



**Modulation der Aktivität ausgewählter
Multidrogen-Resistenz-ABC-Transporter**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Nacera Infed
aus Düsseldorf

Düsseldorf

2012

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

Korreferent: PD. Dr. Ulrich Schulte

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2013

I. Abstract

Multidrug resistant (MDR) cancer cells and an increasing number of multidrug resistant pathogenic microorganisms are serious public health issues. Transporters that accomplish the extrusion of the therapeutic agents/toxic substances are often responsible for the MDR phenotype. The so called MDR transporters are characterized by a broad substrate spectrum that contains a range of structurally and functionally unrelated toxic agents. Many MDR transporters, especially human MDR proteins, are ATP-binding cassette (ABC) transporters. ABC transporters are membrane proteins that use the energy released by ATP hydrolysis for active transport of substances across a biological membrane. Characterization of these ABC-type MDR proteins as well as the development of new specific inhibitors are important approaches to reverse the undesirable MDR phenotype and therefore subjects of this thesis.

In the first part of this thesis the ABC transporter LmrA from *Lactococcus lactis* was studied. This transporter has been intensively studied in the past and a role in multidrug resistance was proposed. The kinetics of ATP hydrolysis and the effect of a substrate (Rhodamine 123) were studied for isolated LmrA in detergent solution and in proteoliposomes. In detergent solution, LmrA purified with Fos-Choline-16 was highly active with respect to ATPase activity, which could be stimulated by a substrate of LmrA. Both, high basal ATPase activity and substrate stimulation were not detected for LmrA solubilized in dodecyl- β -D-maltoside (DDM). After reconstitution of the protein into liposomes, the LmrA samples, which were purified with DDM, showed activity similar to that measured using membrane vesicles prepared from *Lactococcus lactis*, whereas the samples with Fos-Choline-16 showed a reduced activity. The active LmrA samples in all three environments, in FosCholine16-solution, in liposomes where DDM was used and in isolated membrane vesicles, displayed similar determined K_m -values about 0.7 mM for ATP. The maximal stimulation to a 1.6 –fold of the basal ATPase activity by Rhodamine 123 was also seen for all three active LmrA samples.

Moreover a morphological change induced by expression of an ATPase inactive mutant of LmrA (E512Q-LmrA) was observed. These *Lactococcus lactis* cells developed a longated size similar to rod-shape bacteria instead of the usual spherical shape.

In the second part zosuquidar derivatives have been tested towards their ability to modulate the activity of microbial ABC-type MDR transporters. Zosuquidar was developed as an inhibitor for human multidrug resistance efflux pumps, such as P-glycoprotein. Two transporters from *Lactococcus lactis*, LmrA and LmCD, and a transporter from *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5 were selected for this screening. The effects on the ATPase activity as well as on the transport activity were monitored. Most of the substances that showed an influence on the activity, effected the transport activity to a higher extend than the hydrolysis of ATP. It was possible to identify substances that had a greater impact on the transport activity than zosuquidar for all three proteins.

II Zusammenfassung

Der Begriff „multidrug-resistance“ (MDR) beschreibt das Phänomen bei dem Zellen nach Exposition mit einem Zellgift eine allgemeine Resistenz gegen strukturell unterschiedliche Substanzen erlangen. Dieses allgemeine Phänomen kann bei allen Zellen/Organismen beobachtet werden und unterbindet bei Krebszellen und pathogenen Mikroorganismen den Erfolg von Chemotherapien. Dafür verantwortlich sind unter anderem MDR-Proteine, die den Efflux dieser toxischen Substanzen ermöglichen. Zahlreiche, vor allem humane, MDR-Proteine gehören zur Superfamilie der „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter. ABC-Transporter sind Membranproteine, die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie zum aktiven Transport von Substanzen über eine biologische Membran verwenden. Um einem unerwünschten MDR-Phänotyp entgegenwirken zu können, sind die genaue Charakterisierung dieser Proteine und die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von großer Bedeutung, und daher Gegenstand dieser Arbeit.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der MDR-ABC-Transporter LmrA aus *Lactococcus lactis*, biochemisch charakterisiert. Dazu wurde LmrA jeweils mit Dodecyl- β -D-maltosid und FosCholin 16 isoliert und in Liposomen rekonstituiert. Anhand des isolierten Proteins, das in einer Detergenzlösung vorlag oder sich nach Rekonstitution in einer Lipid-Umgebung befand, konnte die Kinetik der ATP-Hydrolyse vergleichend untersucht werden. Es konnte festgestellt werden, dass obwohl in Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiertes LmrA eine sehr geringe basale ATPase-Aktivität aufwies, nach Rekonstitution in einer Lipidumgebung eine hohe Aktivität wiederhergestellt werden konnte. Während sich das gegenteilige Bild unter Verwendung von FosCholin 16 ergab. Desweiteren wurde der Einfluss eines bekannten Substrats (Rhodamin 123) auf die Aktivität, unter den verschiedenen Bedingungen vergleichend untersucht. Lediglich die LmrA-Proben mit hoher basaler ATPase-Aktivität zeigten eine Substratsimulation, die aber bei allen maximal das 1,6-fache der jeweiligen basalen Aktivität entsprach.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Expression einer ATPase inaktiven Mutante von LmrA (E512Q-LmrA) eine morphologische Veränderung der *Lactococcus lactis* Zellen bewirkte. Diese Zellen sind im Vergleich verlängert (1µm vs. 0,2 µm) und ähneln Stäbchen-förmigen Bakterien.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden 26 Zosuquidar-Derivate auf ihr Potential hin untersucht die Aktivität von mikrobiellen MDR-ABC-Transportern zu modulieren. Zosuquidar wurde als Inhibitor des P-Glykoproteins, einem humanen MDR-Protein, entwickelt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob und inwiefern Zosuquidar-Derivate einen Effekt auf die Aktivität von mikrobiellen MDR-Proteinen haben, wurden bei dem in dieser Arbeit vorliegenden Screening die Wirkung auf drei verschiedenen Proteinen untersucht, LmrA und LmrCD aus *Lactococcus lactis* und Pdr5 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Während LmrCD als Modellsystem für MDR-ABC-Transporter pathogener Gram-positiver Bakterien gilt, kommt diese Rolle Pdr5 für dessen Homologe in pathogenen Pilzen zu. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass P-Glykoprotein-Inhibitoren die Aktivität von LmrA ähnlich beeinflussen können wie das P-Glykoprotein. Für jedes dieser Proteine konnten Substanzen identifiziert werden, die einen stärkeren Einfluss auf die Aktivität hatten als die Ausgangssubstanz Zosuquidar.

III Inhaltsverzeichnis

I Abstract I

II Zusammenfassung III

III Inhaltsverzeichnis V

IV Abkürzungsverzeichnis VIII

1 Einleitung

1.1 Membranproteine 1

1.2 Das Multidrogen-Resistenz-Phänomen 3

1.3 Multidrogen-Resistenz bei Bakterien 3

1.4 Die ABC-Transporter 8

1.5 Ausgewählte MDR-ABC-Transporter 9

1.6 Substrate und Inhibitoren von MDR-Proteinen 13

1.7 Motivation und Zielsetzung 17

2 Material und Methoden

2.1 Materialien 18

2.2 Geräte 21

2.3 Mikroorganismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.3.1 Mikroorganismen 23

2.3.2 Plasmide 23

2.3.3 Oligodesoxynukleotide 23

2.4 Lösungen

2.4.1 Puffer und Färbelösungen 24

2.4.2 Medien 26

2.5 Allgemeine Methoden

2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	27
2.5.2 DNA-Analyse	29
2.5.3 RNA-Isolierung aus <i>L. lactis</i>	32
2.5.4 Protein-Analyse	32
2.5.5 Lipid-Analyse und Extraktion	35

2.6 Expression von Membranproteinen in *L. lactis* und Präparation von Membranvesikel 37

2.7 Expression von Pdr5 und Präparation von Plasmamembranvesikel aus *S. cerevisiae* 38

2.8 Isolierung von LmrA und Herstellung von Proteoliposomen 39

2.9 Bestimmung der Aktivität von ABC-Transportern

2.9.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität	41
2.9.2 Bestimmung der Transport-Aktivität von LmrA	42
2.9.3 Bestimmung der Transport-Aktivität von LmrCD	43
2.9.4 Bestimmung der Transport-Aktivität von Pdr5	43

2.10 Mikroskopie 45

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der ATPase-Aktivität von LmrA

3.1.1 Einfluss der Umgebung auf die ATPase-Aktivität	47
3.1.2 Einfluss bekannter Substrate auf die ATPase-Aktivität	56

3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von LmrA

3.2.1 Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Transport-Aktivität	60
3.2.2 Morphologische Veränderungen unter LmrA-Expression	67
3.2.3 Vergleichende Transkriptom-Analyse von LmrA-exprimierenden <i>L. lactis</i> -Zellen	70
3.2.4 Vergleich auf Protein-Ebene	74

3.3 Wirkung von Zosuquidar-Derivate auf die Aktivität ausgewählter MDR-Transporter	75
3.3.1 Einfluss auf die Aktivität von LmrA	76
3.3.2 Einfluss auf die Aktivität von LmrCD	78
3.3.3 Einfluss auf die Aktivität von Pdr5 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
3.3.4 Vergleich der Ergebnisse des Screenings	86
4 Diskussion	
4.1 Der ABC-Transporter LmrA	
4.1.1 Die ATPase-Aktivität von LmrA	89
4.1.2 Der LmrA-vermittelte Ethidium-Transport	93
4.1.3 Einfluss der LmrA-Expression	95
4.2 Zosuquidar-Derivate als Inhibitoren für mikrobielle MDR-ABC-Transporter	98
4.2.1 Modulation der LmrA-Aktivität	99
4.2.2 Modulation der LmrCD-Aktivität	100
4.2.3 Modulation der Pdr5-Aktivität	101
5 Ausblick	102
6 Literaturverzeichnis	103
7 Veröffentlichungen	111

IV Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binde Cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Cm	Chloramphenicol
DC	Dünnschichtchromatographie
DDM	Dodecyl- β -maltoopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FC16	Fos-Choline 16
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethansulfonsäure
Hoechst	Hoechst 33342
HIS	Histidin
IMAC	Immobilisierte Metallionen Chromatographie
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
MDR	Multidrogen-Resistenz
MFS	Multi-Facilitator-Superfamilie
Min	Minuten
NBD	Nukleotidbindedomäne
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBP	Penicillin-Binde-Protein
PCR	Poly Chain Reaction
PDR	Pleiotrope Drogenresistenz
R123	Rhodamin 123
R6G	Rhodamin 6G
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtyp
YPD	Yeast Peptone Dextrose

1 Einleitung

1.1 Membranproteine

Der Besitz von Membranen und somit die Abtrennung von der Außenwelt ist für alle Organismen unerlässlich. Grund dafür ist die Notwendigkeit von definierten Bedingungen für den Ablauf von komplexen physiologischen Reaktionen. Die Außenwelt hingegen unterliegt einer hohen Variabilität. Biologische Membranen schaffen eine Barriere zwischen der Umgebung und der Zelle, bei Eukaryoten zusätzlich zwischen verschiedenen Kompartimenten und dem Zytosol, und sorgen für einen geregelten Stoffaustausch. Nur wenige Verbindungen können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (klein, ungeladen und hydrophob) eine biologische Membran ungehindert passieren. Der Austausch anderer Moleküle ist nicht ohne Weiteres möglich und unterliegt einer Regulation. Membranen setzen sich aus einer Lipid-Doppelschicht und darin eingelagerte Proteine zusammen, wobei Letztere für die selektive Permeabilität der Membran verantwortlich sind und somit entscheidend für ihre Funktion sind [1]. Die Lipid-Zusammensetzung sowie das Protein-Lipid-Verhältnis sind ebenfalls für die Funktion der Membran von Bedeutung und variieren stark je nach Zellfunktion oder Organismus. Nachfolgend wird lediglich auf die verschiedenen Proteine eingegangen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen peripheren und integralen Membranproteinen. Während integrale Membranproteine größere hydrophobe Bereiche aufweisen mit denen sie die Membran durchdringen, sind die Peripheren lediglich mit einer Lipidschicht assoziiert. Daher unterscheiden sich periphere Proteine nicht so wesentlich von löslichen Proteinen und können auch ebenso bei ihrer Isolierung aus der Membran gehandhabt werden. Zum Teil ist es ausreichend sie durch eine erhöhte Salzkonzentration oder Veränderung des pH-Werts von der Membran zu lösen. Integrale Membranproteine hingegen können aufgrund ihrer größeren hydrophoben Bereiche nur durch den Einsatz von Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln aus der Membran isoliert werden, da die Membran „aufgelöst“ werden muss. Organische Lösungsmittel eignen sich jedoch aufgrund ihrer denaturierenden Wirkung auf Proteine lediglich in seltenen Fällen. Hinzukommt, dass biochemische Reaktionen im wässrigen Milieu gemessen werden, so dass spätestens dann häufig auf ein Detergenz zurückgegriffen wird. Es steht mittlerweile eine ganze Reihe von Detergenzien mit unterschiedlichen Eigenschaften dafür zur Verfügung. Zwar gibt es einige

Detergenzien (zum Beispiel n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)) [2-3], die sich bereits bei einer Vielzahl von Proteinen hinsichtlich der Effektivität der Solubilisierung und dem Erhalt der Funktionalität bewährt haben, jedoch gibt es keine ideale Detergenz für alle Proteine oder für eine bestimmte Proteinklasse. Vielmehr muss für jedes Protein eine Auswahl an Detergenzien getroffen und diese getestet werden [4-8]. Die direkten Auswirkungen des Detergenz auf die Aktivität eines Membranproteins wurden bislang noch nicht vollständig geklärt. Daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss von zwei ausgewählten Detergenzien auf die Aktivität eines Membranproteins detailliert untersucht.

Transportproteine stellen eine wichtige Klasse von Membranproteinen dar. Sie sind für den Ein- und Ausstrom einer Vielzahl von Molekülen durch eine biologische Membran verantwortlich. Sie binden ihre Substrate und transportieren diese infolge einer Konformationsänderung durch die Membran. Bezüglich der Energetisierung der Translokation lassen sich zwei Typen von Transportvorgängen unterscheiden, nämlich die erleichterte Diffusion und der aktive Transport. Bei der erleichterten Diffusion wird keine zusätzliche Energie benötigt, da der Transport entlang eines Konzentrationsgradienten verläuft. Im Unterschied dazu erfordert der aktive Transport Energie, da er entgegen eines Konzentrationsgradienten erfolgt. Bei dem primär-aktiven Transport stammt diese direkt aus der Hydrolyse von ATP. Hingegen spricht man von sekundär-aktivem Transport wenn Moleküle (meist Ionen) passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten befördert werden und die dabei freiwerdende potentielle Energie dazu genutzt wird um ein zweites Substrat gegen dessen Konzentrationsgradienten in gleicher Richtung (Symport) bzw. in entgegengesetzter Richtung (Antiport) zu befördern. Weiterhin lassen sich Transporter im Hinblick auf ihre Transportrichtung in Exporter und Importer unterteilen. Innerhalb der aktiven Transporter bilden die ABC- (ATP-binding cassette) Transporter eine der größten Proteinfamilien. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Vertreter einer bestimmten Klasse von ABC-Transportern untersucht. Diese Proteine sind in der Lage viele unterschiedliche Zellgifte aus der Zelle zu exportieren und werden als „multidrug resistance“ (MDR)-ABC-Transporter bezeichnet.

1.2 Das Multidrogen-Resistenz-Phänomen

Unter „multidrug resistance“ (MDR) versteht man die allgemeine Resistenz von Zellen gegenüber einer Reihe von funktionell und strukturell unterschiedlichen Substanzen oder Substanzklassen, obwohl die Zellen zuvor nur einer Substanz ausgesetzt waren. Der MDR-Phänotyp entsteht oft durch erhöhte Expression von Membranproteinen, die diese Zellgifte aus der Zelle transportieren. Im Bezug auf bakterielle Infektionen rücken MDR-Transporter zunehmend in den Fokus, da bereits viele Bakterienstämme eine Resistenz gegenüber den verwendeten Antibiotika erlangt haben [9-12]. Tumorzellen können ebenfalls einen MDR-Phänotyp entwickeln, wenn sie einem Zellgift ausgesetzt wurden, was zu einem geringen Erfolg der Therapie mit Zytostatika bei manchen Krebserkrankungen führt. Hauptverantwortlich für diese Art der Resistenz sind bei humanen Zellen ABC-Transporter wie das P-Glykoprotein/ABCB1 [13], das MDR-assoziierte Protein MRP1/ABCC1 [14] und das „breast cancer resistance protein“ BCRP/ABCG2 [15-16]. Die Funktionsweise von MDR-ABC-Transportern wurde zuerst in Säugetierzellen untersucht [17-20]. Das P-Glykoprotein gilt als Prototyp eines MDR-Efflux-Proteins, nicht nur für eukaryotische Vertreter sondern auch für bakterielle [21]. Immer mehr bakterielle MDR-Transporter wurden in den letzten Jahrzehnten identifiziert und intensiv untersucht. Die Entwicklung von neuen Antibiotika ist zum einen schwierig und zum anderen wird das Problem der resistenten Bakterienstämme nicht zwangsläufig umgangen. Daher sind die Erforschung der genauen Funktionsweise dieser Proteine und die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren ein möglicher Ansatz damit auch in Zukunft bakterielle Infektionen behandelbar bleiben.

1.3 Multidrogen-Resistenz bei Bakterien

Mikroorganismen können auf eine Vielzahl von Mechanismen zurückgreifen um sich vor Zellgiften zu schützen. Die verschiedenen Resistenz-Mechanismen können auch kombiniert auftreten. Die genetische Information für die zugrunde liegenden Proteine können sowohl auf Plasmide vorliegen als auch chromosomal codiert sein [22]. Ein R-Plasmid ist ein typisches Beispiel, es ist oft transferierbar und beinhaltet meist mehrere Resistenz-Gene. Auf Chromosomen sind solche Resistenz-Gene häufig zusammen zu sogenannten Resistenz-Inseln angeordnet [23-25]. Es kommt vor dass diese Gene mit mobilen genetischen

Elementen (Transposons, Integrans) assoziiert sind, so dass es zu Bewegungen entlang des Chromosoms oder zum Wechsel von Chromsomen auf Plasmide und umgekehrt kommen kann.

Zu den Resistenz-Mechanismen gehören die enzymatische Inaktivierung des Zellgifts, die Veränderung/Schutz der zellulären Zielstruktur, die Veränderung der Membran-Permeabilität für das Gift und der Transport der Substanz aus der Zelle. Während die ersten beiden genannten Mechanismen eine Resistenz gegen nur ein bestimmtes Gift oder dessen Klasse gewährleisten, können die Efflux-Systeme zum sogenannten MDR-Phänotyp führen. Als Efflux-Systeme kommen in Bakterien fünf Proteinfamilien vor [26]: die Superfamilie der ABC-Transporter [9], die Superfamilie der „major facilitator“ Proteine (MFS) [27], die Familie der „multidrug and toxic compound extrusion“ (MATE) Proteine [28], die „small multidrug resistance“ Proteinfamilie (SMR) [29] und die „resistance-nodulation-division“ (RND) Superfamilie [30-32]. Eine Übersicht dieser Efflux-Systeme ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

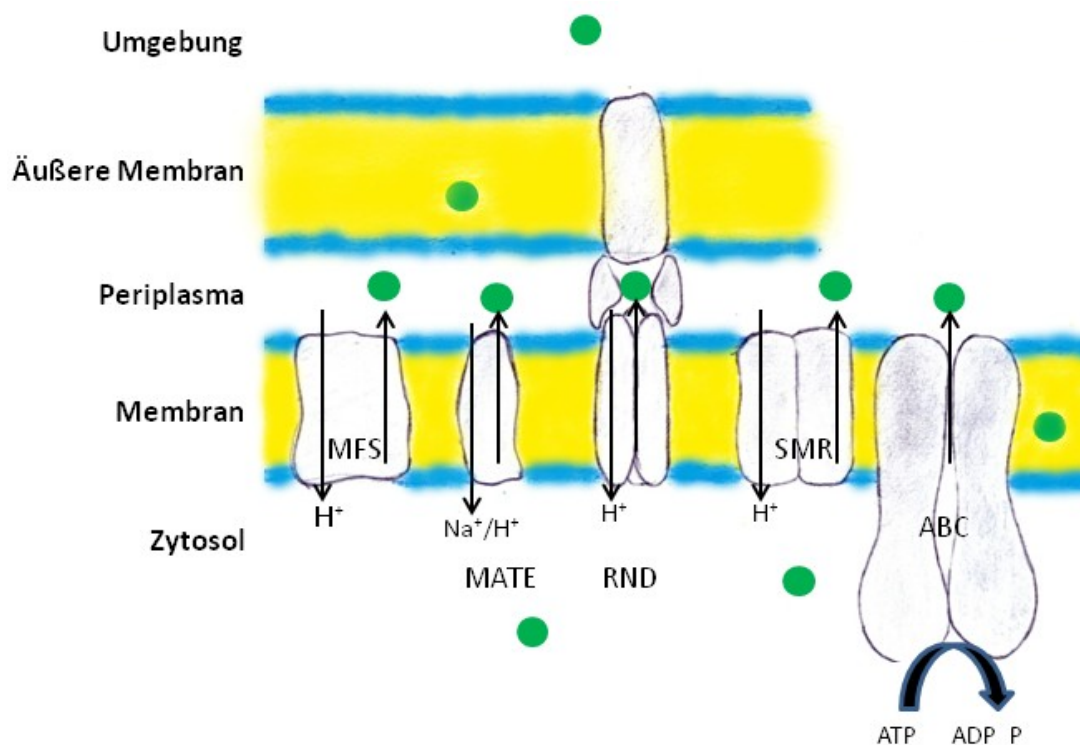


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Protein-(Super-)Familien prokaryotischer MDR-Transporter. Die Superfamilie der „major facilitator“ (MFS), die Familie der „multidrug and toxic compound extrusion“ (MATE)-Transporter, die Superfamilie der „resistance-nodulation-cell division“ (RND)-Transporter, die Familie der „small multidrug resistance“ (SMR)-Transporter und die Superfamilie der „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter. Das Zellgift/Substrat ist in grün dargestellt. Abbildung entnommen aus [33] und verändert.

Die MFS-Transporter

MFS-Transporter sind sekundär-aktive Transporter [27], deren funktionale Einheit ein Monomer ist. Vertreter dieser Superfamilie bestehen aus 12 oder 14 Transmembran-Segmenten (TM), wobei jeweils 6 bzw. 8 α -Helices zu einem Bündel zusammen in einer pseudo-symmetrischen Anordnung in der Membran eingelagert sind [34-36]. Unter den bakteriellen MDR-Proteinen stellen MFS-Transporter die größte Gruppe dar [37]. Bei den MFS-Proteinen kommen sowohl Uniporter als auch Symporter und Antiporter vor [38]. Zwei der sechs MFS-MDR-Transporter-Familien kommen in Bakterien besonders häufig vor: die 12-TM **Drug/H⁺ Antiporter 1** Familie (DHA-1) und die 14-TM DHA-2 [39]. Die meist untersuchten Modell-Systeme dieser Proteinfamilie sind: MdfA aus *E. coli* [40-41], LmrP aus *L. lactis* [42-43], QacA und NorA aus *Staphylococcus aureus* [44-45] und Bmr und Blt aus *Bacillus subtilis* [46-47]. Anhand von Untersuchungen zu Bmr konnte gezeigt werden, dass die Expression durch Anwesenheit eines Zellgifts induziert wird [48]. Das Substrat bindet an den Transkriptions-Aktivator BmrR und erhöht auf diese Weise dessen Affinität zum bmr-Promotor. Dieses Prinzip der Substratinduzierten Expression konnte auch für andere MDR-Proteine gezeigt werden [49]. Die Hypothese nach der die meisten MDR-Proteine ein physiologisch relevantes Substrat besitzen und der Transport von Zellgiften eher ein Nebeneffekt darstellt, konnte bei manchen Vertretern der MDR-MFS-Proteine bestätigt werden. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass Blt acylierte Polyamine transportiert [50], während bei MdfA zusätzlich zu dem Antiport von Gift/H⁺ eine Funktion bei der Bewältigung von alkalischen Wachstumsbedingungen aufgrund einer Na⁺(K⁺)/H⁺-Transportfunktion diskutiert wird [51-52]. Allgemein geht man wie bei den anderen MDR-Proteinen auch hier von einer großen hydrophoben Bindungstasche aus, die vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Substraten interagieren und das auch hier mehrere Substrate simultan gebunden werden können [53-54]. Aufgrund der Tatsache dass MDR-Proteine vorwiegend, manche sogar ausschließlich, positiv geladene Moleküle transportieren, geht man zusätzlich von elektrostatischen Wechselwirkungen aus. Diese sind jedoch bei MFS-Proteinen schwieriger nachzuweisen, denn negativ-geladene Seitenketten innerhalb der TMDs könnten auch lediglich an der H⁺-Translokation beteiligt sein [55]. Beispielsweise konnten für LmrP jedoch zwei solcher am Substrattransport beteiligter Reste

identifiziert werden, Aspartat 142 und Glutamat 327. Während es genügt nur eine der beiden Positionen durch eine neutrale Aminosäure auszutauschen um den Transport eines divalenten Substrats (Hoechst 33342) zu unterbinden, mussten für ein monovalentes Substrat (Ethidium) beide Aminosäuren ausgetauscht werden [56]. Untersuchungen auch an anderen Proteinen legen den Schluss nahe, dass elektrostatische Wechselwirkungen die Bindungsrate beeinflussen, während hydrophobe Wechselwirkungen die Stabilisierung des Substrat-Protein-Komplexes bewerkstelligen [37]. Bei dieser Klasse von MDR-Proteinen kommt der Transport-Stöchiometrie zusätzlich eine wichtige Rolle zu. Die genaue Kopplung des Substrat-Protonen-Transports ist vor allem bei substratspezifischen nicht zu den MDR-Proteinen gehörenden MFS-Proteinen, wie beispielsweise das H^+ /Lactose Symporters (LacY) gut untersucht [57], und kann zum Verständnis der MDR-MFS-Transporter dienen. Allerdings sprechen viele Studien dafür, dass die MDR-MFS-Transporter einem anderen Transport-Mechanismus folgen, als den der gewöhnlichen MFS-Transporter [58]. Interessanterweise ist kein trivalentes kationisches Substrat bekannt, so dass es vorstellbar ist durch Entwicklung von Antibiotika, die unter physiologischen Bedingungen trivalent sind, das durch MFS-Transporter vermittelte MDR-Problem bei Infektionen zu überwinden [37]. Bei lokalen Infektionen ist es auch möglich für ein alkalisches Milieu zu sorgen, so dass auch auf diese Weise der Export von Antibiotika unterbunden wird.

Die MATE-Transporter

Bei den Proteinen der **M**ultidrug **A**nd **T**oxic compound **E**xtrusion (MATE)-Familie handelt es sich um Antiporter die im Gegenzug zum Export von Substraten entweder Protonen oder Natrium-Ionen importieren [59] und als Monomere in der inneren Membran vorliegen. Als Beispiel für ein gut beschriebenes Protein dieser Familie ist NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* zu nennen [30]. Allgemein kommen MATE-Proteine nicht nur in Bakterien vor, sondern auch in Säugern und Pflanzen [26, 28, 59]. Auch bei diesen Proteinen sind die natürlichen Substrate unbekannt und ihre Relevanz für den MDR-Phänotyp in den jeweiligen Organismen ungeklärt, da die meisten der 20 bislang charakterisierten Vertreter heterolog in hypersensitiven *E. coli*-Stämmen expremiert und untersucht wurden [26]. Insgesamt kann man zurzeit wenig über den Transportmechanismus, mögliche Inhibitoren und das Substratspektrum berichten. Jedoch gilt das Substratspektrum als eingeschränkt im Vergleich zu den anderen MDR-Transportern [28]. Die Frage welches der beiden Gegen-

Ionen verwendet wird, wurde bislang für 14 Vertreter geklärt, es fehlt jedoch ein genaues Modell das besagt warum hier im Gegensatz zu den anderen Antiportern in manchen Fällen Natrium-Ionen genutzt werden und inwiefern das vom herrschenden Milieu abhängt.

Die SMR-Transporter

Die Proteine der **S**mall **M**ultidrug **R**esistance (SMR)- Familie sind ebenfalls Protonen-abhängige sekundär-aktive Transporter. Mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 110 Aminosäuren und 4 Transmembran-Segmenten sind sie im Vergleich zu anderen MDR-Proteinen eher klein [60]. Obwohl sie ihre Substrate, bei Gram-negativen Bakterien, lediglich ins Periplasma transportieren können, sind sie in der Lage einen MDR-Phänotyp zu verursachen. Das Substratspektrum umfasst auch klinisch-relevante Antibiotika wie beispielsweise Aminoglykoside [61]. Ein ausführlich beschriebenes Protein dieser Familie ist EmrE aus *E. coli* [30, 62-63]. Wie bei allen SMR-Transportern ist die funktionelle Einheit ein Dimer, wobei es sich in diesem Fall um ein Homodimer handelt. Gegenstand von Diskussionen ist die antiparallele Orientierung der beiden Einheiten eines Dimers als charakteristisches Merkmal für die SMR-Familie. Unterstützt wird dies durch die Kristallstruktur von EmrE [62] und Untersuchungen des Heterodimers EbrAB aus *Bacillus subtilis* [64]. Hingegen konnte gezeigt werden, dass ein Dimer aus parallel angeordneten EmrE-Einheiten Transport-Aktivität aufweist [65], womit argumentiert wird dass die antiparallele Anordnung lediglich ein Präparations-Artefakt darstellt.

Die RND-Transporter

Die Transporter aus der **R**esistance-**N**odulation-**D**ivision (RND)-Superfamilie gehören zu den wichtigsten MDR-Proteinen Gram-negativer Bakterien [31]. Die RND-Proteine sind ebenfalls Antiporter, die im Gegenzug zum Substrat Protonen in die Zelle hinein transportieren. Sie liegen als Trimere in der inneren Membran Gram-negativer Bakterien vor. Die funktionelle Einheit ist jedoch ein größerer Protein-Komplex der sich aus dem RND-Transporter (z. B. AcrB), einem periplasmatischen Adapterprotein (AcrA) und einem Kanal-Protein (TolC) in der äußeren Membran zusammensetzt. Dieser Komplex ermöglicht eine sehr effiziente Translokation von Zellgiften, wobei auch Substanzen die sich im Periplasma befinden transportiert werden können [31]. Die hohe intrinsische Resistenz Gram-negativer Bakterien gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika-Klassen und Fungiziden wurde zunächst auf die

zusätzliche Membran zurückgeführt, jedoch konnte gezeigt werden dass auch die RND-Transporter maßgeblich daran beteiligt sind [66]. Ein intensiv untersuchter Beispiel-Komplex ist das RND-Protein AcrB mit dem Adapterprotein AcrA und dem allgemeinen Porin TolC aus *E. coli*. Die umfangreichen Kenntnisse aus diesen Studien sind in [31] zusammenfassend dargestellt.

1.4 Die ABC-Transporter

ABC-Transporter kommen in allen Organismen vor und erfüllen aufgrund ihrer verschiedenen Substrate eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Sie nutzen die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie zum Transport von Substanzen über eine biologische Membran, entgegen eines Konzentrationsgefälles. Neben ABC-Transportern die relativ kleine Moleküle wie Ionen oder Aminosäuren transportieren, gibt es Vertreter die die Translokation von Zuckern, Lipiden, Peptiden und Proteinen bewerkstelligen [67-73]. ABC-Transporter stellen eine Superfamilie von Membranproteinen dar und gehören zu den ABC-Proteinen. Zusätzlich zu den für ATPasen spezifischen Sequenzmotiven, das Walker A- (GXXGXGKS/TT wobei X für eine beliebige Aminosäure steht) und das Walker B-Motiv ($\phi\phi\phi\phi$ D wobei ϕ jede hydrophobe Aminosäure ist), weisen ABC-Transporter die auch als ABC-Signatur-Motiv bezeichnete C-Schleife (LSGGQ) und D-Schleife (SALD) auf. Daneben sind weitere Aminosäuren, ein Glutamin (Q-Schleife) und ein Histidin (H-Schleife) konserviert [74-75]. Ein funktionaler ABC-Transporter setzt sich aus zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBDs) und zwei Transmembran-domänen (TMDs) zusammen [76]. Bei einigen ABC-Transportern, besonders bei Prokaryoten, liegen TMDs und NBDs als einzelne Polypeptide vor. In Eukaryoten hingegen bilden die vier Untereinheiten oft ein Polypeptid, wobei die TMDs in der Regel N-terminal von den NBDs lokalisiert sind [77]. Sind eine TMD mit eine NBD zu einem Protein fusioniert, so wird dieses Protein als „half-size“-Transporter bezeichnet. Zur Ausbildung eines funktionellen Transporters müssen diese Dimere ausbilden, wobei Beispiele sowohl für Homodimere als auch für Heterodimere bekannt sind [78-79]. Manche ABC-Transporter besitzen zusätzliche an den TMDs gebundene Domänen mit meist regulatorischer Funktion [67, 77, 80-82]. Weiterhin benötigen Importer, die lediglich bei Prokaryoten und Archaeen zu finden sind, sogenannte extrazelluläre Substratbindepoteine

die die Substrate/Nährstoffe im Medium binden und zum Transporter heranzuführen [83]. Sequenzhomologien lassen sich lediglich in den NBDs finden, nur bei sehr ähnlichem Substratspektrum können auch Homologien in den Substrat bindenden TMDs gefunden werden [81].

1.5 Ausgewählte MDR-ABC-Transporter

Nachfolgend werden drei ABC-Transporter vorgestellt, die in dieser Arbeit im Rahmen einer Inhibitor-Studie untersucht wurden. Bei allen drei Proteinen handelt es sich um bekannte MDR-Proteine, die als Modelle zur Untersuchung von MDR-ABC-Transportern von pathogenen Mikroorganismen verwendet werden [9, 84-85].

LmrA aus *Lactococcus lactis*

LmrA ist ein Transporter des Gram-positiven Milchsäurebakteriums *Lactococcus lactis*, mit einem Molekulargewicht von 64 kDa und ist das erstbeschriebene prokaryotische ABC-Protein, dass bei Überexpression zu einem MDR-Phänotyp führt [84]. Die Expression von LmrA vermittelt eine Resistenz gegenüber vielen Antibiotika, darunter Vertreter der Klasse der Aminoglycoside, Lincosamide, Tetracycline und Chloramphenicol [86]. In einem hypersensitiven *E. coli*-Stamm CS562 führte LmrA zu einer erhöhten Toleranz gegenüber typischen Substraten von MDR-Proteinen (Ethidium, Daunomycin, Rhodamin 6G und Tetraphenylphosphonium) [78]. Desweiteren wurde von LmrA-vermitteltem Schutz gegen hohe Salzkonzentrationen, Ethanol- und Cadmium-Toxizität berichtet bzw. postuliert [87-89]. LmrA-exprimierende Lungenfibroblasten zeigen einen identischen Phänotyp, wie dem bei Expression des P-Glykoproteins beobachteten. Die Funktion von LmrA kann in diesen Zellen durch bekannte Pgp-Inhibitoren vollständig unterdrückt werden [90]. Allgemein transportiert LmrA, wie viele MDR-Proteine, hydrophobe kationische Moleküle. Es handelt sich um einen „halfsize“-Transporter dessen funktionelle Einheit ein Homodimer ist [78] (Abbildung 2B). Analog zum P-Glykoprotein werden für die Transmembrandomänen jeweils 6 Transmembranhelices vorhergesagt [84].

Der Mechanismus des Transports ist für diese Proteinfamilie noch nicht vollständig geklärt. Jedoch geht man davon aus, dass die Substratbindung von der inneren Lipidschicht der Membran aus erfolgt und das Substrat entweder zunächst in die äußere Lipidschicht oder direkt in den extrazellulären Raum transportiert wird [91]. Für das P-Glykoprotein konnten während des Transportzyklus drei metastabile Konformationen gemessen werden. Eine Konformation im nicht-energetisierten Zustand, eine im ATP-gebundenen Zustand und die Dritte im post-hydrolytischen Zustand [92]. Diese drei Konformationen konnten mittels ATR-FTIR (abgeschwächte Totalreflexion-Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie) auch für LmrA nachgewiesen werden [93]. Des Weiteren geht man auch bei LmrA von zwei allosterisch-gekoppelten Substratbindestellen unterschiedlicher Affinität aus [78]. Die Ergebnisse von Markierungsstudien an LmrA während des Transport-Zyklus führten zur Annahme, dass die Transmembranhelix 3 eines Monomers zusammen mit den Transmembranhelices 5 und 6 des anderen Monomers die Substrattasche ausbildet. Zusätzlich konnte eine Bewegung der Helices 5 und 6 während des Transport-Zyklus beobachtet werden [94].

