

# Sekundärstruktur, Dynamik und Topologie eines Sieben-Helix-Rezeptors in nativer Membranumgebung, untersucht mit Festkörper-NMR-Spektroskopie\*\*

Manuel Etzkorn, Swetlana Martell, Ovidiu C. Andronesi, Karsten Seidel, Martin Engelhard\* und Marc Baldus\*

Mithilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie unter Bedingungen der Rotation im magischen Winkel (magic angle spinning, MAS)<sup>[1]</sup> wurden bereits beachtliche Fortschritte bei der Erforschung von Ligandenbindung an Membranproteine erzielt;<sup>[2–7]</sup> die Bestimmung vollständiger dreidimensionaler Strukturen größerer, membranständiger Proteine wurde allerdings bisher erschwert durch die Länge der Aminosäuresequenz, die häufigen Wiederholungen von hydrophoben Resten sowie die begrenzte spektrale Auflösung, die aus dem dominanten Einfluss einer einzelnen Art von Sekundärstrukturelement ( $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt) resultiert.<sup>[8–10]</sup> Grundsätzlich lässt sich die spektrale Auflösung durch Strategien der Isotopenmarkierung verbessern (siehe z. B. Lit. [9–11]), allerdings können sich dabei die geringe Expressionsmenge des Proteins und/oder die Kosten der isotopenmarkierten Ausgangsmaterialien negativ auswirken.

Wir zeigen hier, dass mithilfe einer einheitlichen (<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N)-Isotopenmarkierung, die in vielen zellulären Expressionssystemen unkompliziert zu realisieren ist, der Zugabe genau ausgewählter Aminosäuren in ihrer natürlichen Isotopenhäufigkeit („reverse labeling“<sup>[12,13]</sup>) und der Anwendung von Festkörper-NMR-spektroskopischen Methoden, die die spektroskopischen Signale von mobilen, statischen und wasserzugänglichen Proteinsegmenten trennen, die Struktur und Topologie eines vollständigen Sieben-Helix-Rezeptors in nativen Membranen mit einer isotopenmarkierten Probe untersucht werden können.

Unser Ansatz wird am Beispiel des sensorischen Rhodopsins II von *Natronomonas pharaonis* (NpSRII) demonstriert. NpSRII ist ein Sieben-Helix(A–G)-Membranprotein, das als Cofaktor ein Retinal enthält, das über eine protonierte Schiff-Base an einen Lysinrest gebunden ist.<sup>[14]</sup> Dreidimensionale Strukturen von NpSRII in freiem und Transducergebundenem Zustand, Grundzustand und photoaktiviertem Zustand sind bekannt.<sup>[15–19]</sup> Abbildung 1 a zeigt ein (<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C)-Spindiffusions(SD)-Spektrum<sup>[20]</sup> einer einheitlich isotopenmarkierten NpSRII-Probe, die die vier dominanten Reste V, L, F und Y in ihrer natürlichen Isotopenhäufigkeit enthält (in der Folge U[<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N](V,L,F,Y)]-NpSRII genannt). Alle Spektren in Abbildung 1 wurden in Proteoliposomen bei 800 MHz (<sup>1</sup>H-Resonanzfrequenz) aufgenommen. Die beobachtete <sup>13</sup>C-Linienbreite von 0.7 ppm lässt nicht nur auf ein wohlgefaltetes Membranprotein schließen, sondern bestätigt auch, dass hochaufgelöste Festkörper-NMR-Spektren an Membranproteinen in ihrer natürlichen Lipidumgebung prinzipiell möglich sind. Das „reverse labeling“ von vier dominanten Resten, die etwa 34 % der gesamten Aminosäuresequenz ausmachen, verbessert die spektrale Auflösung signifikant gegenüber der bei Untersuchungen an einheitlich isotopenmarkierten Proben.<sup>[8]</sup> Besonders auffällig ist dies in Abbildung 1 b, in der ein zweidimensionales SD-Experiment, aufgenommen unter schwachen Kopplungsbedingungen,<sup>[21]</sup> eine Vielzahl von sequenziellen Korrelationen offenbart, deren Signalintensitäten deutlich oberhalb des spektralen Rauschens liegen (siehe Hintergrundinformationen). Diese Korrelationen reduzieren den Grad an Mehrdeutigkeiten, die durch das Vorkommen kürzerer, isotopenmarkierter Aminosäuresegmente in

