

**Molekulare Analyse von ABC-Transportern
am Beispiel von Pdr5p aus *S. cerevisiae*
und der isolierten NBD des humanen TAP1**

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

vorgelegt von
Robert Ernst
aus Paderborn

Mai 2007

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. L. Schmitt
Koreferent: Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.2007

Zusammenfassung

ATP binding cassette (ABC) Transporter sind ubiquitäre Membranproteine, die durch die Hydrolyse von ATP die Translokation unterschiedlichster Substrate über biologische Membranen energetisieren. Trotz ihrer bedeutenden Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sind zentrale mechanistische Fragen wie die molekulare Kopplung von ATP-Hydrolyse und Translokation oder der exakte Mechanismus der ATP-Hydrolyse nicht zuletzt wegen den komplexen Interaktionen funktional wichtiger Sequenzmotive bisher kaum verstanden. Die vorliegende Dissertation ist dem Zusammenspiel katalytisch relevanter Aminosäuren bei der ATP-Hydrolyse sowie der Etablierung von Methoden gewidmet, die systematische Analysen der Kommunikation zwischen den Motor- und Transmembrandomänen eines ABC-Transporters ermöglichen.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde durch eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung einer isolierten Nukleotid bindenden Domäne (NBD) des humanen Transporters assoziiert mit der Antigenprozessierung (TAP) eine katalytische Dyade als Wirkprinzip der ATP-Hydrolyse identifiziert. Jegliche Mutation dieser katalytischen Dyade bestehend aus einem Glutamat und einem Histidin hatte spezifische und quantifizierbare Effekte auf die Nukleotidaffinität, die Stabilität des TAP1-Homodimers, die *steady-state* ATPase-Aktivität und deren pH Abhängigkeit. Durch die systematische Analyse der erzeugten Mutanten konnte gezeigt werden, dass die beiden katalytisch bedeutenden Reste direkt, in einer Distanz- und pH-abhängigen Weise interagieren. Das Glutamat der katalytischen Dyade hat dabei eine strukturgebende Rolle auf die Seitenkette des konservierten Histidins, das den pentakovalenten Übergangszustand der ATP-Hydrolyse stabilisiert und dadurch essentiell für die ATP-Hydrolyse ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde basierend auf der konstitutiven Überexpression von *PDR5* in einem *pdr1-3* Stammhintergrund eine neue Strategie zur Überproduktion und Affinitätsreinigung beliebiger Hefeproteine entwickelt. Durch das spezielle Design dieser Überexpressionskassette und den automatisierbaren, molekularbiologischen Aufwand eignet sich diese Strategie besonders für die Anwendung in genomweiten Überexpressionsstudien.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der ABC-Transporter Pdr5p aus *S. cerevisiae* anhand dieser neuen Strategie überproduziert und gereinigt. Nach Optimierung konnten pro Liter Kulturvolumen 700 µg dieses eukaryotischen 175 kDa Membranproteins in reiner, stabiler und monodisperser Form gewonnen werden. In Detergenzlösung kann Pdr5p ATP weder hydrolysieren noch binden. Eine detaillierte Analyse des Detergenz-vermittelten Aktivitätsverlustes mit mehr als 30 Detergenzien zeigte, dass Pdr5p höchstwahrscheinlich in einer nativen, aber nicht funktionalen Konformation arretiert vorlag.

Im vierten Teil wurde die Funktionalität von Pdr5p parallel *in vivo* und *in vitro* bestimmt. Nach Mutagenese von Pdr5p mittels einer eigens entwickelten *PDR5 Knock-in* Kassette wurde *in vivo* die

Substratspezifität und die Pdr5p-spezifische ATPase- und Drogentransport-Aktivität in hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen bestimmt. Diese Funktionalitätstests belegten übereinstimmend eine Asymmetrie der NBDs von Pdr5p. Während eine funktionale, ATPase-aktive C-terminale NBD für die Energetisierung des Drogentransports essentiell ist, spielt die N-terminale NBD vermutlich eine eher regulatorische Rolle.

Um den Mechanismus der ATP-Hydrolyse molekular zu analysieren, wurden auch in Pdr5p die beiden Reste der im ersten Teil dieser Dissertation identifizierten katalytischen Dyade durch Mutagenese substituiert. Für die Beobachtung einer *steady-state* ATPase-Aktivität ist in Pdr5p im Gegensatz zur isolierten NBD von TAP1 das konservierte Glutamat essentiell, während eine Mutation des Histidins zu Alanin diese Aktivität überraschenderweise nicht beeinflusst. Diese Studien sind ein deutlicher Hinweis dafür, dass ABC-Transporter ATP anhand unterschiedlicher Mechanismen hydrolysieren können.

Bemerkenswerterweise erlaubte die parallele *in vitro* und *in vivo* Analyse der erzeugten Pdr5p-Mutanten die Identifizierung einer zweiten, bisher nicht beschriebenen Rolle des konservierten Histidins in der Substratauswahl dieses Multidrogentransporters. Obschon sich das konservierte Histidin in allen Kristallstrukturen in unmittelbarer Nähe zum γ -Phosphat des ATP an der Schnittstelle der NBDs befindet, führte eine Mutation zu einer deutlich veränderten Substratauswahl innerhalb der Transmembrandomänen. Die vorliegende Dissertation liefert also Evidenzen für eine doppelte Funktion des konservierten Histidins als Regulator der ATPase-Aktivität und als Substratsensor.

Die Ergebnisse dieser Dissertation können in einem Modell mit drei zentralen Postulaten zusammengefasst werden:

- i) ABC-Transporter spalten ATP anhand unterschiedlicher Mechanismen.
- ii) ABC-Transporter nutzen diese unterschiedlichen Mechanismen der ATP-Hydrolyse, um in alternativen Modi zu operieren: Einem basalen, vom Substrat entkoppelten Modus und einem Substrat-stimulierten, an Substrattransport gekoppelten Modus.
- iii) Das konservierte Histidin des *H-loop* spielt eine zentrale Rolle als Substrat-Sensor und ATPase-Regulator. Diese Doppelrolle in der Koordination von ABC-Transportern wird durch die unmittelbare Nähe zum γ -Phosphat des gebundenen ATP und die direkte Interaktion mit dem Glutamat in einer möglichen katalytischen Dyade gewährleistet.

Summary

ATP binding cassette-transporters (ABC-transporters) are found in all kingdoms of life. They use the energy of ATP-hydrolysis for the translocation of an enormous spectrum of diverse substrates across biological membranes. Despite their crucial role in a number of physiological and pathophysiological processes, some central mechanistic questions like the coupling of ATP-hydrolysis with substrate translocation or the exact mechanism of ATP-hydrolysis are still poorly understood. This thesis is dedicated to the elucidation of the complex interplay of catalytic relevant amino acids during ATP-hydrolysis and to the development of new approaches that allow a systematic analysis of the communication between the motor and transmembrane domains of ABC-transporters.

Based on the biochemical and biophysical characterisation of an isolated nucleotide binding domain (NBD) of the human transporter associated with antigen processing (TAP), a catalytic dyad as the working principle for ATP-hydrolysis was identified in the first part of this thesis. Any mutation or biochemical disruption of this catalytic dyad resulted in specific effects on nucleotide affinity, stability of the TAP1-homodimer or steady-state ATPase-activity. A systematic analysis of the generated mutants proved that the residues of the catalytic dyad, the conserved histidine of the H-loop and the glutamate C-terminally of the Walker B motif, interact in a distance- and pH-dependent manner. The glutamate of the catalytically dyad modulates the catalytic activity by imposing a structural constraint on the side chain of the histidine, whereas the histidine is essential for ATP-hydrolysis by stabilising the pentacovalent transition state of the reaction.

The second part of this thesis describes the construction of a new strategy for the overproduction and affinity purification of any yeast protein. Based on the overexpression of *PDR5* in a *pdr1-3* strain background, this new and versatile tool was especially designed for genome-wide, high-throughput studies of protein overexpression and purification.

This newly designed tool was used in the third part of the thesis to overproduce and purify Pdr5p from *S. cerevisiae*. The purification yielded 700 µg per litre culture of this 175 kDa membrane protein in a pure, stable and monodisperse form. The purified protein could neither hydrolyse nor bind ATP. A detailed analysis of the detergent-mediated loss of activity with more than 30 detergents showed, that Pdr5p is most likely arrested in a native, but non-functional conformation.

Structure-function relations in Pdr5p were determined in the fourth part of this thesis. After mutagenesis employing a *PDR5* Knock-in cassette, the *in vivo* drug resistance phenotype was analysed in parallel to the *in vitro* Pdr5p-specific ATPase-activity and transport activity. It could be shown, that the NBDs of Pdr5p are functionally asymmetric. While an ATPase-active C-terminal NBD is essential for function, the N-terminal NBD plays a rather regulatory role.

In order to decipher the mechanism of ATP-hydrolysis in more detail, the identified catalytic dyad was mutagenised and characterised also in Pdr5p. Surprisingly and in contrast to the isolated NBD of human TAP1, it could be shown that the conserved glutamate is essential for steady-state ATPase activity, while this activity is not affected by a mutation of the histidine of the H-loop to alanine. These studies provide clear evidence that ABC-transporter may hydrolyse ATP by different mechanisms.

Interestingly, the parallel *in vitro* and *in vivo* analysis of the generated Pdr5p-mutants identified a second, previously not described function of the histidine of the H-loop in selecting substrates. Despite the fact, that the conserved histidine is in close proximity to the γ -phosphate moiety of ATP at the interface of the NBD sandwich dimer, its mutation mediated a drastic change in the substrate selection within the TMDs. These observations support a dual role of the conserved histidine as substrate sensor and as regulator of ATPase-activity.

The results of this thesis can be summarized in a model with three central postulates:

- i) ABC-transporters hydrolyse ATP by different mechanisms.
- ii) ABC-transporters employ these different mechanisms to operate in different modes: a basal, substrate uncoupled and a substrate-stimulated, coupled mode.
- iii) The conserved histidine of the H-loop plays a crucial role as substrate sensor and ATPase-regulator. This dual role in the coordination of an ABC-transporter is warranted by direct interaction with the glutamate in a feasible catalytic dyad.

1	EINLEITUNG	1
1.1	MEMBRANTRANSPORT	1
1.2	FUNKTION UND AUFBAU VON ABC-TRANSPORTERN	2
1.2.1	Überblick	2
1.2.2	Die TMDs der ABC-Transporter	5
1.2.3	Die NBDs der ABC-Transporter	6
1.3	DER MECHANISMUS DER ABC-TRANSPORTER	9
1.4	ANTIGENPROZESSIERUNG UND PRÄSENTATION	14
1.5	ABC-PROTEINE UND TRANSPORTER IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	16
1.6	PLEIOTROPE DROGENRESISTENZ IN <i>S. CEREVISIAE</i>	18
1.7	DIE REGULATION DES PDR-NETZWERKS VON <i>S. CEREVISIAE</i>	19
1.8	DIE FUNKTIONALE ANALYSE DES PLASMAMEMBRAN ABC-TRANSPORTERS PDR5P	20
1.8.1	Mutagenesestudien an <i>PDR5</i>	21
1.8.2	Charakterisierung der Substratspezifität von <i>Pdr5p</i>	23
1.8.3	Charakterisierung der Nukleosidase-Aktivität von <i>Pdr5p</i>	24
1.9	MOTIVATION UND ZIELE	24
2	MATERIAL	26
2.1	CHEMIKALIEN	26
2.1.1	Kultivierung, Induktion und Selektion	26
2.1.2	Puffersubstanzen, Salze und Additive	26
2.1.3	Lösungsmittel	27
2.1.4	Substrate und Inhibitoren	27
2.1.5	Größenmarker für DNA und Proteine	28
2.1.6	Detergenzien und Lipide	28
2.1.7	Säulenmaterial und Säulen	28
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	28
2.2	GERÄTE	29
2.3	OLIGONUKLEOTIDE	29
2.3.1	Heterologe Expression der <i>TAP1-NBD</i> in <i>E. coli</i>	29
2.3.2	Homologe Überexpression von <i>PDR5</i> und <i>PDR5</i> -Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	29
2.4	ENZYME UND PROTEINE	32
2.5	<i>E. COLI</i> UND <i>S. CEREVISIAE</i> STÄMME	33
2.6	PLASMIDE UND VEKTOREN	33
3	METHODEN	34
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN IN <i>E. COLI</i>	34
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen und Transformanten	34
3.1.2	Kompetente <i>E. coli</i> Zellen	34
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.1.4	Plasmidkonstruktion und Plasmidreinigung	35
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN IN <i>S. CEREVISIAE</i>	37
3.2.1	Hefe-Medien und Wachstumsbedingungen	37
3.2.2	Konstruktion der Kassetten zur homologen Überproduktion und Reinigung von Hefeproteinen	37
3.2.3	Konstruktion einer <i>PDR5</i> Knock-in Kasette	38
3.2.4	Konstruktion von Plasmiden zur PCR-basierten C-terminalen Modifikation von Hefeproteinen	39
3.2.5	Konstruktion spezialisierter Klonierungsstämme für <i>S. cerevisiae</i>	40
3.2.6	Mutagenese und Überexpression von <i>PDR5</i> -Mutanten	41
3.2.7	Kompetente Hefezellen	41
3.2.8	Transformation von Hefezellen	41
3.3	ELEKTROPHORESE UND PROTEINDETEKTION	42
3.3.1	Proteinbestimmung	42
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.3.3	Coomassie-Blau-Färbung und Silberfärbung	43
3.3.4	Immuno-Blot	44
3.4	EXPRESSION, REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER <i>TAP1-NBD</i>	45
3.4.1	Klonierung und heterologe Proteinexpression der <i>TAP1-NBD</i> in <i>E. coli</i>	45
3.4.2	Proteinreinigung der <i>TAP1-NBD</i>	46

3.4.3	<i>ATPase-Aktivität der TAP1-NBD</i>	47
3.4.4	<i>TNP-AXP Bindungsstudien an der TAP1-NBD</i>	47
3.4.5	<i>Kompetitive Bindungsstudien</i>	49
3.4.6	<i>Molekulares Modellieren</i>	50
3.5	<i>IN VIVO ANALYSE VON PDR5P</i>	50
3.5.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	50
3.5.2	<i>Resistenztest auf Drogen-Agar-Platten</i>	50
3.5.3	<i>Efflux von Rhodamin6G aus ganzen Zellen</i>	51
3.5.4	<i>Präparation von Gesamtzellextrakten aus Hefe</i>	51
3.6	<i>IN VITRO ANALYSE VON PDR5P</i>	52
3.6.1	<i>Präparation von Gesamtmembranen aus Hefe</i>	52
3.6.2	<i>Präparation angereicherter Plasmamembranen aus Hefe</i>	52
3.6.3	<i>Präparation hochhomogener Plasmamembranen aus Hefe</i>	53
3.6.4	<i>Transport von Rhodamin6G in Plasmamembran-Präparationen</i>	54
3.6.5	<i>Reinigung von N10His-Pdr5p mittels IMAC und Gelfiltration</i>	54
3.6.6	<i>Reinigung von N14His-Pdr5p aus angereicherten Plasmamembranen</i>	55
3.6.7	<i>Rekonstitution von Pdr5p in vorgeformte Liposomen</i>	56
3.6.8	<i>Saccharosegradient Dichtezentrifugation mit Proteoliposomen</i>	57
3.6.9	<i>Bestimmung des passiven Flip-Flop von C6 NBD-PE</i>	57
3.6.10	<i>Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie mit Proteoliposomen</i>	58
3.6.11	<i>CD-Spektroskopische Untersuchungen von Pdr5p</i>	59
3.6.12	<i>ATP-Agarose Bindungsstudien mit isoliertem Pdr5p</i>	59
3.6.13	<i>Bestimmung der Pdr5p-vermittelten ATPase-Aktivität</i>	60
4	ERGEBNISSE	62
4.1	<i>EINE KATALYTISCHE DYADE IN ABC -TRANSPORTERN?</i>	62
4.1.1	<i>Auf der Suche nach einem Modellsystem – Sequenzanalysen</i>	62
4.1.2	<i>Ein Strukturmodell des ATP-induzierten Heterodimers aus TAP1 und TAP2</i>	64
4.1.3	<i>Reinigung der humanen TAP1-NBD</i>	66
4.1.4	<i>ATPase-Aktivität der TAP1-NBD</i>	68
4.1.5	<i>Bestimmung der Affinität von Nukleotiden zur TAP1-NBD</i>	70
4.1.6	<i>Analyse der transienten Homodimerisierung der TAP1-NBD</i>	75
4.1.7	<i>Eine katalytische Dyade aus Glutamat und Histidin in der TAP1-NBD</i>	77
4.2	<i>IN VITRO CHARAKTERISIERUNG EINES FULL-SIZE ABC-TRANSPORTERS</i>	80
4.2.1	<i>Die homologe Überexpression von Pdr5p</i>	80
4.2.2	<i>Reinigung von N10His-Pdr5p</i>	83
4.2.3	<i>Analyse der ATPase-Aktivität von N10His-Pdr5p</i>	86
4.2.4	<i>Rekonstitution von N10His-Pdr5p in Liposomen</i>	87
4.2.5	<i>Optimierung der Stabilität von N10His-Pdr5p</i>	92
4.2.6	<i>Imidazol induziert die Aggregation von N10His-Pdr5p</i>	93
4.2.7	<i>Identifikation einer Kontamination in N10His-Pdr5p- Präparationen</i>	95
4.2.8	<i>Reinigung von N10His-Pdr5p ohne Phosphatasekontamination</i>	96
4.2.9	<i>Bindung von ATP an N14His-Pdr5p</i>	97
4.2.10	<i>CD-Spektroskopie an N14His-Pdr5p in DDM</i>	98
4.3	<i>FUNKTIONALE ANALYSE VON PDR5 UND PDR5-MUTANTEN</i>	100
4.3.1	<i>Klonierung einer PDR5 Knock-in Kasette</i>	100
4.3.2	<i>Die Mutagenese von PDR5</i>	101
4.3.3	<i>PDR5-Expressionslevel in PDR5-Mutanten</i>	103
4.3.4	<i>Funktionalität von PDR5 und PDR5-Mutanten auf Drogen-Agar-Platten</i>	104
4.3.5	<i>Ein Zell-basierter Efflux-Assay</i>	106
4.3.6	<i>Präparation hochhomogener Hefe-Plasmamembranen</i>	109
4.3.7	<i>Aktiver Rhodamin6G-Transport in Hefe Plasmamembranen</i>	110
4.3.8	<i>Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität in hochhomogenen Plasmamembranen</i>	115
4.3.9	<i>Inhibition von Pdr5p durch Detergenzien</i>	117
4.3.10	<i>Inhibition von Pdr5p durch ein Transportsubstrat</i>	119
5	DISKUSSION	121
5.1	<i>DIE KATALYTISCHE DYADE IN DER HUMANEN TAP1-NBD</i>	122
5.2	<i>DIE KATALYTISCHE DYADE IN ANDEREN ABC-TRANSPORTERN</i>	124
5.3	<i>DIE GEFAHR EINSEITIGER IN VIVO ANALYSE – PDR5P IN VIVO</i>	126
5.4	<i>DIE GEFAHR EINSEITIGER IN VITRO ANALYSE – PDR5P IN VITRO</i>	127

5.5	PDR5P IN DETERGENZLÖSUNG – EIN AUSNAHMEFALL.....	129
5.6	DIE PARALLELE ANALYSE VON PDR5P-MUTANTEN <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i>	133
5.6.1	<i>Die asymmetrischen NBDs von Pdr5p</i>	133
5.6.2	<i>Ein katalytisches Carboxylat in Pdr5p?</i>	134
5.6.3	<i>Das konservierte Histidin des H-loop als Substratsensor?</i>	135
5.7	DER MECHANISMUS DER ATP-HYDROLYSE – EINE ERWEITERUNG	136
	LITERATURVERZEICHNIS	139
	ANHANG.....	152

1 Einleitung

Biologische Membranen sind für das Leben unerlässlich. Plasmamembranen grenzen Zellen von ihrer Umgebung ab und verleihen ihnen dadurch ihre Individualität. Das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen ist zusätzlich durch intrazelluläre Membranen kompartimentiert, die spezifische enzymatische und bioenergetische Prozesse voneinander trennen. Biologische Membranen, die hochorganisierte Aggregate von Lipiden und Proteinen sind, stellen dabei keine unpassierbaren Barrieren dar, sondern vielmehr hochselektive Permeationsschranken (1,2). Diese selektive Permeabilität beruht auf unterschiedlichen Transportsystemen, die einen regen Austausch zwischen Zellen und ihrer Umgebung (z.B. für die Aufnahme von Nährstoffen oder Extrusion von Giftstoffen) ermöglichen.

1.1 Membrantransport

Membrantransportproteine können, basierend auf der Energiequelle für den Transportvorgang, in vier Gruppen eingeteilt werden (3): i) Primäre Transporter nutzen Licht (z.B. die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin) oder die chemische Energie, die in ATP gespeichert ist und können dadurch Moleküle gegen einen Konzentrationsgradienten auf einer Seite der Membran anreichern. Eine prominente Superfamilie der primären Transporter stellen *ATP binding cassette* (ABC) Transporter dar (4). Auch P-Typ ATPasen (z.B. die H^+ -, Na^+/K^+ -, Na^+/H^+ -, K^+/H^+ -, und Ca^{2+} -ATPase) gehören der Gruppe der primär aktiven Transporter an (5,6). ii) Sekundäre Transporter bewirken entweder eine Translokation von Molekülen entlang ihres (elektro)chemischen Gradienten (erleichterte Diffusion), oder sie koppeln den Transport eines Moleküls (zumeist Protonen oder Na^+ -Ionen) entlang ihres Gradienten, um ein zweites Molekül entweder in die gleiche Richtung (Symport) oder in entgegengesetzte Richtung (Antiport) zu transportieren (7). Die größte Familie der sekundären Transporter wird als *Major Facilitator* (MF) Superfamilie zusammengefasst (8). Die ABC und MF Superfamilien stellen die beiden häufigsten und am weitesten verbreiteten Klassen von Membranproteinen dar. iii) Gruppen-

Translokatoren koppeln die Aufnahme von Substraten an deren chemische Modifikation. Diese Gruppe besteht aus den Phosphoenolpyruvat Phosphotransferase Systemen (PEP-PTS), welche eine Phosphoryl-Gruppe vom Energieträger PEP mittels einer Kaskade von Phosphoryl-Transferproteinen auf das Transportsubstrat übertragen (9). Die letzte Gruppe, iv) umfasst Kanäle und Porine, die ohne Energiequelle funktionieren. Als Konsequenz können sie ihre Transportsubstrate lediglich entlang ihres Konzentrationsgradienten transportieren. Bemerkenswerterweise können sie allerdings durch Ionengradienten (spannungsgesteuerte Kanäle), durch Liganden wie zum Beispiel ATP (ligandengesteuerte Kanäle) oder durch mechanische Stimulation (mechanosensitive Kanäle) reguliert sein. Sie formen also selektive oder nicht-selektive Poren in der Membran und erlauben eine erleichterte, d.h. beschleunigte Diffusion von Ionen oder anderen Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht (10-13).

1.2 Funktion und Aufbau von ABC-Transportern

1.2.1 Überblick

ABC-Proteine werden aufgrund hochkonservierter Aminosäuresequenzen zu einer Superfamilie zusammengefasst (siehe auch 1.2.3) (4,14). Die meisten ABC-Proteine gehören der Unterfamilie der ABC-Transporter an, d.h. sie besitzen eine α -helikale Transmembrandomäne (TMD) und vermitteln einen ATP-abhängigen, primär aktiven Transport. ABC-Transporter wurden in allen Reichen des Lebens gefunden und sind für den Transport einer überwältigenden Vielfalt von Molekülen über biologische Membranen verantwortlich. Dabei verrichten sie von Bakterien bis zu Wirbeltieren eine bemerkenswerte Vielfalt zellulärer Funktionen. Neben dem aktiven Transport erfüllen ABC-Transporter Aufgaben in der Erhaltung der mitochondrialen Funktion, der Reifung zytosolischer Fe/S Proteine, in der Biogenese der Peroxisomen, in der Homöostase von biologischen Membranen und funktionieren dabei nicht nur als primäre Transporter, sondern auch als Ionenkanäle, Kanal-Regulatoren oder Rezeptoren (15-20). ABC-Transporter vollführen die Translokation von Ionen (17), Nährstoffen wie zum Beispiel von Zuckern (21) oder Aminosäuren (22) sowie Medikamenten (23), Gallensalzen (24), Steroiden (25), Phospholipiden (26), Peptiden (27) und sogar ganzen Proteinen (28). Nichtsdestotrotz können

individuelle ABC-Transporter extrem selektiv und spezifisch sein, während andere ein sehr breites und diverses Substratspektrum besitzen. ABC-Transporter mit extrem breiter Substratspezifität veranschaulichen das faszinierende und rätselhafte Zusammenspiel von Substrataffinität, -diversität, und -selektion bei Bindung und Transport strukturell unterschiedlichster Substanzen (29,30).

Trotz der unterschiedlichen Funktionen und Spezifitäten haben die meisten, wenn nicht alle, ABC-Transporter eine einheitliche Organisation ihrer Domänen und teilen sich eine modulare Architektur aus vier Einheiten (Abbildung 1). Ein funktionaler ABC-Transporter besteht zumindest aus zwei Nukleotid-bindenden Domänen (NBDs), und zwei rein α -helikalen Transmembrandomänen (TMDs). Die TMDs enthalten die Substratbindungstasche und begrenzen den Translokationsweg des Substrates durch die Membran. Die NBDs energetisieren den Transport durch Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden wie zum Beispiel ATP (14).

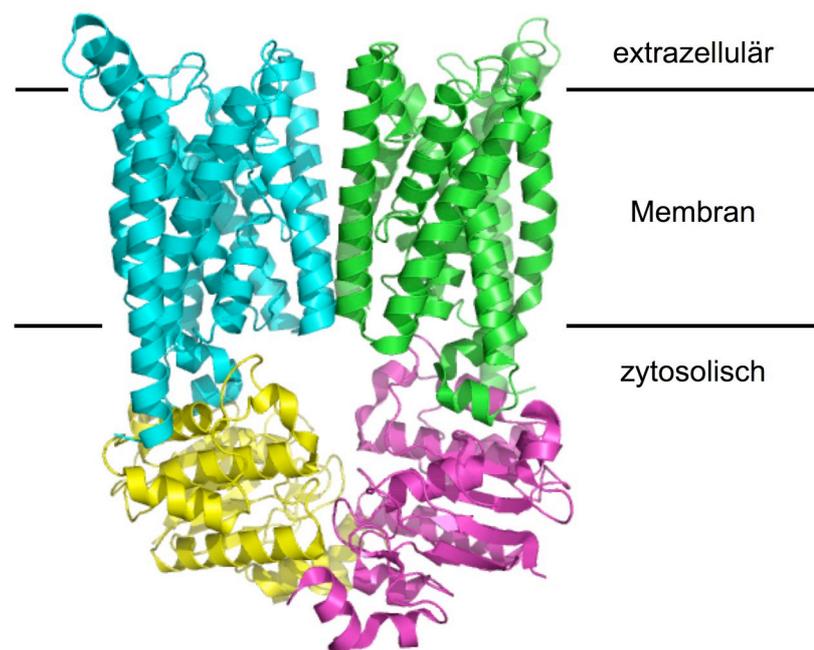


Abbildung 1 Die modulare Struktur von ABC-Transportern

Der Vitamin B₁₂ Transporter BtuC₂D₂ (Proteindatenbank Zugangscode 1L7V) aus *Escherichia coli* (*E. coli*) besteht aus zwei TMDs BtuC (grün und blau) und zwei zytosolischen NBDs BtuD (gelb und pink) (14).

Während in bakteriellen ABC-Transportern die Domänen zumeist auf unterschiedlichen Genen eines Operons kodiert sind, sind die TMDs und NBDs in Hefe und höheren Eukaryoten normalerweise fusioniert und/oder dupliziert, was zu so genannten *full-size* Transportern mit einer gewöhnlichen (TMD-NBD)₂ oder einer

inversen (NBD-TMD)₂ Topologie führt (Abbildung 2). Darüber hinaus sind auch so genannte *half-size* ABC-Transporter bekannt, in denen nur eine NBD mit einer TMD fusioniert ist. Diese *half-size* Transporter müssen homo- oder heterodimerisieren, um einen funktionalen Transporter zu bilden (31).

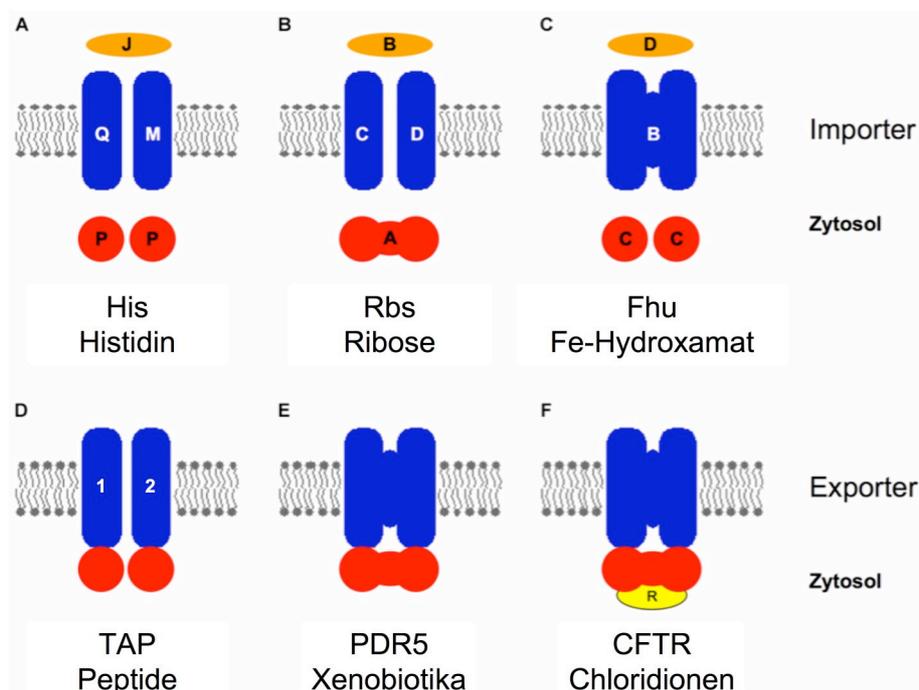


Abbildung 2 Die Domänenorganisation von ABC-Transportern

Beispielhaft sind dargestellt **A)** der in vier (mit dem Substratbindeprotein fünf) getrennten Untereinheiten organisierte Histidin-Transporter, **B)** der aus fusionierten NBDs und separaten TMDs bestehende Ribose-Transporter, **C)** der aus getrennten NBDs und fusionierten TMDs bestehende Eisen-Hydroxamat-Transporter, **D)** der aus zwei TMD-NBD-Kombinationen bestehende heterodimere Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung (TAP; ABCB2 und ABCB3), **E)** der aus einer Polypeptidkette mit vier Domänen bestehende Multidrogentransporter Pdr5p und **F)** der aus fusionierten Domänen sowie einer zusätzlichen regulatorischen Domäne bestehende ABC-Transporter CFTR (ABCC7).

Während ABC-Transporter in der bakteriellen Welt als Importer zur Aufnahme von Nährstoffen ins Zytosol (z.B. Maltose oder Histidin) oder Exporter (z.B. HlyA Toxin-Export oder Antibiotikaresistenz) funktionieren, wurden in mehrzelligen Organismen bisher ausschließlich Exporter identifiziert.

Die Vielfalt der Moleküle, die von ABC-Transportern transportiert werden kann, spiegelt sich in der hohen Sequenz-Diversität der TMDs wieder. Die hohe Konservierung von Sequenz und Faltung der NBDs auf der anderen Seite legt nahe, dass ABC-Transporter chemische Energie von ATP nach einem einheitlichen

Mechanismus für den Substrattransport nutzen. Eine exakte Beschreibung, wie die ATP-Hydrolyse in den NBDs an die Translokationsarbeit in den TMDs gekoppelt wird, ist die zentrale mechanistische Frage im Feld der ABC-Transporter (32).

1.2.2 Die TMDs der ABC-Transporter

Wie bereits beschrieben, formen die TMDs der ABC-Transporter einen Translokationspfad durch die Membran. Die Diversität der Substrate verschiedener ABC-Transporter spiegelt sich in der geringen Sequenzkonservierung dieser Domänen wider, was eine vergleichende Analyse deutlich erschwert. Hydrophobizitätsanalysen und detailliertere Untersuchungen der Topologie von ABC-Transportern sagen 4 bis 10 α -Helizes pro TMD voraus, so dass der Transmembranteil eines kompletten ABC-Transporters aus 8-20 Transmembranhelizes geformt wird (33-35).

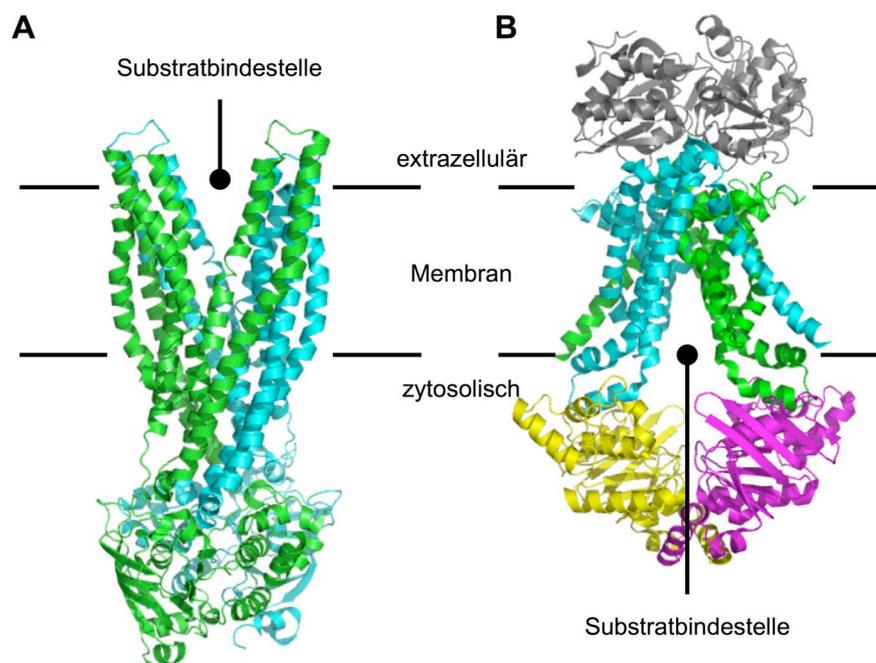


Abbildung 3 Alternierende Zugänglichkeit der Transmembrandomänen

A) Die Kristallstruktur des bakteriellen Sav1866₂ aus *Staphylococcus aureus* (Proteindatenbank Zugangscode 2HYD) zeigt die TMDs in einer Konformation, die einen Zugang des Substrates nur vom extrazellulären Medium aus zulässt. **B)** Die Kristallstruktur des potentiellen Molybdat-Importers ModB₂C₂A aus *Archaeoglobus fulgidus* (Proteindatenbank Zugangscode 2ONK) zeigt die TMDs in einer Konformation, die nur vom Zytosol aus zugänglich ist.

In Analogie zu Transportsystemen der MF Superfamilie und anhand der verfügbaren Kristallstrukturen von voll-assemblierten ABC-Transportern, können die

TMDs vermutlich zumindest zwei deutlich unterscheidbare Konformationen einnehmen: Die Substratbindungsstelle ist dabei entweder nur von der zytosolischen Seite oder der jeweils anderen Seite der Membran zugänglich (Abbildung 3) (36-40).

In TMDs konnte bis heute lediglich eine signifikante Sequenzkonservierung beschrieben werden, welche ein Merkmal für bakterielle ABC-Importer darstellt. Dieses so genannte EAA Motiv (EAAX₃G-X₉IXLP) befindet sich in einer der zytoplasmatischen Schleifen (*loop*) zwischen Transmembranhelix 4 und 5 und stellt höchstwahrscheinlich eine Plattform für die Kommunikation zwischen NBDs und TMDs dar (41,42). Interessanterweise besitzt das EAA Motiv auch eine hohe lokale Sequenzähnlichkeit zum L-*loop* Motiv, das in der Kristallstruktur des Vitamin B₁₂ Transporters BtuC₂D₂ aus *E. coli* als NBD-TMD-Schnittstelle identifiziert wurde (34). Übereinstimmend damit wurden kürzlich ähnliche Architekturen der Schnittstelle aus zwei aufeinander folgenden, kurzen Helizes in den Kristallstrukturen von ModB₂C₂A aus *Archaeoglobus fulgidus* und HI1470/HI1471 aus *Haemophilus influenzae* beschrieben (41,43), wie BtuC₂D₂ ebenfalls bakterielle Importer. Im Gegensatz dazu sind in Sav1866₂, einem Exportsystem aus *Staphylococcus aureus*, die TMDs gegeneinander verdrillt und besitzen ihre NBD-TMD-Schnittstelle im Zentrum des Proteins (44). Die beiden ersten intrazellulären *loop* der TMDs bilden kurze, parallel zur Ebene der Membran verlaufende Helizes, die sozusagen überkreuzt mit beiden NBDs interagieren können (1.3).

Welche dieser beschriebenen NBD-TMD-Schnittstellen tatsächlich auch in anderen Import- und Exportsystemen konserviert sind und ob diese tatsächlich maßgeblich an der Kopplung von NBDs und TMDs beteiligt sind, muss noch durch weitere Struktur-Funktionsanalysen belegt werden.

1.2.3 Die NBDs der ABC-Transporter

Die Untersuchung isolierter NBDs hat wesentlich zum Verständnis des molekularen Mechanismus der ABC-Transporter beigetragen. Die NBDs sind die Motordomänen der ABC-Transporter, die durch Bindung und Hydrolyse von ATP den aktiven Transport ermöglichen. Eine NBD ist gekennzeichnet durch hochkonservierte Sequenzmotive, die auch als diagnostisches Merkmal verwendet werden, um Proteine in die Superfamilie der ABC-Proteine einzuordnen (Abbildung 4). Das Kennzeichen für ein ABC-Protein ist der C-*loop* (LSGGQ) (45). Es findet sich

ausschließlich in ABC-Proteinen und wird auch ABC Signaturmotiv genannt. In der Primärstruktur befindet sich der C-loop zwischen Walker A Sequenz (GXX(G)XGKST, wobei X für jede beliebige Aminosäure steht) und Walker B Sequenz (ΦΦΦΦD, wobei Φ jede hydrophobe Aminosäure darstellt), die in vielen Nukleotid-bindenden und -hydrolysierenden Proteinen zu finden sind (46,47). Neben diesen beschriebenen Motiven existieren in NBDs mit dem Q-loop, dem D-loop und dem H-loop weitere charakteristische Sequenzmotive.

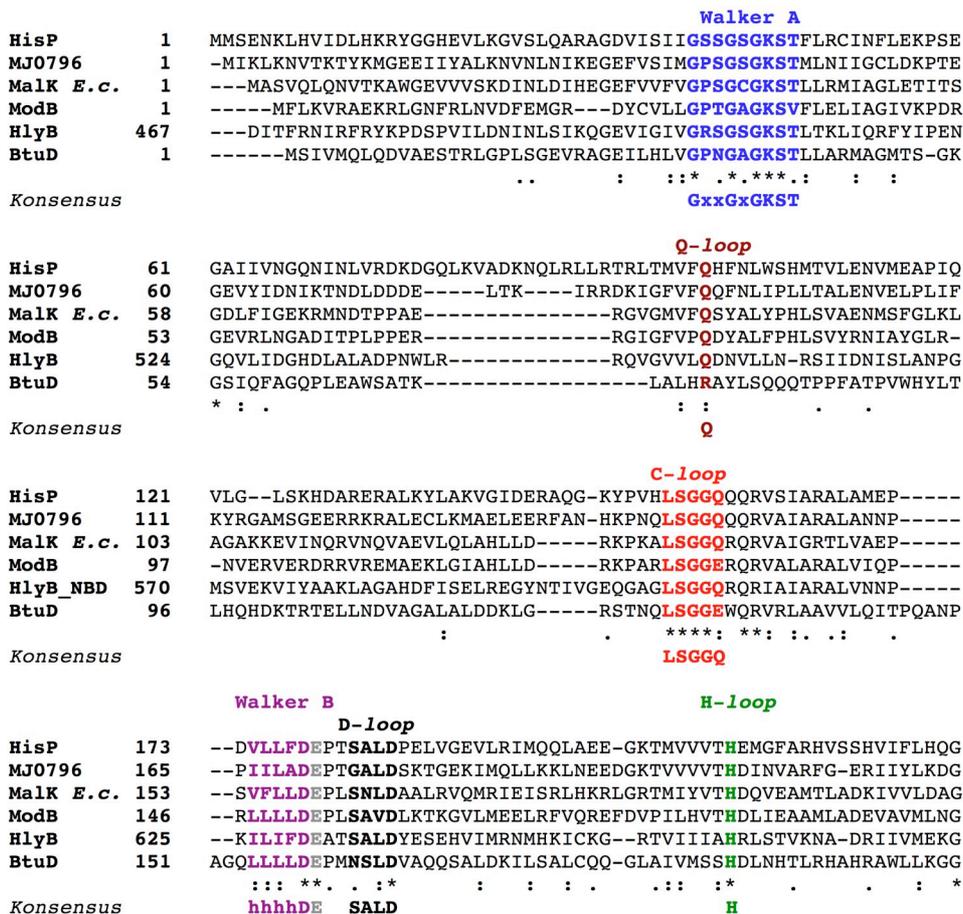


Abbildung 4 Sequenz-alignment von bakteriellen NBDs

Das Sequenz-alignment wurde mit Hilfe des ClustalW Webinterface (www.ebi.ac.uk/clustalw) erzeugt und zeigt Sequenzen aus den NBDs einiger bakterieller ABC-Transporter für die Kristallstrukturen bestimmt wurden. Wichtige konservierte Motive sind farblich markiert und die entsprechenden Konsensussequenzen angegeben. „x“ steht für jede beliebige Aminosäure, „h“ steht für jede hydrophobe Aminosäure.

Im Jahre 1998 wurde die erste Kristallstruktur einer isolierten NBD beschrieben (48), HisP aus *Salmonella typhimurium*. Weitere NBD Strukturen wurden bestimmt (z.B. MalK aus *Thermococcus litoralis*, humanes TAP1 oder HlyB

aus *E. coli*) und bestätigten die L-förmige Struktur aus zwei Subdomänen, der katalytischen und der helikalen Domäne (49-51). Die katalytische Domäne (auch als Arm-I bezeichnet) beinhaltet das Walker A und Walker B Motiv sowie den H- und D-loop (Abbildung 5); die helikale Domäne (Arm-II) umfasst das Signaturmotiv und eine gering konservierte „*structurally diverse region*“ (51), welche die Schnittstelle zur TMD darstellt. Interessanterweise führten in HisP aus *E. coli* Mutationen innerhalb dieser Region zu einer Entkopplung von ATPase-Aktivität und Substrattransport (48). Die helikale und die katalytische Subdomäne werden von zwei Segmenten der Polypeptidkette in der Scharnierregion miteinander verbunden. Diese Verbindungsstücke werden aufgrund besonders konservierter Aminosäuren *Pro-loop* und *Q-loop* genannt.

Einen Überblick über die L-förmige Struktur der NBDs, die Anordnung der Subdomänen zueinander und über die Lage der konservierten Sequenzmotive gibt die Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB aus *E. coli* (51).

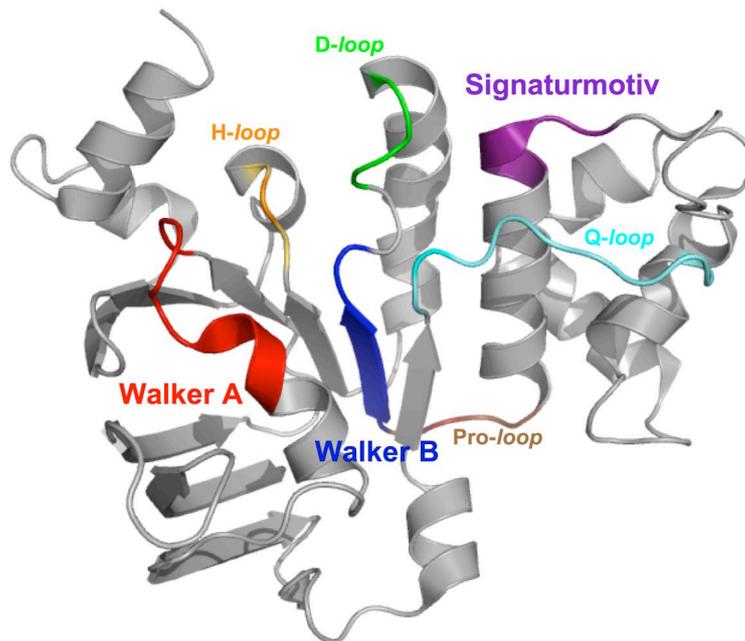


Abbildung 5 Die Struktur von NBDs

Beispielhaft ist die monomere Struktur der isolierten NBD des ABC-Transporters HlyB aus *E. coli* (Proteindatenbank Zugangscode 1MT0) gezeigt (51). Die katalytische Subdomäne enthält die Walker A und Walker B Sequenz sowie den H-loop und den D-loop. Die helikale Subdomäne mit dem Signaturmotiv ist über den Pro-loop und den Q-loop mit der katalytischen Subdomäne verbunden.

Weitere biochemische und strukturelle Untersuchungen an verschiedenen NBDs zeigten, dass die Bindung von ATP eine Einwärtsbewegung der helikalen Domäne um 20° bewirkt und es isolierten, normalerweise monomeren NBDs erlaubt, zu dimerisieren (52-54). Die Strukturen dieser zusammengesetzten Dimere zeigen zwei ATP-Moleküle, die zwischen zwei NBDs vergraben sind und als „molekularer Klebstoff“ wirken. Im Falle der NBD von HlyB aus *E. coli* tragen die beiden ATP-Moleküle zu etwa einem Viertel der gesamten NBD-NBD Interaktionsfläche bei (54). Eine ATP-Bindungstasche wird also durch das Walker A Motiv eines Monomers geformt und vom Signaturmotiv des zweiten Monomers komplettiert.

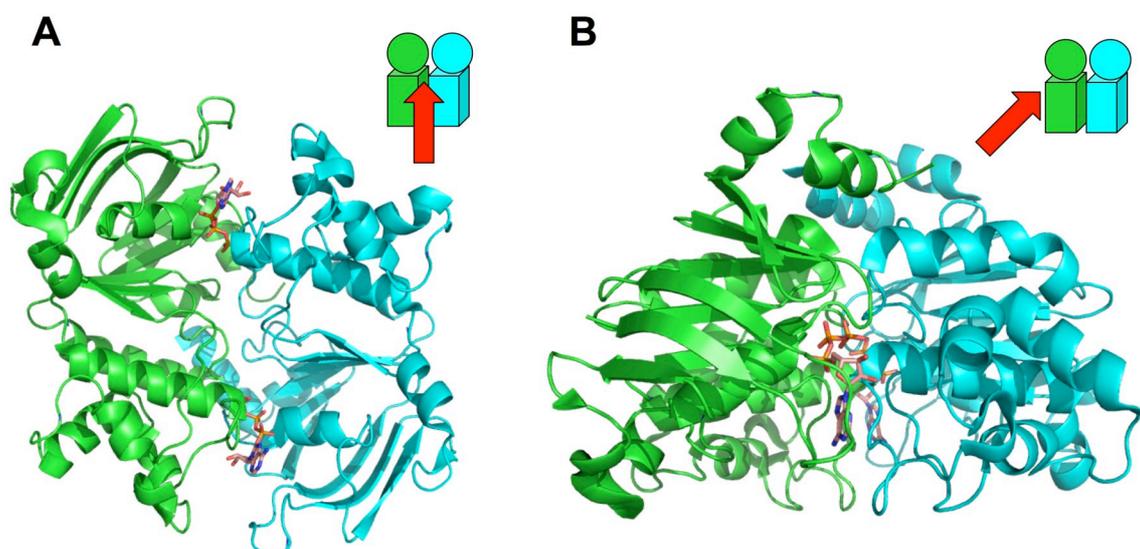


Abbildung 6 **Der ATP induzierte Dimer**

Die Struktur des ATP induzierten HlyB-NBD Dimers zeigt zwei ATP-Moleküle an der Schnittstelle der beiden Polypeptidketten (Proteindatenbank Zugangscode 1MT0). Zur Verdeutlichung werden die Blickrichtungen in einer Skizze dargestellt. **A)** Betrachtung des NBD Dimers aus den TMDs heraus. Diese Darstellung zeigt, dass die Bindungstasche für ein ATP-Molekül aus beiden NBDs zusammengesetzt ist. **B)** Dieselbe Struktur bei frontaler Betrachtung eines ABC-Transporters. In dieser Darstellung lägen die TMDs, die in der Skizze als Quader dargestellt sind, unterhalb der NBDs (Kugeln).

1.3 Der Mechanismus der ABC-Transporter

Trotz intensiver Arbeit zahlreicher Laboratorien sind einige zentrale, mechanistische Fragen im Bereich der ABC-Transporter noch immer ungeklärt oder werden kontrovers diskutiert. i) Wie viele Nukleotide werden in einem Transportzyklus hydrolysiert? ii) Wozu wird die Energie der Hydrolyse von ATP

genutzt? iii) Wie sind die verschiedenen funktionalen Zustände der NBDs an Konformationsänderungen in den TMDs gekoppelt? iv) Welche Aminosäuren sind für die Katalyse der ATP Hydrolyse essentiell und nach welchem Mechanismus wird ATP gespalten?

i) Elegante Studien des ATPase Zyklus am Multidrogentransporter P-Glykoprotein (ABCB1) führten zum so genannten *alternating (catalytic) site* Modell, welches in ähnlicher Form auch für bakterielle Importersysteme (für Histidin und Maltose) erarbeitet wurde (32,55). Ein gemeinsames Postulat dieser Modelle war, dass die Hydrolyse abwechselnd an beiden katalytisch aktiven Seiten des NBD Dimers erfolgt. Während ein ATP-Molekül bis zur Hydrolyse fest gebunden (nicht mit dem umliegenden Medium austauschbar) vorliegt, können an der zweiten NBD die Hydrolyseprodukte ADP und P_i durch ATP ausgetauscht werden. Nach diesem Modell müsste also jeweils nur ein ATP nicht austauschbar gebunden sein und zur Hydrolyse verwendet werden. Allerdings belegten strukturelle und biochemische Analysen von isolierten NBDs, dass zwei Nukleotide in einem NBD Dimer gebunden vorliegen können (56-58). Für den isolierten und in Liposomen rekonstituierten Glycin-Betain Transporter OpuA aus *Lactococcus lactis* wurde eine Stöchiometrie von 2 ATP pro Transportvorgang ermittelt (59). Auf der anderen Seite wiederum legen biochemische Daten und die asymmetrische Konservierung katalytisch relevanter Aminosäuren in vielen eukaryotischen ABC-Transportern (z.B. der PDR-Familie in *S. cerevisiae* (60), der ABCC Familie (61), und dem humanen Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung (TAP)) (62) die Vermutung nahe, dass die Hydrolyse in nur einer NBD nötig ist, um den Transportvorgang zu ermöglichen. Eine gründliche Evaluierung der verwendeten Methoden und Modellsysteme ist also eine Voraussetzung, um ein vereinigendes Modell entwerfen zu können.

ii) Ein zentrales Postulat der ursprünglichen *alternating catalytic site* Modelle war, dass die freiwerdende Energie aus der Hydrolyse von ATP direkt an die Translokation des Substrates gekoppelt ist („*power stroke*“) (32,55,63). Zahlreiche neuere biochemische und strukturelle Studien implizieren allerdings, dass in ABC-Exportern vielmehr die ATP-induzierte Bildung eines NBD Dimers an die Translokation des Substrates gekoppelt ist (36,40,58,64,65). Der Hydrolyse des ATP käme nach dem eigentlichen Translokationsvorgang die Rolle zu, den Transporter in

seinen Anfangszustand zurückzuführen, um neue Transportsubstrate binden zu können.

iii) Obschon bereits 1995 von Alan Senior als Hauptziel definiert (32), stellt die Untersuchung, wie verschiedene funktionale Zustände der NBDs an konformationelle Änderungen in den TMDs gekoppelt sind, bis heute eine besondere Herausforderung dar. Zur Zeit kann über die genaue Art der Kraftübertragung von NBDs auf TMDs nur spekuliert werden (36,39,40).

Die Untersuchung der Schnittstellen zwischen NBDs und TMDs in Kristallstrukturen vollständiger ABC-Transporter ist mit Sicherheit von großer Hilfe bei der Identifizierung kopplungsrelevanter Regionen. Bis heute wurden hochauflösende Strukturen von vier ABC-Transportern bestimmt (34,41,43,44).

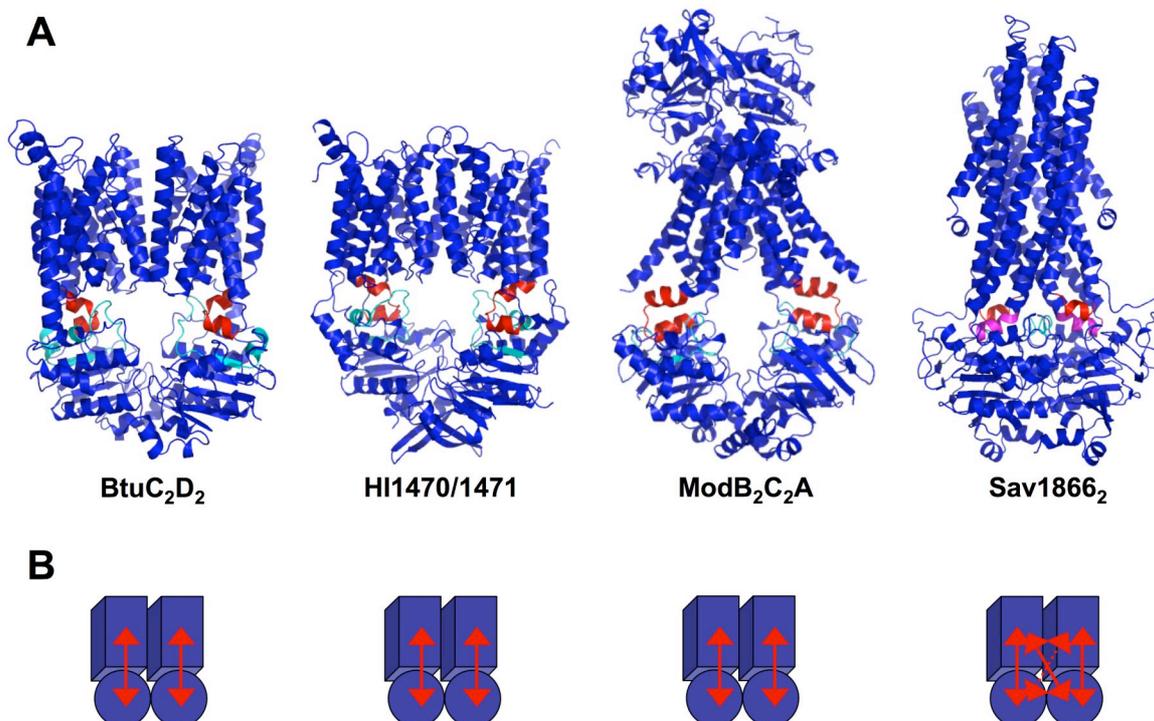


Abbildung 7 **Identifizierte Schnittstellen zwischen TMDs und NBDs**

A) Die Abbildung zeigt die Kristallstrukturen der bakteriellen Importer BtuC₂D₂, HI1470/1471 und ModB₂C₂A sowie des Multidrogentransporters Sav1866₂. Anteile der TMD, die vermutlich die Kopplung zur NBD bewirken, wurden rot/pink eingefärbt, die entsprechenden Anteile der NBD sind hellblau markiert. In den Strukturen der bakteriellen Importsysteme bilden zwei kurze, dicht aufeinander folgende Helizes die Schnittstelle zur NBD aus. Auf der Seite der NBD sind es die Aminosäuren um das hochkonservierte Glutamin des Q-loop, die Kontakte zur TMD ausbilden. In Sav1866₂ liegt die Kontaktregion in Zentrum des Proteins. Die intrazellularen *loops* 1 und 2 der TMD interagieren mit dem X-loop beider NBDs. **B)** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen NBDs (Kugeln) und TMDs (Quader) in den entsprechenden ABC-Transportern. Ein gestrichelter Pfeil deutet eine mögliche Interaktion in einem anderen funktionalen Zustand des Proteins an.

Auf der Seite der TMDs wurde im bakteriellen Vitamin B₁₂-Importsystem BtuC₂D₂, zwischen den Transmembranhelices 6 und 7 ein zytoplasmatischer, L-förmiger *loop* identifiziert. Dieser *L-loop* formt substantielle Kontakte mit einer NBD. Wie bereits beschrieben, sieht die Architektur der Kontaktzone im bakteriellen *half-size* Exportsystem Sav1866₂ signifikant anders aus. In dieser Struktur wurde eine Region im Zentrum des Proteins beschrieben, in der die intrazellulären *loop* 1 und 2 aus beiden TMDs mit beiden NBDs wechselwirken.

Auf der Seite der NBDs wurde in der Kristallstruktur von Sav1866₂ innerhalb der bereits beschriebenen *structurally diverse region* der NBDs (51) ein konserviertes Sequenzmotiv entdeckt (TEVGGERG) (44), welches für ABC-Exporter spezifisch zu sein scheint und vermutlich die Kommunikation zwischen NBDs und TMDs vermittelt (*X-loop*). Die Abwesenheit dieses Sequenzmotivs in bakteriellen ABC-Importern lässt vermuten, dass in diesen Systemen ein anderer Kopplungsmechanismus verwendet wird. In Übereinstimmung mit den zuvor publizierten Strukturen wird auch in den Strukturen der bakteriellen Importsysteme HI1470/HI1471 und ModB₂C₂A ein Großteil der Kontaktfläche zwischen TMD und NBD vom *Q-loop* der NBDs gebildet (41,43).