Bislang konnte kein natürliches LmrA-Substrat identifiziert werden, sodass seine physiologische Rolle in *L. lactis* weiterhin unbekannt ist. Ebenso konnte die Regulation der Expression noch nicht aufgeklärt werden. Eine direkte Induktion konnte nicht durch gängige MDR-Protein-Substrate erreicht werden, was bei vielen MDR-Proteinen beobachtet wurde. Die Rolle von LmrA bei der Ausprägung eines MDR-Phänotyps in *L. lactis* ist umstritten [9]. Erste Hinweise zur physiologischen Funktion von LmrA geben die Ergebnisse von zwei Studien zur Beurteilung der Zellantwort von *L. lactis* bei Überproduktion von Membranproteinen. Es konnte festgestellt werden, dass die erhöhte Expression von Membranproteinen unter anderem zu einer erhöhten Transkription von LmrA führt [95]. Weiterhin konnte angenommen werden, dass LmrA zum CesSR-Regulon gehört [96]. Das Zweikomponenten-System CesSR (cell envelope stress **S**ensor/**R**egulator) ist für die Feststellung von Beeinträchtigungen der Zellhülle und für die Wiederherstellung verantwortlich. CesSR und davon regulierte Proteine sind für die Überexpression von Membranproteinen in *L. lactis* von großer Bedeutung [96].

LmrCD aus *Lactococcus lactis*

LmrCD ist ein heterodimerer Komplex der sich aus zwei Half-size-Transportern, LmrC und LmrD (ehemals YdaG und YdbA), zusammensetzt (Abbildung 2 C). Die beiden codierenden Gene sind in einem kleinen Operon organisiert dessen Transkription von LmrR (YdaF) als Repressorprotein reguliert wird [79]. Anhand von Transkriptom-Analysen von 4 Zellgift-resistenten *L. lactis*-Stämmen, wurde eine erhöhte Transkription von LmrCD bei Anwesenheit von Zellgiften festgestellt, und man folgerte daraus dass LmrCD eine bedeutende Rolle, sowohl bei der intrinsischen als auch der erworbenen Resistenz dieses Bakterium spielt. LmrCD ist nicht nur maßgeblich am MDR-Phänotyp von *L. lactis* beteiligt, sondern vermittelt ebenfalls eine Resistenz gegenüber Gallen-Salzen wie Cholat [97]. Diese werden auch als die natürlichen Substrate für LmrCD betrachtet. Zwar kann *L. lactis* durch Ausbildung eines Biofilms auch ohne LmrCD-Beteiligung eine Resistenz gegenüber Gallensalzen und manchen Detergenzien aufbauen, jedoch ist die Ausprägung der Resistenz und die Aufrechterhaltung des Biofilms bei Anwesenheit von LmrCD von größerem Ausmaß [98].

Pdr5 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Im Gegensatz zu den zuvor behandelten ABC-Transportern ist Pdr5 wie das P-Glycoprotein ein "full-size"-Transporter (Abbildung 2 A). In der Hefe *S. cerevisiae* wird der Begriff "pleiotropic drug resistance" (PDR) für das MDR-Phänomen verwendet. Pdr5 (160 kDa) ist Teil eines Netzwerks, der sich aus ABC-Transportern, Sekundärtransportern die zu den MFS-Proteinen [99-100] gehören und eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren [101-103] zusammensetzt. Die Expression der ABC-Transporter des PDR-Netzwerks unterliegt der Kontrolle zahlreicher Transkriptionsfaktoren, wobei Pdr1 und Pdr3 die wichtigsten sind [104]. Das Substratspektrum von Pdr5 umfasst Fungizide, Zytostatika, Detergenzien, Ionophore, Steroide und Phospholipide [105-109]. Aufgrund der Identifizierung von Phospholipiden als Substrat und eine hohe Expression im Wildtyp-*S. cerevisiae*-Stamm wurde angenommen, dass Pdr5 eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lipidsymmetrie der Plasmamembran spielt [110]. Jedoch führt eine Deletion des PDR5-Gens nicht zu einem erwarteten, eindeutig gestörten Proliferationsverhalten unter normalen

Bedingungen. Zahlreiche Studien wurden bereits durchgeführt um die Substratspezifität von Pdr5 zu untersuchen und so Rückschlüsse auf die Art der Substratbindetasche und der Funktionsweise machen zu können. Es wurden nicht nur unterschiedliche Substanzen verwendet, sondern auch gerichtete Mutationsstudien durchgeführt [106-107, 111-113]. Bei Pdr5 scheint die Größe des Substrats von Bedeutung zu sein, Substanzen mit einem Volumen von ca. $200 \text{ \AA}^3$ werden mit hoher Effizienz, wohingegen Substrate kleiner als $90 \text{ \AA}^3$ kaum transportiert werden [114]. Analog zum P-Glycoprotein geht man auch bei Pdr5 von einer größeren Substratbindetasche mit mindestens drei Substratbindestellen aus. Für die Substratbindestelle 1 (unter anderem verantwortlich für die Bindung von Rhodamin 6G) wird angenommen, dass das Substrat über mindestens drei Akzeptorgruppen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verfügen muss, oder zwei und eine dritte elektronegative Gruppe an einem aromatischen Ring. Für die Substratbindestelle 2 wird nur eine Elektronenpaar-Donor-Gruppe zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen benötigt. Die Hydrophobizität des Substrats scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen [115]. Zusätzlich zu dem umfangreichen Wissen über das Substratspektrum, wurden auch verschiedene Inhibitor-Studien an Pdr5 durchgeführt [116-119]. Die hohe Expression von Pdr5, mit 42000 Molekülen pro Zelle, erlaubt in Kombination mit dem spezifischen Inhibitor Oligomycin die Bestimmung der Aktivität (ATPase- und Transport-Aktivität) bereits in isolierten Membranvesikeln aus *S. cerevisiae* [120-122]. Dies ermöglichte in der Vergangenheit die Etablierung von Testverfahren zur Aktivitätsbestimmung [122], die in dieser Arbeit angewendet werden konnten.

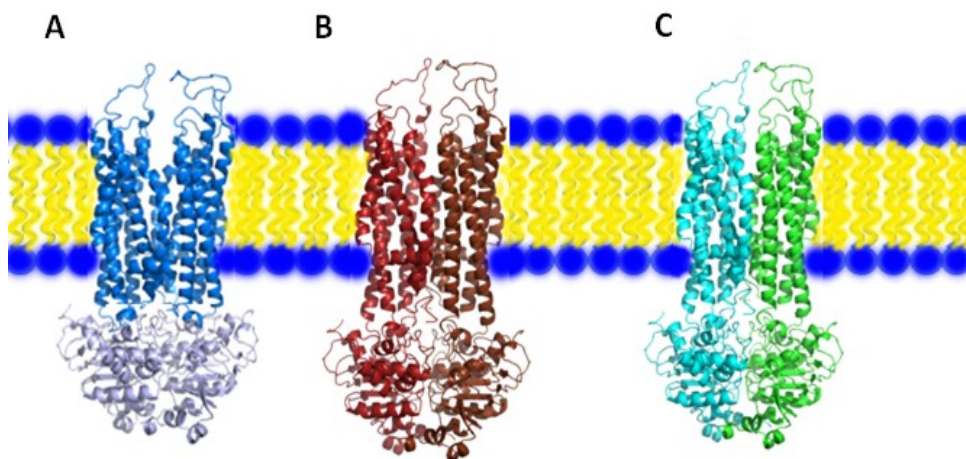


Abbildung 2: Modell der untersuchten MDR-ABC-Transporter. Dargestellt ist die Kristallstruktur des ABC-Transporters Sav 1866 aus *Staphylococcus aureus* [123], wobei diese in (A) als Modell für Pdr5 als „full-size“-Transporter dient. In (B) wurde die Struktur als Modell für den homodimeren Transporter LmrA und in (C) für den heterodimeren Transporter LmrCD verwendet.

1.6 Substrate und Inhibitoren von MDR-Proteinen

Wie bereits eingangs erläutert besitzen MDR-Proteine ein sehr breites Substratspektrum, welches zahlreiche Antibiotika-Klassen, Fungizide und Zytostatika umfasst. Bei der Erforschung der Funktionsweise dieser Transporter macht man sich unter anderem zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe zu Nutze, die ebenfalls als Substrate erkannt werden. In Abbildung 3 sind die Strukturformeln von typischen MDR-Substraten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt. Die einfache Handhabung dieser Substanzen im Vergleich zu radioaktiv-markierten Substraten und ihre chemischen Eigenschaften ermöglichen eine zeitaufgelöste Beobachtung des Transports. So ist beispielsweise Hoechst 33342 [124-126] nur in hydrophober Umgebung oder in einem Komplex mit DNA fluoreszent, so dass beim aktiven Transport aus der Membran eine Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen werden kann. Ethidium [40, 42, 127] hingegen kann nur bei Vorliegen des Farbstoffs in einem Komplex mit doppelsträngiger DNA zur Fluoreszenz angeregt werden, so dass auch hier wie bei Hoechst der Transport aus der Zelle gemessen werden kann. Rhodamin 6 G bildet bei hohen Konzentrationen nicht-fluoreszente Excimere aus [105, 122], was für *in-vitro*-Transport-Messungen mit Membranvesikel verwendet werden kann. Hierbei wird das Substrat aufgrund der umgekehrten Orientierung des Transporters in das Lumen der Vesikel

transportiert, so dass bei Erreichen hoher Konzentrationen auch hier eine Abnahme des Fluoreszenzsignals detektiert werden kann.

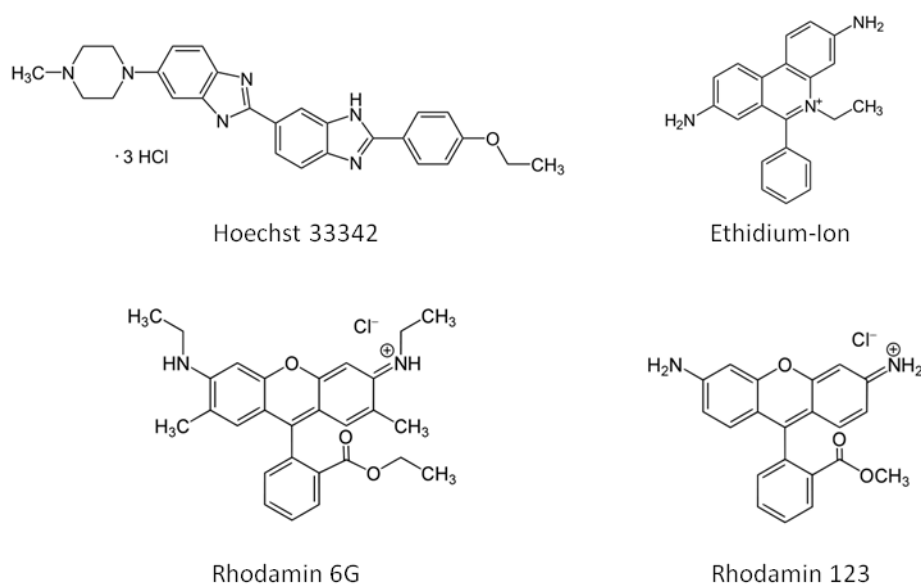


Abbildung 3: Strukturformeln von einer Auswahl an MDR-Substraten. Hoechst 33342 (links oben), Ethidium-Ion (rechts oben), Rhodamin 6G (links unten) und Rhodamin 123 (rechts unten).

Diese Substanzen eignen sich jedoch nicht nur für die genaue Untersuchung des Transports und der Transportkinetik, sondern sind ebenfalls zytotoxisch und können somit zur Betrachtung des Resistenz-Phänotyps verwendet werden. Hoechst 33342 bildet starke nicht-kovalente Bindungen zu Adenin- und Thymin-reichen DNA-Regionen [128-130] und hindert DNA-bindene Enzyme in ihrer Funktion. Die gestörte Replikation, Transkription und Reparatur der DNA führt letzten Endes zu Verzögerung oder gar Arrest des Zellzyklus [131-132] und erhöhter UV-Sensitivität. Bei Ethidium wird zusätzlich zur Wirkung als DNA-Interkalator bei Hefezellen von einem Verlust von intrazellulären Kalium-Ionen [133] berichtet. Hiernach wird ein Antiport-Mechanismus angenommen, bei dem im Zuge des Imports von Ethidium-Ionen ein Export von Kalium-Ionen erfolgt. Je nach Konzentration des zugefügten Ethidiums kann es bis zum vollständigen Verlust des intrazellulären Kaliums kommen. Rhodamine werden aufgrund ihrer Fähigkeit sich in Membranen mit einem bestehenden Membranpotential einzulagern vorwiegend in der Zellbiologie zu Färbung von lebenden Zellen und aktiven Mitochondrien verwendet [134-136]. Die Einlagerung dieser Kationen führt jedoch zur Störung des bestehenden Potentials und seiner Aufrechterhaltung, und begründet die toxische Wirkung dieser Fluoreszenzfarbstoffe.

Die bislang aufgeführten MDR-Protein-Substrate werden, wie bereits erwähnt vorwiegend in Laborversuchen verwendet, in der therapeutischen Praxis sind diverse Antibiotika, wie das natürlich vorkommende Antibiotikum Daunorubicin (Strukturformel Abbildung 4) bedeutender. Ähnlich wie Ethidium handelt es sich auch bei diesem Antibiotikum aus der Gruppe der Anthracycline um ein DNA-Interkalator. Das Breitbandantibiotikum Tetracyclin, sowie das zytostatisch wirksame Mitoxantron sind ebenso gängige Substrate für MDR-Proteine.

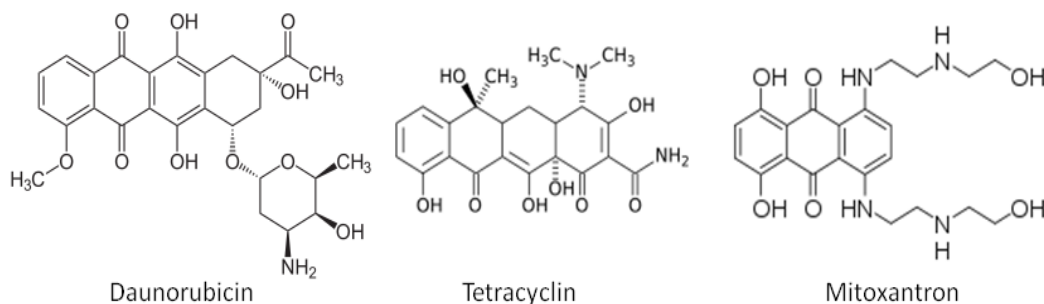


Abbildung 4: Strukturformeln von therapeutisch eingesetzten Substanzen, die von MDR-Proteinen als Substrate erkannt werden. Die natürlich vorkommenden Antibiotika Daunorubicin (links) und Tetracyclin (mitte) sowie das Cytostatikum Mitoxantron (rechts).

Eine erhöhte Expression von ABCB1 (P-Glykoprotein) konnte in 40-50 % von Krebspatienten gefunden werden und ist mit einer geringen Wirksamkeit einer Chemotherapie verbunden [137-139]. Daher ist die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren für ABCB1, bzw. allgemein für diese Proteine, von großer Wichtigkeit. Die Forschung der letzten Jahrzehnte führte zur Entwicklung von zahlreichen Substanzen, die jedoch nicht die erforderliche Selektivität und Effektivität aufwiesen um in klinischen Studien näher untersucht zu werden [140]. Zur ersten Generation von Pgp-Inhibitoren gehören unter anderem Verapamil und Cyclosporin A (Abbildung 5). Diese Substanzen wiesen eine geringe Selektivität auf und mussten in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führte [141]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die zweite Generation der Pgp-Inhibitoren entwickelt, wobei Valspodar/PSC-833 und Biricodar/VX-710 (Abbildung 5) als Beispiele zu nennen sind. Diese Substanzen besitzen eine verbesserte Effektivität jedoch kommt es auch hier zu vielen Interaktionen mit anderen Transport-Proteinen. Desweiteren wird CYP3A4 inhibiert, bei der es sich um eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase handelt und eins der wichtigsten Enzyme zur Metabolisierung von Zellgiften ist [142]. Die dritte

Generation von Inhibitoren zeichnen sich durch eine verbesserte Selektivität aus. Trotzdem gibt es Vertreter die nicht unerhebliche Nebenwirkungen hervorrufen, eine geringe Löslichkeit aufweisen und sogar die Wirkung von gut etablierten Krebsmedikamenten verringern [143]. Zosuquidar (Abbildung 4) gehört zu den vielversprechendsten Vertretern dieser Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass Zosuquidar die Ausprägung eines Pgp-vermittelten MDR-Phänotyps in vielen Zelllinien verhindert [144-147]. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Substanzen inhibiert Zosuquidar spezifisch die Aktivität von Pgp, die Aktivität anderer MDR-ABC-Transporter, wie z. Bsp. von MRP1 (multidrug resistance-related protein) oder BCRP (breast cancer resistance protein) wird nicht beeinflusst [145]. In Phase-1-Studien stellte sich heraus, dass Zosuquidar generell gut vertragen wurde und akzeptable und reversible Nebenwirkungen verursacht [147-150]. Allerdings konnte der Behandlungserfolg von Leukämien und soliden Tumoren nicht durch Zosuquidar verbessert werden [148, 150-151].

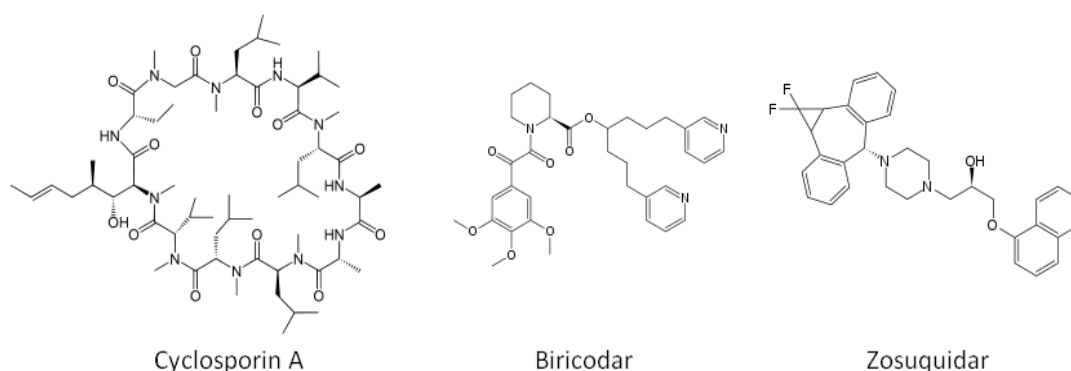


Abbildung 5: Inhibitoren des P-Glykoproteins. Strukturformeln von Vertretern aller drei Generationen von Pgp-Inhibitoren. Cyclosporin als Beispiel für die erste Generation (links), Biricodar für die zweite Generation (mitte) und Zosuquidar für die Dritte (rechts).

1.7 Motivation und Zielsetzung

MDR-ABC-Transporter stellen eine interessante Gruppe innerhalb der MDR-Proteine dar, da sie sowohl an der Resistenz von Krebszellen gegenüber den zum Einsatz kommenden Therapeutika verantwortlich sind, als auch zum MDR-Phänotyp vieler pathogener Mikroorganismen beitragen. Durch den von ihnen vermittelten Efflux der eingesetzten Chemotherapeutika verhindern sie den Erfolg von Behandlungen. Um die Ausprägung des MDR-Phänotyps zu unterbinden ist sowohl eine ausführliche Charakterisierung der zugrundeliegenden Proteine als auch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren notwendig. Ziel dieser Arbeit war es daher einen bakteriellen Vertreter der MDR-ABC-Transporter funktionell zu charakterisieren und ein Screening nach neuen Inhibitoren für mikrobielle ABC-Transporter durchzuführen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der *Lactococcus lactis* multidrug Transporter A (LmrA) biochemisch charakterisiert werden, wobei der Einfluss von ausgewählten Detergenzien, Lipiden und bekannten Substraten auf die Aktivität untersucht werden sollte.

Der zweite Teil sollte die Frage klären inwieweit Derivate eines bekannten Inhibitors (Zosuquidar) für ein humanes MDR-Protein, das P-Glykoprotein, auch die Aktivität mikrobieller MDR-ABC-Transporter beeinflussen können. Für dieses Screening lagen 26 Zosuquidar-Derivate vor, die an LmrA, einem weiteren Vertreter aus *Lactococcus lactis* LmrCD und Pdr5 aus *Saccharomyces cerevisiae* getestet werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1 30 %	Roth
Adenosin-5'-triphosphat	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Serva
Agarose GTQ	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Arabinose	AppliChem
8-Azidoadenosin-5'-[γ ³² P]-triphosphat	Hartmann Analytics
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Bio-Rad
2-Deoxyglukose	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR
Dimethylsulfoxid	Roth
1,4-Dithiothreitol	Roth
Dodecyl- β -D-maltopyranosid	Anatrace
ECL Advance western Blotting Detection Kit	Amersham
EDTA-Dinatriumsalz	AppliChem
Essigsäure	Normapur
Ethanol abs. für Molekularbiologie	Normapur

Ethanol techn.	Fluka
Ethidiumbromid	Fluka
Formaldehyd 37%	Roth
FosCholin 16	Anatrace
Glycerol 98 %	Caesar & Loretz
Glycin	Roth
Glukose	Caesar & Loretz
Harnstoff	Riedel-de Haen
Hefe-Extrakt	Difco/Roth
HellmaEx	Hellma
Hepes	AppliChem
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Fluka
Jod	Roth
Kalium-Dihydrogenphosphat	Roth
Kaliumnitrat	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Fluka
Malachitgrün	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat	Fluka
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Dodecylsulfat	Serva

Oligomycin A, B und C (60:30:10)	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete® Tabletten)	Roche
Salzsäure, 37 %	Riedel-de Haen
Schwefelsäure, 96 %	Fisher
Sukrose	AppliChem
Rhodamin 123 und 6G	Sigma-Aldrich
N,N, N',N'-Tetramethyldiamin	Merck
Trichloressigsäure	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma
Triton X-100	Roth
Tween 20	Fluka
Trypton-Pepton aus Casein	Difco/Roth
Zinkchlorid	Fluka
<u>Enzyme, Proteine und Antikörper</u>	
α -His aus Maus	Qiagen
α -Maus-HRP aus Ziege	Pierce
α -Pdr5 aus Kaninchen	Prof. K. Kuchler, Wien
α -Kaninchen-HRP aus Ziege	Sigma-Aldrich
Strep-Tactin-HRP	IBA
BSA (Rinder Serum Albumin) Standard	Roth
Deoxyribonuclease I	Sigma
Lysozym	Fluka
Phusion DNA Polymerase	Finnzyme
Recombinant Enterokinase	Novagen
Restriktionsenzyme (Fast Digest) und entsprechende Puffer	Fermentas
Taq DNA Polymerase	NEB

T4 DNA Ligase

NEB

Größenmarker für DNA und Proteine

Native Page Marker

Invitrogen

PageRuler100bp Ladder

MBI Fermentas

PageRuler1000bp Ladder

MBI Fermentas

Prestained Protein Molecular Weight Marker

MBI Fermentas

Klonierungs- und Reinigungs-Kits

NucleoSpin Plasmid

Macherey-Nagel

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Stratagene

RNeasy Protect Bacteria Mini Kit

Qiagen

Säulen

HiTrapChelating

GE Healthcare

Superdex 200 16/60

GE Healthcare

Verbrauchsmaterialien

DC-Platten: Alugram SIL/G/UV

Macherey Nagel

Amicon Ultra 15 (MWCO 100 kDa)

Millipore

0,5 mm Glas-Beads

BioSpec Products

Mikrotiterplatte, 96-Well (steril, unsteril)

Greiner

PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Transfermembran

Pall Life Sciences

Whatman-3MM-Filterpapier

Whatman

2.2 Geräte

Bead-Beater

Biospec

Blot-Apparatur Trans-Blot SemiDry

BIO-RAD

Brutschränke

Heraeus/Bachofer

Chromatographiesystem Äkta Basic

GE Healthcare

ELISA-Lesegerät Fluorostar

BMG Labtech

Fluoreszenzspektrometer Fluorolog II	Horiba
Fluoreszenzküvetten	Hellma
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gelelektrophorese-Apparaturen	Technische Werkstätten Universität Düsseldorf
Imager Chemi Genius ²	Syngene
Inkubatoren	Infors
Kritische-Punkt-Trocknung-Gerät	Leica
Megafuge 1.0R	Heraeus
Milli-Q ⁵⁰ Plus Anlage	Millipore
Netzteil PowerPac HC	BIO-RAD
pH-Meter	WTW
Photometer CO 8000	WPA Biowave
Rasterelektronenmikroskop	Jeol
Spectrophotometer NanoDrop-1000	Jasco
Sputter 108Auto	Cressington
Thermocycler T-Personal	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Beckman Coulter
UV-VIS-Spektrometer Cary 50 Bio	Varian
Waagen	Kern/Sartorius
Zellaufschlussmaschine Basic Z System	Constant Systems
Zentrifugen:	
Beckman L-7 65	Beckman Coulter
Eppendorf 5415C	Eppendorf
Eppendorf 5417R	Eppendorf
Sorvall Evolution RC	Thermo
Sorvall Discovery M120 SE	Thermo
Sorvall Discovery 90 SE	Thermo

2.3 Mikroorganismen, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.3.1 Mikroorganismen

Escherichia coli BL21 F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm* (DE3) (Invitrogen)

Lactococcus lactis NZ9000 Δ*lmrA*, *lmrC*, *lmrD* [152]

Saccharomyces cerevisiae

YALF A1 MATa ;ura3–52;trp1-1;leu2–3,112;his3–11,15;ade2-1; PDR1–3 [85]

2.3.2 Plasmide

pBad_*LmrA* [153]

pNHL*LmrA* PnisAp/o, *cmr*, *mcs* [33, 125]

2.3.3 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech, München bezogen.

Sequenzier-Primer

F4487 (5′-3′) TTATTGCCTTTGCTGGTCCT

F3273 (5′-3′) TTTCGTTCTGAAGGAACTACA

Mutagenese-Primer

E512Q-forward (5′-3′) TAATGCTTGATCAGCCAG

E512Q-reverse (5′-3′) CTGGCTGTTGCCTGATCAAGCATTA

PCR-Primer

Gen	Primer forward (5′-3′)	Primer reverse (5′-3′)	Verwendete Anealing Temperatur [°C]
<i>lmrA</i>	AAAGAGGTCCACAAATGGCCAATC	CTTCATCAAGTAATTCGGTCAAACG	55
<i>lmrC</i>	CAAATCAATCATGAAGCATAAATG	ATTGATACGACCTATTGAAACCATAC	51
<i>lmrD</i>	GCTCAAGCATGGTCTGGTAT	CCTGTAATGGCAAGCTGAAG	49

2.4 Lösungen

2.4.1 Puffer und Färbelösungen

Malachitgrün-Färbelösung

M1: Malachitgrün 0,122 % (w/v) in Schwefelsäure 20 % (v/v)

M2: Ammoniummolybdat 7,5 % (v/v) in deionisiertem Wasser

M3: Tween 20 11 % (v/v) in deionisiertem Wasser

Coomassie-Färbelösung

10 % (v/v), Methanol 40 % (v/v), Coomassie Brilliantblau R250 0,25 % (w/v)

Coomassie-Entfärbelösung

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

Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

RF1: 100 mM Rubidiumchlorid, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Calciumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8

RF2: 10 mM MOPS, 10 mM Rubidiumchlorid, 75 mM Calciumchlorid

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA

De-energetisierungspuffer für in vivo Transport-Assay

50 mM Hepes 7,4, 5 mM 2-Deoxyglukose und 40 µM Ethidiumbromid

Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot

4-fach Trenngel-Puffer: 3,0 M Tris-HCl pH 8,85, 0,4% (w/v) Natriumdodecylsulfat

4-fach Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

4-fach Auftrags-Puffer: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 6 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 20 % (v/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Laufpuffer: 50 mM Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Puffer für die Isolierung von LmrA

Auftragungspuffer: 50 mM Hepes, pH 8, 10 mM Imidazol, 250 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerin

Waschpuffer: 50 mM Hepes, pH 7, 40 mM Imidazol, 250 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerin

Elutionspuffer: 50 mM Hepes, pH 7, 250 mM Imidazol, 250 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerin

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes, pH 7, 100 mM NaCl und 20 % (v/v) Glycerin

Puffer für die Plasmamembranpräparation aus *S. cerevisiae*

- 1 M Tris-Acetat pH 7,5
- 0,5 M EDTA
- TAEG-Puffer: 10 mM Tris-Acetat pH 7,5, 0,2 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerin
- 1 M Tris-Acetat pH 5,2
- 2,5 M Tris-Acetat pH 7,5
- 50 mM Hepes pH 7,0
- TAE-Puffer: 10 mM Tris-Acetat pH 7,5 und 0,2 mM EDTA

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

Das Laufmittel bestand aus Chloroform, Methanol, konzentriertem Ammoniak und Wasser in einem Verhältnis (v/v) von 90: 54: 5,5: 5,5

2.4.2 Medien

M17-Medium

β -Glycerophosphat 19,0 g/l, Pepton aus Casein 5,0 g/l, Pepton aus Soja 5,0 g/l, Hefe-Extrakt 2,5 g/l, Ascorbat 0,5 g/l, Magnesiumsulfat 0,25 g/l

Das M17-Medium wurde vor Benutzung auf eine Endkonzentration von 0,5 % Glucose und 5 μ g/ml Chloramphenicol eingestellt.

SMGG-Medium

M17-Medium mit 0,5 % Glucose, 0,5 M Sucrose und 2 % Glycin

Dazu benötigte Stammlösungen: 40 %-ige Glucose-Lösung, 2,5 M Sucrose-Lösung, 20 %-ige Glycin-Lösung

M17-Agar 12,75 g Agar pro Liter M17-Medium

GSM-Agar M17-Agar, 0,5 % Glucose, 0,5 M Sucrose und 5 μ g/ml Chloramphenicol.

LB-Medium

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

2YT-Medium

16 g/l Trypton/Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid und mit Natronlauge auf pH 7 einstellen.

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

YPD-Medium

20 g Trypton/Pepton aus Casein und 10 g Hefeextrakt in 900 ml ddH₂O. Vor der Benutzung wird unter sterilen Bedingungen durch Zugabe von einer 20 % (w/v) Glukose-Lösung eine Endkonzentration von 2 % (w/v) eingestellt.

Boost-Medium (5XYP) 50 g/l Hefextrakt und 100 g/l Trypton/Pepton

YPD-Agar YPD-Medium mit 2 % (w/v) Agar

2.5 Allgemeine Methoden

2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

E. coli Bakterien können durch Behandlung mit Rubidiumchlorid, Manganchlorid und Calciumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. So behandelte Zellen sind zur Transformation fähig. Werden sie nicht sofort benötigt, können sie bei -80°C gelagert werden. Eine einzelne Kolonie wurde für die Herstellung von einer 5 ml- UN-Kultur verwendet. Diese diente zum animpfen von 50 ml LB-Medium. Nach ca. 2 h bei 37 °C und 125 rpm ist eine optische Dichte bei 600 nm von 0,3 – 0,35 erreicht und die Kulturen werden in geeignete sterile 25 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für ca. 25 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 25 min pelletiert, der Überstand entfernt. Die Zellpellets werden in jeweils 8,3 ml auf Eis gekühlten RF1-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert, erneut für 25 min zentrifugiert und in 2 ml vorgekühlten RF2-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 15 min auf Eis inkubiert und in 200-µl-Einheiten aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die bei -80°C gelagerten Zell-Aliquots auf Eis aufgetaut. 10 µl der Plasmidlösung wurden auf 50 µl Zellsuspension gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Zellen für eine Minute einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, gefolgt von einer fünfminütigen Ruhe auf Eis. Zur phänsichen Expression der neuerworbenen Antibiotikaresistenz wurden die Zellen mit einem zehnfachen Volumen von 37°C warmem LB-Medium verdünnt und 1 h bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde hiernach auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die erfolgreiche Transformation wurde durch Plasmidisolierung aus einer Übernacht-Flüssig-Kultur, Restriktionsverdau und Analyse mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Zur Überprüfung der genetischen Information wurden die Plasmide sequenziert.

Herstellung kompetenter *L. lactis*-Zellen und Transformation

5 ml SMGG-Medium werden mit einer Kolonie angeimpft. Für gewöhnlich dauert es ca. 2 Tage bis die Kultur angewachsen ist, sollte das nicht der Fall sein wird die Glycin-Konzentration auf 1,5 oder 1 % reduziert. Diese Kultur wird für neue Übernachtskultur verwendet. 200 ml SMGG-Medium werden mit 5 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 660 nm von 0,5- 0,7 bei 30 °C kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 rcf und 4 °C geerntet und mehrmals mit kalter Waschlösung (0,5 M Sucrose und 10 % Glycerol) gewaschen, so dass das Glycin möglichst vollständig entfernt wird. Die Zellen werden am Ende in 2 ml Waschlösung resuspendiert, in 60 µl-Einheiten aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

Für die Transformation werden die Zellen auf Eis aufgetaut. 50 µl kompetente Zellen und 1-2 µl (ca. 200 ng) DNA werden auf Eis für 5-15 Minuten inkubiert. Der Transformationsansatz wird in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm überführt und die Transformation bei 1,8 kV für 5 ms durchgeführt. Die Zellen werden direkt im Anschluss mit 1 ml SMGMC-Medium versetzt und für 1-2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen auf GSM-Agar (M17-Agar, 0,5 % Glukose und 0,5 M Sucrose) mit 5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Die ersten Kolonien sind nach 24 Stunden sichtbar, sie sind noch klein, rund und transparent und werden erst nach weiteren 24 Stunden weiß.

Die erfolgreiche Transformation wurde durch Plasmidisolierung aus einer Übernacht-Flüssigkultur, Restriktionsverdau und Analyse mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Zur Überprüfung der genetischen Information wurden die Plasmide sequenziert.

Herstellung von Dauerkulturen

Von allen verwendeten Zellen wurden zur längeren Lagerung Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurden 700 µl einer ÜN-Flüssigkultur mit 300 µl sterilem Glycerin in einem sterilen Schraubdeckelgefäß gut vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Ausgang der ÜN-Kultur ist stets eine einzelne Kolonie auf der Selektionsplatte nach Transformation.

2.5.2 DNA-Analyse

Sequenzanalyse

Die qualitative Analyse erfolgte durch automatisierte Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977). Sequenzierungen wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Plasmid DNA oder gereinigten DNA-Fragmenten erfolgte spektroskopisch durch Absorptionsmessung mit Hilfe des ND-1000 (Nanodrop) bei 260 nm, wobei eine OD₂₆₀ = 1 einer Konzentration von 50 ng/μl doppelsträngiger DNA entsprach.

Agarosegelelektrophorese

Zur Untersuchung der Größe von DNA-Fragmenten, Überprüfung von PCR-Produkten und Analyse von Restriktionsverdau wurden 1-2 % Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 145 V für ca. 40 Minuten. Die DNA wurden durch Ethidiumbromid gefärbt, dazu wurde das Gel in eine 0,1 %-ige Ethidiumbromid-Lösung (v/v) überführt und für ungefähr 10 Minuten geschwenkt und anschließend mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Erfolg einer Klonierung bzw. einer Transformation sowie die Überprüfung eines Stammes bezüglich chromosomaler Gen-Deletionen wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion überprüft. Die Amplifikation definierter DNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase. Ein typischer Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR betrug 30 μl, und setzte sich zusammen aus jeweils 0,3 pmol/μl der zwei Primer, 0,15 mM dNTP-Mix, 2,5 mM Magnesiumchlorid, den vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer (1x), 0,05 U Taq-DNA-Polymerase sowie einer Bakterienkolonie. Es empfiehlt sich den Ansatz mit Mineralöl zu überschichten um eine Verdunstung der Probe zu verhindern. Der Zellaufschluss erfolgte durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C. Meist wurde eine Zykluszahl von 40 gewählt. Ein Zyklus setzt sich aus einem Denaturierungs-Schritt bei 95 °C für 3

Minuten, einem „Annealing“-Schritt bei $T_M - 5\text{ °C}$ (T_M ist die Durchschnitts-Schmelztemperatur des Primer-Paars) für 60 Sekunden, sowie einem 2-minütigen Elongations-Schritt bei 72 °C . Der finale Elongations-Schritt betrug 10 Minuten. Die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss durch Gelelektrophorese überprüft, und sofern notwendig zusätzlich sequenziert.

Einführung von Punktmutationen durch PCR

Zur Herstellung von Punktmutationen wurde das QuickChange®II XL Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Bei diesem Kit werden *E. coli*-Zellen verwendet, daher musste hier auf einen pBad-basierten Expressionsvektor zurückgegriffen werden. Die Methode lässt sich in zwei Schritte einteilen. Im ersten Schritt wird mit einer Polymerase, die eine hohe Synthesegeschwindigkeit bei geringer Fehlerrate besitzt (Bergseid et al. 1991), und zueinander komplementären Primern, die die gewünschte (mutierte) Sequenz haben, der Plasmid mit der Mutation vervielfältigt (Saiki et al. 1988). Im zweiten Schritt wird das Template von einem Restriktionsenzym vollständig verdaut, um bei der anschließenden Transformation keine Klone mit dem Ursprungsplasmid zu erhalten, da diese nicht ausgesiekt werden können. Das verwendete Restriktionsenzym DpnI, benötigt für die Erkennung der Schnittstelle zusätzlich zur spezifischen Basensequenz ein Methylierungsmuster (Mc Clelland und Nelson 1992), da die durch PCR synthetisierten Plasmide unmethyliert vorliegen, werden lediglich die aus den Bakterien gewonnenen Plasmide, die als Template dienten und noch keine Mutation tragen, hydrolysiert.

