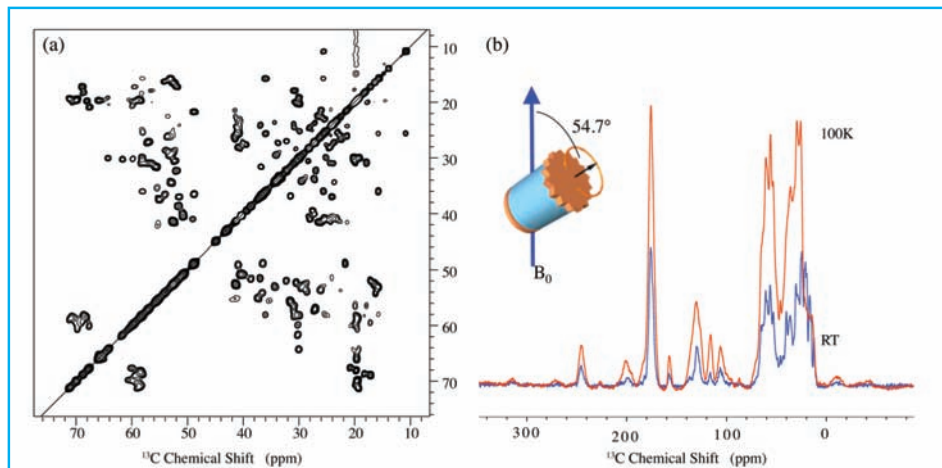


CLEMENS GLAUBITZ, INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE

Biophysikalische Festkörper-NMR Spektroskopie an Membranproteinen

Mittels Festkörper-NMR (FK-NMR) Spektroskopie können unlösliche biomolekulare Komplexe detailliert charakterisiert werden (Abb. 1). Für strukturelle biologische Anwendungen ist diese Methode ein noch relativ neues und in Entwicklung befindliches Verfahren, wohingegen dieser Ansatz für hypothesenbasierte biophysikalische Studien gut etabliert ist. Hierfür stehen in Frankfurt modernste Festkörper-NMR Spektrometer bei 850, 600 und 400 MHz zur Verfügung. Zur weiteren Empfindlichkeitssteigerung wurde kürzlich ein Kryo-MAS Probenkopf installiert welcher Experimente bei Temperaturen von 100K erlaubt und Teil eines im Aufbau befindlichen „Dynamic Nuclear Polarisation“ Festkörper-NMR Spektrometers darstellt.

In der Arbeitsgruppe von Clemens Glaubitz wird FK-NMR hauptsächlich für Struktur-Funktionsstudien an Membranproteinen verwendet. Die Forschungsschwerpunkte liegen hierbei auf Proteinen die an der Weiterleitung von Wirkstoffen, Ionen und Signalen durch die Zellmembran oder an Lipidregulationsprozessen beteiligt sind. Sie werden im Folgenden anhand aktueller Ergebnisse kurz umrissen.



G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCRS) sind für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge, wie Signaltransduktion, Regelung der Hormonaktivität oder Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich. Die Entwicklung pharmakologisch wirksamer Liganden an GPCRS könnte durch Kenntnis der Struktur des aktiven Rezeptorzentrums wesentlich vereinfacht werden. So konnte bspw. die Struktur des Neuropeptides Bradykinin im Komplex mit dem humanen G-Protein gekoppelten Bradykinin-2 Rezeptor mittels Festkörper-NMR bestimmt werden (Abb. 2, Lopez et al. 2008).

Bei **MULTIDRUG-TRANSPORTERN** handelt es sich um Membranproteine, die in der Lage sind, eine Vielzahl toxischer Substanzen aus der Zelle zu transportieren. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle bei

CLEMENS GLAUBITZ, INSTITUTE OF BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Biophysics of Membrane Proteins by Solid-State NMR

Solid-state NMR (ssNMR) allows a detailed characterisation of insoluble biomolecular complexes (Fig. 1). ssNMR is an emerging technique for structural biology but a well established approach for hypothesis driven biophysical studies. In Frankfurt, high-end solid-state NMR spectrometers operating at 850, 600 and 400 MHz are available. In order to extend sensitivity limits, a novel cryo-MAS probehead has recently been installed allowing MAS NMR experiments to be conducted routinely at 100K. It forms part of a dynamic nuclear polarisation spectrometer which is currently being set up.