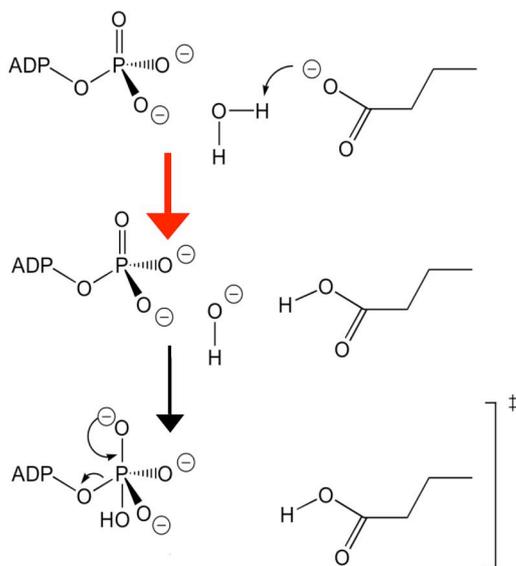
Eine genauere Beschreibung der mechanischen Kopplung der NBD an die TMD und der einhergehenden konformationellen Änderungen in den TMDs ist aus der Kristallstruktur einer einzelnen Konformation eines ABC-Transporters nicht zu extrahieren. Ob der Transport des Substrates also eher Klappbewegungen oder Verdrillen der TMDs zueinander beinhaltet, bleibt bis zum heutigen Tage genauso unklar wie die Frage, ob und wie die Substratbindung und -freisetzung an die NBDs übermittelt wird (66) und die Hydrolyse oder den Austausch von Nukleotiden reguliert (51).

Will man die Frage nach Kopplung zwischen NBDs und TMDs also zweifelsfrei beantworten, bedarf es A) einer Vielzahl hochauflösender Strukturen von ABC-Transportern in verschiedenen funktionalen Zuständen und B) müssen auf der Grundlage der beobachteten konformationellen Unterschiede Homologiemodelle erstellt werden, die mit Hilfe systematischer Mutagenesestudien auf ihre Richtigkeit überprüft werden können.

Gesucht wird also ein Modellsystem, das eine schnelle Mutagenese und die simultane Beobachtung von Substrattransport und ATPase erlaubt. Auf diese Weise können Mutationen identifiziert werden, die an der Kommunikation zwischen TMD und NBD beteiligt sind.

iv) Nach welchem Mechanismus wird ATP gespalten (54,64,67)? Die Bedeutung dieser Frage wird schnell offenbar, wenn man bedenkt, dass sich vermutlich alle direkt an der Katalyse beteiligten und essentiellen Aminosäuren in der katalytischen Subdomäne der NBD befinden. Wie wird in einem vollständigen ABC-Transporter also eine unerwünschte Hydrolyse von ATP verhindert, bevor sich der NBD Dimer geformt hat?

Allgemeine Basenkatalyse



Substrat assistierte Katalyse

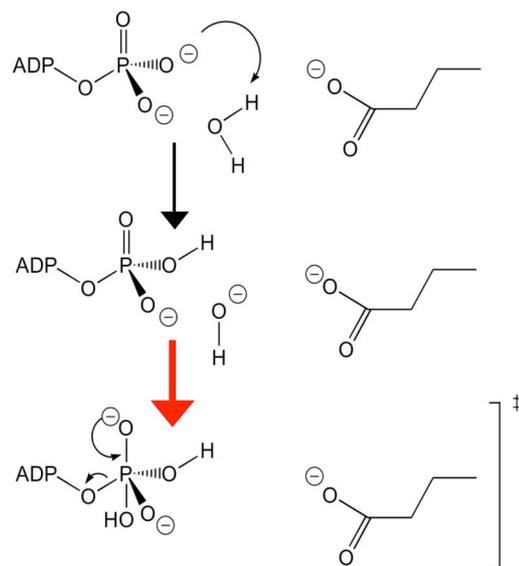


Abbildung 8 Hydrolyse von ATP - zwei konkurrierende mechanistische Modelle

Chemische Skizzen verdeutlichen die zentralen Unterschiede zwischen der allgemeinen Basenkatalyse und der Substrat-assistierten Katalyse (*substrate assisted catalysis*; SAC) (54). Während in der allgemeinen Basenkatalyse das als Nukleophil attackierende Wassermolekül durch ein Carboxylat aktiviert wird, abstrahiert in der SAC das ATP selbst das Proton vom Wasser. Der in dieser Reaktion jeweils ratenlimitierende Schritt ist in den beiden Szenarien unterschiedlich und wird durch einen roten Pfeil hervorgehoben.

Es gibt im Prinzip zwei Möglichkeiten, wie ein ABC-Transporter gebundenes ATP hydrolysieren kann (Abbildung 8). Diese extremen Szenarien wurden als allgemeine Basenkatalyse und Substrat-assistierte Katalyse (SAC) bezeichnet. Wird

der notwendige nukleophile Angriff eines Wassermoleküls am γ -Phosphat des ATP mit Hilfe eines katalytischen Carboxylats ermöglicht, so stellt die Abstraktion eines Protons vom Wasser bzw. die Polarisation des Wassers den ratenlimitierenden Schritt der Reaktion dar. Während diese allgemeine Basenkatalyse also von einem Carboxylat im Protein abhängt, polarisiert bei der SAC das ATP selbst das angreifende Wasser. Die Eleganz der SAC liegt darin, dass durch sie das Problem der unerwünschten Hydrolyse gelöst wird. Die Voraussetzung für die SAC durch ATP ist nämlich ein bestimmter lokaler pH-Wert, der lediglich im zusammengesetzten NBD Dimer erreicht wird (68). Dieser Mechanismus verhindert also die unerwünschte Hydrolyse des ATP vor der Dimerisierung der NBDs, die an die Substrattranslokation gekoppelt ist.

1.4 Antigenprozessierung und Präsentation

Wie schützen sich Wirbeltiere gegen intrazelluläre Pathogene? Viren und zahlreiche Bakterien vermehren sich innerhalb von infizierten Zellen und benutzen auf vielfältige Weise den biosynthetischen und metabolischen Apparat des Wirts zur Produktion infektiöser Partikel. Während extrazelluläre Pathogene mit der humoralen Immunantwort bekämpft werden können, ist das Zellinnere - mit den sich darin befindlichen Erregern - für Antikörper unzugänglich. Die MHC Klasse I-abhängige Präsentation intrazellulärer Peptide auf der Zelloberfläche stellt die Lösung für dieses Problem dar (69).

Sowohl endogene und als auch pathogene Proteine werden durch das 26S und/oder das 20S Proteasom im Zytosol zu Peptiden prozessiert (70,71). Ein kleiner Teil dieser Peptide wird dann in einem ATP-abhängigen Prozess vom Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung (TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) befördert und kann dort auf leere MHC Klasse I-Moleküle geladen werden (27,72,73). Die Beladung eines leeren MHC Klasse I-Moleküls ist ein zentraler Assemblierungsschritt und Voraussetzung für das Durchlaufen der ER Qualitätskontrolle (74). Lediglich assemblierte Peptid-MHC Klasse I-Komplexe werden aus dem ER entlassen und entlang des sekretorischen Weges an die Zelloberfläche verschickt. Hier können die antigenen Peptide durch CD8⁺ T-Lymphozyten inspiziert werden. Die Erkennung von „Fremd“-Peptiden löst daraufhin die Lyse oder Apoptose der infizierten oder malignen Zelle aus (27,75).

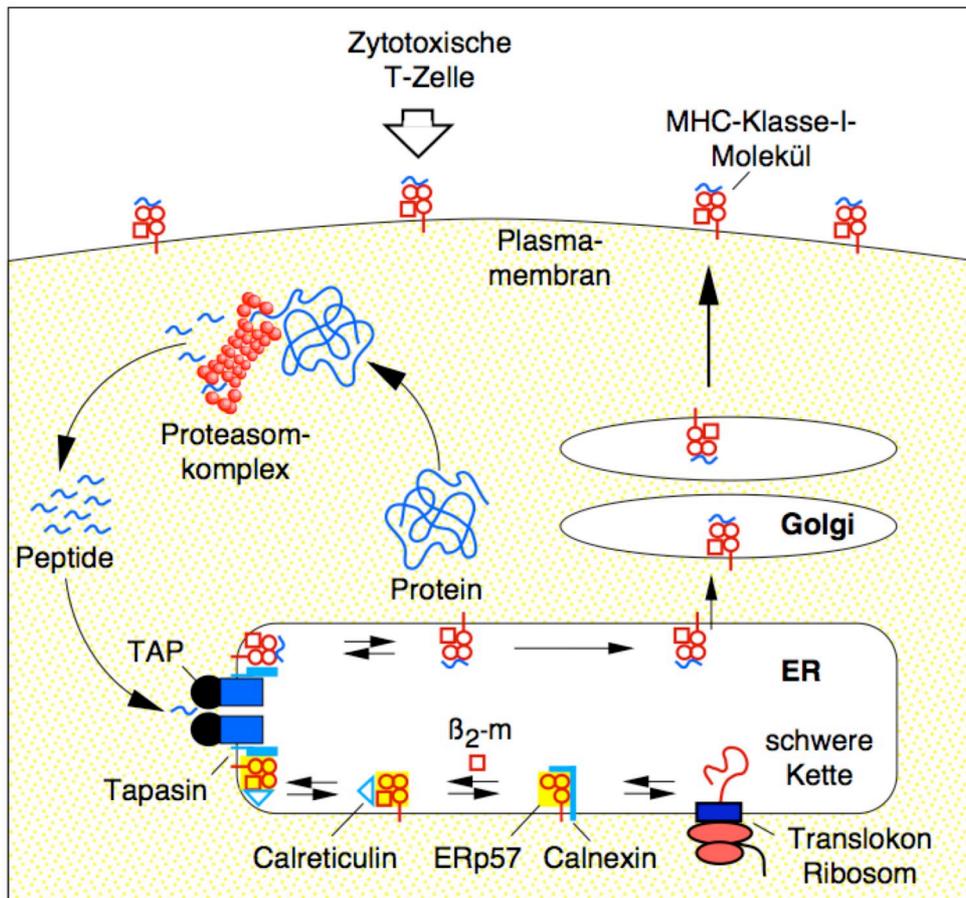


Abbildung 9 Die MHC-Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation

Endogene Proteine werden durch den Proteasomkomplex zu Peptiden degradiert, durch den Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung (TAP) in das Lumen des ER transportiert und in einem makromolekularen Peptid-Beladungskomplex aus TAP, Tapasin, Calreticulin, ERp57 und MHC-Klasse I auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen. Kinetisch stabile Antigenpeptid/MHC-Klasse I-Komplexe können den Peptid-Beladungskomplex verlassen, durchlaufen erfolgreich die ER Qualitätskontrolle und erreichen schließlich über den Golgi-Komplex die Zelloberfläche. Dort werden sie zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert. Stammt das Peptid aus einem körperfremden Protein, wird die präsentierende Zelle von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und durch die Ausschüttung von Perforinen und einigen weiteren Faktoren lysiert bzw. zur Apoptose angeregt. Die Assemblierung der MHC-Klasse I-Moleküle wird durch die Chaperone BiP, Calnexin, Calreticulin sowie durch die thiolabhängige Reduktase ERp57 unterstützt.

Der Translokationsschritt antigener Peptide vom Zytosol in das Lumen des ER spielt also eine für die MHC Klasse I vermittelte Immunantwort essentielle Rolle und erfordert zwei Proteine: TAP1 (im Menschen 748 Aminosäuren) und TAP2 (im Menschen 686 Aminosäuren) bilden in der Membran des ER einen heterodimeren, funktionalen ABC-Transporter. Während für den ATP-abhängigen Transport jeweils

nur die sechs C-terminalen Transmembranhelizes essentiell zu sein scheinen (76), wurden in TAP1 10 Transmembranhelizes bestimmt und für TAP2 9 Transmembranhelizes vorhergesagt. Die zusätzlichen N-terminalen Helizes scheinen als Plattform für die Bildung eines makromolekularen Peptid-Beladungs-Komplexes (bestehend aus 1 x TAP, 4 x Tapasin, 4 x MHC Klasse I-Molekülen, 4 x ERp57 und 4 x Calreticulin) zu dienen (77,78).

Eine Besonderheit des TAP Transporters ist die Asymmetrie seiner NBDs (62,79). Obwohl beide NBDs ATP binden und hydrolysieren können, wird ihre funktionale Unterschiedlichkeit zunehmend evident. Die TAP2-NBD scheint ATP viel rascher zu hydrolysieren als die TAP1-NBD, während die TAP1-NBD eine höhere Affinität zu ATP besitzt. Die Hydrolyse von ATP in der TAP2-NBD scheint für die Peptidtranslokation essentiell zu sein, während die Hydrolyse in der TAP1-NBD eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Möglicherweise stellt die geringe ATPase-Aktivität der TAP1-NBD eine Anpassung an die Energetik und Kinetik des Peptidtransports dar, so dass die Hydrolyse von nur einem ATP in TAP2 ausreicht, um ein Peptid zu transportieren, während die Bindung von ATP an die TAP1-NBD eher eine regulatorische Funktion besitzt (80,81). Ein ähnlich asymmetrisches Verhalten der NBDs in Bezug auf die Hydrolyse von ATP wurde auch in anderen menschlichen ABC-Transportern beobachtet, wie zum Beispiel in CFTR (ABCC7) (17) und MRP1 (ABCC1) (82).

1.5 ABC-Proteine und Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) war der erste eukaryotische Organismus dessen komplettes Genom sequenziert wurde, und beinhaltet 30 ABC-Protein Gene. ABC-Proteine spielen in Hefen und anderen Pilzen eine zentrale Rolle in der Erhaltung der mitochondrialen Funktion, der Reifung zytosolischer Fe/S Proteine, im Pheromontransport, bei der Stress-Antwort und für die zelluläre Detoxifikation.

An dieser Stelle kann nur ein sehr kurzer Überblick über die vielfältigen Funktionen der verschiedenen ABC Unterfamilien in *S. cerevisiae* gegeben werden. Basierend auf phylogenetischer Analyse und strukturellen Ähnlichkeiten mit ABC-Proteinen aus Säugetieren wurden die ABC-Proteine von *S. cerevisiae* in fünf Unterfamilien eingeordnet: MDR, PDR, MRP/CFTR, ALDp, YEF3 /RLI (83).

Die Nicht-ABC-Transporter Gene sind in der YEF3/RLI Unterfamilie zusammengefasst.

Ste6p gehört zur Multidrogenresistenz (MDR) Unterfamilie und war der erste identifizierte ABC-Transporter in *S. cerevisiae* (84). Obwohl Ste6p unter „*steady-state*“ Bedingungen im Golgi-Komplex und in Endosomen-ähnlichen Kompartimenten lokalisiert ist, ist seine Funktion der ATP-abhängige Transport des *a-Mating*-Faktors über die Plasmamembran. Die weiteren Gene aus der MDR Unterfamilie kodieren für mitochondriale *half-size* Transporter (85). Atm1p ist ein ABC-Transporter der inneren Mitochondrienmembran, der vermutlich Fe/S Vorläufer aus den Mitochondrien in das Zytosol schleust (86,87). Auch Mdl1p und Mdl2p befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran. Mdl1p wurde als intrazellulärer Peptidtransporter identifiziert (88), während die Funktion von Mdl2p noch nicht beschrieben wurde.

Die am besten charakterisierten ABC-Transporter der „*multidrug related protein*“ (MRP/CFTR) Familie sind Yor1p und Ycf1p. Überexpression von Yor1p verleiht Zellen eine Resistenz gegen Oligomycin, Feveromycin A und organische Anionen (89-91). Ycf1p vermittelt die Detoxifizierung des Zytosols, indem es Schwermetalle (z.B. Cadmium) und Glutathion-S-Konjugate in das Lumen der Vakuole pumpt (89-91). Der *full-size* Transporter Bat1p soll sowohl Gallensalze in das Lumen der Vakuole pumpen sowie als Peptidtransporter arbeiten (92).

Die Adrenoleukodystrophie Familie (ALDp) umfasst nur zwei Gene, PXA1 und PXA2. Beide kodieren für *half-size* Transporter und sind vermutlich ortholog zu den humanen ALDP und PMP70. Sie sind für den Import von langkettigen Fettsäuren in Peroxisomen zur nachfolgenden β -Oxidation verantwortlich (93,94).

Die Gruppe der PDR Gene formt die größte Unterfamilie der ABC-Transporter in Hefe. Die Plasmamembran ABC-Transporter Pdr5p und Snq2p vermitteln pleiotrope Drogenresistenz durch die Translokation hunderter strukturell und funktional unterschiedlicher Substrate. Pdr5p und Snq2p sind funktional homolog zum humanen P-Glykoprotein (ABCB1) (95,96). Pdr12p transportiert schwache organische Säuren, Pdr11p und Aus1p sind für die Aufnahme von Sterolen verantwortlich (97-99).

1.6 Pleiotrope Drogenresistenz in *S. cerevisiae*

Einige Gene der PDR und MRP-CFTR Unterfamilien konnten mit dem Phänomen der pleiotropen Drogenresistenz in *S. cerevisiae* in Verbindung gebracht werden (95,100). Pleiotrope Drogenresistenz (PDR) beschreibt die Kreuzresistenz gegen eine Vielzahl strukturell und funktional nicht verwandter zytotoxischer Substanzen und Xenobiotika. PDR entwickelt sich als Konsequenz unterschiedlicher, aber oft simultan funktionierender Mechanismen (Abbildung 10). i) Mutationen in Zielgenen der zytotoxischen Agenzien und ii) eine transkriptionale Aktivierung/Deaktivierung kann die Sensitivität gegen diese Substanzen senken. Die Reduktion der effektiven intrazellulären Konzentration kann auch durch iii) enzymatische Drogeninaktivierung, iv) verminderte Aufnahme, v) verminderte Permeabilität der Plasmamembran oder vi) vakuoläre Sequestration erreicht werden. Einer der Hauptgründe für erworbene Drogenresistenz Phänotyp in Pilzen (95,100) und höheren Organismen (101) ist ein vii) drastisch erhöhter Drogenausstoß, welcher durch die Überexpression von unspezifischen, Plasmamembran-ständigen ABC-Transportern hervorgerufen wird.

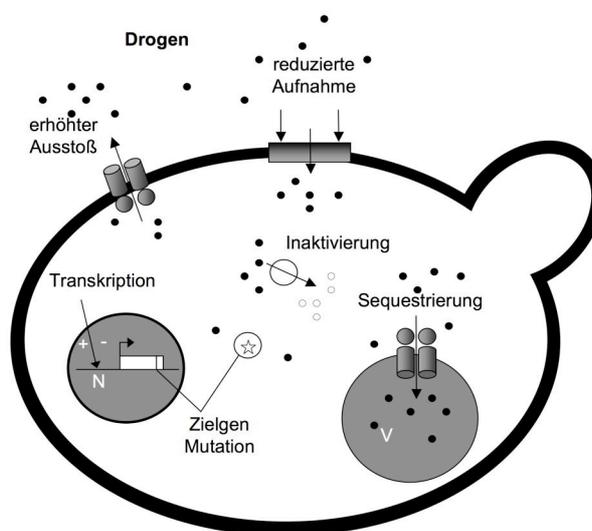


Abbildung 10 **Mechanismen der Drogenresistenz**

Ein Drogenresistenz-Phänotyp kann verschiedene molekulare Ursachen haben. Jeder einzelne Mechanismus kann allein oder in Kombination mit anderen die Ursache für einen Drogenresistenz Phänotyp sein. Pleiotrope Drogenresistenz resultiert häufig aus der Überexpression von Plasmamembran-ständigen ABC-Transportern. N: Nukleus; V: Vakuole (96).

Zahlreiche Studien haben ein komplexes, regulatorisches Netzwerk offen gelegt, welches die Entwicklung von PDR in Hefe kontrolliert. Das PDR-Netzwerk umfasst spezialisierte Transkriptionsfaktoren und Stress-Antwort-Faktoren, welche die Expression von ABC Genen positiv und negativ regulieren können (16,83,102). Hauptziel dieser Regulation sind Plasmamembran ABC-Transporter, aber auch Membranpermeasen der MF Familie (16,83). Interessanterweise wurden durch genomweite Mikroarraystudien neue Kandidaten des PDR-Netzwerks identifiziert, von denen einige bereits zuvor mit Stress-Antwort, Lipid- und Zellwand-Metabolismus in Verbindung gebracht wurden (103).

1.7 Die Regulation des PDR-Netzwerks von *S. cerevisiae*

Das PDR-Netzwerk steht unter strikter Kontrolle einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche Pdr1p, Pdr3p, Pdr8p, Yrr1p, Yrm1p, War1p umfassen (104-108). Viele Faktoren tragen zur Regulation des PDR-Netzwerks bei, jedoch gelten Pdr1p und Pdr3p noch immer als die zentralen Regulatoren der PDR. Pdr1p und Pdr3p können Homo- und Heterodimere bilden und befinden sich stets im Zellkern. Sie binden an so genannte pleiotrope Drogenresistenz Elemente (PDREs, 5'-TCC(G/A)(C/T)G(G/C)(A/G)-3') in Zielpromotoren. Ein einzelnes *cis*-aktives PDRE ist notwendig und ausreichend um Pdr1p/Pdr3p Regulatoren anzuziehen (109,110). Die Deletion beider Gene verursacht eine markante Hypersensitivität gegen Drogen, da durch Pdr1p und Pdr3p die basale Expression zahlreicher PDR-vermittelnder Gene reguliert wird (103,110,111). Die Anwesenheit zweier PDREs in den Promotoren von PDR3 und YRR1 spielt vermutlich eine Rolle in der Autoregulation ihrer Kontrolle (112,113). Interessanterweise können Pdr1p und Pdr3p aber auch entgegen gesetzte Regulationseffekte auf homologe ABC-Transporter haben. Die Deletion von PDR1 verhindert die *PDR5*-Expression. Im Gegensatz dazu hängt die Expression von PDR15 lediglich von PDR3 ab. Eine Deletion von PDR1 erhöht sogar das mRNA Level von PDR15 (111).

Pdr1p und Pdr3p besitzen eine 37%ige Sequenzidentität und besitzen übereinstimmend mit der Architektur anderer Zn(II)₂Cys₆ Zinkfinger Transkriptionsfaktoren eine molekulare Architektur aus einem N-terminalen Zinkfinger, der die DNA-Bindung vermittelt, einer zentralen Inhibitionsdomäne und einer C-terminalen Aktivierungsdomäne (106). Von besonderer Bedeutung für die

Analyse und das Verständnis der PDR war die Identifizierung von so genannten „*gain-of-function*“ Mutationen in PDR1 und PDR3 (114). In genetischen Screens nach erhöhter Drogenresistenz wurden Mutationen in den Inhibitionsmotiven von PDR1 und PDR3 identifiziert. Hyperaktive Allele von PDR1 und PDR3 verursachten durch dramatische Überexpression von Multidrogentransportern wie Pdr5p, Snq2p und Yor1p einen PDR Phänotyp. Besonders beeindruckend ist das *pdr1-3* Allel, das eine P815S Substitution trägt, und PDR5 100fach stärker als der Wildtyp exprimiert (114).

1.8 Die funktionale Analyse des Plasmamembran ABC-Transporters Pdr5p

Kein ABC-Transporter in *S. cerevisiae* liegt während der logarithmischen Wachstumsphase in einer höheren Kopienzahl vor als Pdr5p (115). Bereits 1994 wurde PDR5 in drei unabhängigen Studien anhand seiner Fähigkeit PDR zu vermitteln entdeckt und beschrieben (116-118). Wie also schützt Pdr5p Hefezellen gegen verschiedenste zytotoxische Substanzen? Als Grundvoraussetzung für eine funktionale Analyse dieses potentiellen Multidrogentransporters wurden zunächst Deletionsstämme und Überexpressionsstämme von *PDR5* erzeugt (114,119). Bemerkenswerterweise ist Pdr5p trotz seiner hohen Kopienzahl unter normalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae*. Allerdings zeigten Deletionsstämme von *PDR5* eine deutliche Hypersensitivität gegen eine Vielzahl von Xenobiotika, Anti-Krebs- oder Anti-Pilz-Giften (15).

Die funktionale Analyse von *PDR5* umfasste Experimente an lebenden Zellen, wie zum Beispiel die Beobachtung von Wachstumsphänotypen, in Flüssigkultur und auf Drogen-Agar-Platten (117), oder die Akkumulation von fluoreszierenden Farbstoffen und deren Quantifizierung mittels Fluoreszenz-assistierter Zell Sortierung (FACS) (120). Die Kombination dieser Methoden mit zufälliger und teilweise gerichteter Mutagenese führte zur Identifizierung zahlreicher für die Faltung, Transportfunktion und Substratspezifität wichtiger Reste (120-122). Ein anderes wichtiges Werkzeug für die Analyse der Pdr5p-Funktion und die Suche nach Pdr5p-spezifischen Inhibitoren sowie für die Entschlüsselung ihres Wirkmechanismus war die Etablierung eines Fluoreszenz-basierten, ATP-abhängigen Transport-Assays in Plasmamembran-Präparationen (25). Da das Prinzip dieses Rhodamin6G-Auslöschungsassays höchstwahrscheinlich auf der

ATP-abhängigen Erzeugung eines Konzentrationsgradienten beruht, konnte mit diesem Assay zum ersten Mal gezeigt werden, dass Rhodamine6G tatsächlich aktiv in einer ATP-abhängigen Reaktion von einem Plasmamembran assoziierten Protein in *S. cerevisiae* transportiert wird.

Eine andere Reihe von Studien befasste sich mit der Überexpression von *PDR5* sowie der Solubilisierung und Charakterisierung von Pdr5p in Detergenzlösung (90,123,124). Es wurde eine Nukleosid-Phosphatase Aktivität von Pdr5p beschrieben, die in ihren Eigenschaften klar von der Aktivität der *S. cerevisiae* Plasmamembran Protonenpumpe Pma1p unterscheidbar war.

Zusammenfassend wurden in verschiedenen Studien bereits zahlreiche Methoden etabliert, um die Funktion von Pdr5p *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Nur eine Kombination all dieser Methoden, der systematischen Mutagenese funktional bedeutsamer Aminosäuren, der parallelen *in vitro* Analyse von Drogentransport und ATP-Hydrolyse, erlaubt eine umfangreiche und detaillierte Struktur-Funktionsuntersuchung dieses Multidrogentransporters.

1.8.1 Mutagenesestudien an *PDR5*

Struktur-Funktions-Analysen durch zufällige Mutagenese an *PDR5* erlaubten bereits die Identifizierung bedeutender Aminosäuren für die Faltung, Substraterkennung und Transportfunktion (120). Nicht-funktionale Pdr5p-Moleküle resultierten entweder aus Mutationen in den NBDs oder führten zur Missfaltung im ER.

Einige beschriebene Mutationen von *PDR5* und anderen homologen Multidrogentransportern aus klinisch relevanten Pilzen sind in Tabelle 1.8-A zusammengefasst (60,122,125-128).

Der Aminosäureaustausch C1427Y im sechsten vorhergesagten extrazellulären *loop* zwischen Transmembranhelix 11 und 12 verhindert die korrekte Faltung von Pdr5p. Pdr5p wird im ER zurückgehalten und nach Polyubiquitinierung und Retrotranslokation im zytoplasmatischen Proteasom abgebaut. Eine doppelte Mutation im erweiterten C-*loop* der C-terminalen NBD von Pdr5p (G905S/G908S) führte zu einem vollständigen Verlust der Transport-Aktivität von Pdr5p. Dieses Ergebnis zeigt, dass die N-terminale NBD von Pdr5p für eine Transport-Aktivität von Pdr5p nicht ausreichend ist.

Organismus/Gen/AS	AS in PDR5	Ort	Effekt
<i>C.albicans</i> /CDR1 NBD/C193A	C199A	NBD1 Walker A Motiv	95% Verlust der ATPase-Aktivität
<i>C.albicans</i> /CDR1 NBD/C193K	C199K	NBD 1 Walker A Motiv	instabiles Protein
<i>C.albicans</i> /CDR1 NBD/W326A	W332A	NBD1 Walker B Motiv	geringere ATP-Affinität
<i>C.albicans</i> /CDR1 NBD/D327A	D333A	NBD1 Walker B Motiv	90% Verlust der ATPase-Aktivität
<i>C.albicans</i> /CDR1 NBD/D327N	D333N	NBD1 Walker B Motiv	90% Verlust der ATPase-Aktivität
<i>C.albicans</i> /CDR1/D327N	D333N	NBD1 Walker B Motiv	ca. 80% Verlust der ATPase-Aktivität Verlust der Multidrogenresistenz
<i>C.albicans</i> /CDR1/W326A	W332A	NBD1 Walker B Motiv	gering verringerte ATPase-Aktivität kaum Einfluss auf Drogenresistenz
<i>C.albicans</i> /CDR1/C193A+W326A	C199A+W332A	NBD1 Walker A Motiv	80% Verlust der ATPase-Aktivität Verlust der Multidrogenresistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	G302D	NBD1 N-term. zum C-loop	Verringerte Drogenresistenz Verlust der Rhodamin6G-Resistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	G1009C	NBD2 N-term. zum C-loop	Verringerte Drogenresistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	G905S 908S	NBD2 Walker A Motiv	Verlust der Multidrogenresistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	G1040D	NBD2 D-loop	Verlust der Cycloheximid-Resistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	S648F	TMH4	Verringertes Resistenzspektrum
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	E1289K	TMH9	Verringertes Resistenzspektrum
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	S1360A	TMH10	Erhöhte FK506-Sensitivität
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	S1360F	TMH10	Verlust der FK506-Sensitivität
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	T1364F	TMH10	Verringerte FK506-Sensitivität Verringerte Rhodamin6G-Resistenz Verringerte Azol-Resistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	T1364A	TMH10	Verringerte FK506-Sensitivität
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	T1460I V1467I	extraz. loop 6	Verlust der Ketoconazol-Resistenz Verlust der Itraconazol-Resistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	C1427Y	extraz. loop 6	ER-Retention Proteasomaler Abbau
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	T1393I	extraz. loop 6	Verlust der Cycloheximid-Resistenz Verringerte Azol-Resistenz
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	Y1311S	extraz. loop 5	annähernd kein Effekt
<i>S. cerevisiae</i> /PDR5	S1048V	intraz. loop 3	Deutlich verringertes Resistenzspektrum

Tabelle 1.8-A Mutagenesestudien an PDR5 aus *S. cerevisiae* und CDR1 aus *C. albicans*

Unter einigen identifizierten Mutationen in Pdr5p, die eine veränderte Substratspezifität bewirkten, ist die S1360F-Mutante besonders bemerkenswert (120,121). Das Serin 1360 liegt in der vorhergesagten Transmembranhelix 10 und spielt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Substraterkennung und der

Bindung von Inhibitoren. Die Mutation dieses Serins zu Phenylalanin verringert die Affinität von Pdr5p zu den Mycotoxinen, Ketokonazol und Itrakonazol sowie dem Translationsinhibitor Cycloheximid. Interessanterweise kann in der S1360F-Mutante die Ketoconazol-Resistenz durch FK506 nicht mehr aufgehoben werden. Vermutlich liegt die polare Aminosäure Serin an der Lipid-abgewandten Seite von Pdr5p und ist direkt an der Bindung von Substraten und Inhibitoren beteiligt.

Da fast alle identifizierten *PDR5*-Mutanten das Resistenzspektrum nur teilweise einschränken, bleibt fraglich, inwiefern differenzielle Regulation anderer Transportsysteme mit überlappendem Substratspektrum oder sogar andere Resistenzmechanismen wie zum Beispiel eine veränderte Permeabilität der Plasmamembran für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist (122).

1.8.2 Charakterisierung der Substratspezifität von Pdr5p

Das Substratspektrum von Pdr5p stand bereits im Mittelpunkt vielfältiger Studien. Bereits mit seiner Identifizierung wurde evident, dass Pdr5p eine zelluläre Resistenz gegen Cycloheximid, Cerulenin und Staurosporin, Mycotoxine und Glukocortikoide vermittelt (116-118,129). Im Folgenden wurden Hunderte von Transportsubstraten, einschließlich Steroiden, Rhodaminen, Azolen und Fluoreszenz-markierten Phospholipiden identifiziert (25,90,130-132).

Die Determinanten dieser außergewöhnlich breiten Substratspezifität wurden einerseits durch zufällige und gerichtete Mutagenese (1.8.1) (120-122), andererseits anhand systematischer, chemischer Variation bekannter Substrate und Inhibitoren untersucht (133-135). Dazu wurde zum Beispiel der Einfluss unterschiedlicher, aromatischer Derivate von Imidazol auf die Aktivität von Pdr5p untersucht.

Im Gegensatz zum humanen P-Glykoprotein (ABCB1) scheint nicht die Hydrophobizität der Substrate (136-138), sondern vielmehr ihr Volumen die effektive Erkennung durch Pdr5p zu bestimmen (133). Substrate von Pdr5p haben ein Volumen von mehr als 90 Å³. Substrate mit einer Oberfläche zwischen 200 und 225 Å³ werden offenbar mit höherer Effizienz erkannt.

In Übereinstimmung mit früheren genetischen Studien wurde auf diese Weise die Existenz mindestens dreier, teilweise voneinander abhängiger Substratbindungsstellen bestimmt (25,133,135). Ihre genaue Lage und Ausrichtung zueinander ist bisher ungeklärt. Allerdings zeigten die hochauflösenden

Röntgenstrukturen des multidrogenbindenden Proteins QacR aus *Staphylococcus aureus* in Anwesenheit verschiedener Substrate lediglich ein große, hydrophobe Bindungstasche mit vielfältigen, teilweise überlappenden Domänen, die mehrere Substrate gleichzeitig binden können (139,140). Eine ähnliche Architektur der Drogen-Bindungstasche bietet auch für Pdr5p eine nahe liegende Erklärung für das komplexe Muster von Pdr5p-vermittelter Resistenz gegen unterschiedliche Substanzen und die durch einige dieser Substanzen vermittelte Inhibition des Pdr5p-vermittelten Transports.

1.8.3 Charakterisierung der Nukleosidase-Aktivität von Pdr5p

Bereits früh nach der Identifizierung 1994 wurde die Fähigkeit von Pdr5p verschiedene Nukleotide zu hydrolysieren untersucht (90,123,124). Mit Hilfe von Plasmamembranen aus *PDR5*-überexprimierenden Zellen wurde gezeigt, dass Pdr5p in der Lage ist, neben ATP auch UTP (Uridintriphosphat), CTP (Cytidintriphosphat), ITP (Inosintriphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat) zu hydrolysieren. Die Beobachtung einer ADPase-Aktivität lässt allerdings die Anwesenheit einer ebenfalls ATPase-aktiven Kontamination, zum Beispiel einer Phosphatase, vermuten. Durch eine kinetische Analyse der ATPase-Aktivität von Pdr5p-haltigen Plasmamembranen wurde ein V_{\max} Wert von $2.5 \mu\text{mol P}_i \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ bei einer Michaelis-Menten Konstanten K_m von 0.5 mM bestimmt. Im Detergenz-solubilisierten Zustand wurde ein drastischer Verlust der ATPase-Aktivität beschrieben mit einer maximalen Aktivität von $0.25 \mu\text{mol P}_i \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ und einer Michaelis-Menten-Konstanten K_m von 0.25 mM. Die beobachtete Aktivität konnte durch Vanadat, Micoanzol oder Oligomyzin, nicht aber durch Azid inhibiert werden und wurde daher als Pdr5p-spezifisch interpretiert.

Eine Kombination der systematischen Mutagenese mit der detaillierten Analyse von ATPase- und Transport-Aktivität würde eine umfangreiche Struktur-Funktionsanalyse dieses eukaryotischen Multidrogentransporters ermöglichen.

1.9 Motivation und Ziele

ABC-Transporter erkennen eine überwältigende Vielzahl strukturell unterschiedlicher Substrate und vollführen eine Vielzahl zellulärer Funktionen. Der Mechanismus der ATP-Hydrolyse und die komplexe Kopplung zwischen NBDs und

TMDs sind trotz ihrer essentiellen Bedeutung für die Funktion von ABC-Transportern noch nicht entschlüsselt. Hauptziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Methoden und Modellsystemen, die eine detaillierte und systematische Untersuchung dieser Kernprobleme ermöglichen und somit die Testbarkeit von mechanistischen Modellen durch Verifizierung oder Falsifizierung erlauben.

Die heterolog überproduzierte und isolierte NBD des humanen TAP dient hierbei als methodische Plattform für die Entschlüsselung des ATP-Hydrolyse-Mechanismus und erlaubt eine detaillierte Charakterisierung einzelner an der ATP-Hydrolyse beteiligter Reste mit besonderer Berücksichtigung der postulierten katalytischen Dyade aus dem Histidin des *H-loops* und dem Glutamat, das dem Walker B Motiv folgt.

Voraussetzung für die Untersuchung der mechanistischen Kopplung zwischen NBDs und TMDs ist ein *in vitro* System eines voll-assemblierten und funktionalen ABC-Transporters. Durch die parallele Untersuchung von ATPase-Aktivität und Transport-Aktivität des *full-size* Multidrogentransporters Pdr5p aus Bäckerhefe soll ein erster Einblick in das Zwiegespräch der Domänen in diesem ABC-Transporter ermöglicht werden.

Zur Verfolgung der gewählten Doppelstrategie, aus Isolation und Rekonstitution von Pdr5p in Liposomen auf der einen Seite und die Analyse der Pdr5p-Aktivität in seiner natürlichen Membranumgebung auf der anderen Seite, sollen im Rahmen dieser Arbeit molekularbiologische Werkzeuge zur Überexpression und chromosomalen Mutagenese von *PDR5* (*PDR5 Knock-in* Kasette) konstruiert werden.

Die anschließende Verknüpfung von Überproduktion, gerichteter Mutagenese und Isolation von Pdr5p sowie die Etablierung von *in vivo* und *in vitro* Aktivitätsassays in natürlicher Membranumgebung soll eine Bestimmung der Pdr5p-spezifischen Aktivität erlauben, die Existenz einer katalytischen Dyade in Pdr5p überprüfen und in Zukunft die systematische Analyse der Kommunikation zwischen NBDs und TMDs ermöglichen.

Zusammenfassend sollen durch die Untersuchung zweier Modellsysteme wertvolle Daten bezüglich des Wirkprinzips von ABC-Transportern gewonnen werden und die Ausarbeitung genauerer Modelle zur Kopplung und Kommunikation zwischen von NBDs und TMDs erlauben.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Kultivierung, Induktion und Selektion

Trypton-Pepton	Difco
Hefe-Extrakt	Difco
Hefe Stickstoff Base (YNB)	Difco
Glukose	Caesar & Loretz
2-Deoxy-Glukose	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Serva
Ammoniumsulfat	J.T. Baker
Uracil	Serva
Adenin	Fluka
L-Histidin	Fluka
L-Tryptophan	Roth
L-Arginin	Serva
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich
L-Isoleucin	Roth
L-Phenylalanin	Merck
L-Valin	Roth
L-Threonin	Merck
L-Leucin	Merck
Ampicillin	Roth
Isopropyl- β -thiogalaktosid (IPTG)	BTS-Biotech

2.1.2 Puffersubstanzen, Salze und Additive

NaCl	J.T. Baker
MgCl ₂	Normapur
CaCl ₂	Grüssing
EDTA	AppliChem
Na-Azetat	Fluka
LiOAc	Fluka
Na ₂ HPO ₄	Normapur
NaH ₂ PO ₄	Roth
Tris (Trizma)	Sigma
Natriummalonat	Sigma
Hepes	AppliChem
Natriumcacodylat	AppliChem
MES	Fluka
Glycin	Roth
Imidazol	Fluka
Salzsäure, 37% (HCl)	Riedel-de Haën
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Normapur
Schwefelsäure, 96% (H ₂ SO ₄)	Fisher
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Chromschwefelsäure (H ₂ SO ₄ /CrO ₃)	Riedel-de Haën
Glyzerin 98%	Caesar & Loretz

Polyethylenglykol 4000 (PEG-4000)	Fluka
Harnstoff	Riedel-de Haën
Saccharose	J.T. Baker
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich
Agarose GTQ	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
TEMED	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1 30%	Roth
Na_2CO_3	Roth
Ag_2NO_3	Fluka
Coomassie Brilliantblau R-250	Roth
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Roth
Malachitgrün	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Proteaseinhibitoren Mischung	Roche
Coomassie Plus Bradford Lösung	Pierce

2.1.3 Lösungsmittel

ddH ₂ O	Milli-Q ⁵⁰ Plus Anlage, Millipore
Methanol	Roth
Ethanol	Roth
Isopropanol	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
37% Formaldehyd	Roth
Chloroform	Roth

2.1.4 Substrate und Inhibitoren

ATP	Fluka
ADP	Fluka
AMP	Fluka
TNP-ATP	Molecular Probes
TNP-ADP	Molecular Probes
TNP-AMP	Molecular Probes
Rhodamin123	Sigma-Aldrich
Rhodamin6G	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Fluka
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Fluka
KNO_3	Sigma-Aldrich
NaN_3	Fluka
Oligomycin A,B und C (60:30:10)	BioChemika
Quabain	Fluka
Natrium Orthovanadat	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
BeCl_2	Fluka
Fluconazol	Arbeitskreis Prof. K. Kuchler, Wien
Ketoconazol	Arbeitskreis Prof. K. Kuchler, Wien

2.1.5 Größenmarker für DNA und Proteine

PageRuler 100bp Ladder (100 bp Leiter)	MBI Fermentas
PageRuler 1000bp Ladder (1000 bp Leiter)	MBI Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

2.1.6 Detergenzien und Lipide

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Tween-20	Roth
Triton X-100	Roth
Decyl- β -D-maltopyranosid (DM)	Glycon
Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM)	Glycon
Tridecyl- β -D-maltopyranosid (TDM)	Glycon
CHAPS	Roth
Digitonin	Calbiochem
FOS-CHOLINE-14	Anatrace
CYCLOFOS-7	Anatrace
CYMAL-7	Anatrace
C ₁₂ E ₈	Anatrace
Octyl- β -glucopyranosid (OG)	Glycon
Palmitoyl-(NBD-hexanoyl)-phosphatidylethanolamin (NBD-PE)	Avanti Polar Lipids
Hexanoyl-(NBD-hexanoyl)-phosphatidylethanolamin (C6 NBD-PE)	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylcholin aus Ei (PC)	Avanti Polar Lipids
polare <i>E. coli</i> Lipide	Avanti Polar Lipids
Asolectin aus Sojabohne	Fluka

2.1.7 Säulenmaterial und Säulen

Zn ²⁺ /IDA 1ml HiTrap	GE Healthcare
Zn ²⁺ /IDA 5ml HiTrap	GE Healthcare
HR 10/30 Superose 6	GE Healthcare
HR 26/60 Superdex 200	GE Healthcare
ATP-Agarose	Sigma-Aldrich
ADP-Agarose	Sigma-Aldrich

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra 15 (PES, MWCO 10 kDa)	Millipore
Amicon Ultra 4 (PES, MWCO 10 kDa)	Millipore
Amicon Ultra 4 (PES, MWCO 100 kDa)	Millipore
Dispo Dialyzer, 1 ml (MWCO 10 kDa)	Spectrum
Dispo Dialyzer, 1 ml (MWCO 100 kDa)	Spectrum
Mikrotiterplatte, 96 Well	Greiner Bio-One
0.5 mm Glas-Beads	Roth
0.45 μ m Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher & Schüll
Whatman-3MM-Filterpapier	Whatman
SM-2 Biobeads	BIO-RAD

2.2 Geräte

Brutschränke	Heraeus
Schüttelinkubatoren	Infors
Waagen	Sartorius
FPLC System	GE Healthcare
UV-VIS-Spektrometer Cary 50 Bio	Varian
ELISA-Lesegerät Polarstar Galaxy	BMG Labortechnologie
Zentrifugen	
Sorvall Evolution RC	Thermo
Eppendorf 5417R	Eppendorf
Sorvall Discovery M120 SE	Thermo
Sorvall Discovery 90 SE	Thermo
Netzteil EPS 200	GE Healthcare
Elektrophoreseapparaturen	Universität Düsseldorf
<i>Semidry</i> Blot-Apparatur	BIO-RAD
Zellaufschlussmaschine Basic Z System	Constant Systems
Bead-Beater	Biospec
Fluoreszenzspektrometer Fluorolog II	Horiba
Fluoreszenzküvetten	Hellma

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Heterologe Expression der TAP1-NBD in *E. coli*

Zur Klonierung, Mutagenese und Sequenzierung der NBD von TAP1 (Aminosäuren 489-748) wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
TAP1-NBD-s	GGAATTCATATGGGCAGCAGCCATCACCATCACCA TCACCCACCCAGTGGTCTGTTGACTCCC	6 Histidine <i>NdeI</i> Sense (S)
TAP1-NBD-as	ATATATAAAGCTTATCATTCTGGAGCATCTGCAGGAG CCTG	<i>HindIII</i> Antisense (AS)
TAP1 Q701H	GTGCTTCTCATCACCCACCACCTCAGCCTGGTG	Q701A (CAA→CAC) phosphoryliert
TAP1 D668E	GTACTTATCCTGGATGAAGCCACCAGTGCC	D668E (GAT→GAA) phosphoryliert
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	S im T7 Promotor
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	AS im T7 Terminator

Tabelle 2.3-A Klonierungs-, Mutagenese- und Sequenzierprimer TAP1-NBD

2.3.2 Homologe Überexpression von *PDR5* und *PDR5*-Mutanten in *S. cerevisiae*

Die korrekte Nukleotidsequenz von *PDR5* und der erzeugten *PDR5*-Mutanten sowie die korrekte genomische Insertion dieser *PDR5* Konstrukte wurden durch analytische Polymerase-Kettenreaktionen (*Polymerase chain reaction*; PCR) und DNA-Sequenzierungen anhand folgender verifiziert an. Folgende Oligonukleotide wurden dazu verwendet:

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
RE1	TCGTATCCGCTCGTTCGAAAG	S in <i>PDR5</i>
RE2	CGGCACCCAACAAAAGTG	S in <i>PDR5</i>
RE3	GGTGCTCCGCAGATGTC	S in <i>PDR5</i>
RE4	GCGGCTACTCAGGTGATG	S in <i>PDR5</i>
RE5	GTTGGTAACGACATCGTC	S in <i>PDR5</i>
RE6	CTACTATGGCCCCGCCGA	S in <i>PDR5</i>
RE7	GAAAGAAGTCGACCAACG	S in <i>PDR5</i>
RE8	GGGTAAGTGTAGTATGGC	S in <i>PDR5</i>
RE9	ATCATCGCTGTTTGCTTC	S in <i>PDR5</i>
RE10	CTACGTTGGTCTAAATGG	S in <i>PDR5</i>
RE11	GTTTCGGTATTGGTATGG	S in <i>PDR5</i>
RE12	GAGGAATCCGATACTTACG	S in <i>PDR5</i>
RE13	GGTCAATGGTATTCCCCG	S in <i>PDR5</i>
RE14	TGGTGTGCTGGTGAAGG	S in <i>PDR5</i>
RE15	ACTGTCTACTTTGGCGAC	S in <i>PDR5</i>
RE16	CGATAACTGCAGCTGAGG	S in <i>PDR5</i>
RE17	CCTATTCTACAACAATACC	S in <i>PDR5</i>
RE18	GTTGCATGAAAGGGGTGC	S in <i>PDR5</i>
RE19	GCGCTGATTACGAATTGC	S in <i>PDR5</i>
RE21	GTACCGATGAGATAACCTAGG	AS im <i>PDR5</i> Terminator
RE22	CGGATGGTGGTGTGAATTCTAGC	S in <i>PDR5</i>
RE23	CCATGGTGGTGGTATTGAAGGT	S in Faktor X _A Erkennungstelle
PDR5+180	GAGCATCACTTTTGTGGGTGCCGATTGAG	AS in <i>PDR5</i>
P5P+1000	CGTTAACGTAAATATGTCTTCCTC	S im <i>PDR5</i> -Promotor

Tabelle 2.3-B Sequenzierprimer für die Bestimmung der Nukleotidsequenz von *PDR5*

Um die korrekte chromosomale Insertion der Auxotrophiemarker *TRP1* und *his5⁺* (aus *Schizosaccharomyces pombe*, *Sz. pombe*) sowie des EGFP (*enhanced GFP* oder GFP(S65T)) Konstruktes mittels Kolonien-PCR und DNA-Sequenzierung bestimmen zu können sowie zur Sequenzierung der Plasmide zur Überproduktion und Reinigung von Hefeproteinen, wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
seq-pRE5-1s	GGATGGCGGCGTTAGTATCG	S in <i>his5⁺</i> Marker
seq-pRE5-2s	CCAAGTTCGATTACAGCAAATG	S in <i>his5⁺</i> Marker
seq-pRE5-3s	CGGATGTGATGTGAGAACTGTATC	S in <i>his5⁺</i> Marker
seq-pRE5-4s	GCAATACCAAGTGCAATAGCAG	S in <i>his5⁺</i> Marker
HeuKan2	GTCAAGACTGTCAAGGAGGG	AS im TEF Promotor
EGFP-S	CAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTT	S in EGFP Gen
EGFP-AS	CGCTCCATCTTCAATGTTGTGTC	AS in EGFP Gen
TRP1-S	GGCATTGGTACTATTGAGCACGTG	S in <i>TRP1</i> Marker
TRP1-AS	CGGGGCTCTTGCCTTCCAAC	AS in <i>TRP1</i> Marker

Tabelle 2.3-C Sequenzierprimer für Auxotrophiemarker und EGFP

Zur Analyse der zellulären Lokalisation von Pdr5p und um eine spätere Affinitätsreinigung von fluoreszenzmarkiertem Pdr5p zu erlauben, wurde ein Pdr5p-EGFP-10His Fusionsprotein erzeugt. Dazu wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
GFP-10HIS-S	GGTCGACGGATCCCCGGGTTAATTAACAGTAAAGGA GAAGAAC	<i>AscI</i> S
GFP-10HIS-REV	GGAATTGGCGCGCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGA TGGTGATGGTGTGGTATAGTTCATCCATGCC	<i>PacI</i> und 10 Histidine AS
PDR5-10His-R1	CACCTATATGTAGTGATTATGTATGTTTATTAATAAAG TCCAGAATTCGAGCTCGTTAAAC	Zur Vervielfältigung der Kasette
PDR5-GFP-S3	GCAAGAGTGCCTAAAAAGAACGGTAAACTCTCCAAG AAAGGTCGACGGATCCCCGGG	Zur Vervielfältigung der Kasette
PDR5-10His-F2	GCAAGAGTGCCTAAAAAGAACGGTAAACTCTCCAAG AAAGGTGGTCACCATCACCATCACC	Zur Vervielfältigung der C10His Kasette
C-10HIS-S	TAAGGTGGTCACCATCACCATCACCATCACCATCAC CATTAAATAGGG	S C-10His Kasette
C-10HIS-REV	CGCGCCCTATTAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTG ATGGTGACCACCTTAAT	AS C-10His Kasette

Tabelle 2.3-D Primer zur Erzeugung eines Pdr5p-EGFP-10His Fusionsproteins

Zur Erzeugung der Plasmide zur Überproduktion und Reinigung von beliebigen Hefeproteinen mit N-terminalen Histidin-tags wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
PDR5Psense	TCAGGCGCGCCAAGCAGCACCTCGTTGGCGCAGTCCC	<i>AscI</i>
PDR5Prev	AGTTAATTAATGCATTTTTGTCTAAAGTCTTTCGAACGAG CG	<i>PacI</i> und <i>Nsi</i>
N14-HIS-FWD	TCATCACCATCATCACCATCATCACCATCATCACCAT GGTGGTGGTATTGAAGGTAGAATGCCGAGGCCTTAAT	Faktor Xa Erkennungsstelle 14 Histidine
N14-HIS-REV	TAAGGCCTCGGGCATTCTACCTTCAATACCACCACCATGG TGATGATGATGGTGATGATGGTGATGATGGTGATGATGCA	Faktor Xa Erkennungsstelle 14 Histidine
N10-HIS-S	TCATCACCATCATCACCATCATCACCATGGTGGTGGTATT GAAGGTAGAATGCCGAGGCCTTAAT	Faktor Xa Erkennungsstelle 10 Histidine
N10-HIS-REV	TAAGGCCTCGGGCATTCTACCTTCAATACCACCACCATGG TGATGATGGTGATGATGGTGATGATGCA	Faktor Xa Erkennungsstelle 10 Histidine
N10HISPDR5-S1	CCTATTACAATAAACAATTAAGCCATACTCGCAACAATTTGC CTCATCGATGAATTCGAGCTCG	Zur Vervielfältigung der Kasette
N10HISPDR5-S2	CGTCGTTGACGTTATTGTTAAGCTTGGCCTCGGGCATTCTA CCTTCAATACCACC	Zur Vervielfältigung der Kasette

Tabelle 2.3-E Erzeugung der Plasmide zur Überproduktion und Reinigung von Hefeproteinen

Zur Mutagenese von *PDR5* wurde ein Plasmid erzeugt, das den *Sz. pombe his5⁺* Auxotrophiemarker trägt, die Sequenz des *PDR5*-Promotors enthält und sowohl für das *PDR5* Gen als auch für 14 entfernbare, N-terminale Histidine (als Affinitäts-tag) kodiert. Zur Erzeugung dieses *PDR5 Knock-in* Plasmids und zur gerichteten Mutagenese von *PDR5* wurden folgende Primer verwendet:

Name	Sequenz (5'->3')	Bemerkung
PDR5_AMP_SphI_S	GGAATCGCATGCCGTATCCGCTCGTTCGAAAGAC	<i>SphI</i> S
PDR5_AMP_SpeI_REV	CGGCCGACTAGTCTATTATTTCTTGGAGAGTTTACCG	<i>SpeI</i> AS
P5P_ApaI_S	GGAAGTGGGCCCCTATTACAATAAACAATTAAGCCATAC TCGCAACAATTTGCCATAATAGTCATCGATGAATTCTGA GCTCGT	<i>ApaI</i> S
P5P-HindIII_REV	GTTATTGTTAAGCTTGGCCTCGGGCATTCTACCTTCAAT ACCACCACCATGGTGATG	AS <i>HindIII</i>
PDR5 C199A s	GGTAGACCAGGCTCTGGCTGTACTACTTTATTAATC	S C199A
PDR5 C199A as	Revers komplementär zu PDR5 C199A	AS C199A
PDR5 K911A s	GGTGCTTCAGGTGCTGGTAAAACCACTTCT	S K911A
PDR5 K911A as	Revers komplementär zu PDR5 K911A s	AS K911A
PDR5 H1068A s	GCAATTCTATGTACTATTCACCAACCTCTG	S H1068A
PDR5 H1068A as	Revers komplementär zu PDR5 H1068A s	AS H1068A
PDR5 E1036Q s	CTGTTGGTCTTTTAGATGAACCTACTTCTGGTTTGG	S E1036Q
PDR5 E1036Q as	Revers komplementär zu PDR5 E1036Q s	AS E1036Q
PDR5 H1068A Q1069A s	GCAATTCTATGTACTATTGCCGCACCTCTGC	S H1068A Q1069A
PDR5 H1068A Q1069A as	Revers komplementär zu PDR5 H1068A Q1069A s	AS H1068A Q1069A

Tabelle 2.3-F Primer zur Mutagenese von PDR5

Zur Erzeugung eines Hefestammes mit deletiertem *PDR5*-Promotor ($\Delta PDR5$ prom) sowie eines Stammes ohne den *PDR5*-Promotor und ohne weite Teile des *PDR5* Gens (Startkodon bis zur *AatII* Schnittstelle; $\Delta PDR5\Delta PDR5$ prom) wurden folgende Primer verwendet:

Name	Sequenz (5'->3')	Bemerkung
PDR5PDEL-LONG s	CAATTAAGCCATACTCGCAACAATTTGCCATAATAGA CGGATCCCCGGGTTAATTAA	S Deletion von Promotor und Gen
PDR5PDELpFA6aREV	GTAGCTAGTAACGTCGTTGACGTTATTGTTAAGCTTG GCCTCGGGCATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	AS Deletion von Promotor
PDR5_DEL_AatII_REV	GGCACTTGGGGTAGTCATAACACCACAAAAGACAA AGACATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	AS zur Disruption des <i>PDR5</i> Gens

Tabelle 2.3-G Primer zur Erzeugung von $\Delta PDR5$ prom und $\Delta PDR5\Delta PDR5$ prom

2.4 Enzyme und Proteine

Die Restriktionsenzyme *NsiI*, *PacI*, *AscI*, *NdeI*, *SpeI*, *SphI*, *ApaI*, *DpnI* und *HindIII* wurden von *Fermentas* und/oder *NEB* bezogen und gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet.

Taq DNA Polymerase
AmpLigase
Phusion DNA Polymerase
Pfu DNA Polymerase

NEB
Epicentre
Finnzymes
Fermentas

T4 DNA Ligase	NEB
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	NEB
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma
Rinder Serum Albumin (BSA)	Roth
Lysozym	Fluka

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

W303-1A	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>can1-100</i>
YALF A1	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>pdr1-3</i>
YHW A5*	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>pdr1-3</i> ; $\Delta PDR5::TRP1$
YRE1000*	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>pdr1-3</i> ; $\Delta PDR5prom::TRP1$
YRE1001*	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>pdr1-3</i> ; $\Delta PDR5, \Delta PDR5prom::TRP1$

* YHW A5 wird im Folgenden als $\Delta PDR5$ bezeichnet, YRE1000 als $\Delta PDR5prom$ und YRE1001 als $\Delta PDR5\Delta PDR5prom$.

