

Ermittlung der Konformation von Bacteriorhodopsin-Peptidschleifen in Purpurmembranen durch Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie**

Victoria A. Higman, Krisztina Varga, Lubica Aslimovska, Peter J. Judge, Lindsay J. Sperling, Chad M. Rienstra und Anthony Watts*

Membranproteine (vor allem Rhodopsin-ähnliche G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)) sind von großer biologischer und medizinischer Bedeutung, da sie über 50 % (GPCRs 25 %) der Angriffspunkte gegenwärtiger Wirkstoffe darstellen.^[1] Die Strukturbestimmung von Membranproteinen ist allerdings äußerst anspruchsvoll: Zurzeit bilden sie nur < 1 % der einmaligen Proteinstrukturen in der Protein-Datenbank.^[2] Röntgenkristallographie hat wichtige Beiträge zur Strukturbestimmung von Membranproteinen geleistet,^[3] hat aber den Nachteil, dass die Proteine selten in ihrer nativen Lipidumgebung kristallisiert werden oder unmodifiziert bleiben. Außerdem sind freiliegende Peptidschleifen oft dynamisch und nicht sichtbar, oder sie sind an Kristallkontakten beteiligt. NMR-Spektroskopische Studien von Membranproteinen in Lösung sind auch auf eine unnatürliche Detergenz-Umgebung angewiesen und nur für Proteine von limitierter Größe geeignet. Festkörper-NMR-Spektroskopie hat dagegen den Vorteil, dass Membranproteine in einer natürlichen Lipidumgebung untersucht werden können.^[4] Zwar hat Festkörper-NMR-Spektroskopie nicht die gleichen Einschränkungen bezüglich der Proteingröße wie Lösungs-

NMR-Spektroskopie, jedoch ist die Signalüberlagerung in den Spektren großer Proteine oft sehr stark und behindert deren Untersuchung. In den letzten Jahren sind aber vor allem für MAS-NMR-Spektroskopie (MAS: Rotation im magischen Winkel) große methodische Fortschritte erzielt worden, und erste Membranproteinstrukturen sind nun mit diesem Verfahren bestimmt worden.^[5]

Hier zeigen wir, dass Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie röntgenkristallographische Studien von Sieben-Helix-Membranproteinen ergänzen kann, indem Strukturen von Peptidschleifen validiert und neu definiert werden. Die Struktur von Bacteriorhodopsin (bR) ist in diversen kristallinen zwei- (2D-) und dreidimensionalen (3D-)Umgebungen bestimmt worden, und die größten Variationen zwischen den Strukturen kommen in den Peptidschleifen vor.^[6] Resonanzen in diesen Regionen von bR sind mit Festkörper-MAS-NMR-Spektren von U-^{[13}C,¹⁵N]-markiertem bR in seiner nativen Purpurmembranumgebung zugeordnet worden. Durch Ableitung der ϕ - und ψ -Diederwinkel von den chemischen Verschiebungen haben wir die Struktur mehrerer Peptidschleifen in der Kristallstruktur validiert und bei Konformationsunterschieden die Struktur neu berechnet.

Die Ab-initio-Zuordnung der Resonanzen in den Peptidschleifen von bR wurde mit 2D-DARR-Spektren (15 und 50 ms Mischzeiten) sowie 3D-NCACX- (20 ms), 3D-NCOCX- (20 ms), 3D-CANCO- und 3D-CAN(CO)CX-Spektren (45 ms) durchgeführt. Die Zuordnung der Peptidschleifen wurde dadurch ermöglicht, dass ihre Resonanzen generell gut aufgelöst waren, anders als viele Resonanzen in helikalen Bereichen, wo die Überlagerung, vor allem von Leucin- und Valinresonanzen, nicht aufgelöst werden konnte. Abbildung 1 zeigt als Beispiel die Zuordnung des Abschnitts Met68-Gly72 in der BC-Schleife. Weitere 2D-Spektren und Stripplots sind in den Hintergrundinformationen enthalten (Abbildungen S1–3). Insgesamt haben wir etwa 55 % der Resonanzen in den Peptidschleifen zugeordnet und dabei Reste in allen außer der CD-Schleife abgedeckt. Außerdem konnten wir mehrere Reste in den Helices zuordnen (Abbildung 2, Tabelle S2 der Hintergrundinformationen und BMRB Accession code 17361). Interessanterweise sind Reste aller Peptidschleifen (außer der nicht zugeordneten CD-Schleife) in unseren Kreuzpolarisations(CP)-Spektren sichtbar. Dieser Befund unterscheidet sich von dem beim sensorischen Rhodopsin II aus *Natronomonas pharaonis* (NpSRII), wo die meisten Peptidschleifen nur in INEPT-Spektren zu sehen waren,^[7] was einen höheren Grad an Flexibilität in den NpSRII-Peptidschleifen widerspiegelt. Unsere Beobachtungen sind einer neuen Studie am Proteorhodopsin ähnlicher, in der nur isolierte Reste in INEPT-Spektren sichtbar waren.^[8]

