

Die ersten Strukturen von 7-Helix-Transmembranproteinen in Lösung**

Oliver Zerbe*

Stichwörter:

Membranproteine · NMR-Spektroskopie ·
Strukturbiologie · Zellfreie Expression

7-Helix-Transmembranproteine (7-TM-Proteine) bilden eine biologisch wichtige Klasse von Membranproteinen. Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind die G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die an der Signalleitung vom extrazellulären Raum in die Zelle hinein beteiligt sind und daher eine zentrale Rolle in der Biologie spielen. So greifen z.B. etwa 30 % aller Medikamente an GPCRs an. Trotz ihrer immensen Bedeutung sind erst wenige hochaufgelöste Strukturen dieser Proteine bekannt, auch wenn im letzten Jahrzehnt signifikante Fortschritte vermeldet werden konnten. Den Anfang machte die röntgenkristallographisch gelöste Struktur von Rhodopsin im Jahr 2000.^[1] Weitere Beispiele sind die β 1- und β 2-Adrenorezeptoren sowie die Dopamin-D3-, Adenonsin-A_{2A}-, Histamin-H1- und Chemo-kin-CXCR4-Rezeptoren.^[2]

Die NMR-Spektroskopie benötigt keine Einkristalle und kann daher im Prinzip auch auf Proteine angewendet werden, die flexible Regionen enthalten. Es besteht daher die Erwartung, dass diese Technik viel zu unserem Verständnis von Rezeptoren beitragen kann. Neben der reinen Strukturinformation bietet die NMR-Spektroskopie auch Einsichten in dynamische Prozesse innerhalb eines Proteins, welche oft in engem Zusammenhang mit der biologischen Funktion stehen. Nichtsdestotrotz wurden bisher erst wenige Membranproteinstrukturen mithilfe von NMR-Spektroskopie aufgeklärt, was hauptsächlich auf viele technische Probleme zurückzuführen ist, welche die Experimente erschweren, die Qualität der Spektren verschlechtern und damit auch ihre Analyse verkomplizieren.

Aus technischer Sicht müssen Membranproteine in einem geeigneten membranähnlichen Medium eingebettet sein, damit sie der NMR-Spektroskopie überhaupt erst zugänglich werden. Oft wurden Tensidmicellen, Bicellen oder sogenannte „mini-disks“ zu diesem Zweck verwendet.^[3] Die zusätzliche Tensidhülle erhöht das Molekulargewicht beträchtlich, was oft direkt zu einer Verschlechterung der Qualität der

Spektren beiträgt. Bisherige Lösungs-NMR-Studien mit GPCRs ergaben, dass die Signale der TM-Helices, anders als die der Loops und Termini, oft nicht sichtbar waren.^[4,5]

Im Jahr 2010 veröffentlichten Nietlispach und Mitarbeiter die Struktur von sensorischem Rhodopsin in Lösung.^[6,7] Das Protein besitzt die 7-TM-Architektur der GPCRs, ist aber nicht an ein G-Protein gekoppelt. Diese Arbeit zeigte damit erstmals eindeutig, dass die Strukturbestimmung von 7-TM-Proteinen durch NMR-Spektroskopie möglich ist und auch Resultate in einer Qualität liefern kann, die jener der Röntgenkristallographie vergleichbar ist.

Kürzlich veröffentlichten nun Reckel et al. die Lösungsstruktur von Proteorhodopsin.^[8] Proteorhodopsin, das erst im Jahr 2000 entdeckt wurde, ist der Photorezeptor von marinem Bakterioplankton und einiger Eukaryoten und ist homolog zu Bakteriorhodopsin. Beide Proteine wirken als lichtbetriebene Protonenpumpen. Überraschenderweise war bislang trotz beträchtlichem Aufwand keine Kristallstruktur von Proteorhodopsin verfügbar, und die neue NMR-Struktur stellt daher einen herausragenden Fortschritt auf dem Gebiet der Strukturbiologie von Membranproteinen dar. Die Resonanzen des Peptidrückgrats und weiter Teile der Seitenketten konnten nahezu vollständig zugeordnet werden. In Photolyse-Experimenten wurde außerdem gezeigt, dass das Protein in einem aktiven Zustand vorliegt. Die insgesamt Faltung stimmt mit dem überein, was man anhand von homologen Proteinen erwartet. Interessanterweise findet man im ersten extrazellulären Loop, der die zweite und dritte TM-Helix verbindet, keinerlei Sekundärstrukturelemente. Die Tatsache, dass man an gleicher Stelle in Bakteriorhodopsin, sensorischem Rhodopsin und Xanthorhodopsin ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt findet, verdeutlicht die Wichtigkeit detaillierter Strukturinformationen, auch wenn solche schon für homologe Proteine vorliegen.