<i>E. coli</i> DH5 α	K12 Stamm F ⁻ $\Phi 80/lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$ Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B Stamm F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) Novagen
<i>E. coli</i> XL10-Gold [®]	XL2-Blue Stamm Tet ^R $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^f \Delta M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]$ Stratagene

2.6 Plasmide und Vektoren

pET21a+	Novagen
pFA6a-HIS3-MX6	(141)
pFA6a-TRP1	(141)
pGEM-T-EASY	Promega
pCKSF1	(117)
pFA6a-GFP(S65T)-HIS3-MX6	(141)
pFA6a-GFP(S65T)-10His-HIS3-MX6	diese Arbeit
pFA6A-10His-HIS3-MX6	diese Arbeit
pRE1	diese Arbeit
pRE2	diese Arbeit
pRE3-10His	diese Arbeit
pRE3-14His	diese Arbeit
pRE4	diese Arbeit
pRE5	diese Arbeit

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeiten in *E. coli*

3.1.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen und Transformanten

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien in Petrischalen auf LB-Agar-Medium unter sterilen Bedingungen und Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C erhalten. Das LB-Agar-Medium enthielt 10g Trypton-Pepton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl und 15g Agar-Agar pro Liter. Analog wurden für Flüssigkulturen LB-Medium (ohne Agar-Agar) verwendet. Zur Selektion wurden die Medien mit Antibiotikum versetzt (100 µg/ml Ampicillin). Zur Lagerung plasmidtragender Bakterien für längere Zeiträume wurden stationäre Übernachtkulturen (ÜN-Kulturen) steril mit Glycerin auf 15% (v/v) eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C als so genannte Glycerinstocks gelagert.

3.1.2 Kompetente *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden entweder kommerziell erworben (XL10 – Gold®) oder in Eigenarbeit transformations-kompetent gemacht (DH5α und BL21(DE3)). Dazu wurde eine stationäre *E. coli* ÜN-Kultur mit 100 ml LB-Medium 1:50 verdünnt und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0.5 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und vorsichtig in 40 ml steriler und auf 4°C vorgekühlter MgCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Die Suspension wurde wie oben zentrifugiert, die sedimentierten Zellen in 20 ml vorgekühlter CaCl₂ Lösung (50 mM) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in 2 ml CaCl₂-Glycerin Lösung (50 mM CaCl₂, 15% v/v Glycerin) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 100 µl Portionen bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Plasmid DNA (10 ng bis 1 µg) in einem maximalen Volumen von 10 µl wurde mit 100 µl kompetenten Zellen gemischt und auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Der Hitzeschock der Suspension erfolgte für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die zur Regeneration in 1 ml LB-Medium für 45 – 60 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde kurz zentrifugiert (13000 x g, 20 s, RT), das Sediment in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf vorgewärmten LB-Agar Platten (+100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Plasmidkonstruktion und Plasmidreinigung

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

TAE-Puffer	Tris-Azetat	40 mM	pH 8.0
	EDTA	1 mM	
10 x Probenpuffer	Glyzerin	40% v/v	
	Bromphenolblau	0.25%	
	Xylencyanol	0.25%	
	in 10 x TAE-Puffer		

Zur Plasmidpräparation (im *Mini*- und *Midi*-Maßstab) wurden kommerziell erwerbliche „*Kits*“ der Firma Qiagen verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Berücksichtigung sämtlicher optionaler Waschschrte. Plasmid DNA wurde in leicht gepufferten Lösungen (5 mM Tris-HCl pH 8) gelagert. Restriktionsverdau für analytische und präparative Zwecke wurden übereinstimmend mit den Herstellerangaben mit vorgefertigten Reaktionsmischungen angesetzt und bei der empfohlenen Temperatur bis zum vollständigen Verdau inkubiert.

Vor der Analyse mittels Elektrophorese wurden DNA Proben 1:10 mit 10 x Probenpuffer versetzt. Die DNA Fragmente wurden in 0.8%igen bis 2%igen Agarose-Gelen in TAE-Puffer aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Auf diese Weise aufgetrennte DNA Fragmente konnten mit Hilfe des Gel-Extraktions-*Kits* der Firma Qiagen gereinigt werden.

Um Religationen geschnittener Vektoren zu verhindern oder um synthetische Oligonukleotide für eine nachfolgende Ligation/Ligase-Kettenreaktion vorzubereiten,

wurde entsprechend der Herstellerempfehlungen eine alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) oder eine *T4* Polynukleotidkinase verwendet.

Um DNA Fragmente zu präzipitieren wurde eine 100 µl DNA Lösung mit 10 µl 3 M Na-Azetat (pH 5.2) und 250 µl auf -20°C gekühltem, absolutem Ethanol versetzt. Durch anschließende Inkubation bei -80°C für 15 min und Zentrifugation (20000 x g, 10 min, 4°C) wurde die gefällte DNA sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen und abermals zentrifugiert. Das verbliebene Ethanol wurde vollständig entfernt und die DNA in 5 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert.

Zur Ligation in einen Vektor wurden vorbereitete synthetische Oligonukleotide, PCR Produkte oder Restriktionsfragmente in drei- bis zehnfachem Überschuss mit Vektor-DNA inkubiert und mit Hilfe einer *T4* DNA Ligase in Anwesenheit von ATP und MgCl_2 entsprechend der Herstellerangaben ÜN bei 16°C inkubiert.

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurde verwendet, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen und mit flankierenden DNA-Sequenzen (z.B. mit Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme) zu versehen. Für große Ausbeuten und analytische Zwecke wurde die *Taq* DNA Polymerase verwendet; um unerwünschte, zufällige Mutationen zu minimieren, wurden die *Pfu* oder die *Phusion* DNA Polymerase verwendet. In einigen Fällen wurden PCR Produkte durch die *Taq*-Polymerase (oder *Taq-Pfu* Mischungen im Verhältnis von 9:1) erzeugt, die Desoxyadenosin-Überhänge am 3'-Ende der DNA tragen. Diese PCR Produkte konnten entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in das pGEM-T-Easy Vektorsystem kloniert werden.

Gerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des Quik-Change[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit oder der Ligase-Kettenreaktion (Ligase chain reaction, LCR) durchgeführt. Gemäß den Herstellerangaben wurden hochkompetente XL10-Gold[®] Bakterien mit der mutierten DNA transformiert.

Die korrekte Klonierung wurde mit Restriktion, Kolonien-PCR und DNA-Sequenzierung verifiziert. Zur Vervielfältigung von Plasmid DNA wurde in der Regel der *E. coli* Stamm DH5 α verwendet, für die Expression unter der Kontrolle des T7 Promotors wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen verwendet.

3.2 Molekularbiologische Arbeiten in *S. cerevisiae*

3.2.1 Hefe-Medien und Wachstumsbedingungen

Hefe-Pepton-Dextrose Medium (*Yeast peptone dextrose*, YPD) enthielt eine Endkonzentration von 5 g Hefe Extrakt und 10 g Trypton-Pepton und 2% Glukose pro Liter Medium. Die Glukose wurde zunächst als 20%ige Lösung autoklaviert und im Nachhinein dem Rest des Mediums im Verhältnis 1:10 zugegeben.

Minimalmedium hatte die Endkonzentrationen von 6.7 g Hefe Stickstoff Base (*Yeast nitrogen base*, YNB) und 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einem Liter und einen pH-Wert von 5.6. Nach dem Autoklavieren, wurden 100 ml 20%iger Glukoselösung (Endkonzentration 2%), 50 ml Aminosäure-Mix (20 x) sowie je nach Bedarf als auxotrophe Komponenten Leucin, Histidin, Uracil oder Tryptophan zugesetzt. Zur Erzeugung von -HIS Platten wurden Leucin, Uracil und Tryptophan zugesetzt, zur Erzeugung von -TRP Platten wurden Leucin, Histidin und Uracil zugesetzt. Die auxotrophen Komponenten wurden als 100 x Stock-Lösungen in Wasser vorbereitet, bei Konzentrationen von 4 g/l Uracil, 6 g/l Histidin, 26 g/l Leucin und 8 g/l Tryptophan. Der so genannte 20 x Aminosäure-Mix enthielt 112 mg Adenin, 384 mg Arginin, 133 mg Tyrosin, 576 mg Isoleucin, 480 mg Phenylalanin, 576 mg Valin und 576 mg Threonin gelöst in 500 ml ddH₂O und wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Hefe-Agar-Platten enthielten zusätzlich zum entsprechenden Medium 2% Agar-Agar. Alle Hefestämme wurden routinemäßig bei 25°C oder 30°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 200 Umdrehungen pro Minute (UPM) geschüttelt. Um eine verbesserte Luftversorgung der Zellen zu gewährleisten, wurden für Expressionskulturen mit Schikanen versehene Erlenmeyerkolben verwendet.

3.2.2 Konstruktion der Kassetten zur homologen Überproduktion und Reinigung von Hefeproteinen

Eine Kasette zur homologen Überproduktion und Reinigung von Hefeprotein besteht aus drei Elementen: Einem Promotor, einem Selektionsmarker und einer kodierenden Sequenz für einen Affinitäts-*tag*. Die Konstruktion des Plasmids pRE3

10His bzw. pRE3 14His bestand dementsprechend aus drei Schritten, die im Folgenden beschrieben werden.

Im ersten Schritt wurde der *PDR5*-Promotor mittels Kolonien-PCR anhand des Primerpaares PDR5Psense und PDR5Prev gewonnen und in das kommerziell erwerbliche pGEM-T-EASY Vektor System kloniert. Die PCR Bedingungen wurden gemäß den Herstellerangaben gewählt. Das resultierende Plasmid trägt den Namen pRE1 (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Primer beinhalteten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *NsiI*, *PacI* und *AscI* und wurden in den nächsten Klonierungsschritten verwendet.

Im zweiten Schritt wurde der *PDR5*-Promotor aus pRE1 mit Hilfe von *AscI* und *PacI* gewonnen und in die einmalig vorhandenen Schnittstellen von pFA6a-HIS3-MX6 kloniert. Das resultierende Plasmid pRE2 ist im Anhang dargestellt und trägt bereits den *PDR5*-Promotor und das *Sz. pombe his5+* Modul als Selektionsmarker.

Im dritten und letzten Schritt wurde das pRE2 Plasmid mit Hilfe von *NsiI* und *PacI* geöffnet, und ein zuvor aneinander gelagertes und phosphoryliertes Primerpaar, das für entfernbare Affinitäts-*tags* kodiert, eingesetzt. Je nach verwendetem Primerpaar wurde ein Plasmid erzeugt, das entweder für einen mit Faktor X_a entfernbaren, N-terminalen 14-Histidin-*tag* (N14-HIS-FWD und N14-HIS-REV) oder 10-Histidin-*tag* (N10-HIS-FWD und N10-HIS-REV) kodiert. Die gewonnenen Plasmide (pRE3-10His bzw. pRE3-14His) sind im Anhang dargestellt und beinhalten die Kassetten zur Überexpression und Reinigung von Hefeproteinen.

3.2.3 Konstruktion einer *PDR5 Knock-in* Kassette

Die Mutagenese des chromosomal überexprimierten *PDR5* setzt eine *PDR5 Knock-in* Kassette voraus. Diese *PDR5 Knock-in* Kassette stellt ein Plasmid dar, das den gesamten *PDR5*-Lokus samt Promotor und Selektionsmarker enthält. Die gerichtete Mutagenese kann dann zunächst auf diesem Plasmid durchgeführt werden und anschließend durch homologe Rekombination in das Genom eines spezialisierten Hefestamms eingebracht werden. Die Konstruktion des spezialisierten Hefestamms wird in 3.2.5 beschrieben.

Zur Erzeugung einer *PDR5 Knock-in* Kassette wurde *PDR5* zunächst vom Plasmid pCKSF1 mit Hilfe der Oligonukleotide PDR5_AMP_SphI_S und

PDR5_AMP_SpeI_REV durch PCR gewonnen und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SphI* und *SpeI* in den pGEM-T-EASY Vektor kloniert (117). Das resultierende Plasmid pRE4 (siehe Anhang) trägt *PDR5* mit einem N-terminalen FLU-*tag*. Im zweiten Schritt wurde der *PDR5*-Promotor, das *Sz. pombe his5+* Modul sowie die für einen 14-Histidin-*tag* kodierende Sequenz mit Hilfe der Oligonukleotide P5P_ApaI_S und P5P_HindIII_REV von pRE3-14His vervielfältigt und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *ApaI* und *HindIII* in pRE4 eingeführt, was zu einem Verlust des N-terminalen FLU-*tag* führte. Das resultierende Plasmid pRE5 (siehe Anhang) kodiert für Pdr5p mit einem N-terminalen, mit Faktor X_a entfernbaren 14-Histidin-*tag*. Dieses Fusionsprotein kann unter der Kontrolle des *PDR5*-Promotors überproduziert werden. Außer dem *his5+* Auxotrophiemarker trägt die *PDR5 Knock-in* Kasette am 5'-Ende auch eine ca. 40 bp lange Sequenz, die eine homologe Rekombination der gesamten *PDR5 Knock-in* Kasette (>6000 bp) am *PDR5*-Lokus des spezialisierten Klonierungsstammes $\Delta PDR5prom\Delta PDR5$ (3.2.5) ermöglicht.

3.2.4 Konstruktion von Plasmiden zur PCR-basierten C-terminalen Modifikation von Hefeproteinen

Zur C-terminalen Modifikation eines beliebigen Proteins in *S. cerevisiae* mit einem 10-Histidin-*tag* oder einem EGFP-10-Histidin-*tag* wurden die Plasmide pFA6a-GFP(S65T)10His-HIS3-MX6 und pFA6a-10His-HIS3-MX6 konstruiert. Durch Restriktionsverdau mit *AscI* und *PacI* wurde aus einem pFA6a-GFP(S65T)-HIS3-MX6 das EGFP-Gen entfernt und stattdessen die für den 10-Histidin-*tag* bzw. EGFP-10-Histidin-*tag* kodierenden Sequenzen eingesetzt.

Die für den EGFP-10-Histidin-*tag* kodierende Sequenz wurde mittels PCR vom pFA6a-GFP(S65T)-HIS3-MX6 Plasmid anhand der Primer GFP-10HIS-S und GFP-10HIS-REV gewonnen und mit Erkennungsstellen für *AscI* und *PacI* flankiert. Die kodierende Sequenz für den C-terminalen 10-Histidin-*tag* wurde durch Aneinanderlagerung und Phosphorylierung der Primer C-10HIS-S und C-10HIS-REV gewonnen.

Zur C-terminalen Modifikation von Pdr5p wurden die entsprechenden Kassetten mittels PCR vervielfältigt. Für die C-terminale Fusion mit EGFP-10-Histidin-*tag* wurde das Primerpaar PDR5-10HIS-R1 und PDR5-GFP-S3 verwendet, für eine C-terminale Modifikation mit einem 10-Histidin-*tag* das Primerpaar PDR-

10HIS-R1 und PDR5-10HIS-F2. Das PCR Produkt wurde gefällt, in sterilem ddH₂O resuspendiert und 10 µg DNA zur Transformation von YALF A1 eingesetzt. Die frisch transformierten Zellen wurden auf –HIS Selektionsplatten ausgestrichen.

3.2.5 Konstruktion spezialisierter Klonierungsstämme für *S. cerevisiae*

Zur Überexpression eines beliebigen Gens in *S. cerevisiae* mit Hilfe der Kassetten zur Überproduktion und Reinigung von Hefeproteinen (3.2.2) wurde ein spezialisierter Klonierungsstamm benötigt, der zwei Bedingungen erfüllt: i) er musste das *pdr1-3* Allel tragen, um die Überexpression vom *PDR5*-Promotor zu erlauben und sollte ii) möglichst geringe Homologien zur Überexpressionskassette tragen, um die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination an unerwünschter Stelle zu minimieren.

Es wurden zwei spezialisierte Klonierungsstämme erzeugt. Für beide wurde als Ausgangsstamm YALF A1, der das *pdr1-3* Allel trägt, gewählt. Im spezialisierten Klonierungsstamm für die Überexpression eines beliebigen Hefeproteins wurden weite Teile des *PDR5*-Promotors mit deletiert (-1 bis -800 bp), im Klonierungsstamm für die Mutagenese von *PDR5* wurde sowohl der *PDR5*-Promotor als auch ein Großteil von *PDR5* (Startkodon bis zur einmalig vorhandenen *AatII* Erkennungsstelle) deletiert.

Zur Deletion wurde der *TRP1* Auxotrophiemarker vom pFA6a-TRP1 Plasmid mittels PCR vervielfältigt. Die hierzu verwendeten Primer enthielten am 5'-Ende jeweils ca. 40 bp lange Sequenzen, die homolog zu den flankierenden Sequenzen der zu deletierenden Bereiche waren. Das PCR Produkt wurde mit Ethanol gefällt (3.1.4), in sterilem ddH₂O resuspendiert und 10 µg DNA zur Transformation von YALF A1 eingesetzt. Die Zellsuspension auf –TRP Selektionsplatten ausgestrichen. Die erfolgte Deletion wurde mit Hilfe von Kolonien-PCR und DNA-Sequenzierung nach Kolonien-PCR verifiziert.

Zur Deletion des *PDR5*-Promotors aus YALF A1 wurden die Oligonukleotide PDR5PDEL-long-S und PDR5PDELpFA6aREV verwendet. Der spezialisierte Klonierungsstamm YRE1000 wird im Folgenden kurz $\Delta PDR5$ prom genannt.

Zur Deletion des *PDR5*-Promotors und weiter Teile von *PDR5* (vom Startkodon bis zur einmalig vorhandenen *AatII* Schnittstelle) aus YALF A1 wurde

analog der *TRP1* Marker anhand der Primer PDR5PDEL-LONG-S und PDR5_DEL_AatII_REV vervielfältigt. Der spezialisierte Klonierungsstamm für die Mutagenese von *PDR5* YRE1001 wird im Folgenden $\Delta PDR5\Delta PDR5$ prom genannt.

3.2.6 Mutagenese und Überexpression von *PDR5*-Mutanten

Gezielter Austausch (Einzel- und Doppelmutanten) von Aminosäuren in *PDR5* wurde durch gezielte Mutagenese (Quik-Change® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit) von pRE5 erreicht. Die eingeführten Mutationen und verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3-F zusammengefasst. Durch DNA-Sequenzierung wurde die korrekte Einführung der Mutationen verifiziert und unerwünschte, zufällige Mutationen im gesamten kodierenden Bereich ausgeschlossen.

Nach Gewinnung der Mutationen-tragenden Plasmide im *Midi*-Maßstab, wurde das zu transformierende DNA Fragment durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *ApaI* gewonnen. Zur Transformation des Klonierungsstammes $\Delta PDR5\Delta PDR5$ prom wurden nach Ethanol-Fällung (3.1.4) 10 µg DNA eingesetzt.

3.2.7 Kompetente Hefezellen

50 ml YPD-Medium wurden mit Hefezellen aus einer frischen ÜN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0.2 angeimpft. Die Zellen wurden bei 30°C unter ständigem Schütteln (200 UPM) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1 angezogen. Die Zellen wurden geerntet (2500 x g, 5 min, RT), mit 20 ml ddH₂O gewaschen und im Anschluss in LATE-Puffer (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die kompetenten Hefezellen können bei 4°C für maximal eine Woche gelagert werden.

3.2.8 Transformation von Hefezellen

Kompetente Hefezellen (50 µl) wurden mit maximal 10 µl DNA Lösung (1-10 µg) versetzt. Im Anschluss wurden 300 µl PLATE-Puffer (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 40 vol% PEG4000) zugesetzt und ohne Schütteln für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Suspension wurde als Hitzeschock für 20 min bei 42°C inkubiert und durch Invertieren des Gefäßes alle fünf Minuten vorsichtig durchmischt. Die Zellen wurden geerntet (2500 x g, 10 min, RT) und zur Regeneration in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und für 1.5 bis 2 Stunden bei 30°C

und 190 UPM geschüttelt. Die regenerierten Zellen wurden geerntet (2500 x g, 5 min RT), in 50 µl verbleibendem YPD-Medium resuspendiert, auf den entsprechenden Selektionsplatten (-HIS oder -TRP) ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden. Die positive Transformation der Zellen und korrekt vollzogene homologe Rekombination wurde mittels Kolonien-PCR und DNA-Sequenzierung verifiziert. Dazu wurde eine Hefekolonie zunächst in einer handelsüblichen Mikrowelle für 45 s bei maximaler Leistung (≥1000 W) aufgeschossen, anschließend mit einem vorbereiteten PCR Ansatz versetzt und die PCR gestartet.

3.3 Elektrophorese und Proteindetektion

3.3.1 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Coomassie Plus Assay (Pierce) mit Serumalbumin vom Rind (*bovine serum albumin*, BSA) als Standard bestimmt.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

Trenngelpuffer	SDS	4 g/l	
	Tris-HCl	1.5 M	pH 8.85
Sammelgelpuffer	SDS	4 g/l	
	Tris-HCl	0.5 M	pH 6.8
10 x Laufpuffer	Glycin	1.9 M	
	Tris-HCl	0.25 M	
	SDS	10 g/l	pH 8.3
5 x Probenpuffer			5x Probenpuffer Membranproteine
10 ml	Sammelgelpuffer	8 M	Harnstoff
10 ml	16% SDS	10 ml	Sammelgelpuffer
5 ml	0.2% Bromphenolblau	10 ml	16% SDS
20 ml	98% Glycerin	5 ml	0.2% Bromphenolblau
		500 µl	500 mM EDTA
auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen		auf 50 ml mit 98% Glycerin auffüllen	

Reduzierende Probenpuffer wurden durch Mischen von 980 µl 5 x Probenpuffer mit 20 µl 14.3 M β-Mercaptoethanol oder 20 µl 1 M DTT erzeugt und konnten bei -20°C gelagert werden.

	Sammelgel	Trenngel		
		4.5%	7%	10%
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%)	5.25 ml	17.5 ml	25 ml	37.5 ml
Sammelgelpuffer	5 ml			
Trenngelpuffer		18.75 ml	18.75 ml	18.75 ml
H ₂ O	28 ml	38.75 ml	31.25 ml	18.75 ml
APS (10% in ddH ₂ O)	210 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl

Tabelle 3.3-A Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel der SDS-PAGE

Eine diskontinuierliche SDS-PAGE besteht aus einem Sammelgel, um aufgetragene Proteinproben zu fokussieren und aus einem Trenngel, in dem Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden (142). Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels nach Tabelle 3.3-A gemischt. Die Zugabe von APS und TEMED startete die Polymerisation, die Mischung wurde zügig in eine vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Stunde war das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol wurde abgegossen. Im Anschluss wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt und die fertigen Trenngele überschichtet. Platzhalter aus Teflon wurden zügig in die polymerisierenden Sammelgele gesteckt, um Auftragstaschen zum Beladen der Gele freizuhalten.

Vor einer Elektrophorese wurden Proteinproben durch Zugabe von 5 x Probenpuffer denaturiert. Lösliche Proteine wurden 10 min bei 95 °C aufgeköcht, Membranproteine für 10 min bei 65°C. Ein spezialisierter Probenpuffer für Membranproteine mit 8 M Harnstoff sollte die vollständige Denaturierung unterstützen. Die SDS-Elektrophorese lief bei 160 V für ein bis zwei Stunden in 1 x Laufpuffer.

3.3.3 Coomassie-Blau-Färbung und Silberfärbung

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

Coomassie-Lösung	ddH ₂ O	500 ml
	techn. Methanol	400 ml
	techn. Essigsäure	100 ml
	Coomassie Brilliantblau R-250	0.25% (w/v)
Entfärbelösung	ddH ₂ O	500 ml
	techn. Methanol	400 ml
	techn. Essigsäure	100 ml

Fixierlösung	ddH ₂ O	600 ml	
	techn. Ethanol	300 ml	
	techn. Essigsäure	100 ml	
Thiosulfatpuffer	4 M Na-Azetat pH 6.0	25ml	
	techn. Ethanol	300 ml	
	ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Silbernitratlösung	Ag ₂ NO ₃	500 mg	
	ddH ₂ O	500 ml	
	<i>vor Gebrauch immer frisch:</i>		
Entwicklerlösung	37% Formaldehyd	50 µl	
	Na ₂ CO ₃	2.5 g	
	ddH ₂ O	100 ml	
	<i>vor Gebrauch immer frisch:</i>		
	37% Formaldehyd	50 µl	

Die Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Gel erfolgte mit Hilfe von Coomassie Brilliantblau R-250, indem das Gel für 1 h bei RT in Coomassie-Lösung geschwenkt wurde. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff mehrfach für 30 Minuten in frischer Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels vollständig entfärbt war.

Zur sensitiveren Anfärbung von Proteinen wurde eine Silberfärbung verwendet. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde zunächst 15 min in Fixierlösung eingelegt. Danach wurde das Gel 15 min in Thiosulfatpuffer geschwenkt und viermal für 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurde das Gel für 25 min in Silbernitratlösung geschwenkt und darauf kurz mit ddH₂O gewässert. Die Entwicklung des Gels erfolgte durch Zugabe von Entwicklerlösung und wurde nach Anfärbung der Proteine durch Zugabe von 2 ml Eisessig pro SDS-PAGE gestoppt.

3.3.4 Immuno-Blot

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

Transferpuffer	ddH ₂ O	700 ml	
	10 x Laufpuffer	100 ml	
	techn. Methanol	200 ml	
TBS	NaCl	250 mM	
	Tris-HCl	20 mM	pH 8.0
TBS-T	NaCl	250 mM	
	Tween-20	0.1% v/v	
	Tris-HCl	20 mM	pH 8.0
Blocklösung	3% BSA und 0.1% Azid in TBS-T		

Proteine wurden zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel der SDS-PAGE wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und luftblasen-frei zwischen mehrere in Transferpuffer eingelegte *Whatman-3MM*-Filterpapiere gestapelt. Durch Anlegen eines konstanten Stroms in einer *Semi-dry* Blot Apparatur (1h 30 min, 100 mA pro Gel; BIO-RAD) wanderten die Proteine zur Anode und wurden auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert.

Zur Vorbereitung der Immundetektion und zur Verhinderung unspezifischer Proteinadsorption wurde die Nitrozellulosemembran durch 30-minütige Inkubation mit BSA abgesättigt. Die Membran wurde dann für eine Stunde mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper/Antiserum inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit TBS-T wurde ungebundener Erst-Antikörper entfernt. Die durch den Erst-Antikörper erkannten Banden wurden mit Hilfe eines Peroxidasegekoppelten Zweit-Antikörpers in einer 1:7500 Verdünnung identifiziert. Für die Detektion wurde das Enhanced ChemiLuminescence System (GE Healthcare) verwendet.

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Quelle
α -Pdr5p	Kaninchen	1:20000	Prof. K. Kuchler
α -Pma1p	Kaninchen	1:10000	Prof. K. Kuchler
α -PGK	Kaninchen	1:7500	Prof. K. Kuchler
α -Kaninchen-HRP	Maus	1:7500	Dianova

Tabelle 3.3-B Liste der Antikörper und der verwendeten Verdünnungen

3.4 Expression, Reinigung und Charakterisierung der TAP1-NBD

3.4.1 Klonierung und heterologe Proteinexpression der TAP1-NBD in *E. coli*

Die kodierenden Sequenzen für die C-terminale Domäne (Aminosäure 489 - 748) aus humanem TAP1 wurden mittels PCR und der Primer TAP1-NBD-s und TAP1-NBD-as aus cDNA (Arbeitskreis Prof. R. Tampé, Frankfurt) vervielfältigt. Die 5'-Überhänge kodierten für Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme *NdeI* und *HindIII* sowie für einen N-terminalen 6-Histidin-tag (siehe Tabelle 2.3-A). Das gewonnene PCR Produkt wurde mittels *NdeI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pET21a+ kloniert. Einzel- und Doppelmutanten der TAP1-NBD wurden mittels

gezielter Mutagenese durch Ligase Kettenreaktion erzeugt. Die Bedingungen für die Ligase Kettenreaktion in Anwesenheit der AmpLigase wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen gewählt. Das Aspartat 668, das sich der Walker B Sequenz anschließt, wurde zu Glutamat mutiert (D668E), das Glutamin 710 an der äquivalenten Stelle des konservierten Histidins wurde zu Histidin mutiert (Q710H). Also wurden vier Plasmide pET-NBD(WT), pET-NBD(D668E), pET-NBD(Q710H) und pET-NBD(D668E/Q701H) erzeugt. Unerwünschte, zufällige Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz wurden durch Sequenzierung der DNA ausgeschlossen.

Für die heterologe Expression der TAP1-NBD wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit den gewünschten Plasmiden transformiert. 2 Liter LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden aus einer frischen ÜN-Kultur 1:50 angeimpft und bei 30°C angezogen. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach dreistündiger Expression wurden die Zellen geerntet (4000 x g, 15 min, 4°C) und konnten bei -20°C gelagert werden.

3.4.2 Proteinreinigung der TAP1-NBD

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Sediment einer 2 L Expressionskultur wurde in 30 ml eiskaltem TAP-Puffer A (20 mM Natriumphosphat-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 15% w/v Glycerin) aufgenommen und auf 1 mg/ml Lysozym und 0.1 mg/ml Deoxyribonuklease I eingestellt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit einer Zellaufschlussmaschine aufgebrochen (2.7 kbar). Nicht-aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (16000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion und wurde auf eine mit TAP-Puffer A äquilibrierte Zn²⁺/IDA Säule (5 ml Bettvolumen) geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mittels eines Stufengradienten aus 6 Säulenvolumen TAP-Puffer A und 6 Säulenvolumen TAP-Puffer A mit 25 mM Imidazol gewaschen. Die TAP1-NBD-Mutanten eluierten in TAP-Puffer A mit 90 mM Imidazol und wurden sofort auf 20 mM DTT eingestellt. Die TAP1-NBD-haltigen Fraktionen wurden vereint und mittels Ultrafiltration ankonzentriert (Amicon Ultra 15, 10 kDa MWCO). Durch Gelfiltration auf einer Superdex 200 HR 26/60 Säule (320 ml Bettvolumen) wurde die lösliche TAP1-NBD von Aggregaten getrennt. Das Protein eluierte in TAP-Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 15% w/v Glycerin) bei einem Volumen, das einem

molekularen Gewicht von 29 kDa entspricht. Die TAP1-NBD-haltigen Fraktionen wurden vereint und bei einer Konzentration von 1 mg/ml auf Eis gelagert.

3.4.3 ATPase-Aktivität der TAP1-NBD

Die ATPase-Aktivität der TAP-NBD1 und ihrer Mutanten wurde, wenn nicht anders beschrieben, in TAP-Puffer B (3.4.2) bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml bei 30°C durchgeführt. Die Zeit- und pH-abhängigen ATPase-Aktivität wurde in Anwesenheit von 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ bestimmt. Die Reaktion wurde mit 40 mM H₂SO₄ gestoppt. Die Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats wurde anhand der Komplexbildung mit Färbelösung spektroskopisch bestimmt (3.6.13). Als Standard diente eine NaH₂PO₄ Verdünnungsreihe. Der Hintergrund durch ATP-Autohydrolyse, Phosphatverunreinigungen und/oder Streulicht wurden mit Hilfe von Kontrollansätzen ohne Protein bestimmt und die Messwerte durch Subtrahieren des Hintergrundsignals bereinigt.

Die apparente Affinitätskonstante des TAP1-NBD Homodimers wurde bei pH 7.2 und 30°C bestimmt, indem die spezifische ATPase-Aktivität gegen die verwendete Proteinkonzentration aufgetragen wurde. Die so aufgetragenen Daten wurden mittels eines einfachen Ein-Bindungsstellen-Modells analysiert, um die apparente Dissoziationskonstante K_D^{app} des TAP1-NBD Dimers zu gewinnen.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_0}{K_D^{app} + c_0}$$

Gleichung 1

Wobei v die spezifische ATPase-Aktivität beschreibt, v_{\max} die spezifische ATPase-Aktivität bei unendlicher Proteinkonzentration und c_0 die eingesetzte Proteinkonzentration.

3.4.4 TNP-AXP Bindungsstudien an der TAP1-NBD

Um die Affinität von ATP, ADP und AMP an die isolierte TAP1-NBD sowie ihrer Mutanten zu bestimmen, wurde zunächst die Affinität der fluoreszierenden Nukleotidanaloga TNP-ATP und TNP-ADP ermittelt. Durch Konkurrenz (siehe 3.4.5) von TAP1-NBD/TNP-ADP Komplexen mit ATP, ADP und AMP konnte die Affinität zu

diesen unmodifizierten Nukleotiden abgeleitet werden. Die Fluoreszenz von TNP-ATP und TNP-ADP wurde in einem Fluoreszenzspektrometer bei 409 nm angeregt und die Intensität des emittierten Lichts bei 540 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug für das anregende und das emittierte Licht jeweils 4 nm, die Temperatur wurde konstant bei 20 ± 1 °C gehalten. Alle Experimente wurden in TAP-Puffer B (3.4.2) durchgeführt unter Zusatz der gewünschten Menge MgCl_2 in einem Gesamtvolumen von 1400 μl .

Bei Bindung von TNP-AXP (X = M, D, oder T) an die TAP1-NBD, erhöht sich die Fluoreszenzintensität der TNP-Gruppe um ein Vielfaches. Die absolute Größe dieser Änderung hängt von der spezifischen Proteinumgebung in der Nukleotidbindungsstasche ab. Die Fluoreszenzintensität von TNP-AXP in Abwesenheit von Protein ist relativ gering und kann mit Hilfe von bestimmt werden. Die Fluoreszenzkonstanten Q_1 und Q_2 in Abwesenheit von Protein wurden durch Titration von TNP-AXP aus einer 1 mM Stocklösung in TAP-Puffer B (mit und ohne 5 mM MgCl_2) bestimmt. Die maximale Veränderung des Volumens wurde unter 4% (v/v) gehalten. Die Rohdaten wurden korrigiert für den Verdünnungseffekt und die Hintergrundfluoreszenz in Abwesenheit von TNP-AXP.

$$F_{buffer} = Q_1 L_0 + Q_2 L_0^2$$

Gleichung 2

Q_1 und Q_2 entsprechen spezifischen Fluoreszenzkonstanten, L_0 ist die Konzentration von TNP-AXP.

Die TAP1-NBD und ihre Mutanten wurden in TAP-Puffer B (unter Zusatz von 5 mM MgCl_2) auf 150 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Dissoziationskonstante (K_D) der TAP1-NBD/TNP-AXP-Komplexe wurde mit Hilfe von Gleichung 3 bestimmt.

$$F = Q_1 L_0 + Q_2 L_1^2 + F_{max} (A - \sqrt{A^2 - 4L_0 P_0})$$

$$A \equiv K_{D,L} + L_0 + P_0$$

Gleichung 3

F_{\max} ist die maximale Fluoreszenz, die durch Bindung von TNP-AXP an die TAP1-NBD erreicht werden kann. L_0 und P_0 entsprechen den eingesetzten Konzentrationen von TNP-AXP (L_0) und der TAP1-NBD (P_0). $K_{D,L}$ entspricht der Dissoziationskonstante des TAP1-NBD/TNP-AXP-Komplexes. F ist die im Fluoreszenzspektrometer gemessene Fluoreszenzintensität.

3.4.5 Kompetitive Bindungsstudien

Die TAP1-NBD (150 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit 10 μM TNP-ADP in TAP-Puffer B (3.4.2) bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ für zwei Minuten vorinkubiert. Bei dieser Konzentration der TAP1-NBD kann die ATP-induzierte Dimerisierung vernachlässigt werden. Anschließend wurde AXP ($X = T, D, M$) schrittweise aus 2 μM , 20 μM , 200 μM , 2 mM, 20 mM, 200 mM und 500 mM Stocklösungen (pH 8) hinzupipettiert bis zu einer Endkonzentration von maximal 15 mM. Im Verlauf der Titration wurde das Gesamtvolumen um maximal 4% (v/v) verändert. Die aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf das Hintergrundsignal und die Verdünnung korrigiert, normalisiert und entsprechend von Gleichung 4 ausgewertet.

$$\frac{F_{PL,AXP}}{F_{PL}} = \frac{A + AXP_0 \frac{K_{D,L}}{K_{D,AXP}} - \sqrt{\left(A + AXP_0 \frac{K_{D,L}}{K_{D,AXP}}\right)^2 - 4P_0L_0}}{A - \sqrt{A^2 - 4P_0L_0}}$$

Gleichung 4

$F_{PL,AXP}/F_{PL}$ entspricht hier der bereinigten und normierten Fluoreszenz bei verschiedenen AXP ($X = T, D, M$). $K_{D,L}$ ist die Dissoziationskonstante des TAP1-NBD/TNP-ADP Komplexes und wurde in unabhängigen Experimenten in An- und Abwesenheit von 5 mM MgCl_2 bestimmt (siehe 3.4.4). L_0 und P_0 entsprechen den eingesetzten Konzentrationen von TNP-ADP (L_0) und der TAP1-NBD (P_0). A wurde bereits in Gleichung 3 definiert. $K_{D,AXP}$ ist die zu bestimmende Dissoziationskonstante des TAP1-NBD/AXP Komplexes. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_{D,AXP}$ wurde in mindestens zwei unabhängigen Experimenten wiederholt.

3.4.6 Molekulares Modellieren

Das molekulare Modell des TAP1-NBD/TAP2-NBD Heterodimers mit gebundenem ATP/Mg²⁺ wurde auf der Basis der Kristallstruktur des HlyB-NBD H662A Dimers in Komplex mit ATP/Mg²⁺ (PDB Datenbank Eintrag 1XEF) erstellt. Zunächst wurde ein Sequenz-*alignment* mit Hilfe des *ClustalW Webinterface* (www.ebi.ac.uk/clustalw/) und der Sequenzen von humanem TAP1, TAP2, CFTR, MRP1 sowie der Sequenzen von MalK aus *E. coli*, MJ0796 aus *Methanococcus jannaschii*, und HlyB aus *E. coli* (Abbildung 11) erzeugt. Das Modell wurde dann am *SWISS Model Web Server* (swissmodel.expasy.org/) unter Verwendung der Standardparameter generiert.

3.5 *in vivo* Analyse von Pdr5p

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Expression und Lokalisation vom Pdr5p-EGFP-10His Fusionsproteinen, wurde frisches YPD-Medium zunächst aus einer ÜN-Kultur mit Pdr5p-EGFP-10His überproduzierenden Zellen auf eine OD₆₀₀ = 0.2 angeimpft und bei 30°C und 200 UPM inkubiert, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0.5 – 1.0 erreichten. Die Zellen wurden dann mit ddH₂O gewaschen und anhand eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axioskop 2 FS) mit Exzitations- und Emissionsfiltern für GFP untersucht. Zur Lokalisation von Pdr5p-EGFP-10His wurden identische Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Lichtmikroskopie (im Phasenkontrast-Modus) untersucht.

3.5.2 Resistenztest auf Drogen-Agar-Platten

Hefekulturen wurden in Flüssigkultur bis zu einer Zelldichte OD₆₀₀ = 1 angezogen. Die durch verschiedene Pdr5p-Varianten vermittelte Drogenresistenz wurde untersucht, indem 5 µl einer mit sterilem ddH₂O verdünnten Zellsuspension (OD₆₀₀ = 0.02) auf eine Drogen-Agar-Platte gegeben wurden. Das Zellwachstum wurde nach zwei- bis dreitägiger Inkubation der Zellen bei 30°C dokumentiert. Drogen-Agar-Platten wurden erzeugt, indem die gewünschten Komponenten aus Stammlösungen zunächst mit 1 ml noch flüssigem, handwarmen YPD-Agar kräftig

gemischt wurden, welcher dann mit 50 ml flüssigem YPD-Agar gemischt und zum Erhärten in Petrischalen gegossen wurde. Als Lösungsmittel für die Stammlösungen von Ketoconazol, Fluconazol und Cycloheximid wurde DMSO verwendet, für Rhodamin123 wurde Ethanol verwendet. DMSO und Ethanol hatten in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen.

3.5.3 Efflux von Rhodamin6G aus ganzen Zellen

Identische Zellmengen (2 OD₆₀₀ Äquivalente; 1 OD₆₀₀ Äquivalent entspricht 1ml einer Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von 1) von exponentiell wachsenden Hefekulturen wurden durch Zentrifugation geerntet (6000 x g, 2 min, RT). Nach viermaligem Waschen der Zellen mit ddH₂O wurden die Zellen in 400 µl 50 mM Hepes-NaOH, pH 7.0, 5 mM 2 Deoxy-D-Glukose und 5 µM Rhodamin6G aufgenommen und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die deenergetisierten und mit Rhodamin6G beladenen Zellen wurden zügig zweimal mit 50 mM Hepes pH 7.2 gewaschen und in 1 ml 50 mM Hepes pH 7.2 aufgenommen.

480 µl Zellsuspension wurden mit 480 µl 50 mM Hepes pH 7.2 in einer Fluoreszenzküvette mit Magnetrühr-Einrichtung bei 30°C gemischt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 529 nm, die Emissionswellenlänge 553 nm. Die Spaltbreite für das anregende Licht betrug 1 nm, die Spaltbreite für das emittierte Licht betrug 4 nm. Der Rhodamin6G Efflux wurde durch Zugabe von 20 µl 1M Glukose gestartet. Als Negativkontrolle diente die Zugabe von 20 µl ddH₂O anstelle der Glukoselösung.

3.5.4 Präparation von Gesamtzellextrakten aus Hefe

Gesamtzellextrakte aus Hefe wurden präpariert wie von R. Egner *et al.* beschrieben (143). Frische ÜN-Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0.2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 bis 1.0 angezogen. 5-10 OD₆₀₀ wurden entnommen, durch Zentrifugation (20000 x g, 15 s, RT) sedimentiert und in 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 150 µl 1.85 M NaOH und 7.5% β-Mercaptoethanol vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die so freigesetzten Proteine wurden durch Zugabe von 150 µl 50% TCA (w/v) gefällt und durch Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert. TCA wurde quantitativ

entnommen, das proteinhaltige Sediment mit 5 μ l 1M Tris pH 10 neutralisiert und in 1x Probenpuffer (3.3.2) resuspendiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C wurden die Proteine denaturiert und ca. 0.5 OD₆₀₀ Äquivalente mittels SDS-PAGE analysiert.

3.6 *in vitro* Analyse von Pdr5p

3.6.1 Präparation von Gesamtmembranen aus Hefe

Präparative Mengen von Hefezellen wurden in 5000 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Dazu wurden 2000 ml YPD-Medium aus frischen ÜN-Kulturen auf OD₆₀₀ 0.05 bis 0.2 angeimpft und bis zur spätlogarithmischen Phase angezogen (OD₆₀₀ = 2.0 – 2.5). Die Zellen wurden geerntet und konnten bei -20°C gelagert werden. Vor dem Zellaufschluss wurden die Zellen bei RT aufgetaut und mit 15 ml eiskaltem Hefe-Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% w/v Glycerin) pro Liter Hefekultur resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in zwei Passagen mit einer Zellaufschlussmaschine bei 2.7 kbar aufgeschlossen. Die Suspension wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (5000 x g, 10 min, 4°C) von Zellkernen und Zelltrümmern gereinigt. Die Gesamtmembranen wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation (180000 x g, 1h, 4°) sedimentiert. In einem alternativen Ansatz wurde versucht, die Hefemembranen mit lediglich 20000 x g aus zu sedimentieren. Pro Liter Kulturvolumen wurden die gewonnenen Membranen in 5 ml Hefe-Puffer A resuspendiert. Die resultierende Proteinkonzentration wurde mit BSA als Standard bestimmt (3.3.1).

3.6.2 Präparation angereicherter Plasmamembranen aus Hefe

Als Vorreinigungsschritt für die Reinigung von N14His-Pdr5p genügte eine Anreicherung der Plasmamembranen nach dem Protokoll von L. Serrano (144). 10 - 30 g bei -20°C gelagerte Hefezellen aus 4 - 6 Liter Kulturvolumen wurden bei RT aufgetaut. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit ddH₂O resuspendiert und auf ein Volumen von 84 ml aufgefüllt. Unter ständigem Rühren wurden 5 ml 1M Tris-HCl pH 8.0 und 1 ml 0.5 M EDTA hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Die Suspension wurde in einen Bead-Beater überführt und mit Proteaseinhibitoren sowie 200 – 300 ml Glas-Beads (0.5 mm Durchmesser)

gemischt. Durch fünfmaliges, einminütiges heftiges Durchmischen wurden die Zellen im Bead-Beater physikalisch aufgebrochen. Die Glas-Beads wurden auf einer Glasfritte abgetrennt. Zweimaliges Nachspülen der Glas-Beads mit je 90 ml TEG-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.2 mM EDTA, 20% w/v Glycerin) steigerte signifikant die Ausbeute. Durch zweimaliges Zentrifugieren (700 x g, 10 min, 4°C) wurden Zellkerne und -trümmer abgetrennt, die angereicherte Plasmamembran im Überstand durch Zentrifugation (20000 x g, 30 min, 4°C) sedimentiert und in 2 ml Hefe-Puffer A pro Liter Kulturvolumen (siehe 3.6.1) resuspendiert. Die resultierende Proteinkonzentration wurde bestimmt und auf 10 mg/ml eingestellt (3.3.1).

3.6.3 Präparation hochhomogener Plasmamembranen aus Hefe

Um besonders angereicherte Plasmamembranen aus Hefe zu gewinnen, war es nötig zwei klassische Verfahren zur Reinigung von Plasmamembranen aus Hefe zu kombinieren: Zunächst wurden angereicherte Plasmamembranen nach L. Serrano präpariert (144). Im zweiten Schritt wurden Mitochondrien durch saure Fällung nach A. Goffeau (145,146) gefällt.

Zunächst wurden die Zellen aufgeschlossen, wie in 3.6.2 beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Zellen in einem Tris-Azetat/EDTA-Puffer bei pH 7.5 aufgeschlossen wurden. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurden die Glas-Beads zweimal mit je 90 ml TAEG-Puffer (10 mM Tris-Azetat pH 7.5, 0.2 mM EDTA, 20% w/v Glycerin) gewaschen. Durch zwei Zentrifugationsschritte bei 1000 x g (5 min, 4°C) und eine Zentrifugation bei 3000 x g (5 min, 4°C) wurden Zellkerne und -trümmer abgetrennt. Die angereicherte Plasmamembran wurde aus dem Überstand durch Zentrifugation (20000 x g, 40 min, 4°C) sedimentiert und in 4 ml TAE-Puffer (10 mM Tris-Azetat pH 7.5, 0.2 mM EDTA) pro Liter Zellkultur aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und auf 5 mg/ml eingestellt (3.3.1).

Unter ständigem Rühren wurde dann der pH-Wert der Lösung zügig mit 1 M Essigsäure auf 5.2 eingestellt, und die präzipitierenden Mitochondrien durch Zentrifugation (6900 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde zügig mit 1M NaOH auf pH 7.5 eingestellt, die hochhomogenen Plasmamembranen aus Hefe durch Zentrifugation (26500 x g, 30 min, 4°C) gewonnen und zunächst in 1ml pro Liter Kulturvolumen 50 mM Hepes-HCl pH 7.0 (mit Proteaseinhibitoren)

resuspendiert. Nach Proteinbestimmung wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

3.6.4 Transport von Rhodamin6G in Plasmamembran-Präparationen

Plasmamembranen (30 µg Protein) wurden in einer Fluoreszenzküvette mit 1000 µl HEPES-NaOH pH 7.0, 5 mM MgCl₂ und 150 - 600 nM Rhodamin6G bei 35°C inkubiert. Die Pdr5p- und ATP-abhängige Auslöschung der Rhodamin6G-Fluoreszenz wurde durch Zugabe von ATP-NaOH pH 7.0 (Endkonzentration 5 mM) gestartet und in Echtzeit mittels eines Fluoreszenzspektrometers verfolgt (Einstellungen wie in 3.5.3; Spalt des anregenden Lichts: 1 nm; Spalt des emittierten Lichts: 2 nm)). Durch die Zugabe von Inhibitoren wie zum Beispiel 20 µl 500 mM EDTA konnte die vollständige Reversibilität der beobachteten Fluoreszenzabnahme untersucht werden. Für Studien der Inhibition von Pdr5p durch Detergenzien wurden diese aus wässrigen Stocklösungen zum Reaktionsgemisch hinzugefügt.

3.6.5 Reinigung von N10His-Pdr5p mittels IMAC und Gelfiltration

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

Bindungspuffer Imidazol	Tris-HCl pH 7.8	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	10 mM
	Glyzerin	10% (w/v)
Elutionspuffer Imidazol	Tris-HCl pH 7.8	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	200 mM
	Glyzerin	10% (w/v)
Bindungspuffer Histidin	Tris-HCl pH 7.8	50 mM
	NaCl	500 mM
	L-Histidin	2.5 mM
	Glyzerin	10% (w/v)
Elutionspuffer Histidin	Tris-HCl pH 7.8	50 mM
	NaCl	500 mM
	L-Histidin	100 mM
	Glyzerin	10% (w/v)
Hefe-Puffer A	Tris-HCl pH 7.8	50 mM
	NaCl	50 mM
	Glyzerin	10% (w/v)

Alle Puffer wurden vor Verwendung je nach Bedarf auf 0.05% DDM, 1% Digitonin, 1% OG oder 0.03% TDM eingestellt.

Für die Reinigung von N10His-Pdr5p wurde das Protein nach Zellaufschluss mit Zellaufschlussmaschine und Präparation von Hefe-Gesamtmembranen (180000

x g Sediment oder 20000 x g Sediment) bei einem Protein:Detergenz-Verhältnis von 1:1 und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml für eine Stunde bei 4°C unter ständigem Rühren solubilisiert. Nicht solubilisierte Proteine wurden durch Zentrifugation (180000 x g, 1 h, 4°C) abgetrennt. Der Überstand dieser Zentrifugation enthielt die solubilisierten Proteine, wurden mit einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine mit Bindungspuffer äquilibrierte Zn²⁺/IDA Säule (1ml Bettvolumen) geladen. Ungebundene Proteine wurden mit Hilfe eines Stufengradienten gewegewaschen (Fluss: 2 ml/min). Die gewünschten Konzentrationen von Imidazol und L-Histidin wurden durch Mischen der Bindungs- und Elutionspuffer erreicht.

Reinigung mit Imidazol

22 Säulenvolumen	10 mM Imidazol
7 Säulenvolumen	29 mM Imidazol
4 Säulenvolumen	75 mM Imidazol

Reinigung mit L-Histidin

22 Säulenvolumen	2.5 mM L-Histidin
7 Säulenvolumen	5.4 mM L-Histidin

Die Elution von N10His-Pdr5p erfolgte durch weitere Erhöhung der Imidazol bzw. L-Histidin Konzentration (Fluss: 1 ml/min).

Elution durch Imidazol

10 Säulenvolumen	134 mM Imidazol
------------------	-----------------

Elution durch L-Histidin

10 Säulenvolumen	26.9 mM L-Histidin
------------------	--------------------

Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, vereint und direkt mittels Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Ultra 4, 100 kDa MWCO) für eine anschließende Gelfiltration mittels einer HR10/30 Superose6 Säule (GE Healthcare) ankonzentriert. Die Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit 2.5 Säulenvolumen Hefe-Puffer A äquilibriert, bevor die zu analysierende Proteinprobe bei einem Fluss von 0.5 ml/min aufgetragen und aufgetrennt wurde.

3.6.6 Reinigung von N14His-Pdr5p aus angereicherten Plasmamembranen

Für die Reinigung von N14His-Pdr5p wurde das Protein aus angereicherten Plasmamembranen bei einem Protein:Detergenzverhältnis von 1:1 und einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml für eine Stunde bei 4°C unter ständigem Rühren

solubilisiert. Die restlichen Reinigungsschritte wurden bei nur einer Modifikation wie für N10His-Pdr5p (3.6.5) beschrieben durchgeführt:

Elution von N14His-Pdr5p durch L-Histidin

10 Säulenvolumen 51.3 mM L-Histidin

Die N14His-Pdr5p-haltigen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Gelfiltration analog zu 3.6.5 analysiert.

3.6.7 Rekonstitution von Pdr5p in vorgeformte Liposomen

Für die Liposomenpräparation wurden verschiedene Lipidmischungen verwendet. Entweder wurden *E. coli* Lipide, *E. coli* Lipid: PC Mischungen (3:1) oder nach J. Folch (147) präparierte Hefelipide in Chloroform gemischt. Gegebenenfalls erfolgte eine Markierung der Liposomen durch Zugabe von 0.2 mol% C16 Palmitoyl-(NBD-hexanoyl)-PE (NBD-PE). Aufgrund eines angelegten Stickstoffstroms evaporierte das Chloroform zügig. Der entstandene Lipidfilm konnte mittels Vakuum getrocknet werden und wurde anschließend in Rekonstitutionspuffer (50 mM Hepes pH 7.2, 50 mM NaCl, 5% w/v Glyzerin) rehydratisiert und bei einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml in Suspension gebracht. Durch fünfmaliges Schockgefrieren und langsames Auftauen fusionierten multilaminare Liposomen und wurden mittels eines Extruders auf die gewünschte Größe eingestellt (50 nm, 100 nm, 200 nm oder 400 nm). Die so gewonnenen Liposomen wurden mit verschiedenen Mengen DDM, Triton X-100 oder CHAPS destabilisiert bzw. solubilisiert.

Zur Rekonstitution wurde gereinigtes Pdr5p in einem festgelegten Protein:Lipid-Verhältnis mit 2 mg destabilisierten Liposomen gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Detergenz wurde durch mehrfache Addition von SM-2 Biobeads entfernt, die durch viermaliges Waschen mit Methanol, viermaliges Waschen mit Wasser und zweimaliges Waschen mit Rekonstitutionspuffer vorbereitet wurden. Das Detergenz adsorbierte annähernd quantitativ an die SM-2 Biobeads innerhalb von 3 – 4 Stunden (bei einmaliger Benutzung von 240 mg SM-2 Biobeads) oder ÜN (viermalige, einstündige Inkubation mit jeweils 40 mg SM-2 Biobeads und abschließende ÜN-Inkubation) entfernt und die Proteoliposomen

durch Ultrazentrifugation (300000 x g, 45 min, 4°C) sedimentiert und in Rekonstitutionspuffer mit Hilfe einer 26G-Kanüle resuspendiert.

Die Proteinausbeute wurde bestimmt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten der Rekonstitution jeweils 5% des Gesamtansatzes abgenommen und in einer SDS-PAGE analysiert wurden. Der Verlust an Lipiden konnte anhand des fluoreszenzmarkierten PE-Derivats (NBD-PE) verfolgt werden. Die NBD-PE-Fluoreszenz wurde mittels eines Fluoreszenzspektrometers bei einer Anregungswellenlänge von 468 nm und einer Emissionswellenlänge von 540 nm gemessen. Die Spaltbreiten für das anregende und emittierte Licht wurden auf 4 nm gesetzt. Der Hintergrund wurde mit Hilfe identisch behandelter, aber unmarkierter Liposomen bestimmt und abgezogen.

3.6.8 Saccharosegradient Dichtezentrifugation mit Proteoliposomen

Nach erfolgter Rekonstitution wurde das relative Laufverhalten von Lipiden und Pdr5p in einem Saccharose Dichtegradienten untersucht, um effiziente Inkorporation von Pdr5p in Liposomen zu analysieren (148). Dazu wurden Proteoliposomen (2 - 15 µg Protein) mit Rekonstitutionspuffer-Glyzerin (50 mM Hepes pH 7.2, 50 mM NaCl) auf ein Volumen von 200 µl verdünnt und mit einem identischen Volumen von 60% w/v Saccharose (in Rekonstitutionspuffer-Glyzerin) gemischt. Diese Suspension wurde mit jeweils 800 µl von 20%, 10%, 5% und 0% w/v Saccharose (in Rekonstitutionspuffer-Glyzerin) überschichtet. Der Gradient wurde bis zum Erreichen eines Sedimentationsgleichgewichts zentrifugiert (150000 x g, 8 - 10 h, 4°C). Im Anschluss wurde der Gradient durch vorsichtiges Abnehmen von 500 µl Portionen (von geringer zu hoher Dichte) fraktioniert. Jeweils 100 µl dieser Fraktionen wurden durch TCA gefällt (wie in 3.5.4 beschrieben), in Probenpuffer aufgenommen und mittels Immuno-Blot auf ihren Pdr5p-Gehalt untersucht. Die Lipidverteilung im Dichtegradienten wurde anhand des NBD-PE Gehaltes in den restlichen 400 µl untersucht. Die Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers wurden wie in 3.6.7 gewählt.

3.6.9 Bestimmung des passiven *Flip-Flop* von C6 NBD-PE

2 mg/ml unmarkierte Proteoliposomen oder leere Liposomen mit identischer Lipid-Zusammensetzung in Rekonstitutionspuffer (50 mM Hepes pH 7.2, 50 mM

NaCl, 5% w/v Glycerin) wurden für 30 min auf Eis mit 0.15 mol% Hexanoyl-(NBD-hexanoyl)-PE (C6 NBD-PE) aus einer 1 mM Stocklösung in Ethanol inkubiert, um die Inkorporation des markierten, kurzkettigen Phospholipid-Analogs ins äußere Blatt der Liposomen-Lipiddoppelschicht zu ermöglichen (149). Die Ethanolkonzentration in diesem Inkubationsschritt überschritt niemals 0.2% (v/v). Die passive Translokation vom äußeren zum inneren Blatt der Liposomen-Lipiddoppelschicht („*flip*“) wurde durch Inkubation der Liposomen bei 30°C gestartet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl Proben entnommen und mit 900 µl Rekonstitutionspuffer in einer rührbaren Fluoreszenzküvette gemischt. Die Transmembranverteilung von C6 NBD-PE wurde anhand der Reduktion durch 10 mM Natriumdithionit bei 25°C bestimmt. Fluoreszenzmarkierte Lipide im äußeren Blatt der Lipiddoppelschicht sind für Natriumdithionit zugänglich und verlieren innerhalb von 3 Minuten durch die resultierende Reduktion des Fluorophors ihre Fluoreszenz. Die markierten Lipide im inneren Blatt der Lipiddoppelschicht sind für Natriumdithionit nicht zugänglich und dadurch vor der Reduktion durch Natriumdithionit geschützt.

$$flip[\%] = [1 - (F_{180} / F_0)] \cdot 100$$

Gleichung 5

Bildet man das Verhältnis zwischen dem Fluoreszenzsignal gemessen nach drei Minuten nach der Zugabe von Natriumdithionit (F_{180}) durch das Fluoreszenzsignal vor der Zugabe (F_0), so erhält man den Anteil der C6 NBD-PE-Moleküle im inneren Blatt der Liposomen ($flip[\%]$), die also durch eine Flip-Bewegung die Seite der Membran gewechselt haben (Gleichung 5). Die Fluoreszenz wurde in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen mit Einstellungen wie in 3.6.7.

