidbindedomäne
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Poly Chain Reaction
PDR	Pleiotrope Drogenresistenz
PDRE	Pleiotrope Drogenresistenz Elemente
PFIC	Progressive Familiar Intrahepatic Cholestasis
<i>P. Pastoris</i>	<i>Pichia Pastoris</i>
R6G	Rhodamin 6G
RT	Raumtemperatur
S	Sense

SBP	Substratbindeprotein
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N', N', Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tryptophan
ÜN	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Plasmidkarten



pRE3-14HIS - Klonierungskassette



pRE5-Plasmid zur Mutagenese von PDR5

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und diese intensive Zeit mit mir geteilt und geprägt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schmitt, der mich mit Rat und Tat unterstützt hat und durch seine Begeisterung und unkonventionelle Art stets motiviert und bestärkt hat, mich den Herausforderungen zu stellen. Danke!

Danken möchte ich auch unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Karl Kuchler für die erfolgreiche Zusammenarbeit und wissenschaftliche Expertise, sowie meinem Koreferenten PD Dr. Ulrich Schulte für die freundliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Sander Smits für seine großartige Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen bei der Suche nach wissenschaftlichen und pragmatischen Lösungen bei der oft kniffligen Dateninterpretation bedanken. Vielen Dank für Dein offenes Ohr in allen Situationen und Deine aufmunternden Worte!

Ein großes Dankeschön gilt meinen Weggefährten Jan, Thorsten, Nacera, Britta und Nils für ihre tatkräftige wissenschaftliche und moralische Unterstützung, für's Zuhören und Zureden in Höhen und Tiefen, und vor allem auch den Spaß über die Laborarbeit hinaus!

Ebenso möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Vielen lieben Dank Martina, Silke, Veronica, Tatu, Nino, Patrick, Miro, Rakesh, Philipp, Christian und André für die angenehme Zeit, durch Euch ist das Institut ein zweites zu Hause geworden.

Des Weiteren danke ich besonders Rakesh und den Diplom-/Master-Studenten Norman Nebendorf, Susanne Pryzbylla, Katerina Krikoni, sowie Marianne Kluth für ihre tatkräftige Unterstützung. Mein Dank gilt dabei auch Robert Ernst für seine hilfreichen Ratschläge und sein Interesse für das Projekt auch nach seiner Doktorandenzeit.

Mein ganz besonderer Dank gebührt den wichtigsten Menschen in meinem Leben meiner Familie und besonders meinem Freund Thomas, für das Verständnis und den bedingungslosen Rückhalt. Vielen, vielen Dank für Eure Geduld!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren 26.03.1981 in Heinsberg, Deutschland
Familienstand ledig
Nationalität deutsch

Hochschulausbildung

Seit 2007 Mitglied des Integrierten Graduiertenkollegs im SFB 575
Experimentelle Hepatologie – (A9)
– *In vitro* Charakterisierung von ABC-Transportern in der
humanen Leber

2005 Beginn der Promotion
Institut für Biochemie - Arbeitsgruppe Membrantransport
Heinrich Heine Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. Lutz Schmitt
Thema: "Molekulare Analyse des pleiotropen ABC-Transporters
Pdr5 aus *S. cerevisiae*"

2005 Abschluss zum Diplom-Chemiker
Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Diplomarbeit
Institut für Biochemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Thema "Identifizierung ungerichtet erzeugter NADH Ubichinon
Oxidoreduktase Mutanten von *Neurospora crassa*"
unter der Anleitung von PD Dr. Ulrich Schulte

2005-2000 Studium der Chemie
Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Schulbildung

2000-1991 Kreisgymnasium Heinsberg (Allgemeine Hochschulreife)
1991-1987 Katholische Grundschule Heinsberg VII Straeten

Auszeichnungen und Veröffentlichungen

- 2009 „Short-Talk“, Gordon Research Conference „Multidrug Efflux Systems“
Galveston, Texas, US 03/2009
Titel: Crosstalk between TMD and NBD in the multidrug ABC-transporter Pdr5“
- 2008 FEMS Young Scientist Meeting Grant (YSMG)
2nd FEBS Special Meeting Co-sponsored by FEMS
„ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases“. Innsbruck, Austria 03/2008
Poster: Kueppers P., Ernst R., Klein C., Schwarzmüller T., Kuchler K., Schmitt L. A mutation of the H-loop selectively affects Rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5
- 2000 Preis für überdurchschnittliche Leistungen im Abitur durch den Fonds der chemischen Industrie

Publikationen

Kueppers P., Gupta R., Krikoni K., Kluth M., Smits S.H.J., Kuchler K., Schmitt L.
Generating a symmetry in an asymmetric ABC transporter (*in preparation*)

Kueppers P., Ernst R., Stindt J., Smits S.H.J., Kuchler K., Schmitt L.
A TMD mutation changes ATPase activity and drug susceptibility in the yeast ABC transporter Pdr5 (*in preparation*)

Ernst, R., **Kueppers P.**, Stindt J., Kuchler K., Schmitt L. (2009)
Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ABC multidrug efflux pumps - first come, first served? *FEBS J.* **277** (3) 540-549

Ernst R., **Kueppers P.**, Klein C., Schwarzmüller T., Kuchler K. and Schmitt L. (2008)
A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *PNAS* **105** 5069-5074

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 16.08.2010