Die Primer wurden vorzugsweise mit einer Länge von 25 Basen und die veränderten Basen in der Mitte der Sequenz konstruiert. Es wurde hierbei auf einen möglichst hohen GC-Gehalt, sowie terminale Guanidine oder Cytosine geachtet. Dies erhöht die Schmelztemperatur der Enden, sodass ein guter Start der Polymerasereaktion gewährleistet werden kann. Ein Reaktionsansatz enthielt $1,25\text{ }\mu\text{l}$ des „10x reaction buffer“, $2,5\text{ ng}$ des Wildtyp-Plasmids pBadLmrA, je $31,25\text{ ng}$ der beiden Primer, $0,25\text{ }\mu\text{l}$ dNTP-Mix, $0,75\text{ }\mu\text{l}$ „QuickSolution“ und $0,625\text{ U}$ der Polymerase in einem Gesamtvolumen von $13,75\text{ }\mu\text{l}$. Die PCR wurde mit der vollständigen Denaturierung der DNA bei 95 °C für 60 Sekunden gestartet. Die Replikationszyklen begannen jeweils mit dem Schmelzen der DNA bei 95 °C für 50 Sekunden. Die Annealingtemperatur bei der sich die Primer an die Plasmid-DNA anlagern, wurde jeweils 10 °C unter der Schmelztemperatur des Primers vom Wildtypen gewählt und für 50 Sekunden gehalten. Die Polymerasereaktion fand bei 68 °C für 390 Sekunden statt. Es

wurden 18 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurden für 420 Sekunden bei 68°C angefangene Synthesen komplettiert. Den Reaktionsansätzen wurde, im Anschluss an die PCR, 2,5 U DpnI zugegeben, und die methylierte DNA für eine Stunde bei 37°C verdaut. Die gewonnenen Plasmide wurden in XL1-Blue-Zellen transformiert. Aus den Transformanten wurden die Plasmide isoliert und durch Sequenzierung die Mutation überprüft.

Im letzten Schritt muss die mutierte LmrA-Gensequenz in den Lactis-Expressionsvektor kloniert werden. Die LmrA-Sequenz lässt sich in beiden Vektoren mit den beiden Restriktionsenzymen XhoI und NcoI ausschneiden. Der Restriktionsverdau mit XhoI und NcoI ergab für pBad zwei Fragmente, der gewünschte Vektor von 3989 Basen und das Restfragment von 2153 Basen. Für pNHLmrA ergeben sich zwei Fragmente, bei dem 2159 Basen lange Fragment handelt es sich um das LmrA-Gen mit der Hexahistidin-Gensequenz. In einem Restriktionsansatz hydrolysierten jeweils 10 U der Restriktionsenzyme ungefähr 5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl im vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C für 2 h. Anschließend wurde eine Hitzinaktivierung bei 65°C für 20 Minuten durchgeführt. Die Proben wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die gewünschten Banden (mutierte LmrA-Gensequenz aus pBad und die Vektorsequenz des pNHLmrA) am UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurde das Gel-Extraktions-Kit „gel extraction“ der Firma Qiagen verwendet. Die Ligation des Gen-Fragments mit dem Vektorfragment erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase. Im gesamten Ansatz wurden 200 ng DNA eingesetzt, wobei das molare Verhältnis von Insert zu Vektor bei 3:1 lag. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer wurde 1U T4-Ligase eingesetzt. Nach 8 h wurde die Ligase durch Erwärmen auf 60°C für 20 Minuten inaktiviert. Das erhaltene Konstrukt wurde in *L. lactis*-Zellen transformiert und die erhaltenen Klone durch Plasmidisolierung und Sequenzierung überprüft.

2.5.3 RNA-Isolierung aus *L. lactis*

Für die Isolierung der kompletten *L. lactis*-RNA wurde das Qiagen NReasy Protect Bacteria Mini Kit verwendet. Laut Hersteller ist es möglich mit einer Säule bis zu 100 µg RNA zu isolieren, jedoch konnte im Laufe dieser Arbeit unter Verwendung von Zellen in der stationären Phase lediglich eine durchschnittliche Menge von 15 µg von einer Säule eluiert werden. Es wurde das Herstellerprotokoll befolgt und lediglich der Zell-Aufschluss variiert, in dem ein Lysozymverdau (20 mg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Ein zusätzlicher DNA-Verdau war nicht notwendig. Die Verwendung von größerer Bakterienzahl, sprich ein größeres Kulturvolumen als 5 ml bei einer optischen Dichte größer als 0,8 führte zu keiner höheren Ausbeute, sondern nur zu extremen DNA- und Protein-Verunreinigungen des Eluats. Die Qualität der RNA-Proben wurde zuerst anhand der Absorptionsspektren bewertet. Die Messungen wurden mit einem NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt. Als Kriterium für die Qualität wurden die Verhältnisse der Absorptionswerte 260/280 und 260/230 verwendet, beide Werte sollten ungefähr/größer als 2 entsprechen. Nachfolgend wurden die Proben zur weiteren Untersuchung mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer, der Gewinnung von mRNA und Illumina-Sequenzierung beim Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf abgegeben.

2.5.4 Protein-Analyse

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte, basierend auf der Färbereaktion nach Bradford, spektroskopisch mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Coomassie Plus Lösung. Es wurden 10 µl der zu vermessenden Probe in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 300 µl Coomassie Plus versetzt und die Absorption nach 10 Minuten bei 584 nm gemessen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung. Für die Bestimmung der Konzentration wurde eine BSA-Standardreihe angelegt und vermessen. Trägt man die Absorption der Standardreihe gegen die Konzentration auf, so ergibt sich ein linearer Abschnitt aus dem man eine Regressionsgerade (Gl.1) erstellen und die Konzentration der Probe bestimmen kann.

$$(1) \text{ Konzentration} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Absorption}_{\text{probe}} * Y - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}}$$

Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteoliposomen wurde der BCA-Test eingesetzt. Grundlage des BCA-Assays ist die Biuret-Reaktion nach der Proteine Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu zu Cu^{+} -Ionen reduzieren. Das Natrium-Salz der Bicinchoninsäure bildet mit Cu^{+} -Ionen einen purpurfarbenen Komplex, dass photometrisch durch die Absorption bei 562 nm detektiert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, und auch hier diente eine Konzentrationsreihe einer BSA-Lösung zur Kalibrierung.

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Expression, Reinheit und Zustand der Proteinproben wurden die Proteinproben einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot-Analyse detektiert. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, bei der die Proteine denaturiert werden und nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Proteine wandern zunächst durch ein Sammelgel, wo sie zunächst auf eine schmale Bande aufkonzentriert werden. Anschließend wandern sie durch das engmaschigere Trenngel wo die Auftrennung erfolgt. Für LmrA- und LmrCD-Proben wurden 10 %-Polyacrylamidgele verwendet bei Pdr5 7 %-ige.

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden 16 gesäuberte Glasplatten (10 cm x 8 cm) mit Abstandhaltern (1 mm Dicke) in einem Gießblock aufgeschichtet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 75 ml bestand aus 18,75 ml 4-fachem Trenngelpuffer, 30 ml Rotiphorese-Lösung (für ein 10%iges Gel) und Wasser. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 70 μl TEMED und 0,3 ml 10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) initiiert. Die Lösung wurde zwischen Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgel-Lösung hinzugegeben und Taschenformer zwischen die Glasplatten eingesetzt, so dass die Sammelgel-Lösung bis zum Rand reichte. Die Sammelgel-Lösung wurde aus 5,25 ml Acrylamid-Lösung (für ein 4,5%iges Gel), 8,75 ml 4-fach Sammelgelpuffer, 21 ml Wasser, 70 μl TEMED und 210 μl APS hergestellt. Nach Erstarren des

Sammelgels wurden die Gele aus dem Gießblock entfernt, in feuchte Zellstofftücher gewickelt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Es kann bis zu 20 µl Probenvolumen in eine Tasche aufgetragen werden, bevor dies mit einer Hamilton-Spritze erfolgte, wurden die Proben mit 5xProbenpuffer versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zusätzlich zu den Proben wurde 5 µl eines Größenstandards aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V bis zum Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem Gel.

Coomassie-Färbung zur Detektion der Proteinbanden

Zur Färbung wurde das Gel zwei Stunden lang in der Färbelösung geschwenkt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in Entfärbelösung gelegt, wobei die Lösung mehrmals ausgetauscht wurde.

Western-Blot (Immunodetektion)

Zunächst wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran durch das „Semi-dry“-Verfahren transferiert. Anhand der Lumineszenz aus der, von der Meerrettichperoxidase katalysierten, Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid lässt sich die zu detektierende Protein-Bande nachweisen. Die genaue Vorgehensweise entsprach dem folgenden Protokoll: Die Membran für einige Sekunden in Methanol aktivieren und anschließend in Blot-Puffer legen. Filter-Papiere werde ebenfalls in Blotpuffer eingetaucht um sich damit voll zu saugen. Es werden 4 Filter-Papiere auf die Anode der Blot-Apparatur gelegt, darauf die Membran anschließend das Gel und die restlichen Filter-Papiere. Hat man sichergestellt dass keine Luftbasen zwischen den Schichten sind kann man die Kathode anbringen und so die Apparatur schließen. Der Transfer erfolgt bei 100 mA, < 25 V für 1 Stunde für ein Gel. Anschließend wird die Membran zweimal für je 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS gewaschen. Um die restlichen Bindestellen auf der Membran zu belegen wird die Membran für eine Stunde bei RT in 3% BSA in TBS geschwenkt. Die Membran wird zweimal für je 10 Minuten mit TBST-Puffer und anschließend mit TBS gewaschen. Die Bindung des ersten Antikörpers bei einer 1:1000 Verdünnung in der Blocklösung erfolgt bei RT für eine Stunde bzw. über Nacht bei 4°C. Die

unspezifisch gebundenen Antikörper werden, durch zweimaliges Waschen für je 10 Minuten mit TBST und einmaliges Waschen mit TBS, entfernt. Die Bindung des Zweit-Antikörpers erfolgt ebenfalls innerhalb einer Stunde bei RT. Der Zweitantikörper ist gegen den konstanten Teil des Erst-Antikörpers gerichtet und ist seinerseits mit dem konstanten Teil an einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dieser Antikörper wird in einer 1:10000 Verdünnung in 10% Milchpulver in TBS eingesetzt. Anschließend wird die Membran viermal mit TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Es werden jeweils 200 µl der Lösung A und Lösung B des ECL Kits von Amershan Bioscience gemischt, gleichmäßig auf die Membran verteilt und die Chemilumineszenz detektiert.

2.5.5 Lipid-Analyse und Extraktion

Quantitative Phospholipidbestimmung

Die Konzentrationbestimmung von Phospholipiden basiert auf der Detektion von freiem Phosphat und wurde wie in [154] beschrieben durchgeführt. Proben wurden mit 200 µl Perchlorsäure (70 %) versetzt und in einem Reagenzröhrchen für 1 Stunde bei 200 °C verkocht. Nachdem Abkühlen wurden 500 µl 22 mM $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ in 12,5 % Perchlorsäure und 500 µl 100 mM Ascorbinsäure zugegeben und vermischt. Nach 5 Minuten bei 95 °C wurde die Absorption bei 810 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve zur Quantifizierung wurde eine NaH_2PO_4 -Lösung verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Für eine optimale Auftrennung muss die Atmosphäre des Chromatographietanks mit Fließmitteldämpfen gesättigt sein. Der Chromatographietank wurden am Vorabend mit Filterpapier ausgekleidet, und bis auf ca. 2 cm Höhe mit Laufmittel gefüllt und luftdicht verschlossen. Auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Fertigplatte wurden die Auftragungspunkte der Proben so wie die Laufrichtung mit einem weichen Bleistift markiert. Jeweils 10 µl einer Lipid-Suspension und 20 µl einer Proteinprobe wurden in einem ausreichenden Abstand zueinander und mit einem Mindestabstand von 3 cm vom Rand der Platte aufgetragen und unter dem Abzug bis zur Trocknung aufbewahrt. Die Platten wurden dann senkrecht in den mit Fließmittel beladenen Chromatographietank gelegt und der Lauf

beendet wenn die Lauffront beinahe den oberen Rand erreicht hat (meist ca. 2,5 Stunden). Anschließend wurden die Platten bis zur Geruchlosigkeit unter dem Abzug getrocknet und für 10 - 20 Minuten mit Jod gefärbt. Dazu wurde zuvor eine Spatel-Spitze Jod in einem Chromatographietank gegeben und zur Sublimation gebracht. Sobald der Tank vollständig mit Jod-Dampf beladen war, konnte es zur Färbung verwendet werden. Die auf den Platten sichtbaren braunen Banden wurden mit einem weichen Bleistift umrandet, da die Färbung reversibel ist und die Platten abfotografiert.

Lipid-Extraktion

Die Extraktion von *L. lactis*-Lipiden erfolgte nach dem in [125] beschriebenen Protokoll. *L. lactis*-Zellen mit einem Nassgewicht von ca. 100 g wurden in 100 ml 20 mM Hepes mit einem pH-Wert von 7 resuspendiert und 30 Minuten bei 37 °C mit Lysozym (10 mg/ml) und DNase (100µg/ml) inkubiert. Um die Oxidation der Lipide zu verhindern wurden die nachfolgenden Schritte möglichst unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff) durchgeführt. Die Lipide wurden mit 200 ml Chloroform und 400 ml Methanol für 16 Stunden bei 4 °C unter Rühren extrahiert. Um unlösliche Partikel zu entfernen wurde nach Absetzen dieser der Überstand vorsichtig abgesaugt. Weitere 200 ml Chloroform und 200 ml Wasser wurden der Lösung zugegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasentrennung erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Chloroform-Phase wurde abgetrennt, und das Chloroform unter Verwendung eines Rotationsverdampfers vollständig entfernt, so dass ein dünner Lipidfilm entstand. Die Lipide wurden in Puffer (50 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerol) gelöst und eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt. Die Lipid-Suspension wurde in Aliquote von 1,5 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6 Expression von Membranproteinen in *L. lactis* und Präparation von Membranvesikeln

Expression

Zwei Liter M17-Medium mit 5 µg/ml Chloramphenicol und 0,5 % Glucose wurden mit der entsprechenden Übernachtskultur auf eine optische Dichte (660 nm) von 0,2 in einem 5L-Kolben angeimpft. Das Wachstum bei 30°C wurde anhand der Änderung der optischen Dichte verfolgt. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,8-1 (meist nach 2-2,5 Stunden) wurde die Expression von LmrA/LmrCD durch Zugabe von Nisin (25 µg/l Endkonzentration) induziert und die Kulturen bei 100 UPM geschüttelt. Nach 2 Stunden wurden die Kulturen zunächst für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und dann für 15 Minuten bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM Hepes-Lösung pH 7,4 wurde das Zellpellet in 0,7 % des Kulturvolumens 50 mM Hepes pH 7,4 resuspendiert und in Aliquote, die einem Kulturvolumen von 2 l entsprechen, tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Präparation von Membranvesikel

Die aus einem Kulturvolumen von 8 l erhaltenen bei -80°C gelagerten *L. lactis* wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 mg/ml Lysozym versetzt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend wieder auf Eis abgekühlt und mit EDTA auf eine Endkonzentration von 4 mM versetzt. Der Aufschluss erfolgte mittels einer fünfmaligen Passage durch einen auf 4 °C gekühlten „Cell Disruptor“ (Constant Systems) bei einem Druck von 2,5 kbar. Intakte Bakterien und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugationsschritte von 45 Minuten bei 13000 g und 4°C sowie von 30 Minuten bei 20000 g und 4°C entfernt. Der Überstand wurde zur Sedimentierung der Membranen für 60 Minuten bei 125000 g und 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Membranpellets wurden bei 4°C in 5 ml 50 mM Hepes pH 7,4, 10% (v/v) Glycerin unter Verwendung eines Potters homogenisiert. Die Proteinkonzentration der Suspension wurde ermittelt, und auf eine Proteinkonzentration von ungefähr 20 mg/ml eingestellt. Es wurden 500 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.7 Expression von Pdr5 und Präparation von Plasmamembranvesikel aus *S. cerevisiae*

Expression von Pdr5

Zellen aus einer Kryokultur wurden zuerst auf eine YPD-Agar Platte ausgestrichen und bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Vorkulturen wurden mehrere 100 ml YPD-Medium mit einigen Kolonien angeimpft und über Nacht bei 30 °C und Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Hauptkultur betrug meist 2 l, wobei ein Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 5 l verwendet wurde. Die Kulturen wurden mit der ÜN-Kultur auf eine optische Dichte von 0,05 angeimpft und bei einer Temperatur von 25 °C unter ständigem Schütteln (200 rpm) kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,5 wurden 200 ml Boost-Medium zugegeben. Bei einer OD₆₀₀ von 3,5 wurden die Zellen geerntet, dazu wurden sie bei 8000 X g zentrifugiert und mehrmals (2-3-mal) mit Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert.

Präparation von Plasmamembranvesikel

Die Präparation wurde wie in [85] beschrieben durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden vorgekühlt und die Probe stets auf Eis aufbewahrt. Bei einer typischen Präparation wurden Zellen aus einem Kulturvolumen von 4 l in MQ resuspendiert (ca. 84 ml Gesamtvolumen) mit 5 ml 1 M Tris-Acetat pH 7,5, 1 ml 0,5 M EDTA sowie 2 Tabletten eines Protease-Inhibitor-Mix (Roche) versetzt und in das Gefäß des Bead-Beaters mit gekühlten Glaskugeln gefüllt. Die Zellen wurden im Kühlraum unter Eiskühlung 10-mal für 10 Sekunden mit einer jeweiligen Pause von 10 Sekunden aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Glaskugeln unter Verwendung einer Glasfritte abgetrennt und mit wenig TAE-Puffer Probenreste von den Glaskugeln gespült. Im Anschluss wurden intakte Zellen, Zelltrümmer und andere Bestandteile durch differenzielle Zentrifugation entfernt (5 Min bei 1000 X g und 5 Min bei 3000 X g). Die Membranen wurden dann bei 20 000 X g und 4 °C für 40 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in TAE-Puffer (mit Protease-Inhibitor-Mix) gelöst und auf eine Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml eingestellt (Volumen betrug meist um die 7 ml). Im nächsten Schritt wurden die Mitochondrien ausgefällt, dazu wurde der pH- Wert der Suspension mit 1 M Tris-Acetat-Lösung (pH 5,2) auf 5,2 gebracht und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 6900 X g entfernt. Der Überstand wurde anschließend mit einer 2,5 M Tris-

Acetat-Lösung (pH 7,5) auf einen pH-Wert von 7,5 gebracht. Die Plasmamembranen wurden schließlich durch Zentrifugation bei 26 500 X g für 30 Min pelletiert. Das Pellet wurde in, mit Protease-Inhibitor-Mix (1 Tablette in 50 ml Puffer) versetzte, 50 mM Hepes-Lösung (pH 7,5) resuspendiert, wobei die Suspension auf eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml eingestellt wurde. Die Proben wurden in 500 µl-Aliquote in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.8 Isolierung von LmrA und Herstellung von Proteoliposomen

Isolierung von LmrA

Die Membransuspension wurde auf Eis aufgetaut, anschließend wurde der Suspension Detergenz, mit einem Protein-Detergenz-Verhältnis von 1,5:1, zugesetzt und für 30 Minuten bei 4°C die Proteine solubilisiert. Die Suspension wurde zur Abtrennung der nicht gelösten Bestandteile für 30 Minuten bei 125000 g und 4°C zentrifugiert. Die Isolierung von LmrA aus dem erhaltenen Solubilisat erfolgte unter Ausnutzung des N-terminalen Hexa-Histidin-Tags mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Damit das Membranprotein in Lösung gehalten werden konnte und nicht während der Isolierung ausfällt, wurde allen Puffern die 2,5-fache kritische Mizellen-Konzentration (0,03 mM bei FC16 und 4,5 mM bei DDM) des bei der Solubilisierung verwendeten Detergenzes zugesetzt. Die HiTrap Chelating Säule wurde mit Zink-Ionen beladen und mit Auftragungspuffer äquilibriert. Das aus einem Kulturvolumen von 2 l erhaltene Solubilisat wurde bei einer Flussrate von 0,2 ml/min auf eine 1-ml-Säule aufgetragen. Es wurde solange mit Auftragungspuffer gewaschen bis die Absorption bei 280 nm des Durchflusses einen konstant niedrigen Wert erreicht hat. Im Anschluss wurden mit Waschpuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min schwach- bzw. unspezifisch-gebundene Proteine entfernt. Die Elution von LmrA erfolgte dann bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Das Protein wurde bei 4 °C gelagert und direkt im Anschluss ein Teil für die Messung der ATPase-Aktivität verwendet und der andere Teil rekonstituiert.

Rekonstitution von LmrA

Die Rekonstitution von LmrA in Proteoliposomen erfolgte in Anlehnung an die bereits beschriebenen Protokolle [108, 155].

Der polare Lipidextrakt aus *E. coli* liegt zunächst in Chloroform gelöst vor, daher wurde im ersten Schritt das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationverdampfers entfernt und der entstandene dünne Lipidfilm getrocknet. Lipide sind licht- und sauerstoffempfindlich und sollten daher möglichst lichtgeschützt unter einer Inertgas-Atmosphäre bei der Präparation gehalten werden. Der Lipidfilm sollte frei von Lösungsmittelrückständen sein um gut in Puffer (50 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerol) gelöst werden zu können. Im Falle vom *E. coli*- Lipidextrakt, der als Feststoff vorliegt, wurden die Lipide direkt in Puffer gelöst. Es wurde eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt, in 1-ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Durch dreimaliges Auftauen bei Raumtemperatur und wieder Einfrieren in flüssigem Stickstoff entstehen große multilamillare Vesikel. Die Lipide wurden im Anschluss auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt. Nach dreizehnmaligem Extrudieren durch Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 200 nm bilden sich die benötigten unilamillaren Vesikel. Damit sich LmrA einlagern kann, müssen die Vesikel durch Detergenz destabilisiert werden. Die dafür notwendige Detergenz-Menge wurde durch Titration ermittelt. Dazu wurde einer Lipid-Probe das bei der Protein-Isolierung verwendete Detergenz in 0,1-mM-Schritten zugesetzt und die optische Dichte bei 540 nm gemessen. Auf diese Weise konnten die charakteristischen Werte R_{sat} und R_{sol} bestimmt werden. Für einen typischen Rekonstitutionsansatz wurde eine Suspension (16 mg) aus unilamillaren Vesikeln mit Detergenz, bei einer Konzentration die etwas über dem zuvor bestimmten R_{sat} -Wert liegt, versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren destabilisiert. Anschließend wurde das isolierte Protein mit einem Protein-Lipid-Verhältnis zwischen 1:30 und 1:100 zugegeben und für weitere 2 Stunden bei 4 °C unter vorsichtigem Rühren inkubiert. Das Detergenz wurde durch Zugabe von BioBeads entfernt. Hierzu wurden zunächst 80 mg BioBeads pro ml Probe zugegeben und weiterhin unter Rühren bei 4 °C inkubiert, nach 1 Stunde wurden zusätzlich 100 mg BioBeads pro ml Probenvolumen hinzugegeben. Nach 40 Stunden wurden die BioBeads abgetrennt und die Probe auf das 10-fache Volumen mit dem oben genannten Puffer verdünnt. Die Proteoliposomen wurden im Anschluss durch einen Zentrifugations-Schritt bei 125 000 x g bei 4 °C für eine Stunde

pelletiert und in einem kleinerem Volumen der einer Lipid-Konzentration von 8 mg/ml, bei 100 %-igen Lipid-Ausbeute entsprechen würde, aufgenommen. Ungelöste Partikel wurden durch Zentrifugation bei 13 000 x g und 4 °C für 15 Minuten entfernt. Die Aktivitätsmessungen wurden möglichst am selben Tag durchgeführt und die Proben zwischenzeitlich auf Eis aufbewahrt.

2.9 Bestimmung der Aktivität von ABC-Transportern

2.9.1 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von LmrA erfolgte durch Messung des freigesetzten anorganischen Phosphats. Die Reaktion wurde nach unterschiedlichen Zeiten durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure gestoppt und die Menge an freigesetzten Phosphat-Ionen durch Komplexbildung mit einer Malachitgrün-Ammoniummolybdat-Lösung spektroskopisch bestimmt [156]. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 200 µl und bestand aus, je nach Aktivität des Proteins, 0,1 bis 2 µg Protein in dem jeweiligen Lagerungspuffer bzw. Puffer für die Messung der Transportaktivität und der zu testenden Substanz. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP mit einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Direkt nach Zugabe des ATP ($t = 0$) und zu zwei weiteren Zeitpunkten wurden zwei 25-µl-Proben entnommen und die Reaktion durch die Stopp-Lösung (10 mM Schwefelsäure) beendet. Zur Bestimmung einer Eichgerade wurden zweimal je 25 µl einer Natriumdihydrogenphosphat-Lösung mit Konzentrationen von 200, 100, 50, 25, 12,5, und 0 µM mit je 175 µl 10 mM Schwefelsäure gemischt. Nach Beendigung aller Reaktionen wurden die Ansätze mit je 50 µl frisch angesetzter Malachitgrün-Lösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Minuten wurden die Absorptionen der Ansätze bei 620 nm gemessen. Die Steigung der Eichgerade wurde aus den Absorptionswerten des Natriumphosphatstandards mittels linearer Regression bestimmt. Anhand von Gleichung (2) wurden die spezifischen ATPase-Aktivitäten der untersuchten Proben in µmol freigesetztem Phosphat pro Minute und pro mg Protein errechnet.

$$(2) \text{ Aktivität} = \frac{\frac{Abs(Protein)_t - Abs(Protein)_{t=0}}{Steigung} - \frac{Abs(Kontrolle)_t - Abs(Kontrolle)_{t=0}}{Steigung}}{Proteinmenge * Zeit}$$

2.9.2 Bestimmung der Transport-Aktivität von LmrA

Messung der *in vivo* Transport-Aktivität

L. lactis-Kulturen die LmrA expremiert haben (siehe 2.6) wurden mindestens für 20 Minuten auf Eis abgekühlt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. 1 ml der Kultur (OD-Wert ca. 1,5) wurde für 8 Minuten bei 8000 x g pelletiert und 2-mal durch Resuspendieren und Pelletieren zur Entfernung von Medium-Resten mit De-energetisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut in De-energetisierungspuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4-mal mit Puffer (50mM Hepes-Puffer pH 7,4) gewaschen und schließlich in 100 µl Puffer aufgenommen. Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden mit 950 µl Puffer und der zu testenden Substanz vermischt und bei 30 °C inkubiert. Die Aktivierung des Transports wurde durch Zugabe von 50 µl einer 40 %-igen Glukose-Lösung realisiert. Das Ethidium wurde mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm (Spaltbreite 2 nm) angeregt und das Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 590 nm (Spaltbreite 4 nm) detektiert. Die restlichen 50 µl der Zellsuspension wurden im Anschluss analog vermessen, nur das hierbei keine Testsubstanz zugegeben wurde. Nach Glukose-Zugabe steigt das Fluoreszenzsignal an und erreicht ein stabiles Niveau. Diese Fluoreszenzintensität dient der Quantifizierung der Aktivität, wobei die Signalintensität bei den Messungen ohne Testsubstanz als 100 % gesetzt wurde. Als Kontrollen dienten Messungen mit gleichbehandelten Zellen die E512Q-LmrA expremierten oder lediglich den leeren Expressionsvektor besitzen.

Messung der *in vitro* Transport-Aktivität

Für den LmrA-vermittelten Rhodamin 123-Transport wurden Proteoliposomen verwendet. Als Transportpuffer wurde hier der Puffer verwendet, in dem die Proteoliposomen zuvor aufgenommen wurden, wobei zusätzlich Magnesiumchlorid mit einer Endkonzentration von 5 mM und 500 nM Rhodamin 123 zugesetzt wurden. Nach dem Mischen wurden die Messungen gestartet. Die Messungen fanden bei 30 °C unter Rühren statt. Rhodamin 123 wurde mit Licht einer Wellenlänge von 501 nm (Spaltbreite 1 nm) angeregt und die Emission bei 524 nm (Spaltbreite 1 nm) aufgenommen. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden

die Liposomen mit Transportpuffer vermengt und einige Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Erreichen einer stabilen Fluoreszenzintensität wurde durch Zugabe von 4 µmol ATP der Transport aktiviert. Ähnlich wie bei Rhodamin 6G kommt es dabei zu einer Verringerung der Signalintensität.

2.9.3 Bestimmung der Transport-Aktivität von LmrCD

Für die Messung der Transport-Aktivität von LmrCD wurden isolierte Membranvesikel aus *L. lactis*-Zellen die LmrCD exprimierten verwendet (siehe Abschnitt 2.6). Die Messungen wurden wie in [157] beschrieben durchgeführt. Bei diesem Assay macht man sich die physikalischen Eigenschaften des Substrats Hoechst 33342 zunutze. Hoechst 33342 fluoresziert lediglich in hydrophober Umgebung, so dass dessen LmrCD-vermittelter Transport aus der hydrophoben Membran in die wässrige Phase durch ein Abfall des Fluoreszenzsignals detektiert werden kann [126]. Die Quantifizierung der Transport-Aktivität erfolgte analog zu der von Pdr5 (siehe 2.9.4 und [85]).

Membranvesikel (0,3 - 0,5 mg Gesamtprotein) wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Transportpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 2 mM MgSO₄, 2 mM MgCl₂, 0,5 µM Hoechst 33342) und gegebenenfalls 30 µM der zu testenden Substanz in einer Küvette vermengt. Nach wenigen Minuten wurde die Messung bei 30 °C gestartet. Der Fluorophor wurde mit Licht der Wellenlänge von 355 nm angeregt und die Emission bei 457 nm detektiert. Nach Erreichen eines stabilen Fluoreszenzsignals wurde durch Zugabe von 5 µmol ATP der Transport gestartet.

2.9.4 Bestimmung der Transport-Aktivität von Pdr5

Zur Bestimmung der Transport-Aktivität von Pdr5 wurden wie bei der Messung der ATPase-Aktivität Plasmamembranvesikel verwendet. Sowohl die Durchführung als auch Quantifizierung waren bereits etabliert und sind in [85] nachzulesen. Als Transport-Substrat diente der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G, dessen Bildung von nicht-fluoreszierenden Eximeren bei hoher Konzentration ausgenutzt wird. Am Anfang der Messung kommt es zu

einem Gleichgewicht zwischen den Rhodamin-Molekülen in der wässrigen Phase und den in der Lipidschicht der Probe so dass ein stabiles Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Durch die Transport-Aktivität von Pdr5, die durch Zugabe von ATP aktiviert wird, werden Rhodamin-Moleküle in das Lumen der Vesikel transportiert so dass es zur zuvor genannten Eximerenbildung kommt. Dies kann anhand des Abfalls der gemessenen Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die Rate mit der die Fluoreszenz abnimmt kann zur Quantifizierung verwendet werden. Wird der Transporter inhibiert so kommt es zu einer geringeren Rate des Fluoreszenzabfalls, so lässt sich bezogen auf die Steigung ohne Zugabe eines Inhibitors eine relative Transport-Aktivität in Prozent angeben. Um sicher zu stellen dass die berechneten Steigungen stets den Transport zum selben Zeitpunkt erfassen, wurde einheitlich immer eine Minute nach Zugabe von ATP ein Zeitfenster von 100 Sekunden zur Bestimmung der Steigung verwendet.

Die Vesikel wurden auf Eis aufgetaut und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt. 970 µl des bereits auf 35 °C temperierten Assay-Puffers (50 mM Hepes pH 7,0, 5 mM MgCl₂ und 150 nM Rhodamin 6G) wurden in eine Küvette gegeben und 30 µl der Vesikel-Suspension und gegebenenfalls 5 µM der zu testende Substanz hinzugefügt. Die Küvette wurde in den Probenhalter eines Fluoreszenzspektrometers gestellt, und die Messungen bei 35 °C und unter Rühren durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 529 nm und es wurde Licht der Wellenlänge von 553 nm detektiert, wobei einer Integrationszeit von 2 Sekunden und einer Messdauer von meist 2000 Sekunden eingestellt wurde. Nach dem Start der Messung wurde erst ein stabiles Fluoreszenzsignal abgewartet bevor der Transport durch Zugabe von 10 µmol ATP gestartet wurde.

2.10 Mikroskopie

Poly-L-Lysin-Beschichtung der Deckgläschen

- 30 Minuten mit einer 12%-igen HCl-Lösung waschen
- 2x10 Minuten mit Wasser waschen
- 15 Minuten mit absolutem Ethanol waschen
- Trocknen
- Über Nacht bei 4°C mit einer 0,025%-igen Poly-L-Lysin-Lösung inkubieren
- 3x10 Minuten mit Wasser waschen
- Trocknen und bei 4°C lagern

Herstellung der Mowiol-Lösung:

Die Herstellung der Mowiol-Lösung erfolgte nach Herstellerangaben. Dazu wurden 6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol4-88 bei Raumtemperatur für eine Stunde unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 6 ml dest. Wasser für eine weitere Stunde gerührt. Es wurden dann 12 ml einer 0,2 M Tris-HCl-Lösung zugegeben und die Lösung für 2 Stunden bei 50 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Lösung alle 20 Minuten für 2 Minuten auf einem Magnetrührer gemischt. Im Anschluss wurde das nichtgelöste Mowiol durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 Minuten abgetrennt, die Lösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Proben werden auf die mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen gegeben, mit eisgekühltem Ethanol überschichtet und für 15 Min bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden Ethanolreste und nicht-fixierte Zellen durch mehrmaliges Schwenken in Wasser entfernt. Im Falle von Präparaten bei denen zusätzlich eine Färbung mit DAPI benötigt wurde, wurden die Deckgläschen für 2 Min in einer 1 mM Lösung des Fluorophors gelegt und im Anschluss mit Wasser gewaschen. Die Präparate wurden mit Mowiol eingedeckelt, mit farblosem klarem Nagellack luftdicht verschlossen und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Leica Mikroskop mit einem 100x-Immersionsöl-

Objektiv verwendet. Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurde ein Zeiss-Mikroskop LSM 510 mit einem Olympus UPLSAPO 60x NA 1,3 Immersionsöl-Objektiv verwendet. Die Anregung von Ethidium erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm und die Emission wurde bei 565-634 nm detektiert. Die Einstellungen für die Anregungsintensität und Detektionsdauer wurden so gewählt dass das Präparat das die höchste Fluoreszenz aufweist (E512Q ohne Glukose-Behandlung) kein überbelichtetes Bild ergab. Die Einstellungen wurden für alle Bilder beibehalten.

Rasterelektronenmikroskopie

Die mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen wurden in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gelegt. Jeweils 1 ml der *L. lactis*-Kulturen wurden durch Zentrifugieren bei 6000 g isoliert, mit 50 mM Hepes pH7 gewaschen, auf ein vorbereitetes Deckgläschen pipettiert und vorsichtig mit Fixierungspuffer (2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2) überschichtet. Die Fixierungsdauer betrug 30 Minuten. Der Fixierungspuffer wurde mit 0,1 M PBS-Puffer pH 7,4 abgewaschen, dazu wurde mehrmals die Lösung abgenommen und frischer Puffer dazugegeben. Eine Austrocknung der Proben sollte vermieden werden. Für die Entwässerung der Präparate wurde eine Aceton-Reihe verwendet:

- 3x10 Minuten 10% Aceton
- 1x5 Minuten 30% Aceton
- 1x5 Minuten 50% Aceton
- 1x5 Minuten 70% Aceton
- 2x5 Minuten 90% Aceton
- 2x5 Minuten 100% Aceton

Diese Schritte sollten dazu dienen jegliches Wasser der Probe durch Aceton auszutauschen, so dass die schonende Kritische-Punkt-Trocknung erfolgen kann. Dazu wurde das Gerät Leica EM CDP030 benutzt. Für die Goldbeschichtung wurde das Cressington Sputter 108Auto verwendet. Die Präparate wurden mit einem Jeol Rasterelektronenmikroskop JSM 35 CF betrachtet und Bilder angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der ATPase-Aktivität von LmrA

3.1.1 Einfluss der Umgebung auf die ATPase-Aktivität

Die gemessene Aktivität eines Proteins hängt von zahlreichen Parametern ab, wobei nicht nur die Reaktionstemperatur und die Pufferbedingungen von Bedeutung sind. Bei Membranproteinen spielt es zusätzlich eine Rolle, ob diese in einer Membran oder in einer Detergenzmizelle eingebettet sind. Um dies zu untersuchen wurde die Kinetik der ATP-Hydrolyse von LmrA betrachtet. Dabei wurde die Aktivität von LmrA in einer Detergenzmizelle und in Proteoliposomen verglichen. In einer vorherigen Arbeit konnte bereits festgestellt werden, dass LmrA vorwiegend unter Verwendung von zwitterionischen Detergenzien effektiv unter Erhalt seiner ATPase-Aktivität aus der Membran solubilisiert und isoliert werden kann [158]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) als auch FosCholin 16 (FC16) sich für die Isolierung von LmrA bewährt haben. In Abbildung 6 ist die ATPase-Aktivität von LmrA in Abhängigkeit der ATP-Konzentration dargestellt, wobei DDM als Detergenz verwendet wurde. Die gemessenen Daten lassen sich mit einer Michaelis-Menten-Gleichung gut beschreiben, sodass die $V_{\max}$ - und K_m -Werte bestimmt werden konnten (Tabelle 1). Vergleicht man die beiden Messreihen so kann man feststellen, dass LmrA erwartungsgemäß in einer Lipid-Umgebung eine wesentlich höhere ATPase-Aktivität aufweist ($V_{\max} = 128,4 \pm 6,8 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$) als in einer DDM-Mizelle ($V_{\max} = 26,8 \pm 3,9 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$). LmrA in Proteoliposomen kann eine fünffach höhere Aktivität als in einer DDM-Mizelle erreichen. Auch die ermittelten K_m -Werte weisen einen erheblichen Unterschied auf, so beträgt dieser Wert für solubilisiertes LmrA $1,8 \pm 0,5 \text{ mM}$, während für das rekonstituierte LmrA ein Wert von $0,6 \pm 0,1 \text{ mM}$ ermittelt wurde. Folglich benötigt LmrA in einer DDM-Mizelle eine dreifach höhere ATP-Konzentration, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

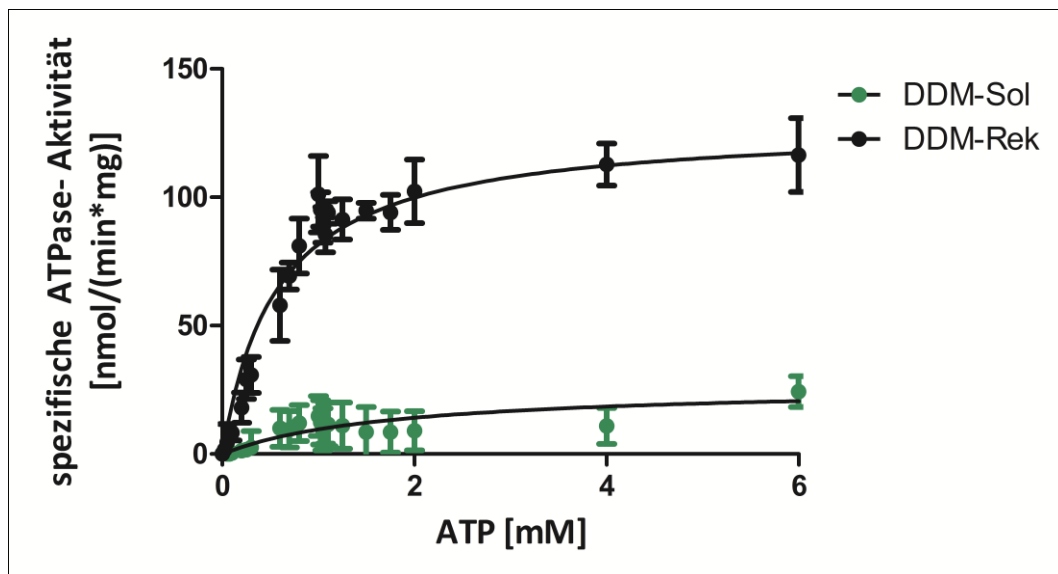


Abbildung 6: Spezifische ATPase-Aktivität von LmrA in Abhängigkeit der ATP-Konzentration unter Verwendung von DDM. In schwarz: ATPase-Aktivität von LmrA in Proteoliposomen wobei DDM bei der Isolierung und der Destabilisierung der Liposomen verwendet wurde. In grün: ATPase-Aktivität von LmrA in DDM-Mizellen.