U[<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N](V,L,F,Y)]-NpSRII bedingt sind (verglichen mit vollständig isotopenmarkierten Proben). Sie wurden mit Experimenten auf der Basis von <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-dipolarem Transfer<sup>[22]</sup> kombiniert, um sequenzielle Signalzuordnungen zu treffen, die in drei Verlässlichkeitsklassen eingeteilt wurden (siehe Hintergrundinformationen). Ausgehend von dieser Signalzuordnung können konformationsabhängige chemische Verschiebungen definiert werden, die eine vorwiegend  $\alpha$ -helicale Konformation für die transmembranen Segmente von NpSRII belegen.

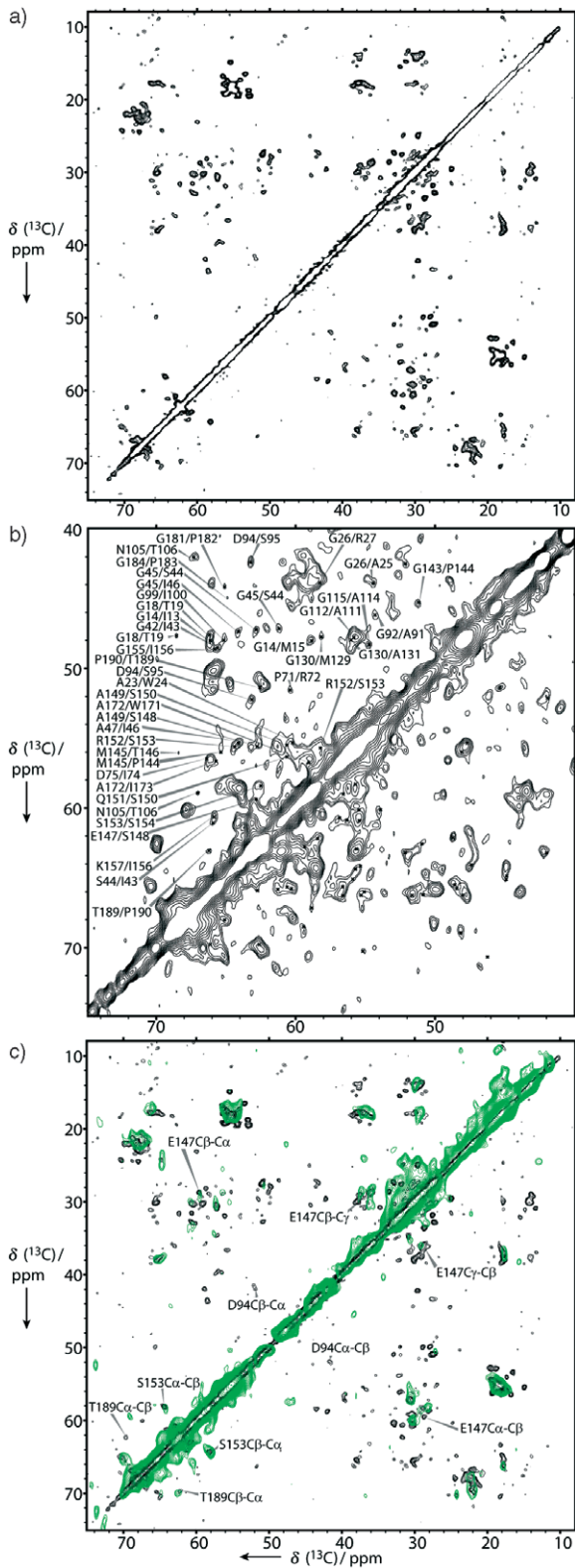
Zur weiteren Charakterisierung der supramolekularen Anordnung von NpSRII in nativen Membranen wurde ein H<sub>2</sub>O-editiertes (<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C)-Korrelationsexperiment durchgeführt. Die dazugehörige Festkörper-NMR-Pulssequenz beruht auf der Möglichkeit des Polarisationsaustauschs zwischen den mobilen Protonen des Wassers und dem Protein-

[\*] S. Martell, Prof. Dr. M. Engelhard  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Abteilung für Physikalische Biochemie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-133-2399  
E-Mail: martin.engelhard@mpi-dortmund.mpg.de

M. Etkorn, Dr. O. C. Andronesi, K. Seidel, Dr. M. Baldus  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Abteilung für NMR-basierte Strukturbiochemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-201-2202  
E-Mail: maba@mpibpc.mpg.de

[\*\*] Wir danken Prof. C. Griesinger für die kontinuierliche Unterstützung dieses Projekts, der DFG und der Max-Planck-Gesellschaft für finanzielle Beihilfen sowie C. Pieczka für die Gestaltung des Titels.