3.6.10 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie mit Proteoliposomen

Unterschiedliche Präparationen von Proteoliposomen wurden zwischen zwei dünne Kupferplättchen platziert und in flüssigem Ethan schockgefroren (150). Die Proben wurden in einer Gefrierbrucheinheit (400T Balzers) präpariert und mit Platin/Kohlenstoff in einem Winkel von 45° bedampft. Im Anschluss wurde reiner Kohlenstoff in einem Winkel von 90° aufgedampft. Die Proben wurden von

organischen Bestandteilen mit Chromschwefelsäure gereinigt. Die erhaltenen Proben wurden mit einem Philips EM208S Elektronenmikroskop analysiert.

3.6.11 CD-Spektroskopische Untersuchungen von Pdr5p

In Detergenz solubilisiertes und gereinigtes N14His-Pdr5p wurde zur Bestimmung von sekundären Strukturelementen mittels eines JASCO Spektralpolarimeters J715 im Spektralbereich von 180 nm – 240 nm vermessen. Für die Messungen wurde eine Sensitivität von 10 mdeg, eine Auflösung von 0.1 nm, eine Reaktionszeit von 4 s und eine Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min gewählt. Um das Rauschen des Messsignals zu minimieren, wurden von jeder Probe zehn Spektren aufgenommen und gemittelt. Der für die jeweilige Messung verwendete Puffer wurde vor jeder Messreihe einzeln aufgenommen und nachträglich von den Spektren der proteinhaltigen Proben subtrahiert. Die vom Spektralpolarimeter ausgegebene Elliptizität Θ wurde unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes und der verwendeten Konzentration auf die Größe Θ_{MRW} normiert (Gleichung 6).

$$\Theta_{MRW} = \frac{MRW \cdot \Theta}{10 \cdot d \cdot c} \quad \text{mit} \quad MRW = \frac{MW}{\text{Anzahl AS} - 1}$$

Gleichung 6

MW entspricht dem Molekulargewicht von N14His-Pdr5p (173 116 Da), d entspricht der Schichtdicke der verwendeten Messzelle (0.1 cm), c entspricht der Proteinkonzentration in g/ml (0.0002), und Θ entspricht der gemessenen Elliptizität in deg. 14His-Pdr5p besteht aus 1533 Aminosäuren.

3.6.12 ATP-Agarose Bindungsstudien mit isoliertem Pdr5p

ATP-Agarose oder ADP-Agarose (C-8 gekoppelt; Sigma) wurde zunächst dreimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Hefe-Puffer A (+0.05% DDM oder +1% Digitonin) gewaschen. Die gewaschene ATP-/ADP-Agarose (≈ 400 nmol gekoppelte Nukleotide) wurde in Anwesenheit von 5 mM MgCl₂ (oder 5 mM EDTA) mit gereinigtem und dialysiertem N14His-Pdr5p (20 - 60 μ g; ≈ 120 - 350 nmol Pdr5p) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, um die Nukleotidbindung zu erlauben. Die ATP-Agarose wurde in 2 oder 4 Schritten mit insgesamt 10 Säulenvolumen Hefe-Puffer A

(3.6.1;+DDM oder +Digitonin) gewaschen, bevor spezifisch gebundene Proteine mit 10 mM freien ATP bzw. ADP in Hefe-Puffer A (+Detergenz) eluiert wurden. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.6.13 Bestimmung der Pdr5p-vermittelten ATPase-Aktivität

Puffer, Lösungen, Zusammensetzung

Malachitgrün Stammlösung	Malachitgrün	0.122% (w/v)
	Schwefelsäure	20% (v/v)
Ammoniummolybdat Lösung	Ammoniummolybdat Tetrahydrat	7.5% (w/v)
Tween-20 Lösung	Tween-20	11% (w/v)
Färbelösung (<i>stets frisch</i>)	Malachitgrün Stammlösung	1 ml
	Ammoniummolybdat Lösung	250 µl
	Tween-20 Lösung	20 µl
Stopplösung	Schwefelsäure	40 mM
Plasmamembranpuffer*	MES-Tris oder Tris-Glycin	300 mM
	pH-Werte 4 - 11	
	Hepes-NaOH pH 7.0	20 mM
	Azid	10 mM
	Kaliumnitrat	50 mM
	Ammoniummolybdat	200 µM
ATP/ Mg²⁺	MgCl ₂	25 mM
	ATP	20 mM

* entspricht den Endkonzentrationen nach Starten der ATPase-Reaktion

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von Pdr5p erfolgte auf Basis des im Zuge der Reaktion freigesetzten anorganischen Phosphats. Die Reaktion wurde nach unterschiedlichen Zeiten mit verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Das freigesetzte anorganische Phosphat wurde in Färbelösung komplexiert und photometrisch bestimmt.

Die ATPase-Aktivität wurde in Mikrotiterplatten in einem 25 µl Probenvolumen bestimmt. 20 µl des Probenvolumen enthielten ein geeignetes Puffersystem, gereinigtes Pdr5p in bekannter Konzentration (zwischen 10 µg/ml und 500 µg/ml) oder Plasmamembran-Präparationen (20 µg/ml Endkonzentration) und sofern erwünscht potentielle Substrate und Inhibitoren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl ATP/Mg²⁺ gestartet. Als Puffersystem für gereinigtes Pdr5p diente Hefe-Puffer A (3.6.1;+0.05% DDM) und für die Plasmamembran-Präparation der Plasmamembranpuffer. Die Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität der Plasmamembran-Präparationen wurde bestimmt als die Differenz zwischen der ATPase-Aktivität in Abwesenheit von Oligomycin und der ATPase-Aktivität in

Anwesenheit von 20 µg/ml Oligomycin (Endkonzentration in 25 µl Probenvolumen). Die Reaktion wurde mit 175 µl eiskalter Stoplösung nach einer gewünschten Zeit beendet. Nach Zugabe von 50 µl Färbelösung, gründlichem Mischen, 20-minütiger Inkubation bei RT und Messen der Absorption bei 620 nm konnte die Menge an freigesetztem Phosphat anhand einer Standardreihe mit Natriumphosphat (0 – 5 nmol anorganisches Phosphat) bestimmt werden. Kontrollansätze ohne Protein oder mit EDTA anstelle von Mg²⁺ dienten dazu, das Hintergrundsignal durch Phosphatkontamination im Puffer, ATP-Autohydrolyse und/oder Lichtstreuung zu bestimmen.

Die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der ATP Konzentration wurde anhand der Michaelis-Menten Gleichung ausgewertet (Gleichung 7).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_{ATP}}{K_m + c_{ATP}} \quad \text{bzw.} \quad k = \frac{k_{cat} \cdot c_{ATP}}{K_m + c_{ATP}}$$

Gleichung 7

Dabei steht v für die spezifische ATPase-Aktivität in $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ bei der verwendeten ATP Konzentration c_{ATP} in μM . K_m und v_{MAX} entsprechen der Michaelis-Menten Konstanten in μM und der spezifischen ATPase-Aktivität bei unendlicher ATP-Konzentration. k und k_{cat} beschreiben die Wechselzahl bzw. die Wechselzahl bei unendlicher ATP-Konzentration in s^{-1} .

4 Ergebnisse

4.1 Eine katalytische Dyade in ABC -Transportern?

Obwohl allgemeine Übereinstimmung darüber herrscht, dass die in ATP gespeicherte chemische Energie von ABC-Transportern genutzt wird, um mechanische Arbeit an den Transportsubstraten zu verrichten, ist der exakte Mechanismus, wie ATP gespalten wird und welche Aminosäuren direkt an der Hydrolyse beteiligt sind, noch völlig ungeklärt. Ausgehend von strukturellen und biochemischen Untersuchungen wurde im bakteriellen ABC-Transporter HlyB eine katalytische Dyade aus zwei konservierten Aminosäuren postuliert: dem Histidin des *H-loop* und dem Glutamat, das dem Walker B Motiv folgt (H662 und E631 in HlyB) (54). Um zu überprüfen, ob solch eine katalytische Dyade auch in den NBDs von anderen ABC-Transportern wirksam ist, und zur detaillierteren, biochemischen Analyse der Interaktion dieser Seitenketten, suchten wir ein geeignetes Modellsystem.

4.1.1 Auf der Suche nach einem Modellsystem – Sequenzanalysen

Sequenzanalysen bilden das Fundament bei der Identifizierung mechanistisch bedeutender Reste. Hochkonservierte Sequenzmotive sind fast ausnahmslos bedeutend für die Struktur und/oder Funktion eines Proteins. Bemerkenswerterweise können allerdings auch Abweichungen von Konsensussequenzen zum Verständnis eines Proteins beitragen.

Wie kann man vor diesem Hintergrund also die Existenz einer katalytischen Dyade in ABC-Transportern nachweisen und auf die relative Bedeutung des konservierten Histidins und Glutamats in der Katalyse schließen? Für detaillierte Struktur-Funktionsuntersuchungen dieser Art bietet sich eine Analyse mittels gerichteter Mutagenese an. Die Mutation einzelner oder mehrerer konservierter Aminosäuren führt – vorausgesetzt, man wählt die richtigen Aminosäuren - zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Doch was bedeutet dieser Aktivitätsverlust? Sind die gewählten Aminosäuren tatsächlich direkt an der Katalyse beteiligt oder hat die Mutation einen globaleren Effekt auf die Faltung des Proteins? Um diesem Dilemma

entgegen zu treten, wurde hier ein „*inverser Mutageneseansatz*“ gewählt: Zunächst wurde eine natürlich vorkommende NBD gesucht, welche die zu studierenden und katalytisch relevanten Reste *nicht* besitzt. Wenn durch das Einführen der Konsensus-Aminosäuren eine enzymatische Aktivität (in diesem Fall also eine ATPase-Aktivität) messbar wird, ist eine direkte Beteiligung dieser Reste an der Katalyse anzunehmen und ein globaler, unspezifischer Effekt auf die Proteinfaltung äußerst unwahrscheinlich.

Der erste Schritt war also die Identifizierung einer NBD, welche weder das postulierte katalytische Carboxylat (das Glutamat nach dem Walker B Motiv), noch das Histidin des *H-loop*, das so genannte „Achsel-Histidin“, enthält. Zu diesem Zweck wurde ein *Sequenz-alignment* mit einigen bakteriellen und humanen ABC-Transportern durchgeführt (Abbildung 11).

	Walker A		C-loop	Walker B	H-loop
		Q-loop		D-loop	
TAP1	-----GPN GS GKST-----	Q-----	LSGGQ--	VLILDDATSALD--	Q-----
TAP2	-----GPN GS GKST-----	Q-----	LAAGQ--	VLILDEATSALD--	H-----
CFTR (N)	-----GSTGAGK TS -----	Q-----	LSGGQ--	LYLLD SP FGYLD--	S-----
CFTR (C)	-----GRTG SG KST-----	Q-----	LSHG H ---	ILLLDEPSAHL D ---	H-----
MRP1 (N)	-----GQV GC GKSS-----	Q-----	LSGGQ--	IYLFDDPLSAV D ---	H-----
MRP1 (C)	-----GRTGAGK SS -----	Q-----	LSVGQ--	ILVLDEATAAV D ---	H-----
MalK	-----GPS GC GKST-----	Q-----	LSGGQ--	VFLLEDEPLSNL D ---	H-----
MJ0796	-----GPS GS GKST-----	Q-----	LSGGQ--	IILADEPTGAL D ---	H-----
HlyB	-----GR SG GKST-----	Q-----	LSGGQ--	ILIFDEATSAL D ---	H-----

Abbildung 11 Sequenz-*alignment* einiger ABC-Transporter

Das Sequenz-*alignment* wurde mit Hilfe des *ClustalW Webinterface* (www.ebu.ac.uk/clustalw) erstellt und zeigt Auszüge aus den NBD-Sequenzen einiger humaner ABC-Transporter und von drei bakteriellen Transportern, für welche Kristallstrukturen im dimeren, ATP-gebundenen Zustand vorliegen. Bei *full-size* Transportern wird in Klammern angegeben, welche Sequenz der zwei NBDs verwendet wurde (N für N-terminal, C für C-terminal). Die verschiedenen Farben kennzeichnen die bekanntesten, hochkonservierten Sequenzen in ABC-Transportern. Die Anzahl der Bindestriche kennzeichnet den Abstand der Sequenzmotive in der Primärsequenz.

Das *Alignment* zeigt ein regelmäßiges Muster, nach die ausgewählten humanen Motordomänen von den klassischen Sequenzmotiven abweichen. Im humanen TAP1 und in den N-terminalen Domänen von CFTR und MRP1 ist das konservierte Glutamat, das putative katalytische Carboxylat, durch ein Aspartat ersetzt (D688 in TAP1, D573 in CFTR und D793 in MRP1). Zusätzlich ist das Histidin

des H-loop durch Glutamin in TAP1 (Q701) und durch Serin in CFTR (S604) ersetzt, während MRP1 das Histidin besitzt (H827). Im Gegensatz dazu stimmen humanes TAP2 sowie die C-terminalen Motordomänen von CFTR und MRP1 bei nur einer bemerkenswerten Ausnahme mit den Konsensussequenzen überein. Lediglich der C-loop von TAP2 sowie der C-terminalen NBDs von MRP1 und CFTR, die mit der ATP-Bindungstasche der jeweils anderen NBD (also der NBD von TAP1 bzw. der N-terminalen NBDs in MRP1 und CFTR) physikalisch interagieren, zeigen Abweichungen von der Konsensussequenz. Anstelle der konservierten LSGGQ-Sequenz findet sich hier in TAP2 LAAGQ, in der C-terminalen NBD von MRP1 LSVGQ und von CFTR LSHGQ.

Zusammenfassend legt die Abwesenheit katalytisch wichtiger Aminosäuren sowie der degenerierte C-loop in der gegenüberliegenden NBD die Vermutung nahe, dass TAP1 sowie die N-terminalen NBDs von MRP1 und CFTR wenn überhaupt nur eine extrem geringe ATPase-Aktivität besitzen. Eine isolierte TAP1-NBD könnte somit ein ideales Modellsystem darstellen, um durch *inverse Mutagenese* die relative Bedeutung des Histidins des H-loop und des Glutamats C-terminal der Walker B Sequenz auf die ATP Hydrolyse zu bestimmen. Zunächst wurde allerdings ein strukturelles Modell eines ATP-induzierten, zusammengesetzten Heterodimers aus TAP1 und TAP2 erstellt.

4.1.2 Ein Strukturmodell des ATP-induzierten Heterodimers aus TAP1 und TAP2

Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Studien waren bereits drei Kristallstrukturen isolierter, dimerer Motordomänen mit gebundenem ATP verfügbar. Von diesen zeigt die NBD des Toxintransporters HlyB aus *E. coli* das höchste Maß an Sequenzhomologie zu TAP (73% für TAP1 und 76% für TAP2 bei einer Sequenzidentität von 39% für TAP1 und 43% für TAP2). Im Gegensatz dazu ist die Sequenzidentität zwischen TAP und MJ0796 bzw. Malk (aus *E. coli*) lediglich zwischen 25 und 30%. Aus diesem Grund wurde ein strukturelles Modell eines ATP-induzierten, zusammengesetzten Heterodimers aus TAP1 und TAP2 auf der Grundlage der Kristallstruktur des ATP/Mg²⁺-gebundenen Homodimers von HlyB erzeugt (Abbildung 12) (54).

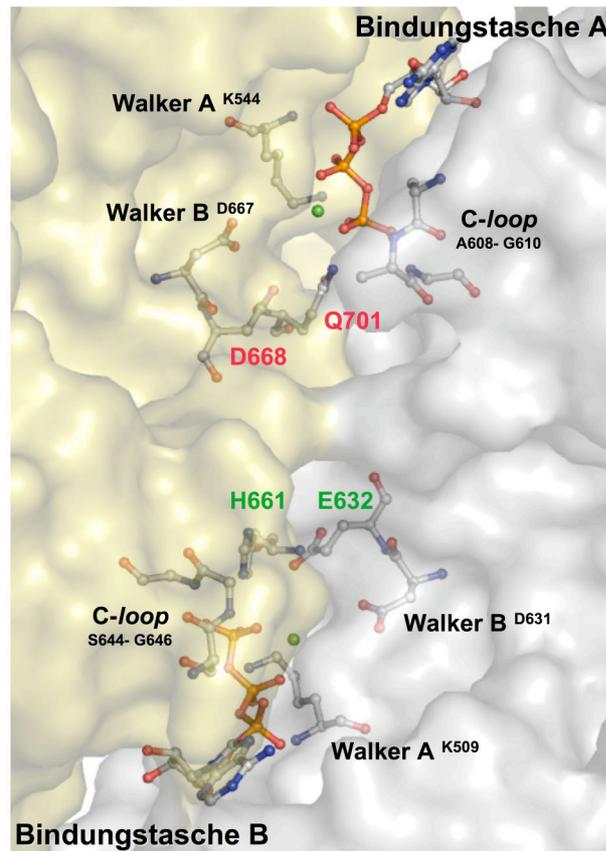


Abbildung 12 Strukturelles Modell des ATP/Mg²⁺ induzierten TAP1-NBD/TAP2-NBD Dimers

Das Modell wurde anhand des ATP/Mg²⁺ gebundenen HlyB Dimers (PDB Datenbank Eintrag 1XEF) mit dem *SWISS Model web server* (swissmodel.expasy.org) erstellt (54). Die TAP1-NBD (gelb) und die TAP2-NBD (grau) sind transparent dargestellt. Für die an der Schnittstelle der NBDs gebundenen ATP-Moleküle und Mg²⁺ Ionen wurde eine Kugel-Stab Darstellung gewählt. Auch für katalytisch wichtige Aminosäuren wurde eine Kugel-Stab Darstellung gewählt. Der Einfachheit halber sind lediglich die hochkonservierten Lysine der Walker A Sequenz, die Aspartate der Walker B Motive und der verkürzte C-loop abgebildet. Die degenerierten und funktional wichtigen Aminosäuren D668 und Q701 von TAP1 sind rot, die entsprechenden Reste von TAP2 grün beschriftet.

Wie aufgrund des Sequenz-*alignments* zu erwarten, zeigt das Strukturmodell eine Asymmetrie der ATP-Bindungstaschen in TAP. Die ATP Bindungstasche B setzt sich aus den Walker A und Walker B Motiven, dem postulierten katalytischen Glutamat (E632) und dem Achsnagel-Histidin (H668) vom TAP2 sowie dem C-loop aus TAP1 zusammen. Die Bindungstasche A beinhaltet die Walker A und Walker B Sequenzen aus TAP1 sowie den degenerierten C-loop aus TAP2 (LAAGQ). Zusätzlich sind in der Bindungstasche A die katalytisch wichtigen Reste Glutamat und Histidin durch ein Aspartat bzw. ein Glutamin ersetzt. Während also die ATP-Bindungstasche B die klassische Anordnung von katalytisch relevanten Aminosäuren

besitzt, weicht die ATP-Bindungstasche A in diesen Aminosäuren von der Konsensussequenz ab. Zusätzlich verdeutlicht Abbildung 12 eine zentrale Hürde bei der Struktur-Funktionsanalyse durch Mutagenese in einem asymmetrischen Dimer aus TAP1 und TAP2: Die Einführung der Konsensus-Aminosäuren in der TAP1-NBD kann Seiteneffekte auf die katalytische Effizienz der TAP2-NBD haben, was wiederum die Interpretation der gewonnenen Daten deutlich erschweren würde. Um solche Komplikationen auszuschließen, wurde die TAP1-NBD kloniert, gereinigt und unter Bedingungen analysiert, die eine Homodimerisierung der isolierten TAP1-NBD erlauben. Durch das schrittweise Einführen der Konsensus-Aminosäuren (des Achsnagel-Histidins und des postulierten katalytischen Carboxylats) konnte die Funktion dieser Aminosäuren bei der Hydrolyse von ATP erforscht werden.

4.1.3 Reinigung der humanen TAP1-NBD

Die Wildtyp TAP1-NBD, ihre Einzelmutanten D668E und Q701H sowie die Doppelmutante D668E/Q701H wurden wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben generiert, in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und mittels IMAC und Gelfiltration gereinigt. Alle Varianten konnten in zwei Schritten bis zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung 13). Die Ausbeute der Proteine lag bei ca. 50 mg pro 1 L Kulturvolumen. Das Protein konnte ohne detektierbare Aggregation bis auf 10 mg/ml konzentriert werden.

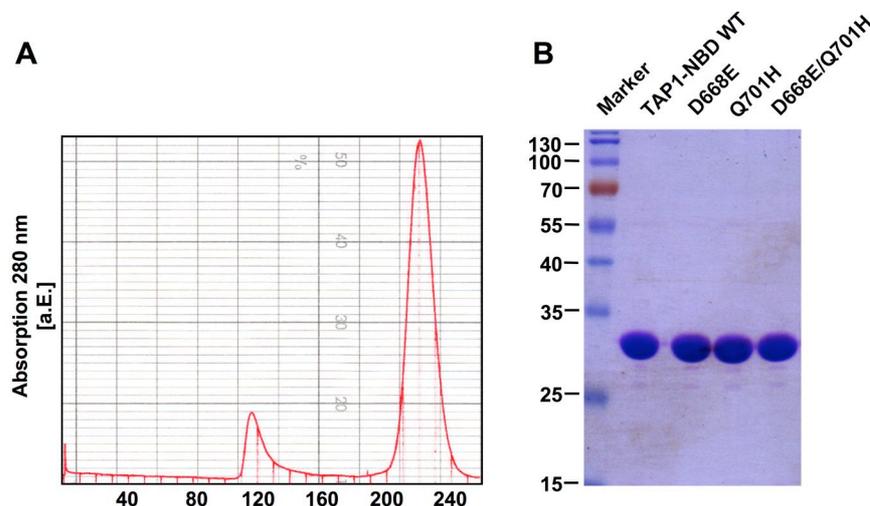


Abbildung 13 Reinigung der TAP1-NBD und seiner Mutanten

A) Die Abbildung zeigt das Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufs der Wildtyp TAP1-NBD auf einer Superdex 200 HR26/60 Säule (120 ml Ausschlussvolumen) in TAP-Puffer B (3.4.2) (a.E. = arbiträre Einheit). **B)** Je 20 µg gereinigter, monomerer TAP1-NBD Varianten wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Molekülmassen der Markerproteine sind in kDa angegeben (WT = Wildtyp).

In Gelfiltrationsexperimenten eluierten alle Proteine als monomere Spezies (220 ml Elutionsvolumen auf einer Superdex 200 HR26/60 Säule) und besaßen ein apparentes Molekulargewicht von 29 kDa. Überraschenderweise konnte in Anwesenheit von 1 mM ATP bei der Gelfiltration keine dimere Form der TAP1-NBD beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf eine sehr geringe Affinität der TAP1-NBDs zueinander. Um eine mögliche, niedrig affine und transiente Homodimerisierung der TAP1-NBD besser auflösen zu können, wurden fluoreszierende Nukleotidanaloga eingesetzt. Jeweils 2 μM TNP-ADP oder TNP-ATP wurden mit der TAP1-NBD titriert (Abbildung 14). Die Fluoreszenz des umgebungssensitiven Fluorophors ändert sich bei der Bindung an das Protein und wurde mittels eines Fluoreszenzspektrometers aufgezeichnet (57). Trägt man die Fluoreszenzänderung gegen die Proteinkonzentration auf, so erhält man für TNP-ADP einen hyperbolischen Kurvenverlauf. Im Kontrast dazu lässt sich für TNP-ATP ein deutlich sigmoidaler Kurvenverlauf beobachten. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die TAP1-NBD nukleotidabhängig oligomerisiert. Im Analogieschluss zu anderen isolierten NBDs erscheint eine ATP-abhängige Dimerisierung am wahrscheinlichsten.

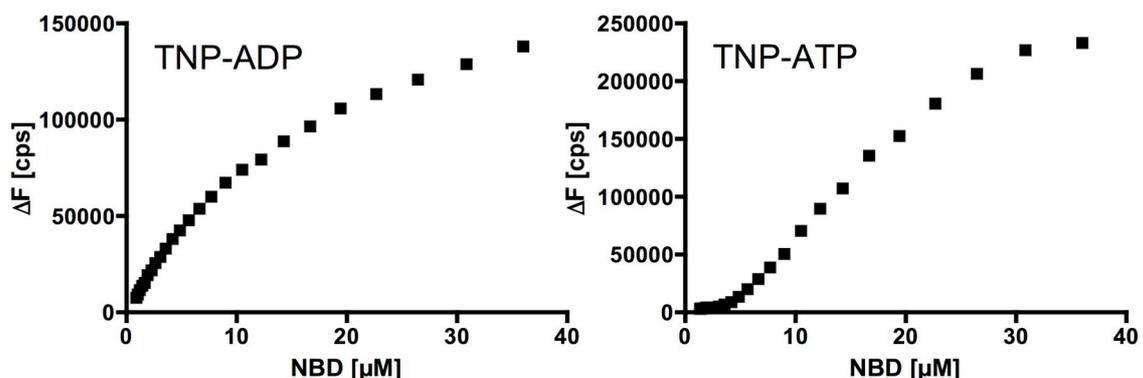


Abbildung 14 Bestimmung der Nukleotid-induzierten Homodimerisierung der TAP1-NBD

2 μM TNP-ADP oder TNP-ATP wurden mit Wildtyp TAP1-NBD titriert und die resultierende Fluoreszenzintensität Gruppe in einem Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Aufgetragen sind die Rohdaten ohne Korrektur für Streulicht.

Da die isolierte TAP1-NBD in Abwesenheit der TAP TMDs und der TAP2-NBD offenbar die Fähigkeit besitzt, transiente Homodimere zu bilden, kann mit dem Satz gereinigter, monodisperser Mutanten der TAP1-NBD der individuelle Anteil des

postulierten katalytischen Glutamats (D668E) und des Achsnagel-Histidins (Q701H) sowie ein möglicher synergistischer Effekt zwischen beiden Aminosäuren (D668E/Q701H) in einer katalytischen Dyade an der Hydrolyse von ATP direkt bestimmt werden.

4.1.4 ATPase-Aktivität der TAP1-NBD

Die ATPase-Aktivität der TAP1-NBD und der erzeugten Mutanten wurde bei pH 8 und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml bestimmt. Die isolierte Wildtyp TAP1-NBD zeigte keine signifikante ATPase-Aktivität (Abbildung 15, gefüllte Dreiecke). Im Gegensatz dazu zeigte die Doppelmutante (D668E/Q701H) eine deutliche ATPase-Aktivität (Abbildung 15, gefüllte Quadrate). Vor dem Hintergrund, dass diese Doppelmutante beide Aminosäuren enthält, die in verschiedenen Studien als essentiell für die Aktivität beschrieben wurden, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Dieses Ergebnis belegt aber, dass die isolierte, mutierte TAP1-NBD in Abwesenheit TAP2-NBD und beider TAP TMDs ATP hydrolysieren kann.

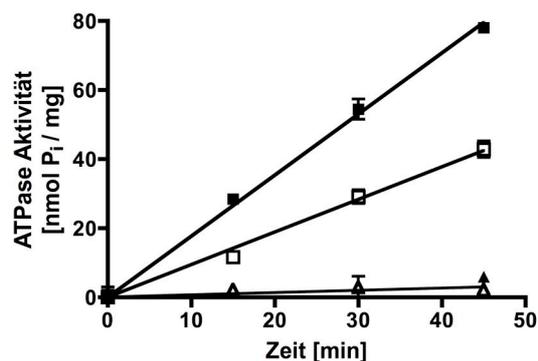


Abbildung 15 Zeit-abhängige ATPase-Aktivität der TAP1-NBD

Die ATPase-Aktivitäten der Wildtyp TAP1-NBD (offene Dreiecke), der D668E-Mutante (geschlossene Dreiecke), der Q701H-Mutante (offene Quadrate) und der D668E/Q701H-Mutante (geschlossene Quadrate) wurden bei pH 8.0 ein Proteinkonzentration von 1 mg/ml und $30 \pm 2^\circ\text{C}$ bestimmt. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken stellt die Abweichungen der Messungen vom Mittelwert dar. Die ATP-Konzentration im Assay betrug 2 mM, die MgCl_2 Konzentration 5 mM.

Doch viel wichtiger sind die Ergebnisse der beiden Einzelmutanten. Die Einzelmutante (D668E) mit dem postulierten katalytischen Glutamat zeigte keine signifikante ATPase-Aktivität (Abbildung 15, offene Dreiecke), während die Einführung des Achsnagel-Histidins (Q701H) eine ATPase-aktive NBD erzeugte (Abbildung 15, offene Quadrate). Offensichtlich erlaubt die Einführung der *beiden*

Konsensus-Aminosäuren an den Positionen 668 und 701 eine erhöhte ATP-Hydrolyse Rate (Abbildung 15, geschlossene Quadrate), während das Histidin an Position 701 essentiell und bereits ausreichend ist, um eine substantielle ATPase-Aktivität in der TAP1-NBD zu ermöglichen.

Während bei der Einführung des Konsensus-Glutamat (D668E) in die Wildtyp TAP1-NBD keine ATPase-Aktivität messbar war, bewirkte seine Einführung im Hintergrund des Achsnagel-Histidins einen signifikanten Aktivitätszuwachs (Abbildung 15, offene und geschlossene Quadrate). Nach dem Konzept von Mildvan ist ein solcher nicht-additiver Effekt von Mutanten ein Hinweis auf eine kooperative Interaktion der beiden Reste, in diesem Fall also zwischen dem eingeführten Histidin 701 und dem Glutamat 668 (151).

Um den Aktivitätsunterschied zwischen den beiden aktiven TAP1-NBD-Mutanten besser zu verstehen, wurden die kinetischen Parameter von D668E/Q701H und von Q701H bestimmt.

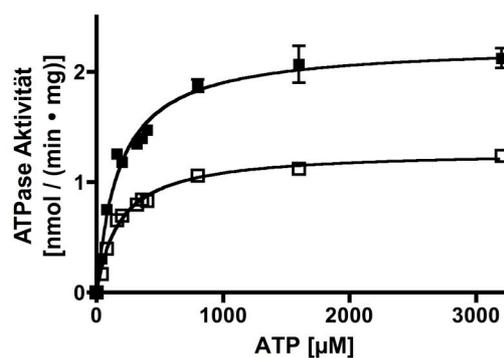


Abbildung 16 Michaelis-Menten Kinetik der ATPase-aktiven TAP1-NBD-Mutanten

Die beiden ATPase-aktiven Mutanten der TAP1-NBD, die Doppelmutante D668E/Q701H (geschlossene Quadrate) und die Einzelmutante Q701H (offene Quadrate) wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen ATP bei $30 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml untersucht. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken stellt die Abweichungen der Messungen vom Mittelwert dar. Die gewonnenen Daten wurden anhand der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 7) ausgewertet. Die ermittelten kinetischen Parameter betragen: $K_m = 174 \pm 17 \mu\text{M}$ (Q701H) und $180 \pm 21 \mu\text{M}$ (D668E/Q701H) und $v_{\text{max}} = 1.26 \pm 0.04 \text{ nmol P}_i \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ (Q701H) und $2.24 \pm 0.08 \text{ nmol P}_i \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ (D668E/Q701H).

Die beiden aktiven Mutanten der TAP1-NBD gehorchten der Michaelis-Menten Kinetik mit K_m Werten von $180 \pm 21 \mu\text{M}$ (D668E/Q701H) und $174 \pm 17 \mu\text{M}$ (Q701H) und v_{max} Werten von $2.24 \pm 0.08 \text{ nmol P}_i \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ (D668E/Q701H) und $1.26 \pm 0.04 \text{ nmol P}_i \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ (Q701H) (Gleichung 7). Diese v_{max} Werte entsprechen

Wechselzahlen (k_{cat} Werten) von 0.06 ATP/min für die aktivere Doppelmutante und 0.03 ATP min⁻¹ für die weniger aktive Einzelmutante (Q701H). Diese Werte sind vergleichbar mit isolierten NBDs anderer ABC-Transporter (152), allerdings viel geringer als die basale und stimulierte ATPase-Aktivität zahlreicher voll-assemblierter ABC-Transporter, welche zwischen 1.5 ATP min⁻¹ (PrtD (153)) und 4.5 ATP s⁻¹ (P-Glykoprotein) (154)) liegt. In isolierten NBDs liegen die beschriebenen Wechselzahlen zwischen 5·10⁻⁵ ATP s⁻¹ (MRP1 (155-157)) und 26 ATP min⁻¹ (HisP (158)). Kristallstrukturen unterschiedlicher NBDs – einschließlich der N-terminalen MRP1-NBD (155) – geben trotz dieser enormen Unterschiede in der Aktivität keinen Hinweis auf größere Änderungen des molekularen Mechanismus der ATP Hydrolyse. Während das Glutamat in der TAP1-NBD Doppelmutante (D668E/Q701H) eine höhere katalytische Effizienz bewirkt, ist der K_m Wert der Q701H und der Doppelmutante identisch.

Diese Daten legen nahe, dass das Achsnagel-Histidin tatsächlich der katalytisch relevante und essentielle Rest ist, während das Glutamat nicht das katalytische Carboxylat darstellt. Der beobachtete, kooperative Effekt deutet auf eine direkte Interaktion der beiden Aminosäuren hin. Dieses Szenario würde also eine katalytische Dyade als das Wirkprinzip in ABC Motordomänen beschreiben.

Doch wurde mit diesen Messungen der *steady-state* ATPase-Aktivität tatsächlich der Mechanismus von ABC Motordomänen betrachtet? Das übereinstimmende Modell eines katalytischen Zyklus von isolierten NBDs umfasst die Bindung von ATP, eine Dimerisierung der NBDs, die Hydrolyse von ATP, den Zerfall des NBD Dimers und die Freisetzung der Hydrolyseprodukte. Um zu zeigen, dass die unterschiedlichen katalytischen Effizienzen der TAP1-NBD-Mutanten tatsächlich aus der direkten Beteiligung der untersuchten Reste an der ATP-Hydrolyse resultieren, muss ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede durch eine veränderte Nukleotidbindung oder Dimerisierung der NBD verantwortet werden.

4.1.5 Bestimmung der Affinität von Nukleotiden zur TAP1-NBD

Die Affinität der TAP1-NBD und seiner Mutanten zu Nukleotiden wurde mit Hilfe von TNP-ADP bestimmt. Dazu musste zunächst durch unabhängige Kontrollexperimente das Hintergrundsignal von ungebundenem TNP-ADP in Puffer bestimmt werden. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der TNP-ADP

Konzentration wurde bestimmt und lässt sich mit Gleichung 2 beschreiben. Die dabei ermittelten Parameter sind in der Abbildungsbeschreibung von Abbildung 17 zusammengefasst.

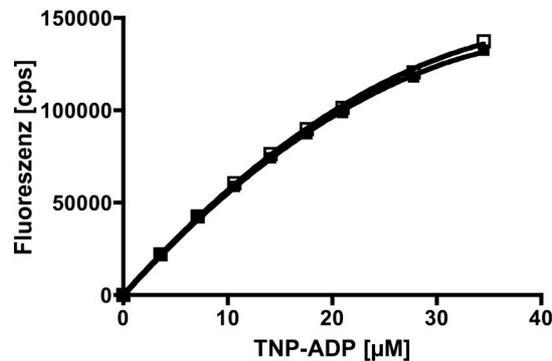


Abbildung 17 Fluoreszenz von TNP-ADP in Puffer mit und ohne 5 mM MgCl_2

TAP-Puffer B wurde in Anwesenheit (geschlossene Quadrate) und Abwesenheit (offene Quadrate) von 5 mM MgCl_2 mit TNP-ADP titriert und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Messwerte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die gewonnenen Daten wurden anhand der Gleichung 2 ausgewertet. Die ermittelten Parameter betragen: $Q_1 = 6253 \pm 61.4 \text{ cps} \cdot (\mu\text{M})^{-1}$ und $Q_2 = -70.66 \pm 2.167 \text{ cps} \cdot (\mu\text{M}^2)^{-1}$ in Anwesenheit von MgCl_2 und $Q_1 = 6358 \pm 75.6 \text{ cps} \cdot (\mu\text{M})^{-1}$ und $Q_2 = -70.00 \pm 2.737 \text{ cps} \cdot (\mu\text{M}^2)^{-1}$ in Abwesenheit von MgCl_2 .

Im zweiten Schritt wurde zunächst die Affinität der verschiedenen Varianten der TAP1-NBD zu TNP-ADP bestimmt (in An- und Abwesenheit von 5 mM MgCl_2 als Kofaktor). Dazu wurde die TAP1-NBD (5 μM) mit ansteigender Konzentration von TNP-ADP titriert. In Abbildung 18 wird exemplarisch die Bestimmung der Affinität von TNP-ADP zum TAP1-NBD Wildtyp gezeigt.

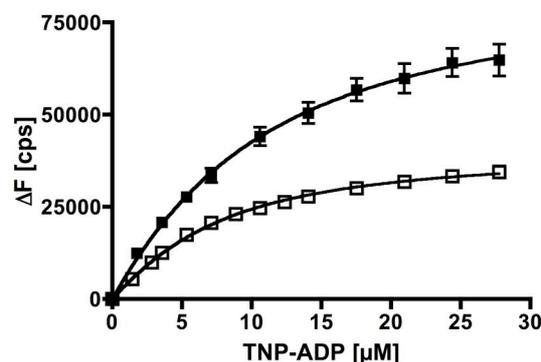


Abbildung 18 Bestimmung der Affinität der Wildtyp TAP1-NBD zu TNP-ADP

5 μM TAP1-NBD wurde in Anwesenheit (offene Quadrate) und Abwesenheit (geschlossene Quadrate) von 5 mM MgCl_2 mit TNP-ADP titriert. Die hintergrundbereinigte Fluoreszenzänderung wurde gegen die TNP-ADP Konzentration aufgetragen. Die gewonnenen Daten wurden anhand der Gleichung 3 ausgewertet. Der K_D Wert von TNP-ADP zur TAP1-NBD beträgt in Anwesenheit von MgCl_2 $4.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ und in Abwesenheit von MgCl_2 $7.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

Die Affinitäten von TNP-ADP unter den gegebenen Bedingungen und zu den verschiedenen Varianten der TAP1-NBD sind in Tabelle 4.1-A zusammengefasst.

TAP1-NBD-Variante	MgCl ₂	K _D [μM]
Wildtyp	+	4.7 ± 0.2
	-	7.9 ± 0.5
D668E	+	2.7 ± 0.9
	-	8.4 ± 1.3
Q701H	+	0.5 ± 0.1
	-	6.7 ± 0.7
D668E/Q701H	+	5.3 ± 0.3
	-	7.9 ± 3.1

Tabelle 4.1-A Affinitäten von TNP-ADP zu den TAP1-NBD-Varianten

Die Affinitäten von TNP-ADP zu den generierten TAP1-NBD-Mutanten wurden wie in Abbildung 18 bestimmt. Die Messwerte entstammen aus drei unabhängigen Messungen.

Die Affinität unmodifizierter und natürlich vorkommender Nukleotide zu den TAP1-NBD-Varianten konnte durch Konkurrenzexperimente ermittelt werden. TNP-ADP/TAP1-NBD Komplexe wurden mit ATP, ADP und AMP titriert und die Dissoziation der TNP-ADP/TAP1-NBD Komplexe mit Hilfe der abnehmenden Fluoreszenz verfolgt und quantifiziert. Das zügige Erreichen eines neuen stabilen Fluoreszenzwertes (in weniger als 5 s) während der Titration mit ATP oder ADP belegt, dass die Bindung von Nukleotiden für die Hydrolyse von ATP nicht ratenlimitierend ist. Exemplarisch werden zwei solcher Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der Affinität von ATP zur Wildtyp TAP1-NBD in Abbildung 19 gezeigt. Die gewonnenen Daten wurden anhand der Gleichung 4 unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration (5 μM) und der verwendeten Konzentration des TNP-ADP (10 μM) ausgewertet. Die so bestimmten Affinitäten der TAP1-NBD-Varianten zu den Nukleotiden ATP, ADP und AMP in An- und Abwesenheit von MgCl₂ sind in Tabelle 4.1-B zusammengefasst.

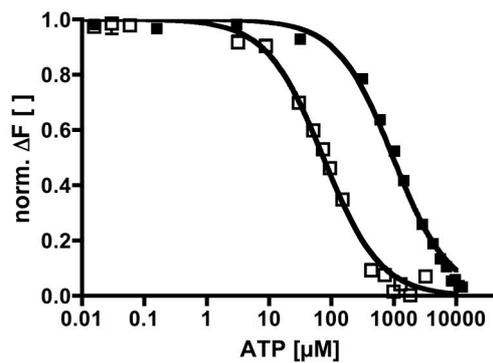


Abbildung 19 Bestimmung der Affinität von ATP zum TAP1-NBD Wildtyp

Die Affinität von ATP zur TAP1-NBD wurde durch Konkurrenzexperimente in Anwesenheit von 5 mM MgCl_2 (offene Quadrate) und Abwesenheit von 5 mM MgCl_2 (geschlossene Quadrate) bestimmt. Jeweils 5 μM TAP1-NBD wurde mit 10 μM TNP-ADP vorinkubiert und dann mit ATP titriert. Die gewonnenen Daten wurden anhand Gleichung 4 ausgewertet. Der abgeleitete K_D Wert für ATP an Wildtyp TAP1-NBD beträgt $22.9 \pm 1.2 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von MgCl_2 und $400.6 \pm 21.7 \mu\text{M}$ in Abwesenheit von MgCl_2 .

Keine der isolierten TAP1-NBD-Varianten zeigte eine Affinität zu AMP im niedrig-millimolaren Bereich, während ATP und ADP mit mikromolarer Affinität gebunden wurden. Dabei war die Affinität zu ADP stets größer als zu ATP. Besonders auffällig war die starke Abhängigkeit der Affinität vom Kofaktor MgCl_2 . Die Anwesenheit von MgCl_2 vermochte die Affinität im Falle der Q701H-Mutante sogar um einen Faktor von 120 zu erhöhen. Diese drastische Zunahme der Affinität impliziert eine durch den Kofaktor induzierte konformationelle Änderung der ABC Motordomäne, qualitativ vergleichbar mit Beobachtungen an der NBD von P-Glykoprotein (159).

Interessanterweise resultiert die Einführung des konservierten Glutamats im Hintergrund des konservierten Histidin (D668E/Q701H *versus* Q701H) zu einer Verringerung der Affinität zu ATP/Mg^{2+} , während die Einführung des konservierten Glutamats im Wildtyp Hintergrund (D668E *versus* Wildtyp) die Affinität erhöht. Dieser gegenläufige Trend ist ein deutliches Indiz für eine Interaktion zwischen den eingeführten Aminosäuren Histidin und Glutamat.

TAP1-NBD-Variante	Nukleotid	MgCl ₂	K _D [μM]
Wildtyp	ATP	+	22.9 ± 1.2
		-	400.6 ± 21.7
	ADP	+	3.3 ± 0.4
		-	121.9 ± 27.6
	AMP	+	>20000
		-	>20000
D668E	ATP	+	8.4 ± 0.3
		-	424.1 ± 21.8
	ADP	+	1.6 ± 0.1
		-	32.6 ± 5.4
	AMP	+	>20000
		-	>20000
Q701H	ATP	+	2.7 ± 0.3
		-	367 ± 34.9
	ADP	+	0.4 ± 0.1
		-	99.1 ± 9.9
	AMP	+	>20000
		-	>20000
D668E/Q701H	ATP	+	17.2 ± 2.2
		-	459.9 ± 38.9
	ADP	+	2.3 ± 0.2
		-	28.8 ± 1.6
	AMP	+	>20000
		-	>20000

Tabelle 4.1-B Affinitätskonstanten von Nukleotiden zur TAP1-NBD und seinen Varianten

Die Affinitätskonstanten wurden durch Konkurrenzexperimente (3.4.5) an TNP-ADP/TAP1-NBD Komplexen bei 20°C ± 1 °C in An- und Abwesenheit von 5 mM MgCl₂ bestimmt. Die angegebenen Werte entstammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Während zwischen den verschiedenen Mutanten signifikante und für das mechanistische Verständnis dieser NBD durchaus relevante Unterschiede in der Affinität zu Nukleotiden beobachtet wurden, konnten diese Unterschiede in der Affinität nicht für die unterschiedlichen Aktivitäten in der Hydrolyserate von ATP verantwortlich sein. Die Hydrolyse von ATP wurde in Anwesenheit vom Kofaktor MgCl₂ und bei einer ATP Konzentration von 2 mM bestimmt. Die Affinität der TAP1-NBD-Varianten zu ATP/Mg²⁺ liegt im niedrigen mikromolaren Bereich (zwischen 2.7 ± 0.4 μM für die Einzelmutante Q701H und 22.9 ± 1.3 μM für den Wildtyp). Unter den Bedingungen für die Bestimmung der ATPase-Aktivität sind also sämtliche TAP1-NBD-Varianten unabhängig von ihrer unterschiedlichen Nukleotidaffinität mit

ATP/Mg²⁺ abgesättigt. Die unterschiedlichen ATPase-Aktivitäten der generierten TAP1-NBD-Varianten sind also nicht das Produkt unerwünschter Nebeneffekte der Mutagenese auf die Nukleotidaffinität.

4.1.6 Analyse der transienten Homodimerisierung der TAP1-NBD

Es ist allgemein anerkannt, dass die Bindung von ATP eine Dimerisierung von isolierten ABC Motordomänen induzieren kann, die wiederum Voraussetzung für die ATP Hydrolyse ist (39,57,58). In Abbildung 14 wurde bereits gezeigt, dass die isolierte TAP1-NBD zumindest prinzipiell nukleotidabhängig dimerisieren kann. Doch spielt die Dimerisierung der TAP1-NBD tatsächlich eine kritische Rolle für die gemessene Hydrolyse? Falls dies in der Tat der Fall ist, stellt sich die Frage, ob die eingeführten Mutationen in der ATP-Bindungstasche einen störenden Einfluss auf die Dimerisierung der NBDs haben und dadurch ein unerwünschter Seiteneffekt der Mutation für die gemessenen Unterschiede in der katalytischen Effizienz verantwortlich ist?

Um zu bestimmen, ob es die monomere oder die dimere Form der NBD ist, welche die ATPase-Aktivität nach Einführung des Achsnagel-Histidins oder der putativen katalytischen Dyade aus Histidin und Glutamat verursacht, wurde die ATPase-Aktivität dieser Mutanten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration untersucht (Abbildung 20).

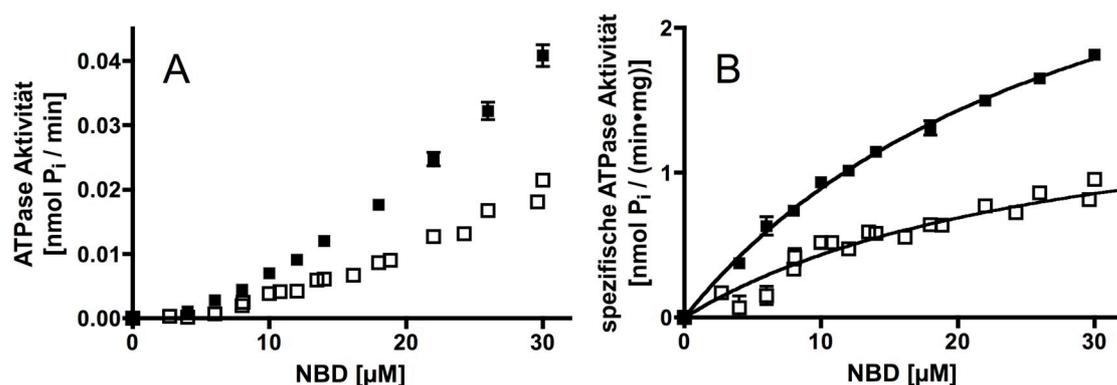


Abbildung 20 ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration der TAP1-NBD

A) Die ATPase-Aktivitäten der Doppelmutante (D668E/Q701H; geschlossene Quadrate) und der Einzelmutante (Q701H; offene Quadrate) wurden bei pH 7,2, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ und verschiedenen Proteinkonzentrationen bestimmt und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. **B)** Die in A) gemessenen ATPase-Aktivitäten der Doppelmutante (D668E/Q701H; geschlossene Quadrate) und der Einzelmutante (Q701H; offene Quadrate) wurden in spezifische ATPase-Aktivitäten umgerechnet gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Gleichung 1 analysiert, um die apparente

Dissoziationskonstante K_D^{app} des TAP1-NBD Dimers zu bestimmen. Der K_D^{app} betrug für die Doppelmutante (D668E/Q701H) $30 \pm 2 \mu\text{M}$ und für die Einzelmutante (Q701H) $28 \pm 6 \mu\text{M}$. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten dar. Die Abweichung der Messwerte vom Mittelwert ist durch die Fehlerbalken dargestellt.

Wäre ein monomeres Protein für die ATP-Hydrolyse verantwortlich, wäre eine lineare Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Proteinkonzentration zu erwarten. Da dies nicht der Fall war (Abbildung 20.A), musste die beobachtete ATPase-Aktivität von einer höher-oligomeren Spezies herrühren.

In einer anderen Darstellung wird die *spezifische* ATPase-Aktivität gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und erlaubt die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante K_D^{app} (Abbildung 20.B, Gleichung 1). Die sich andeutende Sättigung bei höheren NBD Konzentrationen ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass eine höhere oligomere Spezies (höchstwahrscheinlich der Dimer) katalytisch relevant ist. Wäre der TAP1-NBD Monomer katalytisch relevant, so wäre in dieser Darstellung ein konstanter Wert, unabhängig von der verwendeten Proteinkonzentration, zu erwarten. Da aus Stabilitätsgründen die Proteinkonzentration in diesen Experimenten nicht beliebig erhöht werden konnte, und die erreichten Proteinkonzentrationen nicht hoch genug waren, um den K_D^{app} mit hoher Verlässlichkeit bestimmen zu können, sollten die bestimmten Affinitäten *semi-quantitativ* gewertet werden. Nichtsdestotrotz demonstrieren diese Messungen, dass eine niedrig affine Oligomerisierung der NBDs stattfindet und Teil des katalytischen Zyklus dieser isolierten NBD ist. Die niedrige, apparente Affinität des NBD Dimers von ungefähr $30 \mu\text{M}$ erklärt auch, warum eine ATP-induzierte Dimerisierung der NBDs in der Gelfiltration nicht beobachtet werden konnte.

Noch wichtiger allerdings ist die Tatsache, dass die apparenten Affinitäten des Homodimers der Einzelmutante (Q701H) und der Doppelmutante (D668E/Q701) im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch sind und somit nicht für die unterschiedliche katalytische Effizienz der beiden TAP1-NBD-Varianten verantwortlich sein können. Diese Messungen, zusammen mit den ermittelten Affinitäten von Nukleotiden zu den TAP1-NBD-Mutanten (4.1.5) belegen, dass die beiden Reste E668 und H701 direkt an der Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Alternative Erklärungen wie eine veränderte Wechselwirkung zwischen den NBDs und Nukleotiden oder den NBDs untereinander wurden systematisch ausgeschlossen.

Zusammenfassend differenzieren diese Mutagenesestudien an der TAP1-NBD deutlich zwischen den Rollen des konservierten Glutamats und des Achsnagel-Histidins. Während das Achsnagel-Histidin eine essentielle Rolle in der Hydrolyse von ATP spielt, scheint das zuvor postulierte katalytische Glutamat nicht direkt an der Hydrolyse beteiligt zu sein. Vielmehr scheint es einen strukturellen Effekt auf das Achsnagel-Histidin auszuüben, das die katalytische Effizienz bestimmt.

4.1.7 Eine katalytische Dyade aus Glutamat und Histidin in der TAP1-NBD

Um den bisher recht vage als „strukturellen Effekt“ beschriebenen Einfluss des Glutamats auf das katalytische Histidin näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die ATP-Hydrolyse durch die TAP1-NBD ermittelt (Abbildung 22).

Während die Doppelmutante (D668E/Q701H) eine glockenförmige Abhängigkeit vom pH-Wert zeigte (Abbildung 22.A), zeigte die Einzelmutante (Q701H) eine eher sigmoidale Abhängigkeit (Abbildung 22.B). Wie lässt sich ein solch drastischer Unterschied in der pH-Abhängigkeit erklären, wenn man bedenkt, dass sich diese beiden Mutanten lediglich durch eine Methyleneinheit (Aspartat an der Position 668 in der Q701H-Mutante und Glutamat in der D668E/Q701H-Mutante) unterscheiden?

Die einzige Möglichkeit, alle Beobachtungen in einem Modell zu vereinigen, führt zum Postulat einer katalytischen Dyade als Wirkprinzip von isolierten NBDs. In diesem Modell wird das für die Katalyse essentielle Histidin durch eine Salz- oder Wasserstoffbrücke zum Glutamat in einer produktiven Konformation stabilisiert (Abbildung 21). Die qualitativ identische Zunahme der ATPase-Aktivität der Mutanten (D668E/Q701H) und (Q701H) hat nach diesem Modell die gleiche Ursache. ATP^{3-} wird zu ATP^{4-} deprotoniert und erlaubt dadurch eine ATP-Hydrolyse nach dem Prinzip der Substrat-assistierten Katalyse (SAC). Diese SAC durch ATP kann in der Doppelmutante (D668E/Q701H) bei optimalem pH-Wert mit einer bis zu 5-fachen Geschwindigkeit ablaufen, da das Histidin den pentakovalenten Übergangszustand des γ -Phosphats stabilisieren kann, und durch das Glutamat in einer katalytisch produktiven Position stabilisiert wird (Abbildung 21 und Abbildung 22).

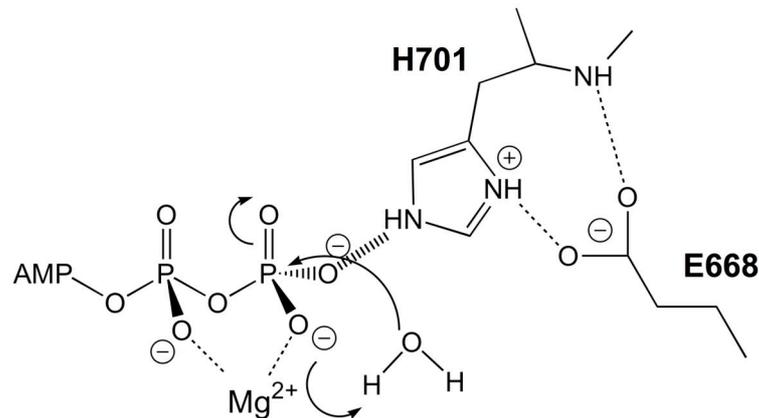


Abbildung 21 Modell der katalytischen Dyade aus Histidin und Glutamat

Das Glutamat E668 hält das Histidin H701 in einer produktiven Konformation, die den pentakovalenten Übergangszustand der ATP Hydrolyse stabilisiert (54). Das ATP wird nach dem Mechanismus der Substrat-assistierten Katalyse hydrolysiert.

Jegliche Veränderung (z.B.: pH-Wert oder Mutation), die diese Wechselwirkung zwischen dem Histidin und Glutamat unterbricht, würde die Flexibilität des Histidins erhöhen und damit die Rate der Hydrolyse verringern.

Da die postulierte Wechselwirkung zwischen dem Histidin und dem Glutamat pH-abhängig ist, und somit Protonierungsgrad des Histidins drastischen Einfluss auf die thermodynamische Stärke der Wechselwirkung hat, muss sich eine Änderung des pH-Wertes direkt in einer veränderten enzymatischen Aktivität widerspiegeln. Eine Erhöhung des pH-Wertes würde zur Deprotonierung des Histidins führen und die Wechselwirkung zum Glutamat aufheben. Das hätte eine erhöhte Flexibilität des Histidins und damit einen Verlust der enzymatischen Effektivität zur Folge. Tatsächlich besitzt die TAP1-NBD Doppelmutante (D668E/Q701H) bei hohen pH-Werten die gleiche *steady-state* ATPase-Aktivität wie die Einzelmutante (Q701H), in welcher das Histidin über das gesamte pH-Spektrum flexibel ist, da das Wildtyp Aspartat durch die fehlende Methyleneinheit keine Wechselwirkung mit dem Histidin eingehen kann.

Diese Daten liefern zum ersten Mal direkte biochemische Evidenzen für die Existenz einer katalytischen Dyade in isolierten NBDs. Ob mit dieser Arbeit der generelle Mechanismus nach dem ABC-Transporter ATP hydrolysieren entschlüsselt wurde, kann abschließend erst beurteilt werden, wenn die hier beschriebene katalytische Dyade auch in weiteren NBDs und voll-assemblierten ABC-Transportern beschrieben wird (56).

