

**Structure determination of the active
center in the integral membrane protein
bacteriorhodopsin and development of
methods for calculating the effect of
pulsed field gradients on high-resolution
NMR spectra**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
an der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Bernd Simon
aus Kuchen
Februar 2000**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H.-H. Limbach**

Tag der Disputation: 10. März 2000

Table of contents

1	INTRODUCTION	3
1.1	Topics of this thesis	4
1.2	Nuclear magnetic resonance	6
1.3	NMR structure determination of proteins in solution	10
1.4	Bacteriorhodopsin	14
1.5	References	16
2	PULSED FIELD GRADIENTS IN HIGH RESOLUTION NMR	19
2.1	Pulsed field gradients in NMR	20
2.2	Theory	21
2.3	Pathway selection and artifact suppression	29
2.3.1	General remarks	29
2.3.2	The Design of Gradient Pulse Sequences	35
2.4	Diffusion in multi-pulse heteronuclear experiments	53
2.4.1	General expressions for the signal attenuation by rectangular and sine shaped gradients	53
2.4.2	Example: Attenuation during HMQC experiment	58
2.5	Discussion	63
2.6	References	66
3	NMR INVESTIGATIONS OF BACTERIORHODOPSIN	71
3.1	NMR strategies for structural investigation of membrane proteins	72
3.2	Labelling and assignment strategy used in this thesis	76
3.3	Practical aspects of NMR measurements and data processing	77
3.4	Proton assignments of bacteriorhodopsin	80
3.4.1	Retinal	80
3.4.2	Threonine and tryptophan assignments	83
3.4.3	Assignments based on published high resolution structures	86
3.5	Analysis of the chemical shifts	89
3.5.1	Introduction of the theoretical model	89
3.5.2	Comparison of the experimental chemical shifts with shift calculations based on a X-ray structure at 1.55 Å resolution	91
3.5.3	Chemical shifts as a tool to analyze the accuracy of a structure	96
3.6	Derivation of distance constraints	101

3.6.1	Determination of a distance constraint list from NOE volumes	101
3.6.2	Back-calculation of NOESY spectra	106
3.7	Bacteriorhodopsin structures	114
3.7.1	Structure calculation	114
3.7.2	Comparison of the solution structures of the all-trans, 15-anti and 13-cis, 15-syn forms of bacteriorhodopsin	122
3.7.3	Comparison of NMR and crystal structures	126
3.7.4	Reflection on the BC and DE loops as observed in the crystal structures on the basis of NMR evidence	131
3.8	Discussion	133
3.9	References	138
APPENDIX A		143
<i>¹H and ¹³C assignments for dodecyl-maltoside</i>		
APPENDIX B		149
<i>Concentration dependence of detergent chemical shifts and diffusion coefficients</i>		
APPENDIX C		155
<i>Size of the detergent and protein/detergent micelles</i>		
APPENDIX D		161
<i>Estimated proton relaxation times</i>		

Publications

- Kimmich, R., **Simon, B.** and Köstler, H. (1995) Magnetization-grid rotating-frame imaging technique for diffusion and flow measurements. *J. Magn. Reson. A*, **112**, 7.
- Simon, B.**, Kimmich, R. and Köstler, H. (1996) Rotating-frame-imaging technique for spatially resolved diffusion and flow studies in the fringe field of rf probe coils. *J. Magn. Reson. A*, **118**, 78-83.
- Patzelt, H., Ulrich, A. S., Egbringhoff, H., Dux, P. Ashurst, J., **Simon, B.**, Oschkinat, H. and Oesterhelt, D. (1997) Towards structural investigations on isotope labelled native bacteriorhodopsin in detergent micelles by solution-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, **10**, 95-106.
- Gryk, M.R., Abseher, R., **Simon, B.**, Nilges, M. and Oschkinat, H. (1998) Heteronuclear relaxation study of the PH domain of β -spectrin: Restriction of loop motions upon binding inositol trisphosphate. *J. Mol. Biol.*, **280**, 879-896.
- Thomas, D.J., Mitschang, L., **Simon, B.** and Oschkinat, H. (1999) Signal Selection in High-Resolution NMR by Pulsed Field Gradients: II. The Design of Gradient Pulse Sequences. *J. Magn. Reson.*, **137**, 10-24.

