

ABC-Transporter

Eine molekulare Analyse der ATP-Hydrolyse

STEFAN JENEWEIN UND LUTZ SCHMITT
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT, DÜSSELDORF

Die Familie der *ATP-binding-cassette* (ABC) Transporter stellt eine der grössten Gruppen von Membranproteinen dar, die in allen drei Reichen des Lebens verbreitet ist und die unterschiedliche Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten durch die Bindung und Hydrolyse von ATP über biologische Membranen transportiert^[1].

■ Zu wichtigen physiologischen Funktionen von ABC-Transportern gehören unter anderem der Import von Nährstoffen in Bakterien und der Export von hydrophoben Substanzen, Peptiden oder Proteinen. Im Menschen stellen Krankheiten wie die Mukoviszidose oder die durch Überexpression von ABC-Transporter vermittelte Resistenz von Tumorzellen bekannte Phänomene dar.

ABC-Transporter – universelle Werkzeuge für den Membrantransport

Gemeinsam ist allen ABC-Transportern der modulare Aufbau aus je 2 Transmembrandomänen (TMD) und je 2 Nukleotid-bindenden Domänen (NBD), den ABC-ATPasen. Die ABC-abhängige Proteinsekretion (Typ I-Sekretion)

in Gram-negativen Bakterien benötigt zusätzlich ein Membranfusionsprotein (MFP), ein Porin-ähnliches Protein und wird zum Transport von Toxinen, Lipasen, Proteasen oder S-Layerproteinen, die in einem Schritt über beide Membranen ins extrazelluläre Medium (Sekretion) erfolgt, verwendet. Der Prototyp dieser Systeme ist die Hämolyysin A (HlyA) Sekretionsmaschinerie, die in pathogenen *E. coli* Stämmen den Transport des 108 kDa Toxins HlyA katalysiert und aus TolC, dem MFP HlyD und dem ABC-Transporter HlyB besteht. Nach heutigem Kenntnisstand stellt die Bindung und Hydrolyse von ATP durch HlyB die wahrscheinlich einzige Energiequelle dar, die für das Ausschleusen von HlyA

in einem Schritt über zwei biologische Membranen benötigt wird.

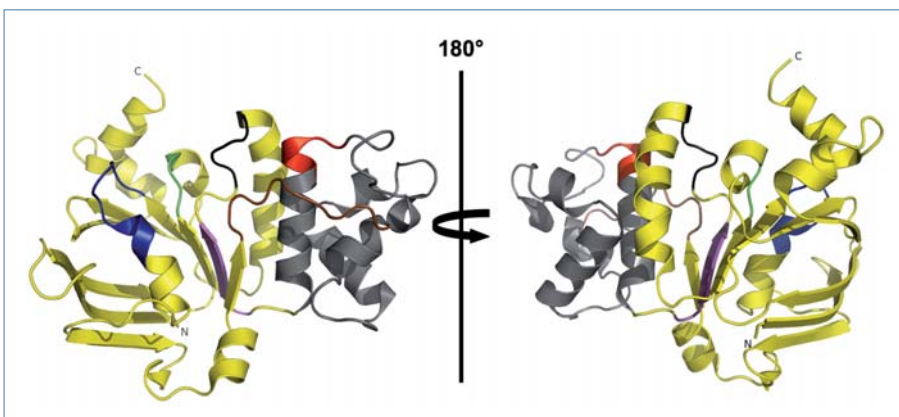
ABC-Transporter – Transportmodelle

Die in der Vergangenheit postulierten Transportmodelle (z. B. ^[2,3]) gehen von einer Änderung des oligomeren Zustandes der NBD während des Transportzyklus aus. Detaillierte Untersuchungen an isolierten NBDs und intakten Transportern implizieren, dass die Bindung von ATP eine NBD-Dimerisierung induziert. Diese mechanische Bewegung induziert Konformationsänderungen innerhalb der TMD. Die darauf folgende Hydrolyse von ATP destabilisiert den NBD-Dimer und seine Dissoziation führt zu einer erneuten strukturellen Änderung innerhalb der TMDs. Nach Dissoziation des ADP wird der Transporter wieder in den Grundzustand versetzt. Diese relativ „oberflächliche“ Zusammenfassung verdeutlicht, wie gering unser molekulares Verständnis des Transportprozesses ist. Ob Substrattransport nach dem ‚alternating access‘ Modell erfolgt oder ob der Transporter zwischen einer hoch- und einer niedrig-affinen Substratbindungsstelle wechselt, welcher molekulare Schritt durch die Bindung bzw. Hydrolyse von ATP katalysiert wird und wie viele Moleküle ATP pro Transportzyklus benötigt werden, ist noch relativ unbekannt.