[*] Dr. V. A. Higman,^[†] Dr. P. J. Judge, Prof. A. Watts
Department of Biochemistry, University of Oxford
South Parks Road, Oxford, OX1 3QU (Großbritannien)
E-Mail: anthony.watts@bioch.ox.ac.uk

Dr. K. Varga^[‡]
Department of Chemistry, University of Wyoming
Laramie, WY 82071 (USA)

Dr. L. Aslimovska
Institute für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität
60438 Frankfurt (Deutschland)

L. J. Sperling, Prof. C. M. Rienstra
Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801 (USA)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken dem EPSRC (GR/R99393/01 und EP/C015452/1), Biotechnology Research Council, Magnex Scientific und Varian Inc., NIH (R01GM075937 an C.M.R. und Molecular Biophysics Training Grant PHS 5 T32 GM008276), dem „University of Oxford bridging support“ (für V.A.H.) und dem Ulliot Fellowship (für L.J.S) für finanzielle Hilfe. Diese Arbeit wurde unterstützt von den DLR/JRA7-Konsortien, finanziert von der EU (HPRI-2001-50065 und RII3-CT-2003-505925). Wir danken den Mitarbeitern des ILL-EMBL-Deuteriumlabors sowie Ming Tang und den Mitarbeitern der University of Illinois at Urbana-Champaign School of Chemical Sciences NMR Facility für technische Unterstützung. MAS: Rotation im magischen Winkel.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100730> zu finden.