Oral presentations

- Simon, B.**, Patzelt, H., terLaak, A., Krause, G., Schmieder P., Oesterhelt, and D. Oschkinat, H. (1997) The chromophore structure of dark-adapted bacteriorhodopsin solubilized in detergent micelles determined by solution NMR spectroscopy. **Joint 29th AMPERE – 13th ISMAR** international conference on magnetic resonance and related phenomena. Technische Universität Berlin, August 2-7, 1998, p. 109.
- Simon, B.**, Patzelt, H., terLaak, A., Kessler, B., Krause, G., Kühne, R., Schmieder P., Oesterhelt, D. and Oschkinat, H. (1997) The structures of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. **Keystone Symposium** on frontiers of NMR in molecular biology VI, Workshop I: Isotopes. Breckenridge, Colorado, January 9-15, 1999, p. 56.

Abstract

The development and application of high-resolution NMR methods for protein structure determination was the topic of the present thesis. Methods for calculating sequences of pulsed field gradients for signal selection as well as the influence of diffusion on the signal amplitudes were discussed in the first part, while the second part dealt with the structure determination of the retinal environment of the integral membrane protein bacteriorhodopsin based on a novel labelling strategy.

Pulsed field gradients are an important tool for signal selection and artifact suppression in modern high-resolution NMR. As part of the present work, the computer programs TRIPLE GRADIENT and Z GRADIENT for the calculation of optimized sequences of pulsed field gradients for arbitrary experiments were developed and tested. Signal selection under consideration of rf-pulse imperfections was exemplified for the HSQC experiment. The formalism on which the programs are based was extended to include stochastic as well as deterministic translational motion of the molecules. As a quantitative example, the influence of diffusion on the HQQC experiment was discussed. It was shown that the diffusion coefficient of ethanol can be reproduced correctly from an analysis of the line-widths in the indirect dimension.

The integral membrane protein bacteriorhodopsin was solubilized in dodecyl-maltoside micelles. Completely deuterated samples with selectively protonated moieties of the protein detergent complex with a molecular weight of more than 60 kDa were used to record ^1H NOESY spectra and to obtain sequence specific resonance assignments. Structures of both forms of the dark-adapted protein were determined from distances between protons in the retinal binding pocket. The theoretical analysis of the chemical shifts as well as a comparison of the all-trans/15-anti NMR structure to crystal structures shows the high accuracy of this method to obtain NMR structures.

The high resolution structure of the 13-cis/15-syn form, now obtained for the first time, was able to reveal a shorter distance between the protonated Schiff-base and its complex counterion than found in the all-trans/15-anti form. The relative position of the retinal carbon atoms to the neighboring tryptophan side-chains is almost identical to that of an early intermediate of the photocycle, in which the retinal is in 13-cis/15-anti conformation.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Anwendung und Weiterentwicklung von hochauflösenden NMR Methoden zur Proteinstrukturbestimmung. Im ersten Teil wurden Methoden zur Berechnung von Sequenzen gepulster Feldgradienten für die Signalselektion, sowie der Einfluß der Diffusion auf die Signalamplituden diskutiert, im zweiten die Strukturbestimmung der Retinalumgebung des integralen Membranproteins Bakteriorhodopsin auf der Basis einer neuen Markierungsstrategie.

Gepulste Feldgradienten sind als Mittel zur Signalselektion und Artefaktunterdrückung aus der modernen hochauflösenden NMR Spektroskopie nicht mehr wegzudenken. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Computerprogramme TRIPLE GRADIENT und Z GRADIENT zur Berechnung von optimierten Sequenzen gepulster Feldgradienten für beliebige Experimente entwickelt und erprobt. Signalselektion auch unter Berücksichtigung imperfekter RF-Pulse wurde exemplarisch am HSQC Experiment gezeigt. Der den Programmen zugrunde liegende theoretische Formalismus wurde erweitert, um erstmals sowohl stochastische als auch deterministische translatorische Bewegungen der Teilchen zu berücksichtigen. Als quantitatives Beispiel wurde der Einfluss freier Diffusion der Moleküle im HQQC Experiment diskutiert. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß die Diffusionskonstante von Ethanol korrekt aus der Analyse der Linienbreiten in der indirekten Dimension bestimmt werden kann.