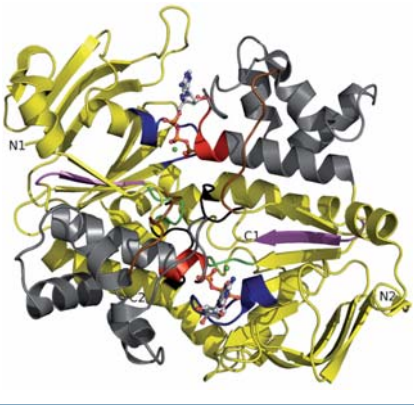
Die NBD – der Motor eines ABC-Transporters

Bereits auf der Ebene der Primärsequenz können ABC-ATPasen durch ihre hohe Homologie identifiziert werden. In allen bisher untersuchten Systemen können folgende konservierte Motive gefunden werden: Walker A (GXXGXGKS/TT, X: jede beliebige Aminosäure) und Walker B ($\phi\phi\phi\phi D$, ϕ : jede beliebige hydrophobe Aminosäure). Die Markenzeichen der ABC-ATPasen sind jedoch das ABC-Signatur-Motiv oder C-Loop (LSGGQ) und der D-Loop (SALD). Daneben treten weitere konservierte Aminosäuren auf: ein Glutamin (Q-Loop) und ein Histidin (H-Loop).

Die Struktur einer NBD kann, wie für die HlyB-NBD gezeigt^[4], in zwei Bereiche unter-



▲ **Abb. 1:** Kristallstruktur der HlyB-NBD im Nukleotid-freien Zustand ^[4]. Die helikale Domäne ist in Grau, die katalytische Domäne in gelb wiedergegeben. Konservierte und im Text erwähnte Motive sind wie folgt hervorgehoben: Walker A-Motiv (Blau), Q-Loop (Braun), ABC-Signatur (Rot), Walker B-Motiv (Magenta), D-Loop (Schwarz) und H-Loop (Grün).

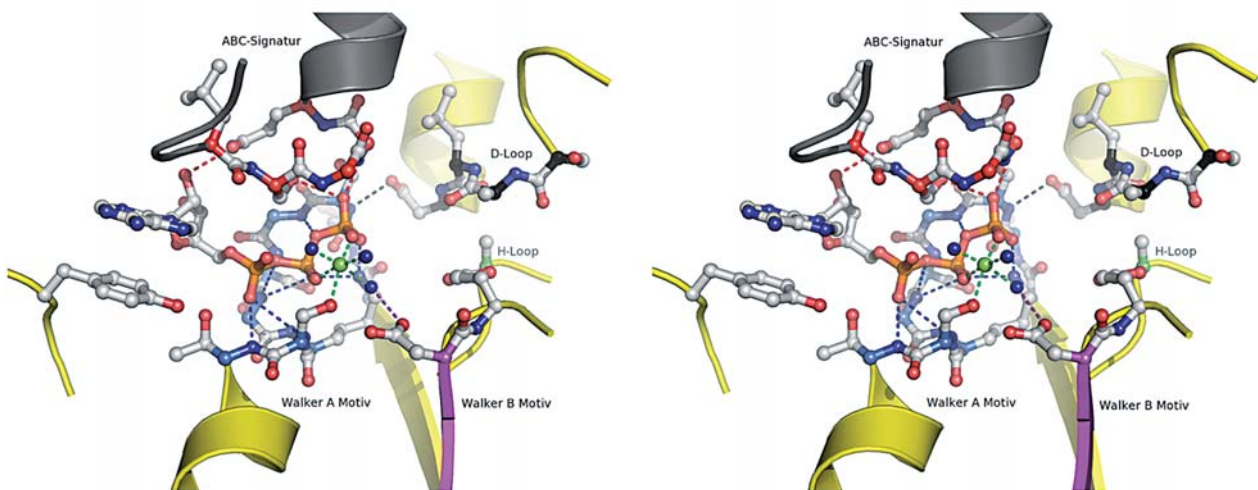


◀ **Abb. 2:** Kristallstruktur des ATP/Mg²⁺-gebundenen Dimers der HlyB-NBD (H662A Mutante)^[5]. Die Farbkodierungen entsprechen Abbildung 1. ATP ist in „Ball-and-stick“-Darstellung wiedergegeben und der Kofaktor Mg²⁺ als grüne und Wassermoleküle als blaue Sphäre.