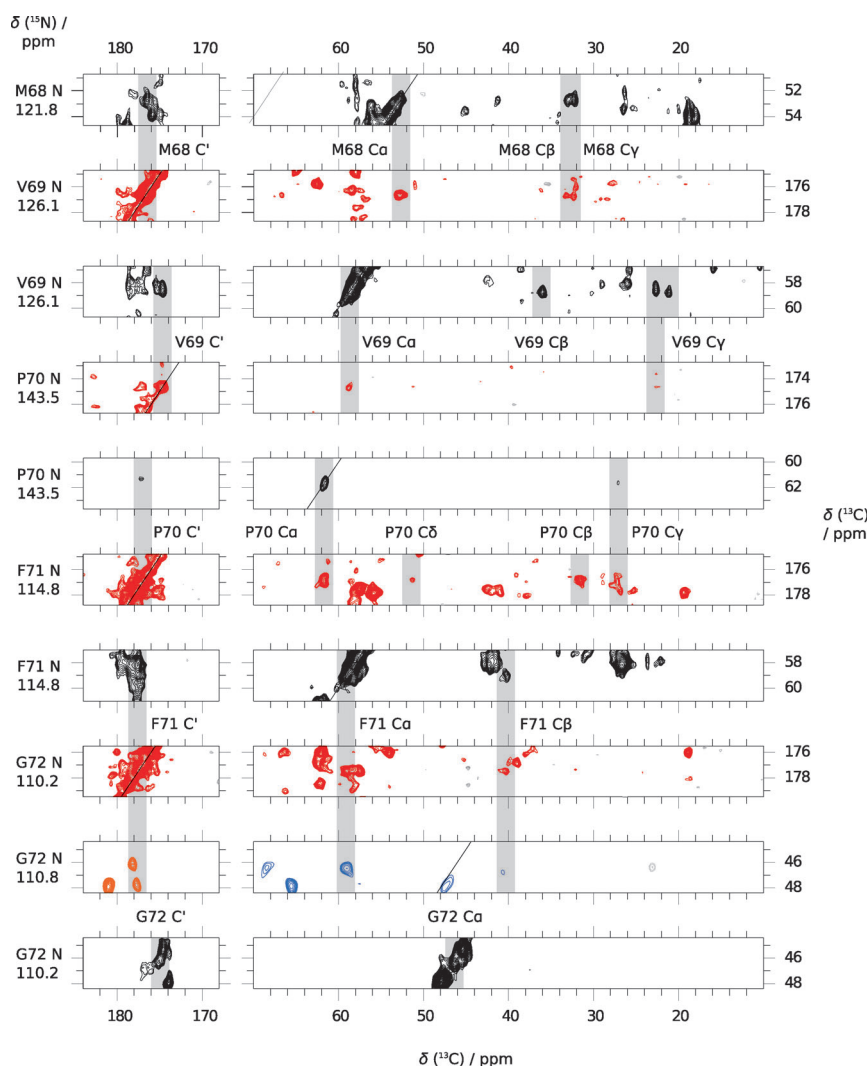


Abbildung 1. Zuordnung von Met68-Gly72 mit NCACX- (schwarz, 20 ms Mischzeit), NCOCX- (rot, 20 ms), CANCO- (orange) und CAN(CO)CX-Spektren (blau, 45 ms).

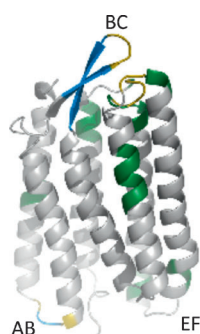


Abbildung 2. Bänderdarstellung der 1QHJ-Kristallstruktur von bR. Zugeordnete Reste sind anhand ihrer von TALOS vorhergesagten Winkel hervorgehoben: α -helikal (grün), β -Faltblatt (blau) oder ungewiss (gelb).

Ein $^{13}\text{C},^{13}\text{C}$ -INEPT-COSY-bR-Spektrum enthält Resonanzen mit chemischen Verschiebungen, die Random-Coil-Strukturen zuzuordnen sind und von Aminosäuretypen stammen, die mit dem N- und C-Terminus vereinbar sind (siehe Abbil-

dungen S4–S5 in den Hintergrundinformationen). Außerdem sind einige Seitenkettensignale der Aminosäuren Lys, Glu, Ala und Ser vorhanden, die nicht Random-Coil-Strukturen zuzuordnen sind und vom KAES-Motiv in der EF-Schleife stammen könnten. Eine sequenzielle Zuordnung ist bisher nicht möglich gewesen. Die Zahl der Signale in den INPET-Spektren nimmt mit steigender Temperatur nicht zu, die Peptidschleifen in bR scheinen also relativ steif zu sein.

Mit der TALOS+-Software^[9] wurden die ϕ - und ψ -Winkel von den zugeordneten chemischen Verschiebungen abgeleitet. In Abbildung 2 sind die zugeordneten Reste und deren vorhergesagte Sekundärstruktur auf die 1QHJ-Kristallstruktur aufgetragen. Diese Struktur ist eine hoch aufgelöste Struktur, die repräsentativ für viele andere Strukturen von hoher Qualität ist. Insgesamt ist die Übereinstimmung zwischen der Sekundärstruktur im Kristall und unseren NMR-Spektroskopiedaten für die Purpormembran sehr gut (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen). Die Daten können auch mit chemischen Verschiebungen verglichen werden, die mit Lösungs-NMR-Spektroskopie an bR gemessen wurden, das in Dodecylmaltosid mit einer deuterierten Dodecyleinheit (DDM) gelöst wurde (Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen).^[10] In der AB-Schleife haben wir vier von sieben Resten zugeordnet; die chemischen Verschiebungen sind in guter Übereinstimmung mit den Verschiebungen in Lösung.