Analog zu den Messreihen mit DDM wurde auch FC16 als Detergenz verwendet (Abb. 7). Im Gegensatz zu den Messungen mit DDM zeigt LmrA in einer FC16-Mizelle eine hohe Aktivität mit einem ermittelten $V_{\max}$ -Wert von $125,6 \pm 8,9$ nmol/(mg*min), während das rekonstituierte Protein einen $V_{\max}$ -Wert von $60,3 \pm 8,8$ nmol/(mg*min) aufweist. Auch sind die K_m -Werte mit $0,4 \pm 0,1$ mM für LmrA in einer FC16-Mizelle und $3,0 \pm 0,8$ mM für LmrA in Proteoliposomen nicht im selben Bereich. Die Tatsache, dass LmrA in einer FC16-Mizelle eine doppelt so hohe ATPase-Aktivität aufweist als in einer Lipidumgebung entspricht nicht der Erwartung. Das rekonstituierte LmrA benötigt eine 7,5-fach höhere ATP-Konzentration für die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen mit LmrA in einer FC16-Mizelle.

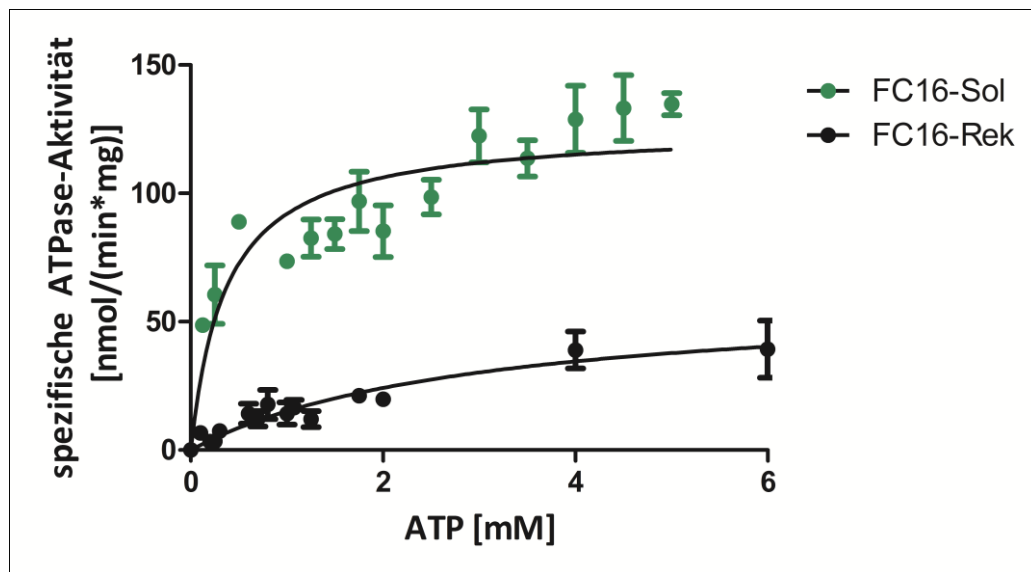


Abbildung 7: Spezifische ATPase-Aktivität von LmrA in Abhängigkeit der ATP-Konzentration unter Verwendung von FC16. In schwarz: ATPase-Aktivität von LmrA in Proteoliposomen wobei FC16 bei der Isolierung und der Destabilisierung der Liposomen verwendet wurde. In grün: ATPase-Aktivität von LmrA in FC16-Mizellen.

Die Kinetik der ATP-Hydrolyse von LmrA wurde auch in isolierten Membranvesikeln untersucht (Abbildung 8). Dafür wurden isolierte Membranvesikel aus Zellen, die wt-LmrA und aus Zellen die E512Q-LmrA expremiert haben, vermessen. E512Q-LmrA ist eine ATPase-inaktive Mutante von LmrA, sodass die Aktivität dieser Membranvesikel zur Bestimmung der Hintergrund-ATPase-Aktivität diente. Anhand einer SDS-PAGE (Abbildung 8B) kann man erkennen, dass das Expressionsniveau bei wt- (Probe 3) und E512Q-LmrA-Expression (Probe 1) vergleichbar ist. Ebenfalls ist die Ausbeute an LmrA nach der Isolierung mittels IMAC in beiden Fällen mit ca. 1 mg Protein pro Liter Kulturvolumen identisch. Verwendet man für die Berechnung der spezifischen ATPase-Aktivität die Gesamtproteinmenge der Membranvesikel und zieht die Aktivität von Membranvesikeln mit E512Q-LmrA ab, so erhält man die in Abbildung 8 in grau dargestellten Messpunkte (wt-Membran), aus den sich die Michaelis-Menten-Konstanten $V_{\max} = 92,0 \pm 4,1 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ und $K_m = 0,7 \pm 0,1 \text{ mM}$ ermitteln lassen. Um aus der Membranvesikel-Aktivität mit wt-LmrA die spezifische LmrA-Aktivität errechnen zu können, bedarf es einer Abschätzung der LmrA-Menge in den Vesikeln. Für das verwendete Expressionssystem wurde berichtet, dass rund 30 % des Proteinsgehalts in der Membran LmrA ist [33]. Legt man diesen Wert zugrunde, so ergibt sich die Aktivität von LmrA in Membranvesikeln mit einem $V_{\max}$ -Wert von $306,6 \pm 13,7 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ und einem K_m -Wert von $0,7 \pm 0,1 \text{ mM}$.

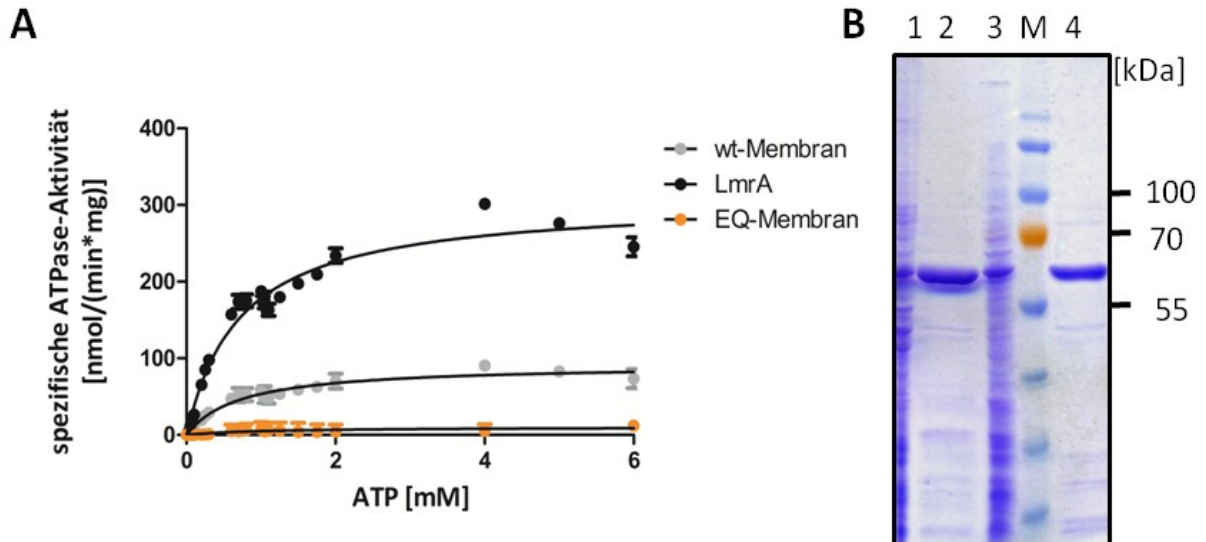


Abbildung 8: Spezifische ATPase-Aktivität von LmrA in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln (A). Die Aktivität von Membranvesikel-Suspensionen aus *L. lactis* mit E512Q-LmrA-Expression (orange), Aktivität bei wt-LmrA-Expression (grau) und korrigierte Aktivität unter der Annahme, dass LmrA 30 % des Membranproteins darstellt. Die an den Messpunkten angepasste Kurve in grau geht von einer Michaelis-Menten-Kinetik aus. SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proben der isolierten Membranvesikel (B). Aufgetragen wurden die Membran-Suspensionen bei E512Q-LmrA-Expression (1) und wt-LmrA-Expression (3) und in den jeweiligen Laufspuren 2 und 4 Proben des mittels IMAC daraus isolierten LmrA. In der mit M bezeichneten Spur ist der Proteinstandard aufgetragen. Das Pfeil markiert die Position LmrA-Banden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass LmrA in einer DDM-Mizelle eine sehr geringe Aktivität aufweist ($V_{\max} = 27 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$), hingegen jedoch nach Rekonstitution in Liposomen eine deutlich höhere Aktivität besitzt ($V_{\max} = 128 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$). Unter Verwendung von FC16 als Detergenz ergab sich das gegenteilige Bild, bei dem LmrA in einer FC16-Mizelle eine höhere Aktivität aufwies ($V_{\max} = 126 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$). Eine graphische Übersicht dieser Beobachtungen ist in Abbildung 9 dargestellt.

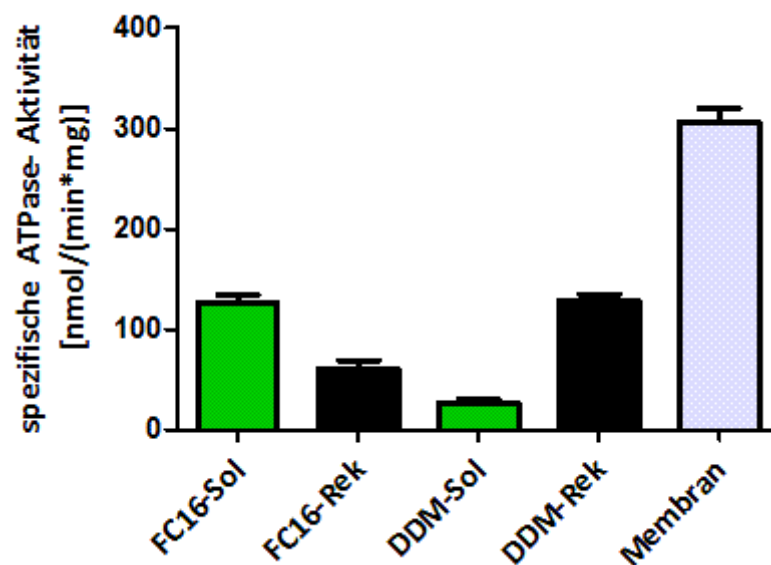


Abbildung 9: Übersicht der $V_{\max}$ -Werte der ATPase-Aktivität von LmrA in unterschiedlichen Umgebungen. Grau: aus *L. lactis*-Zellen isolierte Membranvesikel, schwarz: in Proteoliposomen und grün: in einer Detergenzmizelle.

Tabelle 1: Berechnete Michaelis-Menten-Konstanten für die Kinetik der ATPase-Aktivität von LmrA

		$V_{\max}$ [nmol/(mg * min)]	K_m [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]
Solubilisiert	FC16	125,6 ± 8,9	0,4 ± 0,1	8,2 ± 0,6
	DDM	26,8 ± 3,9	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3
Proteoliposomen	FC16	60,3 ± 8,8	3,0 ± 0,8	3,4 ± 0,5
	DDM	128,4 ± 6,8	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,4
Membranvesikel		306,6 ± 13,7	0,7 ± 0,1	-

Vergleich der isolierten LmrA-Proben

Wie bereits oben beschrieben unterscheidet sich die ATPase-Aktivität von LmrA je nachdem ob es sich in einer FC16- oder DDM-Mizelle befindet erheblich. Eine naheliegende Erklärung dafür ist, dass unter Verwendung DDM LmrA vorwiegend als Monomer vorliegt, während bei FC16 vorwiegend der dimere Zustand erhalten bleibt. Aus diesem Grund wurden die beiden Proben mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 10). Für beide Detergenzien fällt auf, dass LmrA in einem relativ großen Volumenbereich eluiert (ca. 30 ml), wobei dies für DDM um ca. 8 ml zu höherem Elutionsvolumen verschoben ist. Diese

Verschiebung zu kleinerem Molekulargewicht unter Verwendung von DDM im Vergleich zu FC16 ist bereits in einer anderen Arbeit beobachtet worden [158]. Sowohl bei der Probe mit FC16 als auch mit DDM kann man erkennen, dass es sich aufgrund der Auftrennung in zwei Peaks um keine homogene Probe handelt. Die Auftrennung ist bei der FC16-Probe deutlicher zu erkennen, wobei der erste Peak ein Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von ca. 40 ml aufweist und der zweite bei 45 ml. Bei der LmrA-Probe mit DDM ist der erste Peak bei einem Elutionsvolumen von 42 ml und ein zweites Maximum bei 51 ml zu beobachten. In der genannten Arbeit [158] ist die Größenausschlusschromatographie nach einem Tag und nach 7 Tagen Lagerung durchgeführt worden, wobei für beide Detergenzien nach 7 Tagen Lagerung ein symmetrischer Hauptpeak zu sehen ist. In dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen direkt nach der IMAC durchgeführt, und sind daher nicht direkt vergleichbar. Weiterhin kann man erkennen, dass das Verhältnis, indem die beiden Spezies (jeweils Peak 1 und 2) in der Probe vorliegen, bei den beiden Detergenzien unterschiedlich ist. Während bei FC16 Peak 1 eine höhere Absorption besitzt, ist es bei DDM der zweite Peak, der einen höheren Anteil ausmacht.

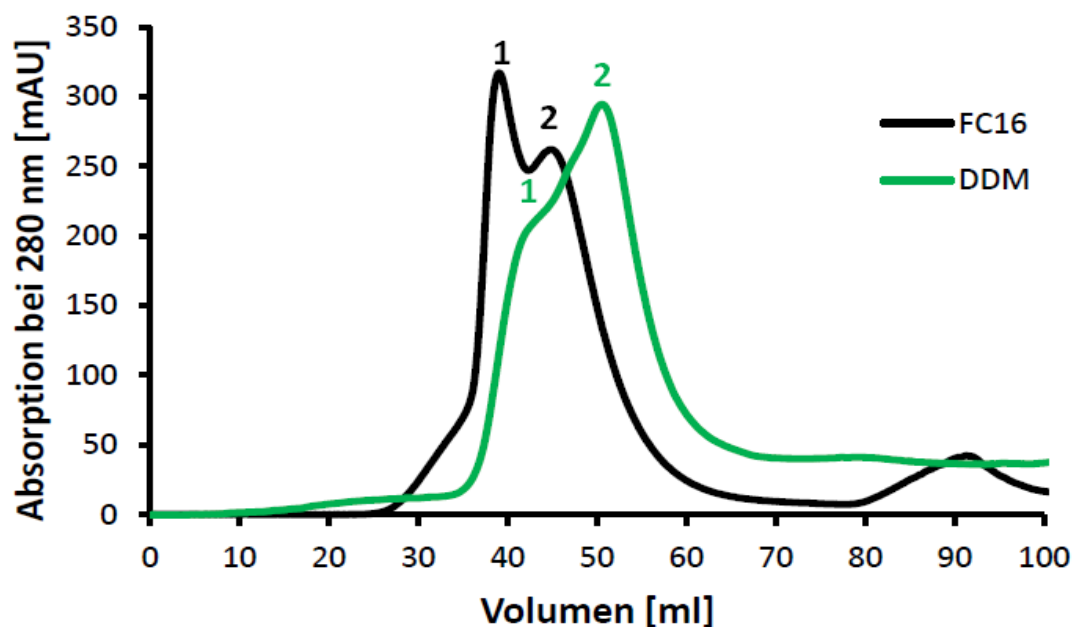


Abbildung 10: Vergleich von DDM und FC16: Größenausschlusschromatogramme von isoliertem LmrA unter Verwendung DDM (grüne Linie) und FC16 (schwarze Linie) als Detergenz bei 4 °C und einer Superdex200-Säule.

Das Elutionsvolumens bei der Größenausschlusschromatographie von Membranproteinen lässt häufig nur eine grobe Abschätzung des Molekulargewichts des Proteins oder des Proteinkomplexes zu, da die Kalibrierung der Säule mit löslichen Proteinen und ohne Detergenz vorgenommen wird und nicht klar ist, wieviele Proteinkomplexe sich in einer Mizelle befinden. Aus diesem Grund wurden Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie mittels einer nativen Acrylamidgelelektrophorese (Blue-Native-PAGE) untersucht. Anhand von Abbildung 11A kann man erkennen, dass sowohl die LmrA-Proben mit DDM als auch mit FC16 als Detergenz zwei Banden aufweisen. Für die Proben mit DDM (Laufspuren 1 und 2) kann man erkennen, dass die beiden Banden eine ähnliche Intensität haben. Aufgrund der geringen Proteinmenge lässt sich bei den FC16-Proben (Proben 3-5) mit dieser Methode kein Unterschied in der prozentualen Verteilung der beiden Spezies feststellen. Bei den beiden Banden handelt es sich jedoch nicht um Verunreinigungen durch ein anderes Protein oder um Abbauprodukte von LmrA, da unter denaturierenden Bedingungen lediglich eine Proteinbande, mit der erwarteten Größe für LmrA, in der SDS-PAGE zu sehen ist (Abbildung 11B). Interessanterweise fällt auf, dass die LmrA-Proben mit DDM eine geringfügig kürzere Laufstrecke in der SDS-PAGE aufweisen.

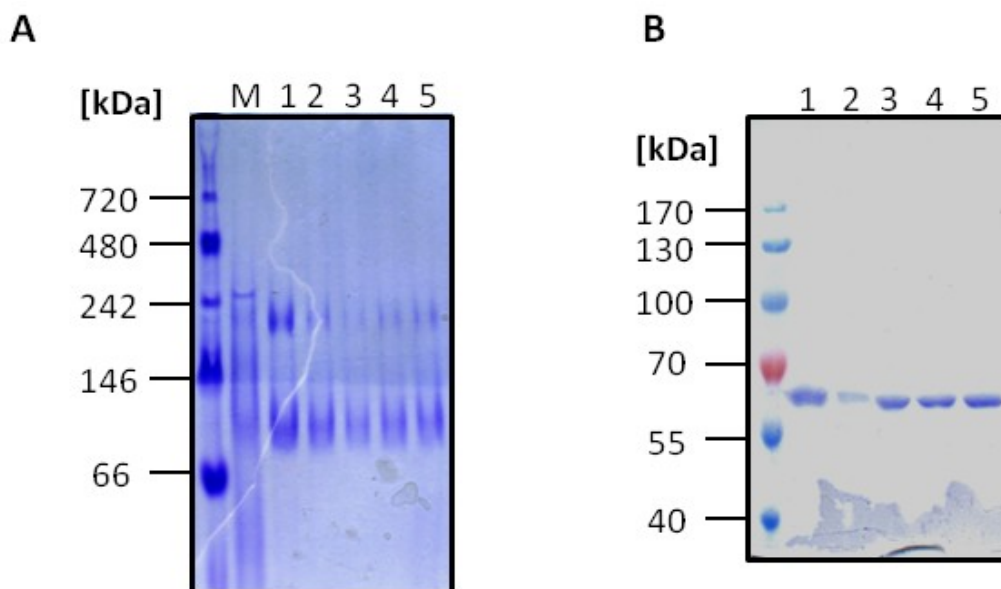


Abbildung 11: Vergleich von isolierten LmrA-Proben in DDM und FC16: Analyse mittels Gelelektrophorese. Verwendet wurde sowohl eine native Acrylamidgelelektrophorese (A) als auch eine SDS-PAGE (B). In beiden Fällen wurden die Proteinbanden durch eine Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. In A wurde auf Spur M eine verdünnte Probe der für die Isolierung von LmrA verwendeten Membransuspension aufgetragen. Bei 1 und 2 wurden Fraktionen von isoliertem LmrA nach der Größenausschlusschromatographie mit DDM, und FC16 bei 3-5, aufgetragen. In B entsprechen die aufgetragenen Proben der Laufspuren 1 und 2 denen von 1 und 2 in A, und 3-5 den Proben von 3-5 in A.

Die Reinheit der Probe und des oligomeren Zustands von LmrA ist lediglich eine denkbare Erklärung für die unterschiedliche Aktivität von LmrA unter Verwendung der beiden Detergenzien. Denkbar ist, dass die beiden Proteinproben noch Lipide enthalten, die aufgrund der unterschiedlichen Solubilisierungsfähigkeit der beiden Detergenzien, verschieden sein können. Daher sollte in den nächsten Experimenten prinzipiell untersucht werden, ob die Proteinproben noch merkliche Mengen Lipide enthalten. Die Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Jod-Dampf-Färbung untersucht. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Bei der LmrA-Probe in FC16 erfolgt eine Auftrennung in drei Banden eine kleine Bande mit einer Laufstrecke von weniger als einem Zentimeter, einer größeren und intensiver gefärbten Bande bei ca. 2,5 cm, sowie einer weiteren Bande nahe der Laufrfront. Bei der LmrA-Probe mit DDM lassen sich ebenfalls diese Banden erkennen, wobei die zweite Bande mit einer Laufstrecke von ca. 2,5 cm länglicher erscheint. Mit dieser Methode ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben feststellen.

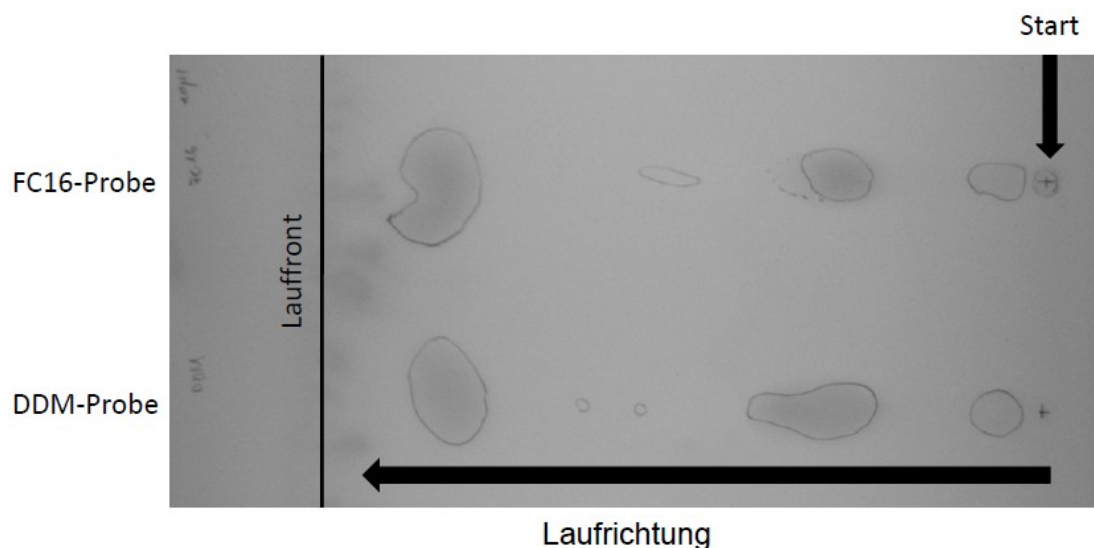


Abbildung 12: Untersuchung von LmrA-Proben mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Jod-Dampf-Färbung. Es wurden jeweils 10 µl einer LmrA-Probe, wobei einmal FC16 und im anderen Fall DDM zur Isolierung verwendet wurden. Die Proteinkonzentration betrug für beide Proben 1 mg/ml und die Plus-Zeichen markieren die beiden Auftragungspunkte.

Aufgrund der Tatsache, dass die Färbung mit Jod nicht spezifisch für Lipide ist und jedes auf der Platte befindliche organische Material reversibel gefärbt werden kann, muss geklärt werden ob alle in Abbildung 12 gefärbten Bereiche Lipide oder Lipid-Gemische sind. Dazu wurde eine LmrA-Probe mit FC16 mit Lipid-Extrakten aus *L. lactis* verglichen (Abbildung 13). Für die Rekonstitution von LmrA wurden käuflich erhältliche *E. coli*-Lipidextrakte verwendet, daher ist zusätzlich eine solche Probe auf die DC-Platte aufgetragen worden. Anhand dieser Probe sollte zudem geklärt werden, ob die verwendete Platte und das Laufmittel eine hinreichende Auftrennung von Gesamtlipidextrakten ermöglichen. Unter den gegebenen Bedingungen konnte der Gesamtlipidextrakt aus *L. lactis* in zwei Populationen aufgetrennt werden, diese lassen sich auch bei der LmrA-Probe beobachten. Bei den Proteinproben (Abbildung 12 und 13) sind jedoch auch weitere Banden zu erkennen, die nicht auf Lipide zurückzuführen sind. Mit dem verwendeten Laufmittel konnte ebenfalls der *E. coli*-Gesamtlipidextrakt in 3 Banden aufgetrennt werden. Mit dem verwendeten Laufmittel in Kombination mit der DC-Platte lassen sich die Lipid-Extrakte lediglich grob in wenige Lipid-Gemische auftrennen, so dass keine konkreteren Aussagen über die Lipidzusammensetzung in den Proteinproben gemacht werden können.

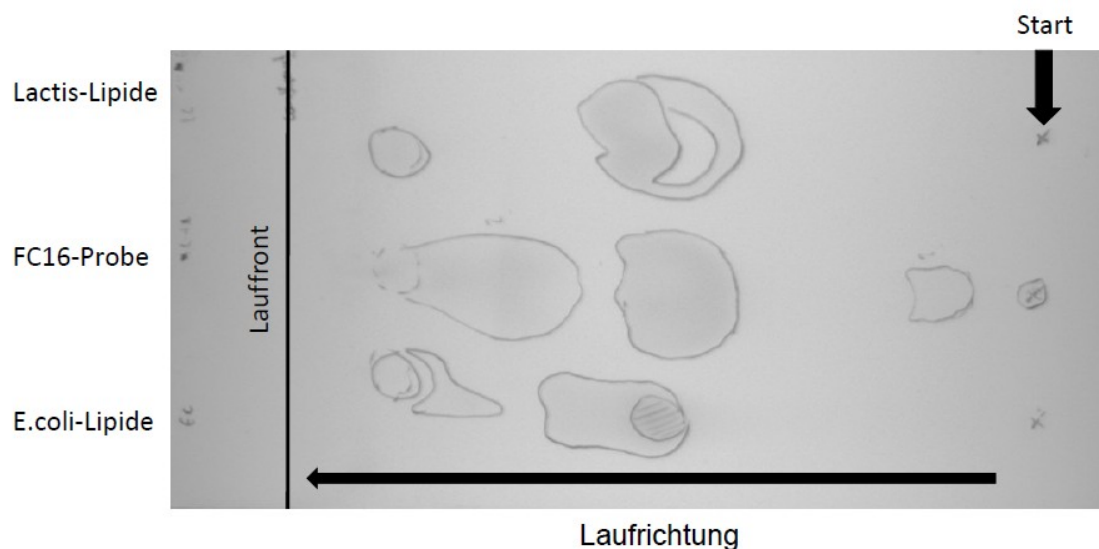


Abbildung 13: Vergleich der Zusammensetzung von Lipid-Extrakten aus *L. lactis* und *E. coli* und einer LmrA-Probe in FC16-Mezellen mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Jod-Dampf-Färbung. Die Auftragungspunkte der Proben sind links durch x gekennzeichnet und die mit Jod-Dampf gefärbten Bereiche anschließend mit einem Bleistift umrandet.

3.1.2 Einfluss bekannter Substrate auf die ATPase-Aktivität

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden einige Fluoreszenzfarbstoffe wie die unterschiedlichen Rhodamine oder auch Hoechst 33342 als LmrA-Substrate in der Literatur beschrieben. Zunächst sollte unter den bekannten LmrA-Substraten ein oder mehrere Substanzen identifiziert werden die die ATPase-Aktivität stark beeinflussen. Für diese Voruntersuchungen wurden Konzentrationen des Substrats genommen, die typischerweise für die *in vitro* Transport-Untersuchungen verwendet werden [85, 125, 152]. Eingesetzt wurden Hoechst 33342 und die Rhodamine 6G, 123 und 110. Für diese ersten Tests wurde mit FC16 als Detergenz isoliertes LmrA verwendet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 14 dargestellt. Die beiden Rhodamine 123 und 110 zeigten bei den verwendeten Konzentrationen stärkere Effekte auf die Aktivität, mit einer Stimualtion auf nahezu der zweifachen basalen Aktivität bei einer Konzentration von 200 nM. Rhodamin 6G und Hoechst 33342 hingegen kaum, wobei bei Rhodamin 6G eine leichte Inhibition gemessen wurde.

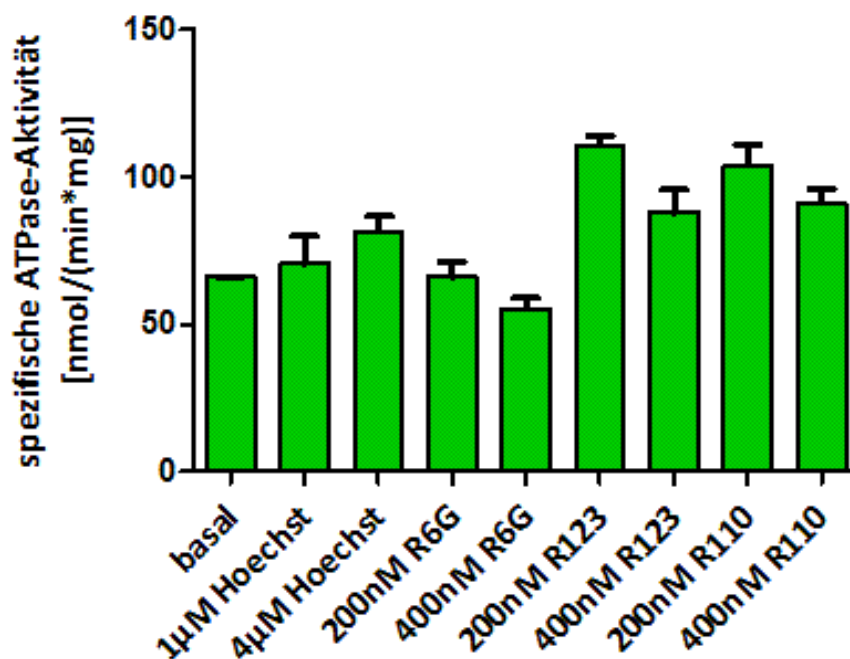


Abbildung 14: Einfluss bekannter Substrate auf die ATPase-Aktivität von LmrA. Vermessen wurde die ATPase-Aktivität von isoliertem LmrA unter Verwendung von FC16 bei 25 °C und einer ATP-Konzentration von 1 mM. Zusätzlich zur basalen Aktivität wurden Hoechst 33342 (Hoechst), Rhodamin 6G (R6G), Rhodamin 123 (R123) und Rhodamin 110 (R110) in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die detailliertere Betrachtung des Substrateinflusses Rhodamin 123 ausgesucht. Hierbei wurde, wie bei der Analyse der ATP-Hydrolyse, sowohl die Aktivität von LmrA in einer Detergenz-Mizelle als auch in Proteoliposomen untersucht. Grundsätzlich konnte bei Verwendung von FosCholin16 (Abbildung 15) ein eher geringerer Einfluss auf die Aktivität von LmrA in Proteoliposomen festgestellt werden. Bei diesen Proben konnte erst bei höheren Rhodamin-Konzentrationen (größer als $0,6 \mu\text{M}$) eine Inhibition der Aktivität gemessen werden, auf ein Viertel der basalen Aktivität. Hingegen konnte bei LmrA in einer Detergenzmizelle bereits bei niedrigen Rhodamin-Konzentrationen eine Stimulation der basalen ATPase-Aktivität beobachtet werden. Bei einer Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ wurde eine 1,8-fache Stimulation der basalen Aktivität gemessen. Dieses Maximum der Aktivität entspricht mit einem Wert absoluten Wert von etwa $111 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ bei einer ATP-Konzentration von 1 mM in etwa dem V_{max} -Wert von $126 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ der Kinetik.

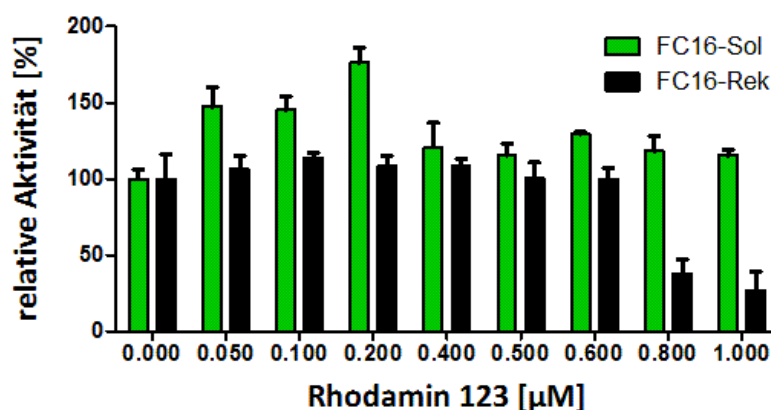


Abbildung 15: Relative ATPase-Aktivität von solubilisiertes (FC16-Sol, grün) und rekonstituiertes LmrA (FC16-Rek, schwarz) in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration unter Verwendung von FC16 bei einer ATP-Konzentration von 1 mM und einer Reaktionstemperatur von 25°C . Die jeweilige spezifische ATPase-Aktivität ohne Rhodamin wurde als 100 % gesetzt.

Bei DDM ist es das rekonstituierte LmrA, das eine stimulierte Aktivität zeigt (Abbildung16). Der Verlauf entspricht dem zuvor bei solubilisiertem LmrA in FC16-Lösung beobachteten, in der Hinsicht als das bei niedrigen Rhodamin-Konzentrationen eine Stimulation gemessen wurde. Auch hierbei entspricht der Wert der maximalen Stimulation ($197 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$) das 1,8-fache der basalen Aktivität ($113 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$), wobei dies bei einer Rhodamin-

Konzentration von 100 nM auftritt. Im Gegensatz dazu, zeigten die nahezu inaktiven LmrA-Proben in einer DDM-Mizelle keine Veränderung der Aktivität aufgrund von Rhodamin 123. Allerdings sind bei dieser Messreihe die Standardabweichungen, aufgrund der niedrigen absoluten Aktivität, zu groß um eine derartige Änderung der Aktivität eindeutig festzustellen.