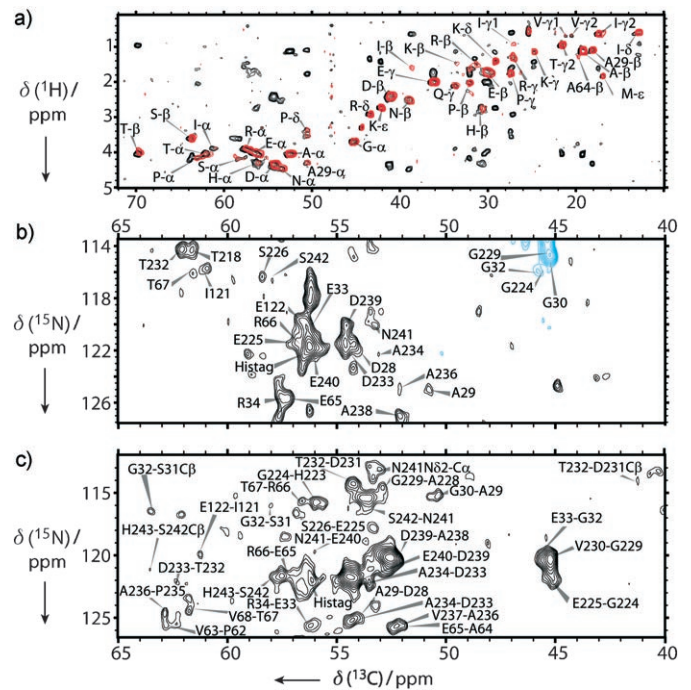
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



**Abbildung 1.** Dipolare ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Korrelationspektren von  $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ - $\text{NpSRII}$  in Lipid-Doppelschichten. a) Spindiffusions (SD)-Experiment mit einer Mischzeit von 15 ms. b) SD unter schwachen Kopplungsbedingungen<sup>[21]</sup> (Mischzeit 150 ms). Eingezeichnet sind sequenzielle ( $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ )- und ( $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ )-Korrelationen. c) Vergleich zwischen einem  $\text{H}_2\text{O}$ -editierten Korrelationspektrum mit einer Proton-Proton-Mischzeit von 4 ms (grün, siehe auch die Hintergrundinformationen) und dem Spektrum aus (a) (schwarz).

