



Doctoral Thesis

Characterization of molecular interactions that switch the functional state of native G-proteins coupled receptors (GPCRS)

Author(s):

Kawamura, Shiho

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007617910> →

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 NO. 20535

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR INTERACTIONS
THAT SWITCH THE FUNCTIONAL STATE OF NATIVE G-
PROTEIN COUPLED RECEPTORS (GPCRS)

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

SHIHO KAWAMURA

Master of Science, San Francisco State University

24th August, 1981

citizen of Japan

accepted on the recommendation of

Prof. Daniel J. Müller, Ph.D.
Prof. Niko Beerenwinkel, Ph.D.
Prof. Andreas Engel, Ph.D.

2012

Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind die größte Gruppe von Membranproteinen menschlicher Zellen. GPCRs sind aus pharmakologischer Hinsicht besonders interessant, da ein großer Teil der heutzutage verfügbaren Medikamente an diese Rezeptoren bindet. Rhodopsin ist ein häufig verwendetes Modellsystem in der GPCR-Forschung. Dieser Rezeptor besteht aus dem Apoprotein Opsin und seinem Liganden Retinal. In meiner Dissertation wurden molekulare Interaktionen im Rhodopsin-Molekül in seiner nativen Membranumgebung, den sogenannten „Discs“, mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Dieser Ansatz ermöglicht, Interaktionen und Stabilität des Rhodopsin-Moleküls zu untersuchen ohne die Integrität des Rezeptors, wie beispielsweise bei NMR oder Röntgenkristallstrukturanalyse zu zerstören.

Mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie (SMFS) und dynamischer Kraftspektroskopie (DFS) wurden Position und Stärke der molekularen Interaktionen, welche den funktionellen Zustand des Proteins bestimmen, im Rhodopsin von Maus und Rind gemessen. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass diese Interaktionsstellen zwischen verschiedenen Rhodopsinvarianten konserviert sind. In diesem Teil der Arbeit konnte bewiesen werden, dass Rhodopsin der Maus als Modellsystem für AFM-Studien genutzt werden kann. Es wäre zudem interessant zu untersuchen, wie diese segmentalen Stabilitäten durch Ligandenbindung beeinflusst werden, da diese zu großen Umlagerungen der α -helikalen Segmente führt.

Um die Mechanismen, welche inaktive und aktive Zustände von GPCRs kontrollieren, zu untersuchen, wurde UV/Vis-Spektroskopie, SMFS und DFS an Rhodopsin-Mutanten, in denen eine Aminosäure

ausgetauscht wurde, durchgeführt. Die G90D-Mutation verursacht die konstitutive Aktivität von Signalkaskaden, was zur Nachtblindheit führt. Außerdem verursacht diese Mutation einen Defekt in der Bindungsstelle für Retinal. Mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Retinal der Mutante vergleichbar mit der des Wildtyp-Protein ist. Die Ergebnisse der SMFS- und DFS-Studien haben gezeigt dass die G90D Rhodopsin-Mutante ähnliche stabile Segmente wie das Wildtyp-Protein besitzt. Die Segmente beider Proteine zeichneten sich zudem durch eine verringerte Energiebarriere und verstärkte Steifigkeit aus, außer Segment [H8].

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die strukturellen Segmente im ungebundenen Zustand ändern. Das Retinal-Pigment Epithel spezifische 65 KDa Protein (RPE65) ist eine Isomerase, die den all-trans-retinyl-Ester in 11-*cis*-Retinol umwandelt und dadurch dessen Bindung an Opsin vorbereitet. Tieren, denen dieses Protein fehlt produzieren normalerweise Stäbchenzellen, die aus Disc-Membranen mit Opsin bestehen. Bei der Untersuchung wurden die gleichen Hauptpeaks wie im Wildtyp-Rhodopsin und in der G90D-Mutante identifiziert. Allerdings zeigte Opsin ein signifikant verringertes Auftreten von Segment [H8]. Zusätzlich wurde bei Opsin ein hohes Level an zufälligen Interaktionen (oder Rauschen) gemessen. Die DFS-Daten zeigten außerdem ähnliche Trends zwischen Opsin und der G90D-Mutation, außer Segment [H8]. Wie bei der G90D-Mutante, waren die mechanischen Eigenschaften von Opsin reduziert. Außerdem erhöhte sich die kinetische Stabilität von [H8] im Vergleich zu Rhodopsin.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Bindung von Retinal essentiell für die Stabilität von [H8] ist. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass das Apoprotein ohne Ligand die selben energetischen und kinetischen Stabilitäten wie die konstitutiv aktiv G90D-Mutante aufweist.

