



Doctoral Thesis

Studies of conformational rearrangements during the transport cycle of bacterial ABC transporters

Author(s):

Götz, Birke Annemarie

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005978376> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Studies of Conformational Rearrangements During the Transport Cycle of Bacterial ABC Transporters

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

BIRKE ANNEMARIE GÖTZ

Dipl. Biologin Universität Tübingen

Born 22.06.1979

Citizen of
Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kaspar Locher, examiner
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner

2009

Summary

ATP binding cassette (ABC) transporters comprise a large family of membrane proteins that catalyze the active export or import of a variety of solutes across biological membranes. Importers are only found in prokaryotes and work as nutrient uptake systems. Exporters are also found in eukaryotes. They are involved in the extrusion of toxic compounds, thus contributing to antibiotic resistance in pathogenic bacteria or multidrug resistance of cancer cells. ABC transporters share a common architecture consisting of two transmembrane domains (TMDs) and two cytoplasmic nucleotide binding domains (NBDs). In addition to the four core components, ABC importers require a periplasmic binding protein to capture the substrate. Importers can be divided into type I and type II groups, depending on the architecture of their TMDs and their substrate. Recent structural studies of ABC transporters have provided a basic two-state scheme of transport in exporters and type I importers. This mechanism describes the conformations of the TMDs in a nucleotide bound and nucleotide free state. However, it was still unclear, whether ABC exporters and type I importers can indeed switch between these two pronounced conformations and moreover the mechanism of ABC type II importers still remained to be elucidated.

In my thesis, I investigated the conformational changes of ABC transporters during their transport cycle by biochemical, biophysical and structural methods. The tungstate/molybdate ABC type I importer AfModBC (*Archaeoglobus fulgidus*) was studied by a chemical cross-linking approach. The results identified significant conformational rearrangements in the TMDs upon binding of nucleotides, which lend further evidence to the postulated two-state scheme. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR) was used to probe movements in the TMDs of the vitamin B₁₂ ABC type II importer BtuCD of *Escherichia coli*. The findings suggest that this transporter may have a mechanism that is distinct from exporters and type I importers. The conformations of the TMDs in the nucleotide-bound and nucleotide-free state revealed remarkable differences to the previously proposed mechanism. To clarify whether BtuCD is a representative for ABC type II importers, structural studies of homologous heme importers were initiated. Crystals were obtained for the heme transporter HmuYp_{UV} of *Yersinia pestis*, which serve as a starting point to solve a high-resolution structure of a heme ABC importer.

Zusammenfassung

ABC Transporter bilden eine große Familie der Membranproteine, die den aktiven Transport einer großen Zahl unterschiedlicher Stoffe ermöglichen. Importer kommen in Prokaryoten vor und sind dort für die Aufnahme von Nährstoffen verantwortlich. Exporter sind zusätzlich auch in Eukaryoten vorzufinden. Dort sind sie für die Ausschleusung von toxischen Substanzen verantwortlich, was zu Antibiotikaresistenz in pathogenen Bakterien oder Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika in Krebszellen führen kann. ABC Transporter bestehen allgemein aus zwei Transmembran-Domänen (TMD) und zwei zytoplasmatischen Nukleotid-bindende Domänen (NBD). Zusätzlich zu diesen vier Domänen besitzen ABC Importer ein periplasmatisches Bindeprotein, welches für das Einfangen und Binden der Substrate verantwortlich ist. Importer lassen sich, abhängig von der Architektur ihrer Transmembrandomänen und ihrem Substrat, in einen Typ I und einen Typ II einordnen. Kürzlich veröffentlichte Studien über die Struktur mehrerer ABC Transporter beschreiben einen Zwei-Stadien Mechanismus in Exporter und Typ I Importer. Dieser Mechanismus erklärt die Konformation der TMDs in einem ATP-gebundenen und ATP-ungebundenen Zustand. Bisher konnte allerdings noch nicht bewiesen werden, ob sich Exporter und Typ I Importer tatsächlich zwischen diesen zwei ausgeprägten Konformationen bewegen. Zudem ist nach wie vor der Mechanismus der Typ II ABC Importer aufzuklären.

In meiner Doktorarbeit habe ich konformationelle Veränderungen der ABC Transporter während ihres Transportprozesses mittels biochemischer, biophysikalischer und struktureller Methoden untersucht. Der für Wolframat/ Molybdat spezifische Type I Importer AfModBC (*Archaeoglobus fulgidus*) wurde mittels einem Quervernetzungsversuch untersucht. Die Ergebnisse zeigten signifikante konformationelle Umordnungen der TMDs, welche mit dem unlängst beschriebenen Zwei-Stadien Mechanismus übereinstimmen. Mittels Elektronen Resonanz Spektroskopie (EPR) wurden die Bewegungen der TMDs des für Vitamin B₁₂ spezifischen Typ II Importers BtuCD aus *Escherichia coli* untersucht. Die Resultate lassen vermuten, dass dieser Transporter einen anderen Mechanismus als Exporter und Typ I Importer hat. Die Konformation in den TMDs zeigt deutliche Unterschiede zu dem kürzlich publizierten Zwei-Stadien Mechanismus. Um aufzuklären, ob BtuCD als ein allgemeiner Vertreter der Typ II Importer gilt, wurden strukturelle Untersuchungen homologer Häm Importer durchgeführt.

Erste Kristalle des Häm Transporters HmuYp_UV aus *Yersinia pestis* konnten erzeugt werden. Sie können als Ausgangspunkt zur Ermittlung einer hochauflösenden Struktur eines Häm Importers dienen.