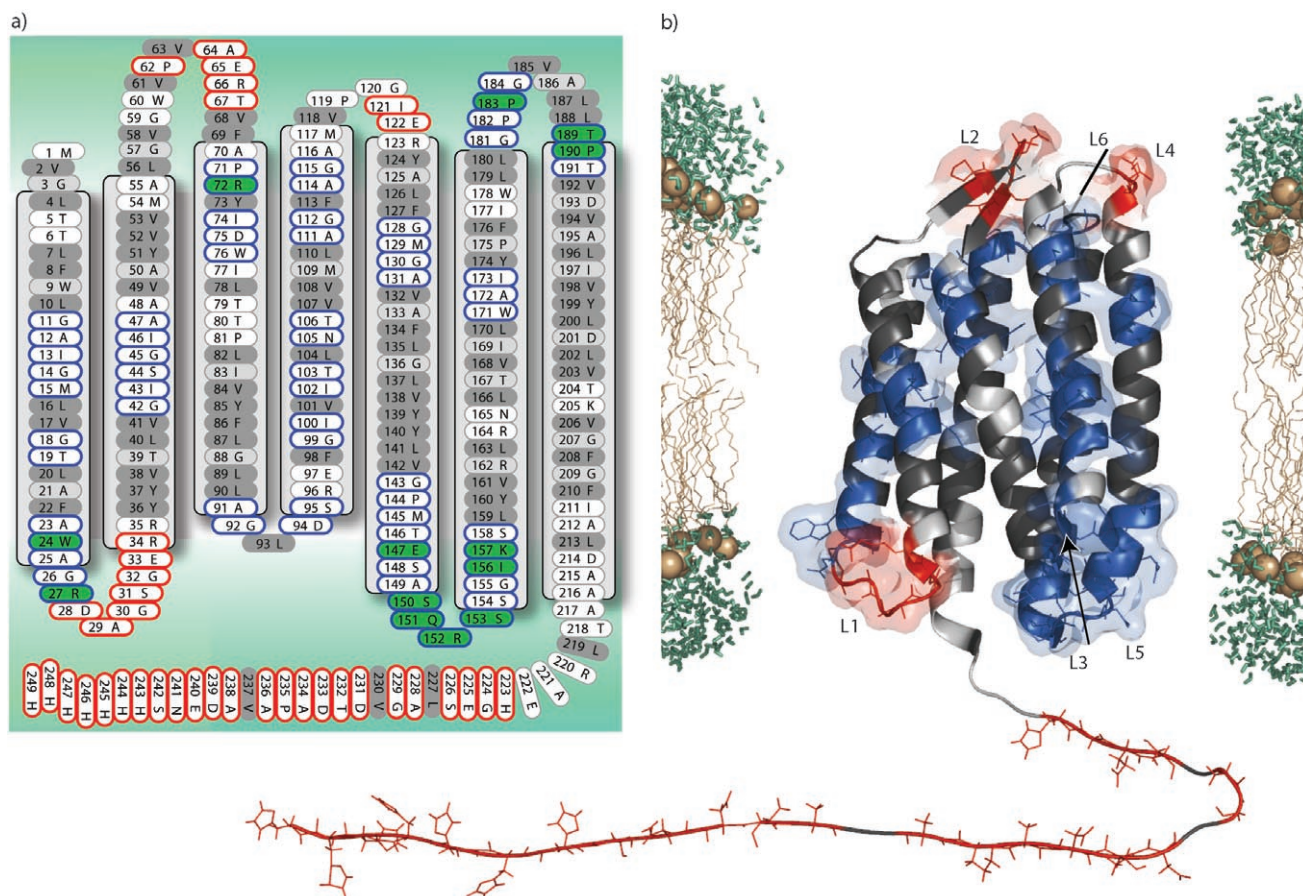
komplex.<sup>[23]</sup> Hierbei können zunächst die NMR-Signale der mobilen Protonen mithilfe eines Relaxationsfilters selektiert werden. Während der darauf folgenden Mischzeit kann ein Polarisationstransfer zu dem immobilen Biomolekül stattfinden. Für kurze Transferzeiten sind die resultierenden Spektren empfindlich für den Abstand zwischen einem gegebenen Kernspin im Inneren des Moleküls und dem umgebenden Wasser.<sup>[24]</sup>

Für unsere Zwecke haben wir existierende Pulssequenzen um eine weitere ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Kontaktlinie erweitert, die es ermöglicht, für eine gegebene Diffusionszeit eine zweidimensionale Korrelationskarte von allen detektierbaren Proteinresonanzen aufzunehmen (siehe Hintergrundinformationen). Das  $\text{H}_2\text{O}$ -editierte ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Spektrum (grün in Abbildung 1c) enthält nur eine Untermenge der Korrelationen in Abbildung 1a. Mit einer ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ )-Mischzeit von 4 ms ist Polarisationstransfer unter den gewählten experimentellen Bedingungen hauptsächlich auf die Protein-Wasser-Grenzfläche von  $\text{NpSRII}$  begrenzt. Da wegen des dipolaren Polarisationstransfers starre Komponenten selektiert werden, sind Signale von immobilen Proteinsegmenten wie Glu 147, Ser 153 und Thr 189 zu beobachten. Auffällig ist auch das Fehlen von Kreuzkorrelationen für Asp 94 im  $\text{H}_2\text{O}$ -editierten ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Korrelationsexperiment, was dafür sprechen könnte, dass die Peptidschleife L3, die die Helices C und D verbindet, tiefer in die Membran eingebettet ist. Mithilfe dieser Korrelationen lässt sich die gegebene SR $\text{II}$ -Röntgenbeugungsstruktur relativ zur Lipid-Wasser-Grenzfläche positionieren (siehe unten).