Die von TALOS+ vorhergesagten Diederwinkel für Ser35 befinden sich allerdings in der β -Faltblattregion des Ramachandran-Diagramms, während die Kristallstruktur den α -helikalen Bereich bevorzugt. Das β -Faltblatt in der BC-Schleife der Kristallstruktur ist auch in bR in Purpormembranen präsent, wo wir 12 von 18 Resten zuordnen konnten. Für diese Peptidschleife sind wenige Lösungs-NMR-spektroskopische Zuordnungen vorhanden, eventuell weil das β -Faltblatt den ^1H - ^2H -Austausch verhindert. Die CD-Schleife ist sehr kurz, und leider war es nicht möglich, eindeutige Festkörper-NMR-spektroskopische Verschiebungen zuzuordnen. Wir haben drei von vier Resten in der kurzen DE-Schleife zugeordnet, und die TALOS+-Diederwinkel stimmen gut mit denen der Kristallstrukturen überein. Lösungs-NMR-Spektroskopiedaten sind nicht vorhanden. Die EF-Schleife nimmt in den Kristallstrukturen von bR unterschiedliche Konformationen an. In einigen Kristallstrukturen ist sie in Kristallkontakte eingebunden, und in mehreren Strukturen sind die Reste 157–161 nicht sichtbar. Die Zuordnung von Phe156–Ser158 zeigt allerdings, dass

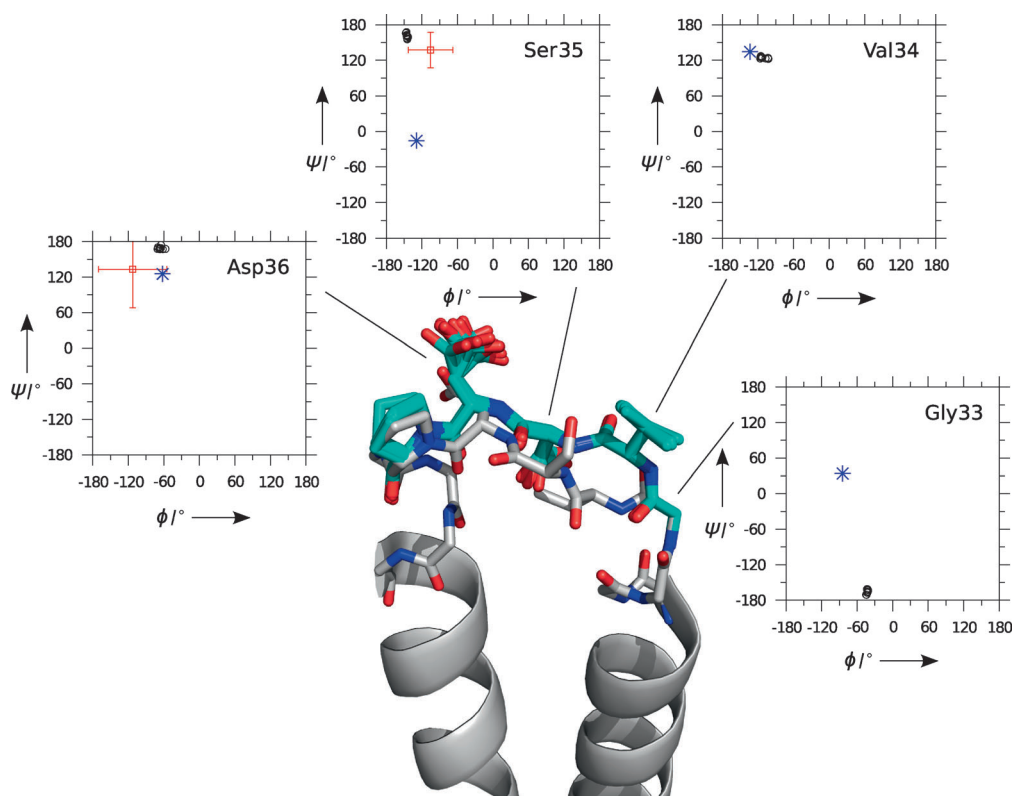


Abbildung 3. Die AB-Schleife von bR; grau: 1QHJ-Kristallstruktur, cyan: die zehn Strukturen mit der niedrigsten Energie, die anhand der TALOS+-Diederwinkel mit XPLOR errechnet wurden. Seitenkettenkonformationen und Ramachandran-Diagramme sind für Gly33–Pro37 eingezeichnet: 1QHJ-Kristallstruktur (blauer Stern), TALOS+-Winkel (rotes Quadrat), XPLOR-Ensemble (schwarze Kreise).