The Glaubitz lab uses ssNMR mainly for structure-function studies on membrane proteins. The research is centred on proteins involved in signal and information transfer across membranes as well as lipid regulators. Latest research highlights are shown below.

G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS (GPCRS) are responsible for numerous physiological processes such as signal transduction, hormone regulation and cell-cell communication. The development of novel, pharmacologically active ligands could be enhanced by structural data of the ligand binding site or the ligand itself. Using ssNMR, we were able to determine the backbone structure of the neuropeptide bradykinine bound to the human G-protein coupled bradykinin-2 receptor (Fig.2, Lopez et al. 2008).

Abb. 1: Mittels Probenrotation am magischen Winkel (MAS-NMR) können hoch aufgelöste NMR Spektren von unlöslichen Proben erhalten werden. Ein Beispiel für die erzielbare Auflösung von ^{13}C - ^{13}C Korrelationsexperimenten an einem Hochfeldspektrometer (850MHz) ist in (a) für eine kristalline Präparation des Proteins GB1 gezeigt. Eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung ist durch den Einsatz von Kryo-MAS Probenköpfen möglich, bei denen die Elektronik als auch Probe auf 100K gekühlt werden, wie hier am Beispiel des Membranproteins Proteorhodopsin gezeigt (b).

Abb. 1: Mittels Probenrotation am magischen Winkel (MAS-NMR) können hoch aufgelöste NMR Spektren von unlöslichen Proben erhalten werden. Ein Beispiel für die erzielbare Auflösung von ^{13}C - ^{13}C Korrelationsexperimenten an einem Hochfeldspektrometer (850MHz) ist in (a) für eine kristalline Präparation des Proteins GB1 gezeigt. Eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung ist durch den Einsatz von Kryo-MAS Probenköpfen möglich, bei denen die Elektronik als auch Probe auf 100K gekühlt werden, wie hier am Beispiel des Membranproteins Proteorhodopsin gezeigt (b).

Fig. 1: Highly resolved NMR spectra of insoluble protein samples can be obtained using magic angle sample spinning (MAS-NMR). The resolution which can be obtained at high fields (850 MHz) is illustrated by a ^{13}C - ^{13}C correlation experiment obtained from a crystalline preparation of the protein GB1 (a). An essential improvement in sensitivity can be achieved using cryo probe heads which allow MAS-NMR experiments to be conducted on samples at 100K, as shown here for the membrane protein proteorhodopsin (b).

MULTIDRUG RESISTANCE is an increasingly important problem in the treatment of infectious diseases. The most distinct mechanism for multidrug resistance is based on secondary and primary active

Abb. 2: Struktur des Neuropeptides Bradykinin die es im Komplex mit dem humanen Bradykinin-2 Rezeptor annimmt, auf welchen es als Agonist wirkt. Angeregt durch das Hormon durchläuft der Rezeptor vermutlich verschiedene Konformationsänderungen, um letztendlich das G-Protein zu aktivieren. Die Struktur wurde mittels Festkörper-NMR in Kooperation mit H. Michel, MPI Biophysik Frankfurt, bestimmt (Lopez et al. 2008).

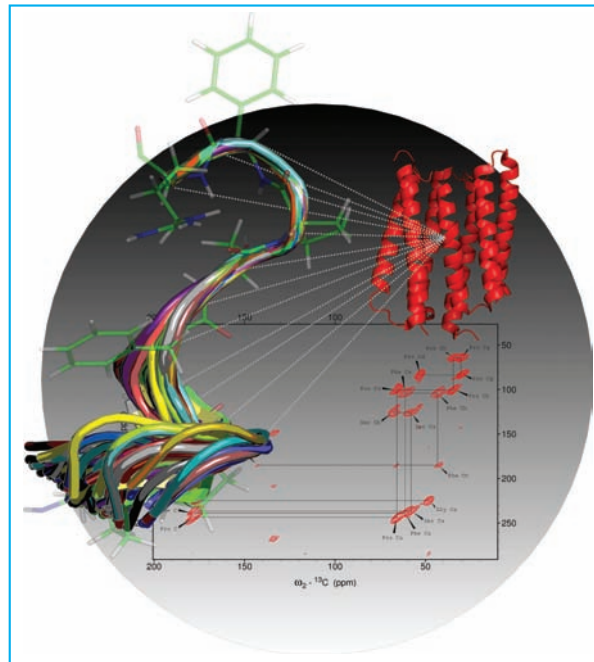


Fig. 2: Structure of the neuropeptide bradykinin in complex with the human bradykinin-2 receptor. It is assumed, that the receptor undergoes a number of conformational changes upon hormone binding prior G-protein activation. The structure was determined using solid-state NMR in collaboration with H. Michel, MPI Biophysik, Frankfurt (Lopez et al. 2008).

