



Doctoral Thesis

## Preparation and characterization of membrane proteins and challenging oligomeric proteins for solution NMR spectroscopy

**Author(s):**

Hu, Kaifeng

**Publication Date:**

2004

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004844309> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss.ETH Nr. 15726

**Preparation and characterization of membrane  
proteins and challenging oligomeric proteins for  
solution NMR spectroscopy**

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

Presented by

**Kaifeng Hu**

Master of Science

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences

Born on Feb. 19, 1974

Citizen of China

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Konstantin Pervushin, examiner  
PD. Dr. Oliver Zerbe, co-examiner

2004

## Summary

The aim of my thesis is to develop methodological aspects of NMR structure/dynamics investigations of proteins considered to be difficult from the vista of conventional NMR. This includes membrane proteins reconstituted into micelles of detergents or highly dynamical and extended (non-compact) soluble proteins with low density or absence of long range structural constraints based on NOEs. The methodological aspects discussed in the thesis include choice of the isotope-labeling pattern, sample preparation and conditions for NMR studies, adopting both previously developed strategies as well as developing new ones for assignment of backbone resonances, and analysis of dynamical properties and function of the selected target proteins. The presented results should serve as a basis for more detailed structural studies of these biologically important systems.

Membrane proteins take part in a large number of important physiological functions. As an example of a membrane protein suitable for NMR studies, we selected outer membrane protein A (OmpA), which is an abundant structural protein of the outer membrane of Gram-negative bacteria. The N-terminal domain of the OmpA protein from *Escherichia coli*, consisting of residues 1-172, forms an antiparallel  $\beta$ -barrel whose eight transmembrane  $\beta$ -strands are connected by three short periplasmic turns and four relatively large surface-exposed hydrophilic loops. In NMR studies of OmpA, we were concerned with a structural role of the surface-exposed loops of OmpA. An OmpA deletion variant with all four loops shortened, which we called  $\beta$ -barrel platform (BBP) of OmpA, consists of only 142 amino acid residues and constitutes the smallest  $\beta$ -structured integral membrane protein known to date. Fractional factorial refolding screens were used to identify refolding conditions for BBP. The shortened protein was successfully refolded and properly labeled for NMR structure determination. An analysis of NMR spectra shows that this artificially designed outer membrane protein refolds into a  $\beta$ -barrel structure, which is similar to the transmembrane domain of the wild type of OmpA. This implies that the absence of the extracellular loops does not affect the structure of the transmembrane domain. BBP therefore can serve as a good starting point for the development of integral membrane proteins with novel engineered functions.

FkpA is a heat shock periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) with chaperone activity. The chaperone activity of FkpA is independent of its PPIase activity. The mature dimeric FkpA protein has 245 amino acid residues per monomer. Both chain termini are not well

structured and were therefore removed in the reconstructed gene and the expressed protein prepared for structure studies is denoted “shortened FkpA” (sFkpA). Both FkpA and sFkpA with C-terminal His<sub>6</sub>-tag were overexpressed with suitable <sup>2</sup>H/<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C- labels and purified for solution NMR studies. Backbone resonances of 94% of the residues of FkpA were assigned and secondary structure elements were established using the CSI analysis. Primary dynamical properties of FkpA were investigated by NMR relaxation experiments, suggesting that the dimeric FkpA protein could be divided into three relatively rigid subunits moving relative to each other. Residual dipolar couplings (RDC) were used to compare the global NMR structure of FkpA in solution with the corresponding crystal structure. Experimental RDC showed significant mobility of two FKBP domains relative to the dimerization domain. These dynamic properties of the protein might play an important role in the chaperone activity of FkpA, where binding to different substrates potentially requires some structural adaptations of the chaperone. Protein substrates were then used to identify where the chaperone function resides in the dimeric molecule. Results indicated that five residues, which are distributed between the long  $\alpha$  helices and the FKBP domains, could play an important role in polypeptide binding. A model, the so-called “mother’s arms” model, is then proposed to illustrate the mechanism of the chaperone function of FkpA. In this model, FkpA “catches” the polypeptide or small protein (“baby protein”) substrates with its polypeptide binding sites (like “hands”), and then holds the substrates through its structural adaptations, i.e. bending of its two long helical “arms”, which is like a mother’s arms hugging her baby.

In NMR methodological aspects, the 3D TROSY-HN(CA)HA and 4D TROSY-HACANH experiments were proposed for backbone resonance assignment and a new <sup>13</sup>C-detected 3D HCC-TOCSY is described which serves as an attractive experiment for simultaneous and unambiguous assignment of the side-chain H and C resonances in partially deuterated proteins of large size. In 3D TROSY-HN(CA)HA and 4D TROSY-HACANH, the combined application of 1H-13C multiple-quantum and the 1H-15N TROSY effect is proposed to enhance sensitivity. The <sup>13</sup>C-detected 3D HCC-TOCSY expected to be suitable for assignment of the side-chain methyl <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H chemical shifts, containing important information for structure determination, of methyl protonated, highly deuterated and <sup>13</sup>C-labeled proteins with high molecular weight.