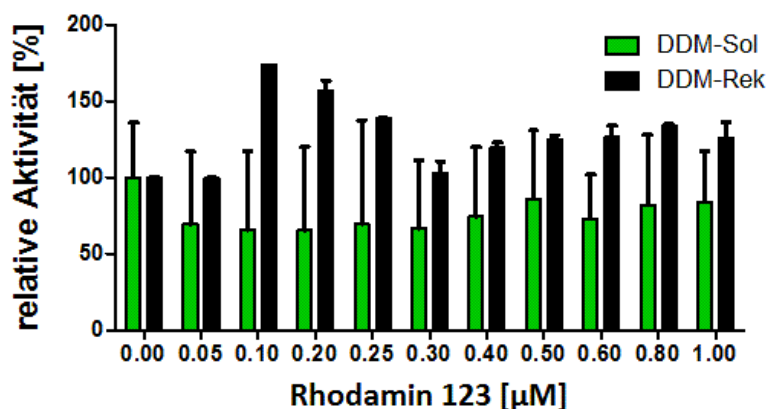


Abbildung 16: Relative ATPase-Aktivität von solubilisiertes (DDM-Sol, grün) und rekonstituiertes LmrA (DDM-Rek, schwarz) in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration unter Verwendung von DDM bei einer ATP-Konzentration von 1 mM und einer Reaktionstemperatur von 25 °C. Die jeweilige spezifische ATPase-Aktivität ohne Rhodamin wurde als 100 % gesetzt.

Der Einfluss von Rhodamin 123 auf die ATPase-Aktivität von LmrA wurde auch in isolierten Membranvesikel untersucht (Abbildung 17). Hier bestätigte sich die Beobachtung, wonach es bei niedriger Substratkonzentration zuerst zu einer Stimulation kommt. Allerdings verringert sich die Aktivität bei höheren Konzentrationen nur geringfügig und bleibt weiterhin höher als die basale Aktivität. In diesem System wurde die maximale Stimulation bereits bei einer Rhodamin-Konzentration von 25 nM gemessen. Die maximale Aktivität entspricht mit einem absoluten Wert von 546 nmol/(mg*min) einer 1,7-fachen Stimulation der basalen Aktivität (329 nmol/(mg*min)).

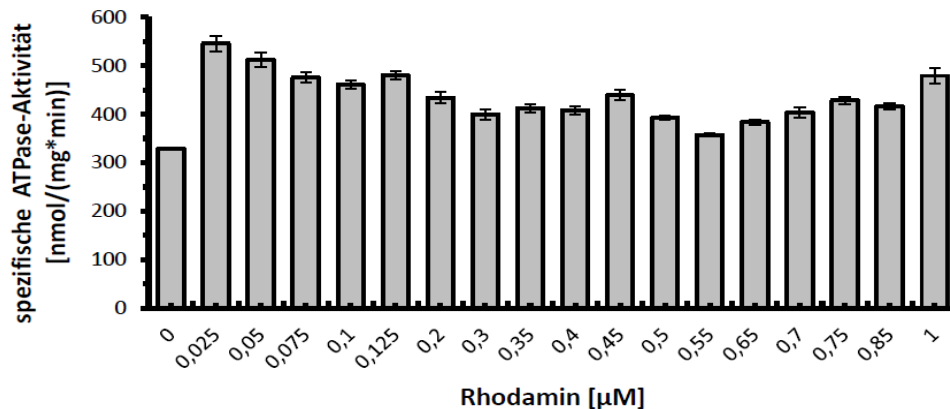


Abbildung 17: Einfluss von Rhodamin 123 auf die ATPase-Aktivität von LmrA unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln bei einer ATP-Konzentration von 1 mM und einer Reaktionstemperatur von 25 °C.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine hohe basale ATPase-Aktivität von LmrA meist mit einer Modulierbarkeit dieser mittels des Substrats Rhodamin 123 einhergeht. Unabhängig von der Umgebung zeigt LmrA denselben Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, bei der es bei niedrigen Substratkonzentrationen zu einer Stimulation der Aktivität kommt. Lediglich die Konzentration bei der LmrA maximal stimuliert wird variiert mit der Umgebung, so ist die maximale Stimulation in einer FC16-Lösung bei einer Rhodamin-Konzentration von 200 nM erreicht, während dies bei rekonstituiertem Protein (DDM-Rek) bei 100 nM ist und in isolierten Membranvesikeln lediglich bei 25 nM liegt (Abbildung 18).

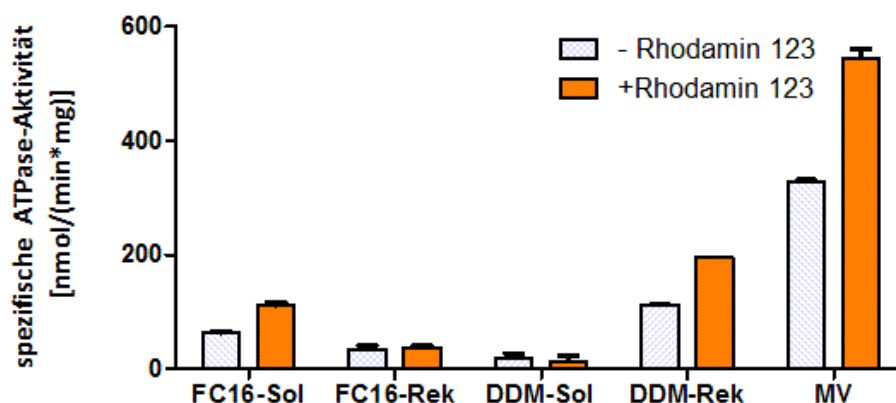


Abbildung 18: Maximale Stimulation von LmrA in verschiedenen Umgebungen durch Rhodamin 123. Dargestellt ist die spezifische ATPase-Aktivität von LmrA in Detergenz-Lösung (FC16-Sol und DDM-Sol), in Liposomen (FC16-Rek und DDM-Rek) sowie in isolierten Membranvesikeln, wobei in Fall von FC16 eine Rhodamin-Konzentration von 200 nM eingesetzt wurde, 100 nM bei DDM und 25 nM bei isolierten Membranvesikeln (MV).

3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von LmrA

3.2.1 Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Transport-Aktivität

In dieser Arbeit wurde bislang zur Beurteilung der Aktivität von LmrA ausschließlich die ATPase-Aktivität verwendet. Für eine umfassende Charakterisierung des Proteins ist jedoch auch die Transport-Aktivität von Interesse. Die Etablierung einer praktischen und verlässlichen Methode zur Messung der Transport-Aktivität von LmrA ist das Thema der folgenden Abschnitte. Eine Etablierung bzw. Abwandlung von bereits in der Literatur beschriebenen Assays war notwendig [78, 125], da sie nicht reproduziert werden konnten und in einem Fall von späteren Veröffentlichungen kontrovers diskutiert worden sind. So ist der Transport von Hoechst 33342 unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln laut [152] abhängig von einem bestehenden Protonengradienten.

LmrA-vermittelter Transport von Rhodamin 123

Aufgrund der Tatsache, dass in den vorherigen Untersuchungen bereits Rhodamin 123 verwendet wurde, sollte es auch bei Betrachtung der Transport-Aktivität als Substrat genutzt werden. Desweiteren sollte die Transport-Aktivität von rekonstituiertem LmrA vermessen werden. Die Verwendung von Proteoliposomen hat gegenüber von isolierten Membranvesikeln den Vorteil, dass eine Beteiligung eines anderen Proteins am Transport ausgeschlossen werden kann.

In Abbildung 19 A ist eine solche Beispielmessung dargestellt. Zu Anfang der Messung kommt es zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals von Rhodamin 123 da es sich in die Lipidschicht einlagert. Nach Erreichen eines Gleichgewichts, das sich durch eine statische Signalintensität auszeichnet, wird ATP hinzugegeben. Die ATP-Zugabe verursacht eine Verringerung des Fluoreszenzsignals um ca. 50 % der Ausgangsintensität, da das Substrat in das Liposomenlumen transportiert wird und es aufgrund einer entstehenden hohen Konzentration ein Queching verursacht wird. Die Signalintensität bleibt über einen langen Zeitraum konstant und kann nicht durch EDTA oder Verapamil verändert werden. Weiterhin ist in Abbildung 19 B das Messergebnis bei leeren Liposomen gezeigt. Auch hier kommt es zu einer Signalreduktion, jedoch ist sie im Gegensatz zu den Proteoliposomen sprunghaft

und verläuft nicht stetig über einen Zeitraum. Die leeren Liposomen wurden ebenso vorbehandelt wie die Proteoliposomen, wobei lediglich keine Proteinlösung zugesetzt wurde. Bei Gabe von EDTA und somit des Abbruch des Transports wird erwartet, dass die Rhodamin-Fluoreszenz wieder zunimmt.

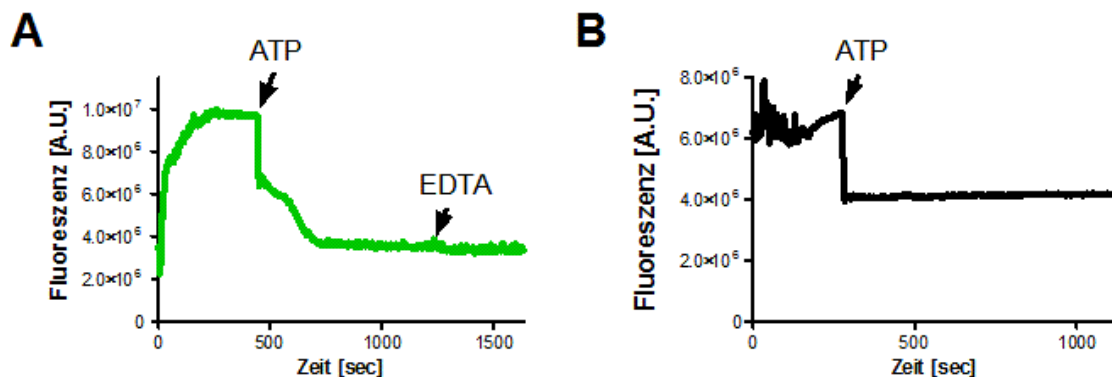


Abbildung 19: Rhodamin-Transport in Proteoliposomen. LmrA-vermittelter Transport von Rhodamin 123 nach Zugabe von ATP (A). Kontrollmessung mit Liposomen ohne Protein (B).

Im Hinblick auf die Tatsache, dass mittels eines solchen Assays in dieser Arbeit eine Vielzahl von potenziellen Inhibitoren getestet werden sollten, ist der Aufwand zur Herstellung einer solchen Probe und auch die benötigte Proteinmenge unvorteilhaft. Ein *in vivo* Assay wäre für diesen Zweck am geeignetsten.

LmrA-vermittelter Transport von Ethidiumbromid

Ethidiumbromid gehört zu den häufig in Laboren eingesetzten MDR-Proteinsubstraten und sollte für einen zellbasierten Transport-Assay verwendet werden. Hierzu wurden zunächst, in Anlehnung an einen bereits beschriebenen Test [159], *Lactis*-Zellen deenergetisiert und kurz vor Start der Messung mit Glukose und Erwärmen auf 30 °C wieder mit Energie versorgt. Dies sollte dem Zweck dienen alle Zellen auf dasselbe energetische Niveau zu bringen. Nach dem Start der Messung, bei der das Fluoreszenzsignal von Ethidium beobachtet wird, wurde 9 µM Ethidiumbromid den Zellen zugesetzt. Das Ergebnis dieser ersten Messmethode ist in Abbildung 20 dargestellt. Das Ethidium gelangt in die Zelle und bildet dort einen Komplex

mit der DNA, was zu einem Anstieg der Intensität des Fluoreszenzsignals führt. Bei Zellen die ein aktives MDR-Protein expremiert haben erwartet man, dass der Farbstoff aus der Zelle transportiert wird, sodass diese Zellen eine geringere Fluoreszenz aufweisen. In diesem Fall bedeutet es, dass die Fluoreszenz der Zellen mit wt-LmrA-Expression geringer sein müsste als die der Zellen mit der transport-inaktiven E512Q-Mutante von LmrA. Anhand von Abbildung 21 kann man sehen, dass sich überraschenderweise das Gegenteil beobachten ließ. So sind es die mit LmrA-E512Q-Expression bei denen nur ein geringer Anstieg der Ethidiumfluoreszenz gemessen wurde. Das stärkere Fluoreszenzsignal bei Zellen mit wt-LmrA-Expression ist in diesem Fall unerwartet.

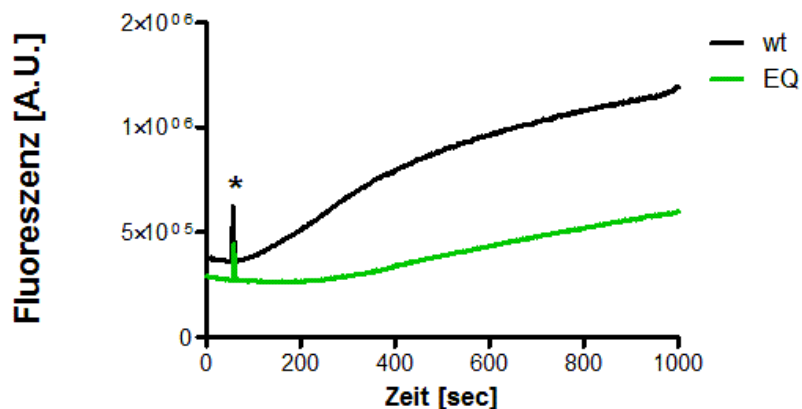


Abbildung 20: *In vivo*-Ethidium-Transport. Verwendet wurden *Lactis*-Zellen mit LmrA- (schwarz) und LmrA-E512Q-Expression (grün), wobei der Stern markiert den Zeitpunkt der Zugabe von 9 μ M Ethidumbromid.

Bei einer weiteren Variante eines Ethidium-Efflux-Assays werden die Zellen zunächst im deenergetisierten Zustand mit Ethidumbromid beladen und der Transport durch Zugabe von Glukose gestartet. Hierbei wird bei Zellen mit aktivem Transporter ein Absinken der Signalintensität erwartet, da Ethidium aus der Zelle transportiert wird. Abbildung 21 zeigt eine solche Messung, bei der den Zellen während der Behandlung mit Deoxyglukose 30 μ M Ethidumbromid zugesetzt worden ist. Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse bei der ersten Variante des Assays, wurden hier zur Abklärung zusätzlich LmrCD-expremierende Zellen verwendet. LmrCD ist ebenfalls ein MDR-ABC-Transporter des Bakteriums *L. lactis* (siehe Einleitung). Auch hier erreichten *Lactis*-Zellen mit aktivem Transporter, sowohl mit LmrA als auch LmrCD, eine höhere Fluoreszenzintensität als Zellen mit der inaktiven LmrA-E512Q-

Mutante (Abbildung 21). Um die Energie-Abhängigkeit des gemessenen Effekts zu überprüfen, wurden Messungen mit LmrA-exprimierenden Zellen durchgeführt, denen anstelle von Glukose Wasser zugesetzt wurde (Abbildung 20, wt-MQ). Hierbei zeigten diese Zellen eine ähnlich niedrige Fluoreszenz wie Zellen mit LmrA-E512Q-Expression.

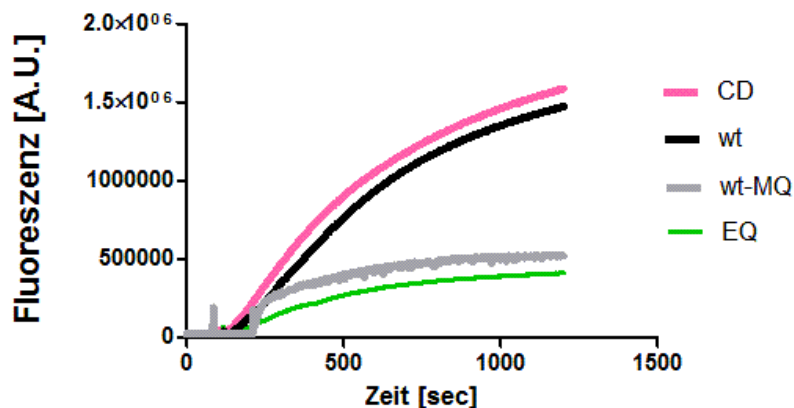


Abbildung 21: In vivo-Ethidium-Transport. Dargestellt ist die Ethidium-Fluoreszenz gegen die Zeit bei Messungen mit LmrCD- (pink), LmrA- (schwarz) und E512Q-LmrA- (grün) exprimierenden Zellen nach Zugabe von Glukose. In grau ist die Messung bei LmrA-exprimierenden Zellen, wobei Wasser (MQ) anstelle von Glukose zugegeben wurde, dargestellt.

Die höhere Signalintensität für wt-LmrA steht nicht nur im Widerspruch zu der bereits genannten Publikation, sondern auch zu einer weiteren Beobachtung. Bereits während der Präparation fiel auf, dass LmrA-E512Q- exprimierende Zellen sichtbar mehr Ethidiumbromid aufnehmen als Zellen mit LmrA- oder LmrCD-Expression (Abbildung 22).

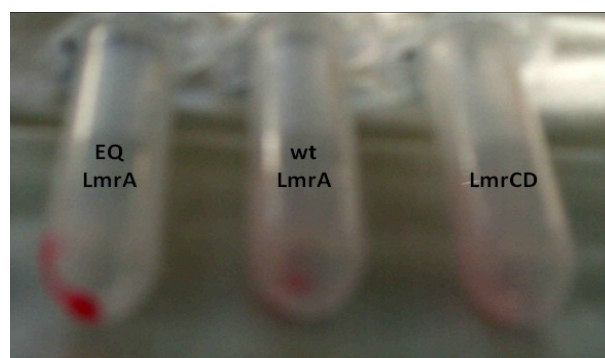


Abbildung 22: *Lactococcus lactis*-Zellen, die E512Q-LmrA, LmrA und LmrCD exprimiert haben nach Inkubation mit Ethidiumbromid.

Mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie sollte der LmrA-vermittelte Transport von Ethidium bestätigt werden. Dafür wurden Präparate von den Zellen vor und nach Zugabe von Glukose

hergestellt (Abbildung 23). Wobei die Zellen im Falle einer Glukose-Behandlung solange bei 30 °C inkubiert wurden, dass es dem Zeitpunkt entspricht bei dem die Zellen bei den Spektrometer-Messungen den konstanten Level erreicht haben; dies entspricht 20 Minuten. Um die Aufnahmen der verschiedenen Präparate vergleichen zu können, wurden alle Geräteeinstellungen, wie die Belichtungsintensität und Aufnahmedauer für ein Bild konstant gehalten und so eingestellt, dass bei Aufnahmen der de-energetisierten Zellen mit LmrA-E512Q-Expression eine Überbelichtung vermieden wurde. Anhand von Abbildung 23 kann man erkennen, dass bei E512Q-LmrA-Expression kein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz zwischen den de-energetisierten Zellen und den Zellen die wieder mit Glukose versorgt wurden beobachtet werden kann. Hingegen ist dies bei wt-LmrA-Expression anders, denn hier lässt sich ein deutlicher Unterschied erkennen. Die wieder mit Glukose energetisierten Zellen haben bei den gewählten Einstellungen eine kaum erfassbare Ethidiumfluoreszenz. Ebenfalls wird hier die Beobachtung aus Abbildung 22 bestätigt, da auch hier beim Vergleich der de-energetisierten Zellen mit wt-LmrA-Expression eine geringere Färbung als die mit LmrA-E512Q-Expression aufweisen.

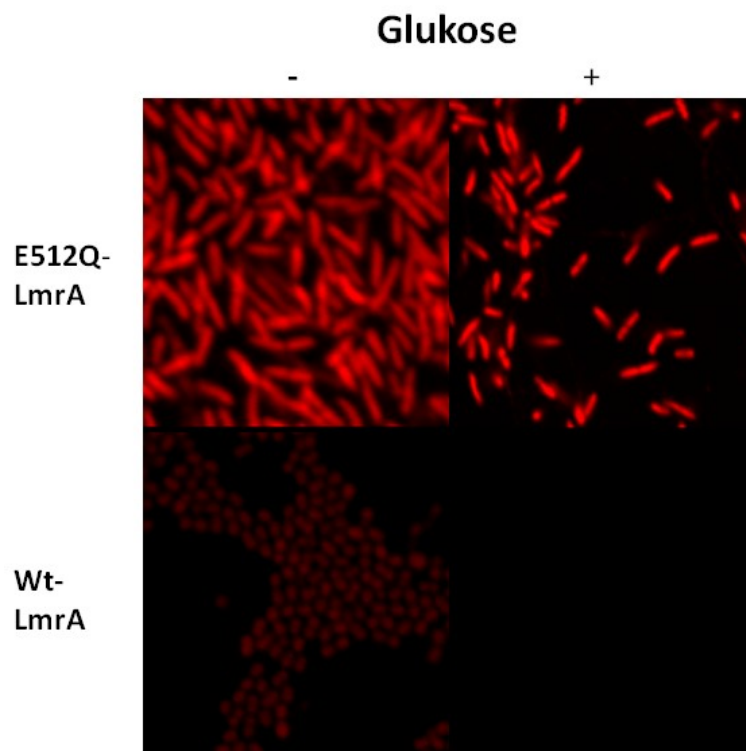


Abbildung 23: LmrA-vermittelter Transport von Ethidium. Fluoreszenzaufnahme (60-fache Vergrößerung) von *L. lactis*-Zellen, die im de-energetisierten Zustand mit Ethidiumbromid beladen wurden. Dargestellt sind Zellen die E512Q-LmrA (obere Bilder) und die wt-LmrA expremierten (untere Bilder), wobei die linken Aufnahmen de-energetisierte Zellen (-) zeigen, während die Zellen bei den rechten Aufnahmen mit Glukose (+) re-energetisiert wurden.

In Abbildung 23 sind in der Aufnahme der mit Glukose behandelten Zellen mit wt-LmrA-Expression nicht erkennbar, sodass eine zweite Färbung notwendig ist. Zusätzlich suggeriert Abbildung 23, dass diese Zellen gar keine Ethidium-Fluoreszenz mehr aufweisen. Jedoch ist bei Erhöhung der Anregungsintensität durchaus ein Ethidium-Fluoreszenzsignal messbar. Für die in Abbildung 24 zusammengefassten Aufnahmen wurde nach Fixierung der Zellen eine Färbung der DNA mit DAPI vorgenommen. Desweiteren wurde bei diesen Aufnahme die Belichtungsintensität auf den jeweiligen Zellen ohne Glukose eingestellt. Die Ethidium-Fluoreszenz wurde in orange dargestellt und für die DAPI-Fluoreszenz blau gewählt. In Abbildung 24 sind die Überlagerungen beider Aufnahmen gezeigt, wobei man bei den deenergetisierten Zellen sehen kann, dass bei manchen Zellen die DAPI-Färbung nicht erfolgte, sodass die Zellen lediglich orange sind. Bei dem überwiegenden Teil der Zellen hingegen war die DAPI-Färbung erfolgreich und so erscheinen nahezu alle Zellen violett. Während bei den Aufnahmen der Zellen mit LmrA-E512Q-Expression mit und ohne Glukose-Behandlung kaum unterscheiden, sieht man dass die Zellen mit aktiven Transportern, sowohl LmrCD als auch LmrA, eine geringe Ethidium-Fluoreszenz aufweisen.

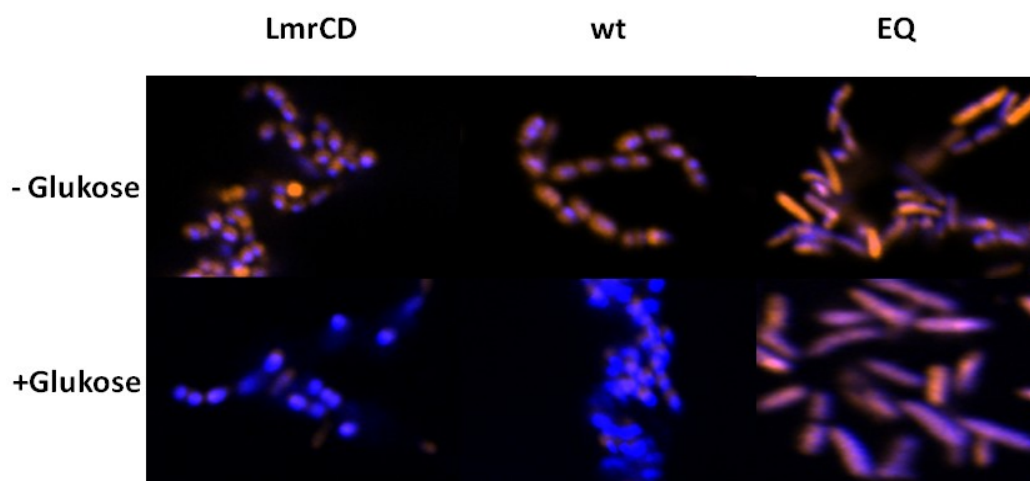


Abbildung 24: LmrA-vermittelter Transport von Ethidium. *Lactis*-Zellen mit LmrCD- LmrA- und E512Q- LmrA-Expression wurden mit Ethidumbromid im de-energetisierten Zustand beladen (-Glukose), und anschließend mit Glukose energetisiert (+Glukose). Nach der Fixierung wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die Ethidium-Fluoreszenz ist orange dargestellt und die DAPI-Fluoreszenz blau.

Der hier diskutierte Transport-Assay sollte, wie bereits eingangs erwähnt, vorrangig für ein Substanz-Screening verwendet werden (siehe Abschnitt 3.3). Für die Quantifizierung der Aktivität konnte die anfängliche Steigung nicht genutzt werden, da bei manchen Substanzen (Strukturformeln der Testsubstanzen siehe Abbildung 30) ein größerer Wert für die Steigung beobachtet werden konnte, aber dennoch am Ende ein niedriger Wert der Fluoreszenz erreicht wurde (Beispiel: Substanz **7** in Abbildung 25 A). Daher wurde die mittlere Signalintensität des Plateaus verwendet, wobei der Wert für Zellen ohne Testsubstanz als 100 % der Aktivität gesetzt wurde. Abbildung 25 B zeigt den Einfluss von Zosuquidar (Substanz **1**) auf den Verlauf des Ethidium-Transports mit LmrCD-exprimierenden Zellen. Auch bei diesen Zellen beobachtet man, dass aufgrund von Zosuquidar ein geringeres Fluoreszenzsignal-Plateau erreicht werden kann. Als Ergebnis für die Inhibition erhält man bei dieser Beispielmessung einen Wert von 44 %. Dieses Ergebnis für die Inhibition der Transport-Aktivität von LmrCD entspricht dem Wert von $42,4 \pm 1,5$ %, der aus Messungen mit isolierten Membranvesikeln und Hoechst 33342 als Substrat ermittelt wurde (siehe Abschnitt 3.3.2).

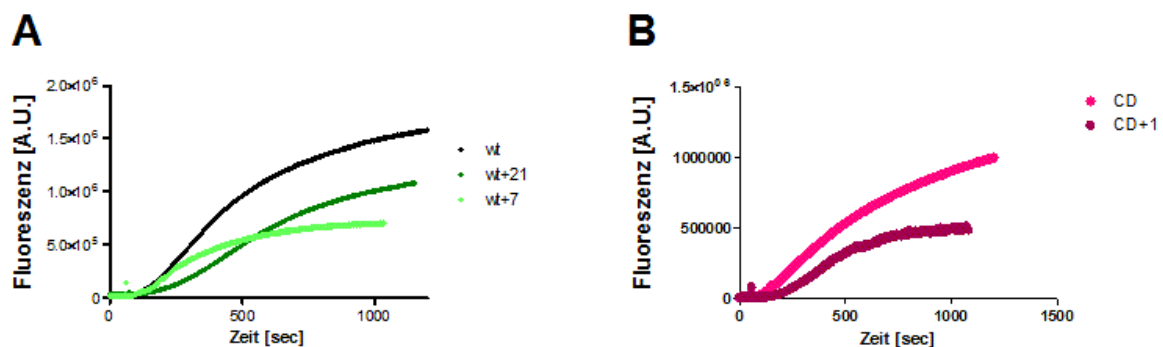


Abbildung 25: Auswertung der Ethidium-Transport-Messungen. Einfluss von Substanz 21 und 7 auf den Ethidium-Transport von wt-LmrA-exprimierenden *Lactis*-Zellen (A) und Substanz 1 auf den LmrCD-vermittelten Ethidium-Transport (B). Beide Substanzen wurden auf eine Endkonzentration von 30 μ M zugesetzt zusammen mit Glukose zugesetzt.

3.2.2 Morphologische Veränderungen unter LmrA-Expression

Bereits auf den Fluoreszenzbildern ist eine morphologische Veränderung der E512Q-LmrA-exprimierenden Zellen zu erkennen (Abbildungen 23 und 24). Diese Zellen erscheinen im Vergleich zu wt-LmrA – und LmrCD-exprimierenden Zellen vergrößert. Ebenso lassen sich keine längeren Ketten in den Präparaten finden. Die geringe Größe von *L. lactis*-Zellen macht eine genauere Untersuchung mit einem Rasterelektronen-Mikroskop erforderlich. Anhand dieser Bilder (Abbildung 26) kann man erkennen, dass während wt-LmrA-exprimierende Zellen (B) dieselbe Morphologie aufweisen wie *L. lactis*-Zellen (A) die den leeren Expressionsvektor besitzen, die E512Q-LmrA-exprimierenden Zellen deutlich vergrößert sind und nicht mehr in der Lage sind Ketten von mehr als zwei Zellen zu bilden. Während Zellen mit wt-LmrA-Expression eine Länge von etwa 0,2 μm aufweisen, haben LmrA-E512Q-exprimierende Zellen eine ungefähre Länge von 1 μm . Desweiteren lässt sich auch bei diesen Zellen eine deutliche Septenbildung erkennen, sodass man davon ausgehen kann, dass diese nicht gestört ist. Grundsätzlich fällt jedoch auf, dass bei den Präparaten von Zellen ohne Proteinexpression und der mit wt-LmrA-Expression deutlich mehr teilende Zellen zu sehen sind. Dies ist allerdings nicht mit verschiedenen Wachstumsphasen in den jeweiligen Kulturen zu erklären, denn die Flüssigkulturen wiesen alle eine optische Dicht von ca. 1,3 auf.

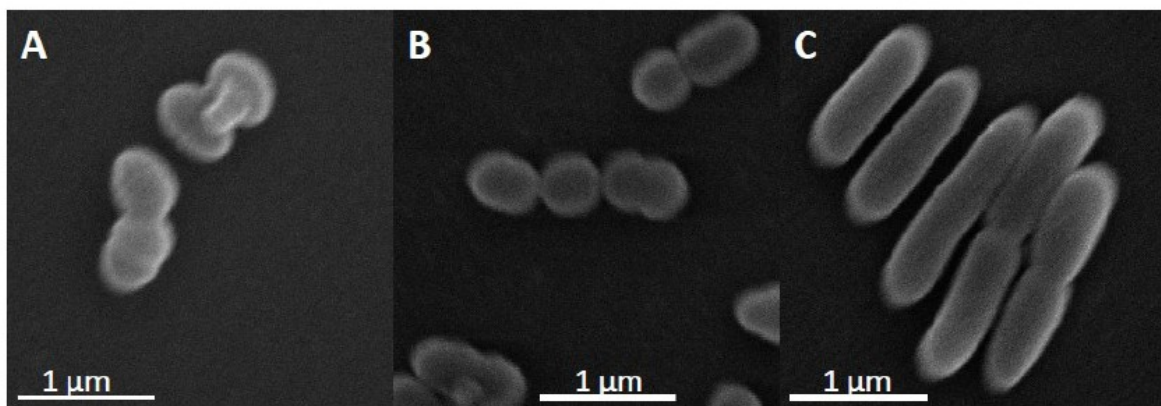


Abbildung 26: Aufnahmen von *L. lactis*-Zellen bei 13 000-facher Vergrößerung. *L. lactis*-Zellen mit dem Expressionsvektor ohne Gensequenz (A), wt-LmrA-exprimierende Zellen (B) und E512Q-LmrA-exprimierende Zellen (C). In Kooperation mit Dr. K. Zanger, Core-Facility-Elektronenmikroskopie des Zentrums für Anatomie und Hirnforschung des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob dieser Unterschied tatsächlich auf die Überexpression der funktionell inaktiven Mutante von LmrA zurückzuführen ist, oder sich in diesen Zellen unabhängig davon eine oder mehrere Mutationen ereignet haben, die dafür verantwortlich sind. Dazu wurden die Plasmide, mit wt-LmrA codierender Sequenz und für E512Q-LmrA codierender Sequenz in den NZ900-Stamm, in dem *ImrD* und *ImrA* chromosomal deletiert wurde, erneut transformiert und die E512Q-LmrA-exprimierenden Zellen vor und nach der Induktion der Proteinexpression betrachtet. Da sich die Beobachtung bezüglich der Größe der Zellen von der lichtmikroskopischen Untersuchung bei 100-facher Vergrößerung durch die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestätigt hat, wird aufgrund der aufwendigeren Präparationsvorbereitung bei der REM desweiteren lediglich die Lichtmikroskopie für die Einschätzung der Morphologie verwendet. In Abbildung 27A sieht man, dass vor der Induktion durch Nisin lediglich ein kleiner Prozentsatz der Zellen als Duplokokken vorliegt und die Bakterienzellen längere Ketten gebildet haben. Zwei Stunden nach der Induktion sind nur noch Duplokokken (Abbildung 27B) erkennbar. Allerdings ist der Größenunterschied nicht so stark ausgeprägt wie in den vorherigen Präparaten. Zwar lässt sich anhand dieses Experiments die Beteiligung eines anderen Proteins nicht endgültig ausschließen, jedoch verstärkt es die Annahme, dass die E512Q-LmrA-Expression für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

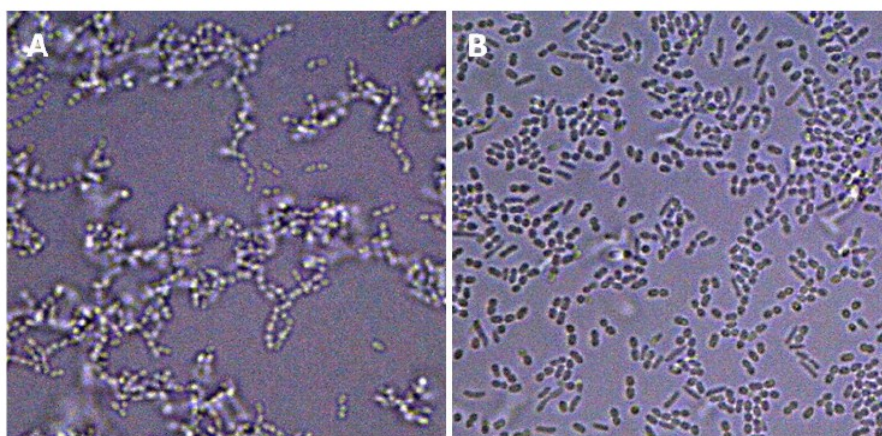


Abbildung 27: Einfluss der E512Q-LmrA-Expression auf die Morphologie von *Lactococcus lactis*-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Leica, 100-fache Vergrößerung) vor Induktion der Expression mit Nisin (A) und zwei Stunden nach der Induktion (B).

Derartige morphologische Veränderungen könnten sich auf das Wachstumsverhalten auswirken, daher wurde dieses mittels Messung der optischen Dichte der Flüssigkulturen verfolgt (Abbildung 28). Dafür wurden die Zellen in GM17-Medium bei 30 °C kultiviert. Es wurde auf einen Wert der optischen Dichte von 0,2 angeimpft, wobei alle verwendeten Ausgangskulturen einen OD-Wert zwischen 2,6 und 2,7 aufwiesen. Bei einem OD-Wert von 0,8 -1 wurde die Proteinexpression durch Nisin-Zugabe induziert. Betrachtet man die OD-Werte zum Zeitpunkt 5 Stunden, dieser Zeitpunkt entspricht dem der Ernte und somit der Präparat-Herstellung, so stellt man keinen Unterschied zwischen den beiden Zellkulturen mit LmrA-Expression (wt und E512Q) fest. Lediglich die Zellen mit dem leeren Expressionsvektor wachsen zu einem höheren OD-Wert. In der Zeit vor der Nisin-Zugabe wachsen die Zellen mit dem Plasmiden für die E512Q-LmrA-Expression besser als die übrigen Kulturen. Die hier gezeigten Messwerte sollten nur einen ersten Anhaltspunkt über das Wachstumsverhalten geben, eine genauere Betrachtung ist zur Abklärung notwendig. Anhand dieser Messungen sieht man, dass die Expression von E512Q-LmrA sich stärker inhibierend über die Zeit auf das Kulturwachstum auswirkt als die wt-LmrA-Expression. Nach Induktion der E512Q-LmrA-Expression wachsen die Zellen deutlich langsamer als vor der Nisin-Zugabe, und langsamer als Zellen die wt-LmrA exprimieren.