diese Reste in der Purpormembran eine helikale Struktur annehmen und nicht sehr dynamisch sind. In Lösung wurden für die Reste 153–159 mindestens zwei Konformationen identifiziert, und die $\text{Ca/C}\beta/\text{C}'$ -Verschiebungen unterscheiden sich um mehrere ppm von denen in der Purpormembran. Die EF-Schleife hat offensichtlich die Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen relativ mobil zu sein, aber in der Purpormembranumgebung, die wir hier mit Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht haben, scheint sie vergleichsweise steif zu sein. Wegen fehlender Zuordnungen können wir derzeit nicht bestimmen, ob die Reste 159–164 auch im Festkörper dynamisch sind. Die von TALOS+ vorhergesagten Diederwinkel für die sieben zugeordneten Reste der neun Reste langen FG-Schleife sind in guter Übereinstimmung mit den Winkeln in den Kristallstrukturen. Vergleiche mit Lösungsdaten sind für diese Reste nicht möglich.

Die Struktur der AB-Schleife wurde auf Grundlage der ϕ - und ψ -Winkel, die mit TALOS+ für Ser35 und Asp36 vorhergesagt wurden, neu berechnet. Das Resultat ist eine Modifikation der Ser35-Winkel, die durch eine Veränderung der ϕ - und ψ -Winkel von Gly33 ausgeglichen wird (Abbildung 3 und Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Zwar ist es unwahrscheinlich, dass diese Unterschiede für die Funktion von bR von Bedeutung sind, sie zeigen aber, dass Konformationsunterschiede zwischen einem Membranprotein in einem Kristall und in der nativen Lipidumgebung beobachtet werden können und die Struktur mit Festkörper-

NMR-Spektroskopiedaten korrigiert werden kann. Eine neue Studie, die Untersuchungen des Influenzavirus-A-M2-Protonenkanals mit Röntgenkristallographie sowie Lösungs- und Festkörper-NMR-Spektroskopie vergleicht, hat hervorgehoben, wie wichtig es ist, Membranproteine entweder in ihrer nativen Lipidumgebung zu untersuchen oder Strukturen in anderen Umgebungen zu validieren.^[11]

Hier haben wir gezeigt, wie Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopiedaten eines großen Sieben-Helix-Membranproteins in seiner nativen Membran genutzt werden können, um die Struktur (möglicherweise verformter) Peptidschleifen in Kristallstrukturen oder Daten, die mithilfe von Lösungs-NMR-Spektroskopie in alternativer Umgebung aufgenommen wurden, zu

ergänzen und zu verifizieren. Wenn die chemischen Verschiebungen auf Unterschiede in der Konformation hinweisen, kann eine alternative Peptidschleifenstruktur in Übereinstimmung mit den Festkörper-NMR-Spektroskopiedaten errechnet werden. Die Ermittlung neuer GPCR-Kristallstrukturen in den letzten Jahren ist nur dadurch ermöglicht worden, dass thermostabilisierende Mutationen, Komplexe mit Antikörperfragmenten oder Konstrukte mit zusätzlichen Proteinen in einer Peptidschleife gebildet wurden, um die Kristallisation zu fördern.^[12] Unser Ansatz kann wichtige komplementäre Informationen über die native Struktur der Peptidschleifen in Wildtypproteinen liefern, in An- wie Abwesenheit niedermolekularer Liganden oder Proteine, die an Signalübertragung beteiligt sind.