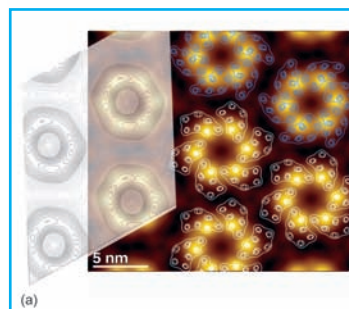
dem zunehmend zu beobachtenden signifikanten Anstieg der Antibiotikaresistenz nahezu aller pathogener Bakterienstämme. Die erstaunliche Fähigkeit dieser Transportsysteme eine Vielzahl sehr diverser Wirkstoffe spezifisch zu binden, scheint den verbreiteten Ansichten über Substrat-Protein-Wechselwirkung zu widersprechen. Interessanterweise findet man Multidrug-Transporter in evolutionär sehr unterschiedlichen Proteinfamilien: Transporter der ABC Familie gewinnen die Energie für den Substrat-Transport durch die Membran aus der ATP-Hydrolyse, während sekundäre Transporter einen gekoppelten Ionen-Transport (Antiport) benötigen. Als Modell für sekundäre Transporter verwenden wir Proteine der Small Multidrug Resistance (SMR) Familie. Wir konnten die Ausbildung eines Zwischenzustandes des Transportzyklus nachweisen (Basting et al. 2008) als auch essentielle Reste in der Bindungstasche charakterisieren (Lehner et al. 2008). Am ABC Transporter LmrA konnte ein Eindruck über die Dynamik der ATP-Bindedomänen gewonnen werden (Siarheyeva et al. 2007) als auch erstmals ATP-Hydrolyse mittels Festkörper-NMR in Echtzeit verfolgt werden (Hellmich et al. 2008).

PROTEORHODOPSIN (PR), eine lichtgetriebene Protonenpumpe, wurde in marinen Bakterien in den oberen Schichten der Weltmeere gefunden. Das von ihm erzeugte elektrochemische Potential könnte eine wichtige Energiequelle dieser Organismen darstellen. Es konnten bisher 900 Varianten von Proteorhodopsin identifiziert werden, die eine sehr große Sequenzähnlichkeit aufweisen, aber an ihre Um-

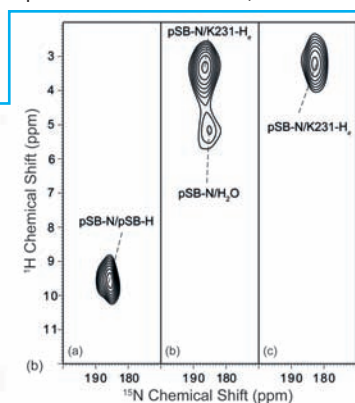
gebung unterschieden sind. Wir sind interessiert in key events und structural changes during the transport cycle, in characterising the properties of the drug binding pockets, and investigate the role of lipids and oligomerisation for protein activity. For SMR proteins, we were able to show the existence of an occluded transport cycle intermediate state (Basting et al. 2008). Essential residues in the binding pocket have been analysed by ssNMR (Lehner et al. 2008). For the ABC transporter LmrA, the molecular dynamics of the ATP bindings domains has been probed (Siarheyeva et al. 2007) and for the first time, ATP hydrolysis was directly observed by ssNMR in real time (Hellmich et al. 2008).

