

Diss. ETH No. 15091

Variable-Angle Spinning NMR techniques for the study of lipid bilayers and bilayer- associated peptides

DISSERTATION
submitted to the
EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Giorgia Zandomeneghi

Dottore in Chimica
born February 7, 1972
citizen of Italy

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Beat. H. Meier, examiner
Prof. Dr. Konstantin Pervushin, co-examiner

Zürich, 2003

Abstract

In this thesis novel NMR techniques for the study of phospholipid bilayers and bilayer-bound peptides in magnetically oriented media (bicelles) are presented. Bicelles are model membranes composed of a mixture of long- and short-chain phospholipids in water. Bicelles can form nematic liquid-crystalline phases, which in presence of a magnetic field, align with the liquid-crystalline director perpendicular to the magnetic field. In this phase the phospholipids are assumed to form bilayered disks with a planar bilayer of long-chain lipids surrounded by a rim of shorter-chain.

Bicelles offer distinct advantages over the commonly used multilamellar liposomes as model of phospholipid membranes in the NMR study of membrane-associated proteins. Oriented phospholipid bilayers, like bicelles, often result in NMR spectra characterized by higher resolution and signal-to-noise ratio than the spectra obtained in multilamellar liposomes. In fact, if the molecular rotation within the bilayer is rapid or the liquid-crystalline director is aligned with the magnetic field direction, the resulting spectra are well resolved with a single resonance line per site. At the same time, these spectra are rich with structural information because the resonance frequency encodes the isotropic and anisotropic spin interactions.

In the first part of this thesis I will show that bicelles can be oriented with the director at an arbitrary angle to the applied magnetic field, including the parallel orientation, by sample rotation around one axis (variable-angle sample spinning) or around two axes successively (switched-angle spinning). The possibility of controlling the orientation of the bilayers and, therefore, to manipulate the contribution of the spin anisotropic interactions, provides an additional experimental parameter and opens novel possibilities for NMR studies of bicelles and proteins reconstituted into bicelles. In particular, it can be used to disentangle the anisotropic and isotropic contributions to the resonance position, as discussed below.

The second part of the thesis presents some applications of sample-spinning methods for the study of biomolecules reconstituted into bicelles. In particular, we investigated two membrane peptides, which correspond to the different kind of interactions between lipids and membrane proteins present in nature: an integral protein (the transmembrane domain M4 of the γ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor) and a peripheral protein (the opioid peptide leucine enkephalin, Lenk). The spectra of the transmembrane domain M4, labelled with NMR sensitive isotopes and reconstituted into bicelles, are recorded under static and magic-angle spinning conditions. The isotropic chemical shieldings and the chemical-shielding anisotropies of the labelled residues can be measured and information about the dynamics and the secondary structure of the M4 within the bilayer is provided. Furthermore, the orientation of the peptide with respect to the lipid bilayer can be determined. Lenk is a water-soluble pentapeptide which associates with the membrane surface. The conformation of bicelle-associated Lenk has been studied applying NMR multidimensional experiments to isotropic bicelle/Lenk systems. Isotropic bicelles are small bicelles which tumble fast and isotropically and provide isotropic NMR signals.

The spectral resolution for a peptide associated to oriented bicelles under static conditions is often limited due to a large number of anisotropic spin interactions. This is particularly true for the proton spectra where the resonances are relatively broad, mainly as a consequence of the strong proton-proton dipolar couplings. The spectral resolution is greatly improved by magic-angle spinning. The high-resolution spectrum under magic-angle spinning can be correlated with its anisotropic spectrum in two-dimensional switched-angle spinning NMR spectra. The anisotropic spectrum is obtained spinning the bicelle sample around an axis parallel to the magnetic field and is identical to the static spectrum. The two-dimensional spectrum allows the exploitation of the high resolution of the isotropic spectrum, while retaining the structural information imparted by the anisotropic interactions in the static spectrum. Furthermore, switched-angle spinning techniques are presented that allow one to record the spectrum of ordered bicellar phases as a function of the angle between the rotor axis and the magnetic field direction, thereby scaling the dipolar interactions by a predefined factor. In a model study, the switched-angle spinning experiments described above are applied to the proton NMR study of Lenk associated to oriented bicelles.

Riassunto

In questa tesi sono presentate nuove tecniche per lo studio NMR di doppi-strati fosfolipidici e dei peptidi legati ad essi, in sistemi uniassialmente orientati detti bicelle. Le bicelle sono delle membrane-modello costituite da una miscela in acqua di due fosfolipidi, che sono identici se non per la lunghezza della catena acilica. Le bicelle possono formare fasi nematiche liquido-cristalline che, in presenza di un campo magnetico, si orientano con il direttore disposto perpendicolarmente al campo magnetico. Si ritiene che in questa fase i lipidi formino dei dischi costituiti da un piano di doppio strato al centro (formato dal fosfolipide a catena lunga) e da un bordo (formato dal fosfolipide a catena corta).