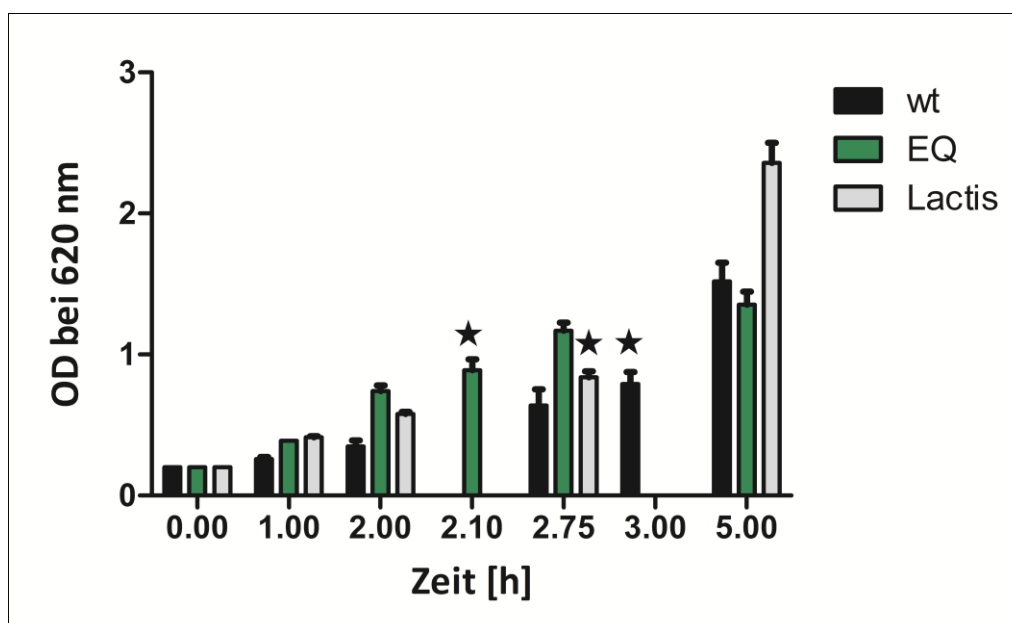


Abbildung 28: Vergleich des Wachstums. Das Wachstum von *L. lactis*-Zellen in GM17-Medium bei 30 °C wurde mittels Messung der optischen Dichte beobachtet, wobei der Zeitpunkt der Nisin-Zugabe bei den verschiedenen Kulturen mit einem Stern markiert ist. Verwendet wurde der *L. lactis*-Stamm NZ 9000 mit den Plasmiden pNHLmrA (wt, schwarz), pNHE512QLmrA (EQ, grün) und dem leeren Expressionsvektor pNZ8048 (*Lactis*, grau). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Kulturen.

3.2.3 Vergleichende Transkriptom-Analyse von LmrA-exprimierenden *L. lactis*-Zellen

Unter der Annahme, dass morphologische Veränderungen wie sie in 3.2.2 beschrieben sind auch mit einer differenzierten Transkription einhergehen könnten, wurde eine entsprechende Analyse, in Kooperation mit Prof. Dr. Köhrer und seinem Mitarbeiter Dr. Deenen, durchgeführt. Auch wenn Veränderungen auf der Ebene des Transkriptoms nicht zwangsläufig mit einer entsprechenden Änderung auf der Protein-Ebene einhergehen, so kann eine solche Analyse wichtige Hinweise liefern.

Die RNA aus *Lactis*-Zellen, mit den jeweiligen Plasmiden für die wt-LmrA- und E512Q-LmrA-Expression sowie dem leeren Expressionsvektor, wurde isoliert und sequenziert. Um mögliche überlagernde Effekte aufgrund des Schüttelns der Kulturen nach Nisin-Zugabe zu verhindern, wurden hier die Zellen von Beginn an unter Schütteln kultiviert. Es wurden für alle drei Plasmide jeweils zwei RNA-Proben von unabhängigen Kulturen vor und nach Induktion der LmrA-Synthese analysiert. Als Wert für die Expression wurde hier der RPKM-Wert (Reads per Kilobase of exon model per Million mapped reads) verwendet [160]. Betrachtet wurden die Mittelwerte der RPKM-Werte über beide Proben vor und nach Induktion. Das Verhältnis dieser wurde als Faktor der Änderung der Transkription verwendet.

Der in dieser Arbeit verwendete *Lactococcus lactis* Stamm NZ9000 besitzt ein Chromosom bei einer Größe von 2,53 Mb, das 2510 Proteine codiert. Zwar ist diese Zahl im Vergleich zu anderen Organismen nicht besonders hoch, trotzdem bedarf es Auswahlkriterien für die Zusammenstellung einer Liste von interessanten Genen. In erster Linie wurde nach rein statistischen Kriterien ausgewählt, wobei Gene als signifikant-differenziell transkribiert galten, wenn sowohl der P-Wert als auch ein nach FDR (false discovery rate) korrigierter P-Wert kleiner als 0,05 waren. Im zweiten Schritt wurden nur Gene ausgewählt bei denen der Betrag des Änderungsfaktors größer oder gleich 2 war.

Es wurden alle drei Datensätze jeweils vor und nach der Nisin-Zugabe verglichen, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Zellen mit dem pNH-LmrA-E512Q-Plasmiden vor und nach der Induktion festgestellt werden. Ohnehin konnten hier lediglich Faktoren von ± 1 ermittelt werden. Im Hinblick auf den beobachteten morphologischen Effekt der LmrA-E512Q-Expression war das besonders überraschend. Auch die Ergebnisse der Analyse der RNA-Proben aus den Zellen mit dem leeren Expressionsvektor erfüllten in seltenen Fällen alle zwei statistischen Kriterien. Diese Analyse sollte dazu dienen Effekte auszuschließen, die allein durch den Induktor Nisin entstehen. Wenn der Änderungsfaktor jedoch in etwa dem bei den beiden anderen Plasmiden entsprach und nur der reguläre P-Wert kleiner als 0,05 war, reichte dies aus um zu sagen, dass dies kein LmrA-spezifischer Effekt ist. Jedoch traf dies meist auf Transkripte zu, die ohnehin einen zu niedrigen Betrag des Änderungsfaktors haben.

In den Tabellen 2 und 3 sind die Ergebnisse für die wt-LmrA-exprimierenden Zellen gezeigt, wobei lediglich die Gene aufgeführt sind, die die beiden statistische Kriterien erfüllen, d.h. sowohl einen P-Wert als auch einen FDR korrigierten P-Wert von kleiner als 0,05 aufweisen. Die grau markierten Gene sind nicht zwingend LmrA-spezifisch, da sie auch bei den Zellen mit dem leeren Expressionsvektor differenziell expremiert wurden. In Tabelle 2 sind Transkripte zusammengefasst, die bei LmrA-Expression stärker transkribiert werden, während die Gene in Tabelle 3 negativ reguliert sind.

Bei Betrachtung der in Tabelle 2 aufgeführten Gene, fällt die hohe Zahl hypothetischer Proteine auf, deren mögliche Funktion nicht ermittelt werden konnte. Bei den Genen LLNZ_09490 und LLNZ_00800 erbrachte eine Protein-Blast-Analyse lediglich, dass es sich um konservierte bakterielle hypothetische Proteine handelt. LLNZ_06150 konnte als Riboflavin-ECF-Transporter identifiziert werden (99 % Sequenzidentität) und LLNZ_09875 ist bei dem *Lactococcus lactis*-Stamm MG1363 als putatives Membranprotein aufgeführt. Weniger überraschend ist die verstärkte Expression von allgemeinen „Stress-Proteinen“ wie das Heat-Shock-Protein GrpE oder auch die Glutathion-Peroxidase, dieser Effekt ist bereits in [95] beschrieben. Hingegen ist die verstärkte Expression von Proteinen die an der DNA-Bindung/Reparatur (LLNZ_02130 und LLNZ_05765) beteiligt sind neu.

Tabelle 2: Liste differenziell transkribierter Gene, die bei wt-LmrA-Expression positiv reguliert werden. Grau hinterlegt sind Gene, die bei Zellen mit dem leeren Expressionsvektor ebenfalls differenziell expremiert wurden.

Gen	Faktor	P-Wert	FDR P-Wert	vor Induktion	nach Induktion	Protein
LLNZ_06150	6,91	1,10E-04	0,03	190,18	1315,04	hypothetisches Protein
LLNZ_08110	6,25	9,52E-04	0,05	345,73	2160,82	Heat Shock Protein GrpE
LLNZ_11065	5,41	1,16E-04	0,03	472,45	2557,61	hypothetisches Protein
LLNZ_07860	4,32	3,11E-04	0,04	125,76	543,68	hypothetisches Protein
LLNZ_05630	3,26	9,90E-04	0,05	305,43	997,21	Glutathion-Peroxidase
LLNZ_01865	2,98	4,73E-04	0,05	542,25	1616,08	Alkyl-Hydroperoxid- Reduktase UE C
LLNZ_06965	2,91	7,81E-04	5,00E-02	288,51	840,2	hypothetisches Protein
LLNZ_00800	2,53	8,02E-04	0,05	788,37	1994,02	hypothetisches Protein
LLNZ_00795	2,49	6,16E-04	0,05	714,3	1781,48	Holliday-Junction Resolvase- like Protein
LLNZ_09875	2,36	6,59E-04	0,05	501,32	1181,43	hypothetisches Protein
deoD	2,32	1,48E-03	0,05	423,86	982,86	Purinnukleosid- Phosphorylase
LLNZ_02130	2,32	6,78E-04	0,05	240,57	559,28	Einzelstrang-DNA- Bindepotein
LLNZ_05765	2,29	1,47E-03	0,05	255,26	584,4	XpaC-like Protein
LLNZ_09490	2,23	7,25E-04	0,05	337,57	752,76	hypothetisches Protein

Ebenfalls von Interesse sind die Proteine, die bei Überexpression von LmrA negativ reguliert werden. Eine Zusammenstellung dieser differenziell transkribierten Gene bietet Tabelle 3. Überraschender Weise sind hier besonders viele ribosomale Proteine aufgeführt. Dies ist insofern unerwartet, als dass man bei hoher Proteinexpression Gegenteiliges vermuten würde. Allerdings ist dies bereits bei der Expression von anderen Membranproteinen beobachtet worden und keine Besonderheit der LmrA-Expression [95]. Besonders interessant in dieser Liste ist das Gen LLNZ_09220, da es sich hierbei um einen Transkriptionsregulator aus der MarR-Familie (multiple antibiotic resistance regulator) handelt.

Tabelle 3: Liste differenziell transkribierter Gene, die bei wt-LmrA-Expression negativ reguliert werden. Grau hinterlegt sind Gene, die bei Zellen mit dem leeren Expressionsvektor ebenfalls differenziell expremiert wurden.

Gen	Faktor	P-Wert	FDR P-Wert	Vor Induktion	Nach Induktion	Protein
rplK	-9	2,29E-04	0,04	4063,1	451,51	50S ribosomales Protein L11
rpmA	-7,95	8,31E-05	0,03	2379,16	299,14	50S ribosomales Protein L27
rplF	-6,18	3,72E-04	0,05	2466,76	399,32	50S ribosomales Protein L6
rplA	-6,02	1,03E-03	0,05	2773,14	460,67	50S ribosomales Protein L1
rplR	-5,85	4,17E-04	0,05	2098,19	358,78	50S ribosomales Protein L18
rpsQ	-4,55	6,78E-04	0,05	3394,35	746,4	30S ribosomales Protein S17
rpmF	-4,33	3,94E-06	2,55E-03	1022,32	236,05	50S ribosomales Protein L32
rpsA	-3,72	2,74E-04	0,04	4364,52	1174,09	30S ribosomales Protein S1
LLNZ_12785	-3,57	5,59E-04	0,05	1666,8	466,5	Einzelstrang-DNA-Bindeprotein
rplE	-3,06	6,79E-04	0,05	2546,76	831,73	50S ribosomales Protein L5
acpP	-3,02	1,42E-03	0,05	1268,26	420,36	Acyl-Carrier-Protein
LLNZ_09220	-2,86	3,83E-04	0,05	572,81	200,18	Transkriptionregulator der MarR-Familie
LLNZ_09215	-2,84	9,32E-05	0,03	625,86	220,38	3-Oxoacyl-ACP Synthase
rpsI	-2,6	8,54E-04	0,05	715,64	275,36	30S ribosomales Protein S9
LLNZ_10700	-2,29	1,90E-04	0,04	1049,94	459,23	Proteinphosphatase 2C
LLNZ_11325	-2,04	6,28E-04	0,05	589,17	288,95	Aspartatprotease

Desweiteren wurden die beiden Datensätze bei LmrA-Expression, wt und E512Q-LmrA, verglichen. Daraus ergaben sich 40 differenziell transkribierte Gene, jedoch waren lediglich die regulären P-Werte kleiner als 0,05 und es konnten nur geringe Änderungsfaktoren von ± 1 errechnet werden. Das Gen LLNZ_0956 ist die einzige Ausnahme, bei der mit einem P-Wert von $6,23 \times 10^{-3}$ ein Änderungsfaktor von 1283 beobachtet wurde. Es kommt in den RNA-Proben aus Zellen mit E512Q-LmrA-Expression mit einem normalisierten Mittelwert von 242,6 vor, während diese Zahl bei wt-LmrA-Expression bei 0,19 liegt. Es handelt sich dabei um ein Gen mit einer Länge von 339 BP, und direkter Nachbarschaft zum LmrA-Gen auf dem *L. lactis*-Genom. Es wird angenommen, dass LLNZ_0956 für ein Protein mit Esterase-Funktion codiert.

3.2.4 Vergleich auf Protein-Ebene

Um mögliche Unterschiede der Zellen bei wt-LmrA- und E512Q-LmrA-Expression auf der Ebene der Proteinausstattung zu untersuchen, wurden OD-Äquivalente der Ganzzelllysate der betreffenden Zellen auf einer SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 29). Hier lässt sich keine eindeutige Proteinbande ausmachen, die bei den Zellen vor und nach der Induktion hervorsticht. Alle vier Kulturen befanden sich in derselben Wachstumsphase, hatten eine OD zwischen 1,7 und 2,1. In Abbildung 29 sind Banden eines ca. 21 kDa großen Proteins durch rote Umrandung markiert, das vermutlich in den Zellen vor der Induktion etwas stärker expremiert wird als nach Start der LmrA-Synthese.

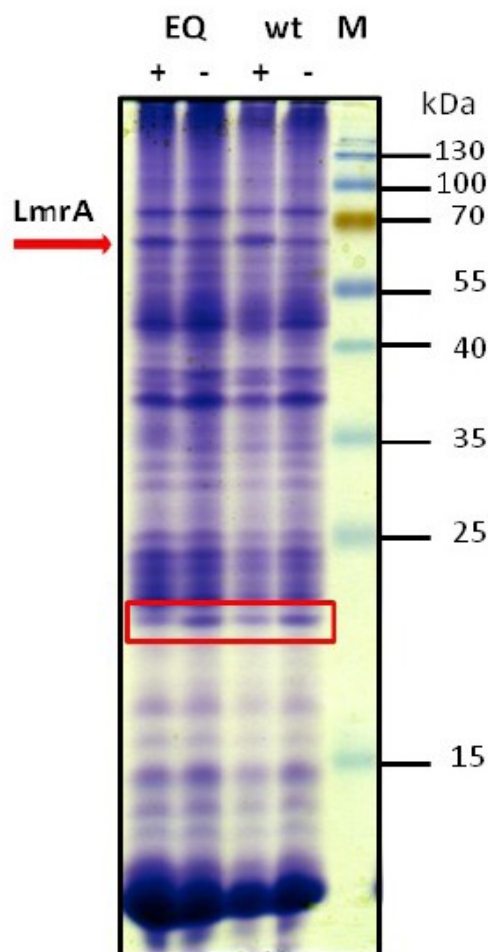


Abbildung 29: SDS-PAGE von Ganzzelllysaten von *L. lactis*-Zellen vor (-) und nach Induktion (+) der LmrA-Expression und anschließender Coomassie-Färbung der Proteinbanden. Der Pfeil markiert die LmrA-Bande und mit rot umrandet sind die Banden eines Proteins, das bei LmrA-Expression weniger expremiert wird.

3.3 Wirkung von Zosuquidar-Derivate auf die Aktivität ausgewählter MDR-Transporter

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse des Substanz-Screenings vorgestellt. Ziel war es neue Inhibitoren für mikrobielle MDR-ABC-Transporter zu identifizieren. Bei den verwendeten Testsubstanzen handelt es sich um Zosuquidar und 26 seiner Derivate. Zosuquidar ist (siehe Einleitung) ein für das humane P-Glykoprotein entwickelter Inhibitor, der bislang ausschließlich an humanen MDR-Proteinen untersucht wurde. Die verwendeten Substanzen wurden in der Abteilung für stereoselektive Synthesen unter der Leitung von Prof. Dr. Braun (Institut für organische Chemie und makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine Universität) von Torsten Dittrich synthetisiert [161]. In Abbildung 30 sind die Strukturformeln dieser Substanzen dargestellt. Nachfolgend wird Zosuquidar auch als Substanz **1** bezeichnet.

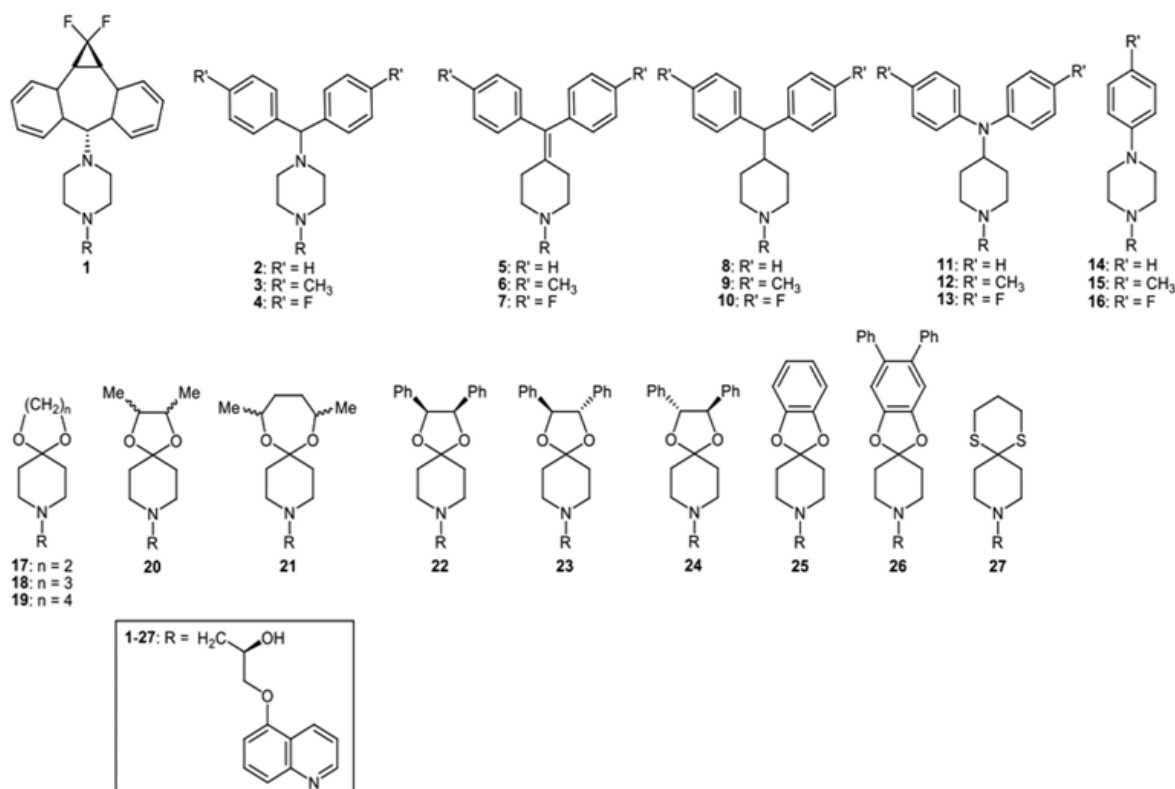


Abbildung 30: Strukturformeln aller Substanzen.

Anhand der Untersuchung der Wirkung der Testsubstanzen auf die Aktivität von drei ABC-Transportern sollte geklärt werden, ob und inwieweit sie sich als Modulatoren/Inhibitoren bewähren. Es wurde hierfür sowohl die Wirkung auf ATPase-Aktivität als auch auf die

Transport-Aktivität analysiert. Alle drei Proteine sind bewährte Modelle zur Untersuchung mikrobieller MDR-ABC-Transporter.

3.3.1 Einfluss auf die Aktivität von LmrA

Eines dieser Modellsysteme ist der MDR-ABC-Transporter LmrA aus *Lactococcus lactis*. Für die Analyse der Wirkung auf die Transport-Aktivität wurde der in 3.2.1 beschriebene zellbasierte Ethidium-Transport-Assay verwendet. Die Wirkung auf die ATPase-Aktivität wurde unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln untersucht.

Die Effekte der einzelnen Substanzen auf die Transport- und ATPase-Aktivität sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Grundsätzlich fällt auf, dass die ATPase-Aktivität und die Transport-Aktivität meist nicht in gleicher Weise von den Substanzen moduliert werden. Viele dieser Substanzen zeigten eine eher geringe Wirkung auf die ATPase-Aktivität, schränkten jedoch den Transport von Ethidium stark ein (Substanz **1,7,8,9,10** und **11**). Eine zweite Gruppe von Substanzen stimulierte die basale ATPase-Aktivität bei gleichzeitiger Inhibition der Transport-Aktivität (**19, 21-23** und **27**). Substanz **16** stellt in diesem Screening eine Besonderheit dar, da sowohl eine Stimulation der ATP-Hydrolyse als auch des Ethidium-Transports gemessen werden konnte. Einige Substanzen hatten keine Wirkung auf die Aktivität von LmrA, diese sind in der Tabelle grau markiert (Substanz **2,4,17,24** und **26**).

Tabelle 4: Ergebnisse des Screenings für LmrA. Wirkung der Testsubstanzen auf die ATPase- Und Transport-Aktivität von LmrA, bei einer Substanzkonzentration von 30 µM. Die Aktivitäten sind in Prozent angegeben, wobei die Aktivität ohne Substanzzugabe als 100 Prozent gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die resultierende Standardabweichung. Grau hinterlegt sind Substanzen die keinen Einfluss auf die Aktivität haben.

Substanz	ATPase-Aktivität [%]	Transport-Aktivität [%]
1	94,3 ± 1,6	51,8 ± 12,8
2	101,5 ± 10,5	100,6 ± 16,0
3	96,7 ± 5,9	89,5 ± 7,8
4	101,3 ± 7,1	110,9 ± 3,0
5	99,3 ± 22,4	89,8 ± 2,0
6	79,2 ± 7,8	108,8 ± 13,2
7	122,9 ± 20,9	43,5 ± 16,1
8	85,1 ± 3,1	30,5 ± 10,9
9	106,0 ± 9,5	69,0 ± 3,3
10	93,2 ± 7,9	38,2 ± 16,5

11	108,3 ± 12,7	44,0 ± 11,4
12	113,8 ± 14,5	91,7 ± 13,8
13	120,8 ± 20,3	95,7 ± 11,5
14	115,9 ± 2,9	112,1 ± 11,7
15	147,4 ± 12,3	107,1 ± 15,8
16	142,0 ± 14,1	148,8 ± 8,8
17	104,2 ± 12,8	94,3 ± 16,5
18	123,8 ± 13,1	131,3 ± 12,3
19	140,4 ± 1,3	75,2 ± 4,9
20	116,1 ± 9,5	99,0 ± 3,6
21	147,2 ± 6,6	70,0 ± 12,3
22	137,2 ± 5,6	34,7 ± 5,5
23	135,3 ± 2,4	40,9 ± 4,2
24	97,3 ± 4,7	94,6 ± 9,5
25	87,7 ± 27,7	96,3 ± 17,8
26	95,4 ± 1,6	99,5 ± 12,2
27	163,3 ± 6,7	48,7 ± 12,0

Die in Tabelle 4 zusammengefassten Ergebnisse dieses Screenings sind in Abbildung 31 zur besseren Anschauung graphisch dargestellt. Hier lässt sich auf einem Blick erkennen, dass die getesteten Substanzen durchaus in der Lage sind die Aktivität von LmrA zu modulieren. Es konnten 7 Substanzen identifiziert werden, die die Transport-Aktivität von LmrA stärker inhibieren als Substanz 1 (7, 8, 10, 11, 22, 23 und 27).

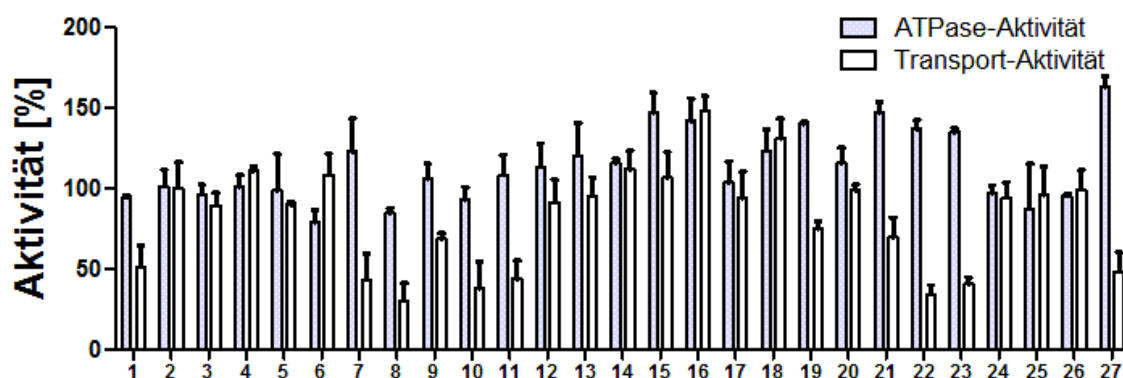


Abbildung 31: Substanz-Screening an LmrA. In Grau ist die ATPase-Aktivität von LmrA und in Weiß die Ethidium-Transportaktivität abgebildet. Es wurden 30 µM der zu testenden Substanz verwendet. Bei den angegebenen Werten für die Aktivität handelt es sich um relative Werte, wobei die Aktivität ohne Zugabe einer Test-Substanz als 100 % gesetzt wurde.

3.3.2 Einfluss auf die Aktivität von LmrCD

Das zweite Protein an dem die Substanzen getestet wurden ist LmrCD. Dieser Transporter setzt sich aus den beiden Proteinen LmrC und LmrD zusammen und ist ebenfalls ein *Lactococcus lactis*-MDR-System und maßgeblich für den MDR-Phänotyp dieses Bakteriums verantwortlich (siehe Einleitung). Für die Transport-Aktivitätsbestimmung kam hier ein *in vitro* Transport-Assay zum Einsatz, bei dem isolierte Membranvesikel verwendet wurden. Bei diesem bereits in der Literatur beschriebenen Assay wird Hoechst 33342 als Transport-Substrat genutzt. Die Verwendung dieses Testsystems hat den Vorteil, dass die resultierenden Werte für die Transport-Aktivität besser mit denen der ATPase verglichen werden können, da in beiden Fällen mit Membranvesikeln gemessen wird. Desweiteren ist bei LmrCD nicht der Effekt auf die basale ATPase-Aktivität betrachtet worden, sondern bei Anwesenheit des Transportsubstrats in der entsprechenden Konzentration. So konnte beobachtet werden, wie die Testsubstanzen die ATPase-Aktivität bei zusätzlicher Anwesenheit eines Substrates beeinflussen. Auf diese Weise kann so sicherer beurteilt werden ob eine gemessene Transport-Inhibition auf eine ATPase-Inhibition gründet. In Abbildung 32 A ist eine typische Messung des Hoechst-Transports ohne (Kontrolle) und mit Substanz 1 dargestellt, während 32 B die Auswertung veranschaulicht und die Wirkung der Substanzen auf die Steigung zeigt.

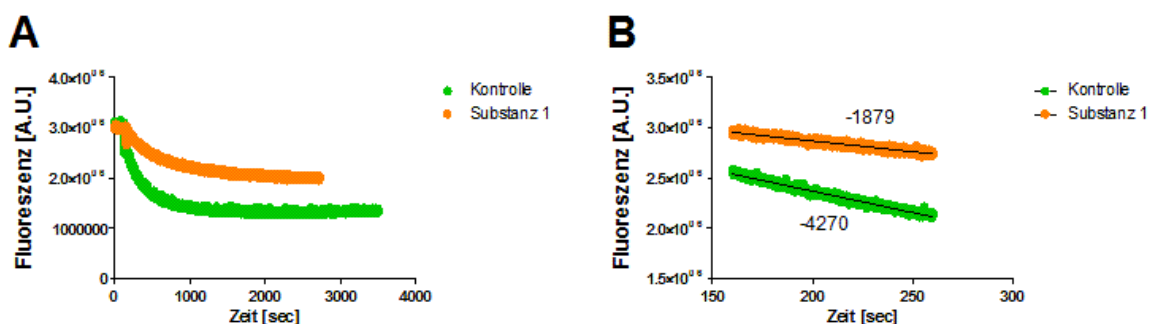


Abbildung 32: LmrCD-vermittelter Hoechst 33342-Transport. Hoechst-Transport in isolierten Membranvesikeln aus Zellen mit LmrCD-Expression, mit 30 μ M Substanz 1 (orange) und ohne Inhibitor (grün) (A). In (B) ist, der für die Berechnung der Steigung, Bereich mit Angabe der Steigung gezeigt.

Der Einfluss der synthetisierten potenziellen Inhibitoren auf die Aktivität von LmrCD ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Einige wenige Testsubstanzen hatten keine Wirkung auf die Aktivität von LmrCD, sie sind in Tabelle 5 zusätzlich grau markiert (Substanz **6**, **17**, **23** und **27**). Die meisten Substanzen zeigen eine moderate Inhibition sowohl der ATPase- als auch der Transport-Aktivität (Beispiel Substanz **10**), während 6 Substanzen lediglich die Transport-Aktivität hemmen (Substanz **1-5**, **24**). Bei dieser Analyse sticht besonders die Substanz **24** hervor, da sie den Transport massiv inhibiert (auf 11 %) während die ATP-Hydrolyse unbeeinflusst bleibt.

Tabelle 5: Ergebnisse des Screenings für LmrCD. Wirkung der Testsubstanzen auf die ATPase- Und Transport-Aktivität von LmrCD, bei einer Substanzkonzentration von 30 μ M. Die Aktivitäten sind in Prozent angegeben, wobei die Aktivität ohne Substanzzugabe als 100 Prozent gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die resultierende Standardabweichung. Grau hinterlegt sind Substanzen die keinen Einfluss auf die Aktivität haben.

Substanz	ATPase-Aktivität [%]	Transport-Aktivität [%]
1	118,9 $\pm$ 7,3	42,4 $\pm$ 1,5
2	100,9 $\pm$ 11,3	28,0 $\pm$ 0,4
3	110,3 $\pm$ 6,1	64,0 $\pm$ 3,9
4	101,6 $\pm$ 9,8	65,3 $\pm$ 2,3
5	102,3 $\pm$ 6,3	89,3 $\pm$ 3,0
6	95,5 $\pm$ 5,8	113,6 $\pm$ 6,1
7	85,6 $\pm$ 5,2	63,9 $\pm$ 3,9
8	85,6 $\pm$ 5,2	67,2 $\pm$ 4,0
9	79,5 $\pm$ 4,3	43,9 $\pm$ 3,3
10	82,7 $\pm$ 5,1	59,0 $\pm$ 4,0
11	88,9 $\pm$ 5,4	77,4 $\pm$ 2,5
12	61,9 $\pm$ 3,8	19,7 $\pm$ 0,6
13	123,1 $\pm$ 7,5	73,0 $\pm$ 1,2
14	85,3 $\pm$ 5,2	84,7 $\pm$ 4,9
15	70,5 $\pm$ 4,3	74,4 $\pm$ 2,4
16	76,1 $\pm$ 4,7	98,7 $\pm$ 3,6
17	95,9 $\pm$ 7,4	107,0 $\pm$ 6,4
18	80,5 $\pm$ 8,2	94,8 $\pm$ 2,5
19	87,2 $\pm$ 10,3	108,7 $\pm$ 8,2
20	88,4 $\pm$ 6,4	100,8 $\pm$ 9,5
21	99,1 $\pm$ 6,4	84,1 $\pm$ 1,1
22	114,3 $\pm$ 7,0	96,9 $\pm$ 3,2
23	105,6 $\pm$ 6,5	95,8 $\pm$ 16,7

24	103,8 ± 4,0	11,2 ± 2,3
25	95,1 ± 5,8	83,5 ± 3,0
26	111,2 ± 6,8	129,3 ± 5,5
27	95,8 ± 10,8	91,4 ± 3,0

Die in Tabelle 5 zusammengefassten Ergebnisse des Screenings für LmrCD sind in Abbildung 33 graphisch dargestellt. Anhand dieser Abbildung kann man erkennen, dass bei dieser Testung die Substanzen **2**, **12** und **24** effektiver den Transport inhibieren als Zosuquidar. Desweiteren verdeutlicht diese Abbildung, dass auch in diesem Fall die effektiveren Testsubstanzen den Transport stärker inhibieren als die ATPase-Aktivität. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden *Lactococcus lactis*-Proteine so stellt man fest, dass die Aktivität von LmrCD nur von wenigen der Testsubstanzen aber dafür stärker moduliert wird. Inwiefern dies eventuell auf die verschiedenen Testsysteme oder auf das Transportsubstrat zurückzuführen ist wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

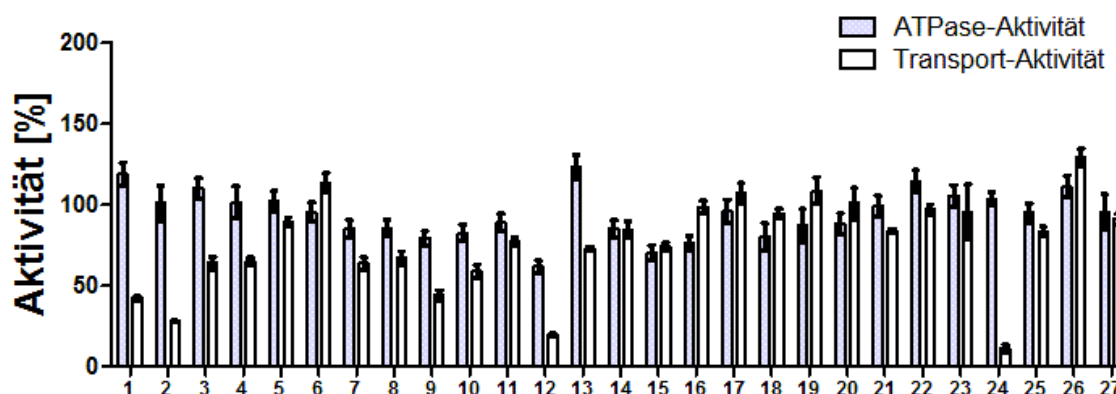


Abbildung 33: Substanz-Screening an LmrCD. In Grau ist die ATPase-Aktivität von LmrCD und in Weiß die Hoechst 33342-Transportaktivität abgebildet. Es wurden 30 µM der zu testenden Substanz und 1 µM Hoechst 33342 als Substrat verwendet. Bei den angegebenen Werten für die Aktivität handelt es sich um relative Werte, wobei die Aktivität ohne Zugabe einer Test-Substanz als 100 % gesetzt wurde.

3.3.3 Einfluss auf die Aktivität von Pdr5 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Ziel des Screenings war es das Potential dieser Testsubstanzen als Inhibitoren nicht nur für bakterielle MDR-ABC-Transporter zu erörtern sondern allgemein für mikrobielle Transporter, daher sollte der Einfluss dieser auch an ein eukaryotisches MDR-Protein untersucht werden. Dazu wurde das aus *S. cerevisiae* stammende Pdr5 verwendet. Die Auswahlkriterien waren, dass die Aktivitätsmessungen gut etabliert sind und sich verlässlich quantifizieren lassen. Desweiteren ist Pdr5 ein Homolog von Cdr1, ein ABC-Transporter des pathogenen Pilzes *Candida albicans*, so dass sich bei vielversprechenden Ergebnissen eventuelle therapeutische Einsatzmöglichkeiten ergeben. Für die Messung der Transport-Aktivität wurde das hochaffine Substrat von Pdr5 Rhodamin 6G verwendet. Wie auch bei LmrCD wurde auch hier ein *in vitro* Transport-Assay, unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln, genutzt und die ATP-Hydrolyse im Beisein von R6G gemessen.

In Abbildung 34 ist eine Beispielmessung für den R6G-Transport mit und ohne Substanz **1** dargestellt (A). Die Vorgehensweise der Quantifizierung der Transport-Aktivität über die Steigung, ist in Abbildung 34 B veranschaulicht.

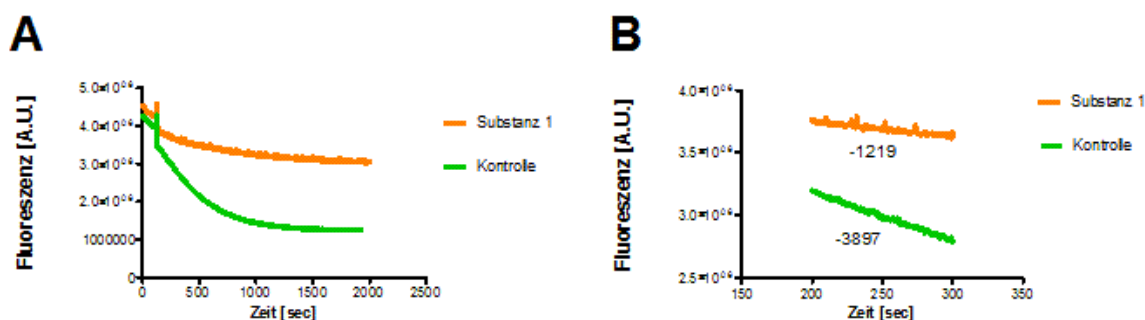


Abbildung 34: Beispielmessung des Pdr5-vermittelten R6G-Transports und Wirkung von Substanz **1**. Messung des R6G-Transports unter Verwendung von isolierten Membranvesikeln (A). In grün ist die Messung ohne eine Testsubstanz dargestellt und in orange der Verlauf bei Zugabe von 5 μ M Substanz **1**. In (B) ist der Bereich der Messungen gezeigt der für die Errechnung der Steigung verwendet wurde.