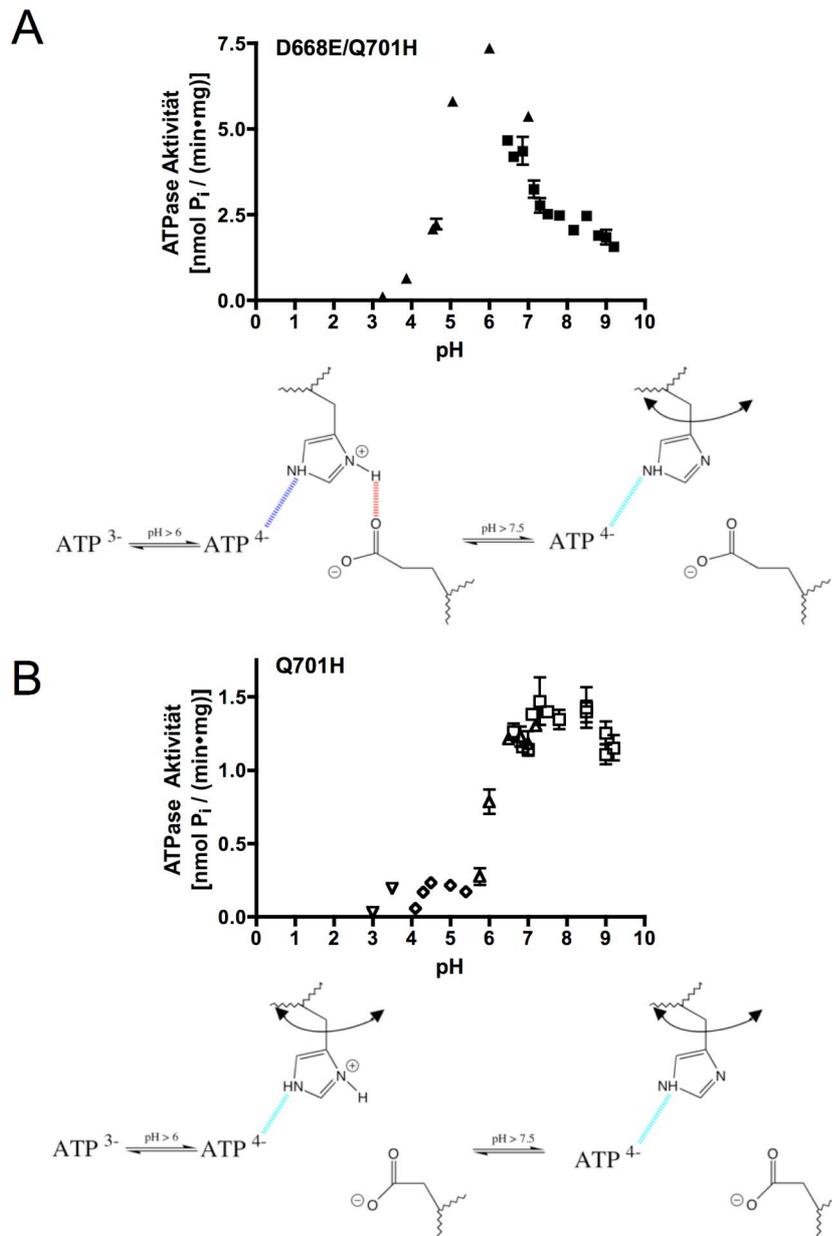


Abbildung 22 pH Abhängigkeit der ATPase-Aktivität in TAP1-NBD-Mutanten

A) Die ATPase-Aktivität der D668E/Q701H-Mutante bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Als Puffersubstanzen wurden Tris (Quadrate) und Malonat (Dreiecke) verwendet. **B)** Die ATPase-Aktivität der Q701H-Mutante bei 30°C und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Als Puffersysteme wurden Tris (Quadrate), Cacodylat (Dreiecke), Glycin (umgekehrte Dreiecke) und Azetat (Rauten) verwendet. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen. Die chemischen Skizzen beschreiben das mögliche Interaktionsmuster von ATP und der katalytischen Dyade bei unterschiedlichen pH-Werten. Die benutzten Pfeile deuten in Abwesenheit eines stabilisierenden Effektes durch Glutamat eine höhere Flexibilität der Histidin-Seitenkette an. In **(A)** wird bei hohem pH die Imidazolgruppe deprotoniert, was die Interaktion zwischen Glutamat und Histidin aufrischt, in **(B)** fehlt das Glutamat und das Wildtyp Aspartat kann wegen der fehlenden Methyleneinheit nicht mit dem Histidin interagieren und es in einer produktiven Form stabilisieren.

4.2 *In vitro* Charakterisierung eines *full-size* ABC-Transporters

Ein häufiges, fundamentales Problem bei der biochemischen und biophysikalischen Untersuchung von Membranproteinen - besonders eukaryotischen - ist bis heute eine unzureichende Überexpression des Proteins von Interesse (160). Um Membranbiochemikern ein weiteres Werkzeug zur Hand zu reichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf der beschriebenen Überexpressionssystem von *PDR5* in einem *pdr1-3* Stammhintergrund (114) eine neue Strategie zur Überproduktion und Reinigung von beliebigen Proteinen aus *S. cerevisiae* entwickelt (96). Das Werkzeug leitet sich vom Plasmid pFA6a (161) ab und erlaubt entsprechend eine „*Ein-Schritt*“ PCR-vermittelte, chromosomale Überproduktion eines beliebigen Hefeproteins mit fusioniertem Affinitäts-*tag* konstruiert.

Die Vorteile dieser neuen Strategie sind i) ein minimaler experimenteller Aufwand, ii) die natürlich vorkommenden post-translationalen Modifikationen, iii) eine standardisierbare Reinigung aufgrund des durch Faktor X_a entfernbaren N-terminalen Histidin-*tag* und iv) die dadurch ermöglichte Anwendung in genomweiten Hochdurchsatz-Ansätzen. Prinzipiell genügen ein Primerpaar und eine einzige PCR-Reaktion, um innerhalb von eineinhalb Wochen zu erfahren, ob diese Strategie die Überproduktion und Reinigung des Proteins von Interesse ermöglicht.

Die Konstruktion der Plasmide zur homologen Überproduktion und Reinigung beliebiger Hefeproteine (pRE3-10His und pRE-14His) ist in 3.2.2 beschrieben. Eine Vektorkarte des entsprechenden Plasmids befindet sich im Anhang.

4.2.1 Die homologe Überexpression von Pdr5p

Um auch den Mechanismus der ATP-Hydrolyse durch Pdr5p *in vitro* analysieren zu können und um anhand dieses voll-assemblierten ABC-Transporters die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattransport untersuchen zu können, wurde zunächst Wildtyp N10His-Pdr5p mit Hilfe der neuen Strategie zur Überproduktion und Reinigung von beliebigen Proteinen in *S. cerevisiae* gewonnen.

Nach erfolgreicher Transformation des Klonierungsstammes $\Delta PDR5$ prom mit der Überexpressionskassette von pRE3-10His wurde die Überproduktion des Fusionsproteins N10His-Pdr5p mit Hilfe von Ganzzellextrakten und anschließendem Immuno-Blot überprüft. Zur Immundetektion wurde ein polyklonaler α -Pdr5p-Antikörper (aus Kaninchen) verwendet (Abbildung 23).

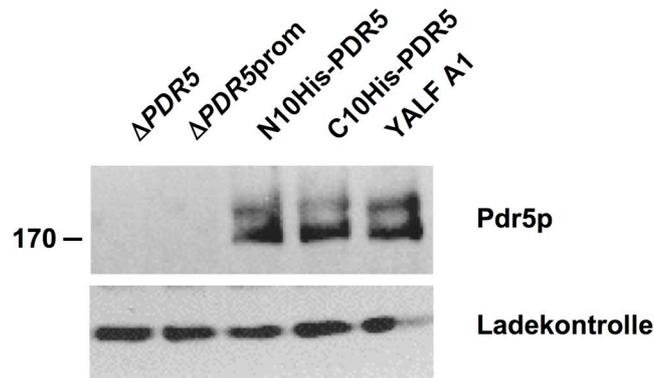


Abbildung 23 Immuno-Blot von Ganzzelextrakten verschiedener Hefe-Stämme

0.3 OD₆₀₀ Äquivalente wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und Pdr5p mit Hilfe des polyklonalen α -Pdr5p-Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle dient eine Kreuzspezifität des sekundären α -Kaninchen-HRP-Antikörpers.

Der Immuno-Blot belegte, dass i) die Deletion des *PDR5*-Promotors die Expression von Pdr5p verhindert und dass ii) ein N-terminaler (N10His-PDR5) und ein C-terminaler Affinitäts-tag (C10His-PDR5) die Überproduktion von Pdr5p im Vergleich zu einer unmodifizierten Version von *PDR5* nicht verringert (YALF A1).

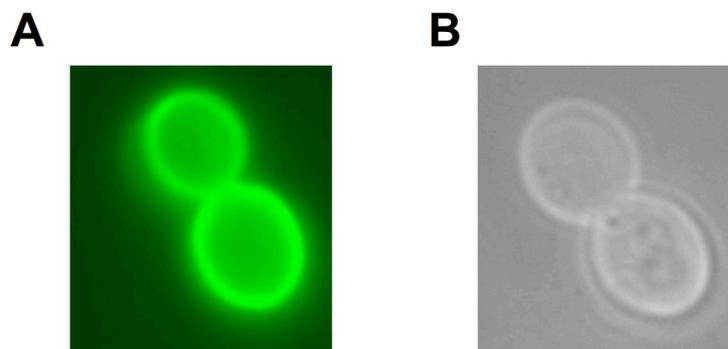


Abbildung 24 Lokalisation von Pdr5p

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Pdr5p-EGFP-10His überproduzierenden Zellen. Die Grünfärbung entspricht dem emittierten Licht des EGFP. **B)** Phasenkontrast-Bild der identischen Zellen.

Da die Überexpression und N- wie C-terminale Modifikationen von Proteinen, Missfaltung und Misslokalisierung induzieren kann (162-164), wurden der korrekte intrazelluläre Transport und die korrekte zelluläre Lokalisation von überproduziertem Pdr5p überprüft. Dazu wurde ein Pdr5p-EGFP-10His Fusionsprotein kloniert und wie N10His-Pdr5p und C10His-Pdr5p vom *PDR5*-Promotor in einem *pdr1-3* Hintergrund

überproduziert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen exponentiell wachsender Hefezellen dieses Stammes zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran und belegten die korrekte Lokalisation von überproduziertem Pdr5p (Abbildung 24).

Um die Funktionalität von Pdr5p zu überprüfen, wurde die Pdr5p-vermittelte Drogenresistenz in ganzen Zellen auf Drogen-Agar-Platten getestet (Abbildung 25). *PDR5*-überexprimierende Stämme (YALF A1, N10His-Pdr5p, C10His-Pdr5p) wuchsen im Gegensatz zu $\Delta PDR5$ -Zellen in Anwesenheit von 25 ng/ml und 50 ng/ml Cycloheximid. Die Anwesenheit und Position von fusionierten Affinitäts-tags hatte offenbar keinen Einfluss auf die Funktionalität von Pdr5p.

Da sich der C-terminale 10-Histidin-tag nach nur einer kurzen Verbindungssequenz von zwei Glycinen direkt an die letzte vorausgesagte Transmembranhelix von Pdr5p anschließt, war ein störender Effekt der Detergenzmizelle auf das Bindungsverhalten von C10His-Pdr5p während der IMAC nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurde zunächst nur die Reinigung von N10His-Pdr5p etabliert.

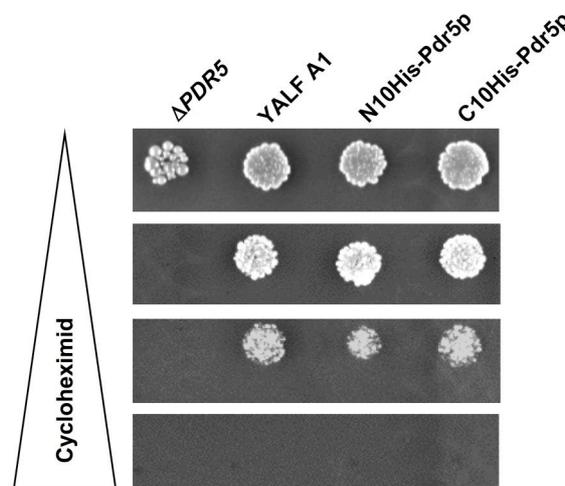


Abbildung 25 Pdr5p-vermittelte Drogenresistenz in Zellen

Ein 1/20000 OD₆₀₀ Äquivalent verschiedener Hefe Stämme wurde auf YPD-Agar-Platten mit ansteigenden Cycloheximidkonzentrationen aufgetragen und nach dreitägiger Inkubation bei 30°C photographiert. Die Cycloheximidkonzentrationen betragen (von oben nach unten) 0 ng/ml 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml. *PDR5*-überexprimierende Stämme (YALF A1, N10His-Pdr5p, C10His-Pdr5p) wachsen im Gegensatz zum ansonsten isogenen $\Delta PDR5$ -Stamm in Anwesenheit von 25 μ g/ml und 50 μ g/ml Cycloheximid. Die Position eines fusionierten Affinitäts-tags hat offenbar keinen Einfluss auf die Funktionalität von Pdr5p.

4.2.2 Reinigung von N10His-Pdr5p

N10His-PDR5-produzierende Zellen wurde in einer 4 Liter Expressionskultur bis zur spätlogarithmischen Phase ($OD_{600} = 2.8$) in YPD-Medium bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden geerntet und mit einer Zellaufschlussmaschine bei 2.7 kbar aufgeschlossen. Laut L. Serrano lassen sich Plasmamembranen aus *S. cerevisiae* durch eine 30-minütige Zentrifugation bei $20000 \times g$ sedimentieren, während viele von intrazellulären Membranen abgeleitete Vesikel im Überstand bleiben (144). Da dies einen Vorreinigungsschritt der Plasmamembran darstellt, wurde dieses Protokoll adaptiert (Abbildung 26). Nach Aufschluss der Zellen wurden unaufgeschlossene Zellen und Zellwandbruchstücke durch zwei Zentrifugationsschritte bei $5000 \times g$ entfernt. Erstaunlicherweise sedimentierte bei $20000 \times g$ allerdings nur ein äußerst geringer Anteil ($<10\%$) von Pdr5p, während die Hauptmenge im $20000 \times g$ Überstand verblieb (Abbildung 26.A).

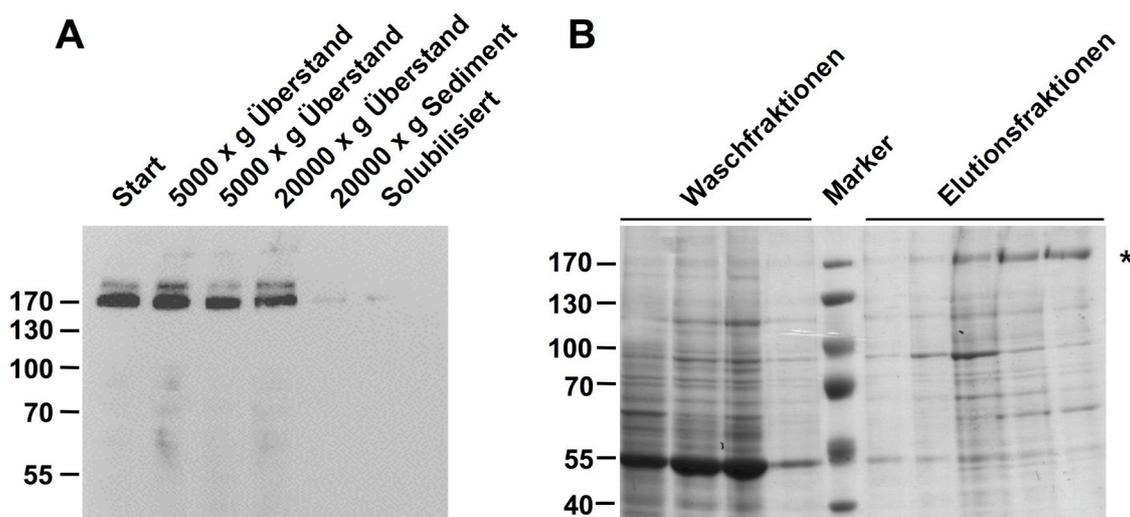


Abbildung 26 Reinigung von N10His-Pdr5p in DDM aus dem $20000 \times g$ Sediment

A) 0.5 OD_{600} Äquivalente verschiedener Präparationsschritte wurden während der differentiellen Zentrifugation in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des α -Pdr5p-Antikörpers im Immuno-Blot detektiert. Die Molekülmasse der verwendeten Markerproteine ist in kDa angegeben. **B)** Die Abbildung zeigt eine 10%ige SDS-PAGE jeweils zweier Waschfraktionen mit 10 mM und 29 mM Imidazol sowie die ersten fünf Elutionsfraktionen der IMAC. Zuvor wurde Pdr5p aus dem $20000 \times g$ Sediment mit DDM solubilisiert. Das Detergenz:Protein-Gewichtsverhältnis bei der Solubilisierung betrug 1:1 bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml. Nicht-solubilisiertes Material wurde durch einstündige Zentrifugation bei $100000 \times g$ abgetrennt. Elutions- und Waschlösung enthielten 0.05% DDM. Der Stern markiert die Pdr5p entsprechende Bande.

Das 20000 x g Sediment wurde mittels DDM in einem Detergenz:Protein-Gewichtsverhältnis von 1:1 bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml solubilisiert und auf eine Zn²⁺/IDA Säule (1 ml Bettvolumen) aufgetragen. Unspezifisch adsorbierte Proteine wurden mittels eines Stufengradienten eluiert. Pdr5p eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 134 mM.

Aufgrund der geringen Ausbeute von Pdr5p im 20000 x g Sediment wurde die differenzielle Zentrifugation angepasst und Pdr5p nunmehr aus einem Gesamtmembransediment gewonnen, das durch einstündige Ultrazentrifugation (180000 x g; 4°C) präpariert wurde. Der Immuno-Blot in Abbildung 27.A belegt, dass das Gesamtmembransediment im Vergleich zum 20000 x g Sediment (Abbildung 26.A) deutlich größere Mengen von N10His-Pdr5p enthielt. Das Gesamtmembransediment wurde mit DDM in einem Detergenz:Protein-Gewichtsverhältnis von 1:1 bei 10 mg/ml Proteinkonzentration für 1h bei 4°C solubilisiert. Die Solubilisierungseffizienz betrug für DDM unter diesen Bedingungen ca. 50%.

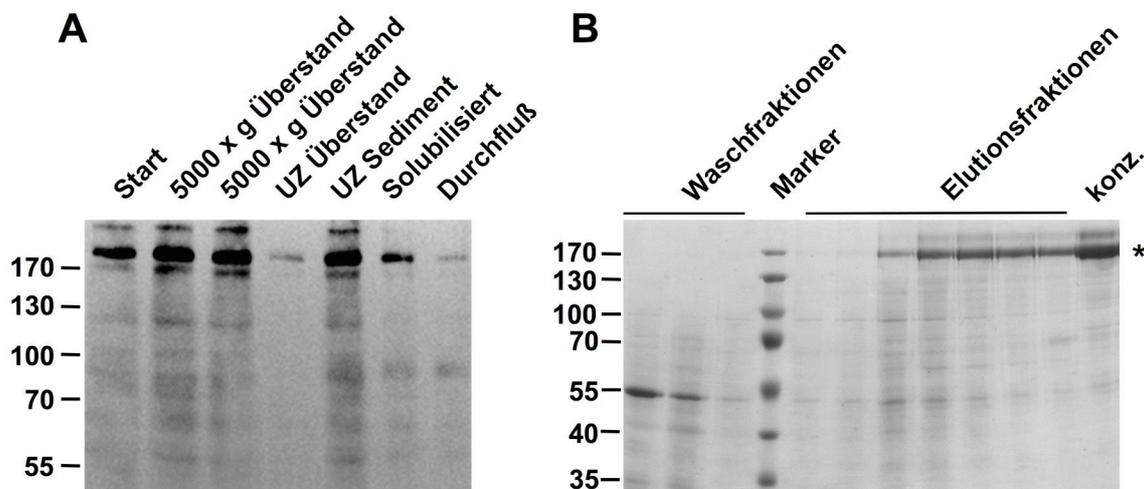


Abbildung 27 **Reinigung von N10His-Pdr5p aus dem Gesamtmembransediment**

A) 0.5 OD₆₀₀ Äquivalente verschiedener Präparationsschritte wurden vor der IMAC in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des α -Pdr5p-Antikörpers im Immuno-Blot detektiert. **B)** Die Abbildung zeigt eine Coomassie Billantblaugefärbte 10%ige SDS-PAGE der letzten Waschfraktionen (29 mM Imidazol) und der ersten sieben Elutionsfraktionen der IMAC. Während des Ankonzentrierens wurde bei einer Proteinkonzentration von ca. 400 μ g/ml eine Probe entnommen und ebenfalls auf die SDS-PAGE aufgetragen (konz.). Das Detergenz:Protein-Gewichtsverhältnis bei der Solubilisierung betrug 1:1 bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml. Elutions- und Waschpuffer enthielten 0.05% DDM. Der Stern markiert die Pdr5p entsprechende Doppelbande.

Die N10His-Pdr5p enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereint und in einem Amicon Ultra 4 Konzentrator mit einem MWCO von 100 kDa auf 1 mg/ml konzentriert. Das Aggregationsverhalten von isoliertem und Detergenz-solubiliertem N10His-Pdr5p wurde mittels Gelfiltrationschromatographie auf einer Superose 6 HR10/30 (in Anwesenheit von 0.05% DDM) untersucht (Abbildung 28).

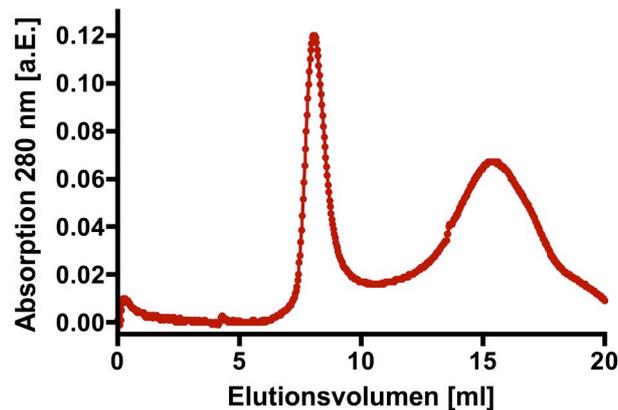


Abbildung 28 Gelfiltration von Detergenz-solubiliertem und gereinigtem N10His-Pdr5p

N10His-Pdr5p wurde mittels IMAC in 0.05% DDM gereinigt, durch Ultrafiltration auf 1 mg/ml konzentriert und auf eine HR10/30 Superose 6 Säule aufgetragen. Das Ausschlussvolumen der Säule beträgt ungefähr 8 ml.

Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigte zwei Signale: Ein deutliches Signal im Ausschlussvolumen und ein breiteres Signal mit einem Maximum bei etwa 15 ml. Eine Analyse aller Fraktionen bestätigte, dass das Absorptionssignal tatsächlich von N10His-Pdr5p verursacht wird (nicht gezeigt). Folglich deutete das Signal im Ausschlussvolumen auf eine Aggregation (>2 MDa) von N10His-Pdr5p hin. Das symmetrische Hauptsignal mit einem Maximum bei 15 ml implizierte, dass Pdr5p dominant in einer Form vorlag, vermutlich als Monomer oder Dimer. Die Breite dieses Signals implizierte eine sehr heterogene Größe und Masse der isolierten Protein-Detergenzmizellen (165).

Erneute Analysen der Fraktionen des Ausschlussvolumens sowie zwischen 12 und 18 ml legten nahe, dass N10His-Pdr5p vermutlich zwar irreversibel aggregiert war, dass aber isoliertes, von Aggregaten getrenntes N10His-Pdr5p bei Lagerung auf Eis innerhalb einer Woche keine neuen Aggregate bildete (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend erlaubt die beschriebene Zwei-Schritt Präparation (IMAC und Gelfiltration) von N10His-Pdr5p eine zügige Reinigung dieses eukaryotischen ABC-Transporters in Milligramm-Mengen.

4.2.3 Analyse der ATPase-Aktivität von N10His-Pdr5p

Die Funktionalität des Detergenz-solubilisierten und gereinigten N10His-Pdr5p wurde anhand der ATPase-Aktivität untersucht. Die beobachtete ATPase-Aktivität war abhängig von Mg^{2+} und zeigte bei einer Proteinkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eine Wechselzahl k_{cat} von 1.8 ATP pro Sekunde bei einer Michaelis-Menten Konstante K_m von 0.5 mM (Abbildung 29, Gleichung 7).

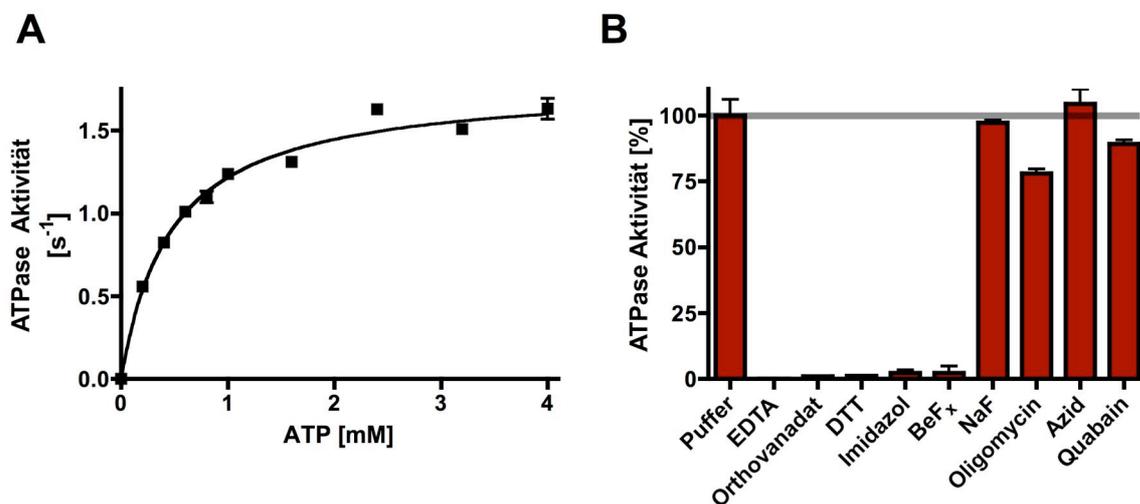


Abbildung 29 ATPase-Aktivität der N10His-Pdr5p-Präparation

A) Die ATPase-Aktivität einer N10His-Pdr5p-Präparation wurde in Anwesenheit verschiedener ATP Konzentrationen bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ und einer Proteinkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Messungen dar. Die gewonnenen Daten wurden anhand der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 7) ausgewertet. Die ermittelten kinetischen Parameter betragen: $K_m = 0.47 \pm 0.04$ mM und $k_{\text{cat}} = 1.78 \pm 0.04$ ATP s^{-1} . **B)** Der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die ATPase-Aktivität wurde bei $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, einer ATP Konzentration von 2 mM und einer Mg^{2+} Konzentration von 5 mM bestimmt. Die Endkonzentration der verwendeten Inhibitoren betrug im Assay 10 mM EDTA, 5 μM Orthovanadat, 10 mM DTT, 100 mM Imidazol, 2 mM BeF_x, 10 mM NaF, 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligomycin, 20 mM Azid oder 1.4 mM Quabain.

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren wurde untersucht, um zu zeigen, dass die beobachtete ATPase-Aktivität spezifisch für Pdr5p ist. Dabei ließen sich zwei Gruppen von Inhibitoren unterscheiden. Die erste Gruppe umfasste Inhibitoren, welche die ATPase-Aktivität in N10His-Pdr5p-Präparationen komplett unterdrückten,

während die zweite Gruppe wenn überhaupt nur einen äußerst geringen Einfluss auf die ATPase-Aktivität dieser N10His-Pdr5p-Präparation hatte.

Eine vollständige Inhibition der ATPase-Aktivität durch EDTA, Orthovanadat und BeF_x war nicht überraschend, da diese Substanzen wohlbekannt und etablierte Inhibitoren von ABC ATPasen sind (166-169). Die Inhibition durch DTT und Imidazol war nur auf den ersten Blick weniger einleuchtend. Durch einer Struktur-Funktionsanalyse von Pdr5p mittels zufälliger Mutagenese wurde eine für die korrekte Faltung und Funktionalität von Pdr5p eine essentielle Disulfidbrücke postuliert (120), deren Reduktion durch DTT natürlich einen drastischen Einfluss auf die ATPase-Aktivität hätte. In einer anderen Studie wurde die Inhibition von Pdr5p durch eine Vielzahl aromatischer Imidazolderivate beschrieben (133).

Die zweite Gruppe von Inhibitoren hatte gar keinen, oder lediglich einen minimalen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von N10His-Pdr5p-Präparationen. Die Gruppe umfasste NaF, einen verbreiteten Inhibitoren von Phosphatasen (170), Azid, einen Inhibitoren der abundanten, mitochondrialen F_1F_0 -ATPase (171) sowie Quabain einen Inhibitoren der menschlichen Natrium-Kalium-ATPase (172). Überraschenderweise konnte die beobachtete ATPase-Aktivität durch Oligomycin, einem beschriebenen Inhibitoren der Pdr5p-vermittelten ATPase, nur minimal inhibiert werden (90,123,124).

Die präsentierten Daten legen die Vermutung nahe, dass N10His-Pdr5p in einem funktionalen Zustand gereinigt wurde und die Präparation frei von Phosphatasen und anderen ATPasen war.

4.2.4 Rekonstitution von N10His-Pdr5p in Liposomen

Ein zentrales Ziel der Isolation von N10His-Pdr5p ist es, die Kopplung der ATPase und des Transports *in vitro* nachzuvollziehen. Da Transport-Aktivität in Detergenzmizellen nicht messbar ist (59), musste N10His-Pdr5p zunächst in Liposomen rekonstituiert werden.

Basierend auf den Rekonstitutionsprotokollen von B. Poolman und J. L. Rigaud (173,174) wurden zunächst große unilaminare Liposomen mit definierter Lipid-Zusammensetzung und Größe erzeugt. Durch Titration mit verschiedenen Detergenzien (DDM, Triton X-100 oder CHAPS) wurden diese Liposomen destabilisiert und mit gereinigtem N10His-Pdr5p gemischt. Durch Inkubation mit

Polystyrene Beads (SM-2 Biobeads) wurden selektiv leere Detergenzmizellen und monomere Detergenz-Moleküle entzogen. Da die Liposomen nicht vollständig solubilisiert wurden, war es extrem unwahrscheinlich, dass die hydrophilen NBDs die destabilisierte Liposomenmembran durchdringen. Daher inkorporierte Pdr5p in den meisten Fällen unidirektional, so dass die NBDs dem umliegenden Medium zugänglich blieben und durch ATP energetisiert werden konnten.

Die Etablierung der Rekonstitution eines Membranproteins ist ein empirischer Optimierungsvorgang mit einer Vielzahl von Parametern, die in (Tabelle 2.3-A) zusammengefasst werden.

Protein	Liposom	SM-2Biobeads
Detergenzwahl <ul style="list-style-type: none"> • DM • DDM • Digitonin 	Lipid Zusammensetzung <ul style="list-style-type: none"> • Polare <i>E. coli</i> Lipide <i>S. cerevisiae</i> Gesamtlipide • +/- Sterole • +/- Diacylglycerol • Synthetische Lipide (PC:PA) 	SM-2 Biobeads:Lipid-Verhältnis (120:1 – 20:1)
Protein:Lipid-Verhältnis (1:10 – 1:500 w/w)	Größe der Liposomen (50 nm – 400 nm)	Anzahl der Inkubationen (1-5)
Dauer der Inkubation mit destabilisierten Liposomen (10 min – 1 h)	Wahl des Detergenz beim Destabilisieren <ul style="list-style-type: none"> • DDM • Triton X-100 • CHAPS 	Dauer der Inkubation (3 h – 16 h)
	Detergenz:Lipid-Verhältnis	

Tabelle 4.2-A Kritische Parameter bei der Rekonstitution von N10His-Pdr5p

Voraussetzung für jede Optimierung ist ein Ausleseverfahren, das bewertet, ob die Veränderung eines Parameters eine Verbesserung oder Verschlechterung bewirkt. Die beste Auslese wäre im Falle der Rekonstitution von Pdr5p ein Transport-Assay, der allerdings zum Zeitpunkt der Rekonstitutionsexperimente noch nicht etabliert war. Besonders die hydrophobe Natur der Pdr5p Substrate und ihrer daraus resultierenden hohen Membranpartitionierung und -gängigkeit erschwert die Beobachtung einer Transportfunktion. Eine Optimierung der Rekonstitution unter Zuhilfenahme indirekter Ausleseverfahren erschien daher als angemessen.

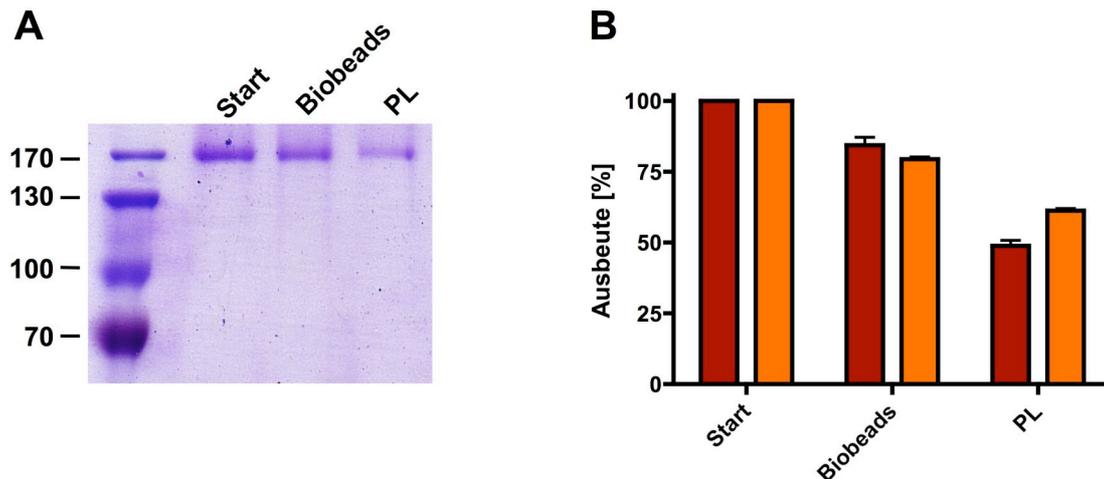


Abbildung 30 Ausbeute von Protein, ATPase und Lipiden während der Rekonstitution

A) Die Proteinausbeute während der Rekonstitution wurde ermittelt, indem jeweils 5% des gesamten Rekonstitutionsansatzes in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt wurde und das Gel anschließend mit Coomassie Brilliantblau gefärbt wurde. „Start“ entspricht dem Ausgangsmaterial (N10His-Pdr5p in DDM mit polaren *E. coli* Lipiden destabilisiert mit DDM; Protein:Lipid-Verhältnis 1:50 w/w; DDM:Lipid-Verhältnis 1:2 w/w) nach Mischen des Proteins mit destabilisierten Liposomen. „Biobeads“ entspricht dem Überstand nach 3-stündigen Inkubation mit SM-2 Biobeads. „PL“ entspricht dem resuspendierten 200000 x g Sediment zur Ernte der Proteoliposomen. **B)** In Dunkelrot dargestellt ist die Ausbeute der ATPase-Aktivität während der Rekonstitution. In Orange ist die Ausbeute vom fluoreszierenden NBD-PE dargestellt, das in geringen Mengen (0.2 mol%) den Liposomen zugesetzt war.

Nach jedem Experiment wurden daher folgende Charakteristika der Rekonstitution vermessen:

- A) Protein-Ausbeute
- B) Lipid-Ausbeute
- C) Ausbeute der ATPase-Aktivität
- D) Dichtheit der Liposomen
- E) Kofraktionierung von N10His-Pdr5p mit Liposomen im Saccharosegradient
- F) Kofraktionierung der ATPase Aktivität mit Liposomen im Saccharosegradient
- und optional G) Inkorporation von N10His-Pdr5p in Liposomen mittels EM

Für die Etablierung eines Pdr5p-abhängigen Transport-Assays ist der komplette Detergenzentzug aus den Proteoliposomen besonders wichtig. Da Detergenzrückstände die Lipiddoppelschicht destabilisieren und eine erhöhte Rate des passiven Lipid *Flip-Flop* bewirken, konnte die verbleibende Detergenzmenge

anhand der Rate des passiven Lipid *Flip-Flops* von C6 NBD-PE in asymmetrisch markierten Proteoliposomen bestimmt werden (Abbildung 31) (149).

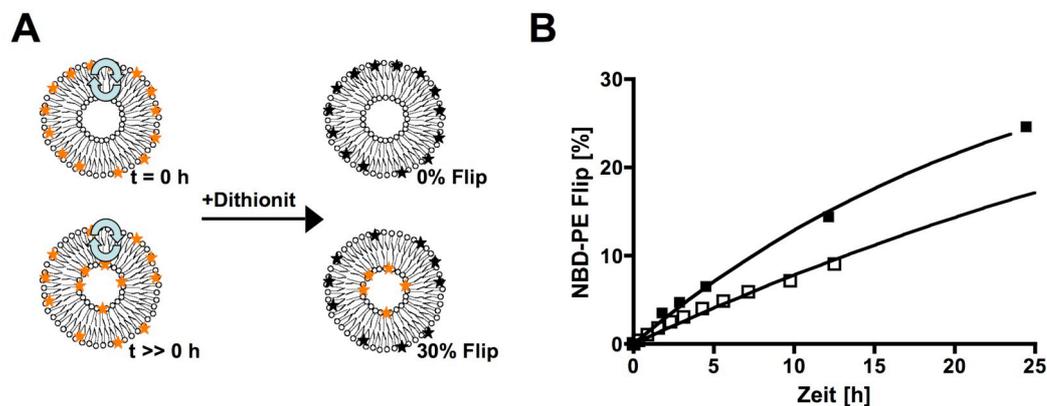


Abbildung 31 Der passive *Flip-Flop* von C6 NBD-PE in Liposomen und Proteoliposomen

A) Liposomen und Proteoliposomen wurden für 30 min auf Eis mit C6 NBD-PE gemischt und anschließend direkt im Fluoreszenzspektrometer vermessen ($t = 0 \text{ h}$). Bei Zugabe von Dithionit, einem nicht-membrangängigen, starken Reduktionsmittel, wurde der im äußeren Blatt der Lipiddoppelschicht zugängliche Fluorophor innerhalb von 3 Minuten zu annähernd 100% zerstört. Längere Inkubationszeiten bei 30°C ($t \gg 0 \text{ h}$) vor der Reduktion mit Dithionit erlaubten eine Umverteilung der C6 NBD-PE durch eine passive *Flip*-Bewegung der markierten Lipide in das innere Blatt der Liposomen-Lipiddoppelschicht. Im gegebenen Beispiel nimmt dadurch das Fluoreszenzsignal bei Zugabe von Dithionit nur noch um 70% ab, da 30% des Fluorophors im inneren Blatt vor der Reduktion durch Dithionit geschützt sind. **B)** Diese Abbildung zeigt die passive, einwärts gerichtete Translokation von C6 NBD-PE in einseitig markierten Liposomen (offene Quadrate) und Proteoliposomen (geschlossene Quadrate). Die abgeleiteten Halbwertszeiten betragen 38.6 h für Liposomen und 17.5 h für Proteoliposomen.

Zusätzlich wurde bei jedem Rekonstitutionsexperiment die Kofraktionierung von Liposomen, N10His-Pdr5p und ATPase-Aktivität im Saccharosegradienten überprüft (148). Dazu wurde ein Teil der Proteoliposomen auf 30% w/v eingestellt, in einem Saccharosegradienten (0%-30% w/v) aufgetrennt (3.6.8) und anschließend nach aufsteigender Dichte fraktioniert (Abbildung 32). Der Lipidgehalt (NBD-PE), das Profil der ATPase-Aktivität sowie der Gehalt an Pdr5p (mittels Immuno-Blot) wurden für jede Fraktion bestimmt. Entsprechend ihrer Dichte wären leere Liposomen in früheren Fraktionen (F2+F3), Proteoliposomen in späteren (also dichteren) Fraktionen (F5) und aggregiertes Protein in der Bodenfraktion (F8) zu erwarten.

Der Immuno-Blot zeigte eine deutliche Anreicherung von Pdr5p, Lipiden und der ATPase-Aktivität in der Fraktion 5. Das Lipidsignal in den Fraktionen 2 bis 4 implizierte, dass bei einer Rekonstitution mit einem Protein:Lipid-Verhältnis von 1:50 w/w eine Mischung aus leeren Liposomen und Proteoliposomen vorlag.

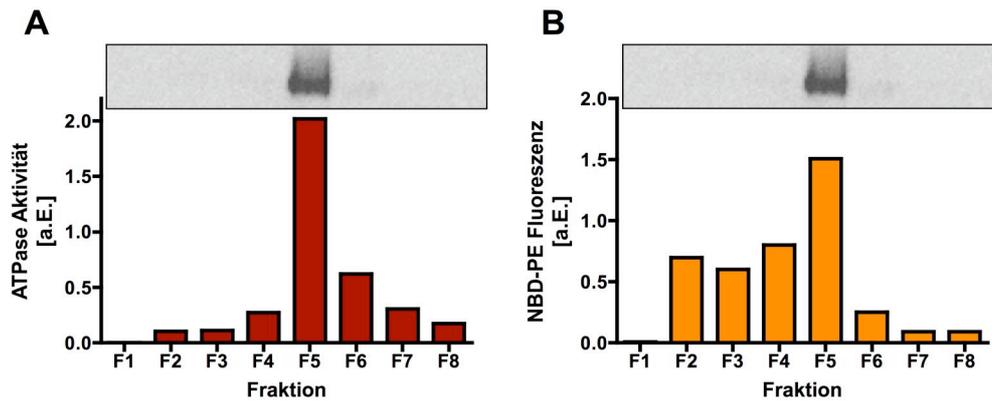


Abbildung 32 Saccharosegradient Dichtezentrifugation von Proteoliposomen

A) Der Graph zeigt die ATPase-Aktivität und den Immuno-Blot der entsprechenden Fraktionen des Saccharosegradienten nach ansteigender Dichte. Zur Immundetektion wurde der polyklonale α -Pdr5p-Antikörper verwendet. F1 entspricht einem Saccharosegehalt von 0% w/w, F8 einem Saccharosegehalt von 30% w/w. **B)** Die Verteilung von Lipiden im Saccharosegradienten wurde anhand der NBD-PE-Fluoreszenz im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Der Immuno-Blot der entsprechenden Fraktionen bestätigt eine Kofraktionierung von Lipiden und Pdr5p im Saccharosegradienten, also eine wahrscheinliche Inkorporation von Pdr5p in die Liposomen.

Wie bereits oben erwähnt, wurde die Rekonstitution von Pdr5p anhand einer indirekten Auslese optimiert. Trotz intensiver Bemühungen und Adaptation beschriebener Transport-Assays konnte kein inhibierbarer, Pdr5p- und ATP-abhängiger Transport beobachtet werden (175,176). Um dennoch den Erfolg der Rekonstitution von Pdr5p in Liposomen auf eine direkte Art protokollieren zu können, wurden Pdr5p-Proteoliposomen mittels der Gefrierbruch-Technik elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 33) (150,177).

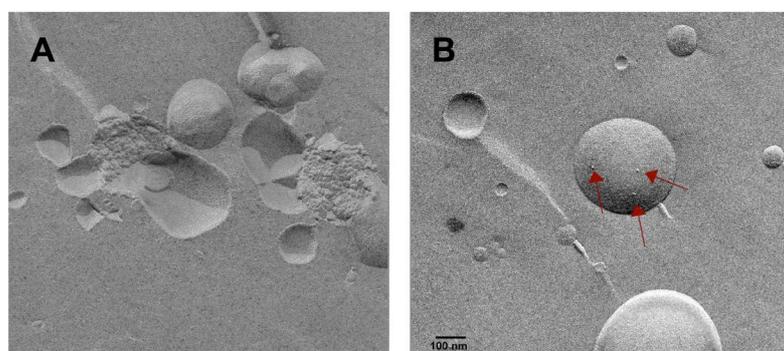


Abbildung 33 Elektronenmikroskopische Analyse von Proteoliposomen

A) Die nach Gefrierbruch erstellte elektronenmikroskopische Aufnahme eines Rekonstitutionsexperiments von Pdr5p zeigt deutliche Spuren aggregierten Proteins auf einigen Liposomen, wenn DDM durch SM-2 Biobeads nur langsam entzogen wurde (4 x 1h 40 mg SM-2 Biobeads für 2 mg Lipid + 40 mg SM-2

Biobeads ÜN bei 4°C). **B)** Bei schnellem Entzug von DDM durch große Mengen SM-2 Biobeads (240 mg SM-2 Biobeads für 2 mg Lipid für 3h bei RT) können nach Gefrierbruch durch Elektronenmikroskopie Proteoliposomen mit einzelnen, rekonstituierten Pdr5p-Molekülen (rote Pfeile) beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte für Pdr5p ein Protokoll etabliert werden, das eine in hohem Maße reproduzierbare Rekonstitution in Liposomen ermöglicht. Die Rekonstitution von Pdr5p war bis zu einem Protein:Lipid-Verhältnis von 1:50 erfolgreich, eine weitere Erhöhung des Protein-Anteils führte zu durchlässigen Proteoliposomen mit Halbwertszeiten des passiven Lipid *Flip-Flop* von weniger als 2 Stunden.

4.2.5 Optimierung der Stabilität von N10His-Pdr5p

Die Gelfiltrationsexperimente in DDM (Abbildung 28) zeigten einen signifikanten Anteil von Pdr5p in Aggregaten. Da die Wahl des Detergenz auf die Erhaltung der Funktionalität und der oligomeren Spezies während der Reinigung einen dramatischen Einfluss haben kann (178), wurde N10His-Pdr5p mit unterschiedlichen Detergenzien unter vergleichbaren Bedingungen solubilisiert und gereinigt. Beispielhaft sind hier die Reinigungen in DDM, TDM, Digitonin und OG abgebildet (Abbildung 34).

Die Ausbeute und Reinheit von isoliertem N10His-Pdr5p war am größten in den strukturell verwandten Detergenzien DDM und TDM. Deutlich geringere Ausbeuten wurden mit Digitonin erreicht. In OG konnte N10His-Pdr5p nicht gereinigt werden. Da TDM, das bei niedrigen Temperaturen (<5 °C) spontan ausfallen kann, kein verändertes Aggregationsverhalten von N10His-Pdr5p bewirkte (Daten nicht gezeigt) und in DDM größere Ausbeuten erreicht wurden, wurde Pdr5p weiterhin in DDM gereinigt. Andere getestete Detergenzien konnten Pdr5p entweder nicht solubilisieren (z.B. Triton X-100, C₁₂E₈, FOS-CHOLINE-14, CYCLOFOS-7) oder bewirkten eine stärkere Tendenz von N10His-Pdr5p zur irreversiblen Aggregation (z.B. CHAPS oder DM).

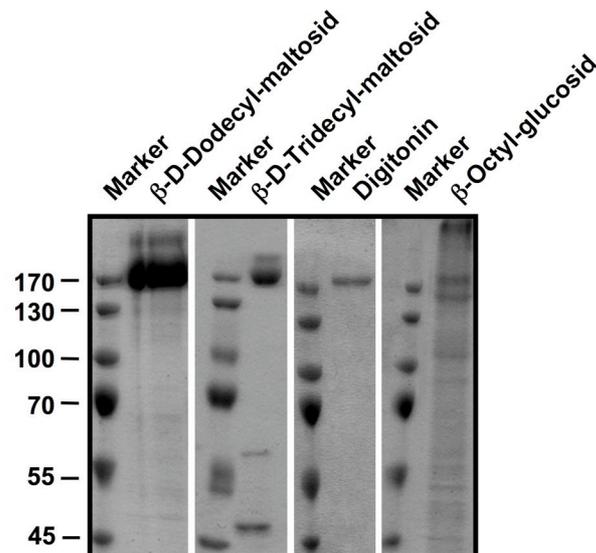


Abbildung 34 Reinigung von N10His-Pdr5p in verschiedenen Detergenzien

N10His-Pdr5p wurde aus angereicherten Plasmamembranen mit Hilfe verschiedener Detergenzien solubilisiert und gereinigt. Die Proteinkonzentration betrug bei der Solubilisation 5 mg/ml. Das Detergenz:Protein-Verhältnis (w/w) betrug während der Solubilisation 1:1 für DDM und TDM und 5:1 für Digitonin und OG. Die Wasch- und Elutionspuffer während der IMAC enthielten 0.05% DDM oder TDM bzw. 1% Digitonin oder OG. Die Coomassie Brilliantblau-gefärbte 7%ige SDS-PAGE zeigt jeweils die Elutionsfraktion der IMAC mit der höchsten Proteinkonzentration.

4.2.6 Imidazol induziert die Aggregation von N10His-Pdr5p

Die Stabilität von solubilisierten Membranproteinen hängt nicht nur vom verwendeten Detergenz ab (178). Prinzipiell kann jegliche Eigenschaft (pH-Wert, Ionenstärke, etc.) und jeder Bestandteil eines Puffers (Glyzerin, reduzierende Agentien wie DTT, divalente Ionen, etc.) die Qualität einer Proteinpräparation drastisch beeinflussen. Da bei unterschiedlichen pH-Werten und Pufferzusammensetzungen stets ein signifikanter Anteil von Pdr5p als Aggregat vorlag (4.2.2), wurde der Einfluss von Imidazol (dem Eluent der IMAC) auf das Aggregationsverhalten von N10His-Pdr5p untersucht.

Dazu wurden Elutionsfraktionen der IMAC (Proteinkonzentration 290 µg/ml; Imidazolkonzentration 105 mM) entweder direkt 1:5 mit Hefe-Puffer A + 0.05% DDM (3.6.5) oder mit Hefe-Puffer A + 0.05% DDM + 105 mM Imidazol verdünnt, für drei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration auf einer Superose 6 HR10/30 Säule untersucht (Abbildung 35).

Der Vergleich der Absorption im Ausschlussvolumen der Gelfiltration (8-9 ml) zeigte, dass bei einer Verdünnung von N10His-Pdr5p in Imidazol-freiem Puffer

deutlich weniger Pdr5p-Aggregate entstanden als bei einer Verdünnung in Puffer mit 105 mM Imidazol (Abbildung 35.A und Abbildung 35. B).

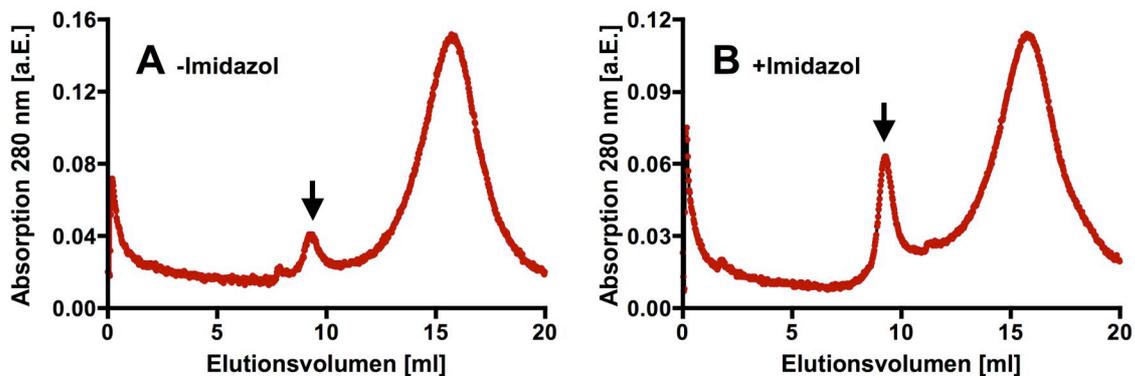


Abbildung 35 Imidazol-abhängige Aggregation von N10His-Pdr5p

N10His-Pdr5p in DDM (290 $\mu\text{g/ml}$ Proteinkonzentration) wurde nach der IMAC entweder in Puffer ohne Imidazol (-Imidazol) oder in Puffer mit 105 mM Imidazol (+Imidazol) 1:5 verdünnt und für drei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine Superose 6 HR 10/30 Säule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde Hefe-Puffer A + 0.05% DDM gewählt. Das Ausschlussvolumen der Säule beträgt 9 ml und ist durch einen Pfeil markiert.

Da Imidazol die Aggregation von N10His-Pdr5p induzierte, wurde Imidazol als Eluent der IMAC durch L-Histidin ersetzt. Die Abbildung 36 zeigt einen direkten Vergleich der Chromatogramme von N10His-Pdr5p, das entweder mit Imidazol oder L-Histidin von der IMAC Säule eluiert wurde.

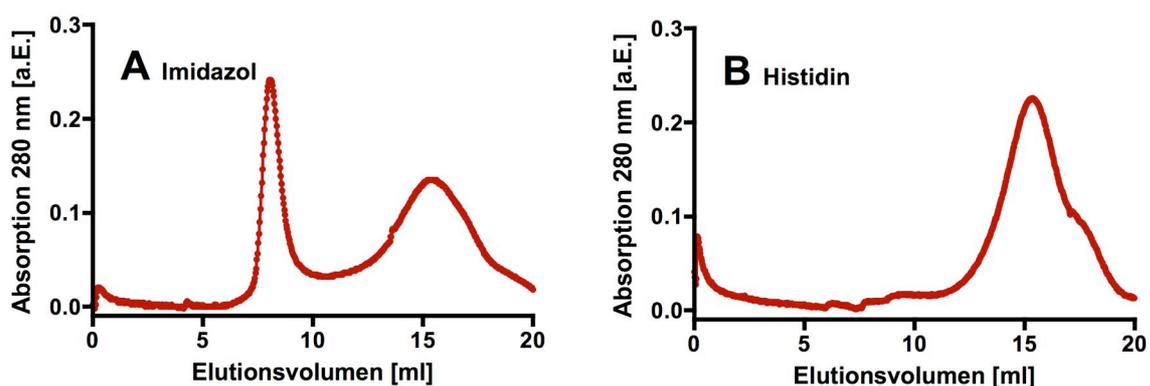


Abbildung 36 Gelfiltration von N10His-Pdr5p gereinigt mittels Imidazol oder L-Histidin

N10His-Pdr5p wurde mittels IMAC in 0.05% DDM gereinigt, durch Ultrafiltration auf 1 mg/ml konzentriert und auf eine HR10/30 Superose6 Säule aufgetragen. **A)** N10His-Pdr5p wurde während der IMAC mit Imidazol-haltigen Puffern gewaschen und mit 105 mM Imidazol eluiert. **B)** N10His-Pdr5p wurde während der IMAC mit L-Histidin-haltigen Puffern gewaschen und mit 25 mM L-Histidin eluiert.

Während bei der Reinigung von N10His-Pdr5p mit Imidazol ein deutlicher Anteil aggregierte, konnte diese Aggregation annähernd vollständig verhindert werden, indem Imidazol durch L-Histidin ersetzt wurde (Abbildung 36). Die Umstellung der IMAC von Imidazol auf L-Histidin erlaubte zum ersten Mal ein Ankonzentrieren von N10His-Pdr5p auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml ohne messbare Aggregation von Pdr5p.

4.2.7 Identifikation einer Kontamination in N10His-Pdr5p-Präparationen

Im Zuge der Optimierung des L-Histidin Stufen-Gradienten zur Reinigung von N10His-Pdr5p mittels IMAC wurde auch die ATPase-Aktivität der Elutionsfraktionen bestimmt (Abbildung 37).

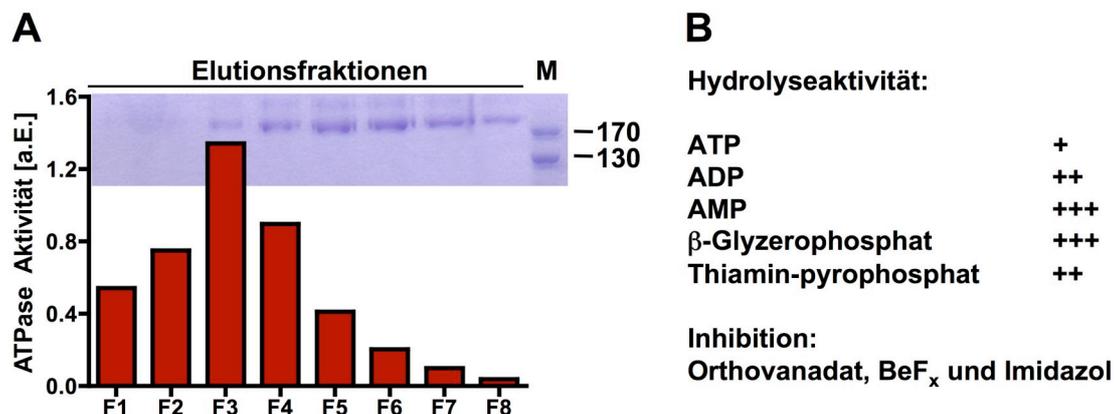


Abbildung 37 Identifizierung einer kontaminierenden Phosphatase-Aktivität

A) Die ATPase-Aktivität von N10His-Pdr5p-haltigen Elutionsfraktionen der IMAC wurde untersucht. Die entsprechenden Fraktionen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. **B)** Anorganisches Phosphat wird von unterschiedlichen Molekülen durch N10His-Pdr5p-haltige Fraktionen mit unterschiedlicher Rate freigesetzt.

Überraschenderweise musste festgestellt werden, dass unter diesen neuen Reinigungsbedingungen die Fraktion mit der höchsten ATPase-Aktivität (F3) nicht der Fraktion mit dem höchsten N10His-Pdr5p Gehalt (F5-F6) entsprach. Die beobachtete ATPase-Aktivität stammte also mit größter Wahrscheinlichkeit *nicht* von N10His-Pdr5p. Eine detailliertere Analyse der IMAC Elutionsfraktionen ergab, dass die vermeintliche Kontamination AMP und β-Glyzerophosphat mit annähernd 8-facher Rate sowie ADP und Thiamin-Pyrophosphat mit 5-facher Rate gegenüber ATP hydrolysierte. Diese Beobachtungen, zusammen mit der gemessenen

vollständigen Inhibition der Hydrolyse-Aktivität durch Orthovanadat, Berilliumfluorid und Imidazol waren ein Hinweis darauf, dass die N10His-Pdr5p-Präparationen eine Phosphatase enthielten. Die Kontamination liegt nur in äußerst geringen Mengen vor, so dass ihr in einer Coomassie Billantblau-gefärbten SDS-PAGE keine Bande zugeordnet werden konnte. Die kontaminierende Phosphatase musste daher im Vergleich zu ABC-Transportern (Wechselzahlen von bis zu 10 s^{-1}) eine deutliche höhere spezifische Aktivität (Wechselzahl $\gg 500 \text{ s}^{-1}$) haben (179,180).

4.2.8 Reinigung von N10His-Pdr5p ohne Phosphatasekontamination

Um Pdr5p ohne Kontaminationen reinigen zu können, wurde eine Doppelstrategie verfolgt: A) Um die Affinität von Pdr5p während der IMAC zu erhöhen, wurde der 10-Histidin-*tag* durch einen 14-Histidin-*tag* ersetzt und B) zur Vorreinigung von Pdr5p wurde die Präparation von Hefe-Plasmamembranen etabliert (3.6.2).