**Abbildung 2.** Skalare a) ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )- und b), c) ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Korrelationspektren von  $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ - $\text{NpSRII}$  in Lipid-Doppelschichten. a) Vergleich eines ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-INEPT-Spektrums (rot) mit einem ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-INEPT-TOBSY-Spektrum (schwarz). b) NCA- und c) NCOCA-Spektren wie in Lit. [25] beschrieben. In allen Fällen wurden mobile Proteinsegmente detektiert.





**Abbildung 3.** Festkörper-NMR-Untersuchung an  $U^{13}C,^{15}N\{(V,L,F,Y)\}$ -NpSR II in Proteoliposomen a) entlang der Sequenz und relativ zu einer wässrigen Umgebung und b) abgebildet auf der dreidimensionalen Röntgenbeugungsstruktur von NpSR II (Lit. [16]) in einer Lipid-Doppelschicht-Umgebung. In beiden Fällen sind mobile Reste in Rot, starre Proteinsegmente in Blau dargestellt. In (a) sind die Reste, die im  $H_2O$ -editierten Spektrum identifiziert wurden, in Grün hervorgehoben. Nicht isotoopenmarkierte Reste in der  $U^{13}C,^{15}N\{(V,L,F,Y)\}$ -NpSR II-Probe und Reste, die als Resultat dieser Präparation nicht sequenziell zugeordnet werden können, sind entsprechend in Dunkel- und Hellgrau gekennzeichnet.

Das Fehlen größerer Teile von Peptidschleifen des Rezeptors in den dipolaren Spektren in Abbildung 1 könnte entweder durch statisch-strukturelle Heterogenität oder schnelle molekulare Bewegung hervorgerufen werden. Um zwischen diesen beiden Mechanismen zu unterscheiden, haben wir eine Messreihe von 2D-Korrelationsexperimenten durchgeführt, die skalare Transfereinheiten verwenden und mobile Proteinsegmente unter MAS-Bedingungen detektieren.<sup>[25]</sup> In Abbildung 2a sind die Ergebnisse eines auf  $(^1H,^{13}C)$ -INEPT basierenden Transfers (rot) und die eines  $(^1H,^{13}C)$ -HCC-INEPT-TOBSY-Transfers (schwarz) überlagert. Mithilfe dieser Spektren sind bereits aminosäurespezifische Signalzuordnungen möglich. Für sequenzielle Signalzuordnungen wurden NCA- und NCOCA-Korrelationsexperimente auf der Basis skalarer Kopplungen durchgeführt (Abbildung 2b und c). Ähnlich wie bei den Spektren auf der Basis von dipolarem Transfer (Abbildung 1) liegt die spektrale Auflösung, sowohl für  $^{15}N$  als auch  $^{13}C$ , deutlich unter einem ppm und ermöglicht so sequenzielle Zuordnungen in einer Vielzahl von Proteinsegmenten. Zu beachten sind in Abbildung 2b die Korrelationen von Glycinen, die wegen der spezifischen Transfercharakteristik innerhalb einer Methy-

lengruppe negativ (und blau dargestellt) sind. Unter Berücksichtigung des Isotoopenmarkierungsmusters unserer NpSR II-Probe zeigen die skalaren Transferexperimente eindeutig, dass der C-Terminus, von Rest 223 an aufwärts, mobil ist. Zusätzliche Korrelationen in den 2D-Spektren lassen darauf schließen, dass weitere Proteinsegmente eine hohe Mobilität aufweisen. Unseren Daten zufolge handelt es sich bei diesen Segmenten am ehesten um die Peptidschleifen A–B (L1), B–C (L2) und D–E (L4). Tatsächlich haben die zugehörigen sekundären chemischen Verschiebungen dieser Reste weitgehend ungeordneten („Random-Coil“-)Charakter (siehe Hintergrundinformationen), was für eine schnelle Proteindynamik im Nano- bis Mikrosekundenbereich spricht.

Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung unserer Festkörper-NMR-Spektroskopie-Studie; zum einen schematisch an der Primärsequenz (a), zum anderen an der dreidimensionalen Kristallstruktur von NpSR II (b, PDB-Code: 1H68). In beiden Fällen sind Reste, die sich schnell bewegen, in Rot dargestellt. Starre Proteinsegmente mit vorwiegend  $\alpha$ -helicalem Charakter sind in Blau wiedergegeben. Im Ganzen konnten Signale für 98 Aminosäuren zugeordnet werden, was 73% aller sequenziell zuordenbaren Rezeptor-Reste ent-

spricht. Unsere Daten weisen darauf hin, dass im SRII, rekonstituiert in Lipiden der Purpormembran, nur drei der sechs Proteinschleifen sowie der C-Terminus eine beträchtliche Dynamik aufweisen. Des Weiteren konnten die Informationen aus unserem H<sub>2</sub>O-editierten (<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C)-Korrelationsexperiment verwendet werden, um das Protein innerhalb einer Modellmembran zu positionieren (Abbildung 3b).

Hochauflösende Festkörper-NMR-Spektroskopie erwies sich als geeignet zur Untersuchung von Sekundärstruktur, Dynamik und Membrantopologie eines vollständigen Sieben-Helix-Rezeptors in nativer Membranumgebung. Die erzielte strukturelle Genauigkeit sollte sich durch Kombination von mehreren unterschiedlich isotoptenmarkierten Proteinproben, eventuell im Rahmen der 3D-NMR-Spektroskopie, noch weiter verbessern lassen. Die hier präsentierten Daten bilden die spektroskopische Basis für weitere Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen, z. B. unter Zuhilfenahme von indirekt detektierten Proton-Proton-Kontakten (siehe z. B. Lit. [7]), um die dreidimensionale Struktur von NpSRII in nativer Membranumgebung zu bestimmen. Ergänzt durch andere biophysikalische Methoden,<sup>[18,19,26]</sup> können Festkörper-NMR-spektroskopische Untersuchungen Einblicke in Strukturdetails der Signaltransduktion in NpSRII oder in anderen Membranproteinen liefern.

## Experimentelles

U[<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N(V,L,F,Y)]-NpSRII wurde in einem *E. coli*-Stamm exprimiert, der in einem Nährmedium aus <sup>13</sup>C-isotoptenmarkierter Glucose und <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl gezüchtet worden war. Unmarkierte Aminosäuren wurden in 1 mM (L,F,Y) oder 4 mM Konzentration (V) zugegeben. Proteoliposomen wurden wie in Lit. [27] beschrieben präpariert. Alle NMR-Experimente wurden mit 4-mm-Dreikanal-(<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N)-Probenköpfen an Magnetfeldern von 18.8 und 14.1 T, entsprechend 800 und 600 MHz <sup>1</sup>H-Resonanzfrequenz (Bruker Biospin, Karlsruhe), durchgeführt. Dipolarer Transfer wurde unter breitbandiger (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C)- und selektiver<sup>[22]</sup> (<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C)-Kreuzpolarisation (CP) erreicht. Während der dipolaren Korrelationsexperimente wurde SPINAL64-Protonenentkopplung<sup>[28]</sup> mit Radiofrequenzfeldern von 75–90 kHz verwendet. Sequenzielle (<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C)-Signalzuordnungen wurden unter Kombination von 2D-NCACX- und NCOCX-Spektren<sup>[22]</sup> mit Ergebnissen aus (<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C)-Korrelationsexperimenten, aufgenommen unter schwachen Kopplungsbedingungen,<sup>[21]</sup> erzielt. MAS-Raten zwischen 8 und 12.5 kHz und Temperaturen zwischen –13 und +5 °C wurden verwendet. Mobile Proteinsegmente wurden mit Methoden untersucht, wie sie in Lit. [25] beschrieben wurden. Das H<sub>2</sub>O-editierte (<sup>13</sup>C,<sup>13</sup>C)-Korrelationsexperiment wurde mit einem Relaxationsfilter von 1 ms und einer Proton-Proton-Mischzeit von 4 ms aufgenommen (siehe auch die Hintergrundinformationen).

Eingegangen am 29. Mai 2006,

veränderte Fassung am 14. Juli 2006

Online veröffentlicht am 26. September 2006

**Stichwörter:** Membranproteine · Moleküldynamik · NMR-Spektroskopie · Rezeptoren · Strukturklärung

[1] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, 182, 1659.