## Zusammenfassung

Das Ziel meiner Doktorarbeit ist es, neue Methoden für die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie von Struktur und Dynamik von Proteinen zu entwickeln, welche vom Standpunkt der konventionellen NMR-Spektroskopie als schwierig angesehen werden. Dies schliesst in Mizellen rekonstituierte Membranproteine oder auch höchst dynamische und lösliche Proteine mit grosser Ausdehnung und geringer Dichte oder fehlenden weitreichenden strukturellen Informationen durch NOEs mit ein. Die in dieser Arbeit behandelten Aspekte sind die Wahl einer geeigneten Isotopenmarkierung, Herstellung einer Probe, Anpassung von schon bestehenden und Entwicklung neuer Strategien für die Resonanzzuordnung und die Analyse von dynamischen und funktionellen Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins. Die präsentierten Resultate sollten als Grundlage für detailliertere Untersuchungen über die Struktur und Dynamik von diesen biologisch wichtigen Systemen dienen.

Membranproteine erfüllen eine grosse Anzahl physiologisch wichtiger Aufgaben. Ein Beispiel eines Membranproteins, welches geeignet ist für die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie, ist OmpA, welches in der äusseren Membran von gram-negativen Bakterien in grosser Anzahl zu finden ist. Die N-terminale Domäne von OmpA von *Escherichia coli*, welche die Aminosäuren 1-172 umfasst, bildet ein antiparalleles  $\beta$ -Barrel, dessen acht transmembranäre  $\beta$ -Stränge durch drei kurze periplasmatische und vier relativ lange oberflächen-exponierte hydrophile Loops verbunden sind. Wir wollten den Einfluss der oberflächen-exponierten Loops auf die gesamte Struktur des Proteins mittels NMR-Spektroskopie untersuchen. Eine OmpA Deletions-Variante, in welcher alle vier Loops auf eine minimal nötige Länge gekürzt sind und von uns  $\beta$ -Barrel Plattform (BBP) benannt wurde, besteht aus nur 142 Aminosäuren und ist das kleinste bekannte  $\beta$ -strukturierte integrale Membranprotein. Um die idealen Rückfaltungsbedingungen für die BBP zu erreichen, wurde eine grosse Anzahl verschiedener Bedingungen in einem „fractional factorial screen“ getestet. Zu diesem Zeitpunkt kann BBP erfolgreich rückgefaltet und isotopenmarkiert werden und ist damit für NMR-spektroskopische Untersuchungen zugänglich. Ein Vergleich der NMR-Spektren von BBP und dem Wildtyp OmpA, zeigt dass beide Proteine ähnlich gefaltet sind. Dies führt zu der Annahme, dass die Abwesenheit der extrazellulären Loops keinen Einfluss auf die Struktur der Transmembrandomäne hat.

FkpA ist eine periplasmatische Hitzeschock peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase (PPIase) mit Chaperone-Aktivität, welche unabhängig von der PPIase Aktivität ist. FkpA liegt als ein

Homodimer bestehend aus zweimal 245 Aminosäuren vor. Da die beiden Termini keine feste Struktur aufweisen, wurden sie entfernt und das daraus entstandene Protein wurde sFkpA (für „shortened FkpA“) genannt. Beide Varianten wurden mit einer C-terminalen His<sub>6</sub>-Extension und geeigneter Isotopenmarkierung überexprimiert und für NMR-spektroskopische Untersuchungen aufbereitet. Rückgratresonanzen von 94% der Aminosäuren von FkpA konnten zugeordnet werden und die Sekundärstruktur wurde mittels CSI Analyse vorausgesagt. NMR-spektroskopische Relaxationsexperimente weisen darauf hin, dass das FkpA Dimer aufgrund dynamischer Eigenschaften in drei Domänen unterteilt werden kann. Um die Struktur von FkpA in Lösung mit der Kristallstruktur zu vergleichen wurden dipolare Kopplungen verwendet, welche signifikante Mobilität von zwei FKBP Domänen relativ zur Dimerisierungsdomäne aufzeigen. Diese dynamischen Eigenschaften des Proteins könnten bei der Chaperone-Aktivität von FkpA, wo die Bindung an verschiedene Substrate strukturelle Adaptation nötig macht, eine wichtige Rolle spielen. Die Chaperone-Aktivität innerhalb des Dimers wurde mittels Titration mit verschiedenen Substraten in den langen  $\alpha$ -Helices und FKBP Domänen lokalisiert. Das sogenannte „mother’s arms“ Modell, in welchem FkpA ein Polypeptid oder ein kleines Protein („Baby-Protein“) mit den Bindungsstellen (den „Händen“) hält und dieses durch strukturelle Veränderungen in den zwei langen helikalen „Armen“ umschließt, wurde aufgrund dieser Resultate vorgeschlagen.

In Bezug auf NMR-spektroskopische Methoden, wurden 3D TROSY-HN(CA)HA und 4D TROSY-HACANH Experimente zur Zuordnung von Rückgratresonanzen und ein neues <sup>13</sup>C-detektiertes 3D HCC-TOCSY Experiment als attraktive Alternative zur simultanen und eindeutigen Resonanzzuordnung für <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C in Seitenketten von partiell deuterierten, grösseren Proteinen entwickelt. Es wird vorgeschlagen, durch kombinierte Anwendung des <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C „multiple-quantum“ und des <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY Effekts in den 3D TROSY-HN(CA)HA und 4D TROSY-HACANH Experimenten die Sensitivität zu erhöhen. Es kann vorausgesagt werden, dass das <sup>13</sup>C-detektierte 3D HCC-TOCSY Experiment sehr hilfreich sein wird bei der Resonanzzuordnung von <sup>13</sup>C und <sup>1</sup>H chemischen Verschiebungen in Methylgruppen von Aminosäureseitenketten. Diese chemischen Verschiebungen enthalten für die Strukturbestimmung wichtige Informationen in methyl-protonierten, komplett deuterierten und in <sup>13</sup>C-markierten Proteinen mit hohem Molekulargewicht.