Tabelle 6: Ergebnisse des Screenings für Pdr5. . Wirkung der Testsubstanzen auf die ATPase- Und Transport-Aktivität von Pdr5, bei einer Substanzkonzentration von 5 μ M. Die Aktivitäten sind in Prozent angegeben, wobei die Aktivität ohne Substanzzugabe als 100 Prozent gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die resultierende Standardabweichung.

Substanz	ATPase-Aktivität [%]		Transport-Aktivität [%]	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
1	30,0	3,6	23,7	5,3
2	70,8	5,8	23,7	9,7
3	45,0	4,2	24,2	7,2
4	66,5	8,5	21,9	5,6
5	79,2	6,7	33,1	7,0
6	39,9	5,2	15,7	2,5
7	37,4	3,7	0,9	0,2
8	95,5	6,5	83,4	8,9
9	53,8	3,5	51,0	15,3
10	58,4	7,9	13,6	4,3
11	49,5	5,7	14,0	5,5
12	24,2	6,8	32,7	2,7
13	38,9	5,0	37,5	7,6
14	116,5	5,6	43,0	4,8
15	87,4	4,2	39,1	0,8
16	94,8	8,2	29,3	3,5
17	114,1	6,2	54,7	11,4
18	78,1	7,2	81,5	8,1
19	160,2	6,3	78,7	10,7
20	117,9	4,5	83,8	9,4
21	59,2	9,8	74,0	12,9
22	79,1	9,4	30,7	13,1
23	38,0	5,8	27,2	1,5
24	16,1	5,0	30,7	10,0
25	35,1	7,8	12,5	6,9
26	66,9	7,7	83,2	11,4
27	95,0	8,1	65,1	13,2

Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Transport- und ATPase-Aktivität von Pdr5 ist in Tabelle 6 bzw. in Abbildung 35 zusammengefasst. Prinzipiell konnte die meisten (18 von 27) Substanzen die Transport-Aktivität von Pdr5 um mehr als 50 % inhibieren. Auch die ATP-Hydrolyse konnte von vielen (10 von 27) Testsubstanzen gehemmt werden, wobei der Transport effektiver unterdrückt werden konnte. Fünf der Testsubstanzen bewirkten mit Werten von 84-99 % eine stärkere Inhibition der Transport-Aktivität von Pdr5 (**6**, **7**, **10**, **11** und **25**) als Zosuquidar (76 %). Der überwiegende Teil der Substanzen hatte eine ähnlich oder geringfügig niedrigere Wirkung als der P-Glykoprotein-Inhibitor (Beispiel **24**). Bei Betrachtung von Abbildung 35 fällt auf, dass Substanz **19** die ATPase-Aktivität um das 1,6-fache deutlich stimuliert, dies ist insofern interessant als dass nicht viele Substanzen bekannt sind die eine Stimulation der ATP-Hydrolyse von Pdr5 bewirken.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei den Substanz **8**, **9** und **10** die Art der Reste an den beiden Phenylringen eine Rolle spielen. Handelt es sich dabei um Fluor-Atome (Substanz **10**) ist der Einfluss weit aus stärker (14 % Resttransport-Aktivität) als bei Methyl-Gruppen (Substanz **9**) in derselben Position (51%). Substanzen bei denen die Fluor-Atome durch Protonen ersetzt wurden zeigten einen eher geringen Effekt (Substanz **8**, 83% Restaktivität). Derselbe Trend konnte auch für die Substanzen **5**, **6** und **7** festgestellt werden. Sind hingegen die beiden Phenylringe über ein Stickstoff mit dem Piperidin-Rest (Substanzen **11**: 14 %, **12**: 33 % und **13**: 37% Restaktivität) verbunden ist der gegenteilige weniger stark ausgeprägte Effekt beobachtet worden. Wird der Piperidin-Rest durch ein Piperazin-Rest ausgetauscht wie bei den Substanzen **2** (24 %), **3** (24 %) und **4** (22 %) sind die Reste an den Phenylringen unwichtig. Der beschriebene Trend gilt nur für die Transportaktivität von Pdr5, jedoch nicht für die ATPase-Aktivität. Für die Transportaktivität von LmrA und LmrCD konnte kein derartiger Trend abgeleitet werden.

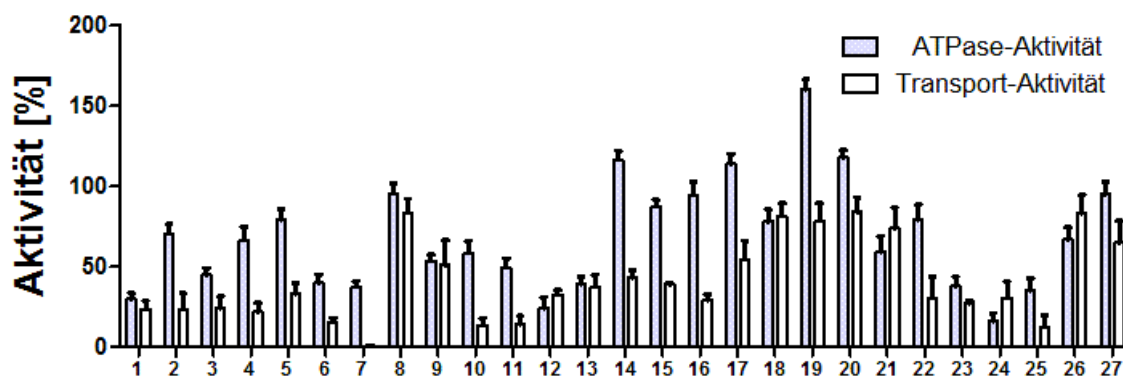


Abbildung 35: Substanz-Screening an Pdr5. In Grau ist die oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität von Pdr5 und in Weiß die R6G-Transportaktivität abgebildet. Es wurden 5 μM der zu testenden Substanz und 150 nM R6G als Substrat verwendet. Bei den angegebenen Werten für die Aktivität handelt es sich um relative Werte, wobei die Aktivität ohne Zugabe einer Substanz als 100 % gesetzt wurde.

Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings wurden vier repräsentative Substanzen (**2**, **7**, **11**, **23**) ausgewählt um die Inhibition detaillierter zu untersuchen. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der IC_{50} -Wert-Bestimmung für die Transport- (links) und ATPase-Aktivität (rechts) zusammengefasst. Wie man bereits aus der ersten Analyse schließen konnte beeinflussen die Substanzen im stärkeren Maße die Transport-Aktivität, so konnten hier IC_{50} -Werte von 0,3-0,9 μM ermittelt werden, während sie für die ATPase-Aktivität zwischen 4 und 20 μM lagen. Diese Beobachtung ist bei Substanz **2** am deutlichsten, da für die ATPase-Aktivität der Wert bei 19,6 μM lag, während für die Transport-Aktivität 0,8 μM ermittelt wurden. Überraschenderweise wurde für Substanz **11** ein niedrigerer IC_{50} -Wert für den Transport bestimmt als für Substanz **7** (0,3 vs. 0,9 μM), obwohl laut dem ersten Screening Substanz **7** der effektivere Inhibitor war.

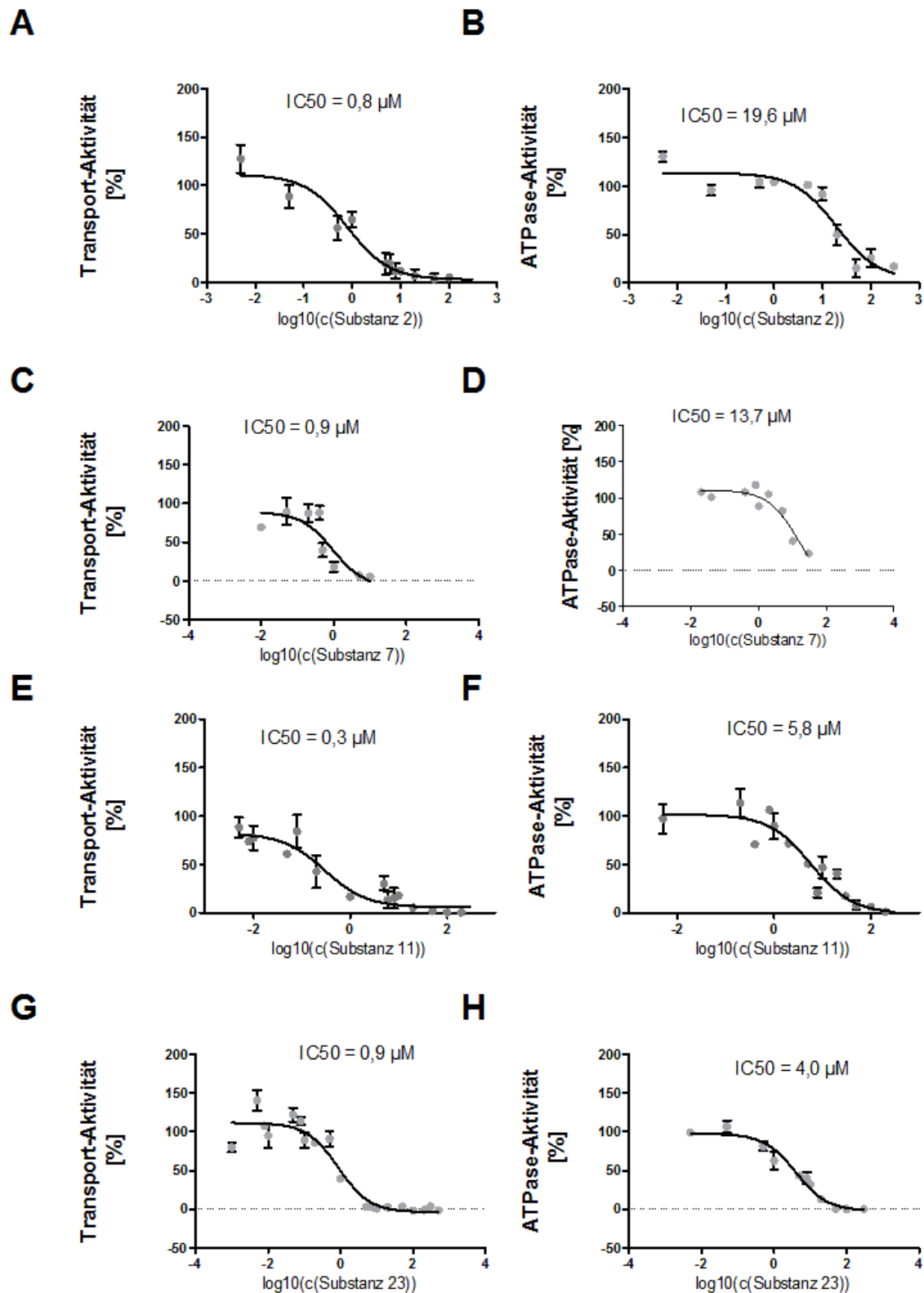


Abbildung 36: Bestimmung der IC₅₀-Werte für die Transportaktivität und ATPase-Aktivität von Pdr5. Bestimmung der IC₅₀-Werte für die Substanzen **2** (A und B), **7** (C und D), **11** (E und F) und **23** (G und H).

3.3.4 Vergleich der Ergebnisse des Screenings

Es konnte anhand dieser Studie gezeigt werden, dass sowohl Zosuquidar als auch davon abgeleitete Substanzen die Aktivität mikrobieller ABC-Transporter beeinflussen können. Für alle drei Proteine konnten Substanzen identifiziert werden, die einen größeren Einfluss auf die Transport-Aktivität hatten als Zosuquidar. Im Vergleich zu Pdr5 mussten für die Inhibition der bakteriellen Proteine LmrA und LmrCD die Inhibitoren in einer wesentlich höheren Konzentration eingesetzt werden, jedoch ist ein direkter Vergleich nur anhand der jeweiligen IC_{50} -Werte möglich. Desweiteren zeigte sich zwar auch bei dem Screening für Pdr5, dass es Substanzen gab, die die Aktivität eher geringfügig beeinflussten, allerdings gab es keine, die gar keine Wirkung hatten, wie das bei LmrA und LmrCD beobachtet werden konnte.

In Abbildung 37 sind die Strukturformeln der Substanzen dargestellt, die die jeweiligen Proteine in größerem Maße inhibiert haben als Zosuquidar. LmrCD wird am effektivsten von den Substanzen **2**, **12** und **24** inhibiert. Diese drei Substanzen erzielten jedoch bei LmrA und Pdr5 keine stärkere Inhibition als die „Ausgangssubstanz“. Hingegen hatten die Substanzen **7**, **10** und **11** sowohl bei LmrA als auch bei Pdr5 einen stärkeren Einfluss auf die Transport-Aktivität als Zosuquidar. Überraschenderweise konnte also eine Überlappung bei den Inhibitoren für LmrA und Pdr5, jedoch keine zwischen LmrA und LmrCD festgestellt werden.

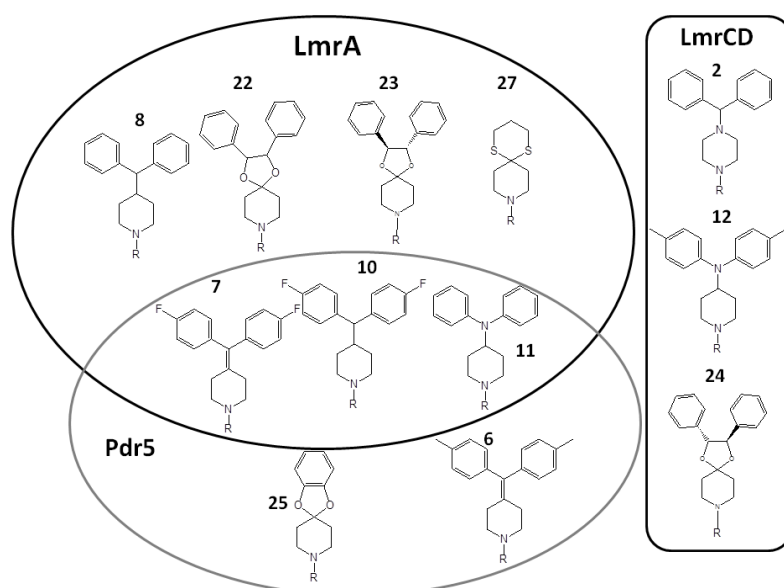


Abbildung 37: Ergebnisse des Screenings. Dargestellt sind die Strukturformeln des variablen Teils der Zosuquidar-Derivate, die die Transport-Aktivität von den jeweiligen Proteinen stärker beeinflusst haben als Zosuquidar.

4 Diskussion

4.1 Der ABC-Transporter LmrA

4.1.1 Die ATPase-Aktivität von LmrA

Die Aktivitäts-Analyse von LmrA in Proteoliposomen und Detergenzmizellen unter Verwendung von DDM oder FC-16 ergab zwei reaktive Spezies, solubisiertes LmrA in FC-16-Lösung ($V_{\max} = 126 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ und $K_m = 0,4 \text{ mM}$) und rekonstituiertes LmrA unter Verwendung von DDM ($V_{\max} = 128 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ und $K_m = 0,6 \text{ mM}$) (siehe Tabelle 1). In beiden Fällen konnte ein ähnlicher k_{cat} -Wert von 8 min^{-1} ermittelt werden. In isolierten Membranvesikeln ist die ATPase-Aktivität erwartungsgemäß höher ($V_{\max} = 307 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ und $K_m = 0,7 \text{ mM}$), da sich hier LmrA in seiner natürlichen Membran befindet. Die K_m -Werte sind für die beiden LmrA-Proben in einer Lipidumgebung (DDM-Rek und Membranvesikel) unter Beachtung der Standardabweichung (siehe Tabelle 1) identisch. Hinsichtlich der publizierten Werte für die ATPase-Aktivität von LmrA bestehen einige Diskrepanzen. So wird die Aktivität von LmrA in Proteoliposomen unter Verwendung von DDM in [152] mit einem Wert von ca. $240 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ angegeben, während diese laut [162] lediglich $126 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ beträgt. Für die Berechnung der Aktivität ist die Kenntnis über die effektive Proteinkonzentration notwendig, da nur LmrA-Moleküle an der ATP-Hydrolyse beteiligt sind, die so in den Liposomen eingelagert sind, dass die NBDs ins äußere Milieu ragen. Über die Relation der beiden Orientierungen in den Proteoliposomen machen beide Publikationen keine Angaben, und in dieser Arbeit konnte diese nicht bestimmt werden, jedoch ist aus einer früheren Publikation eine 1:1 Relation ermittelt worden [125]. Die zweite und relevantere Diskrepanz besteht hinsichtlich der ATPase-Aktivität der E512Q Mutante von LmrA, während diese in dieser Arbeit (siehe Abbildung 8) und [152] inaktiv ist bzw. weniger als 3 % der wt-LmrA-Aktivität beträgt, ist in [162] von einer identisch hohen Aktivität berichtet worden.

Über die ATPase-Aktivität von LmrA in einer FC16-Lösung ist in der Literatur nichts bekannt, jedoch scheint sie, wenn man den gemessenen K_m -Wert mit denen für rekonstituiertes LmrA im Fall von DDM und in Membranvesikeln vergleicht, mit der in einer Lipidumgebung vergleichbar zu sein. Die verringerte Aktivität nach der Rekonstitution dieser Proben ist momentan nicht zu erklären. Allerdings ist es möglich, dass in diesem Fall ein höherer Anteil des eingesetzten Proteins die falsche Orientierung in den Liposomen besitzt. Bei der Rekonstitution mit FC16 konnte ohnehin ein relativ hoher Proteinverlust von 40 % des eingesetzten LmrA beobachtet werden, hingegen betrug der Verlust bei DDM weniger als 10 %.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in DDM solubilisiertes LmrA im Gegensatz zu LmrA in einer FC16-Mizelle eine sehr geringe ATPase-Aktivität besitzt ($V_{\max} = 27$ nmol/(mg*min) und $K_m = 2$ mM, siehe Tabelle 1). Ein Erklärungsansatz dafür ist, dass in der DDM-Probe der Anteil an LmrA im dimeren Zustand kleiner ist als in der FC16-Probe. Zu dieser Annahme lässt sich sagen, dass sowohl für FC16 als auch für DDM mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden konnte, dass es sich bei beiden Proteinproben nicht um eine homogene Spezies handelt (Abbildung 10 und 11). Für beide Proteinproben konnten zwei Peaks beobachtet werden, die nicht vollständig bei der verwendeten Säule getrennt werden konnten. Über die genaue Größe der beiden Peaks kann keine Aussage getroffen, allerdings entsprechen die Abstände der beiden Teil-Maxima in den Chromatogrammen der Größenausschluss-chromatographie nicht einer möglichen Auftrennung zwischen Dimer und Monomer. Die jeweiligen Peaks wurden zusätzlich mittels einer Blue-Native-PAGE untersucht (Abbildung 11), hierbei zeigte sich, dass auch diese aus zwei oligomeren Spezies von LmrA bestehen. Insgesamt konnte die These über eine fehlende dimere LmrA-Spezies in der DDM-Lösung nicht bestätigt werden, da die DDM- und FC16-Proben sich ähnlich heterogen zeigen. In einer vorangegangenen Arbeit in der LmrA ebenfalls mit FC16 und DDM isoliert wurde, und eine Kalibrierung der Chromatographie-Säule erfolgte, konnte für die DDM-Probe ein Molekulargewicht von rund 440 kDa und für FC16 von ca. 600 kDa ermittelt werden [158]. In einer anderen Publikation konnte mittels Massenspektrometrie in den mit DDM isolierten Proben sowohl ein Tetramer als auch ein LmrA-Dimer gefunden werden[87].

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass bei DDM ein für die Aktivität von LmrA wichtiges Lipid, im Gegensatz zu FC16, nicht solubilisiert wird. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass beide Proteinproben nachweislich einen hohen Lipid-Gehalt aufweisen (Abbildung 12 und 13). Die genaue Identifizierung dieser und deren verhältnismäßige Zusammensetzung muss noch untersucht werden. Gerade im Hinblick auf die bereits berichtete spezifische Bindung von Cardiolipin durch LmrA [87] ist das der wahrscheinlichere Grund für die geringe Aktivität bei der Isolierung mit DDM. In der genannten Publikation konnte durch Untersuchungen von isoliertem LmrA mittels Massenspektrometrie Cardiolipin nachgewiesen werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die *L. lactis*-Membran aus rund 42 % (m/m) Cardiolipin besteht [163]. Sollte es aber so sein, dass DDM nicht ausreichend Cardiolipin solubilisiert, so kann dies durch die Rekonstitution wieder ausgeglichen worden sein und so die Ergebnisse in dieser Arbeit erklären. Zwar unterscheiden sich die Membranen von *E. coli* und *L. lactis* in ihrer Lipidzusammensetzung, aber auch der verwendete *E. coli*-Lipidextrakt (Avanti, total lipid extract und polar lipid extract) besteht aus rund 10 % (m/m) Cardiolipin (Hersteller-Angabe). Als nächsten Schritt sollte der isolierten LmrA-Probe in DDM-Lösung Cardiolipin hinzutitriert werden und die ATPase-Aktivität erneut überprüft werden. Interessanterweise ist in der genannten Publikation bei der Cardiolipin in der isolierten LmrA-Probe gefunden wurde ebenfalls DDM verwendet worden, wobei hier eine ATPase-Aktivität von rund 24 nmol/(mg*min), bei einer ATP-Konzentration von 2 mM, gemessen wurde. Dies stimmt mit der in dieser Arbeit gemessenen Aktivität überein ($V_{\max} = 27 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ und $K_m = 2 \text{ mM}$).

Auch sind es die aktiveren LmrA-Proben, die eine für MDR-ABC-Transporter typische Substratstimulation zeigen (Abbildungen 15- 18) [164]. Alle Proben wurden auf das 1,6-fache ihrer basalen Aktivität stimuliert. Bei LmrA in einer FC16-Lösung entsprach die stimulierte Aktivität (110 nmol/(mg*min)) in etwa dem $V_{\max}$ -Wert. Ungewöhnlicherweise, war bei LmrA in einer Lipidumgebung (rekonstituiert bei DDM und Membranvesikel) die stimulierte Aktivität größer als die entsprechenden $V_{\max}$ -Werte für die ATP-Hydrolyse (DDM-Rek: 113 vs. 197 nmol/(mg*min) und Membranvesikel: 330 vs. 546 nmol/(mg*min), siehe Abbildung 18). Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, sollte die Kinetik der ATP-Hydrolyse in Membranvesikeln mit Rhodamin 123 gemessen werden. Vergleicht man die Konzentrationen bei denen die maximale Stimulation beobachtet wurde, so ist diese für die natürlichere Umgebung, Membranvesikel, mit 25 nM Rhodamin 123 am geringsten, und in

der FC16-Mizelle mit 200 nM am höchsten (Abbildungen 16-18), in Proteoliposomen ist es 100 nM. Dieser Unterschied kann zum einen an unterschiedlichen lokalen Konzentrationen für das Protein liegen, so kann es sein dass bedingt durch unterschiedliche Verteilungskoeffizienten, die Einlagerung des Rhodamins in einer biologischen Membran besser ist als in einer Detergenzmizelle. Desweiteren ist möglicherweise die genaue Zusammensetzung der Lipidumgebung für den Zugang des Rhodamins zur Bindestelle in LmrA von Bedeutung. Im Gegensatz zu den Proteoliposomen, für die *E. coli*-Lipide verwendet wurden und lediglich LmrA in hoher Konzentration eingebettet ist, ist bei den isolierten Membranvesikeln die tatsächliche *Lactococcus lactis*-Membran gegeben, sodass die Zugänglichkeit der Bindestelle für Rhodamin besser sein könnte.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Detergens eine entscheidende Rolle für die *in vitro* Aktivität von LmrA spielt. Für Messungen der Aktivität in einer Detergenz-Lösung ist DDM ungeeignet, da entweder die Mizelle an sich oder das Fehlen eines Lipids (möglicherweise Cardiolipin) zu einer stark verringerten Aktivität führt. Weiterhin ist beobachtet worden, dass eine hohe basale ATPase-Aktivität mit einer besseren Ansprechbarkeit auf das Substrat Rhodamin 123, messbar an der Stimulation der Aktivität, einhergeht. Dies könnte an einer Konformation des LmrA in der Mizelle liegen, bei der die Substratbindestelle unzugänglich ist.

4.1.2 Der LmrA-vermittelte Ethidium-Transport

Ein zellbasierte Ethidium-Transport-Assay ist in der Literatur [159] für LmrA beschrieben. In diesem Fall wurde eine Abnahme der Fluoreszenz bei Glukose-Zugabe beobachtet. Dabei geht man davon aus, dass Ethidium-Moleküle aus der Zelle ins extrazelluläre Medium transportiert werden und somit zum Abfall des Signals führen. Im Zuge dieser Arbeit wurde jedoch das Gegenteil beobachtet (Abbildung 21). Eine wahrscheinliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Fluoreszenzauslöschung. Es ist bekannt, dass bei hohen Konzentrationen, DNA-ungebundene Ethidium-Moleküle die Fluoreszenz von komplexierten Ethidium-Molekülen auslöschen [165]. Somit wäre das niedrigere Fluoreszenzsignal bei Zellen mit E512Q-LmrA-Expression auf eine sehr hohe Konzentration zurückzuführen, was durch eine rein optische Beurteilung der Zellen (Abbildung 22) bereits bestätigt werden konnte. Und umgekehrt sorgen die aktiven Transporter LmrA und LmrCD für eine weitestgehende Reduzierung der intrazellulären Ethidium-Konzentration nach der Reenergetisierung mit Glukose, so dass die Fluoreszenzauslöschung nicht mehr zum Tragen kommt. Bei Verwendung einer geringeren Ethidymbromid-Konzentration (9 μM) (Abbildung 20) konnte beobachtet werden, dass der Unterschied zwischen Zellen mit aktivem und inaktivem LmrA schwächer ausgeprägt war. Vorstellbar ist, dass durch Messungen mit immer niedrigeren Ethidymbromidkonzentrationen der Effekt der Fluoreszenzlöschung soweit verringert werden kann, dass die erwartete Fluoreszenzabnahme beim Efflux beobachtet werden kann. Denn der auffälligste Unterschied zwischen dem publizierten Assay und dem hier verwendeten liegt in den verwendeten Ethidymbromid-Konzentrationen, 2 μM in [159] und 30 μM in dieser Arbeit.

Desweiteren wurden in den beiden Assays die Zellen auf unterschiedlicher Art de-energetisiert. In dieser Arbeit wurde 2-Deoxy-D-Glukose unter Eiskühlung verwendet, während in [159] 2,4-Dinitrophenol bei 30 °C zum Einsatz kam. Die beiden Substanzen greifen an unterschiedlichen Stellen des Stoffwechsels ein. Durch das Fehlen der OH-Gruppe am C2 der 2-Deoxy-D-Glukose wird dessen Metabolisierung verhindert. Der zweite Schritt der Glykolyse, die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat kann mit 2-Deoxyglukose-6-phosphat nicht durchgeführt werden und es kommt zum Abbruch der Glykolyse. Zusätzlich induziert 2-Deoxyglukose-6-phosphat die Glukose-Repression. 2,4-

Dinitrophenol hingegen ist ein sogenannter Protonenionophor, der den für die ATP-Synthese notwendigen Protonengradienten abbaut. Bei diesem Prozess geht die im Protonengradienten gespeicherte Energie als Wärme ungenutzt verloren, der Stoffwechsel wird zur Kompensation der geringen ATP-Synthese erhöht. Die physiologische Wirkung beruht demnach auf einer Erhöhung des Stoffwechsels. Inwiefern die beiden Substanzen sich durch Waschen der Zellen komplett entfernen lassen ist unklar, jedoch ist eine Re-energetisierung durch Zugabe von Glukose im Falle von 2-Deoxy-D-Glukose wahrscheinlicher.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt Energie-abhängig ist (Abbildung 21), denn bei Zellen ohne Glukosezugabe konnte ein ähnlich niedriges Fluorezenzsignal, wie für Zellen mit E512Q-LmrA-Expression gemessen werden. Zusätzlich wurden zur Abklärung des Phänomens Zellen mit LmrCD-Expression verwendet, wobei auch bei diesen Zellen ein Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen wurde.

Anhand konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie-Bilder konnte bestätigt werden, dass LmrA in der Lage ist Ethidium-Ionen zu transportieren (Abbildung 23 und 24), da lediglich bei den Zellen mit E512Q-LmrA-Expression eine hohe Intensität der Ethidium-Fluoreszenz nach der Reenergetisierung beobachtet werden konnte.

4.1.3 Einfluss der LmrA-Expression

Die Entdeckung der veränderten Morphologie von *Lactis*-Zellen bei Überexpression der inaktiven LmrA-E512Q-Mutante, die sich durch verlängerte Zellen auszeichnet (3.2.2), wurde bei den mikroskopischen Untersuchungen des Ethidium-Transports gemacht. In Anbetracht der Tatsache, dass LmrA kein essentielles Protein ist und die Deletion des Gens keine bislang beobachtete Wirkung zeigte, ist dies besonders unerwartet. Grundsätzlich ist der Sachverhalt erwähnenswert, dass auch der LmrA-vermittelte MDR-Phänotyp lediglich bei hoher Expression in anderen Organismen beobachtet wurde und nicht in *Lactococcus lactis* [9]. Hingegen konnte in *Lactococcus lactis* gezeigt werden, dass LmrA LmrB funktionell ersetzen kann [166]. LmrB ist ebenfalls ein ABC-Transporter der bei Stämmen, die kein LmrA-Gen auf dem Chromosomen besitzen, auf Plasmiden codiert wird. Obwohl auch hier der Name LmrB für „multidrug resistance“ steht, sind die eigentlichen Substrate die beiden Bakteriocine LsbA und LsbB. Daher wird auch bei LmrA die Funktion eines Peptid-Transporters diskutiert[33].

Die Einschätzung einer gewöhnlichen Morphologie von *Lactococcus lactis* muss differenzierter betrachtet werden, denn es gibt sowohl haploide Laborstämme wie der IL1403 mit haploiden Chromosomensatz und kockenförmiger Erscheinung, als auch diploide wie MG1363 mit verlängerten Zellen [167]. In der genannten Publikation sind die Bakterien in definierten Medien (Minimalmedium) kultiviert worden und nicht wie in dieser Arbeit in GM17-Medium. Der in dieser Arbeit verwendete NZ9000-Stamm ist aus dem MG1363-Stamm abgeleitet, jedoch ist auch der MG1363-Stamm bei den hier verwendeten Wachstumsbedingungen kockenförmig, 0,2 µm lang und in der Lage längere Ketten auszubilden [168], wie es bei Aufnahmen von Zellen ohne Expression und mit Expression von wt-LmrA und LmrCD beobachtet wurde (Abbildung 24 und 26). Interessanterweise ergaben Untersuchungen von *Lactis*-Stamm MG 1363 unter hohem Druck (größer 50 MPa) eine ähnliche Veränderung der Morphologie [168]. Auch hier wurden verlängerte Zellen beobachtet, jedoch waren die Zellen auch weiterhin in der Lage Ketten zu bilden. Dies wurde bei E512Q-LmrA-Expression nicht beobachtet (siehe Abbildung 26). In der genannten Arbeit wurde dabei eine verminderte Zellteilungsrate, anhand der Detektion des bakteriellen Zytoskelett Proteins Ftz für die Ausbildung des Septalringes mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet. Weiterhin wurde eine verminderte Aktivität der Muramidase

AcmA vermutet, da es vermeintlich das einzige Protein von *Lactococcus lactis* MG 1363 mit dieser Funktion ist und somit essentiell für die Zellseparation ist. Das Gen für AcmA wird momentan als LLNZ_01465 im Genom von NZ9000 bezeichnet. Vergleicht man die Transkriptome von E512Q- und wt-LmrA-exprimierenden Zellen, so gehört acmA tatsächlich zu den differentiell exprimierten Genen mit einem P-Wert von 0,006. Allerdings beträgt der Faktor lediglich 1,07 und unerwarteter Weise ist es bei Zellen mit E512Q-LmrA-Expression höher transkribiert (normalisierte Mittelwerte E512Q:300 und wt:280). Somit kann zumindest eine AcmA-Beteiligung bei dem in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen ausgeschlossen werden.

Die Veränderung von einer typischen Form für kockenartige Bakterien zu Stäbchenförmigen trat lediglich bei E512Q-LmrA-Expression auf, wobei dieser Phänotyp tatsächlich erst nach Induktion entsteht (Abbildung 27). Eine verminderte Zellteilungsrate kann aufgrund der bislang bestehenden Daten nicht mit Sicherheit belegt werden, jedoch deuten grobe Messungen des Kulturwachstums auf eine Wachstumsinhibition nach Induktion der Proteinexpression durch Nisin-Zugabe (Abbildung 28) hin. Diese Wachstumsinhibition ist bei E512Q-LmrA-Expression wesentlich ausgeprägter als bei Zellen mit wt-LmrA-Expression und kann somit nicht durch eine hohe Proteinexpression erklärt werden, denn diese ist für beide Proteine identisch.

Für eine ausführliche Betrachtung des Unterschiedes für die *Lactococcus lactis*-Zellen bei LmrA-Expression wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Es wurden vorwiegend die Ergebnisse des Vergleichs vor und nach wt-LmrA-Expression betrachtet, da diese als signifikant beurteilt wurden (Tabelle 2 und 3). Die erhöhte Expression von DNA-Bindung und Reperatur Proteinen (LLNZ_02130 und LLNZ_05765) ist momentan nicht zu erklären und ist vermutlich LmrA-spezifisch da sie in einer anderen Studie, bei der der Einfluss der Expression diverser Membranproteine [95], nicht beschrieben sind. Ein bedeutendes Ergebnis ist die verminderte Transkription des Transkriptionsregulators aus der „multiple antibiotic resistance Regulator“ (MarR)-Familie LLNZ_09220, da es möglicherweise an der natürlichen Regulation der LmrA-Expression beteiligt sein könnte. Das zweite interessante Ergebnis ist das Gen LLNZ_0956, das in den Zellen mit LmrA-E512Q-Expression transkribiert wird. Die Rolle dieser möglichen Esterase für die Funktion von LmrA muss in Folgearbeiten erforscht werden. Die räumliche Nähe des Gens zum LmrA-Gen im Genom, könnte auf einen

funktionalen Zusammenhang hindeuten. So ist bereits in der Vergangenheit im Fall von *Bacillus subtilis* Mutidrug Transporter Blt festgestellt worden, dass es gemeinsam mit dem Gen für eine Acetyltransferase (bltD) ein Operon bildet, und dass das Produkt von bltD das natürliche Transport-Substrat darstellt [50]. Die Tatsache aber, dass in unserem Fall das Gen LLNZ_0956 bei EQ-LmrA häufiger detektiert wurde, spricht eher dafür dass die Zellen es benötigen, um das eigentliche Transport-Substrat abzubauen bzw. zu modifizieren, da E512Q-LmrA nicht den Transport bewerkstelligen kann. Grundsätzlich muss man an dieser Stelle betonen, dass nichts über die natürliche Regulation der LmrA-Expression und dessen Operon bekannt ist und der angemerkte mögliche funktionale Zusammenhang zwischen LLNZ_0956 und LmrA spekulativ ist.

Die genaue zeitliche und räumliche Regulation Peptidoglycanschichtbildung während der Zellteilung sind für die Morphologie von bakteriellen Zellen entscheidend, wobei sowohl der FtsZ-Ring als auch die Lokalisation von Penicillin-Binde-Proteinen (PBPs) an der Teilungsstelle notwendig sind [169]. Die Lokalisation von PBPs erfolgt über ihre Substrate, bei denen es sich um Peptidoglykane (PGs) oder lipid-gebundenen Peptidoglykan-Vorstufen handelt, die zunächst aus der Zelle transportiert werden müssen. Es konnte bereits für *Lactococcus lactis* gezeigt werden, dass Veränderungen dieser PGs zu Veränderungen der Morphologie führen, die denen in dieser Arbeit beschriebenen ähneln [170]. Somit ist es denkbar, dass das natürliche Substrat von LmrA ein PBP-Substrat ist. Bei Expression von E512Q-LmrA kann das Substrat nicht transportiert werden und führt auf diese Weise zu einer verminderten Lokalisation von PBPs und somit zur Disregulation der Zellwandbildung, die bestimmend für die Morphologie einer bakteriellen Zelle ist. Diese Abhängigkeit von funktionalem LmrA der *Lactococcus lactis*-Zellen scheint sich jedoch erst bei hoher Produktion von Membranproteinen zu manifestieren. Zwar ist *Lactococcus lactis* ein gängiges Expressionssystem für Membranproteine [96], jedoch ist die Expression von LmrA mit 30 % aller Membranproteine außergewöhnlich hoch [33]. Weiterhin konnte bereits nachgewiesen werden, dass LmrA zu den hochregulierten Proteinen in *Lactococcus lactis* bei Expression von Membranproteinen gehört [95]. Um diese Hypothese zu untermauern bedarf es zahlreicher weiterer Untersuchungen. So sollte beispielsweise geprüft werden, ob die Verwendung von Inhibitoren für Penicillin-Binde-Proteine bei Zellen mit wt-LmrA-Expression einen ähnlichen Phänotyp hervorruft, wie dem bei E512Q-LmrA-Expression.