teilt werden (**Abb. 1**): Eine helikale Domäne, die ABC-Transporter-spezifisch ist und die ABC-Signatur enthält sowie eine RecA/F₁-ATPase-ähnliche Domäne, die auch in anderen ATPasen zu finden ist und in der alle weiteren konservierten Bereiche der Primärstruktur lokalisiert sind. Strukturelle und biochemische Untersuchungen unter anderem an der isolierten HlyB-NBD konnten zeigen^[4-7], dass während eines ATPase-Zyklus eine ATP-abhängige Dimerisierung stattfindet. Ein Blick auf die Kristallstruktur des HlyB-NBD in Komplex mit ATP/Mg²⁺ zeigt einen Dimer (**Abb. 2**) in einer sogenannten „Head-to-Tail“-Anordnung^[5]. Hierbei wird das gebundene ATP durch das Walker A-Motiv des cis Monomers und die ABC-Signatur des trans Monomers koordiniert und wirkt daher als molekularer Klebstoff, der den ABC-Dimer stabilisiert. Da das ABC-Signatur-Motiv des trans Monomers im wesentlichen nur mit der γ -Phosphatgruppe des ATP interagiert, kann die ATP-induzierte Dimerisierung auch strukturell erklärt werden. Die molekulare Architektur der ATP-Bindungsstelle wird in **Abbildung 3** verdeutlicht. Sie belegt wie der Dimer eine definierte Umgebung schafft, in der nicht

nur die hohe negative Ladungsdichte der Triphosphatgruppe des ATP sondern auch der Adeninrest und die Riboseeinheit koordiniert wird. Um daher neben der strukturellen Charakterisierung auch eine mechanistische Analyse durchzuführen, wurden biochemische Analysen der ATPase Aktivität in Lösungen unterschiedlicher Viskosität oder in Gegenwart von D₂O durchgeführt^[5]. Änderungen der Viskosität können dazu verwendet werden, um einen Einblick in den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Reaktion zu gewinnen. Eine Änderung der Viskosität beeinflusst die Diffusionsrate und damit Erkennungsprozesse wie z.B. Nukleotidbindung oder Dimerisierung, aber nicht die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion. In unseren Untersuchungen zeigte die ATPase Aktivität keinerlei Abhängigkeit von der Viskosität der Lösung, so dass eine chemische Reaktion wie z.B. die ATP-Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein muss. Prinzipiell existieren zwei Mechanismen der ATP-Hydrolyse: allgemeine Basenkatalyse (ABK) und Substrat-assistierte Katalyse (SAK). Beide Mechanismen unterscheiden sich nur im limitierenden Schritt, in der

ABK stellt die Abstraktion eines Protons vom katalytischen Wasser den entscheidenden Schritt dar, während in der SAK ATP dieses Proton abstrahiert, aber die Hydrolyse den limitierenden Schritt darstellt. Dieser Unterschied konnte mittels Messungen in D₂O bestimmen werden (die Abstraktion eines Deuteriums statt eines Protons führt zur Reduktion des Reaktionsumsatzes). Die Ergebnisse dieser Messungen belegen, dass in der HlyB-NBD keine ABK vorliegt. Weitere Kontrollexperimente legen den Schluss nahe, dass SAK vorliegt^[5]. Dieser Mechanismus erklärt auch, wie die Hydrolyse von ATP und die Dimerisierung der NBD zeitlich und räumlich koordiniert werden kann. SAK im Gegensatz zur ABK, bei der alle relevanten katalytischen Aminosäuren in einem Monomer lokalisiert sind, generiert durch die Dimerisierung eine entsprechende Mikroumgebung, die die Hydrolyse erst ermöglicht^[8]. Diese Daten kombiniert mit der strukturellen Analyse, die neben dem ATP/Mg²⁺-Komplex der HlyB-NBD, auf allen zur Beschreibung des katalytischen Zyklus nötigen Kristallstrukturen basiert, führten zum sogenannten Achsnagel-Modell („*Linchpin modell*“), das ausgehend von einer katalytischen Dyade die widersprüchlichen Daten aus Mutationsstudien erklären kann^[5]. Diese Strukturen konnten essentielle Asymmetrien innerhalb der NBD bestimmen, die zu einer sequentiellen Dissoziation des abgespaltenen anorganischen Phosphats führen und viele biochemische Daten untermauern, die eine schrittweise Dissoziation des Phosphats postuliert haben. Darüberhinaus wurde eine „enthalpische Feder“ (Energiespeicher) innerhalb dieser Struktu-



