



Doctoral Thesis

Structural studies of bacterial ABC exporters

Author(s):

Flogaus, Christian Peter

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006393497> →

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](#).

DISS. ETH NO. 19470

Structural Studies of Bacterial ABC Exporters

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by

CHRISTIAN PETER FLOGAUS

Diplom-Biologe (technisch orientiert), Universität Stuttgart

Born 14.05.1978

Citizen of
Germany

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Kaspar Locher, examiner
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner

2011

Summary

Biological membranes present a barrier to the passive diffusion of important nutrients, waste products, and toxic compounds into or out of cells and cellular organelles.

The active transport of these is mediated by a variety of membrane proteins, like those belonging to the super family of ATP-binding cassette (ABC) transporters. Acting either as importers, so far only found in prokaryotic cells, or exporters, found in all kingdoms of life, ABC transporters utilize energy from ATP hydrolysis to alternately expose a substrate binding pocket to the inside or outside of the membrane for import or export of a wide range of substrates. ABC exporters play an important role in antibiotic resistance of pathogenic bacteria and multi-drug resistance (MDR) of cancer cells. Members of the family share a conserved architecture comprising two transmembrane domains (TMDs) which generate the translocation pathway and two cytoplasmic nucleotide-binding domains (NBDs) which provide energy by binding and hydrolyzing ATP. The aim of this thesis was to determine the high resolution structure of an ABC exporter in a physiologically relevant conformation to gain detailed insight into its ATP coupled transport mechanism. In the beginning of this thesis the ABC multidrug-exporter Sav1866 was crystallized without nucleotide which resulted in low resolution crystals with high internal disorder.

After thorough homolog screening, the ABC exporter YvcC from *Bacillus subtilis* was subsequently selected for crystallization and structure determination in the inward or outward facing conformation, as well as functional characterization. Both antibodies and designed ankyrin repeat protein (DARPin) were screened to aid crystallization and to obtain well diffracting crystals. Monoclonal antibodies raised against the extra-cellular loops (ECLs) of YvcC were used to co-crystallize with the transporter. Extensive crystallization screening was undertaken and well diffracting crystals were obtained for a mutant transporter, YvcC E504Q, lacking a catalytic carboxylate group known to allow ATP to bind but not be hydrolyzed. Although the presence of the transporter was required for obtaining these crystals, thorough analysis during the phase determination stage revealed the probable YvcC E504Q-Fab-crystals contained mainly the fragment antigen-binding (Fab) portion of the antibody. Presented herein is the biochemical and functional characterization of YvcC along with details of our crystallization strategy. These results re-affirm the challenges involved in the

crystallization of ABC exporters and demonstrate the potential pitfalls associated with antibody mediated crystallization of membrane proteins.

Zusammenfassung:

Biologische Membranen bilden eine Barriere für die Diffusion wichtiger Nährstoffe, Stoffwechselprodukte und toxischer Verbindungen in oder aus der Zelle oder zellulärer Organellen. Der aktive Transport dieser Verbindungen wird durch verschiedenste Membranproteine bewerkstelligt, wie etwa durch die Familie der der ABC (ATP-binding cassette) Transporte, die als Importer, welche nur in Prokaryoten zu finden sind, oder als Exporter, die sowohl in Pro- wie auch in Eukaryoten vorkommen, auftreten. ABC Exporter spielen eine wichtige Rolle bei der Antibiotikaresistenz von pathogenen Bakterien und der Resistenz von Krebszellen gegenüber verschiedensten Chemotherapeutika. ABC Transporter bestehen im Allgemeinen aus zwei Transmembrandomänen (TMDs), welche den Transportkanal bilden und aus zwei zytoplasmatischen Nukleotid-bindenden Domänen, die die Energie durch Bindung und Hydrolyse von ATP erzeugen. Das Ziel dieser Arbeit war es die hoch auflösende Struktur eines ABC Exporters in einer physiologisch relevanten Konformation zu bestimmen, um einen detaillierten Einblick in den Mechanismus des ATP-gekoppelten Transports zu erhalten. Zu Beginn dieser Arbeit wurde der ABC-multidrug Exporter Sav1866 ohne Nukleotide kristallisiert, was in Kristallen mit niedriger Auflösung und hochgradiger, interner Fehlordnung resultierte.

Nach einem gründlichen Auswahlverfahren, wurde der homologe ABC Exporter YvcC aus *Bacillus subtilis* für die Kristallisation und Strukturaufklärung einer nach innen oder außen geöffneten Konformation und für weitere funktionelle Studien gewählt. Es wurden DARPins (designed ankyrin repeat protein) und Antikörper gesucht, die die Kristallisation unterstützen und um gut streuende Kristalle zu erhalten. Ein monoklonaler Antikörper, der die extrazellulären Bestandteile von YvcC band, wurde für die Kristallisation mit dem Transporter verwendet. Nach intensiver Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnten gut streuende Kristalle für eine Mutante, YvcC E504Q, bei der eine katalytische Carboxylgruppe entfernt wurde, wodurch ATP zwar gebunden, aber nicht mehr hydrolysiert wird, erzeugt werden. Obwohl der Transporter

für die Kristallisation vorhanden sein musste, zeigte eine gründliche Analyse bei der Bestimmung der Phaseninformation, dass die vermeintlichen YvcC E504Q-Fab Kristalle hauptsächlich nur die Antigen-bindenden Fragmente (Fab) des Antikörpers enthielten. Nachstehend wird die biochemische und funktionelle Charakterisierung zusammen mit der verwendeten Kristallisierungsstrategie dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen erneut die Herausforderungen bei der Kristallisation von ABC Exportern und demonstrieren potentielle Gefahren bei der Antikörper vermittelten Kristallisation von Membranproteinen.