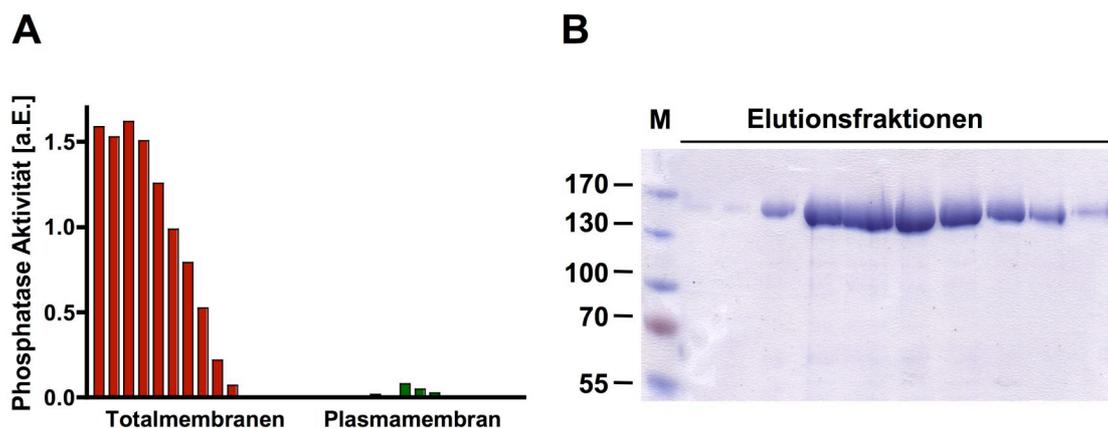


Abbildung 38 Präparation von Pdr5p ohne kontaminierende Phosphatasen

N14His-Pdr5p wurde aus angereicherten Plasmamembranen mit Hilfe von DDM solubilisiert (Proteinkonzentration der Membranen 5 mg/ml; Detergenz:Protein-Verhältnis 1:1 (w/w) und mittels IMAC gereinigt (51.3 mM L-Histidin im Elutionspuffer). **A**) Die Phosphatase-Aktivität der Elutionsfraktionen nach Reinigung aus Hefe-Gesamtmembranen wurde mit AMP bestimmt. N14His-Pdr5p aus angereicherten Hefe-Plasmamembranen zeigte keine signifikante Phosphatase-Aktivität (grüne Balken). **B**) Coomassie Billantblau-gefärbte 7%ige SDS-PAGE der Phosphatase-freien Elutionsfraktionen mit N14His-Pdr5p.

Der dramatische Effekt dieser Vorreinigung wird in Abbildung 38 dokumentiert. Während nach der Reinigung von N10His-Pdr5p (Daten nicht gezeigt) und N14His-Pdr5p aus Hefe-Gesamtmembranen eine Phosphatase-Aktivität

messbar blieb, konnte diese Kontamination durch die Reinigung von Pdr5p aus angereicherten Hefe-Plasmamembranen quantitativ abgetrennt (Abbildung 38). Diese optimierten N14His-Pdr5p-Präparationen waren mehr als 95% rein und frei von messbaren Kontaminationen durch andere ATPasen und/oder Phosphatasen. N14His-Pdr5p verlor offensichtlich im Verlauf der Solubilisierung und Reinigung seine ATPase-Aktivität und konnte auch durch Zugabe von Substraten und/oder Lipiden nicht aktiviert werden.

4.2.9 Bindung von ATP an N14His-Pdr5p

Da homogenes N14His-Pdr5p in Detergenzlösung keine messbare ATPase-Aktivität aufwies, stellte sich die Frage, ob N14His-Pdr5p in Detergenzlösung ATP überhaupt binden kann. Dazu wurde N14His-Pdr5p in DDM oder Digitonin gereinigt, gegen Hefe-Puffer A (+0.05% DDM oder +1% Digitonin) dialysiert und das Bindungsverhalten an ATP-Agarose (C8 über 9 Platzhalteratome an Agarose gekoppelt) analysiert (Abbildung 39).

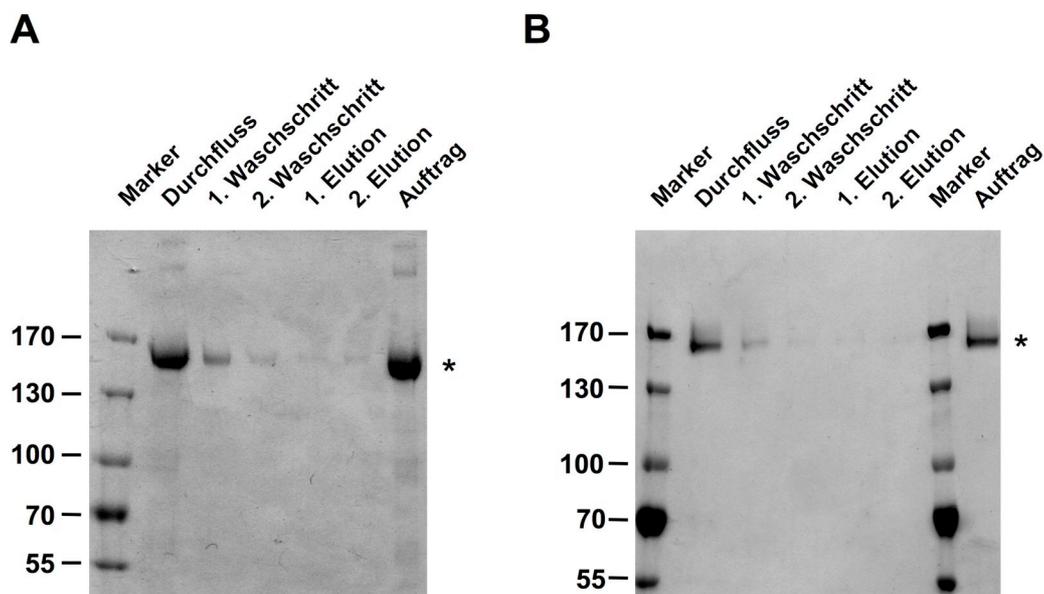


Abbildung 39 Bindungsstudien von N14His-Pdr5p an ATP-Agarose

A) N14His-Pdr5p wurde in 0.05% DDM gereinigt und gegen Hefe-Puffer A (+0.05% DDM) dialysiert. Die Coomassie Brillantblau-gefärbte 7%ige SDS-PAGE zeigt die Bindungsstudie von N14His-Pdr5p in DDM an C8-gekoppelte ATP-Agarose in Abwesenheit von $MgCl_2$. **B)** N14His-Pdr5p wurde in 1% Digitonin gereinigt und gegen Hefe-Puffer A (+1% Digitonin) dialysiert. Die Silber-gefärbte 7%ige SDS-PAGE zeigt die Bindungsstudie von N14His-Pdr5p in Digitonin an C8 gekoppelte ATP-Agarose in Abwesenheit von $MgCl_2$.

Die Bindungsstudien zeigten, dass weder in Digitonin noch in DDM solubilisiertes Pdr5p spezifisch mit C8-gekoppelter ATP-Agarose interagiert und sich annähernd quantitativ im Durchfluss befand. Auch die Wiederholung der Interaktionsstudien in An- und Abwesenheit von $MgCl_2$ sowie die Verwendung von ADP-Agarose zeigten, dass gereinigtes Pdr5p keine Nukleotide bindet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten Kontrollexperimente mit der isolierten Wildtyp TAP1-NBD und dem gereinigten ABC-Transporter LmrA aus *Lactococcus lactis*, dass ABC-NBDs mit C8-gekoppelter ATP/ADP-Agarose interagieren können (Daten nicht gezeigt). Um eine komplette Entfaltung von N14His-Pdr5p durch DDM während der Solubilisierung und Reinigung ausschließen zu können, wurde gereinigtes N14His-Pdr5p mit Hilfe von CD-Spektroskopie untersucht.

4.2.10 CD-Spektroskopie an N14His-Pdr5p in DDM

Mittels CD-Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen und deren Veränderungen während der Proteinfaltung oder aufgrund von Konformationsänderungen bestimmt werden. Um eine komplette Denaturierung von N14His-Pdr5p im Zuge der Solubilisierung und Reinigung ausschließen zu können, wurde gereinigtes N14His-Pdr5p (Endkonzentration im Spektrometer 200 $\mu\text{g/ml}$) nach Dialyse gegen Hefe-Puffer A +0.05% DDM (3.6.5) vermessen (Abbildung 40, grün).

Das für Pdr5p gemessene „W-förmige“ Spektrum mit zwei Minima bei 207.5 nm und 225 nm ist charakteristisch für ein hauptsächlich α -helikales Protein (181). Eine Hitzedenaturierung von N14His-Pdr5p durch Inkubation bei 90°C bewirkte einen vollständigen Verlust der α -Helizes und zeigte ein Spektrum typisch für ein entfaltetes Protein, frei von Sekundärstrukturen (Abbildung 40, rot). Inkubation von N14His-Pdr5p mit 1%-SDS führte nicht zu dem Verlust der α -helikalen Anteile in N14His-Pdr5p (Abbildung 40, gelb). Im Kontrast dazu induzierte SDS eine Verschiebung des Signals im Bereich von 203 nm – 220 nm zu stärker negativen Werten, was sich durch den Verlust der β -Faltblätter in den NBDs von Pdr5p erklären lässt.

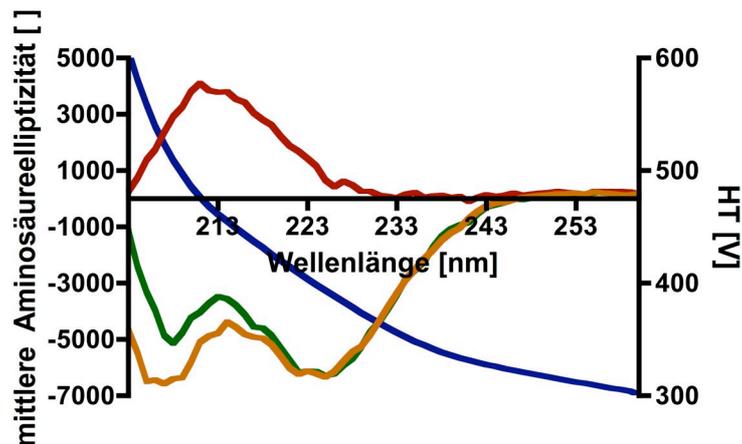


Abbildung 40 CD-Spektroskopie an N14His-Pdr5p in DDM

N14His-Pdr5p wurde in Hefe-Puffer A (+0.05% DDM) dialysiert und entweder zunächst 10 Minuten bei 90°C (Hitzenaturierung, rot), mit 1% SDS inkubiert (Denaturierung durch SDS, gelb) oder direkt mittels eines CD-Spektrometers vermessen (grün). Die blaue Kurve zeigt das Spannungssignal des Detektors; bei Werten über 600 V ist das Signal für die gemessene Elliptizität nicht mehr verlässlich und wurde daher nicht mehr aufgetragen. Die mittlere Aminosäureelliptizität wurde gemäß Gleichung 6 ermittelt.

Die durch CD-Spektroskopie gewonnenen Daten widerlegen eine komplette Entfaltung von Pdr5p durch DDM. Der SDS-induzierte Verlust von β -Faltblättern impliziert vielmehr, dass die NBDs von Pdr5p in DDM vermutlich korrekt gefaltet war. Trotz einer offenbar korrekten Faltung ist gereinigtes N14His-Pdr5p also in Detergenzlösung nicht funktional. Um die Ursache und den genauen Zeitpunkt des Aktivitätsverlustes untersuchen zu können, mussten Funktionalitätstests etabliert werden, welche die Aktivitätsbestimmung von Pdr5p während jedes Schrittes der Präparation ermöglicht. Die zentrale Voraussetzung für die Messung der Pdr5p-spezifischen Aktivität im Hintergrund der gesamten Hefezelle oder im Hintergrund der angereicherten Plasmamembran war allerdings die Verfügbarkeit von *PDR5*-Mutanten, die keine ATPase-Aktivität und/oder keinen ATP-abhängigen Transport aufweisen.

4.3 Funktionale Analyse von *PDR5* und *PDR5*-Mutanten

4.3.1 Klonierung einer *PDR5 Knock-in* Kasette

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellte *PDR5 Knock-in* Kasette erlaubt die zielgerichtete, chromosomale Mutagenese von *PDR5*. Die besondere Herausforderung bestand darin, die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten, zufälligen Mutationen bei diesem Schritt zu minimieren. Aus diesem Grund wurde die *PDR5 Knock-in* Kasette mit DNA-Sequenzen aus dem *PDR5*-Lokus flankiert, um die Transformation und die resultierende homologe Rekombination ohne zusätzlichen PCR-Schritt zu ermöglichen. Die genauen Klonierungsschritte zur Konstruktion der *PDR5 Knock-in* Kasette und des spezialisierten Klonierungsstammes ($\Delta PDR5 \Delta PDR5prom$) sind in 3.2.3 beziehungsweise in 3.2.5 beschrieben. Im Anhang findet sich eine Vektorkarte des Plasmids pRE5, das die *PDR5 Knock-in* Kasette trägt.

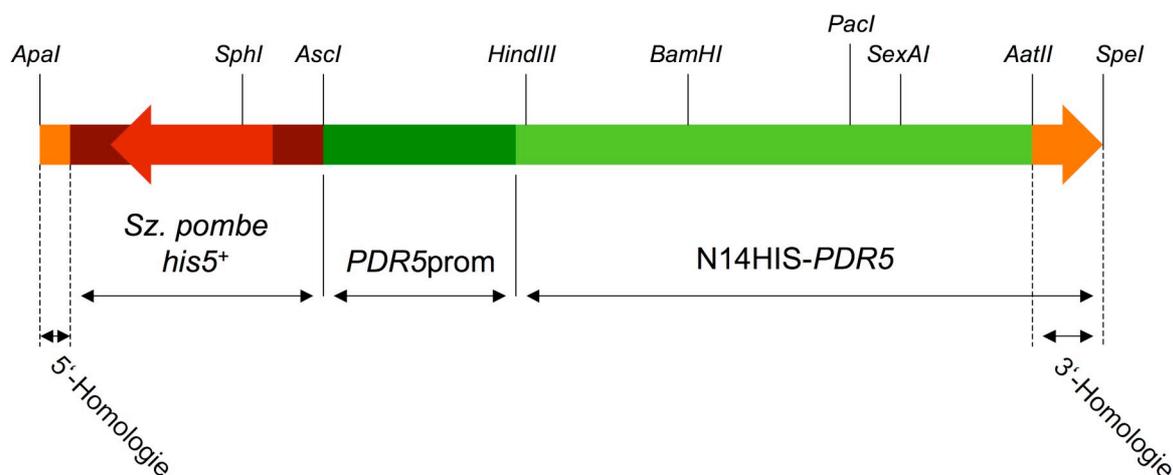


Abbildung 41 Die *PDR5 Knock-in* Kasette

Die Abbildung zeigt die mittels der einmalig vorhandenen Schnittstellen *ApaI* und *SpeI* aus pRE5 gewonnene *PDR5 Knock-in* Kasette, die aus drei Modulen besteht: Dem *Sz. pombe his5⁺* Modul (Rot) mit Tef-Promotor und Terminator (Dunkelrot), dem *PDR5*-Promotor (Dunkelgrün) und den für N14His-Pdr5p kodierenden Sequenzen (Hellgrün). Die drei Module werden von Sequenzen flankiert, die zum *PDR5*-Lokus homolog sind und die homologe Rekombination ermöglichen (Orange).

Die *PDR5 Knock-in* Kasette kann zur der Transformation des Klonierungsstammes ohne PCR-Schritt aus pRE5 durch die einmalig vorhandenen Schnittstellen *ApaI* und *SpeI* gewonnen werden und umfasst ein *Sz. pombe his5⁺*

Modul als Auxotrophiemarker, den *PDR5*-Promotor sowie das gesamte *PDR5* Gen mit zusätzlichen Sequenzen für einen N-terminalen und entfernbaren 14-Histidin-tag, welcher die Reinigung von *PDR5*-Mutanten ermöglicht (Abbildung 41).

Durch Ausnutzung der einmalig vorhandenen Schnittstellen *HindIII*, *BamHI*, *PacI*, *SexAI* und/oder *AatII* könnte diese Kasette sogar zur heterologen Überexpression von beliebigen Genen aus beliebigen Organismen genutzt werden.

4.3.2 Die Mutagenese von *PDR5*

Voraussetzung für die funktionale Analyse von Pdr5p *in vivo* und *in vitro* war die Verfügbarkeit einer Pdr5p-Mutante, die weder die vielfältigen Substrate des Multidrogentransporters transportieren, noch ATP hydrolysieren kann. Die Sequenzanalysen von Genen der PDR-Familie in *S. cerevisiae* und anderen Pilzen zeigte eine bemerkenswerte Sequenzkonservierung zwischen den verschiedenen Multidrogentransportern. Beispielsweise ist die Sequenzidentität von *CDR1* aus *C. albicans* und *PDR5* aus *S. cerevisiae* größer 70%.

		Walker A		Walker B	
				C-loop	H-loop
Konsensus		GXXGXGKST-----		LSGGQ--hhhhDE--	H-
NBD1	<i>S. cerevisiae PDR5</i>	GRPGSGCTT-----		VSGGE--FQCWDN--	YQ
	<i>S. cerevisiae PDR15</i>	GRPGSGCTT-----		VSGGE--FQCWDN--	YQ
	<i>S. cerevisiae PDR10</i>	GRPGAGCTT-----		VSGGE--FQCWDN--	YQ
	<i>C. glabrata CDR1</i>	GRPGSGCTT-----		VSGGE--FQCWDN--	YQ
	<i>C. albicans CDR1</i>	GRPGAGCST-----		VSGGE--IQCWDN--	YQ
	<i>C. dubliniens CDR1</i>	GRPGAGCST-----		VSGGE--IQCWDN--	YQ
	<i>C. albicans CDR2</i>	GRPGAGCST-----		VSGGE--IQCWDN--	YQ
<i>C. dubliniens CDR2</i>	GRPGAGCST-----		VSGGE--IQCWDN--	YQ	
NBD2	<i>S. cerevisiae PDR5</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LVFLDE--	HQ
	<i>S. cerevisiae PDR15</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LVFLDE--	HQ
	<i>S. cerevisiae PDR10</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LVFLDE--	HQ
	<i>C. glabrata CDR1</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LVFLDE--	HQ
	<i>C. albicans CDR1</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LLFLDE--	HQ
	<i>C. dubliniens CDR1</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LLFLDE--	HQ
	<i>C. albicans CDR2</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LLFLDE--	HQ
<i>C. dubliniens CDR2</i>	GASGAGKTT-----		LNVEQ--LLFLDE--	HQ	

Abbildung 42 Sequenz-alignment einiger ABC-Transporter der PDR-Familie

Das Sequenz-alignment wurde mit Hilfe des *ClustalW Webinterface* (www.ebi.ac.uk/clustalw) erstellt und zeigt Auszüge aus den NBD-Sequenzen ausgewählter ABC-Transporter der PDR-Familie. Die verschiedenen Farben kennzeichnen hochkonservierte Sequenzen der NBDs. Die Anzahl der Bindestriche kennzeichnet den Abstand der Sequenzmotive in der Primärsequenz. Eingrahmt sind Reste, die im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurden.

Die NBDs der PDR-Familie weisen bemerkenswerte Abweichungen von der Konsensussequenz auf (Abbildung 42). Besonders eminent ist dabei die N-terminale

NBD (NBD1), die weder das Lysin der Walker A Sequenz, noch das Glutamat C-terminal der Walker B Sequenz, noch das Histidin des H-loop trägt. Im Gegensatz dazu sind diese hochkonservierten und katalytisch bedeutsamen Reste in den C-terminalen NBDs (NBD2) erhalten. Anhand der Sequenzanalyse lässt sich also bereits vermuten, dass die C-terminale NBD vermutlich eine höhere ATP-Hydrolyserate besitzt, während der N-terminalen NBD möglicherweise eine regulatorische Aufgabe zukommt.

Hauptziel der Mutagenesestudien war es zunächst, eine Pdr5p-Mutante zu etablieren, die nicht in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren und Substrate aktiv zu transportieren. Des Weiteren sollten die in *PDR5* eingeführten Mutationen Aufschluss über drei spezifische Fragen geben: i) Sind die NBDs von Pdr5p funktional asymmetrisch oder äquivalent? ii) Ist in der C-terminalen NBD von Pdr5p, ähnlich wie in der NBD von HlyB aus *E. coli* eine katalytische Dyade aus Histidin und Glutamat wirksam? Und iii) Hat das in der PDR-Familie hochkonservierte Glutamin, das in der C-terminalen NBD direkt an das konservierte Histidin des H-loop anschließt, eine wichtige Rolle in der ATP-Hydrolyse und sorgt es für eine Redundanz als Wasserstoffbrückendonator in der Stabilisierung des pentakovalenten Übergangszustands bei der Abspaltung des γ -Phosphats von ATP?

i) Um die relative Bedeutung der beiden Pdr5p-NBDs zu unterscheiden, wurden die C199A-Mutante (Walker A Sequenz der N-terminalen NBD) und die K911A-Mutante (Walker A Sequenz der C-terminalen NBD) gewählt und als Einzel- und Doppelmутanten in *PDR5* eingeführt. Beide Reste wurden in unabhängigen Studien als essentiell für die Funktionalität beschrieben (Abbildung 42).

ii) Um die Existenz einer katalytischen Dyade aus Histidin (H1068) und Glutamat (E1036) zu überprüfen und um ihre relative Bedeutung in der ATP-Hydrolyse und im Drogentransport untersuchen zu können, wurden analog zu den Studien in der isolierten TAP1-NBD auch von diesen beiden Resten Einzel- und Doppelmутanten erzeugt.

iii) Die Doppelmутante (H1068A/Q1069A) wurde erzeugt um eine mögliche Beteiligung des zweiten Wasserstoffbrückengebers (Q1069) im H-loop an der Hydrolyse von ATP zu untersuchen.

4.3.3 *PDR5*-Expressionslevel in *PDR5*-Mutanten

Die Überexpression von Wildtyp *PDR5* und seinen Mutanten sowie das Maß der *PDR5*-Expression in Hefestämmen mit Deletionen im *PDR5*-Lokus (Promotor und/oder Gen) wurden mit Hilfe von Ganzzellextrakten und Immuno-Blot untersucht (Abbildung 43).

Das Fusionsprotein aus Pdr5p und einem N-terminalen 14-Histidin-*tag* (N14His-PDR5) wurde im gleichen Maß überproduziert wie Wildtyp Pdr5p (YALF A1). Zusätzlich zeigt Abbildung 43, dass in exponentiell wachsenden Zellen alle erzeugten Mutanten in vergleichbaren Mengen vorlagen. Erwartungsgemäß konnte in Proteinextrakten aus $\Delta PDR5$ -Zellen kein Pdr5p detektiert werden. Auch in den Zellextrakten von $\Delta PDR5$ prom- und $\Delta PDR5\Delta PDR5$ prom-Zellen konnte kein Pdr5p nachgewiesen werden. Der W303-Stamm produzierte geringere Mengen Pdr5p, weil er im Gegensatz zu den Überexpressionsstämmen keinen *pdr1-3* Stammhintergrund besitzt.

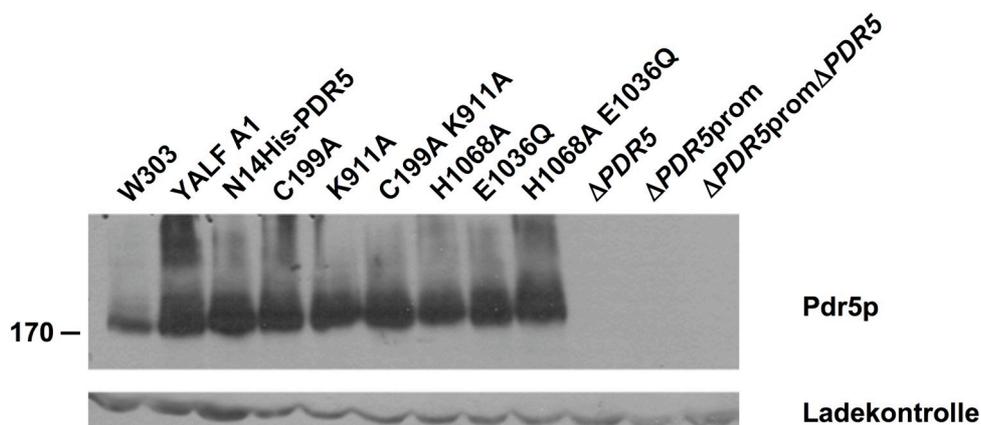


Abbildung 43 Expression von *PDR5*-Mutanten

Die Abbildung zeigt einen α -Pdr5p Immunoblot mit Ganzzellextrakten aus Stämmen mit verschiedenen Pdr5p-Varianten. Die *PDR5*-Mutanten wurden durch zielgerichtete Mutagenese von Wildtyp *PDR5* erzeugt. Wildtyp N14His-Pdr5p sowie alle generierten Pdr5p-Mutanten tragen einen N-terminalen 14-Histidin-*tag*. Als Kontrollstamm dient der $\Delta PDR5$ -Stamm mit deletiertem *PDR5*. Proteinextrakte aus 0.4 OD₆₀₀ Äquivalenten exponentiell wachsender Zellen wurden in einer 7%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Immuno-Blot mit einem polyklonalen α -Pdr5p-Antikörper detektiert.

4.3.4 Funktionalität von *PDR5* und *PDR5*-Mutanten auf Drogen-Agar-Platten

Zunächst wurde die Funktionalität von N14His-Pdr5p und seinen Mutanten anhand der von Pdr5p-vermittelten Drogenresistenz in ganzen Zellen auf verschiedenen Drogen-Agar-Platten getestet (Abbildung 44).

Zwischen Wildtyp *PDR5*-überexprimierenden Zellen (YALF A1) und N14His-Pdr5p-produzierenden Zellen (N14His-PDR5) konnte auf Drogen-Agar-Platten kein unterschiedliches Wachstumsverhalten beobachtet werden. Ein N-terminale 14-Histidin-*tag* scheint also die Funktion von Pdr5p nicht zu stören. Allerdings zeigte auch der W303-Stamm, der *PDR5* in einem Wildtyp *PDR1* Stammhintergrund exprimiert (keine Überexpression), auf allen Drogen-Agar-Platten ein unverändertes Wachstum.

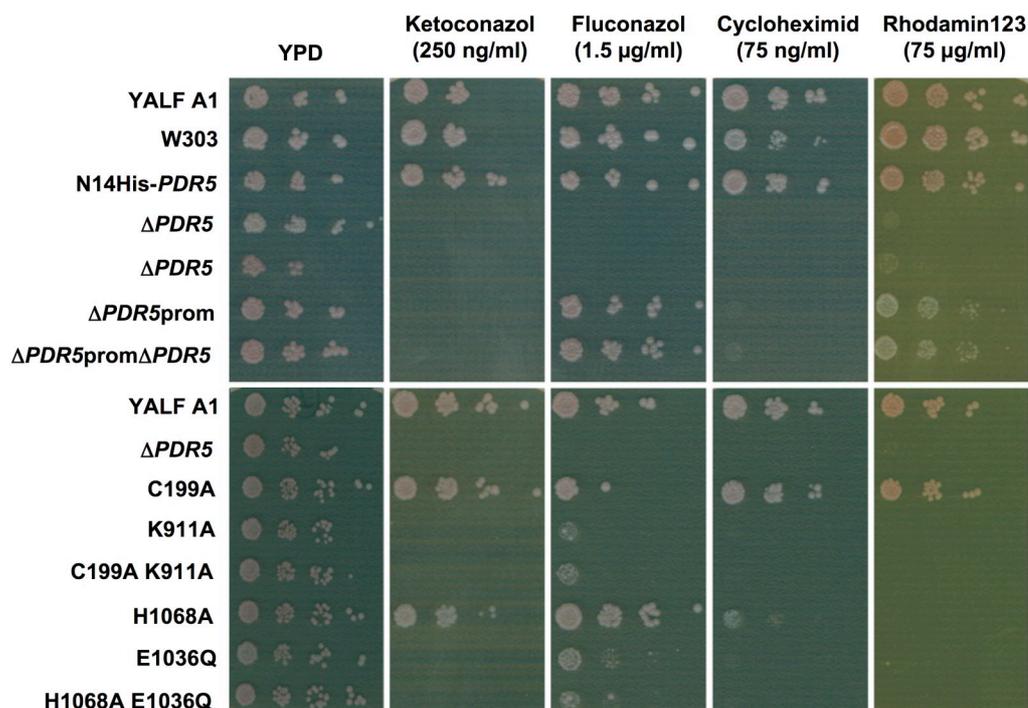


Abbildung 44 Pdr5p-vermittelte Drogenresistenz auf Drogen-Agar-Platten

Ein Drogenresistenz-Assay gegen Ketoconazol (250 ng/ml), Fluconazol (1.5 µg/ml), Cycloheximid (75 ng/ml) und Rhodamin123 (75 µg/ml) wurde mit Hefestämmen durchgeführt, die *PDR5* und *PDR5*-Mutanten exprimieren sowie mit dem Δ *PDR5*-Stamm und spezialisierten Klonierungsstämmen. *PDR5*-überexprimierende Zellen, ansonsten isogene Δ -Stämme, in denen entweder weite Teile des *PDR5*-Gens und/oder des *PDR5*-Promotors deletiert wurden sowie *PDR5*-Mutanten-überexprimierende Zellen wurden in YPD-Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1$) angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 0.2 verdünnt und jeweils 5 µl einer seriellen Verdünnung dieser Zellen (10^0 bis 10^{-2}) auf Drogen-Agar-Platten übertragen. Die Drogen-Agar-Platten wurden bei 30°C für 48h im Dunkeln inkubiert.

Die Deletion von *PDR5* ($\Delta PDR5$) bedeutete für die entsprechenden Zellen den Verlust der Resistenz gegen alle getesteten Drogen. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, in denen entweder nur der *PDR5*-Promotor ($\Delta PDR5$ prom) oder der *PDR5*-Promotor und weite Teile von *PDR5* deletiert wurden ($\Delta PDR5$ prom $\Delta PDR5$), eine Resistenz gegen Fluconazol und Rhodamin123. Da diese Zellen keine detektierbaren Mengen von *PDR5* exprimieren (Abbildung 43), war die beobachtete Drogenresistenz wahrscheinlich Pdr5p-unabhängig. Dieses überraschende Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass noch weitere Gene im Zusammenhang mit in der zellulären Drogenresistenz und unter der Kontrolle des *PDR5*-Promotors (Position -1 bis -800 bp vom Startkodon) stehen.

Der in der Walker A Sequenz der N-terminalen NBD der PDR-Familie konservierte Rest C199 schien keine essentielle Bedeutung für den Drogentransport zu haben, da die Mutation C199A keinen Einfluss auf die Drogenresistenz hatte. Im Gegensatz dazu führte die Mutation K911A in der Walker A Sequenz der C-terminalen NBD von Pdr5p zum totalen Verlust der Resistenz gegen alle getesteten Substanzen (mit der erwähnten Ausnahme einer schwachen Fluconazol-Resistenz). Zusammenfassend belegen diese Daten eine deutliche Asymmetrie der NBDs. Eine funktionale C-terminale NBD ist für den Drogentransport durch Pdr5p unerlässlich, während die ATP-Hydrolyse in der N-terminalen NBD vermutlich eine untergeordnete oder regulatorische Rolle spielt.

Die Mutagenese beider Reste der katalytischen Dyade in der C-terminalen NBD (H1068A und E1036Q) erzeugte einen Drogen-Resistenzphänotyp vergleichbar mit einem *PDR5 Knock-out* (außer einer schwachen Resistenz gegen Fluconazol). Dieses Ergebnis belegt, dass eine funktionale C-terminale NBD für den Drogentransport essentiell ist. Überraschenderweise zeigte die Einzelmutante H1068A nur einen teilweisen Verlust der Drogenresistenz und eine veränderte Substratspezifität. Die H1068A-Mutante zeigte eine mit Wildtyp Pdr5p vergleichbare Resistenz gegen Ketoconazol und Fluconazol, aber eine deutlich verringerte Drogenresistenz gegen Cycloheximid und keine detektierbare Resistenz gegen Rhodamin123. Im Gegensatz dazu vermittelten die E1036Q-Mutante und die Doppelmutante E1036Q/H1068A einen Drogenresistenzphänotyp, der bis auf eine schwache Resistenz gegen Fluconazol mit einem *PDR5 Knock-out* vergleichbar war.

Diese Ergebnisse belegen eine bedeutende Rolle des konservierten Glutamats für die Funktionalität von Pdr5p, während das konservierte Histidin keine essentielle Rolle für den Drogentransport zu spielen scheint.

4.3.5 Ein Zell-basierter Efflux-Assay

Um die Funktionalität von Pdr5p und den erzeugten Mutanten mit einer alternativen Methode zu testen, wurde ein fluoreszenz-basierter Efflux-Assay mit Rhodamin6G durchgeführt.

Dazu wurden Hefezellen mit unterschiedlichen *PDR5*-Varianten zunächst durch Inkubation mit 2-deoxy-D-Glukose, einem Glykolyse-Inhibitor, und Rhodamin6G, einem Inhibitor der mitochondrialen ATP-Synthase, deenergetisiert, und mit Rhodamin6G beladen. Die Konzentration von Rhodamin6G wurde so gewählt, dass der Fluorophor innerhalb der Zellen in so hohen, lokalen Konzentrationen vorlag, dass er nicht fluoreszierende Eximere bildete. Der Pdr5p-vermittelte Efflux von Rhodamin6G wurde indirekt anhand der Glukose-stimulierten Fluoreszenzzunahme bestimmt. Bei Zugabe einer Energiequelle (Glukose) zu Rhodamin6G-beladenen und deenergetisierten Zellen stieg der intrazelluläre ATP-Spiegel innerhalb von Sekunden an und ermöglichte einen Pdr5p-abhängigen Efflux von Rhodamin6G.

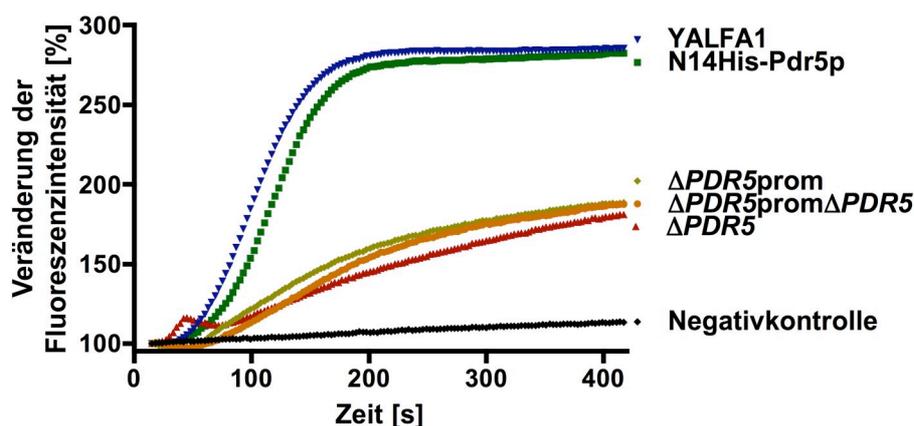


Abbildung 45 Efflux von Rhodamin6G aus energetisierten Zellen

Wie in 3.5.3 beschrieben wurden deenergetisierte und mit Rhodamin6G-beladene Zellen durch Zugabe von Glukose zum Zeitpunkt 0s energetisiert. Die resultierende Fluoreszenzzunahme wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers in Echtzeit beobachtet und war abhängig von Pdr5p. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht energetisiert wurden.

Nach Energetisierung von *PDR5*-überexprimierenden Zellen (YALF A1) konnte eine Fluoreszenzzunahme in Echtzeit beobachtet werden (Abbildung 45). Der Grund für die Fluoreszenzzunahme ist vermutlich die aktive Extrusion des Fluorophors in das umliegende Medium, was eine effektive Verdünnung des Fluorophors in der Membran und somit eine Reduktion der effektiven Eximerkonzentration bedeutete.

Wildtyp Pdr5p und N14His-Pdr5p überproduzierende Zellen (YALF A1 bzw. N14HIS-PDR5) extrudierten Rhodamin6G nach Energetisierung durch Glukose mit ähnlicher Kinetik ins umliegende Medium (Abbildung 45). Im Gegensatz dazu verlief die Fluoreszenzzunahme in Zellsuspensionen, die kein Pdr5p produzieren ($\Delta PDR5$, $\Delta PDR5prom$, $\Delta PDR5\Delta PDR5prom$) deutlich langsamer (Abbildung 45).

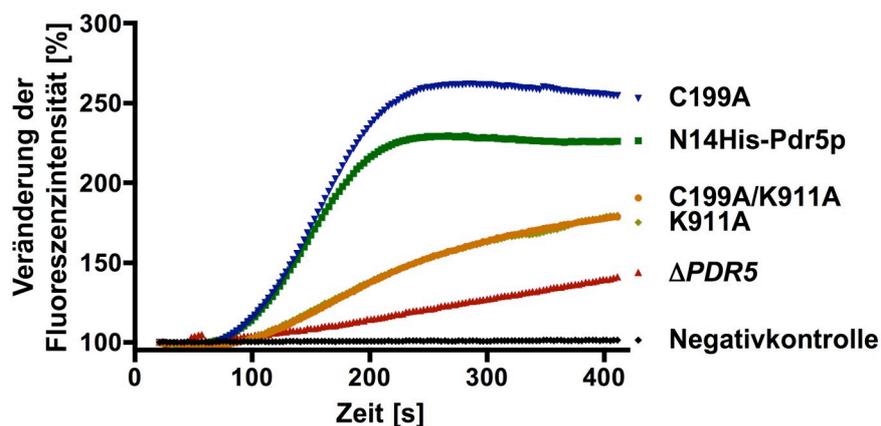


Abbildung 46 Efflux von Rhodamin6G durch *PDR5*-Mutanten der Walker A Sequenzen

Der zell-basierte Efflux-Assay wurde wie in Abbildung 45 beschrieben durchgeführt. Es wurden die *PDR5*-Mutanten C199A, K911A und die Doppelmutante C199A/K911A vermessen.

Die Untersuchung von *PDR5*-Mutanten in der Walker A Sequenz der N-terminalen und C-terminalen NBD bestätigte qualitativ die Ergebnisse der Drogen-Agar-Platten (Abbildung 46). Der energieabhängige Drogentransport war in der C199A-Mutante voll erhalten und wurde im Kontrast dazu durch die K911A-Mutation drastisch reduziert. Dennoch war eine geringe Restaktivität der Einzelmutante K911A und der Doppelmutante C199A/K911A im Vergleich zum *PDR5* Knock-out in diesem zell-basierten Assay zu erkennen.

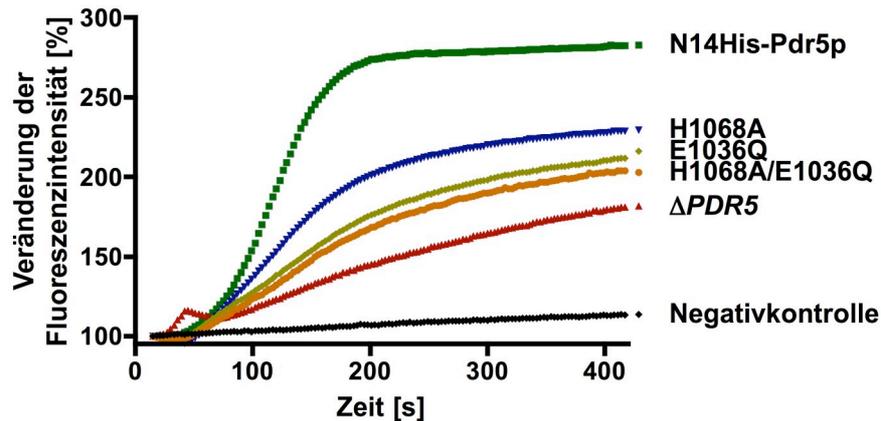


Abbildung 47 Efflux von Rhodamin6G durch *PDR5*-Mutanten der C-terminalen NBD

Der zell-basierte Efflux-Assay wurde wie in Abbildung 45 beschrieben durchgeführt. Es wurden die *PDR5*-Mutanten E1036Q, H1068A und die Doppelmutante E1036Q/H1068A vermessen.

Auch die Untersuchung der in isolierten NBDs identifizierten katalytischen Dyade aus dem Achsnagel-Histidin (H1068) und dem konserviertem Glutamat (E1036) in der C-terminalen NBD von Pdr5p konnte die Ergebnisse der Drogen-Agar-Platten qualitativ bestätigen. Während Zellen mit einer Pdr5p-Einzelmutante E1036Q und einer Pdr5p-Doppelmutante E1036Q/H1068A Rhodamin6G mit annähernd identischer Kinetik aus den Zellen transportierten und sich nur geringfügig von $\Delta PDR5$ -Zellen unterschieden, zeigten Zellen mit einer Pdr5p-Mutation des Achsnagel-Histidins (H1068A) in mehreren Experimenten eine ungefähr zweifach höhere Extrusionsrate.

Zusammenfassend erlaubt der zell-basierte Efflux-Assay eine semi-quantitative Analyse des Einflusses von Pdr5p-Mutationen auf die Transport-Aktivität. Ein zentraler Nachteil dieser Methode bleibt allerdings, dass lediglich Transportvorgänge entlang eines Gradienten gemessen werden. Eine endgültige Aussage darüber, ob Pdr5p tatsächlich aktiv Rhodamin6G transportiert, lässt sich nur treffen, wenn Rhodamin6G durch Pdr5p ATP-abhängig und gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert wird. Die beobachtete Restaktivität der NBD-Mutanten im Vergleich zum *PDR5 Knock-out* könnte nämlich auch durch eine erleichterte Diffusion der Rhodamin6G-Moleküle durch die TMDs von Pdr5p verursacht werden. Trotz dieser Schwächen unterstützen die gewonnenen Daten, dass i) die N-terminale NBD eine untergeordnete Rolle im aktiven Drogentransport

hat, ii) die ATP-Hydrolyse in der C-terminalen NBD für den Drogentransport essentiell ist, iii) eine katalytische Dyade aus E1036 und H1068 in Pdr5p nicht strikt wirksam ist und iv) das Glutamat E1036 für die Funktionalität dieses eukaryotischen Multidrogentransporters eine größere Bedeutung hat als das H1068 des H-loop.

4.3.6 Präparation hochhomogener Hefe-Plasmamembranen

Wie bereits beschrieben verlor Pdr5p durch Solubilisierung und Reinigung in verschiedenen Detergenzien seine Aktivität (4.2.8, 4.2.9). Eine mechanistische Analyse des Mechanismus der ATP-Hydrolyse und der Kopplung zwischen NBDs und TMDs setzt also bereits vor der Solubilisierung einen Aktivitäts-Assay für den Pdr5p-spezifischen Transport und die Pdr5p-spezifische ATPase voraus. Um möglichst homogene Hefe-Plasmamembranen zu gewinnen, wurden zunächst zwei klassische Verfahren zur Reinigung von Plasmamembranen kombiniert (Abbildung 48).

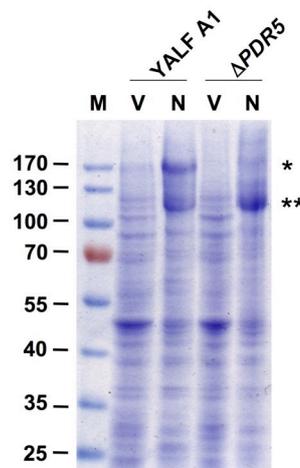


Abbildung 48 Gewinnung hochhomogener Plasmamembranen

Angereicherte Plasmamembranen von *PDR5*-überexprimierenden Zellen (YALF A1) und isogenen $\Delta PDR5$ -Zellen wurden wie in 3.6.3 präpariert (V). Durch selektive Präzipitation und Abtrennung der Mitochondrien (N) wurden hochhomogene Plasmamembranen gewonnen. Jeweils 15 μ g (Protein) der gewonnenen Membranen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Durch die Präzipitation der Mitochondrien wurden für YALF A1 zwei Banden (*) und (**) deutlich angereichert, während für den $\Delta PDR5$ nur eine Bande sichtbar angereichert wurde (**). Immuno-Blots mit einem α -Pdr5p-Antikörper und einem α -Pma1p-Antikörper bestätigten, dass die Bande (*) Pdr5p entspricht und die Bande (**) der Protonenpumpe Pma1p entspricht.

Nach Gewinnung angereicherter Plasmamembranen wurde durch die selektive Präzipitation von Mitochondrien eine hochhomogene Plasmamembran isoliert. Durch anschließende Saccharosegradient Dichtezentrifugation konnten Plasmamembranen sogar noch weiter angereichert werden (Daten nicht gezeigt), was allerdings zu einem signifikanten Verlust von Pdr5p-spezifischer Aktivität führte und deshalb nicht als zusätzlicher Reinigungsschritt geeignet war.

Durch die Etablierung und Optimierung der Plasmamembran-Präparation, konnten hochhomogene Plasmamembranen von allen erstellten *PDR5*-Varianten gewonnen werden. Die Proteinzusammensetzung der verschiedenen Präparationen erschien in einer Coomassie Brilliantblau-gefärbten SDS-PAGE (bis auf das Fehlen von Pdr5p im $\Delta PDR5$ -Stamm) identisch (Abbildung 49).

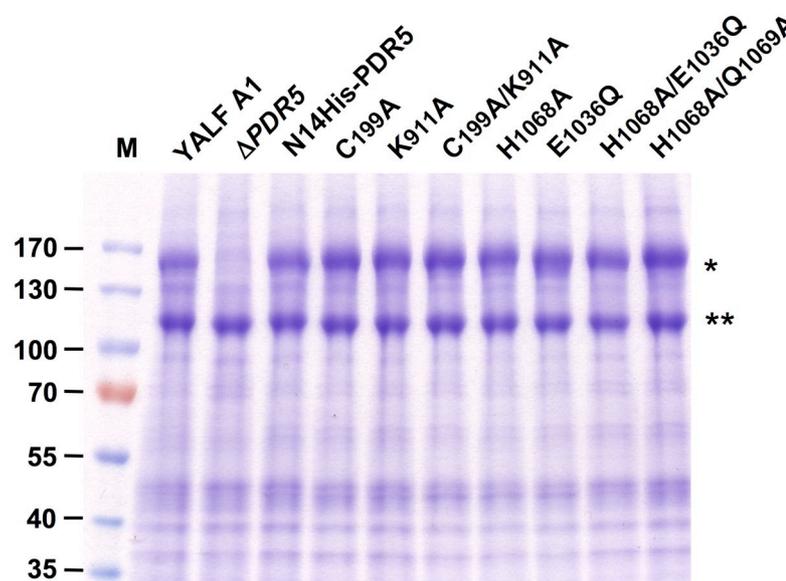


Abbildung 49 Hochhomogene Plasmamembranen verschiedener *PDR5*-Varianten

Jeweils 15 μg hochhomogener Plasmamembranen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Die Bande (*) entspricht verschiedenen Varianten und Mutanten von Pdr5p, die Bande (**) entspricht der Plasmamembran Protonenpumpe Pma1p.

4.3.7 Aktiver Rhodamin6G-Transport in Hefe Plasmamembranen

Die Pdr5p-vermittelte Drogentransport-Aktivität wurde mittels Rhodamin6G in hochhomogenen Plasmamembranen untersucht (25). In Anwesenheit von ATP/Mg²⁺ reduzierte sich das Rhodamin6G-Fluoreszenzsignal in Membranpräparationen von *PDR5*-überexprimierenden Zellen rasch (Abbildung 50). Diese Fluoreszenz-auslöschung konnte nicht beobachtet werden, wenn die Membranen eines

ansonsten isogenen $\Delta PDR5$ -Stammes verwendet wurden (Abbildung 49). Die für die Fluoreszenzlöschung verantwortliche Reaktion konnte durch nanomolare Konzentrationen Oligomycin, mikromolare Konzentrationen BeF_x und Orthovanadat sowie durch EDTA komplett inhibiert werden. Bei Zugabe der Inhibitoren nach Erreichen eines Gleichgewichtswertes der Rhodamin6G-Auslöschungs-Reaktion (Abbildung 50, 2550 s) wurde eine erneute Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet und dadurch volle Reversibilität gezeigt.

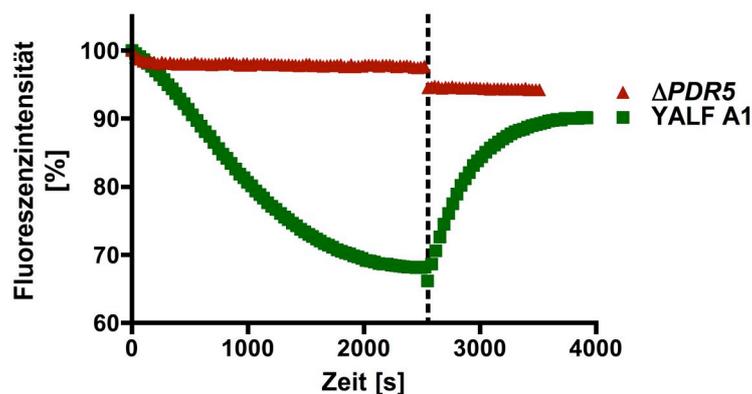


Abbildung 50 ATP/ Mg^{2+} -abhängige Rhodamin6G-Auslöschung in Plasmamembranen

30 μg Plasmamembranen von einem *PDR5* Überexpressionsstamm (YALF A1) und von einem ansonsten isogenen $\Delta PDR5$ -Stamm wurden in einer Küvette (1000 μl) mit 600 nM Rhodamin6G gemischt, wie in „Material und Methoden“ beschrieben. Nach 2550s (gestrichelte Linie) wurde der *Pdr5p*-vermittelte Transport durch Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligomycin inhibiert.

Die beobachtete ATP/ Mg^{2+} -abhängige Fluoreszenzabnahme konnte nicht durch chemische Modifikation des Fluoreszenzfarbstoffs hervorgerufen worden sein. Erstens stellte die Zugabe von solubilisierenden Detergenz-Konzentrationen das ursprüngliche Fluoreszenzsignal wieder her und zweitens waren die Fluoreszenzspektren von Rhodamin6G vor und nach dem Experiment unverändert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die beobachtete Rhodamin6G-Auslöschung ist eine Umverteilung von Rhodamin6G in der Lipiddoppelschicht oder/bzw. eine Akkumulation des Farbstoffs durch *inside-out* Plasmamembran Vesikel. Als Folge dieser Akkumulation formte Rhodamin6G nicht-fluoreszierende Dimere und Trimere.

Um die kinetische Analyse zu erleichtern und um eine lineare Extrapolation der maximalen Steilheit der Fluoreszenzabnahme zu erleichtern, wurde sowohl das Protein:Rhodamin6G-Verhältnis, der pH-Wert und Konzentration der Mg^{2+} -Ionen

optimiert. Es konnte beobachtet werden, dass der Puffer, in dem die gewonnenen, hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen resuspendiert wurden, trotz der anschließenden, starken Verdünnung im Transport-Assay einen drastischen Einfluss auf die Transport-Aktivität von Pdr5p hatte (Abbildung 51).

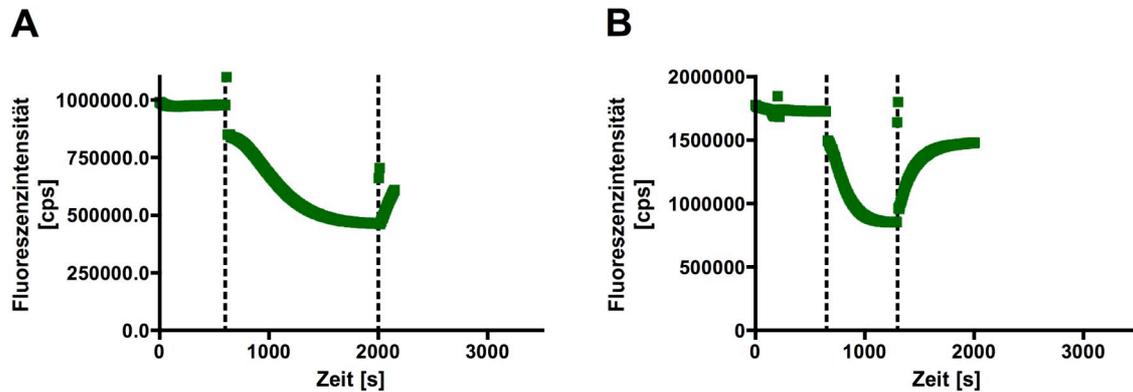


Abbildung 51 Optimierung der Bedingungen für den Rhodamin6G Transport-Assay

A) Hochhomogene Plasmamembranen (YALF A1) wurden im letzten Schritt der Präparation in Hefe-Puffer A resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. 30 μ l dieser Membransuspension wurden in eine Küvette mit 50 mM Hepes-HCl pH 7.0 und 150 nM Rhodamin6G auf ein Endvolumen von 1000 μ l gebracht und gemischt. Nach Erreichen eines stabilen Fluoreszenzsignals nach 600 s wurde die Pdr5p-abhängige Auslöschung durch Zugabe von ATP/Mg²⁺ gestartet. Nach 2000 s wurde die Pdr5p-abhängige Aktivität durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt. **B)** Die Plasmamembranen wurden wie in A) präpariert, allerdings im letzten Schritt der Präparation in 50 mM Hepes pH 7.0 Puffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Der Rhodamin6G Transport-Assay wurde nach 650s durch ATP/Mg²⁺ gestartet und durch Zugabe von 10 mM EDTA nach 1300s gestoppt.

Durch Verwendung von 50 mM Hepes pH 7.0 für das Resuspendieren, das Schockgefrieren und Lagern von Plasmamembranen, konnten im Vergleich zu Hefe-Puffer A deutlich höhere Rhodamin6G-Transportraten erreicht werden.

Wie schon zuvor mit den *in vivo* Funktionalitätstests wurden die generierten Pdr5p-Mutanten mit diesem *in vitro* Transport-Assay analysiert. Während eine Mutation im Walker A Motiv der N-terminalen NBD (C199A) Transportfunktion von Pdr5p nicht beeinflusste (Abbildung 52.D), verursachte die äquivalente Mutation im Walker A Motiv der C-terminalen NBD (K911A) einen vollständigen Aktivitätsverlust (Abbildung 52.E).

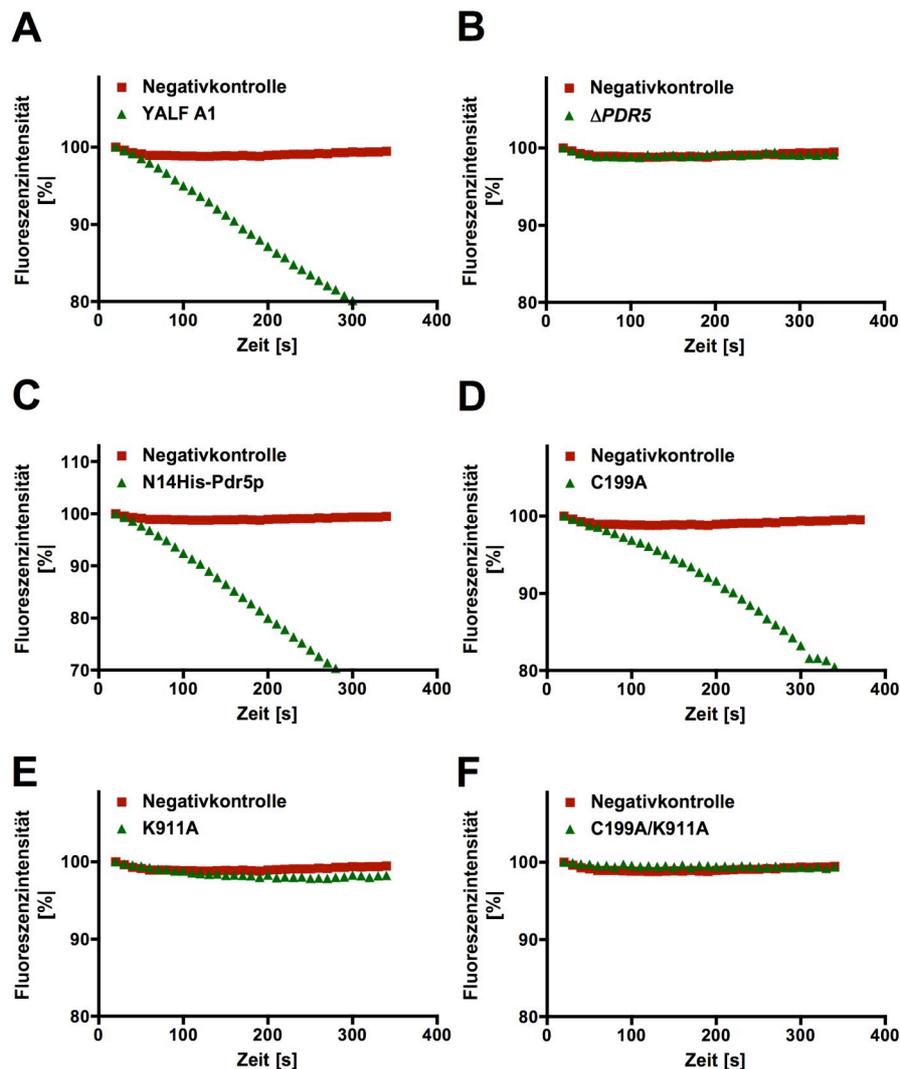


Abbildung 52 Rhodamin6G Transport-Assay in hochhomogenen Plasmamembranen

Hochhomogene Plasmamembranen (30 μg in 1000 μl) wurden in 50 mM HEPES pH 7.0 mit 150 nM Rhodamin6G für 15 min inkubiert. Zum Zeitpunkt 0s wurde der Pdr5p-vermittelte Transport durch Zugabe von ATP/Mg²⁺ gestartet (Grün). Als Negativkontrolle diente eine identische Probe, der ATP/EDTA zugesetzt wurde (Rot).

Diese *in vitro* Messungen bestätigen die Beobachtungen aus Zell-basierten Funktionalitätstests. Während das konservierte Lysin (K911) in der Walker A Sequenz der C-terminalen NBD für die Transportfunktion essentiell ist, scheint die N-terminale NBD eine untergeordnete Rolle im Drogentransport zu spielen.

