

Structural and Functional Investigations of Bacterial MFS- and MATE-type Multidrug Transporters

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

MARTINA NIEDERER

Dipl. Natw. ETH

Born 22.02.1982

citizen of Heiden AR, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kaspar Locher, examiner

Prof. Dr. Raimund Dutzler, co-examiner

Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner

2012

Summary

Cells and organelles are surrounded by biological membranes that serve as selective barriers. Import of nutrients and export of waste products across membranes are mediated by transport proteins. Proteins of the major facilitator superfamily (MFS) and the multidrug and toxin extrusion (MATE) family are integral membrane proteins that mediate such transport reactions in all kingdoms of life. They are secondary active transporters that use the energy stored in the electrochemical gradient of one solute for the translocation of a second solute against its concentration gradient. Multidrug resistance transporters of the MFS and MATE family couple proton or sodium import to the extrusion of various, structurally unrelated drugs and thereby confer multidrug resistance to pathogenic bacteria. These transporters are believed to function according to an alternating access mechanism, where a substrate-binding site is alternately accessible from either side of the membrane. However, the molecular details of the underlying transport reaction are unknown.

In this thesis, bacterial multidrug transporters were investigated both structurally and functionally in order to elucidate the transport reaction at a molecular level. Initially, four bacterial MATE transporters were identified in a homolog screening approach as suitable candidates for structural studies by X-ray crystallography and for functional experiments: *Vibrio cholerae* NorM (VcNorM), *Vibrio parahaemolyticus* NorM (VpNorM), *V. cholerae* VcrM (VcVcrM), and *Escherichia coli* YdhE (EcYdhE). Protocols yielding pure and homogeneous samples of detergent-solubilized transporters at high concentrations were successfully established. Binding activity of these four homologous transporters was determined by fluorescence anisotropy confirming that the detergent-solubilized transporters represented a physiologically relevant state. Crystallization screening of the identified transporters yielded crystals of VcNorM; yet crystal quality was insufficient for structure determination. The difficulties in obtaining well-diffracting crystals of MATE transporters are likely due to intrinsic flexibility and limited hydrophilic surface, both inherent characteristics of transporter proteins. Small conformation-specific binders, like nanobodies, might help overcome these features and thereby facilitate crystallization. Thus, in order to produce high-quality crystals, nanobodies binding VcNorM, VcVcrM, and EcYdhE with high affinity were generated. Subsequently, co-crystallization of VcNorM and corresponding nanobodies was screened. Initial crystals were obtained that will serve as starting point for further crystallization screening aiming to determine a high resolution structure of VcNorM.

Zusammenfassung

Zellen und Organellen sind umgeben von biologischen Membranen, die als selektive Barrieren fungieren. Transportproteine ermöglichen die Aufnahme von Nährstoffen sowie die Abgabe von Abfallprodukten durch die Membran. Proteine der MFS- und MATE-Familien sind integrale Membranproteine, welche solche Prozesse in allen lebenden Organismen durchführen. Die Proteine beider Familien sind sekundär aktive Transporter, das heißt, sie nutzen Energie, die in Form eines elektrochemischen Gradienten einer Substanz gespeichert ist, um eine zweite Substanz entgegen ihres elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Multiresistenz(MDR)-Transportproteine beider Familien koppeln die Aufnahme von Protonen oder Natrium mit der Ausschleusung zahlreicher, strukturell verschiedener Moleküle und können dabei Multiresistenz in pathogenen Bakterien verursachen. Die Funktion dieser Transporter ist vermutlich durch einen alternierenden Zugangsmechanismus gekennzeichnet, bei dem die Substratbindestelle abwechselnd von beiden Seiten der Membran zugänglich ist. Der genaue Prozess der Transportreaktion ist jedoch noch nicht geklärt.

In dieser Doktorarbeit werden MDR-Transporter sowohl strukturell als auch funktionell untersucht, um den molekularen Mechanismus der Transportreaktion aufzuklären. Anfangs wurden vier homologe, bakterielle MATE Transporter als Kandidaten für die Analyse mittels röntgenkristallographischer Methoden identifiziert: *Vibrio cholerae* NorM (VcNorM), *Vibrio parahaemolyticus* NorM (VpNorM), *V. cholerae* VcrM (VcVcrM) und *Escherichia coli* YdhE (EcYdhE). Protokolle wurden etabliert, um reine und homogene Proben von in Detergens gelösten Transportern herzustellen. Die Bindungsaktivität der homologen Transporter wurde durch Fluoreszenzanisotropiemessungen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messungen bestätigen, dass die in Detergens gelösten Transporter eine physiologische Konformation aufweisen. Kristalle von VcNorM konnten hergestellt werden, ihre Qualität genügte jedoch nicht, um die Struktur von VcNorM zu bestimmen. Die Schwierigkeiten in der Herstellung von MATE Transporter-Kristallen hängen vermutlich mit der intrinsischen Flexibilität und der minimalen hydrophilen Oberfläche der Proteine zusammen; beides sind typische Eigenschaften von Transportproteinen. Proteine, wie zum Beispiel Nanobodies, die den Transporter in einer spezifischen Konformation binden, können helfen, diese Schwierigkeiten zu überwinden. Daher wurden Nanobodies hergestellt, die VcNorM, VcVcrM und EcYdhE mit hoher Affinität binden. Die Ko-kristallisation von VcNorM und einem Nanobody lieferte erste Kristalle, die als Startpunkt für weitere Kristallisationsexperimente dienen können, um eine hochauflösende Struktur von VcNorM zu bestimmen.