Experimentelles

NMR-Proben wurden wie in der Literatur beschrieben präpariert.^[13] 2D-DARR^[14] sowie 3D-NCACX und 3D-NCOCX-NMR-Spektren^[15] wurden auf einem 800-MHz (^1H -Frequenz)-Varian/Magnex-Infinity-Plus-NMR-Spektrometer mit einem 3.2-mm-HCN-Balun-Probenkopf (mit MAS-Raten von 10.776 kHz (DARR) oder 10.0 kHz (NCACX, NCOCX) und einer eingestellten Temperatur von -10°C) aufgenommen. 3D-CANCO und 3D-CAN(CO)CX-Spektren (45 ms DARR-Mischzeit)^[16] wurden auf einem 500-MHz (^1H -Frequenz)-Varian-Infinity-Plus-Spektrometer mit einem 3.2-mm-HCN-Balun-Probenkopf (mit einer MAS-Rate von 11.111 kHz und einer eingestellten Temperatur von -25°C) aufge-

nommen. Daten wurden mit NMRPipe^[17] prozessiert und mit CCPNmr Analysis^[18] analysiert. Weitere Details zur Akquisition und Prozessierung der Daten sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

Strukturrechnungen wurden mit XPLOR-NIH^[19] durchgeführt. Die 1QHJ-Kristallstruktur^[20] wurde als Anfangsstruktur verwendet, und alle Atome außer denen in der AB-Schleife wurden fixiert. Zusätzlich zu den von TALOS+ bestimmten Winkeln^[9] wurde eine Diederwinkel-Datenbank eingesetzt.^[21] Weitere Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 28. Januar 2011,

veränderte Fassung am 27. April 2011

Online veröffentlicht am 18. Juli 2011

Stichwörter: Bacteriorhodopsin · Membranproteine · NMR-Spektroskopie · Proteinstrukturen

- [1] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 993.
- [2] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235.
- [3] S. H. White, *Nature* **2009**, 459, 344.
- [4] a) J. F. Wang, S. Kim, F. Kovacs, T. A. Cross, *Protein Sci.* **2001**, 10, 2241; b) Y. Li, D. A. Berthold, R. B. Gennis, C. M. Rienstra, *Protein Sci.* **2008**, 17, 199; c) I. Lehner, D. Basting, B. Meyer, W. Haase, T. Manolikas, C. Kaiser, M. Karas, C. Glaubitz, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 3281; d) V. Lange, J. Becker-Baldus, B. Kunert, B. J. van Rossum, F. Casagrande, A. Engel, Y. Roske, F. M. Scheffel, E. Schneider, H. Oschkinat, *ChemBiochem* **2010**, 11, 547.
- [5] a) O. C. Andronesi, S. Becker, K. Seidel, H. Heise, H. S. Young, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12965; b) S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. DeGrado, M. Hong, *Nature* **2010**, 463, 689.
- [6] a) T. Hirai, S. Subramaniam, *FEBS Lett.* **2003**, 545, 2; b) T. Hirai, S. Subramaniam, J. K. Lanyi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 433.
- [7] M. Etzkorn, S. Martell, O. C. Andronesi, K. Seidel, M. Engelhard, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 463; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 459.
- [8] J. Yang, L. Aslimovska, C. Glaubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 4874.
- [9] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2009**, 44, 213.
- [10] H. Patzelt, B. Simon, A. terLaak, B. Kessler, R. Kuhne, P. Schmieder, D. Oesterheld, H. Oschkinat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9765.
- [11] T. A. Cross, M. Sharma, M. Yi, H.-X. Zhou, *Trends Biochem. Sci.*, **2011**, 36, 117.
- [12] C. G. Tate, G. F. X. Schertler, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, 19, 386.
- [13] K. Varga, L. Aslimovska, A. Watts, *J. Biomol. NMR* **2008**, 41, 1.
- [14] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 344, 631.
- [15] F. Castellani, B. J. van Rossum, A. Diehl, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Biochemistry* **2003**, 42, 11476.
- [16] W. T. Franks, K. D. Kloepper, B. J. Wylie, C. M. Rienstra, *J. Biomol. NMR* **2007**, 39, 107.
- [17] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 277.
- [18] W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, P. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, 59, 687.
- [19] a) C. D. Schwieters, J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **2003**, 160, 65; b) C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, G. M. Clore, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2006**, 48, 47.
- [20] H. Belrhali, P. Nollert, A. Royant, C. Menzel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau, E. Pebay-Peyroula, *Structure* **1999**, 7, 909.
- [21] a) J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Protein Sci.* **1996**, 5, 1067; b) J. Kuszewski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Magn. Res.* **1997**, 125, 171.