

Diss. ETH No. 16803

Exploring Structural Plasticity in Membrane Proteins

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Simon Alioth

Dipl. Natw. ETH

born on December 10, 1977
citizen of Arlesheim and Basel

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Konstantin Pervushin, examiner
Prof. Dr. Donald Hilvert, co-examiner

September 2006

Zusammenfassung

In meiner Dissertation "exploring structural plasticity in membrane proteins" stelle ich flüssig NMR Studien mit drei verschiedenen Membranproteinen vor. Zwei Gesichtspunkten der strukturellen Plastizität sind betrachtet, namentlich die Toleranz der tertiär Struktur für die Einfügung und Entfernung von Aminosäuren oder sogar langen Aminosäurewindungen ("loops"), und die interne Dynamik von Proteinen verursacht durch die physikalische Bewegung von Atomen oder ganzen Atomgruppen.

Die strukturelle Plastizität der tertiären Struktur bei der Einfügung und Entfernung von Aminosäuren wurde an einem künstlich entwickeltem beta-barrel Membranprotein untersucht. Alle Aminosäurewindungen vom "outer membrane protein A" (OmpA) von *E. coli* wurden gekürzt um eine minimale beta-barrel Plattform (BBP) zu gewinnen, welche aus dem transmembranen Teil von OmpA besteht verbunden durch kurze Aminosäure-Sequenzen. Die tertiäre Struktur dieses neuen Proteins wurde mit flüssig NMR aufgeklärt um die strukturelle Konsequenz von Einfügung und Entfernung von Aminosäuren zu erforschen. BBP wurde zusätzlich verwendet für die Entwicklung eines beta-barrel Proteins, welches in der Lage ist, Metalionen zu binden. Dies wurde erreicht durch die Einführung eines "EF-hand" Ca^{2+} -Bindungselements. Diese Metalbindungsstelle wurde verwendet um das Protein, durch die Titration mit paramagnetischen Ionen, im magnetischen Feld schwach auszurichten. Dies ermöglicht die Detektion von "residual dipolar couplings". Schlussendlich wurde BBP verwendet, um die interne Dynamik von beta-barrel Membranproteinen genauer zu untersuchen.

Die interne Dynamik von Membranproteinen wurde zusätzlich im Detail untersucht an dem alpha-helikalen in der Membrane verankertem Enzym Alkanhydroxylase (AlkB) von *Pseudomonas oleovorans* und der cytoplasmatischen Domäne des ClC-0 Chloridkanals von *Torpedo marmorata*.

AlkB ist eine nicht-Häm Monooxygenase, welche in der aktiven Tasche zwei Eisenatome an Histidinreste koordiniert. Ermöglicht durch eine neue Expressions-, Markierungs- und Reinigungsmethode werden die ersten flüssig NMR Resultate von diesem 46 kDa alpha-helikalen Membranprotein vorgestellt. Zusätzlich wurde die strukturelle Plastizität in Abhängigkeit des Redox-Zustands von Eisen mit NMR und EPR Spektroskopie untersucht.

Mit Röntgen-Kristallographie wurde entdeckt, dass die cytoplasmatischen Domäne des ClC-0 Chloridkanals zwei lange intrinsisch unstrukturierte Elemente in der Struktur enthält. Die meisten Aminosäuren von diesen flexiblen Teilen konnten Resonanzen in den flüssig NMR Spektren zugeordnet werden. Auf der Basis von ^{15}N -Relaxation wurde die interne Dynamik des Proteins im Detail untersucht. Die Resultate von dynamischen Messungen und "residual dipolar couplings" deuten darauf hin, dass es Neigungen zur Strukturbildung in diesen sonst unstrukturierten Proteinfragmenten gibt. Die Entdeckung von verbleibenden strukturellen Elementen in der cytoplasmatischen Domäne des ClC-0 Chloridkanals ist ein grosser Fortschritt im Verständnis der Funktion von dieser Proteindomäne.

Summary

In my thesis "exploring structural plasticity in membrane proteins" I present solution NMR studies of three different membrane proteins. Structural plasticity is explored from two different aspects, namely, the tolerance of tertiary structures to insertion or deletion of amino acids or even long loops and internal dynamics of proteins caused by physical movement of atoms or groups of atoms.

The tolerance of tertiary structure to insertions and deletions of amino acids was studied using an artificially engineered beta-barrel membrane protein. All loops from the outer membrane protein A (OmpA) from *E. coli* were truncated to obtain a minimal beta-barrel platform (BBP) consisting of the transmembrane part of OmpA with short connecting turns. BBP was used to engineer a beta-barrel protein with the ability to bind metal ions by inserting an EF-hand Ca^{2+} -binding loop. The tertiary structure of this new membrane protein was elucidated by solution NMR spectroscopy to study structural consequences of deletion and insertions of loops. The metal binding loop was used to weakly align the protein in the magnetic field by titrating the protein with paramagnetic ions, which opened a possibility for detection of residual dipolar couplings. Finally, BBP was used to investigate internal dynamics of beta-barrel membrane proteins.

Internal dynamics of membrane proteins are additionally studied in detail with the alpha helical membrane embedded enzyme alkane hydroxylase (AlkB) from *Pseudomonas oleovorans* and the cytoplasmatic domain of the ClC-0 chloride channel from *Torpedo marmorata*.

AlkB is a non-heme monooxygenase containing two iron atoms coordinated to histidine residues in the active site. The first solution NMR spectroscopy results from this 46 kDa alpha helical integral membrane protein solubilized in detergent micelles are presented, enabled by a new expression, labeling and purification

SUMMARY

method. In addition, structural plasticity depending on the redox state of the diiron cluster was investigated by NMR and EPR spectroscopy.

The cytoplasmatic domain of the ClC-0 chloride channel contains two long intrinsically disordered elements in the structure, as established by X-ray crystallography. Most of the amino acids in the flexible part of the protein could be assigned to resonances in the solution NMR spectra. On the basis of ^{15}N -relaxation data the internal dynamics of the protein were studied in detail. Results from dynamics and residual dipolar couplings indicated the presence of structural propensities in this otherwise disordered protein fragments. The discovery of residual structure in the cytoplasmatic domain of ClC-0 domain is a major step forward in understanding the function of this protein.