Diese Ergebnisse zeigen, wie molekulare Interaktionen in funktionellen GPCRs organisiert sind und wie sich die Stabilität der Segmente zwischen inaktiven und aktiven Zuständen ändert. Obwohl weitere Untersuchungen wie die Interpretation des Rauschens vonnöten ist, können die DFS-Daten, die von Rhodopsin und Opsin aufgenommen wurden, als Vorlage für MD-Simulationen anderer GPCRs dienen.

Abstract

G-protein-coupled receptors (GPCRs) which consist of seven transmembrane (7TM) domains are the largest super family in the human genome and are clinically interesting targets for drug development. Rhodopsin is a prototype GPCR model protein and consists of apoprotein, opsin, and its ligand, retinal. In my dissertation, the molecular interactions of rhodopsin in its native rod outer segment (ROS) disc membrane have been examined with atomic force microscopy (AFM). In addition, experiments have been performed under physiologically relevant conditions. This approach enables us to probe native molecular interactions and stabilities in the rhodopsin molecule as they avoid dehydration steps paired with other membrane protein study, such as x-ray crystallography and NMR spectroscopy. The. By applying single molecule force spectroscopy (SMFS) and dynamic SMFS (DFS) analysis to wild-type bovine and mouse rhodopsin, our lab has identified the strength and locations of molecular interactions that could be important for the functional state of the proteins (1-3). At the same time, we have shown they are conserved between mammalian rhodopsins (4). From this part of work, I have proven that mouse rhodopsin can serve as a mammalian rhodopsin model organisms for AFM study. Using different mouse strains, it would be interesting to investigate how these segmental stabilities are affected by activation or ligand binding which couple with large helical rearrangements (4,5).

To investigate the mechanism of control between inactive and active states of GPCRs, UV/Vis spectroscopy, SMFS and DFS are assessed on glycine 90 to aspartic acid (G90D) substituted rhodopsin mutant. G90D mutation induces the constitutive activation of downstream signaling cascades and causes congenital night blindness (5,6). The G90D mutation causes a defect in the retinal-binding pocket by disrupting the salt bridge

with its negatively charged residue (7). Our UV/Vis spectroscopy suggests the retinal binding state of G90D receptor molecule as consistent to the previous report (5). SMFS and DFS data shows that G90D mutant rhodopsin possess similar positions of stabilizing segments as wild-type rhodopsin, however their segments generally have lowered energy barrier and increased rigidity, except segment [H8].

Next we investigated how the structural segments changed in the ligand free receptor. Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein (RPE65) is the isomerase which converts all-trans-retinyl ester to 11-*cis*-retinol, preparing it for binding to opsin (7). *Rpe65*^{-/-} animals normally produce rod cells which consist of ROS discs with opsin (8). While same major peaks are identified as in wild-type rhodopsin and G90D, opsin has decreased the frequency of segment [H8] distinctly. In addition, we have detected a high level of random interactions, namely noise, elsewhere in the opsin sequence. Opsin DFS slopes inclines similar to the G90D mutation, except segment [H8]. Resulting mechanical rigidities have also reduced and kinetic stabilities have increased in opsin segments relative to rhodopsin. To summarize, a retinal binding might be essential to form stability of [H8], and opsin has the energetic and kinetic stabilities with similar impacts as the constitutively active mutation.

These results displayed the molecular interactions organized in the functional GPCRs, and the stability of segments at inactive and active states. Although further annotation such as noise interpretation is necessary, rhodopsin and opsin DFS parameters may serve as the template for molecular dynamic simulation of other GPCRs in a future.