- [2] F. Creuzet, A. McDermott, R. Gebhard, K. van der Hoef, M. B. Spijker-Assink, J. Herzfeld, J. Lugtenburg, M. H. Levitt, R. G. Griffin, *Science* **1991**, 251, 783.
- [3] A. F. L. Creemers, S. Kühne, P. H. M. Bovee-Geurts, W. J. DeGrip, J. Lugtenburg, H. J. M. de Groot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9101.
- [4] S. Luca, J. F. White, A. K. Sohal, D. V. Filippov, J. H. van Boom, R. Grisshammer, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 10706.
- [5] A. B. Patel, E. Crocker, M. Eilers, A. Hirshfeld, M. Sheves, S. O. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 10048.
- [6] L. Krabben, B. J. van Rossum, F. Castellani, E. Bocharov, A. A. Schulga, A. S. Arseniev, C. Weise, F. Hucho, H. Oschkinat, *FEBS Lett.* **2004**, 564, 319.
- [7] A. Lange, K. Giller, S. Hornig, M.-F. Martin-Eauclaire, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, *Nature* **2006**, 440, 959.
- [8] T. A. Egorova-Zachernyuk, J. Hollander, N. Fraser, P. Gast, A. J. Hoff, R. Cogdell, H. J. M. de Groot, M. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2001**, 19, 243.
- [9] A. J. van Gammeren, F. B. Hulsbergen, J. G. Hollander, H. J. M. de Groot, *J. Biomol. NMR* **2004**, 30, 267.
- [10] M. Hiller, L. Krabben, K. R. Vinothkumar, F. Castellani, B. J. van Rossum, W. Kühlbrandt, H. Oschkinat, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1679.
- [11] M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, P. Güntert, *Nature* **2006**, 440, 52.
- [12] G. W. Vuister, S. J. Kim, C. Wu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9206.
- [13] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15871.
- [14] J. P. Klare, V. I. Gordeliy, J. Labahn, G. Büldt, H.-J. Steinhoff, M. Engelhard, *FEBS Lett.* **2004**, 564, 219.
- [15] H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Science* **2001**, 293, 1499.
- [16] A. Royant, P. Nollert, K. Edman, R. Neutze, E. M. Landau, E. Pebay-Peyroula, J. Navarro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10131.
- [17] K. Edman, A. Royant, P. Nollert, C. A. Maxwell, E. Pebay-Peyroula, J. Navarro, R. Neutze, E. M. Landau, *Structure* **2002**, 10, 473.
- [18] V. I. Gordeliy, J. Labahn, R. Moukhametzianov, R. Efremov, J. Granzin, R. Schlesinger, G. Büldt, T. Savopol, A. J. Scheidig, J. P. Klare, M. Engelhard, *Nature* **2002**, 419, 484.
- [19] R. Moukhametzianov, J. P. Klare, R. Efremov, C. Baeken, A. Göppner, J. Labahn, M. Engelhard, G. Büldt, V. I. Gordeliy, *Nature* **2006**, 440, 115.
- [20] N. Bloembergen, *Physica* **1949**, 15, 386.
- [21] K. Seidel, A. Lange, S. Becker, C. E. Hughes, H. Heise, M. Baldus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 5090.
- [22] M. Baldus, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, 41, 1.
- [23] H. T. Edzes, E. T. Samulski, *Nature* **1977**, 265, 521.
- [24] K. K. Kumashiro, K. Schmidt-Rohr, O. J. Murphy III, K. L. Ouellette, W. A. Cramer, L. K. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5043.
- [25] O. C. Andronesi, S. Becker, K. Seidel, H. Heise, H. S. Young, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12965.
- [26] Y. Sudo, H. Okuda, M. Yamabi, Y. Fukuzaki, M. Mishima, N. Kamo, C. Kojima, *Biochemistry* **2005**, 44, 6144.
- [27] J. P. Klare, E. Bordignon, M. Doebber, J. Fitter, J. Kriegsmann, I. Chizhov, H. J. Steinhoff, M. Engelhard, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 1207.
- [28] B. M. Fung, A. K. Khitrin, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 97.