Die Strukturaufklärung des Proteorhodopsins ist das Ergebnis langjähriger Bemühungen mehrerer Forschungsgruppen. Dies führt uns zur Frage, warum Strukturen solcher Proteine in Lösung so schwer zu bestimmen sind. Erstens ist die Expression und Aufreinigung von helikalen Membranproteinen schwierig, und es können nur geringe Ausbeuten erzielt werden.^[3,9] Darüber hinaus verlangen NMR-Experimente nach verschiedenen Arten von Isotopenmarkierungen. Die Notwendigkeit von ^2H , ^{13}C - und ^{15}N -Markierungen schließt die Verwendung der bei Kristallographen beliebten

[*] Prof. Dr. O. Zerbe
Organisch-chemisches Institut, Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)
E-Mail: oliver.zerbe@oci.uzh.ch
Homepage: <http://www.oci.uzh.ch/group.pages/zerbe>

[**] Dank geht an Dr. Reto Walser für wertvolle Kommentare zum Manuskript.

Insektenzellen für die Expression praktisch aus. Hohe Deuterierungsgrade sind in vivo nur in *E. coli*^[10] und *Pichia pastoris*^[11] möglich. In der vorliegende Studie wurde dagegen eine zellfreie Expressionsmethode verwendet, die eine Expression in vitro ermöglicht. Auf diese Weise werden Probleme der Zelltoxizität oder der Überbeanspruchung des Membrantranslokationssystems, wie sie bei In-vivo-Methoden oft auftreten, vermieden.^[12] Darüber hinaus können mit dieser zellfreien Methode auch speziell markierte Aminosäuren in Proteine eingeführt werden, ohne Isotopenscrambling oder metabolische Modifikationen befürchten zu müssen. Die kürzlich eingeführte SAIL-Markierungstechnik^[13] verwendet chemisch stereoselektiv synthetisierte Aminosäuren, in denen die Protonen einer der beiden prochiralen Methylgruppen in Val und Leu, eines der zwei Methylenprotonen und die meisten der Ringprotonen der aromatischen Aminosäuren durch Deuterium ersetzt sind (Abbildung 1). So kann der Gesamtgehalt an Protonen (und damit die Beiträge zur transversalen Relaxation) erheblich verringert werden. Ebenfalls können so stereospezifische Zuordnungen gemacht werden, die am Ende die Präzision der berechneten Strukturen erhöhen. Im Fall von Proteorhodopsin wurden die klassischen NOEs durch Distanzeinschränkungen aus paramagnetischen Relaxationsverstärkungen (PREs)^[14] mittels positionsspezifisch eingeführter para-

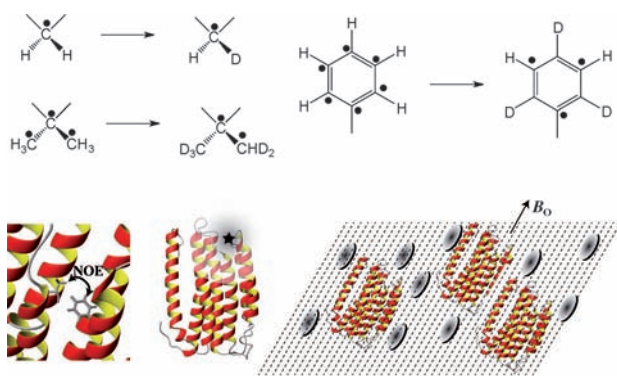


Abbildung 1. Oben: Markierungsmuster nach der SAIL-Methode. Schwarze Punkte bedeuten ^{13}C Markierungen. Unten: Verwendete Distanzeinschränkungen: NOEs (links), PREs (Mitte) und RDCs (rechts).

magnetischer Markierungen sowie durch dipolare Restkopplungen (RDCs)^[15] ergänzt.

Dank der kombinierten Anwendung dieser Methoden gelang es, diese anspruchsvolle Strukturbestimmung des Proteorhodopsins zu meistern. Jedoch sind diese Methoden schon länger bekannt, und so stellt sich die Frage, warum dies erst die zweite Strukturaufklärung eines 7-TM-Proteins in Lösung ist. Mangelnde Anstrengungen sind sicher nicht die Ursache – vielmehr sind es die inhärenten Schwierigkeiten, die mit diesen Proteinen verbunden sind, die eine Untersuchung erschweren. So erfordert z.B. die Herstellung eines aktiven Proteinzustands eine beträchtliche Flexibilität der Polypeptidkette. Dies kann wiederum zu konformationellen Austauschprozessen führen, die Resonanzen so weit verbreitern, dass sie nicht mehr detektierbar sind. Dieses Phä-