▲ **Abb. 3:** Stereoabbildung einer detaillierten Ansicht der ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle^[5]. Die Farbkodierungen der C α -Atome entsprechen Abbildung 1.

ren identifiziert, die eine koordinierte Dissoziation des ADP ermöglicht und damit einen weiteren Kontrollpunkt innerhalb des katalytischen Zyklus einer ABC-ATPase darstellt^[7].

Ausblick

Obwohl in den letzten Jahren ein erstes Bild des Transportmechanismus von ABC-Transportern erhalten wurde und unter anderem ein detailliertes Verständnis der strukturellen und funktionellen Mechanismen der isolierten HlyB-NBD erworben wurde, fehlen viele Details, die für ein molekulares Verständnis von ABC-Transporter essenziell sind. Hierzu gehören nicht nur Kristallstrukturen, son-

dern auch eine fundierte Biochemie der entsprechenden Systeme. ■

Literatur

- [1] Holland, I. B., Cole, S. P., Kuchler, K., Higgins, C. (2003): ABC-proteins: From bacteria to man. *Academic Press, London*.
- [2] Higgins, C. F., Linton, K. J. (2004): The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11: 918–926.
- [3] van der Does, C., Tampe, R. (2004): How do ABC transporters drive transport? *Biol Chem* 385: 927–933.
- [4] Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M. A., Holland, I. B., Stubbs, M. T. (2003): Crystal structure of the ABC-domain of the ABC-transporter HlyB: Identification of a variable region within the hecal domain of ABC-domains. *J Mol Biol* 330: 333–342.
- [5] Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B., Schmitt, L. (2005): H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Embo J* 24: 1901–1910.
- [6] Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I. B., Schmitt, L. (2005): Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry* 44: 9680–9690.

- [7] Zaitseva, J., Oswald, C., Jumpertz, T., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Holland, I. B., Schmitt, L. (2006): A structural analysis of asymmetry required for catalytic activity of an ABC-ATPase domain dimer. *Embo J* 25: 3432–3443.
- [8] Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I. B., Schmitt, L. (2006): Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett* 580: 1036–1041.

Korrespondenzadresse:

Lutz Schmitt

Stefan Jenewein

Institut für Biochemie

Heinrich Heine Universität

Universitätsstr. 1

D-40225 Düsseldorf

Tel.: 0211-81-10773

Fax: 0211-81-15310

lutz.schmitt@uni-duesseldorf.de

www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/biochem/schmitt/Startpage.htm

AUTOREN



Lutz Schmitt

Jahrgang 1967. 1986–1992 Diplom Chemie, Universität Freiburg. 1992–1996 Promotion, TU München. 1996–1999 Postdoc., Abt. von Prof. H. M. McConnell, Stanford University, USA. 1999–2003 Emmy Noether Gruppenleiter, Universität Marburg und Frankfurt. 2004 Heisenberg Stipendiat, Universität Frankfurt und seit 2005 C3-Professor für Biochemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Berlin.



Stefan Jenewein

Jahrgang 1978. 1998–2003 Diplom Biochemie in Frankfurt. Diplomarbeit bei Prof. Tampe und Dr. Schmitt über lösliche ABC Einheiten an der Universität Frankfurt. Seit 11/2003 Promotion über ABC abhängige Typ I Sekretion bei Prof. Schmitt in Frankfurt und seit 2005 in Düsseldorf.