PROTEORHODOPSIN (PR), is a light-driven proton pump found in marine bacteria in the photic zone of the oceans. Its electrochemical gradient could provide an essential source of energy for these organisms. So far, 900 variants have been found, which show high sequence similarity but show colour tuning their environment. PR forms a ring shaped complex of 40 Å diameter (Shastri et al. 2009). Using solid-state NMR, we

Abb. 3: Proteorhodopsin ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe aus marinen Bakterien, die in der Membran einen ringförmigen, überwiegend hexameren Komplex bildet. In Zusammenarbeit mit W. Kühlbrandt, MPI Biophysik Frankfurt und D. Müller, TU Dresden, wurde das Protein mittels Kryo-EM als auch AFM in der Membran analysiert (Überlagerung in (a) gezeigt). Festkörper-NMR kam zum



Einsatz um das aktive Zentrum dieses Proteins zu analysieren. So konnte bspw. mittels ^{15}N - ^1H HETCOR Spektren gebundenes Wasser in der Nähe der protonierten Schiffchen Base nachgewiesen werden (b) (Pfleger et al. 2009).



extensively to probe the active site of PR. For example, using ^{15}N - ^1H HETCOR experiments, we were able to show bound water close to the protonated Schiff base (b) (Pfleger et al. 2009).

have been able to investigate the photoactive centre in great detail. We were able to show, that the

Fig. 3: Proteorhodopsin is a light driven proton pump found in marine bacteria. In the membrane, it forms a ring shaped, mainly hexameric complex. The protein has been analysed using cryo-EM and AFM in collaboration with W. Kühlbrandt, MPI Biophysik Frankfurt, and Daniel Müller, TU Dresden (overlay shown in (a)). Solid-state NMR has been used



gebung farblich angepasst sind. PR bildet ringförmige, überwiegend hexamere Komplexe mit 40 Å Durchmesser (Shastri et al. 2009). Mittels Festkörper-NMR waren wir bisher in der Lage, das aktive Zentrum aus Retinal und Schiff'scher Base zu untersuchen. Wir konnten feststellen, dass im Grundzustand das Retinal sich fast zu 100% in seiner all-trans Konfiguration befindet und dass die protonierte Schiff'sche Base in ein starkes Interaktionsnetzwerk mit gebundenem Wasser involviert sein muss (Pfleger et al. 2009) (Abb. 3).

chromophore retinal is almost 100% all-trans in their PR ground state and that the protonated Schiff base must be involved in a strong interaction network involving bound water (Pfleger et al. 2009, Fig.3).

LITERATUR / REFERENCES

- Lopez, J.J., Shukla, A.K., Reinhart, C., Schwalbe, H., Michel, H., **Glaubitz, C.** (2008) The structure of bradykinin bound to the human GPCR bradykinin-2 as determined by solid-state NMR. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 1668-1671.
- Basting, D., Lorch, M., Lehner, I., **Glaubitz, C.** (2008) Transport Cycle Intermediate in Small Multidrug Resistance Protein is revealed by Substrate Fluorescence. *FASEB J* 22, 365-373.
- Lehner, I., Basting, D., Meyer, B., Haase, W., Manolikas, T., Kaiser, C., Karas, M., **Glaubitz, C.** (2008) The key residue for substrate transport in the EmrE dimer is asymmetric. *J. Biol. Chem.* 283, 3281-3288.
- Siarheyeva, A., Lopez, J.J., Lehner, I., Hellmich, U.A., van Veen, H., **Glaubitz, C.** (2007) Probing the Molecular Dynamics of the ABC Multidrug Transporter LmrA by Deuterium Solid-State NMR. *Biochemistry* 46, 3075-83.
- Hellmich, U.A., Haase, W., Velamakanni, S., van Veen, H., **Glaubitz, C.** (2008) Caught in the Act: ATP hydrolysis of an ABC-Multidrug transporter followed by real-time Magic Angle Spinning NMR. *FEBS Letters* 582: 3557-62
- Shastri, S., Vonck, J., Haase, W., Pfleger, N., Kuehlbrandt, W., **Glaubitz, C.** (2007) Proteorhodopsin: Characterisation of 2D Crystals by Electron Microscopy and Solid-State NMR. *BBA Biomem.* 1768, 3012-3019
- Pfleger, N., Woerner, A.C., Yang, J., Shastri, S., Hellmich, U.A., Aslimovska, L., Maier, M.S.M., **Glaubitz, C.** (2009) Solid-state NMR and functional studies on proteorhodopsin. *BBA Bioenergetics*. In press.

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
 Institut für Biophysikalische Chemie
 Max-von-Laue-Str. 9
 D-60438 Frankfurt am Main

Tel: ++49 (0)69 798-29927
 Fax: ++49 (0)69 798-29929
 Email: glaubitz@em.uni-frankfurt.de
http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb14/BiochemieH/BPC/AK_Glaubitz/