Die Untersuchung der postulierten katalytischen Dyade aus Achsnagel-Histidin (H1068) und dem konservierten Glutamat benachbart zur Walker B Sequenz (E1036) in der C-terminalen NBD bestätigte die Ergebnisse der Drogen-Agar-Platten. Während die H1068A-Mutante auf Drogen-Agar-Platten eine Resistenz gegen

Fluconazol und Ketoconazol vermittelte, konnten die entsprechenden Zellen nicht auf Rhodamin123-haltigen Platten wachsen. Im Rhodamin6G Transport-Assay mit hochhomogenen Plasmamembranen zeigte sich, dass die Einzelmutationen H1068A und E1036Q sowie die Doppelmutante E1036Q/H1068A unfähig waren, Rhodamin6G in ATP/Mg²⁺-abhängiger Weise zu transportieren (Abbildung 53).

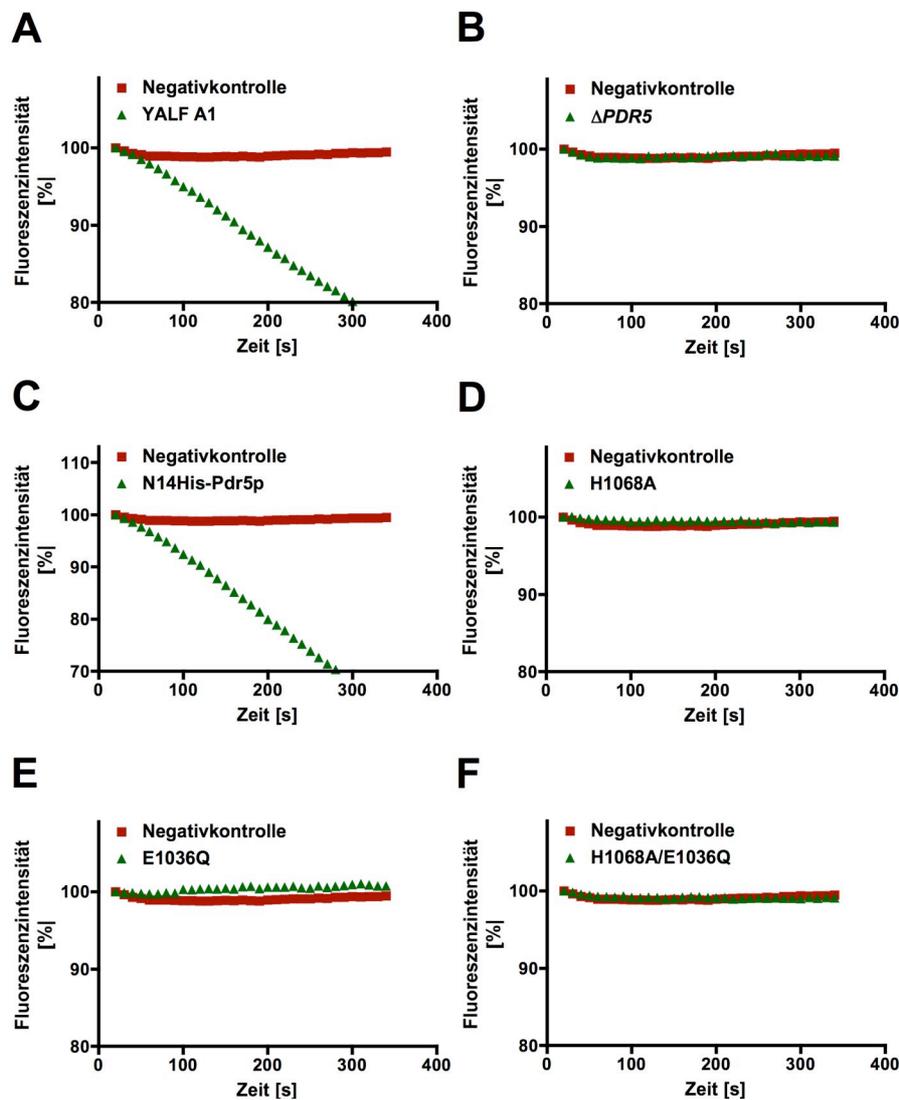


Abbildung 53 Rhodamin6G Transport-Assay in hochhomogenen Plasmamembranen

Verschiedene Varianten von *PDR5* wurden auf ihre Fähigkeit, den Pdr5p-vermittelten Transport zu inhibieren untersucht. Es wurden die H1068A- und E1036Q- Einzelmutanten sowie eine E1036Q/H1068A-Doppelmutante erzeugt und untersucht. Die genauen Assay-Bedingungen sind in „Material und Methoden“ beschrieben.

4.3.8 Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität in hochhomogenen Plasmamembranen

Die ATPase-Aktivität von Plasmamembran-Präparationen der verschiedenen *PDR5*-Varianten wurde untersucht. Zunächst wurden mit Hilfe eines *PDR5* Überexpressionsstammes (YALF A1) und eines Δ *PDR5*-Stammes Bedingungen ausgearbeitet, unter denen sich eine Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität bestimmen lässt. Um den Hintergrund durch andere ATPasen und Phosphatasen zu verringern, wurden dem Assay mehrere Inhibitoren hinzugesetzt: Azid, das die F_1F_0 -ATPase inhibiert, Ammoniummolybdat, das saure Phosphatasen inhibiert und Kaliumnitrat, das die vakuoläre ATPase inhibiert (60,182-184). Membranpräparationen von *PDR5*-überexprimierenden Zellen zeigten eine Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität, während von isogenen Δ *PDR5*-Stämmen abgeleitete Präparationen eine mehr als 80% geringere Oligomycin-sensitive ATPase aufwiesen (Abbildung 54.A).

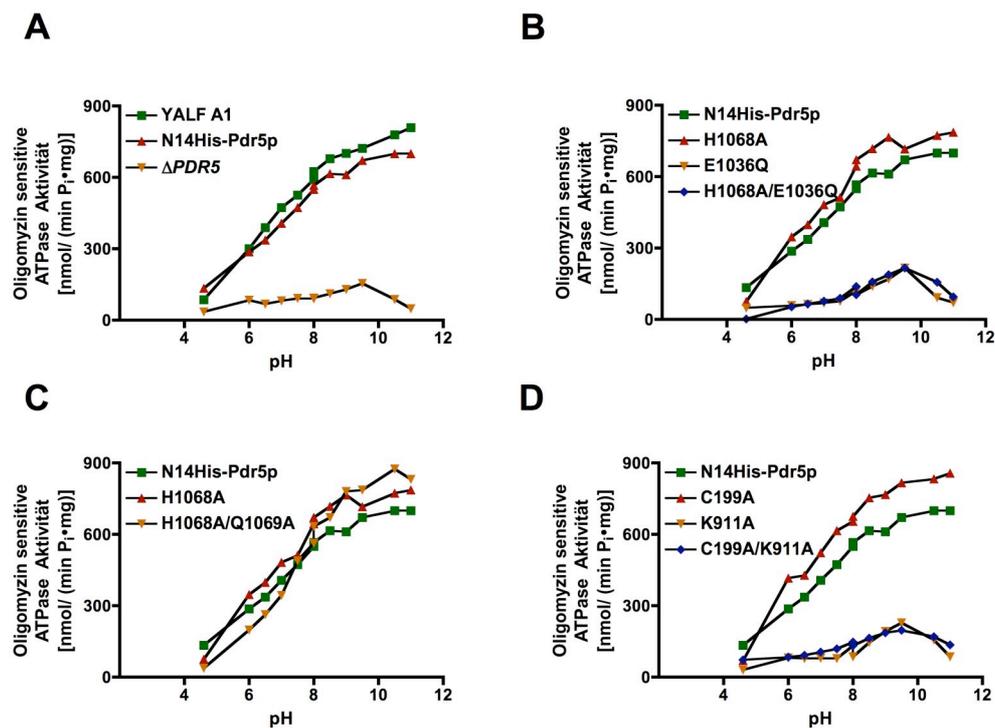


Abbildung 54 Die Oligomycin-sensitive ATPase in hochhomogenen Plasmamembranen

Die Oligomycin-sensitive ATPase von Plasmamembran-Präparationen verschiedener *PDR5*-Varianten wurde bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Im pH-Bereich von 4–8 wurde ein MES-Tris Puffersystem verwendet, im pH-Bereich von 8-11 wurde ein Tris-Glycin Puffersystem verwendet. Die ATPase wurde in An- und Abwesenheit von 20 μ g/ml Oligomycin bestimmt und die Oligomycin-sensitive ATPase aufgetragen. Um den Hintergrund durch kontaminierende ATPasen zu verringern, wurden die Experimente in Anwesenheit von 10 mM Azid, 50 mM Kaliumnitrat und 200 μ M Ammoniummolybdat durchgeführt.

Die eingeführten Mutationen in den NBDs von Pdr5p hatten entweder keinen Einfluss auf die beobachtete Oligomycin-sensitive ATPase (C199A, H1068A und H1068A/Q1069A) oder führten zu einem vollständigen Verlust dieser Pdr5p-spezifischen ATPase (K911A, C199A/K911A, E1036Q, E1036Q/H1068A). Das pH-Optimum für die ATPase liegt im alkalischen Bereich (pH >10). Die Pdr5p -spezifische, Oligomycin-sensitive ATPase beträgt bei pH 10 ca. $800 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$.

Ein Verlust der ATPase-Aktivität von Pdr5p führte in allen Fällen auch zu einem Verlust der Drogentransport-Aktivität. Von besonderem Interesse für zukünftige Untersuchungen ist mit Sicherheit die H1068A-Mutante. Sie zeigte gegenüber dem Wildtyp *PDR5* eine unveränderte ATPase-Aktivität, aber keine Drogentransport-Aktivität. Die Mutation H1068A in der C-terminalen NBD von Pdr5p führte also entweder zu einer Entkopplung der NBDs von den TMDs (ATPase-Aktivität ohne Drogentransport) oder bewirkte eine drastische Veränderung in der Substraterkennung (Rhodamin6G). In beiden Szenarien muss also ein Signal aus der NBD (H1068A) durch Interdomänen-Kommunikation auf die Substrat-Bindungstasche in der TMD von Pdr5p übertragen werden.

Die Analyse der katalytischen Dyade aus dem Achsnagel-Histidin (H1068) und dem konservierten Glutamat (E1036) zeigte, dass in Pdr5p im Gegensatz zur isolierten TAP1-NBD das Glutamat essentiell für eine *steady-state* ATPase-Aktivität ist, während das Histidin offensichtlich keine Funktion in der Hydrolyse von ATP hat. (Abbildung 54.B). Überraschenderweise scheint also eine katalytische Dyade aus Glutamat und Histidin in Pdr5p nicht strikt wirksam zu sein.

Zusätzlich konnte durch die Pdr5p-Doppelmutante H1068A/Q1069A eine vermeintliche redundante Rolle dieser beiden Reste des H-loop in der ATP-Hydrolyse ausgeschlossen werden (Abbildung 54.C) Die Doppelmutante, der beide putativen Wasserstoffbrückengeber H1068 und Q1069 fehlten, zeigte gegenüber Wildtyp Pdr5p eine völlig unveränderte ATPase-Aktivität.

Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, dass die N-terminale NBD keine, oder nur eine äußerst niedrige ATPase-Aktivität besitzt (Abbildung 54.D). Die Mutation des in der PDR-Familie konservierten Walker A Cysteins (C199A) in der N-terminalen NBD hatte keinen Einfluss auf die beobachtete ATPase-Aktivität, während

die äquivalente Mutation in der Walker A Sequenz der C-terminalen NBD (K911A) von Pdr5p keine Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität mehr aufwies.

Durch die Entwicklung von *PDR5 Knock-in* Kassetten, von *in vitro* Drogentransport-Assays und die Etablierung eines Assays zur Bestimmung der Pdr5p-spezifischen ATPase-Aktivität in Membranpräparationen lässt sich nunmehr i) die Bedeutung jeder beliebigen Aminosäuren auf die ATPase-Aktivität und die Transport-Aktivität bestimmen, ii) durch gezielte Mutagenese und unter Ausnutzung der identifizierten H1068A-Mutante die Kommunikation zwischen NBD und TMD detaillierter charakterisieren und iii) der Mechanismus der Pdr5p-Inhibition durch Detergenzien während der Solubilisierung und Reinigung besser nachvollziehen.

4.3.9 Inhibition von Pdr5p durch Detergenzien

Während Pdr5p in hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen noch funktional war, zeigte Pdr5p in Detergenzlösung weder ATPase-Aktivität noch ATP-Bindung (4.2.8 und 4.2.9). Durch die Etablierung von *in vitro* Funktionalitäts-Assays für Pdr5p wurde es möglich, den Einfluss verschiedener Detergenzien auf Pdr5p während der Solubilisierung und Reinigung zu untersuchen. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss geringste Mengen Detergenzien (<CMC) auf den Pdr5p-vermittelten Drogentransport haben (Abbildung 55).

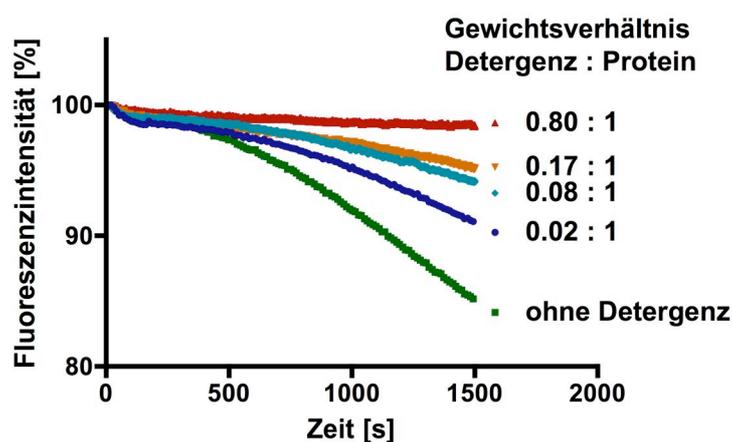


Abbildung 55 Inhibition des Pdr5p-vermittelten Drogentransports durch Detergenzien

Membranpräparationen (YALF A1) wurden bei einer Endkonzentration von 30 µg/ml mit 150 nM Rhodamin6G und DDM in verschiedenen Konzentrationen von 0.00006% bis 0.0024% (CMC (DDM) 0.00625%) für 30 min bei 30°C inkubiert, bis der Drogentransport zum Zeitpunkt $t = 0s$ durch Zugabe von ATP/Mg^{2+} gestartet wurde.

Bereits bei Detergenzkonzentrationen weit unter dem CMC-Wert von DDM konnte eine vollständige Inhibition des Pdr5p-vermittelten Rhodamin6G-Transports beobachtet werden. Die Messung der Pdr5p-spezifischen ATPase unter annähernd identischen Bedingungen zeigte allerdings, dass die vollständige Inhibition der ATPase-Aktivität von Pdr5p deutlich höhere Detergenzkonzentrationen (>CMC) benötigte.

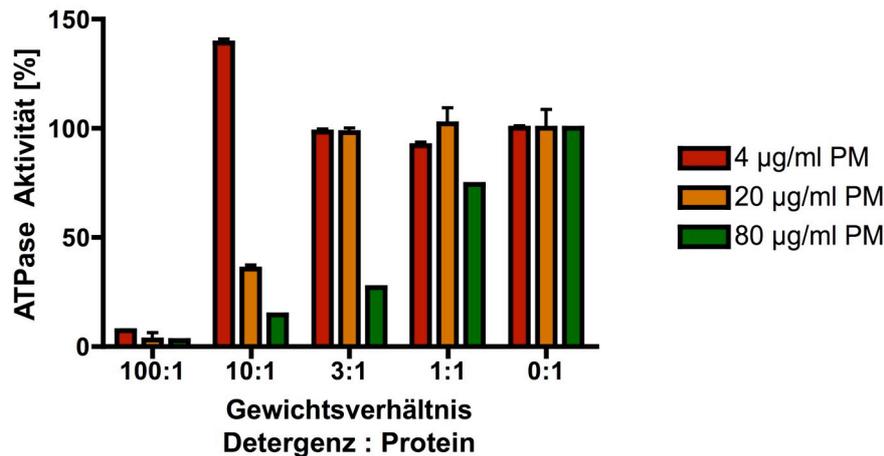


Abbildung 56 Inhibition der Pdr5p-spezifischen ATPase durch DDM

Die Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität wurde bei drei verschiedenen Plasmamembrankonzentrationen (4 µg/ml, 20 µg/ml und 80 µg/ml) und bei verschiedenen DDM:Protein-Gewichtsverhältnissen (0:1, 1:1, 3:1, 10:1 und 100:1) bestimmt. Vor dem Starten der Reaktion durch ATP/Mg²⁺ wurden die Proben 30 min bei RT inkubiert. Der theoretische CMC-Wert von DDM (0.0066%) wäre bei einem DDM:Protein-Verhältnis von 16.5 (für 4 µg/ml Plasmamembran), von 3.3 (für 20 µg/ml Plasmamembran) und von 0.825 (für 80 µg/ml Plasmamembran) erreicht.

Es wurden also zwei unabhängige Mechanismen identifiziert, durch welche das Detergenz DDM Pdr5p inhibiert. Bei geringen Detergenzkonzentrationen (<CMC) wurde der Pdr5p-vermittelte Drogentransport ohne einen messbaren Einfluss auf die Pdr5p-spezifische ATPase inhibiert. Die Inhibition der Pdr5p-spezifischen ATPase korrelierte für DDM wie auch für andere getestete Detergenzien (DM, CHAPS) mit der entsprechenden CMC.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die zweistufige Inhibition von Pdr5p ist, dass bereits bei niedrigen Detergenzkonzentrationen (<CMC) monomere Detergenz-Moleküle in die präparierten Plasmamembranen partitionierten und durch Konkurrenz mit Rhodamin6G in der Substrat-Bindungsstelle von Pdr5p den Transport inhibieren. Höhere Detergenzkonzentrationen (2-3 x CMC) führten zur

Solubilisierung von Pdr5p und resultierten in einen Verlust der ATPase-Aktivität. Bemerkenswertweise konnte die ATPase-Aktivität in einem systematischen Test mit mehr als 30 unterschiedlichen Detergenzien (einschließlich Digitonin, DM, DDM, Triton X100, Fos-Cholin-14 etc.) gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von Pdr5p in keinem der getesteten Detergenzien konserviert blieb (Daten nicht gezeigt).

Da so viele strukturell unterschiedliche Detergenzien Pdr5p vollständig inhibieren konnte, stellt sich die Fragen, ob es überhaupt ein Detergenz gibt, das die ATPase-Aktivität von Pdr5p während der Solubilisierung erhält, und warum diese Vielzahl unterschiedlichster Detergenzien offenbar den gleichen Effekt auf Pdr5p hat. Ist es möglich, dass durch Detergenzien eine Konformation von Pdr5p stabilisiert wurde, die einen Austausch von Nukleotiden drastisch verlangsamt? Die Kristallstruktur des bakteriellen ABC-Transporters Sav1866₂ zeigte eine geschlossene Struktur des NBD Dimers, obschon das Protein in Anwesenheit von ADP kristallisiert wurde und alle gängigen Modelle von einer ATP-induzierten Dimerisierung der NBDs ausgehen (44,185). Können also Detergenzien, die sogar teilweise Substrate von Pdr5p sind, Pdr5p in einer Konformation arretieren, die kein ATP bindet? Um die Möglichkeit einer Inhibition durch ein Substrat näher zu untersuchen, wurde der Einfluss von Rhodamin6G auf die Pdr5p-spezifische ATPase ermittelt.

4.3.10 Inhibition von Pdr5p durch ein Transportsubstrat

Die Pdr5p-spezifische, basale ATPase wurde in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Rhodamin6G bestimmt. (Abbildung 57).

Überraschenderweise zeigte sich, dass die Pdr5p-spezifische, basale ATPase-Aktivität durch die Anwesenheit des Transportsubstrates Rhodamin6G nicht stimuliert wurde. Im Gegenteil, die ATPase-Aktivität von Pdr5p wurde durch mikromolare Konzentrationen von Rhodamin6G annähernd vollständig inhibiert. Der IC₅₀ Wert dieser Inhibition betrug 1.3 µM für N14His-Pdr5p – der dimensionslose log(IC₅₀)-Wert betrug -6.00 ± 0.04 . Noch bei einer Konzentration von 0.6 µM Rhodamin6G konnte allerdings ein Pdr5p-spezifischer, ATP-abhängiger Transport von Rhodamin6G beobachtet werden. Offensichtlich kann also Pdr5p also durch sein eigenes Substrat inhibiert werden.

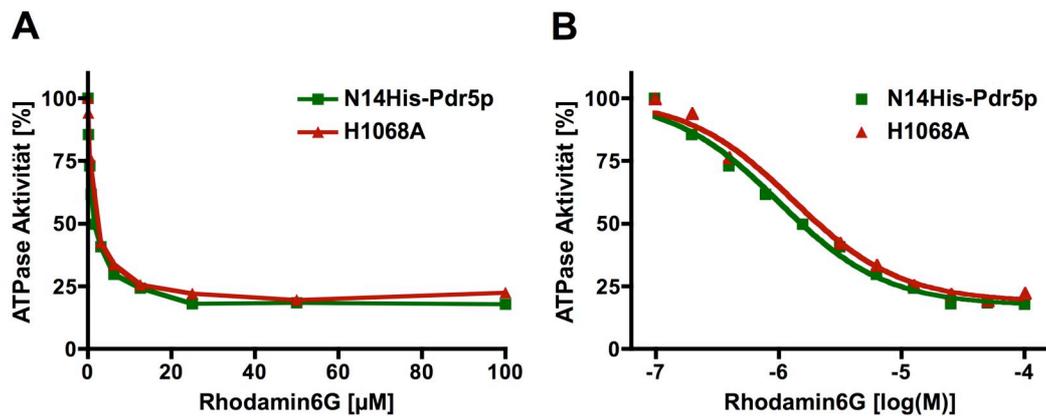


Abbildung 57 Inhibition der Pdr5p-vermittelten ATPase-Aktivität durch Rhodamin6G

Die Pdrp5-spezifische ATPase von N14His-Pdr5p(Wildtyp) und N14His-Pdr5p(H1068A) wurde bei verschiedenen Konzentrationen von Rhodamin6G bestimmt und gegen die verwendete Konzentration entweder **A)** linear oder **B)** logarithmisch aufgetragen. Durch Analyse der Daten anhand einer sigmoidalen Dosis-Antwort-Kurve konnte ein IC_{50} Wert für N14His-Pdr5p(Wildtyp) von $1.0 \mu\text{M}$ und für N14His-Pdr5p(H1068A) ein IC_{50} Wert von $1.3 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Der $\log(IC_{50})$ betrug für N14His-Pdr5 (Wildtyp) -6.00 ± 0.04 und für N14His-Pdr5p(H1068A) -5.89 ± 0.07 .

Der bestimmte IC_{50} Wert war für Wildtyp Pdr5p, als auch für die H1068A-Mutante, die Rhodamin6G nicht transportiert, im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch (Abbildung 57). Der dimensionslose $\log(IC_{50})$ -Wert betrug für die H1068A-Mutante -5.89 ± 0.07 . Die inhibitorische Bindungsstelle für Rhodamin6G wird also durch eine Mutation des konservierten Histidins im *H-loop* zu Alanin nicht beeinflusst.

5 Diskussion

In den letzten Jahren wurden faszinierende Einblicke in die molekulare Funktionsweise von ABC-Transportern ermöglicht. Insbesondere die strukturellen Arbeiten an isolierten NBDs und voll-assemblierten ABC-Transportern veranschaulichen die einfachen Prinzipien des Transports und deren hochkomplexe Umsetzung und Architektur.

Während die Kristallstrukturen isolierter Motordomänen in verschiedenen funktionalen Zuständen - insbesondere des HlyA-Exporters HlyB und des Maltose-Aufnahmesystems MalFGK₂ aus *E. coli* - ein immer detaillierteres Bild von der Funktionsweise und Koordination hochkonservierter Sequenzmotive in den NBDs zeichnen (52,65,186), erlauben die Strukturen voll-assemblierter ABC-Transporter, des Vitamin B₁₂-Importsystems BtuC₂D₂ aus *E. coli* (34), des Multidrogentransporters Sav1866₂ aus *Staphylococcus aureus* (44), des mutmaßlichen Molybdat-Aufnahme Systems ModB₂C₂A aus *Archaeoglobus fulgidus* (41) und des putativen Metall-Chelat Transporters HI1470/HI1471 aus *Haemophilus influenzae* (43), erste Einblicke in den möglichen Mechanismus des Transportvorgangs und in die Kommunikation zwischen NBDs und TMDs.

Obwohl also die gewonnenen Kristallstrukturen und die davon abgeleiteten Modelle von äußerster Wichtigkeit für den wissenschaftlichen Fortschritt auf dem Gebiet des Membrantransports sind, bleibt zu bedenken, dass sie jeweils nur ein statisches Bild eines dynamischen Moleküls liefern. Um diesen statischen Abbildungen Leben einzuhauchen, bedarf es umfangreicher biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen, die das dynamische Zusammenspiel funktional relevanter Bereiche entschlüsseln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Modellsysteme untersucht: die isolierte Motordomäne des humanen TAP1 aus dem heterodimeren TAP-Komplex und der voll-assemblierten Multidrogentransporter Pdr5p aus *S. cerevisiae*. Die parallele und vergleichende Analyse dieser zwei Modellsysteme bietet für mechanistische Studien entscheidende Vorteile, da insbesondere die *intra*-molekularen Interaktionen der beiden NBDs eines voll-assemblierten ABC-

Transporters gar nicht oder nur sehr schwer zu bestimmen sind. Durch die Charakterisierung isolierter NBDs werden also *intra*-molekulare Interaktionen als *inter*-molekulare Interaktionen betrachtet. Auf der anderen Seite ist für ein tieferes Verständnis der Kopplung von Substratbindung und -transport an die ATP-Hydrolyse offensichtlich ein voll-assemblierter ABC-Transporter essentiell.

Die vergleichende Analyse der isolierten ABC-Motordomäne vom humanen TAP1-Protein und des *full-size* Multidrogentransporters Pdr5p lieferte überraschende, teilweise sogar widersprüchliche Ergebnisse, die unter Einbeziehung der komplexen Datenlage aus anderen Struktur-Funktionsuntersuchungen von ABC-Transportern in einem vereinigenden Modell zusammengefasst werden können.

5.1 Die katalytische Dyade in der humanen TAP1-NBD

Das γ -Phosphat des gebundenen ATP nimmt in ABC-Transportern eine funktionale und strukturelle Sonderstellung ein. Um das γ -Phosphat spannt sich ein Netzwerk aus den Resten der Q-, D-, C-, und H-*loop*, die wiederum über Domänen-Domänen-Interaktionen das gesamte Transportprotein kontrollieren. Um den exakten Mechanismus der ATP-Hydrolyse molekular analysieren zu können (14,31,36,40), wurde die relative Bedeutung zweier konservierter Aminosäuren untersucht, die biochemisch und strukturell mit der Hydrolyse von ATP in Verbindung gebracht wurden: Der Glutamat-Rest C-terminal zum Walker B Motiv und das konservierte Histidin des H-*loop* (53,54,67).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch schrittweises Einführen von Konsensus Aminosäuren in die humane TAP1-NBD direkte, biochemische Evidenzen dafür geliefert werden, dass diese beiden Aminosäuren eine katalytische Dyade bilden und für die ATP-Hydrolyse in dieser isolierten und mutierten NBD verantwortlich sind (56). Durch die detaillierte Analyse der pH Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse und Homodimerisierung konnte eine Distanz- und pH-abhängige, kooperative Interaktion der beiden Reste dieser katalytischen Dyade identifiziert werden. Während dem Histidin des H-*loop* dabei eine essentielle Rolle zukommt, hat das konservierte Glutamat einen Struktur gebenden Einfluss.

In einer sehr ähnlichen Studie wurde kürzlich die TAP1-NBD aus der Ratte mutiert, isoliert und biochemisch sowie röntgenkristallographisch untersucht (81). In deutlicher Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten wurde

gezeigt, dass nur durch die Einführung der beiden konservierten Reste Glutamat und Histidin ein vielfach aktiveres Enzym erzeugt werden konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte katalytische Dyade scheint also auch in der TAP1-NBD aus der Ratte wirksam zu sein. Während die Wildtyp TAP1-NBD aus Ratte noch ein geringes Maß an ATPase-Aktivität aufwies, führte die Einführung des H-loop Histidins überraschenderweise zu einer Verringerung der ATPase-Aktivität, während die Einführung des konservierten Glutamats eine geringfügige Steigerung der ATPase-Aktivität bewirkte. Diese scheinbar umgekehrte Hierarchie zwischen Glutamat und Histidin ist vor dem Hintergrund der extrem hohen Sequenzidentität (>74%) der humanen TAP1-NBD und der TAP1-NBD der Ratte äußerst verwunderlich.

Die ATP-Hydrolyse setzt eine Dimerisierung der NBDs voraus. Entsprechend ist eine quantitative Analyse der Dimerisierung Voraussetzung für ein molekulares Verständnis der ATP-Hydrolyse. Überraschenderweise unterscheiden sich die beiden NBDs trotz ihrer hohen Sequenzidentität drastisch in ihrem Dimerisierungsverhalten. Die Affinität des Homodimers der TAP1-NBD aus Ratte scheint um ein Vielfaches höher zu sein als die des humanen Homologs, was sich für die Kristallisation verschiedener, dimerer Varianten dieser NBD als äußerst hilfreich erwies. Bezeichnenderweise konnte für die Mutanten D645N und D645Q/Q678H in der TAP1-NBD der Ratte sogar zum ersten Mal eine ADP induzierte Dimerisierung von isolierten ABC-Motordomänen beschrieben werden (81). Dieses im Vergleich zur humanen TAP1-NBD, drastisch unterschiedliche Dimerisierungsverhalten könnte auch die beobachtete, umgekehrte Bedeutung von Glutamat und Histidin auf die *steady-state* ATPase-Aktivität erklären. Im Falle der TAP1-NBD der Ratte könnte aufgrund der offensichtlich vielfach höheren Stabilität des Homodimers der Dimerzerfall als die ATP-Hydrolyse die Rate der *steady-state* ATPase diktieren. Um über die Hierarchie zwischen Glutamat und Histidin in der TAP1-NBD der Ratte entscheiden zu können, müsste ähnlich wie für die verschiedenen humanen TAP1-NBD-Varianten präsentiert die apparente Dissoziationskonstante K_D^{app} der Homodimerisierung bestimmt werden.

Funktionale Studien am voll-assemblierten, humanen TAP-Komplex (80,81) implizieren allerdings, dass in der NBD von TAP2 tatsächlich das Glutamat eine dem Histidin übergeordnete Rolle hat. Während die Mutagenese des Glutamats einen

vollständigen Verlust der Transport-Aktivität bedeutet, zeigt ein Austausch des konservierten Histidins gegen Glutamin keinen signifikanten Aktivitätsverlust. Dies widerspricht der Hypothese einer essentiellen Rolle des konservierten Histidins für die ATP-Hydrolyse.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass äquivalente Mutationen in der postulierten katalytischen Dyade der TAP1-NBD und speziell im voll-assemblierten TAP-Komplex offenbar vielfältige und teilweise gegenläufige Effekte auf die *steady-state* ATPase bzw. die Transportfunktion haben. Welche Rolle spielen die beiden Reste der katalytischen Dyade also in anderen ABC-Transportern?

5.2 Die katalytische Dyade in anderen ABC-Transportern

Lässt sich aus verfügbaren strukturellen und funktionalen Daten von anderen ATPasen und ABC-Proteinen auf die Existenz einer katalytischen Dyade schließen? Auf struktureller Seite ist festzustellen, dass sich in allen Kristallstrukturen von ABC-Domänen die Seitenketten des konservierten Glutamats und Histidins in unmittelbarer Nähe zueinander und zum γ -Phosphat befinden (48,52,54,81,187-193). Zusätzlich geht eine zentrale, katalytische Bedeutung des konservierten Histidins auch aus einem strukturellen *Alignment* mit anderen ATPasen und GTPasen hervor, in denen sich an der Position des konservierten Histidins Reste befinden, welche für die Katalyse essentiell sind: Y311 (α -Kette der F1-ATPase), E328 (β -Kette der F1 ATPase), Q194 (RecA), Q61 (p21^{ras}), H85 (EF-Tu) und H465 (T7 Helikase) (54). Bemerkenswert ist, dass all diese Reste fähig sind, Wasserstoffbrücken auszubilden. Mutationen des konservierten Histidins führten auch in unterschiedlichen ABC-Transportern zum totalen Verlust der ATPase-Aktivität: H662A (HlyB aus *E. coli*), H211R und H211D (HisP aus *E. coli*) (194,195), H192R (MalK aus *E. coli*) (196), H631A (Mdl1p aus *S. cerevisiae*) (150). Zusätzlich wurde die zentrale Bedeutung des Histidins durch seinen Einfluss auf den ATP-abhängigen Substrattransport von MRP1, HisP und MalK unterstrichen. Allerdings wurde beim Austausch des Histidins gegen Glutamin und andere Wasserstoffbrücken-bildende Aminosäuren in MRP1 und TAP2 eine Restaktivität bzw. unverminderte Aktivität der Proteine beobachtet (80,81,197). Lediglich in MutS aus *E. coli*, einem ABC-Protein, das DNA-Fehlpaarungen erkennt, zeigte eine H728A-Mutation noch immer eine Restaktivität von 50%, was zwar unvereinbar ist mit einer essentiellen Funktion des Histidins,

nicht aber im Widerspruch zu einer katalytischen Dyade mit dem konservierten Glutamat steht (189).

Die Mutation dieses konservierten Glutamat führte zu äußerst verschiedenartigen Ergebnissen: Während eine E599Q-Mutation zu einem annähernd vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität im Mdl1p Transporter (aus *S. cerevisiae*) führte (58,150), zeigten äquivalente Doppelmutationen der Reste E552 und E1197 in humanem P-Glykoprotein (ABCB1) eine erniedrigte, aber noch vorhandene ATPase-Aktivität (154). In MRP1 (ABCC1) konnte die ATP-Hydrolyse in der N-terminalen NBD durch eine D793E-Mutation drastisch erhöht werden, während die spiegelverkehrte Mutation in der C-terminalen NBD (E1455D) die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung von ADP deutlich verringerte (82). Eine E171Q-Mutation in der ABC-Motordomäne MJ0796 aus *Methanococcus jannaschii* (64) sowie die Mutation des äquivalenten Restes in BmrA aus *Bacillus subtilis* zu Aspartat, Alanin, Cystein, Glutamin oder Serin (67) führten zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität. Doch im Gegensatz dazu zeigte die isolierte E631Q-Mutante der HlyB-NBD aus *E. coli* wiederum eine 10%ige Restaktivität (54,64).

Dieses komplexe Bild mit scheinbar widersprüchlichen Effekten von Mutationen erscheint zunächst unvereinbar mit einem universellen Modell für den Mechanismus der ATP-Hydrolyse in ABC-Transportern. Doch kann die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte katalytische Dyade aus Histidin und Glutamat eine gemeinsame, eventuell sogar redundante Funktion vom Glutamat und Histidin erklären. Bereits subtile Unterschiede nicht-konservierter Reste in den untersuchten NBDs oder geringfügige Unterschiede in der Durchführung der Experimente könnten einen großen Effekt auf das Ergebnis der Mutagenesestudie haben und somit für die verwirrende Datenlage verantwortlich sein. Auch andere Faktoren, wie die Untersuchung bei An- und Abwesenheit der TMDs (198-200) und von Transportsubstraten (66,201-203) könnten die kooperative Interaktion zwischen Histidin und Glutamat beeinflussen und somit drastischen Einfluss auf die ATP-Hydrolyse ausüben.

Um die Wirkung einer katalytischen Dyade bei der ATP-Hydrolyse in einem voll-assemblierten ABC-Transporter zu überprüfen und um ein Modellsystem zu etablieren, dass die simultane Beobachtung von ATP-Hydrolyse und

Substrattransport erlaubt, wurde der Multidrogentransporter Pdr5p aus *S. cerevisiae* gewählt.

5.3 Die Gefahr einseitiger *in vivo* Analyse – Pdr5p *in vivo*

Die Charakterisierung von Pdr5p wurde anhand einer Doppelstrategie vollzogen. Während die *in vivo* Analyse anhand von Drogenresistenztests eine schnelle Charakterisierung des Einflusses von Mutationen oder auch N- und C-terminalen Modifikationen (wie z.B. Affinitäts-tags) auf die untersuchte Proteinaktivität zulässt, erlaubt die Isolierung von Pdr5p eine Charakterisierung unter voll-kontrollierbaren Bedingungen. Diese Studie belegt, dass eine einseitige Analyse *in vivo* oder *in vitro* Gefahren der Fehlinterpretation birgt (96,204-209).

In einer Vielzahl unabhängiger Studien wurde gezeigt, dass Pdr5p eine zelluläre Resistenz gegen eine enorme Vielzahl zytotoxischer Substanzen verleiht (15,95). Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit belegen, dass Zellen mit deletiertem *PDR5*-Promotor Pdr5p zwar nicht mehr bilden können, aber überraschenderweise dennoch eine deutliche Resistenz gegen Fluconazol und Rhodamin123 zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass diese zelluläre Resistenz *nicht* von der Pdr5p-Produktion und dessen funktionellen Status unabhängig ist. Offensichtlich führt in diesen Hefestämmen also eine differenzielle Regulation anderer Resistenz-vermittelnder Systeme zu dem beobachteten Drogenresistenz-Phänotyp. Dieser bisher nicht beschriebene Regulationsmechanismus scheint unter der Kontrolle des *PDR5*-Promotors zu stehen. Eine Beteiligung der benachbarten Gene von *PDR5* an dieser Regulation wird derzeit untersucht.

Auch zwei andere kürzlich veröffentlichte Studien verdeutlichen die Bedeutung einer vorsichtigen Interpretation von Zell-basierten Deletionsstudien: Kihara und Igarashi konnten zeigen, dass die Deletion von *PDR5* und/oder *YOR1* eine massiv erhöhte Expression von RSB1, einem ER/Plasmamembran assoziiertem *long chain base*-Transporter zur Folge hat (205,206). In einer anderen Studie wurde gezeigt, wie eine Mutation, welche die Funktion der F_0 -Untereinheit der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase verhindert, zur drastisch erhöhten Expression von *PDR3* und *PDR5* und konsequenterweise zu einer deutlich erhöhten Cycloheximid-Resistenz führte (204,207). Diese Beispiele zeigen, dass die Deletion/Mutation eines Genes zu einer differenziellen Regulation verwandter, aber auch in Funktion und

Lokalisation unterschiedlicher Proteine führen kann. Besonders bei der Studie von komplex regulierten, zellulären Netzwerken (wie dem PDR-Netzwerk) ist eine detaillierte Analyse kompensatorischer Effekte essentiell, um das Gesamtphänomen verstehen zu können.

5.4 Die Gefahr einseitiger *in vitro* Analyse – Pdr5p *in vitro*

Die Isolation von Proteinen und deren *in vitro* Analyse kann die für *in vivo* Analysen beschriebenen Probleme lösen, da eine Untersuchung unter vollständig kontrollierbaren Bedingungen möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Pdr5p mittels eines eigens entwickelten Überexpressionssystems funktional überproduziert. Nach erfolgreicher Isolierung von monodispersen Pdr5p mittels IMAC und Gelfiltration wurde die ATPase-Aktivität der gewonnenen Fraktionen bestimmt. Im Zuge der Optimierung der Pdr5p-Reinigung konnte allerdings gezeigt werden, dass offenbar die Verunreinigung durch eine hochaktive Phosphatase für die gemessenen ATPase-Aktivitäten verantwortlich war. Diese Beobachtung stellt ein selten beschriebenes, aber bedeutendes und inhärentes Problem bei der *in vitro* Analyse von Enzymen dar (208). Auch die *in vitro* Analyse eines heterolog überexprimierten, humanen ABC-Transporters (ABCG5/G8) in *Pichia pastoris* führte zu ähnlichen Beobachtungen (209). Obwohl vielfältige Werkzeuge die Überexpression und Reinigung rekombinanter Proteine immer leichter machen, zeigen diese Ergebnisse, dass eine intensive und gründliche Optimierung der Proteinreinigung dadurch nicht ersetzt wird.

Pdr5p konnte nach der Optimierung der Membranpräparation und des Affinitäts-*tags* ohne kontaminierende Aktivitäten gereinigt werden. Erstaunlicherweise zeigte sich allerdings, dass Pdr5p nach Solubilisierung und Reinigung ATP weder binden, noch hydrolysieren kann. Eine vollständige Entfaltung von Pdr5p in DDM konnte durch CD-spektroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Bereits in früheren Studien wurde Pdr5p aus hochhomogenen Plasmamembran-Präparationen mit DDM solubilisiert und durch Reinigung über einen Glycerolgradienten weiter angereichert (90,123,124). Mit Pdr5p angereicherte Fraktionen zeigten eine ATPase- und UTPase-Aktivität von ca. $30 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$. Durch Zugabe von Asolectin, einer aus Sojabohnen gewonnenen Phospholipidmischung, wurde Pdr5p scheinbar „reaktiviert“ und führte zu einer

ATPase-Aktivität von ca. $250 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$, was etwa 10% der gemessenen Pdr5p-spezifischen Aktivität in der Plasmamembran entsprach. Die in identischen Fraktionen beobachtete ADPase-Aktivität sowie die unvollständige Inhibition der UTPase-Aktivität durch Oligomycin, legten nahe, dass zumindest ein Teil der gemessenen Aktivitäten durch kontaminierende Enzyme (z.B. Phosphatasen) hervorgerufen wurde. Nichtsdestotrotz stellte diese Studie einen ersten, bedeutenden Schritt für die *in vitro* Analyse von Pdr5p dar und erlaubte die Identifizierung von mehreren Inhibitoren der Pdr5p-spezifischen UTPase- und ATPase-Aktivität.

Die beschriebene Aktivierung von Pdr5p in Detergenzlösung durch Zugabe von Phospholipidmischungen konnte im Rahmen dieser Arbeit trotz intensiver Versuche nicht reproduziert werden. Während sich also in vielfältigen Studien die ATPase-Aktivität von Pdr5p und anderen Multidrogentransportern wie Snq2p (124) und Yor1p aus *S. cerevisiae* (90), Cdr1p aus *C. albicans* (127) und *C. glabrata* sowie Pdh1p aus *C. glabrata* (60,184) in hochhomogenen Plasmamembranen problemlos bestimmen lässt, bleibt der drastische Aktivitätsverlust in Detergenzlösung rätselhaft.

In einer neueren Studie wurde Pdr5p anhand eines C-terminalen 6-Histidintag gereinigt. Nach Detergenzentzug von einer Pdr5p-Detergenz-Lipid-Mischung konnten durch *negative-stain* mittels Elektronenmikroskopie einzelne, quadratische Partikel mit ca. 11 nm Seitenlänge beobachtet werden (210). Die durch Einzelpartikelanalyse errechnete dreidimensionale Struktur von Pdr5p bei einer Auflösung von 25 Å zeigte überraschenderweise eine dimere Anordnung, mit vier NBDs und vier TMDs in engem Kontakt, ähnlich wie zuvor für den *half-size* Transporter BmrA aus *Bacillus subtilis* beobachtet (211). Leider wurde bei der Einzelpartikelanalyse von Pdr5p dessen besonderes, biochemisches Verhalten in Detergenzlösung wie der Aktivitätsverlust und die Imidazol-abhängige Aggregation nicht detailliert untersucht, so dass die beobachtete Struktur nur schwer in Relation zur Funktion von Pdr5p betrachtet werden kann. Obwohl die Einzelpartikelanalyse von BmrA eine homotetramere Architektur zeigte, belegten zusätzliche, biochemische Studien an BmrA in Detergenzlösung und in Proteoliposomen, dass BmrA dominant als Homodimer vorliegt und dass der Homodimer die funktional relevante Form darstellt (211-213). Ob die beobachtete Dimerisierung des *full-size* ABC-Transporters Pdr5p also eine funktionale Relevanz besitzt, oder ob sie lediglich

eine favorisierte Protein-Protein Interaktion während der Rekonstitution darstellt, kann abschließend nicht bewertet werden (210). Da allerdings eine Homodimerisierung von Pdr5p bereits aufgrund einer *Yeast-two-hybrid*-Analyse postuliert wurde (214) und da eine supramolekulare Organisation weiterer ABC-Transporter weiterhin kontrovers diskutiert wird, scheint eine nähere Analyse dieses Phänomens sinnvoll (210,211,214-219).

5.5 Pdr5p in Detergenzlösung – ein Ausnahmefall

Wie bereits erwähnt, konnte Pdr5p im Rahmen dieser Arbeit bis zur Homogenität gereinigt werden, doch war Pdr5p in solubilisierter und gereinigter Form nicht in der Lage, ATP zu binden und zu hydrolysieren. Bereits in der ersten *in vitro* Studie an Pdr5p wurde eine inhibierende Wirkung von Detergenzien auf Pdr5p beobachtet, doch beschränkten sich diese und nachfolgende Studien lediglich auf eine kleine Zahl unterschiedlicher Detergenzien (25,90,123,124). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pdr5p-spezifische ATPase-Aktivität in Plasmamembran-Präparationen durch mehr als 30 unterschiedliche Detergenzien komplett inhibiert wird. Eine detailliertere Studie der DDM-vermittelten Inhibition von Pdr5p offenbarte einen zweistufigen Inhibitionsmechanismus: Bereits bei niedrigen Konzentrationen von DDM (<CMC) wird der Pdr5p-vermittelte Transport von Rhodamin6G in Membranen verhindert, während für die Inhibition der ATPase-Aktivität deutlich höhere Konzentrationen von DDM benötigt werden (>CMC). Da Pdr5p eine zelluläre Resistenz gegen eine Vielzahl von Detergenzien vermittelt und diese konsequenterweise Substrate von Pdr5p zu sein scheinen (122,220), ist eine Inhibition des Rhodamin6G-Transports aufgrund einer Konkurrenz zwischen Rhodamin6G und Detergenz-Molekülen um die Substratbindungsstelle nicht verwunderlich. Ein vollständiger Verlust der ATPase-Aktivität konnte bei höheren Detergenzkonzentrationen für alle getesteten Detergenzien beobachtet werden und korrelierte mit der CMC des entsprechenden Detergenz. Ursächlich für den Verlust der ATPase ist also scheinbar die Solubilisierung, nicht aber die Natur des gewählten Detergenz. Eine vollständige Entfaltung von Pdr5p in Detergenzlösung erschien angesichts der CD-spektroskopischen Untersuchungen in DDM unwahrscheinlich. Es ist allerdings durchaus möglich, dass die besondere Umgebung einer Detergenzmizelle eine Konformation von Pdr5p begünstigt, in welcher die beiden

NBDs in engem Kontakt stehen und dadurch Nukleotide gar nicht oder nur extrem langsam austauschen können (Abbildung 58.A). Eine ähnliche Arretierung in einer nicht-funktionalen Konformation wurde auch für den ABC-Transporter Sav1866₂ aus *S. aureus* vermutet (44,185). Bemerkenswerterweise mussten im Fall von Sav1866₂ Proteinkristalle, die in Anwesenheit von ADP gezüchtet wurden, zweimal für jeweils fünf Tage in frischer Kristallisationslösung mit AMP-PNP inkubiert werden, um einen Nukleotidaustausch zu gewährleisten. Die Möglichkeit, dass Pdr5p in Detergenzlösung in einer ähnlichen, unproduktiven Proteinkonformation arretiert ist, wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass die ATPase-Aktivität von Pdr5p sogar durch das Transportsubstrat Rhodamin6G inhibiert werden konnte (Abbildung 57). Dabei blockierte Rhodamin6G vermutlich die extrazelluläre, niedrig-affine Substratbindestelle von Pdr5p und führte zur Arretierung derselben Konformation, die auch durch die Anwesenheit einer Detergenzmizelle begünstigt wird (Abbildung 58).

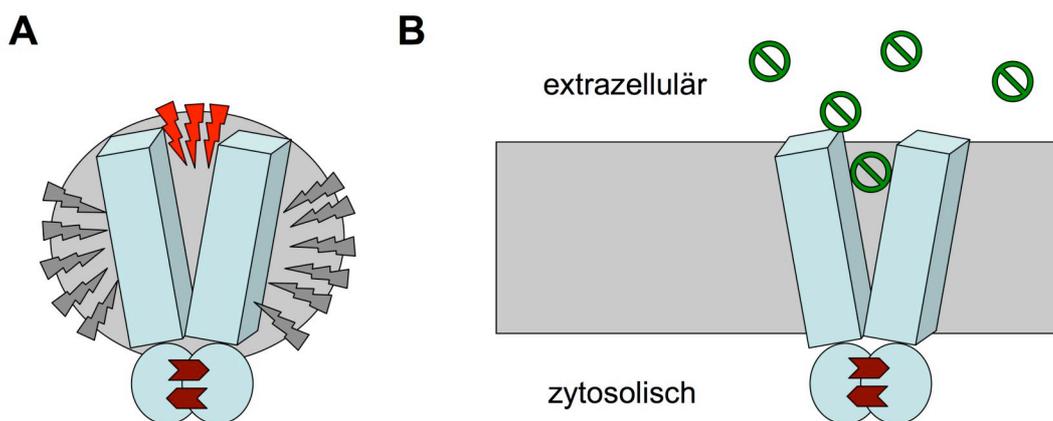


Abbildung 58 Transport-inkompetente Konformationen von Pdr5p

A) Durch die Anwesenheit einer Detergenzmizelle und/oder durch einzelne Detergenz-Moleküle (Blitze) in der niedrig-affinen Substratbindungstasche von Pdr5p wird solubilisiertes Pdr5p in einer Konformation arretiert, in der die NBDs (Kreise) in engem Kontakt stehen und nur sehr langsam Nukleotide austauschen können (dunkelrote Pfeile). **B)** In Anwesenheit extrem hoher Substratkonzentrationen (grüne Symbole) kann das Substrat nicht mehr von der niedrig-affinen, extrazellulären Bindungsstelle, die von den TMDs geformt wird (Quader), freigesetzt werden. Dadurch wird Pdr5p in einer Konformation blockiert, die nur extrem verlangsamt Nukleotide austauschen kann (dunkelrote Pfeile).

Eine kürzlich veröffentlichte, detaillierte Studie des Einflusses von Transportsubstraten auf die ATPase-Aktivität von P-Glykoprotein (ABCB1) zeigte bei niedrigen Substratkonzentrationen zunächst eine Stimulation der ATPase-Aktivität,

während durch weitere Erhöhung der Substratkonzentration die ATPase-Aktivität vollständig inhibiert werden konnte (221,222). Die Inhibition der ATPase-Aktivität dieses funktional homologen ABC-Transporters wurde in analoger Weise durch die Arretierung in einer unproduktiven Proteinkonformation erklärt (222).

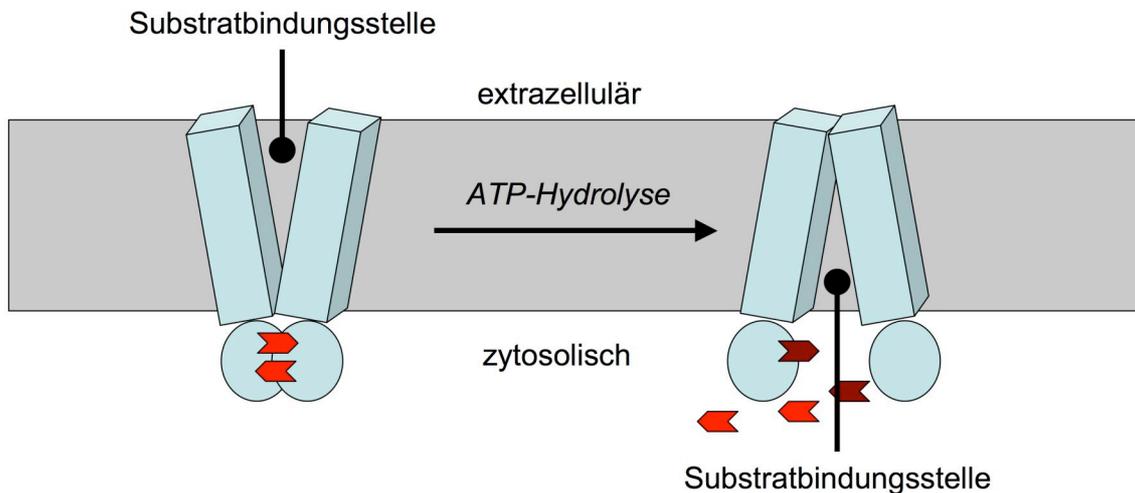


Abbildung 59 Die notwendige basale ATPase-Aktivität von Pdr5p

Durch Bindung von ATP (rote Pfeile) dimerisieren die NBDs von Pdr5p (Kreise). Lediglich die niedrig-affine, extrazelluläre Substratbindungsstelle des Proteins ist zugänglich. Der Zustand der NBDs bestimmt also hier die Konformation der TMDs (Quader). Durch die basale ATPase-Aktivität von Pdr5p wird diese Konformation kontinuierlich in eine zweite Konformation überführt, die den Austausch von Nukleotiden und die Bindung von neuen Transportsubstraten auf der zytosolischen Seite erlaubt.

Doch warum wurde die ATPase-Aktivität von Pdr5p durch Rhodamin6G nicht stimuliert? Die fehlende Stimulation der ATPase durch das Transportsubstrat impliziert, dass Pdr5p im Gegensatz zum humanen P-Glykoprotein (ABCB1) lediglich einen basalen, vom Transportsubstrat unabhängigen ATPase-Zyklus besitzt. Eine vom Substrat entkoppelte ATPase-Aktivität erscheint auf den ersten Blick als Energieverschwendung der Zelle, ist allerdings für die Aufrechterhaltung einer zellulären Drogenresistenz von zentraler Bedeutung: Da die NBDs von Pdr5p höchstwahrscheinlich auch in Abwesenheit eines Transportsubstrates ATP binden und dadurch ATP-abhängig dimerisieren können, wäre durch die resultierenden Konformationsänderungen in den TMDs lediglich die niedrig-affine, extrazelluläre Substratbindungsstelle von Pdr5p zugänglich. In Folge dessen könnte Pdr5p keine neuen Substrate auf der intrazellulären Seite binden und wäre dadurch nicht in der Lage zytotoxische Substanzen aus der Zelle zu transportieren. Die Entkopplung der

ATPase-Aktivität vom Drogentransport stellt also einen überlebenswichtigen Mechanismus dar, um Pdr5p analog zu P-Glykoprotein kontinuierlich in eine Transport-kompetente Konformation zu überführen und um die Konzentration dieser Konformation zu maximieren.

Während also eine basale, Substrat-unabhängige ATPase-Aktivität von Pdr5p Sinn macht, bleibt fraglich, warum Pdr5p und andere Multidrogentransporter aus Pilzen (127,223) im Gegensatz zu P-Glykoprotein (175,176,221,222,224,225) oder zum Beispiel MRP1 (ABCC1) überhaupt nicht (oder nur minimal) durch Transportsubstrate stimuliert werden können. Möglicherweise ist die hohe, basale ATPase-Aktivität sowie die hohe *steady-state* Expression eine Anpassung an die Funktion als Multidrogentransporter in einem einzelligen Organismus. Immerhin ist Pdr5p gemäß der *yeast GFP fusion localization database* (yeastgfp.ucsf.edu) in der spätlogarithmischen Phase mit rund 42000 Kopien pro Zelle eines der Kopienreichsten Membranproteine der Plasmamembran (115). Ob Pdr5p zusätzlich eine Rolle in der Homöostase der Plasmamembran spielt und ob Bestandteile der Plasmamembran (Sterole, Phospholipide, Zwischenstufen des Lipid-Metabolismus, etc.) dadurch Transportsubstrate für Pdr5p darstellen, wird zurzeit intensiv diskutiert (90,205,226-228).

Das etablierte Protokoll zur Reinigung von Pdr5p erlaubte also eine zügige Isolierung von Milligramm-Mengen dieses eukaryotischen Transporters in einer stabilen, wahrscheinlich nativen, aber nicht-funktionalen Konformation. Die Arretierung der konformationellen Flexibilität macht Pdr5p zu einem idealen Kandidaten für zukünftige, röntgenkristallographische Ansätze.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rekonstitution von Pdr5p in Liposomen etabliert und mittels Saccharosegradient Dichtezentrifugation und Gefrierbruchelektronenmikroskopie verifiziert. Durch die Kombination des Rekonstitutionsprotokolls mit den neu entwickelten Werkzeugen zur Reinigung, Mutagenese und funktionalen *in vitro* Analyse von Pdr5p (5.6), sollte es in sehr naher Zukunft möglich werden, die Drogentransport-Aktivität von isoliertem Pdr5p, ähnlich wie bereits für P-Glykoprotein beschrieben, in Liposomen zu bestimmen.

5.6 Die parallele Analyse von Pdr5p-Mutanten *in vivo* und *in vitro*

Wie in den Abschnitten 5.3 und 5.4 dargelegt, birgt sowohl die *in vivo* als auch die *in vitro* Analyse von Pdr5p Risiken. Als Voraussetzung für eine solide Analyse des ABC-Transporters Pdr5p *in vivo* und *in vitro* wurde eine *PDR5 Knock-in* Kassetten konstruiert, die eine chromosomale Überproduktion eines mutagenisierten Pdr5p mit einem N-terminalen 14-Histidin-*tag* erlaubt. Die spezielle Architektur der *PDR5 Knock-in* Kassetten ermöglichte dabei eine Klonierungseffizienz von >70% bei der homologen Rekombination.

Struktur-Funktionsbeziehungen in Pdr5p wurden durch die parallele Analyse von gerichtet erzeugten Pdr5p-Mutanten *in vivo* und *in vitro* ermittelt. Die Funktionalität von Pdr5p wurde *in vivo* anhand von Drogenresistenz-Phänotypen auf Drogen-Agar-Platten und in einem zell-basierten Efflux-Assay bestimmt. Durch die Etablierung eines *in vitro* Systems für Pdr5p konnten der ATP-abhängige Drogentransport und die ATPase-Aktivität der generierten Mutanten parallel untersucht werden. So konnte die *in vivo* bestimmte Funktionalität der Mutanten in zwei trennbare Teilaktivitäten aufgeschlüsselt werden, was eine detailliertere Struktur-Funktionsanalyse ermöglichte.