4.2 Zosuquidar-Derivate als Inhibitoren für mikrobielle MDR-ABC-Transporter

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Modifikationen des Bibenzosuberyl-piperazin-Restes von Zosuquidar in der Lage sind die Aktivität der verwendeten mikrobiellen MDR-ABC-Transporter zu modulieren. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass diese Substanzen im Allgemeinen die Transport-Aktivität stärker beeinflussen als die ATP-Hydrolyse. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neuen Inhibitoren sind von großem Wert, da bislang eine geringe Zahl von Substanzen (z.B. Verapamil) zur Verfügung steht um die Aktivität von mikrobiellen MDR-ABC-Transportern zu inhibieren bzw. zu untersuchen. Die Ergebnisse für die drei Transporter waren sehr unterschiedlich für die einzelnen Substanzen. Dies kann zum einen tatsächlich an sehr unterschiedliche Spezifitäten der untersuchten Transporter liegen, zum anderen aber auch an der Verwendung unterschiedlicher Systeme (*in vivo* bei LmrA und *in vitro* bei LmrCD und Pdr5) und Transport-Substrate. Das Transport-Substrat ist insofern von Bedeutung als dass angenommen werden kann, dass auch die untersuchten Transporter ähnlich wie das P-Glykoprotein [171] verschiedene Substratbindestellen für die verwendeten Substrate haben. Weiterhin konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht zwischen Modulatoren/Inhibitoren und Substraten unterschieden werden, da nur der Transport der eingesetzten fluoreszierenden Transportsubstrate verfolgt werden konnte. So kann es sich bei manchen Testsubstanzen um neue Substrate handeln, die anstelle der eingesetzten Substrate transportiert werden und auf dieser Weise zu einer Inhibition der gemessenen Transport-Aktivität führten. Der Austausch des Piperazin-Rest an der Hydroxypropan-Brücke in der Struktur von Zosuquidar gegen ein Piperidin hat sich besonders bewährt, da die meisten Substanzen mit stärkerer inhibitorische Wirkung als Zosuquidar dies aufwiesen (siehe Abbildung 37).

4.2.1 Modulation der LmrA-Aktivität

Für LmrA konnten sieben Substanzen identifiziert werden, die eine stärkere Inhibition der Transport-Aktivität bewirkten als Zosuquidar (Substanz **7**, **8**, **10**, **11**, **22**, **23** und **27**). Allen gemein ist eine Piperidinbasis direkt an der Hydroxypropan-Brücke des konstanten Teils aller Substanzen. Unter den genannten Substanzen stellt Substanz **27** eine Ausnahme dar, da sie klein ist und keine aromatischen Reste aufweist. Im Gegensatz zu den Substanzen **22** und **23** sind zusätzlich im heterocyclischen Rest zwei Schwefelatome anstelle des Sauerstoffs enthalten. Allerdings ist diese Verbindung nur geringfügig effektiver als Zosuquidar, denn es bleibt eine Resttransport-Aktivität von 49 %, während diese bei Zosuquidar 52 % beträgt. Aus den Ergebnissen des Screenings lässt sich ferner ableiten, dass LmrA stärker von räumlich anspruchsvollen Substanzen mit aromatischen Resten beeinflusst wird, so kann beispielsweise mit Substanz **8** die Transport-Aktivität um 70 % reduziert werden. Vergleicht man die Struktur von Substanz **7** mit der von **8** und die unterschiedliche Inhibition, 57 % bei Substanz **7**, so kann man davon ausgehen, dass nicht nur die grundsätzliche Anwesenheit aromatischer Reste für die Modulation von LmrA eine Rolle spielen, sondern zusätzlich die Flexibilität bedeutsam ist, denn diese ist bei Substanz **7** durch die Doppelbindung eingeschränkt im Vergleich zu Substanz **8**. Weiterhin ist die räumliche Orientierung der Phenylreste von Wichtigkeit, denn während die Substanzen **22** und **23** effektiv die Transportaktivität inhibieren (66% und 60% Inhibition), zeigt Substanz **24** keine Wirkung (Tabelle 6 und Strukturformeln siehe Abbildung 30).

Zwar wurden in dieser Arbeit keine Messungen zur Bestimmung der IC_{50} -Werte vorgenommen, es ist jedoch nicht zu erwarten, dass hierbei Werte kleiner als 25 nM ermittelt werden könnten. Denn für alle an LmrA [90] getesteten Inhibitoren (Verapamil, Cyclosporin A, Nicardipin etc.) wurden kleinere IC_{50} -Werte als 25 nM ermittelt. Allerdings muss man an dieser Stelle betonen, dass die genannten Untersuchungen in humanen Zelllinien erfolgten und nicht in *Lactococcus lactis*. Im Vergleich zu anderen typischen P-Glykoprotein-Inhibitoren, wie Verapamil oder Cyclosporin A, ist die Wirkung von Zosuquidar und den getesteten Derivaten auf die Transport-Aktivität von LmrA gering.

4.2.2 Modulation der LmrCD-Aktivität

Für LmrCD konnten drei Substanzen identifiziert werden die effektiver die Transport-Aktivität inhibieren als Zosuquidar, Substanz **2**, **12** und **24**. Während die für LmrA effektivste Substanz **8** eine 70 %-Inhibition erreichte, konnte Substanz **2** die Transport-Aktivität von LmrCD um 72 % inhibieren, Substanz **12** um 80 % und Substanz **24** eine Inhibition um 89 % bewirken. Wie bei LmrA scheint jedoch die Anwesenheit von aromatischen Resten bedeutsam zu sein, denn Verbindungen ohne diese Partialstrukturen wie die Substanzen **17-21** und **27**, haben eine geringe (Substanz **21**: 84 % Restaktivität) oder gar keine (Beispiel Substanz **20** mit 100 % Restaktivität) Wirkung (Tabelle 5). Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden *Lactococcus lactis*-Proteine ist die Stereoselektivität. Denn während die Substanz **24** die Aktivität von LmrCD stark beeinflusst, sind dessen Stereoisomere **22** und **23** von geringer Wirkung (97 % und 96 % Restaktivität).

Im Gegensatz zu den Substanzen **2** und **24**, bei denen die ATPase-Aktivität unbeeinflusst bleibt, inhibiert Substanz **2** auch die ATP-Hydrolyse um 38 %. Dieser Sachverhalt kann zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden. Grundsätzlich sollte durch weitere Messungen die Art der Inhibition untersucht werden. Bei einer kompetitiven Hemmung ist es wahrscheinlich, dass diese Substanzen an dieselbe Bindestelle wie die Transportsubstrate binden und so die Aktivität modulieren. Es ist bei nicht-kompetitiver Inhibition aber auch möglich, dass sie an einer anderen Stelle des Proteins binden. Diese aufwendigen Zusatzuntersuchungen sind bei LmrCD besonders sinnvoll, da hier eine geringe Zahl an sehr effektiven Substanzen identifiziert wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten Inhibitoren für LmrCD beschrieben, was angesichts der Homologie zu Effluxpumpen pathogener Bakterien sehr interessant ist.

4.2.3 Modulation der Pdr5-Aktivität

Im Vergleich zu den anderen beiden Transportern wird die Aktivität Pdr5 von einer hohen Zahl an Testsubstanzen beeinflusst. Die Substanzen **6**, **7**, **10**, **11**, und **25** erwiesen sich als die effektivsten in diesem Screening. Die genannten Substanzen konnten bei einer Konzentration von 5 μM die Transport-Aktivität um bis zu 99 % (Substanz **7**) reduzieren, wobei die geringste Effektivität bei Substanz **6** mit 84 %-Inhibition beobachtet wurde. Insgesamt inhibieren die Testsubstanzen die Pdr5-Aktivität in stärkerem Ausmaß als bei den anderen beiden Proteinen, bereits Zosuquidar inhibiert die Transport-Aktivität um 76%, während dies bei LmrCD 42 % ist und bei LmrA sogar 52 %. Für Pdr5 konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Art der zusätzlichen Reste an den Phenylringen der Substanzen **5-10** eine Rolle für die Effektivität spielen (Abbildung 35). Beispielsweise werden in Substanz **7** (Restaktivität von 1 %) die Fluoratome durch Methylreste ersetzt (Substanz **6**), so wird eine geringere Inhibition mit 16 % Restaktivität bewirkt. Dieser Trend verstärkt sich wenn lediglich Protonen angefügt werden (Substanz **5**) mit einer resultierenden Restaktivität von 33 %. Allerdings sind diese Reste unter Beibehaltung der Piperazinbasis für die Modulation unwichtig, denn die Substanzen **2**, **3**, und **4** inhibieren die Transport-Aktivität mit Werten zwischen 76 und 78 % gleichermaßen. Bei Pdr5 fällt zudem auf, dass die ATPase-Aktivität ebenfalls inhibiert wird, beispielsweise Zosuquidar mit 70 % (Tabelle 6). Aber auch bei diesem Protein gilt, dass die Transport-Aktivität in höherem Ausmaß inhibiert wird, wie auch anhand der ermittelten IC_{50} -Werte für einige repräsentative Substanzen gezeigt werden konnte (Abbildung 36). Besonders eindrucksvoll ist dies bei Substanz **2** beobachtet worden, während der IC_{50} -Wert für den Rhodamin-Transport bei 0,8 μM liegt liegt der Wert für die ATPase-Aktivität bei 20 μM . Somit scheinen die verwendeten Substanzen nicht primär die ATPase-Aktivität zu modulieren, so dass ihre Bindung an den TMDs dieser Proteine wahrscheinlich ist. Im Gegensatz zu den beiden *Lactococcus lactis*-Transportern liegen bei Pdr5 Vergleichsmöglichkeiten vor um die Relevanz und Effektivität der hier vorgestellten Substanzen beurteilen zu können. So konnte festgestellt werden, dass die identifizierten Substanzen mit IC_{50} -Werten für den Rhodamin 6G-Transport von 0,3 - 0,9 μM zu den effektivsten Pdr5-Inhibitoren gehören. Andere bekannte Inhibitoren, wie Verapamil (1,7 μM) oder auch Paclitaxel (2,8 μM), weisen eine geringere Effektivität auf. Niedrigere IC_{50} -Werte für den Rhodamin-Transport wurden lediglich bei dem Östradiol-Derivat RU49953 (0,083 μM) beobachtet [118, 172].

5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden ob DDM ein LmrA-Inhibitor ist, um dies zu klären sollte DDM in geringen Konzentrationen, weit unter seiner kritischen Mizellenkonzentration, zu isolierten Membranvesikeln mit LmrA titriert werden und die ATPase-Aktivität bestimmt werden. Eine zweite Erklärung für die geringe Aktivität von LmrA in einer DDM-Mizelle ist das Fehlen eines für die Aktivität von LmrA essentiellen Lipids, daher sollten *L. lactis*-Lipide einzeln einer isolierten LmrA-Probe mit DDM als Detergenz hinzugegeben werden und die ATPase-Aktivität untersucht werden.

Wie in der Diskussion bereits erwähnt stellt die veränderte Morphologie von *L. lactis* bei Überexpression von ATPase- inaktivem LmrA (E512Q-Mutante) einen wichtigen Hinweis für die physiologische Funktion von LmrA dar. Im nächsten Schritt sollte die Morphologie einer anderen inaktiven Mutante von LmrA untersucht werden, um andere Faktoren ausschließen zu können. Weiterhin ist es vorstellbar die Zellen zusätzlich zu dem pNHLmrA-E512Q-Plasmiden mit einem weiteren Plasmiden mit der wt-LmrA-Gensequenz zu transfizieren. Nach Expression von E512Q-LmrA-Expression und Ausbildung des Phänotyps sollte die wt-LmrA-Expression induziert werden um so die Veränderung umzukehren. Die derzeitige Hypothese geht davon aus, dass die Funktion von LmrA erst bei Überproduktion von Membranproteinen zum Tragen kommt, daher sollte die Ausbeute bei Expression eines Membranproteins im NZ9000-Stamm mit und ohne LmrA-Gen verglichen werden. Desweiteren sollten die wichtigsten Ergebnisse der Transkriptom-Analyse, die Reduktion bei dem Transkriptionregulator LLNZ_09220 und die erhöhte Transkription der Esterase LLNZ_0956, durch RT-PCR bestätigt werden.

Desweiteren konnte für jedes der untersuchten Proteine mehrere Zosuquidar-Derivate identifiziert werden die merklich dessen Aktivität beeinflussen konnten. Anhand der verwendeten Untersuchungsmethoden lässt sich jedoch nicht ableiten ob es sich dabei um mögliche Substrate oder tatsächlich um Modulatoren mit einer gänzlich anderen Bindungsstelle als die üblichen Transport-Substrate dieser Proteine handelt. Im ersten Schritt sollte zunächst durch Variation der Transport-Substanz-Konzentration festgestellt werden welche Art der Inhibition vorliegt. Bei nicht-kompetitiver Hemmung ließe sich durch Verwendung von vielversprechenden radioaktiv-markierten Zosuquidar-Derivaten feststellen ob diese als Substrate transportiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Nagle, J.F. and H.L. Scott, Jr., *Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. Theory of membrane permeability*. Biochim Biophys Acta, 1978. **513**(2): p. 236-43.
2. le Maire, M., P. Champeil, and J.V. Moller, *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1508**(1-2): p. 86-111.
3. Li, M., et al., *Selecting optimum eukaryotic integral membrane proteins for structure determination by rapid expression and solubilization screening*. J Mol Biol, 2009. **385**(3): p. 820-30.
4. Banerjee, P., et al., *Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents*. Chem Phys Lipids, 1995. **77**(1): p. 65-78.
5. Federkeil, S.L., et al., *Examination of EmrE conformational differences in various membrane mimetic environments*. Biochem Cell Biol, 2003. **81**(2): p. 61-70.
6. Kawate, T. and E. Gouaux, *Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins*. Structure, 2006. **14**(4): p. 673-81.
7. Lund, S., et al., *Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1989. **264**(9): p. 4907-15.
8. Sikora, C.W. and R.J. Turner, *Investigation of ligand binding to the multidrug resistance protein EmrE by isothermal titration calorimetry*. Biophys J, 2005. **88**(1): p. 475-82.
9. Lubelski, J., W.N. Konings, and A.J. Driessen, *Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(3): p. 463-76.
10. Cohen, M.L., *Changing patterns of infectious disease*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 762-7.
11. Levy, S.B., *The challenge of antibiotic resistance*. Sci Am, 1998. **278**(3): p. 46-53.
12. Neu, H.C., *The crisis in antibiotic resistance*. Science, 1992. **257**(5073): p. 1064-73.
13. Ambudkar, S.V., et al., *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7468-85.
14. Kruh, G.D. and M.G. Belinsky, *The MRP family of drug efflux pumps*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7537-52.
15. Doyle, L.A. and D.D. Ross, *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7340-58.
16. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
17. Dano, K., *Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo*. Cancer Chemother Rep, 1972. **56**(6): p. 701-8.
18. Dano, K., *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells*. Biochim Biophys Acta, 1973. **323**(3): p. 466-83.
19. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
20. Paulsen, I.T. and K. Lewis, *Microbial multidrug efflux: introduction*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 143-4.
21. Chen, C.J., et al., *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 381-9.
22. Nikaido, H., *Multidrug resistance in bacteria*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 119-46.
23. Mulvey, M.R., et al., *The genetics of Salmonella genomic island 1*. Microbes Infect, 2006. **8**(7): p. 1915-22.
24. Fournier, P.E., et al., *Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet, 2006. **2**(1): p. e7.

25. Adams, M.D., et al., *Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol, 2008. **190**(24): p. 8053-64.
26. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. Drugs, 2009. **69**(12): p. 1555-623.
27. Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr., *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 1-34.
28. Kuroda, T. and T. Tsuchiya, *Multidrug efflux transporters in the MATE family*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(5): p. 763-8.
29. Jack, D.L., N.M. Yang, and M.H. Saier, Jr., *The drug/metabolite transporter superfamily*. Eur J Biochem, 2001. **268**(13): p. 3620-39.
30. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. Drugs, 2004. **64**(2): p. 159-204.
31. Nikaido, H. and Y. Takatsuka, *Mechanisms of RND multidrug efflux pumps*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(5): p. 769-81.
32. Tseng, T.T., et al., *The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins*. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999. **1**(1): p. 107-25.
33. Saparoea, B.v.d.B.v., *Multidrug and peptide export in Lactococcus lactis*, in *Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute*. 2009, University of Groningen: Groningen.
34. Abramson, J., et al., *Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli*. Science, 2003. **301**(5633): p. 610-5.
35. Huang, Y., et al., *Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli*. Science, 2003. **301**(5633): p. 616-20.
36. Yin, Y., et al., *Structure of the multidrug transporter EmrD from Escherichia coli*. Science, 2006. **312**(5774): p. 741-4.
37. Fluman, N. and E. Bibi, *Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(5): p. 738-47.
38. Saier, M.H., Jr., et al., *The major facilitator superfamily*. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999. **1**(2): p. 257-79.
39. Saier, M.H., Jr. and I.T. Paulsen, *Phylogeny of multidrug transporters*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(3): p. 205-13.
40. Edgar, R. and E. Bibi, *MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition*. J Bacteriol, 1997. **179**(7): p. 2274-80.
41. Bibi, E., et al., *MdfA, an interesting model protein for studying multidrug transport*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 171-7.
42. Bolhuis, H., et al., *The Lactococcal ImrP gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26092-8.
43. Poelarends, G.J., P. Mazurkiewicz, and W.N. Konings, *Multidrug transporters and antibiotic resistance in Lactococcus lactis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1555**(1-3): p. 1-7.
44. Tennent, J.M., et al., *Physical and biochemical characterization of the qacA gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol, 1989. **135**(1): p. 1-10.
45. Brown, M.H. and R.A. Skurray, *Staphylococcal multidrug efflux protein QacA*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 163-70.
46. Neyfakh, A.A., C.M. Borsch, and G.W. Kaatz, *Fluoroquinolone resistance protein NorA of Staphylococcus aureus is a multidrug efflux transporter*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(1): p. 128-9.
47. Neyfakh, A.A., *The multidrug efflux transporter of Bacillus subtilis is a structural and functional homolog of the Staphylococcus NorA protein*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(2): p. 484-5.
48. Ahmed, M., et al., *A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 28506-13.

49. Grkovic, S., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Regulation of bacterial drug export systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(4): p. 671-701, table of contents.
50. Woolridge, D.P., et al., *Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the Bacillus subtilis multidrug transporter Blt*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 8864-6.
51. Lewinson, O., E. Padan, and E. Bibi, *Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(39): p. 14073-8.
52. Padan, E., et al., *Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1717**(2): p. 67-88.
53. Lewinson, O. and E. Bibi, *Evidence for simultaneous binding of dissimilar substrates by the Escherichia coli multidrug transporter MdfA*. Biochemistry, 2001. **40**(42): p. 12612-8.
54. Putman, M., et al., *The secondary multidrug transporter LmrP contains multiple drug interaction sites*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 13900-5.
55. Yerushalmi, H. and S. Schuldiner, *A model for coupling of H(+) and substrate fluxes based on "time-sharing" of a common binding site*. Biochemistry, 2000. **39**(48): p. 14711-9.
56. Mazurkiewicz, P., W.N. Konings, and G.J. Poelarends, *Acidic residues in the lactococcal multidrug efflux pump LmrP play critical roles in transport of lipophilic cationic compounds*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26081-8.
57. Guan, L. and H.R. Kaback, *Lessons from lactose permease*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 67-91.
58. Sigal, N., S. Molshanski-Mor, and E. Bibi, *No single irreplaceable acidic residues in the Escherichia coli secondary multidrug transporter MdfA*. J Bacteriol, 2006. **188**(15): p. 5635-9.
59. Omote, H., et al., *The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(11): p. 587-93.
60. Paulsen, I.T., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiol Rev, 1996. **60**(4): p. 575-608.
61. Bay, D.C., K.L. Rommens, and R.J. Turner, *Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(9): p. 1814-38.
62. Chen, Y.J., et al., *X-ray structure of EmrE supports dual topology model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 18999-9004.
63. Korkhov, V.M. and C.G. Tate, *Electron crystallography reveals plasticity within the drug binding site of the small multidrug transporter EmrE*. J Mol Biol, 2008. **377**(4): p. 1094-103.
64. Kikukawa, T., et al., *Anti-parallel membrane topology of two components of EbrAB, a multidrug transporter*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(4): p. 1071-5.
65. Steiner-Mordoch, S., et al., *Parallel topology of genetically fused EmrE homodimers*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 17-26.
66. Nikaido, H., et al., *Multidrug efflux pump AcrAB of Salmonella typhimurium excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains*. J Bacteriol, 1998. **180**(17): p. 4686-92.
67. Holland, I.B. and M.A. Blight, *ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans*. J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 381-99.
68. Blight, M.A. and I.B. Holland, *Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators*. Mol Microbiol, 1990. **4**(6): p. 873-80.
69. Locher, K.P., A.T. Lee, and D.C. Rees, *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1091-8.
70. Badri, D.V., et al., *Influence of ATP-Binding Cassette Transporters in Root Exudation of Phytoalexins, Signals, and in Disease Resistance*. Front Plant Sci, 2012. **3**: p. 149.
71. Liu, S., et al., *Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, Bombyx mori*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 491.
72. Tang, L., et al., *Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells*. BMC Pharmacol, 2010. **10**: p. 12.

73. Marzac, C., et al., *ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients*. Haematologica, 2011. **96**(9): p. 1293-301.
74. Schmitt, L. and R. Tampe, *Structure and mechanism of ABC transporters*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(6): p. 754-60.
75. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
76. Higgins, C.F., et al., *A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 448-50.
77. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
78. van Veen, H.W., et al., *The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2503-14.
79. Lubelski, J., et al., *ydaG and ydbA of Lactococcus lactis encode a heterodimeric ATP-binding cassette-type multidrug transporter*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34449-55.
80. Gadsby, D.C., P. Vergani, and L. Csanady, *The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 477-83.
81. Saurin, W., M. Hofnung, and E. Dassa, *Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters*. J Mol Evol, 1999. **48**(1): p. 22-41.
82. Biemans-Oldehinkel, E., M.K. Doeven, and B. Poolman, *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1023-35.
83. Berntsson, R.P., et al., *A structural classification of substrate-binding proteins*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2606-17.
84. van Veen, H.W., et al., *Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10668-72.
85. Küppers, P., *Molekulare Analyse des pleiotropen ABC-Transporters Pdr5 aus S. cerevisiae*, in *Institute of Biochemistry*. 2010, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
86. Putman, M., et al., *Antibiotic resistance: era of the multidrug pump*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 772-3.
87. Velamakanni, S., et al., *A multidrug ABC transporter with a taste for salt*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6137.
88. Bourdineaud, J.P., et al., *A bacterial gene homologous to ABC transporters protect Oenococcus oeni from ethanol and other stress factors in wine*. Int J Food Microbiol, 2004. **92**(1): p. 1-14.
89. Achard-Joris, M., et al., *Heterologously expressed bacterial and human multidrug resistance proteins confer cadmium resistance to Escherichia coli*. Biochemistry, 2005. **44**(15): p. 5916-22.
90. van Veen, H.W., et al., *A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 291-5.
91. Bolhuis, H., et al., *Multidrug resistance in Lactococcus lactis: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane*. EMBO J, 1996. **15**(16): p. 4239-45.
92. Rosenberg, M.F., et al., *Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5615-25.
93. Grimard, V., et al., *Structure and dynamics of the membrane-embedded domain of LmrA investigated by coupling polarized ATR-FTIR spectroscopy and (1)H/(2)H exchange*. Biochemistry, 2001. **40**(39): p. 11876-86.
94. Ecker, G.F., et al., *A three-dimensional model for the substrate binding domain of the multidrug ATP binding cassette transporter LmrA*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(5): p. 1169-79.

95. Marreddy, R.K., et al., *The response of Lactococcus lactis to membrane protein production*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24060.
96. Pinto, J.P., et al., *Efficient overproduction of membrane proteins in Lactococcus lactis requires the cell envelope stress sensor/regulator couple CesSR*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21873.
97. Zaidi, A.H., et al., *The ABC-type multidrug resistance transporter LmrCD is responsible for an extrusion-based mechanism of bile acid resistance in Lactococcus lactis*. J Bacteriol, 2008. **190**(22): p. 7357-66.
98. Zaidi, A.H., et al., *Cholate-stimulated biofilm formation by Lactococcus lactis cells*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(8): p. 2602-10.
99. Teixeira, M.C. and I. Sa-Correia, *Saccharomyces cerevisiae resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of TPO1 and PDR5 genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(2): p. 530-7.
100. Jacquot, C., R. Julien, and M. Guilloton, *The Saccharomyces cerevisiae MFS superfamily SGE1 gene confers resistance to cationic dyes*. Yeast, 1997. **13**(10): p. 891-902.
101. Balzi, E. and A. Goffeau, *Yeast multidrug resistance: the PDR network*. J Bioenerg Biomembr, 1995. **27**(1): p. 71-6.
102. Balzi, E. and A. Goffeau, *Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1187**(2): p. 152-62.
103. Balzi, E. and A. Goffeau, *Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1073**(2): p. 241-52.
104. Delaveau, T., et al., *PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon*. Mol Gen Genet, 1994. **244**(5): p. 501-11.
105. Kolaczowski, M., et al., *Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31543-8.
106. Tutulan-Cunita, A.C., et al., *Mutational analysis of the yeast multidrug resistance ABC transporter Pdr5p with altered drug specificity*. Genes Cells, 2005. **10**(5): p. 409-20.
107. Golin, J., et al., *Chemical specificity of the PDR5 multidrug resistance gene product of Saccharomyces cerevisiae based on studies with tri-n-alkyltin chlorides*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(1): p. 134-8.
108. Kolaczowski, M., et al., *In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network*. Microb Drug Resist, 1998. **4**(3): p. 143-58.
109. Balzi, E., et al., *PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2206-14.
110. Decottignies, A., et al., *ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12612-22.
111. Sauna, Z.E., et al., *Mutations define cross-talk between the N-terminal nucleotide-binding domain and transmembrane helix-2 of the yeast multidrug transporter Pdr5: possible conservation of a signaling interface for coupling ATP hydrolysis to drug transport*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35010-22.
112. Golin, J., et al., *Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5963-9.
113. Golin, J., S.V. Ambudkar, and L. May, *The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates?* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(1): p. 1-5.
114. Hanson, L., et al., *The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter*. Biochemistry, 2005. **44**(28): p. 9703-13.
115. Golin, J., et al., *Complete inhibition of the Pdr5p multidrug efflux pump ATPase activity by its transport substrate clotrimazole suggests that GTP as well as ATP may be used as an energy source*. Biochemistry, 2007. **46**(45): p. 13109-19.
116. Bissinger, P.H. and K. Kuchler, *Molecular cloning and expression of the Saccharomyces cerevisiae STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4180-6.

117. Egner, R., et al., *Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(2): p. 523-43.
118. Conseil, G., et al., *Potent competitive inhibition of drug binding to the Saccharomyces cerevisiae ABC exporter Pdr5p by the hydrophobic estradiol-derivative RU49953*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1614**(2): p. 131-4.
119. Kralli, A. and K.R. Yamamoto, *An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17152-6.
120. Carvajal, E., et al., *Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes*. Mol Gen Genet, 1997. **256**(4): p. 406-15.
121. Ghaemmaghami, S., et al., *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
122. Ernst, R., et al., *A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5069-74.
123. Dawson, R.J. and K.P. Locher, *Structure of a bacterial multidrug ABC transporter*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 180-5.
124. Steinfels, E., et al., *Highly efficient over-production in E. coli of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from Bacillus subtilis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(1): p. 1-5.
125. Margolles, A., et al., *The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of Lactococcus lactis mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids*. Biochemistry, 1999. **38**(49): p. 16298-306.
126. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein*. J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 16167-75.
127. Yerushalmi, H., M. Lebediker, and S. Schuldiner, *EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6856-63.
128. Singh, S., B.S. Dwarakanath, and T.L. Mathew, *DNA ligand Hoechst-33342 enhances UV induced cytotoxicity in human glioma cell lines*. J Photochem Photobiol B, 2004. **77**(1-3): p. 45-54.
129. Hilwig, I. and A. Gropp, *Decondensation of constitutive heterochromatin in L cell chromosomes by a benzimidazole compound ("33258 Hoechst")*. Exp Cell Res, 1973. **81**(2): p. 474-7.
130. Loontjens, F.G., et al., *Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities*. Biochemistry, 1990. **29**(38): p. 9029-39.
131. Woynarowski, J.M., R.D. Sigmund, and T.A. Beerman, *DNA minor groove binding agents interfere with topoisomerase II mediated lesions induced by epipodophyllotoxin derivative VM-26 and acridine derivative m-AMSA in nuclei from L1210 cells*. Biochemistry, 1989. **28**(9): p. 3850-5.
132. Chen, A.Y., et al., *A new mammalian DNA topoisomerase I poison Hoechst 33342: cytotoxicity and drug resistance in human cell cultures*. Cancer Res, 1993. **53**(6): p. 1332-7.
133. Theuvsenet, A.P., et al., *Interaction of ethidium bromide with yeast cells investigated by electron probe X-ray microanalysis*. J Membr Biol, 1983. **73**(2): p. 131-6.
134. Baracca, A., et al., *Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1606**(1-3): p. 137-46.
135. Duchen, M.R., A. Surin, and J. Jacobson, *Imaging mitochondrial function in intact cells*. Methods Enzymol, 2003. **361**: p. 353-89.
136. Ehrenberg, B., et al., *Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes*. Biophys J, 1988. **53**(5): p. 785-94.

137. Lage, H., *MDR1/P-glycoprotein (ABCB1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(7): p. 813-21.
138. Tan, B., D. Piwnica-Worms, and L. Ratner, *Multidrug resistance transporters and modulation*. Curr Opin Oncol, 2000. **12**(5): p. 450-8.
139. Jamrozak, K. and T. Robak, *Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies*. Hematology, 2004. **9**(2): p. 91-105.
140. Ding, P.R., et al., *The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil is a potent inhibitor of ABCB1/P-glycoprotein transporter*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19329.
141. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. Eur J Pharm Sci, 2000. **11**(4): p. 265-83.
142. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 48-58.
143. Modok, S., H.R. Mellor, and R. Callaghan, *Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 350-4.
144. Dantzig, A.H., et al., *Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4171-9.
145. Dantzig, A.H., et al., *Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(2): p. 854-62.
146. Dantzig, A.H., et al., *Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic*. Curr Med Chem, 2001. **8**(1): p. 39-50.
147. Green, L.J., P. Marder, and C.A. Slapak, *Modulation by LY335979 of P-glycoprotein function in multidrug-resistant cell lines and human natural killer cells*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(11): p. 1393-9.
148. Rubin, E.H., et al., *A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3710-7.
149. Gerrard, G., et al., *Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine*. Haematologica, 2004. **89**(7): p. 782-90.
150. Sandler, A., et al., *A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3265-72.
151. Cripe, L.D., et al., *Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4077-85.
152. van den Berg van Saparoea, H.B., et al., *Proton motive force-dependent Hoechst 33342 transport by the ABC transporter LmrA of Lactococcus lactis*. Biochemistry, 2005. **44**(51): p. 16931-8.
153. Schmitz, J., *Funktionale Charakterisierung des ABC-Transporters LmrA aus L. lactis*, in Institut für Biochemie. 2007, HHU-Düsseldorf: Düsseldorf.
154. Zehnpfennig, B., I.L. Urbatsch, and H.J. Galla, *Functional reconstitution of human ABCC3 into proteoliposomes reveals a transport mechanism with positive cooperativity*. Biochemistry, 2009. **48**(20): p. 4423-30.
155. Geertsma, E.R., et al., *Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function*. Nat Protoc, 2008. **3**(2): p. 256-66.
156. Baykov, A.A., O.A. Evtushenko, and S.M. Avaeva, *A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay*. Anal Biochem, 1988. **171**(2): p. 266-70.

157. Lubelski, J., et al., *Nucleotide-binding sites of the heterodimeric LmrCD ABC-multidrug transporter of Lactococcus lactis are asymmetric*. Biochemistry, 2006. **45**(2): p. 648-56.
158. Hanekop, N., *Strukturbiologische Charakterisierung des ABC-Transporters LmrA aus L. lactis und Substratbindeproteins EhuB aus S. meliloti*, in Biochemie, Chemie und Pharmazie. 2006, Johann Wolfgang Goethe-Universität: Frankfurt.
159. Balakrishnan, L., et al., *Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11273-80.
160. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.
161. Dittrich T., H.N., Infed N., Schmitt L. and Braun M., *Synthesis of 5-oxyquinoline derivatives for reversal of multidrug resistance*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2012. **8**: p. 1700-1704.
162. Venter, H., et al., *On the energy-dependence of Hoechst 33342 transport by the ABC transporter LmrA*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(4): p. 866-74.
163. Oliveira, A.P., J. Nielsen, and J. Forster, *Modeling Lactococcus lactis using a genome-scale flux model*. BMC Microbiol, 2005. **5**: p. 39.
164. Al-Shawi, M.K., *Catalytic and transport cycles of ABC exporters*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 63-83.
165. Heller, D.P. and C.L. Greenstock, *Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye*. Biophys Chem, 1994. **50**(3): p. 305-12.
166. Gajic, O., et al., *Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34291-8.
167. Michelsen, O., et al., *The MG1363 and IL1403 laboratory strains of Lactococcus lactis and several dairy strains are diploid*. J Bacteriol, 2010. **192**(4): p. 1058-65.
168. Molina-Höppner, A., *Physiological response of Lactococcus lactis to high-pressure*, in Lehrstuhl für technische Mikrobiologie. 2002, Technische Universität München: München.
169. Cabeen, M.T. and C. Jacobs-Wagner, *Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): p. 381-7.
170. Deghorain, M., et al., *Functional and morphological adaptation to peptidoglycan precursor alteration in Lactococcus lactis*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 24003-13.
171. Shapiro, A.B. and V. Ling, *Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities*. Eur J Biochem, 1997. **250**(1): p. 130-7.
172. Conseil, G., et al., *Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 2000. **39**(23): p. 6910-7.

7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind für eine Veröffentlichung vorgesehen.

- Analysis of the inhibition potential of zosuquidar derivatives on selected bacterial and fungal ABC transporters

Infed N, Smits SH, Dittrich T, Braun M, Driessen A, Hanekop N and Schmitt L
Molecular Membrane Biology (am 28. November 2012 akzeptiert)

- Synthesis of 5-oxyquinoline derivatives for reversal of multidrug resistance

Dittrich T, Hanekop N, Infed N, Schmitt L and Braun M
Beilstein J. Org. Chem. 2012, 8, 1700-1704. Epub 2012 October 05.

- Influence of detergents on the activity of the ABC transporter LmrA

Infed N, Hanekop N, Driessen AJ, Smits SH, Schmitt L.
Biochim Biophys Acta. 2011 Sep;1808(9):2313-21. Epub 2011 May 30.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Februar 2012 am Institut für Biochemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Schmitt angefertigt.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation eigenständig von mir verfasst wurde, und dass ich alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel genau angegeben habe. Alles, was ich aus anderen Arbeiten in veränderter oder unveränderter Form übernommen habe, wurde als solches kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 2012

Nacera Infed

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schmitt, der mich immer unterstützt und motiviert hat. Vielen Dank für die wertvollen Anregungen und die Möglichkeit die Richtung des Projektes selbstzubestimmen.

Meinem Korreferenten PD Dr. Ulrich Schulte möchte ich für die vielen Fragen während der Seminare und der freundlichen Unterstützung danken.

Sehr dankbar bin ich für den Einsatz und Diskussionsbereitschaft meiner direkten Betreuer Nils Hanekop und Sander Smits. Vielen lieben Dank! Ich konnte viel von Euch lernen.

Ich bedanke mich bei Stefanie Weidtkamp-Peters für die Betreuung bei der Erstellung der Fluoreszenz-Bilder. Danke dass Du immer wesentlich geduldiger warst als ich, wenn es darum ging ein noch besseres Bild aufzunehmen.

Herrn Dr. Klaus Zanger sowie seinen Mitarbeiterinnen Frau Rohbeck und Frau Wesbuer danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der REM-Aufnahmen. Danke dass alles so schnell und unkompliziert geklappt hat.

Ich danke Herrn Professor Dr. Karl Köhrer und Dr. René Deenen für die Durchführung und Auswertung der RNA-Sequenzierungen. Danke René, dass Du Zeit hattest mir jeden Schritt zu erklären.

Maria Gerdes, Akrem Neftati und Annika Jesse danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung.

Bei meinen direkten Kooperationspartnern Torsten Dittrich und Daniel Rohbeck möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Danke Frau Blum, Philipp, Marianne, Veronika, Ricarda, Martina, Zainab, Tatu, Lolita, Isa, Kerstin, Sakshi, Sven und Frau Rasid.

Ich weiß zwar nicht wie ich das geschafft habe aber ich bin immer im Gute-Laune-Büro gelandet. Danke Jan H., Nino, Stefan, Miro, Britta, Thorsten, Christian, Silke, Susanne, André, Sabrina, Iris F., Iris G. und Michael für die schöne Zeit. Ganz besonders möchte ich bei Diana fürs geduldige Ertragen meines Gejammers bedanken.

Dem MDR-Team möchte ich für die vielen Diskussionen, das Mitfiebern bei spannenden Experimenten und der geteilten Freude im Laboralltag danken. Danke Petra, Jan und Rakesh auch für den Spaß außerhalb des Labors.

Weiterhin möchte ich mich bei Patrick Bakkes ganz herzlich bedanken. Danke für deine Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Vielen, vielen Dank für die Unterstützung und Geduld.