Das integrale Membranprotein Bakteriorhodopsin wurde in Dodecylmaltosid Mizellen solubilisiert. An vollständig deuterierten Proben mit einzelnen protonierten Resten des Protein-Detergenz-Komplex mit einem Molekulgewicht von mehr als 60 kDa wurden ^1H NOESY Spektren aufgenommen und sequenzspezifische Signalzuordnungen erzielt. Strukturen beider Formen des Proteins im dunkel-adaptierten Grundzustand wurden mit Hilfe von Abständen zwischen Protonen in der Retinalbindungstasche bestimmt. Die theoretische Analyse der chemischen Verschiebungen und der Vergleich der all-trans/15-anti NMR Struktur mit Kristallstrukturen belegte die hohe Genauigkeit dieser Methode der NMR Strukturbestimmung.

In der erstmals bestimmten 13-cis/15-syn Struktur ist der Abstand zwischen protonierter Schiff'scher Base und ihrem komplexen Gegenion kürzer im Vergleich zur all-trans/15-anti Struktur. Die relative Position der Retinalkohlenstoffe zu benachbarten Tryptophanseitenketten ist fast identisch mit der Kristallstruktur eines frühen Intermediaten des Photozyklus, bei der das Retinal in 13-cis/15-anti Konfiguration vorliegt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Oschkinat danke ich für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten, die sehr interessante Themenstellung, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und die stetige Unterstützung in allen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. H.-H. Limbach danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt und seiner Gruppe am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, insbesondere Brigitte Kessler, Dr. Heiko Patzelt und Michael Kolbe, danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die Präparation vieler Proben und die vielen sehr anregenden Diskussionen über Bakteriorhodopsin.

Allen Mitgliedern der NMR Arbeitsgruppen von Prof. Hartmut Oschkinat, Dr. Analisa Pastore und Dr. Michael Sattler am EMBL in Heidelberg und der Arbeitsgruppe von Prof. Hartmut Oschkinat am FMP in Berlin danke ich für ihre Unterstützung und das sehr freundschaftliche Verhältnis.

Dr. Lorenz Mitschang gilt mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit bei der Anwendung der gepulsten Feldgradienten, sowie für die vielen Diskussionen über die physikalischen Grundlagen der Kernresonanz.

Dr. David Thomas danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Computerprogramme TRIPLE GRADIENT und Z GRADIENT.

Dr. Michael Gryk und Dr. Roger Abseher danke ich für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur Dynamik der PH Domäne, Dr. Gryk insbesondere auch für das Auffinden immer neuer Artefakte in den Spektren.

Dr. Ton ter Laak, Dr. Ronald Kühne und Dr. Gert Krause danke ich für die Zusammenarbeit bei den Strukturrechnungen von Bakteriorhodopsin.

Dr. Peter Schmieder danke ich das Ansetzen von NOESY Spektren und für die hervorragende Unterstützung bei allen praktischen Problemen am Spektrometer.

Dr. Maria Macias danke ich für ein stets offenes Ohr während der häufig frustrierenden Phase der Zuordnung der Bakteriorhodopsinsignale.

Dr. Michael Nilges danke ich für die Beantwortung vieler Detailfragen zu Proteinstrukturrechnungen und dem Computerprogramm XPLORE.

David Grindrod danke ich für die Hilfe bei allen Computerfragen.

Pamela Detrois und Dr. Lorenz Mitschang danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Jutta Pauli und Dr. Mark Kelly danke ich für Ihre Gastfreundschaft.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung.

Meiner Frau Pam und meiner Tochter Kira danke ich für ihre Liebe und ihre Geduld.