Le bicelle sono state introdotte per semplificare lo studio NMR delle proteine associate alle membrane. Infatti, i liposomi multilamellari, che sono gli aggregati lipidici generalmente usati come modello di membrana cellulare, originano spettri NMR spesso caratterizzati da bassa risoluzione e da un modesto rapporto segnale-rumore. I sistemi di lipidi macroscopicamente orientati con il direttore allineato con il campo magnetico o con altra orientazione ma caratterizzati da una dinamica veloce nel piano del doppio strato, producono invece spettri NMR ben risolti, con una sola risonanza per sito molecolare. Allo stesso tempo, questi spettri sono ricchi di informazione strutturale dal momento che la frequenza di risonanza dipende sia dalle interazioni NMR isotrope che da quelle anisotrope.

Nella prima parte della tesi dimostro che le bicelle possono essere orientate con il direttore inclinato di un angolo arbitrario rispetto al campo magnetico (e quindi anche allineato con il campo), mediante la rotazione del campione attorno ad un asse ("variable-angle sample spinning") o attorno a due assi successivamente ("switched-angle spinning"). La possibilità di controllare l' orientazione delle bicelle e, di conseguenza, il contributo delle interazioni di spin anisotrope, fornisce un parametro

sperimentale in più e rende possibile la realizzazione di esperimenti innovativi per lo studio NMR di bicelle e di proteine ricostituite in bicelle. In particolare, il controllo della orientazione delle bicelle può essere utilizzato per separare il contributo delle interazioni NMR isotrope alla frequenza di risonanza da quello delle interazioni anisotrope.

La seconda parte della tesi presenta alcune applicazioni dei metodi precedentemente proposti basati sulla rotazione di bicelle contenenti peptidi. In particolare, vengono studiati due peptidi che esemplificano i diversi tipi di interazioni peptide-membrana presenti in natura: un peptide transmembrana (il dominio transmembrana M4 dalla subunità γ del recettore dell' acetilcolina nicotinic) e un peptide periferico (il peptide opioide leucine enkephalin, Lenk). Gli spettri del dominio transmembrana M4 sintetizzato con isotopi attivi all' NMR e ricostituito in bicelle sono stati registrati in condizioni statiche e di rotazione all' angolo magico ("magic-angle spinning"). Il chemical shielding isotropo e l' anisotropia di chemical-shielding dei residui con isotopi NMR-attivi sono stati misurati, ottenendo così informazioni sui processi dinamici e sulla struttura secondaria del dominio M4. E' stato inoltre possibile determinare l' orientazione del peptide rispetto alla membrana. Il Lenk è un pentapeptide solubile in acqua che si associa alla superficie della membrana. La struttura del Lenk associato alla bicelle è stata studiata in un campione di bicelle isotrope mediante esperimenti multidimensionali. Le bicelle isotrope sono bicelle di dimensioni ridotte che si muovono velocemente e isotropicamente, dando così origine a segnali NMR isotropi.

La risoluzione spettrale per un peptide associato a bicelle in un campione statico può essere limitata per effetto delle interazioni NMR anisotrope. Questo è particolarmente vero nel caso degli spettri al protone dove le risonanze sono piuttosto larghe, soprattutto a causa di forti accoppiamenti dipolari protone-protone. La risoluzione spettrale è migliorata considerevolmente mediante "magic-angle spinning". Lo spettro ad alta risoluzione del peptide associato alle bicelle in condizioni di "magic-angle spinning" può essere correlato con lo spettro anisotropo corrispondente in esperimenti bidimensionali basati sul cambiamento repentino della orientazione dell' asse di rotazione ("switched-angle spinning"). Lo spettro anisotropo è ottenuto ruotando il campione attorno ad un asse parallelo al campo magnetico e

risulta essere identico allo spettro statico. Lo spettro bidimensionale basato sullo "switched-angle spinning" permette lo sfruttamento dell' alta risoluzione dello spettro isotropo conservando allo stesso tempo l' informazione strutturale dovuta alle interazioni anisotrope presenti nello spettro statico. In aggiunta, si dimostra che le tecniche di "switched-angle spinning" permettono di registrare spettri al protone di sistemi di bicelle ben allineati in funzione dell' angolo tra l' asse di rotazione e la direzione del campo magnetico, scalando in questo modo le interazioni di dipolo di un fattore predefinito. In uno studio modello presentato nell' ultima parte di questa tesi gli esperimenti di "switched-angle spinning" sopra descritti sono applicati allo studio NMR al protone del Lenk associato a bicelle.