

DISS. ETH NO. 26614

Time-Resolved Serial-Femtosecond Crystallography of the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

THOMAS GRUHL

Master of Science (M. Sc.), Freie Universität Berlin

born on 24.05.1990

citizen of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Gebhard Schertler, examiner

Dr. Valérie Panneels, co-examiner

Prof. Vladimir Korkhov, co-examiner

Dr. Martin Weik, co-examiner

2020

Abstract

Cells interact with the environment through proteins embedded in their membrane. Due to their diversity and prevalence, G protein-coupled receptors (GPCRs) are one of the most important groups of membrane receptors. Within this large protein family, light-sensitive rhodopsins are responsible for photoreception and vision. As part of their mechanism of light detection, rhodopsins trigger one of the fastest chemical reactions in biology, the *cis-to-trans* photoisomerization of a double bond in the chromophore retinal, a cofactor derived from vitamin A covalently bound to the protein. After photoactivation, rhodopsin undergoes conformational changes leading to a "META" state that activates the next partner in the signalling cascade, the G protein transducin, leading finally to cell hyperpolarisation. Rhodopsin and the structurally related bacteriorhodopsin are considered prototypes for the study of the molecular mechanisms of photoactivation in membrane proteins, an important aspect of photobiology. However, while rhodopsins are eukaryotic GPCRs, bacteriorhodopsin is a microbial proton pump, and different mechanisms are therefore expected.

Recently, X-ray free electron lasers (XFEL) have revolutionized the field of structural biology by enabling the dynamic study of protein structural changes in a timescale from fs to ms. In pump-probe serial femtosecond crystallography XFEL experiments, the X-ray pulse for acquiring structural data follows a 'trigger' (e.g. photoactivation) after specified time delays, allowing the measurement of conformational changes in the protein along its activation pathway at a very high temporal and spatial resolution. This method requires a constant renewal of protein crystals, as, after diffracting, they are immediately destroyed by the brilliant X-ray pulses. To date, only 'static' structures of eukaryotic rhodopsins have been characterised by X-ray crystallography in cryogenic conditions. The aim of this thesis is to use time-resolved X-ray crystallography at XFELs to study rhodopsin dynamics at room temperature. Here, I present protocols and results for rhodopsin purification, crystallisation, dynamic measurements at room temperature, data processing, and analysis.

First, we optimised existing purification protocols, screened for the most suitable crystallisation technique and conditions, and established the first crystallisation of wild-type mammalian rhodopsin in lipidic cubic phase, the environment of choice for most serial crystallography experiments of membrane proteins. Crystals obtained by this method allowed us to solve the structure of rhodopsin to the highest resolution to date (1.8 Å), allowing the precise analysis of internal water-mediated hydrogen bond networks that are crucial for receptor activity. The crystals were optimised for time-resolved studies, and we collected data of eight photoactivated intermediates ranging from fs to ms. This work presents in detail the first electron density maps and refined models extracted from those measurements, focusing on the analysis of two time-points: 1 and 100 picoseconds after photoactivation. The structures, in which retinal has already switched to a batho-like state, reveal the conformation of rhodopsin at two early major events of photoactivation: retinal isomerisation and thermal relaxation of the protein. The 1 ps data was collected in a pilot experiment at SwissFEL as one of the first beamtimes for in-house users. Our data show a fully *cis-to-trans* isomerised (but still severely twisted) retinal already at 1 ps, in which the rotation of a methyl group forces a water to move. This is accompanied by structural rearrangements of nearby amino acid residues (Glu181, Tyr268 and Tyr191/192) known to be involved in the activation mechanism of rhodopsin.

In summary, we show the first X-ray serial femtosecond crystallography data for rhodopsin, which reveal activation events at the edge of ultrafast time scales and open the path to studies at the fs

regime. This work enables the full characterization of the photoactivation process of the visual pigment rhodopsin in the near future. This will pave the way to new insights in the field of photobiology of metazoan opsins. In addition, the data will provide further insights into the molecular mechanism of activation of rhodopsin, including the role of highly conserved residues and motifs within the large GPCR family. Thus, our studies will also lead to a better understanding of the wide and important family of G protein-coupled receptors.

Zusammenfassung

Zellen interagieren mit der Umwelt durch Proteine, die in ihre Membran eingebettet sind. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind eine der wichtigsten Klasse von Membranrezeptoren, die sich durch ihre grosse Vielfalt und physiologische Relevanz auszeichnen. Innerhalb dieser großen Proteinfamilie sind lichtempfindliche Rhodopsine in Tieren für die Lichtwahrnehmung insbesondere im Sehprozess verantwortlich. Als Teil ihres Mechanismus zur Lichtdetektion lösen Rhodopsine eine der schnellsten chemischen Reaktionen in der Biologie aus, die *cis-trans*-Photoisomerisierung einer Doppelbindung des Chromophors Retinal, einem vom Vitamin A abgeleiteten Cofaktor, der kovalent an das Protein gebunden ist. Nach der Photoaktivierung unterliegt Rhodopsin Konformationsänderungen, die zu einem "META" -Zustand führen, der den nächsten Partner in der Signalkaskade, das G-Protein Transducin, aktiviert und schließlich zur Zellhyperpolarisation führt. Rhodopsin und das strukturell verwandte Bakteriorhodopsin gelten als Prototypen für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Lichtaktivierung von Membranproteinen, einem wichtigen Aspekt der Photobiologie. Während Rhodopsine eukaryotische GPCRs sind, ist Bakteriorhodopsin eine mikrobielle Protonenpumpe, und von daher werden unterschiedliche Mechanismen erwartet.