5.6.1 Die asymmetrischen NBDs von Pdr5p

Die NBDs von Pdr5p sind funktional asymmetrisch. Mutationen hochkonservierter Reste in den beiden Walker A Motiven (C199A und K911A) zeigten, dass eine funktionale C-terminale NBD für Pdr5p unerlässlich ist, während die äquivalente Mutation in der N-terminalen NBD keinen signifikanten Einfluss auf den Drogenresistenzphänotyp hat. Diese aufgrund der Primärsequenz wenig verwunderliche, funktionale Asymmetrie der NBDs wird durch frühere Mutationsstudien an Pdr5p (120) bestätigt. In Übereinstimmung damit führte eine analoge Mutation in der N-terminalen NBD von Cdr1p aus *C. glabrata* (C189A) zu einem Drogenresistenzphänotyp, der sich nur marginal von Wildtyp Cdr1p unterschied, während eine entsprechende Mutation in der C-terminalen NBD (K899A) zum vollständigen Verlust der Resistenz gegen Fluconazol und Rhodamin6G führte (60). Vollständig konsistent mit diesen Beobachtungen belegte die *in vitro* Analyse von Pdr5p die funktionale Asymmetrie der NBDs in der ATP-Hydrolyse und im ATP-abhängigen Drogentransport. Beide Aktivitäten waren

abhängig von der Anwesenheit des konservierten Lysins (K911) in der C-terminalen NBD, während die Mutation des äquivalenten Aminosäure in der N-terminalen NBD (C199A) keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität und den Drogentransport hatte. Bei einer vergleichbaren *in vitro* Analyse der funktionalen Asymmetrie in Cdr1p aus *C. glabrata* wurde ebenfalls eine essentielle Rolle der C-terminalen NBD für die ATP-Hydrolyse beschrieben, während der N-terminalen NBD eine eher regulatorische Rolle zugeschrieben wurde (60). Im Kontrast zu diesen Studien wurde in mehreren Veröffentlichungen zum ABC-Transporter Cdr1p aus *C. albicans* eine essentielle Rolle der ATP-Hydrolyse in der N-terminalen NBD postuliert (126-128).

Die für Pdr5p beobachtete funktionale Asymmetrie der NBDs wurde bereits für andere eukaryotische ABC-Transportern beschrieben (17,62,79-82). Das wahrscheinlichste Modell für die Funktionsweise dieser asymmetrisch arbeitenden ABC-Transporter ist, dass durch die dauerhafte Bindung eines ATP-Moleküls in einer NBD eine „Dimerisierungsplattform“ gebildet wird. Das gebundene ATP-Molekül hält dabei die beiden NBDs in der Scharnierregion zusammen, während die zweite NBD durch den fortlaufenden Zyklus von ATP-Bindung, Ausbildung eines geschlossenen NBD Dimers, ATP-Hydrolyse und Nukleotidaustausch den Substrattransport energetisiert.

5.6.2 Ein katalytisches Carboxylat in Pdr5p?

Das konservierte Glutamat (E1036), das sich der Walker B Sequenz in der C-terminalen NBD von Pdr5p anschließt, ist von zentraler Bedeutung für den Pdr5p-vermittelten Transport und die Drogenresistenz Pdr5p überproduzierender Zellen. Durch *in vitro* Analyse konnte gezeigt werden, dass eine E1036Q-Substitution zum vollständigen Verlust der Drogentransport-Aktivität sowie der ATPase-Aktivität führte. Dieses Ergebnis reiht sich in eine Serie von Studien ein, die dieser Aminosäure eine bedeutende Funktion in der ATP-Hydrolyse und im Substrattransport durch ABC-Transporter zuordnen (5.2). Der vollständige Verlust der ATPase-Aktivität durch die Mutation eines einzigen Restes in der C-terminalen NBD unterstützt zusätzlich die in (5.6.1) beschriebene funktionale Asymmetrie der NBDs. Da das Histidin des H-loop vermutlich keine Rolle in der ATP-Hydrolyse spielt (5.6.3), erscheint die Funktion einer katalytischen Dyade aus Glutamat und Histidin in Pdr5p fraglich. Die exklusive Bedeutung des Glutamats für die ATP-Hydrolyse und den ATP-abhängigen

Drogentransport könnte auf eine Funktion des konservierten Glutamats als katalytisches Carboxylat hinweisen (53,64,67), müsste allerdings durch detaillierte biochemische und biophysikalische Analysen verifiziert oder falsifiziert werden.

5.6.3 Das konservierte Histidin des H-loop als Substratsensor?

Bemerkenswerterweise führt die Mutation des Histidins im H-loop der C-terminalen NBD von Pdr5p (H1068A) zwar zu einem vollständigen Verlust der Rhodamin123-Resistenz, doch bleiben die Resistenzen gegen Fluconazol und Ketoconazol unverändert. Auch im zell-basierten Efflux-Assay zeigte diese Mutante eine geringe Restaktivität.

An dieser Stelle erwies sich die parallele *in vivo* und *in vitro* Analyse von Pdr5p als besonders wertvoll. Da diese H1068A-Mutation unerwarteterweise keinen messbaren Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Pdr5p hatte, kann das H-loop Histidin katalytisch nicht essentiell sein. Durch die zusätzliche Mutation des benachbarten Glutamins (H1068A/Q1069A) konnte ausgeschlossen werden, dass die Flexibilität des H-loop eine Redundanz dieser beiden Reste in der ATP-Hydrolyse ermöglicht. Obwohl also die H1068A eine normale ATPase-Aktivität zeigt, konnte interessanterweise *in vitro* kein ATP-abhängiger Drogentransport gemessen werden. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass dieser Rest, der sich in allen bisher bestimmten Strukturen von ABC-Transportern in unmittelbarer Nähe zum γ -Phosphat des ATP befindet, offenbar eine zentrale Funktion in der Auswahl von Transportsubstraten spielt, die Substratbindungsstelle von Pdr5p allerdings in der TMD liegt, ist die weitere Untersuchung der H1068A-Mutante für ein besseres Verständnis der TMD-NBD-Kommunikation in Pdr5p von zentraler Bedeutung. Wie kann ein Rest, der an der Dimer-Schnittstelle der NBDs begraben liegt, die Substratauswahl in den TMDs beeinflussen? Warum ist gerade dieser hochkonservierte Rest, der sich in unmittelbarer Nähe zum γ -Phosphat des gebundenen ATP befindet, an der Kopplung von ATP-Hydrolyse und Transport und/oder der Substratauswahl beteiligt? Welche Konsequenz kann diese Beobachtung für die Funktion des Histidins in anderen ABC-Transportern haben?

5.7 Der Mechanismus der ATP-Hydrolyse – eine Erweiterung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der ATP-Hydrolyse in zwei Modellsystemen untersucht. Während das konservierte Histidin des *H-loop* in der humanen TAP1-NBD ein für die Katalyse essentieller Rest ist, hat eine analoge Mutation in der C-terminalen NBD von Pdr5p offenbar keinen Einfluss auf die Rate der ATP-Hydrolyse. Auch die Bedeutung vom konservierten Glutamat, das der Walker B Sequenz folgt, ist auf dem Gebiet der ABC-Transporter äußerst kontrovers diskutiert (5.2).

Die hier präsentierten Ergebnisse führen zu einer Erweiterung des bisher formulierten Modells vom Mechanismus der ATP-Hydrolyse durch ABC-Transporter. Das erste Postulat des neuen Modells besagt, dass die Existenz einer katalytischen Dyade aus Histidin und Glutamat einem ABC-Transporter erlaubt, ATP nach zwei unterschiedlichen Mechanismen, der Substrat-assistierten Katalyse und der allgemeinen Basenkatalyse, zu spalten und dementsprechend in zwei unterschiedlichen Modi zu arbeiten (54,56).

Das zweite zentrale Postulat des neuen Modells ist, dass sich die für viele ABC-Transporter beobachtete basale und die Substrat-stimulierte ATPase-Aktivität in der Nutzung zweier alternativer, aber voneinander abhängiger Mechanismen der ATP-Hydrolyse widerspiegeln. Dem in der Familie der ABC-Transporter hochkonservierten Histidin des *H-loop* kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Während einige ABC-Transporter nur einen Modus verwenden und streng gekoppelt agieren (z.B. die Importersysteme HisP (194,200) und MalK (198) aus *E. coli*), können andere zwischen basaler, entkoppelter und Substrat-stimulierter, gekoppelter ATPase-Aktivität umschalten (z.B. humanes P-Glykoprotein, ABCB1) (221,222).

Die Bedeutung einer basalen ATPase-Aktivität für die kontinuierliche Rückführung von P-Glykoprotein und andere ABC-Exporter in eine Transport-kompetente Konformation wurde bereits in 5.5 diskutiert. ABC-Importer benötigen keine basale ATPase-Aktivität, da die ATP-induzierte Dimerisierung der NBDs eine Transport-kompetente Konformation des Proteins induziert (Abbildung 60). Ob ein ABC-Transporter beide Modi (gekoppelt *und* entkoppelt) oder nur einen der beiden Modi (gekoppelt *oder* entkoppelt) verwendet, scheint eine individuelle Anpassung an die jeweiligen Anforderungen darzustellen.

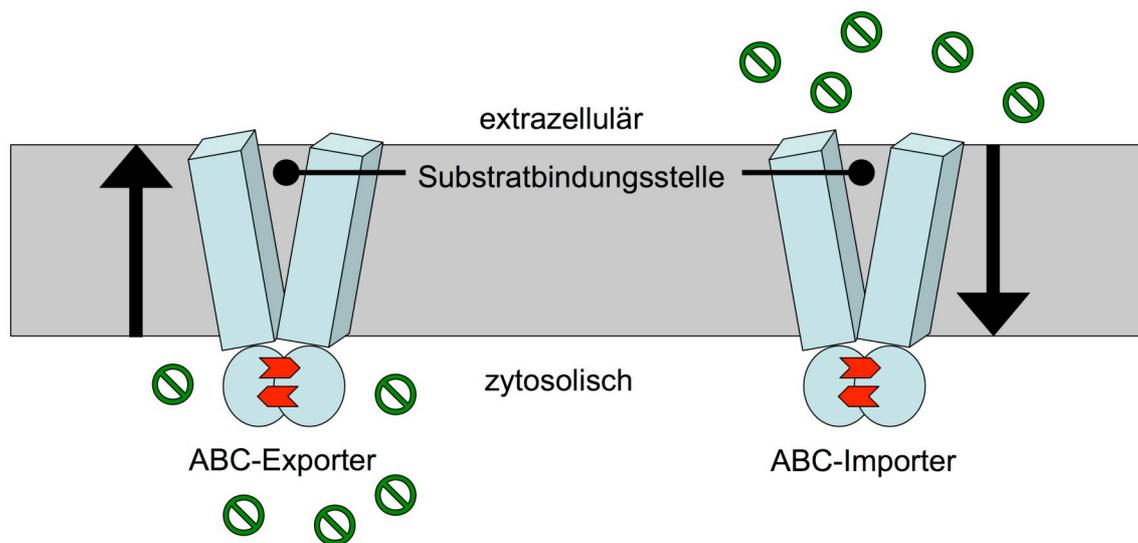


Abbildung 60 ATP-induzierte Konformationen bei ABC-Importern und ABC-Exportern

Die ATP-induzierte enge Assoziation von NBDs (Kreise) führt zu Konformationsänderungen in den TMDs (Quader). Während bei ABC-Importern die Substratbindungstasche für neue Transportsubstrate (grüne Symbole) zugänglich bleibt, ist die Substratbindungsstelle von ABC-Exportern in dieser Konformation für Transportsubstrate unzugänglich. Das für ein bakterielles Importsystem übliche Substratbindeprotein ist in dieser schematischen Zeichnung nicht dargestellt.

Pdr5p ist der erste ABC-Transporter, bei dem nach einer Mutation des konservierten Histidins des *H-loop* die ATPase-Aktivität vollständig erhalten bleibt. Zusätzlich scheint Pdr5p vollständig entkoppelt zu funktionieren, da seine ATPase-Aktivität durch Transportsubstrate nicht stimuliert wird. Allerdings konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich durch eine Mutation des Histidins (H1068A) die Substratspezifität von Pdr5p ändert. Offenbar gibt es also ein Zwiesgespräch zwischen dem konservierten Histidin des *H-loop* und der Substratbindungstasche in Pdr5p. Diese Tatsache macht das Histidin zu einem hervorragenden Kandidaten als Koordinator zwischen der ATPase-Aktivität und der Substratbindungsstelle.

Konsequenterweise führen die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zum dritten Postulat, dass das konservierte Histidin eine duale Rolle als Substratsensor und ATPase-Regulator besitzt. Unterstützt wird dieses Postulat dadurch, dass in streng gekoppelten Importsystemen wie MalK (198) oder HisP (194,200) aus *E. coli* die Mutation des konservierten Histidins zum vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität und des ATP-vermittelten Transports führt, während das

Histidin trotz seiner unmittelbaren Nähe zum γ -Phosphat für die ATPase-Aktivität im vermutlich vollständig entkoppelt arbeitenden Pdr5p unbedeutend war.

Eine detaillierte Beschreibung, wie sich die postulierte, doppelte Funktion des Histidins in einem ABC-Transporter strukturell manifestiert, speziell in einem ABC-Transporter, der in zwei unterschiedlichen Modi operieren kann (z.B. P-Glykoprotein) (221,222), bedarf zukünftiger struktureller, biochemischer und dynamischer Analysen. Es erscheint allerdings notwendig, dass in einem Transporter wie P-Glykoprotein die Information, ob ein Substrat innerhalb der TMDs gebunden vorliegt, auf eine bestimmte Weise bis zum γ -Phosphat des gebundenen ATP weitergeleitet wird. Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse machen das Histidin des H-loop zu einem Hauptkandidaten für diese Aufgabe.

Literaturverzeichnis

1. Singer, S. J., und Nicolson, G. L. (1972) *Science* **175**, 720-731
2. Simons, K., und Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572
3. Saier, M. H., Jr. (2000) *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2), 354-411
4. Higgins, C. F. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**(67), 67-113
5. Kuhlbrandt, W. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4), 282-295
6. Pomorski, T., und Menon, A. K. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**(24), 2908-2921
7. Abramson, J., Iwata, S., und Kaback, H. R. (2004) *Mol Membr Biol* **21**(4), 227-236
8. Pao, S. S., Paulsen, I. T., und Saier, M. H., Jr. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1), 1-34
9. Saier, M. H., Hvorup, R. N., und Barabote, R. D. (2005) *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1), 220-224
10. MacKinnon, R. (2003) *FEBS Lett* **555**(1), 62-65
11. Schmidt, D., Jiang, Q. X., und MacKinnon, R. (2006) *Nature* **444**(7120), 775-779
12. Lee, S. Y., Lee, A., Chen, J., und MacKinnon, R. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43), 15441-15446
13. Unwin, N. (2005) *J Mol Biol* **346**(4), 967-989
14. Schmitt, L., und Tampé, R. (2002) *Cur. Opin. Struc. Biol.* **12**, 754-760
15. Bauer, B. E., Schüller, C., und Kuchler, K. (2003) Fungal ABC Proteins in Clinical Drug Resistance and Cellular Detoxification. In: I Barry Holland, S. P. C., Karl Kuchler and Christopher F Higgins (ed). *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, Academic Press - Elsevier Science, Amsterdam
16. Schüller, C., Bauer, B. E., und Kuchler, K. (2003) Inventory and Evolution of Fungal ABC Protein Genes. In: I Barry Holland, S. P. C., Karl Kuchler and Christopher F Higgins (ed). *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, Academic Press - Elsevier Science, Amsterdam
17. Vergani, P., Lockless, S. W., Nairn, A. C., und Gadsby, D. C. (2005) *Nature* **433**(7028), 876-880
18. Holland, I. B., und Blight, M. A. (1999) *J Mol Biol* **293**(2), 381-399
19. Kuchler, K., und Thorner, J. (1992) *Endocr Rev* **13**(3), 499-514
20. Dean, M., und Annilo, T. (2005) *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 123-142
21. Davidson, A. L., und Nikaido, H. (1990) *J Biol Chem* **265**(8), 4254-4260

22. Ames, G. F., Nikaido, K., Wang, I. X., Liu, P. Q., Liu, C. E., und Hu, C. (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**(2), 79-92
23. Di Pietro, A., Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Dayan, G., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Steinfels, E., Jault, J. M., de Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel, A., Mariotte, A. M., Dumontet, C., McIntosh, D. B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F., und Barron, D. (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**(2), 307-322
24. Arrese, M., und Ananthanarayanan, M. (2004) *Pflugers Arch* **449**(2), 123-131
25. Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillion, J. P., Konings, W. N., und Goffeau, A. (1996) *J Biol Chem* **271**(49), 31543-31548
26. Daleke, D. L. (2003) *J Lipid Res* **44**(2), 233-242
27. Abele, R., und Tampe, R. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**(2), 405-419
28. Holland, I. B., Blight, M. A., und Kenny, B. (1990) *J Bioenerg Biomembr* **22**(3), 473-491
29. Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K., und Poolman, B. (2006) *FEBS Lett* **580**(4), 1085-1093
30. Deeley, R. G., und Cole, S. P. (2006) *FEBS Lett* **580**(4), 1103-1111
31. Jones, P. M., und George, A. M. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**(6), 682-699
32. Senior, A. E., al-Shawi, M. K., und Urbatsch, I. L. (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27**(1), 31-36
33. Khwaja, M., Ma, Q., und Saier, M. H., Jr. (2005) *Res Microbiol* **156**(2), 270-277
34. Locher, K. P., Lee, A. T., und Rees, D. C. (2002) *Science* **296**(5570), 1091-1098
35. Schuurman-Wolters, G. K., und Poolman, B. (2005) *J Biol Chem* **280**(25), 23785-23790
36. van der Does, C., und Tampe, R. (2004) *Biol Chem* **385**(10), 927-933
37. van der Does, C., und Tampe, R. (2004) *Chembiochem* **5**(9), 1171-1175
38. Locher, K. P. (2004) *Curr Opin Struct Biol* **14**(4), 426-431
39. Davidson, A. L., und Chen, J. (2004) *Annu Rev Biochem* **73**, 241-268
40. Higgins, C. F., und Linton, K. J. (2004) *Nat Struct Mol Biol* **11**(10), 918-926
41. Hollenstein, K., Frei, D. C., und Locher, K. P. (2007) *Nature* **446**(7132), 213-216
42. Mourez, M., Hofnung, M., und Dassa, E. (1997) *Embo J* **16**(11), 3066-3077
43. Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K. P., und Rees, D. C. (2007) *Science* **315**(5810), 373-377
44. Dawson, R. J., und Locher, K. P. (2006) *Nature* **443**(7108), 180-185

45. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., und et al. (1986) *Nature* **323**(6087), 448-450
46. Vetter, I. R., und Wittinghofer, A. (1999) *Q Rev Biophys* **32**(1), 1-56
47. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., und Gay, N. J. (1982) *Embo J* **1**(8), 945-951
48. Hung, L.-W., Wang, I. X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ferro-Luzzi Ames, G., und Kim, S.-H. (1998) *Nature* **396**, 703-707
49. Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vorrhein, C., Boos, W., und Welte, W. (2000) *Embo J* **19**(22), 5951-5961
50. Gaudet, R., und Wiley, D. C. (2001) *EMBO J.* **20**(17), 4964-4972
51. Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M. A., Holland, I. B., und Stubbs, M. T. (2003) *J Mol Biol* **330**, 333-342
52. Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L., und Quioco, F. A. (2003) *Mol Cell* **12**(3), 651-661
53. Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J., und Hunt, J. F. (2002) *Mol Cell* **10**(1), 139-149
54. Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B., und Schmitt, L. (2005) *Embo J* **24**(11), 1901-1910
55. Senior, A. E., und Gadsby, D. C. (1997) *Semin Cancer Biol* **8**(3), 143-150
56. Ernst, R., Koch, J., Horn, C., Tampe, R., und Schmitt, L. (2006) *J Biol Chem* **281**(37), 27471-27480
57. Horn, C., Bremer, E., und Schmitt, L. (2003) *J Mol Biol* **334**(3), 403-419
58. Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C., und Tampe, R. (2003) *J Biol Chem* **278**(29), 26862-26869
59. Patzlaff, J. S., van der Heide, T., und Poolman, B. (2003) *J Biol Chem* **278**(32), 29546-29551
60. Wada, S., Tanabe, K., Yamazaki, A., Niimi, M., Uehara, Y., Niimi, K., Lamping, E., Cannon, R. D., und Monk, B. C. (2005) *J Biol Chem* **280**(1), 94-103
61. Frelet, A., und Klein, M. (2006) *FEBS Lett* **580**(4), 1064-1084
62. Chen, M., Abele, R., und Tampe, R. (2004) *J Biol Chem* **279**(44), 46073-46081
63. Sauna, Z. E., und Ambudkar, S. V. (2001) *J Biol Chem* **276**(15), 11653-11661
64. Moody, J. E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J. F., und Thomas, P. J. (2002) *J Biol Chem* **277**(24), 21111-21114
65. Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I. B., und Schmitt, L. (2005) *Biochemistry* **44**, 9680-9690

66. Herget, M., Oancea, G., Schrodt, S., Karas, M., Tampe, R., und Abele, R. (2007) *J Biol Chem* **282**(6), 3871-3880
67. Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A., und Jault, J. M. (2003) *J Biol Chem* **278**(47), 47002-47008
68. Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I. B., und Schmitt, L. (2006) *FEBS Lett* **580**(4), 1036-1041
69. Janeway, C. A., Jr. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7461-7468
70. Rock, K. L., und Goldberg, A. L. (1999) *Annu Rev Immunol* **17**, 739-779
71. Seufert, W., und Jentsch, S. (1992) *Embo J* **11**(8), 3077-3080
72. Momburg, F., Neefjes, J. J., und Hammerling, G. J. (1994) *Curr Opin Immunol* **6**(1), 32-37
73. Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J., und Neefjes, J. J. (1994) *J Exp Med* **179**(5), 1613-1623
74. Lehner, P. J., und Trowsdale, J. (1998) *Curr Biol* **8**(17), R605-608
75. Abele, R., und Tampe, R. (2004) *Physiology (Bethesda)* **19**, 216-224
76. Koch, J., Guntrum, R., und Tampe, R. (2005) *FEBS Lett* **579**(20), 4413-4416
77. Koch, J., Guntrum, R., und Tampe, R. (2006) *FEBS Lett* **580**(17), 4091-4096
78. Koch, J., und Tampe, R. (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**(6), 653-662
79. Karttunen, J. T., Lehner, P. J., Gupta, S. S., Hewitt, E. W., und Cresswell, P. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7431-7436
80. Perria, C. L., Rajamanickam, V., Lapinski, P. E., und Raghavan, M. (2006) *J Biol Chem* **281**(52), 39839-39851
81. Procko, E., Ferrin-O'Connell, I., Ng, S. L., und Gaudet, R. (2006) *Mol Cell* **24**(1), 51-62
82. Payen, L. F., Gao, M., Westlake, C. J., Cole, S. P., und Deeley, R. G. (2003) *J Biol Chem* **278**(40), 38537-38547
83. Taglicht, D., und Michaelis, S. (1998) *Methods Enzymol* **292**, 130-162
84. Kuchler, K., Sterne, R. E., und Thorner, J. (1989) *Embo J* **8**(13), 3973-3984
85. Kuchler, K., Dohlman, H. G., und Thorner, J. (1993) *J Cell Biol* **120**(5), 1203-1215
86. Kuhnke, G., Neumann, K., Muhlenhoff, U., und Lill, R. (2006) *Mol Membr Biol* **23**(2), 173-184
87. Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., und Lill, R. (1997) *FEBS Lett* **418**(3), 346-350
88. Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., und Langer, T. (2001) *Science* **291**(5511), 2135-2138

89. Katzmann, D. J., Epping, E. A., und Moye-Rowley, W. S. (1999) *Mol Cell Biol* **19**(4), 2998-3009
90. Decottignies, A., Grant, A. M., Nichols, J. W., de Wet, H., McIntosh, D. B., und Goffeau, A. (1998) *J Biol Chem* **273**(20), 12612-12622
91. Katzmann, D. J., Hallstrom, T. C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G., und Moye-Rowley, W. S. (1995) *Mol Cell Biol* **15**(12), 6875-6883
92. Ortiz, D. F., St Pierre, M. V., Abdulmessih, A., und Arias, I. M. (1997) *J Biol Chem* **272**(24), 15358-15365
93. Shani, N., und Valle, D. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11901-11906
94. Shani, N., Watkins, P. A., und Valle, D. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13), 6012-6016
95. Bauer, B. E., Wolfger, H., und Kuchler, K. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**(2), 217-236
96. Ernst, R., Klemm, R., Schmitt, L., und Kuchler, K. (2005) *Methods Enzymol* **400**, 460-484
97. Reiner, S., Micolod, D., Zellnig, G., und Schneiter, R. (2006) *Mol Biol Cell* **17**(1), 90-103
98. Li, Y., und Prinz, W. A. (2004) *J Biol Chem* **279**(43), 45226-45234
99. Wilcox, L. J., Balderes, D. A., Wharton, B., Tinkelenberg, A. H., Rao, G., und Sturley, S. L. (2002) *J Biol Chem* **277**(36), 32466-32472
100. Wolfger, H., Mamnun, Y. M., und Kuchler, K. (2001) *Res Microbiol* **152**(3-4), 375-389
101. Borst, P., und Elferink, R. O. (2002) *Annu Rev Biochem* **71**, 537-592
102. Moye-Rowley, W. S. (2003) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73**, 251-279
103. DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., und Goffeau, A. (2000) *FEBS Lett* **470**(2), 156-160
104. Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E., und Goffeau, A. (1987) *J Biol Chem* **262**(35), 16871-16879
105. Cui, Z., Shiraki, T., Hirata, D., und Miyakawa, T. (1998) *Mol Microbiol* **29**(5), 1307-1315
106. Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J., und Jacq, C. (1994) *Mol Gen Genet* **244**(5), 501-511
107. Hikkel, I., Lucau-Danila, A., Delaveau, T., Marc, P., Devaux, F., und Jacq, C. (2003) *J Biol Chem* **278**(13), 11427-11432
108. Lucau-Danila, A., Delaveau, T., Lelandais, G., Devaux, F., und Jacq, C. (2003) *J Biol Chem* **278**(52), 52641-52650
109. Katzmann, D. J., Hallstrom, T. C., Mahe, Y., und Moye-Rowley, W. S. (1996) *J Biol Chem* **271**(38), 23049-23054

110. Katzmann, D. J., Burnett, P. E., Golin, J., Mahe, Y., und Moye-Rowley, W. S. (1994) *Mol Cell Biol* **14**(7), 4653-4661
111. Wolfger, H., Mahe, Y., Parle-McDermott, A., Delahodde, A., und Kuchler, K. (1997) *FEBS Lett* **418**(3), 269-274
112. Delahodde, A., Delaveau, T., und Jacq, C. (1995) *Mol Cell Biol* **15**(8), 4043-4051
113. Zhang, X., Cui, Z., Miyakawa, T., und Moye-Rowley, W. S. (2001) *J Biol Chem* **276**(12), 8812-8819
114. Carvajal, E., van den Hazel, H. B., Cybularz-Kolaczowska, A., Balzi, E., und Goffeau, A. (1997) *Mol Gen Genet* **256**(4), 406-415
115. Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., und Weissman, J. S. (2003) *Nature* **425**(6959), 737-741
116. Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., und Goffeau, A. (1994) *J Biol Chem* **269**(3), 2206-2214
117. Bissinger, P. H., und Kuchler, K. (1994) *J Biol Chem* **269**(6), 4180-4186
118. Hirata, D., Yano, K., Miyahara, K., und Miyakawa, T. (1994) *Curr Genet* **26**(4), 285-294
119. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., und Davis, R. W. (1999) *Science* **285**(5429), 901-906
120. Egner, R., Rosenthal, F. E., Kralli, A., Sanglard, D., und Kuchler, K. (1998) *Mol Biol Cell* **9**(2), 523-543
121. Egner, R., Bauer, B. E., und Kuchler, K. (2000) *Mol Microbiol* **35**(5), 1255-1263
122. Tutulan-Cunita, A. C., Mikoshi, M., Mizunuma, M., Hirata, D., und Miyakawa, T. (2005) *Genes Cells* **10**(5), 409-420
123. Decottignies, A., Kolaczowski, M., Balzi, E., und Goffeau, A. (1994) *J Biol Chem* **269**(17), 12797-12803
124. Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H., Epping, E. A., Moye-Rowley, W. S., Balzi, E., und Goffeau, A. (1995) *J Biol Chem* **270**(30), 18150-18157
125. Holmes, A. R., Tsao, S., Lamping, E., Niimi, K., Monk, B. C., Tanabe, K., Niimi, M., und Cannon, R. D. (2006) *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **47**(4), 275-281
126. Rai, V., Gaur, M., Shukla, S., Shukla, S., Ambudkar, S. V., Komath, S. S., und Prasad, R. (2006) *Biochemistry* **45**(49), 14726-14739
127. Shukla, S., Rai, V., Banerjee, D., und Prasad, R. (2006) *Biochemistry* **45**(7), 2425-2435

128. Jha, S., Karnani, N., Dhar, S. K., Mukhopadhyay, K., Shukla, S., Saini, P., Mukhopadhyay, G., und Prasad, R. (2003) *Biochemistry* **42**(36), 10822-10832
129. Kralli, A., Bohlen, S. P., und Yamamoto, K. R. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10), 4701-4705
130. Conseil, G., Decottignies, A., Jault, J. M., Comte, G., Barron, D., Goffeau, A., und Di Pietro, A. (2000) *Biochemistry* **39**(23), 6910-6917
131. Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Jault, J. M., Gamarro, F., Goffeau, A., Hofmann, J., und Di Pietro, A. (2001) *Biochemistry* **40**(8), 2564-2571
132. Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Renoir, J. M., Goffeau, A., und Di Pietro, A. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1614**(2), 131-134
133. Golin, J., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., Habib, A. D., Sczepanski, J., Ziccardi, W., und May, L. (2003) *J Biol Chem* **278**(8), 5963-5969
134. Golin, J., Barkatt, A., Cronin, S., Eng, G., und May, L. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* **44**(1), 134-138
135. Hanson, L., May, L., Tuma, P., Keeven, J., Mehl, P., Ferenz, M., Ambudkar, S. V., und Golin, J. (2005) *Biochemistry* **44**(28), 9703-9713
136. Chiba, P., Ecker, G., Schmid, D., Drach, J., Tell, B., Goldenberg, S., und Gekeler, V. (1996) *Mol Pharmacol* **49**(6), 1122-1130
137. Ford, J. M., Bruggemann, E. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., und Hait, W. N. (1990) *Cancer Res* **50**(6), 1748-1756
138. Romsicki, Y., und Sharom, F. J. (1999) *Biochemistry* **38**(21), 6887-6896
139. Schumacher, M. A., Miller, M. C., und Brennan, R. G. (2004) *Embo J* **23**(15), 2923-2930
140. Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., und Brennan, R. G. (2001) *Science* **294**(5549), 2158-2163
141. Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J. R. (1998) *Yeast* **14**(10), 953-961
142. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**(5259), 680-685
143. Egner, R., und Kuchler, K. (1996) *FEBS Lett* **378**(2), 177-181
144. Serrano, R. (1988) *Methods Enzymol* **157**, 533-544
145. Dufour, J. P., Amory, A., und Goffeau, A. (1988) *Methods Enzymol* **157**, 513-528
146. Goffeau, A., und Dufour, J. P. (1988) *Methods Enzymol* **157**, 528-533
147. Folch, J., Lees, M., und Sloane Stanley, G. H. (1957) *J Biol Chem* **226**(1), 497-509
148. Rothnie, A., Theron, D., Soceneantu, L., Martin, C., Traikia, M., Berridge, G., Higgins, C. F., Devaux, P. F., und Callaghan, R. (2001) *Eur Biophys J* **30**(6), 430-442
149. Kol, M. A., van Dalen, A., de Kroon, A. I., und de Kruijff, B. (2003) *J Biol Chem* **278**(27), 24586-24593

150. Hofacker, M., Gompf, S., Zutz, A., Presenti, C., Haase, W., van der Does, C., Model, K., und Tampe, R. (2007) *J Biol Chem* **282**(6), 3951-3961
151. Mildvan, A. S. (2004) *Biochemistry* **43**(46), 14517-14520
152. Schneider, E., und Hunke, S. (1998) *FEMS Microbiol Rev* **22**(1), 1-20
153. Delepelaire, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27952-27957
154. Tomblin, G., Bartholomew, L. A., Tyndall, G. A., Gimi, K., Urbatsch, I. L., und Senior, A. E. (2004) *J Biol Chem* **279**(45), 46518-46526
155. Ramaen, O., Leulliot, N., Sizun, C., Ulryck, N., Pamlard, O., Lallemand, J. Y., Tilbeurgh, H., und Jacquet, E. (2006) *J Mol Biol* **359**(4), 940-949
156. Ramaen, O., Sizun, C., Pamlard, O., Jacquet, E., und Lallemand, J. Y. (2005) *Biochem J* **391**(Pt 3), 481-490
157. Ramaen, O., Masscheleyn, S., Duffieux, F., Pamlard, O., Oberkampf, M., Lallemand, J. Y., Stoven, V., und Jacquet, E. (2003) *Biochem J* **376**(Pt 3), 749-756
158. Nikaido, K., Liu, P. Q., und Ames, G. F. (1997) *J Biol Chem* **272**(44), 27745-27752
159. Sauna, Z. E., Smith, M. M., Muller, M., Kerr, K. M., und Ambudkar, S. V. (2001) *J Bioenerg Biomembr* **33**(6), 481-491
160. Seddon, A. M., Curnow, P., und Booth, P. J. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1666**(1-2), 105-117
161. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., und Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**(13), 1793-1808
162. Kunze, I. I., Hensel, G., Adler, K., Bernard, J., Neubohn, B., Nilsson, C., Stoltenburg, R., Kohlwein, S. D., und Kunze, G. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1410**(3), 287-298
163. Ellgaard, L., Molinari, M., und Helenius, A. (1999) *Science* **286**(5446), 1882-1888
164. Hong, E., Davidson, A. R., und Kaiser, C. A. (1996) *J Cell Biol* **135**(3), 623-633
165. Moller, J. V., und le Maire, M. (1993) *J Biol Chem* **268**(25), 18659-18672
166. Qu, Q., Chu, J. W., und Sharom, F. J. (2003) *Biochemistry* **42**(5), 1345-1353
167. Qu, Q., Russell, P. L., und Sharom, F. J. (2003) *Biochemistry* **42**(4), 1170-1177
168. Sankaran, B., Bhagat, S., und Senior, A. E. (1997) *Biochemistry* **36**(22), 6847-6853
169. Senior, A. E., und Bhagat, S. (1998) *Biochemistry* **37**(3), 831-836
170. Paulais, M., und Turner, R. J. (1992) *J Biol Chem* **267**(30), 21558-21563
171. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., und Walker, J. E. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(23), 8646-8649
172. Artigas, P., und Gadsby, D. C. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2), 501-505
173. Knol, J., Sjollem, K., und Poolman, B. (1998) *Biochemistry* **37**(46), 16410-16415

174. Rigaud, J.-L., Pitard, B., und Levy, D. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 223-246
175. Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P., und Ling, V. (1999) *Eur J Biochem* **259**(3), 841-850
176. Shapiro, A. B., und Ling, V. (1998) *Acta Physiol Scand Suppl* **643**, 227-234
177. Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dotsch, V., und Bernhard, F. (2007) *J Struct Biol*
178. Ostermeier, C., und Michel, H. (1997) *Curr Opin Struct Biol* **7**(5), 697-701
179. Lin, Y. P., und Carman, G. M. (1989) *J Biol Chem* **264**(15), 8641-8645
180. Lin, Y. P., und Carman, G. M. (1990) *J Biol Chem* **265**(1), 166-170
181. Bloemendal, M., und Johnson, W. C., Jr. (1995) *Pharm Biotechnol* **7**, 65-100
182. Niimi, M., Tanabe, K., Wada, S., Yamazaki, A., Uehara, Y., Niimi, K., Lamping, E., Holmes, A. R., Monk, B. C., und Cannon, R. D. (2005) *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **46**(4), 249-260
183. Niimi, M., Wada, S., Tanabe, K., Kaneko, A., Takano, Y., Umeyama, T., Hanaoka, N., Uehara, Y., Lamping, E., Niimi, K., Tsao, S., Holmes, A. R., Monk, B. C., und Cannon, R. D. (2005) *Jpn J Infect Dis* **58**(1), 1-7
184. Wada, S., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A. R., Monk, B. C., Cannon, R. D., und Uehara, Y. (2002) *J Biol Chem* **277**(48), 46809-46821
185. Dawson, R. J., und Locher, K. P. (2007) *FEBS Lett* **581**(5), 935-938
186. Zaitseva, J., Oswald, C., Jumpertz, T., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Holland, I. B., und Schmitt, L. (2006) *Embo J* **25**(14), 3432-3443
187. Gaudet, R., und Wiley, D. C. (2001) *Embo J* **20**(17), 4964-4972
188. Hopfner, K. P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P., und Tainer, J. A. (2000) *Cell* **101**(7), 789-800
189. Junop, M. S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P., und Yang, W. (2001) *Mol Cell* **7**(1), 1-12
190. Karcher, A., Bu Ttner, K., Martens, B., Jansen, R. P., und Hopfner, K. P. (2005) *Structure (Camb)* **13**(4), 649-659
191. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P., und Yang, W. (2000) *Nature* **407**(6805), 703-710
192. Verdon, G., Albers, S. V., Dijkstra, B. W., Driessen, A. J., und Thunnissen, A. M. (2003) *J Mol Biol* **330**(2), 343-358
193. Verdon, G., Albers, S. V., van Oosterwijk, N., Dijkstra, B. W., Driessen, A. J., und Thunnissen, A. M. (2003) *J Mol Biol* **334**(2), 255-267
194. Nikaido, K., und Ames, G. F. (1999) *J Biol Chem* **274**(38), 26727-26735
195. Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., und Ames, G. F. (1991) *J Biol Chem* **266**(28), 18714-18719
196. Davidson, A. L., und Sharma, S. (1997) *J Bacteriol* **179**(17), 5458-5464

197. Yang, R., und Chang, X. B. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1768**(2), 324-335
198. Davidson, A. L., und Nikaido, H. (1991) *J Biol Chem* **266**(14), 8946-8951
199. Liu, P.-Q., und Ames, G. F.-L. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 3495-3500
200. Liu, P. Q., Liu, C. E., und Ames, G. F. (1999) *J Biol Chem* **274**(26), 18310-18318
201. Neumann, L., und Tampé, R. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 1203-1213
202. van Endert, P. M., Saveanu, L., Hewitt, E. W., und Lehner, P. (2002) *Trends Biochem Sci* **27**(9), 454-461
203. van Endert, P. M., Tampé, R., Meyer, T. H., Tisch, R., Bach, J. F., und McDevitt, H. O. (1994) *Immunity* **1**(N6), 491-500
204. Devaux, F., Carvajal, E., Moye-Rowley, S., und Jacq, C. (2002) *FEBS Lett* **515**(1-3), 25-28
205. Kihara, A., und Igarashi, Y. (2004) *Mol Biol Cell* **15**(11), 4949-4959
206. Panwar, S. L., und Moye-Rowley, W. S. (2006) *J Biol Chem* **281**(10), 6376-6384
207. Zhang, X., und Moye-Rowley, W. S. (2001) *J Biol Chem* **276**(51), 47844-47852
208. Gallop, J. L., Butler, P. J., und McMahon, H. T. (2005) *Nature* **438**(7068), 675-678
209. Wang, Z., Stalcup, L. D., Harvey, B. J., Weber, J., Chloupkova, M., Dumont, M. E., Dean, M., und Urbatsch, I. L. (2006) *Biochemistry* **45**(32), 9929-9939
210. Ferreira-Pereira, A., Marco, S., Decottignies, A., Nader, J., Goffeau, A., und Rigaud, J. L. (2003) *J Biol Chem* **278**(14), 11995-11999
211. Chami, M., Steinfels, E., Orelle, C., Jault, J. M., Di Pietro, A., Rigaud, J. L., und Marco, S. (2002) *J Mol Biol* **315**(5), 1075-1085
212. Ravaud, S., Do Cao, M. A., Jidenko, M., Ebel, C., Le Maire, M., Jault, J. M., Di Pietro, A., Haser, R., und Aghajari, N. (2006) *Biochem J* **395**(2), 345-353
213. Dalmas, O., Do Cao, M. A., Lugo, M. R., Sharom, F. J., Di Pietro, A., und Jault, J. M. (2005) *Biochemistry* **44**(11), 4312-4321
214. Subba Rao, G., Bachhawat, A. K., und Gupta, C. M. (2002) *Funct Integr Genomics* **1**(6), 357-366
215. Soszynski, M., Kaluzna, A., Rychlik, B., Sokal, A., und Bartosz, G. (1998) *Arch Biochem Biophys* **354**(2), 311-316
216. Rosenberg, M. F., Mao, Q., Holzenburg, A., Ford, R. C., Deeley, R. G., und Cole, S. P. (2001) *J Biol Chem* **276**(19), 16076-16082
217. Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., und Zhang, J. T. (2004) *J Biol Chem* **279**(19), 19781-19789
218. Poruchynsky, M. S., und Ling, V. (1994) *Biochemistry* **33**(14), 4163-4174
219. Awayn, N. H., Rosenberg, M. F., Kamis, A. B., Aleksandrov, L. A., Riordan, J. R., und Ford, R. C. (2005) *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5), 996-999

220. Wolfger, H., Mamnun, Y. M., und Kuchler, K. (2004) *J Biol Chem* **279**(12), 11593-11599
221. Al-Shawi, M. K., und Omote, H. (2005) *J Bioenerg Biomembr* **37**(6), 489-496
222. Al-Shawi, M. K., Polar, M. K., Omote, H., und Figler, R. A. (2003) *J Biol Chem* **278**(52), 52629-52640
223. Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A. R., Yates, J. E., Decottignies, A., Monk, B. C., Goffeau, A., und Cannon, R. D. (2001) *Antimicrob Agents Chemother* **45**(12), 3366-3374
224. Shapiro, A. B., und Ling, V. (1998) *Eur J Biochem* **254**(1), 189-193
225. Shapiro, A. B., und Ling, V. (1997) *Eur J Biochem* **250**(1), 130-137
226. Mahe, Y., Lemoine, Y., und Kuchler, K. (1996) *J Biol Chem* **271**(41), 25167-25172
227. Pohl, A., Devaux, P. F., und Herrmann, A. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1733**(1), 29-52
228. Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G., und Holthuis, J. C. (2003) *Mol Biol Cell* **14**(3), 1240-1254

a.E.	arbiträre Einheit
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
AS	Antisense
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Serumalbumin vom Rind (<i>bovine serum albumin</i>)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
C ₁₂ E ₈	Octaethyleneglycolmonododecylether
CMC	kritische Mizellen Konzentration (<i>critical micellar concentration</i>)
cps	Ereignisse pro Sekunde (<i>counts per second</i>)
DDM	Dodecyl-β-D-maltopyranosid
DM	Decyl-β-D-maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxy-Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Variante von GFP (<i>enhanced GFP</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonsäure
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)
NBD	Nukleotid bindende Domäne
NBD-PE	Palmitoyl-(NBD-hexanoyl)-phosphatidylethanolamin
OD	optische Dichte
OG	Octyl-β-D-glukopyranosid
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phosphatidylethanolamin
PGK	Phosphogylzerat Kinase
RT	Raumtemperatur
S	Sense
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAC	Substrat-assistierte Katalyse (<i>substrate assisted catalysis</i>)
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl-sulfate</i>)
TAP	Transporter assoziiert mit der Antigenprozessierung
TCA	Trichloressigsäure
TDM	Tridecyl-β-D-maltopyranosid
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TNP	2,4,6,-trinitrophenol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
YNB	Hefe Stickstoff Base (<i>yeast nitrogen base</i>)
YPD	Hefe Pepton Dextrose (<i>yeast peptone dextrose</i>)

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lutz Schmitt für die hervorragende Unterstützung, für den blauen Daumen und die offene Tür, für den Enthusiasmus, den Pragmatismus, die Motivation und den Rock and Roll. Danke!

Bei den Kooperationspartnern Prof. Dr. Robert Tampé, Prof. Dr. Karl Kuchler und Prof. Dr. Gerrit van Meer, Dr. Joachim Koch, Dr. Sigrún Hrafnisdóttir, Dr. Joost Holthuis, Dr. Gergely Szakacs, Cornelia Klein und Tobias Schwarzmüller möchte ich mich für die fruchtbare und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Für ihre besondere Gastfreundschaft und die Möglichkeit in ihrem elektrisierenden Umfeld lehrreiche Zeiten verbringen zu dürfen danke ich Prof. Dr. Robert Tampé, Prof. Dr. Karl Kuchler und Prof. Dr. Gerrit van Meer. Danke an das RTN „Flippases“ und ihren Koordinator Andreas Herrmann für die Möglichkeit, so feine Menschen zu so schönem Anlass so regelmäßig zu treffen.

Allen Kollegen in Frankfurt, Wien und Utrecht danke ich für ungezählte Stunden des Glücks und für Gespräche über Grünspan, Lychees und auch Haifischflossen. Meine Grüße fliegen zu Min, Robin, Bruno, Carlos, Marco, Lena und Peterchen.

Für zündende Ideen, Euer Zureden und Eure Signalfeuer in unruhiger See danke ich Euch, Robin Klemm, Christer Eijsing, Gergely Szakacs, Michael Palmgren, Rosa Lopez und Joost Holthuis. Ihr seid wie Blitz und Donner. Denkt bitte daran.

Für die Hilfe zur Selbsthilfe durch Doppelacht danke ich Christine, Anna, Stefan und Justin.

Danke auch Thorsten für den ruhenden Pol.

Spezieller Dank auch an Dich, Petra. Riesig, was ist - größer nur, was wird.

Sander? Kaffee! - Christine! Jour fixe?

Bei allen meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und besonders für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung bedanken. Danke Carsten, Christine, Jan, Kathi, Lena, Martina, Nils, Petra, Silke, Sander, Stefan, Thorsten, Yasmin! Ihr habt mir die langen Stunden kurz gemacht. Fröhlich und leicht.

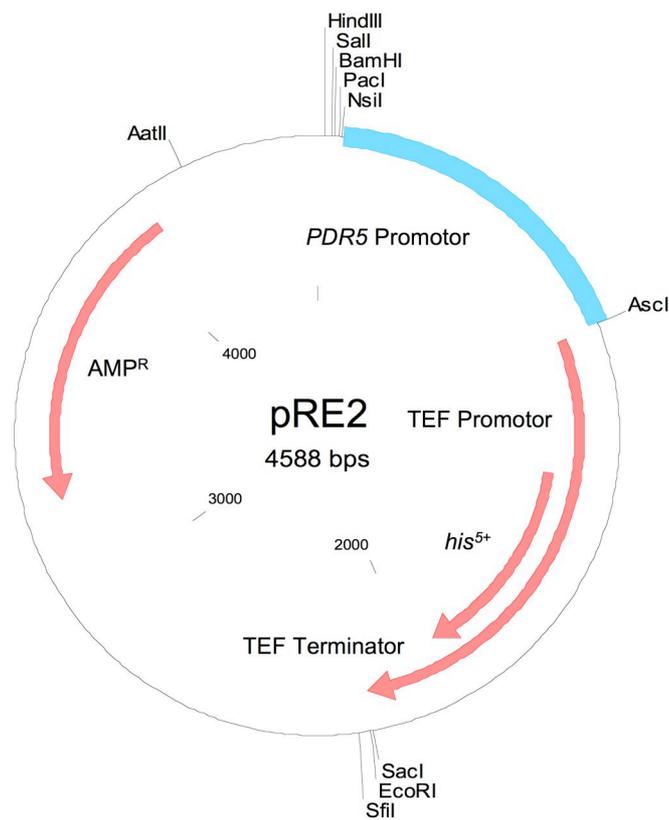
Christine Oswald, Petra Küppers, Sander Smits, Stefan Jenewein, Thorsten Jumpertz und Carola Hengstenberg waren auf der Suche nach dem hoffentlich letzten Rechtschreibfehler unentbehrlich.

Meinen engsten Freunden Philipp und Florian gilt ein spezieller Dank für die unerschöpfliche Quelle der Motivation, Erholung und Inspiration.

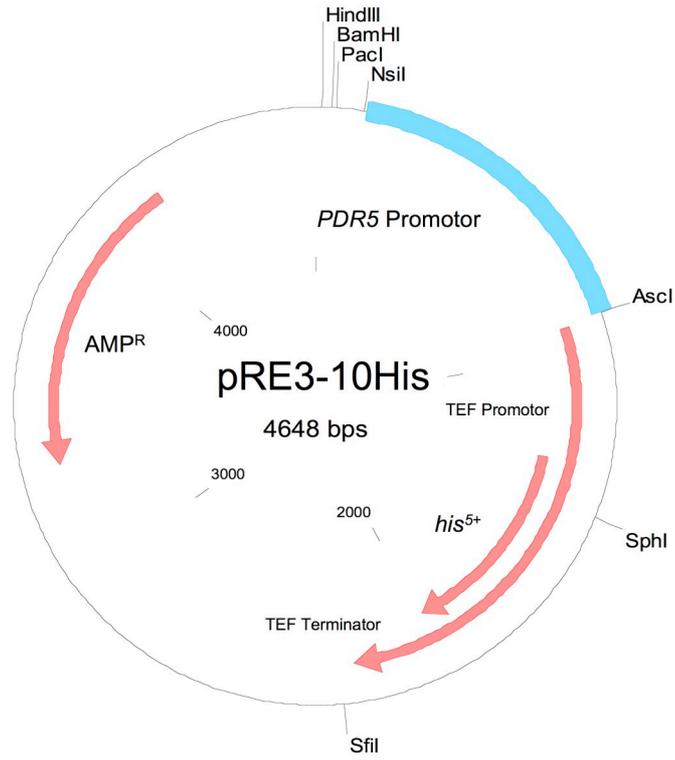
Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern Georg und Veronika, meinen Geschwistern Peter und Jutta.

Anhang

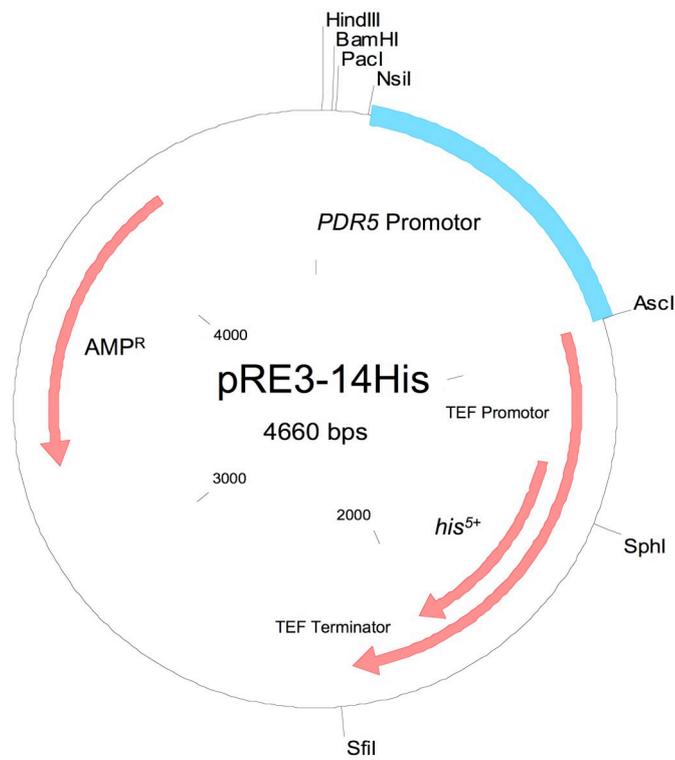
AMP ^R	Ampicillin-Resistenz (β -Lactamase)
<i>his</i> ⁵⁺	Auxotrophiemarker aus <i>Sz. pombe</i>
<i>PDR5</i> -Promotor	-1 bis -800bp vom <i>PDR5</i> -Startcodon
TEF Promotor	Promotor für Auxotrophiemarker
TEF Terminator	Terminator für Auxotrophiemarker



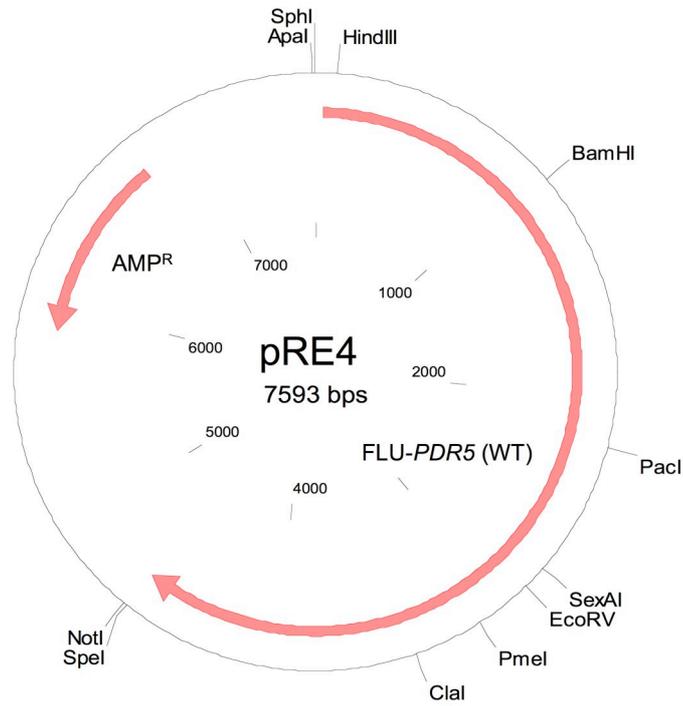
Plasmidkarte pRE2



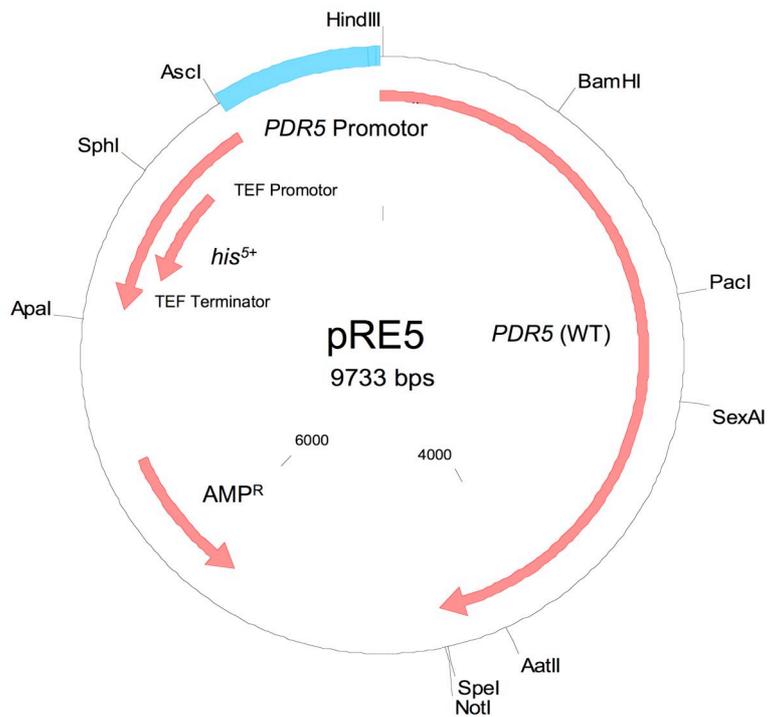
Plasmidkarte pRE3-10His



Plasmidkarte pRE3-14His



Plasmidkarte pRE4



Plasmidkarte pRE5

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Robert Ernst
 Geburtsdatum: 11. November 1977
 Geburtsort: Paderborn

Hochschulausbildung

seit September 2005	Promotion am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. L. Schmitt Titel: „Molekulare Analyse von ABC-Transportern am Beispiel von Pdr5p aus <i>S. cerevisiae</i> und der isoiierten NBD von TAP1“
Oktober 2002 bis August 2005	Promotion am Institut für Biochemie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. L. Schmitt
seit Juli 2002	Diplom Humanbiologie Hauptfach Biochemie; Nebenfächer Virologie und Molekularbiologie
Oktober 2001 bis Juli 2002	externe Diplomarbeit am Institut für Biochemie der J.W. Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. L. Schmitt mit dem Titel „Biochemische Charakterisierung der Nukleotidbindungsdomönen des humanen Transporters assoziiert mit der Antigenprozessierung“
Oktober 1997 bis Oktober 2001	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg

Schul Ausbildung

1997	Abitur am Gymnasium Marianum Warburg
1983 bis 1997	Schul Ausbildung in Warburg (Westfalen)

Stipendien und Auszeichnungen

2005	Posterpreis beim 5 th Transportkolloquium Rauschholzhausen
2004	EMBO <i>short term fellowship</i> Laboraufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Kuchler am Institut für Medizinische Biochemie an der Medizinischen Universität Wien
2003	EMBO <i>short term fellowship</i> Laboraufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. van Meer am Institut für Membranenzymologie an der Universität Ütrecht
1999-2002	Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Publikationsliste

Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., **Ernst, R.**, Blight, M.A., Holland, I.B., und Schmitt, L. (2003). A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J Mol Biol* 327, 1169-1179.

Ernst, R., Klemm, R., Schmitt, L., und Kuchler, K. (2005). Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps. *Methods Enzymol* 400, 460-484.

Ernst, R., Koch, J., Horn, C., Tampe, R., und Schmitt, L. (2006). Engineering ATPase activity in the isolated ABC cassette of human TAP1. *J Biol Chem* 281, 27471-27480.

Ernst, R., Kueppers, P., Kuchler, K., und Schmitt, L. (2007a). Isolation and functional characterisation of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *in Vorbereitung*

Ernst, R., Kueppers, P., Nebendorf, N., Klein, C., Kuchler, K., und Schmitt, L. (2007b). The dual role of the linchpin histidine in substrate selection and regulation of ABC-transporters. *in Vorbereitung*