nomen, das sicher vielen NMR-Gruppen allzu gut bekannt sein dürfte, wurde denn auch in dieser Studie bei einigen Signalen aus den Loops beobachtet. Eine andere Ursache ist unser eingeschränktes Verständnis von Protein-Lipid-Interaktionen, ein Aspekt, der durch die schwierige Expression der Proteine noch erschwert wird: Oft steht einfach nicht genügend Material zur Verfügung, um alle gewünschten Tenside und deren Kombinationen auszuprobieren. Die Strukturaufklärungen von sensorischem Rhodopsin und jetzt von Proteorhodopsin in Lösung wurden sicher durch deren „gutmütige“ Eigenschaften (verglichen mit „echten“ GPCRs) hinsichtlich der oben beschriebenen Probleme begünstigt. In den meisten kristallographischen Studien von GPCRs waren beträchtliche Modifikationen an der Proteinsequenz notwendig, um überhaupt Kristalle gewinnen zu können. So wurde z.B. der lange und flexible dritte zytosolische Loop durch T4-Lysozym ersetzt oder durch Antikörperbindung rigidisiert. Eine weitere Strategie bestand in der Thermostabilisierung durch Mutagenese.^[16] Oft wird behauptet, dass Proteine, die aufgrund flexibler Teile nicht kristallisiert werden können, für die NMR-Spektroskopie per se kein Problem darstellen. Leider ist dies öfter nicht der Fall, und so ergeben Proteine, die nicht kristallisieren oft auch NMR-Spektren von schlechter Qualität und umgekehrt. Die Strukturen von sensorischem Rhodopsin und Proteorhodopsin zeigen in überzeugender Weise, dass NMR-Spektroskopie doch befähigt ist, Strukturinformationen für solche Proteine zu liefern, wenn auch unter großem Aufwand und mit viel Expertise in der Akquisition und Interpretation der NMR-Experimente. Konstrukte, in denen der Grund- oder aktivierte Zustand stabilisiert wurden, sei es durch Mutationen oder durch Bindung eines geeigneten Liganden (wie sie auch in der Kristallographie verwendet werden), könnten auch in der NMR-Spektroskopie nützlich sein, um Probleme mit konformationellem Austausch zu beheben und so auch Lösungsstrukturen von GPCRs in Reichweite zu bringen.

Reckel et al. zeigen in ihrer Arbeit eindrucklich, dass NMR-Spektroskopie auch auf größere helicale Membranproteine angewendet werden kann. Mit einem besseren Verständnis für erfolgsversprechende Modifikationen können wir wohl einer aussichtsreichen Zukunft für die NMR-Spektroskopie in diesem wichtigen Gebiet der Strukturbiochemie entgegenblicken.

Eingegangen am 30. Oktober 2011

Online veröffentlicht am 16. Dezember 2011

- [1] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Moto-shima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739–745.
- [2] D. M. Rosenbaum, S. G. Rasmussen, B. K. Kobilka, *Nature* **2009**, 459, 356–363.
- [3] J. L. Banères, J. L. Popot, B. Mouillac, *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 314–322.
- [4] S. Tapaneeyakorn, A. D. Goddard, J. Oates, C. L. Willis, A. Watts, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2011**, 1808, 1462–1475.
- [5] K. Werner, C. Richter, J. Klein-Seetharaman, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2008**, 40, 49–53.

- [6] A. Gautier, J. P. Kirkpatrick, D. Nietlispach, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7407–7410; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7297–7300.
- [7] A. Gautier, H. R. Mott, M. J. Bostock, J. P. Kirkpatrick, D. Nietlispach, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 768–774.
- [8] S. Reckel, D. Gottstein, J. Stehle, F. Löhr, M.-K. Verhoefen, M. Takeda, R. Silvers, M. Kainosho, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, F. Bernhard, H. Schwalbe, P. Güntert, V. Dötsch, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12148–12152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11942–11946.
- [9] V. Sarraimegn, I. Muller, A. Milon, F. Talmont, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1149–1164.
- [10] D. M. LeMaster, *Methods Enzymol.* **1989**, *177*, 23–43.
- [11] W. D. Morgan, A. Kragt, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 337–347.
- [12] F. Junge, S. Haberstock, C. Roos, S. Stefer, D. Proverbio, V. Dötsch, F. Bernhard, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *28*, 262–271.
- [13] M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, P. Güntert, *Nature* **2006**, *440*, 52–57.
- [14] B. Liang, J. H. Bushweller, L. K. Tamm, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4389–4397.
- [15] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111–1114.
- [16] R. M. Bill, P. J. Henderson, S. Iwata, E. R. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C. G. Tate, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 335–340.

ChemistryViews

Spot your favorite content
www.ChemistryViews.org

Education & entertainment

Exciting news

Unique articles

Multi-media

Free & easy access to new magazine

New online service brought to you by

ChemPubSoc Europe

WILEY-VCH

603701008