In jüngster Zeit haben Freie Elektronen Laser im Röntgenbereich (XFEL) das Gebiet der Strukturbiologie revolutioniert, indem sie die dynamische Untersuchung von Proteinstrukturänderungen in einem Zeitbereich von fs bis ms ermöglichen. In seriellen sogenannten „Pump-Probe“ Femtosekunden-Kristallographie-XFEL-Experimenten folgt der Röntgenpuls zur Erfassung von Strukturdaten nach definierten Zeitverzögerungen auf einen Aktivierungsimpuls (z. B. Lichtaktivierung), wodurch die Konformationsänderungen des Proteins während seiner Aktivierung mit einem sehr hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung gemessen werden können. Diese Methode erfordert einen ständigen Austausch der Proteinkristalle, da diese nach der Beugung sofort durch die hochbrillanten Röntgenpulse zerstört werden. Bisher sind nur „statische“ Strukturen eukaryotischer Rhodopsine durch Röntgenkristallographie unter kryogenen Bedingungen charakterisiert. Das Ziel dieser Arbeit ist es mithilfe der zeitaufgelösten Röntgenkristallographie an XFELs die Dynamik des Photorezeptors Rhodopsin bei Raumtemperatur zu untersuchen. Hier präsentiere ich Protokolle und Ergebnisse für die Rhodopsinaufreinigung und Kristallisation, sowie von dynamischen Messungen bei Raumtemperatur mit der entsprechenden Datenverarbeitung und Analyse.

Zunächst optimierten wir bestehende Aufreinigungsprotokolle, suchten nach den am besten geeigneten Kristallisationstechniken und -bedingungen, und etablierten die erste Kristallisation von Wildtyp-Säugetier-Rhodopsin in der lipidischen kubischen Phase, der bevorzugten Umgebung für die meisten seriellen Kristallographieexperimente von Membranproteinen. Mit dieser Methode erhielt ich Kristalle, die es uns ermöglichten, die Struktur von Rhodopsin mit der bislang höchsten Auflösung (1,8 Å) zu lösen und mir so erlaubten interne wasservermittelter Netzwerke von Wasserstoffbrückenbindungen im Detail zu analysieren. Diese sind für die Rezeptoraktivität entscheidend. Die Kristalle wurden für zeitaufgelöste Studien optimiert und wir sammelten Daten von acht Zeitpunkten im Bereich von fs bis ms. In meiner Arbeit werden die ersten aus diesen Messungen extrahierten Elektronendichtekarten und verfeinerten Modelle detailliert vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse von zwei Zeitpunkten liegt: 1 und 100 Pikosekunden nach der Photoaktivierung. Die Strukturen, in denen das Retinal bereits in einen bathoähnlichen Zustand

übergegangen ist, zeigen die Konformation von Rhodopsin bei zwei frühen Hauptereignissen der Photoaktivierung auf: Die Isomerisierung des retinals und die thermische Relaxation des Proteins. Die 1 ps-Daten wurden während einer der ersten in-house Pilotversuch Strahlzeiten am SwissFEL gesammelt. Unsere Daten zeigen ein vollständig cis-zu-trans-isomerisiertes -aber immer noch stark verdrehtes- Retinal bereits nach einer Pikosekunde, wobei die Rotation einer Methylgruppe ein Wassermolekül zur Bewegung zwingt. Dies geht einher mit strukturellen Umlagerungen benachbarter Aminosäurereste (Glu181, Tyr268 und Tyr191/192), von denen bekannt ist, dass sie am Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin beteiligt sind.

Zusammenfassend zeige ich in meiner Arbeit die ersten seriellen Röntgen-Femtosekunden-Kristallographiedaten für Rhodopsin, die die Aktivierungsereignisse im Grenzbereich ultraschneller Zeitskalen aufdecken und den Weg für Studien im fs-Regime ebnen. Diese Arbeit ermöglicht in naher Zukunft die vollständige Charakterisierung des Photoaktivierungsprozesses des Photorezeptors Rhodopsin. Dies wird als Grundlage für neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Photobiologie von Metazoan-Opsinen dienen. Darüber hinaus werden die Daten weitere Einblicke in den molekularen Mechanismus der Aktivierung von Rhodopsin liefern, einschließlich der Bedeutung hochkonservierter Aminosäurereste und Motive innerhalb der gesamten GPCR-Familie. Daher wird diese Studie auch zu einem besseren Verständnis der wichtigen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führen.