

Strukturbiologie

Atomare Einblicke in die Dynamik der Membransysteme und der Biokatalyse

MANUEL ETZKORN

INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE BIOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Structural biology is targeting increasingly complex systems. Emerging fields such as cellular structural biology consequently apply integrative approaches that combine the strengths of different techniques. In this setting it is of fundamental importance that the applied methods focus on their inherent strengths. The unique features of nuclear-magnetic-resonance (NMR) spectroscopy can play a valuable role in this endeavor. In this article, our research focusing on NMR-method development, tailored to the need of modern structural biology, is outlined.

DOI: 10.1007/s12268-022-1707-8
© Der Autor 2022

Die beeindruckenden Erfolge der Elektronenmikroskopie sowie der computergestützten Proteinstrukturvorhersage führen seit einiger Zeit zu einem notwendigen Umdenken in verschiedenen Feldern der Strukturbiologie. Aus Sicht eines biomolekularen NMR-Spektroskopikers ist dieser Prozess sehr begrüßenswert, da er eine Fokussierung auf die Stärken der NMR-Spektroskopie ermöglicht und vorantreibt. Zwei zentrale Stärken, die die biomolekulare

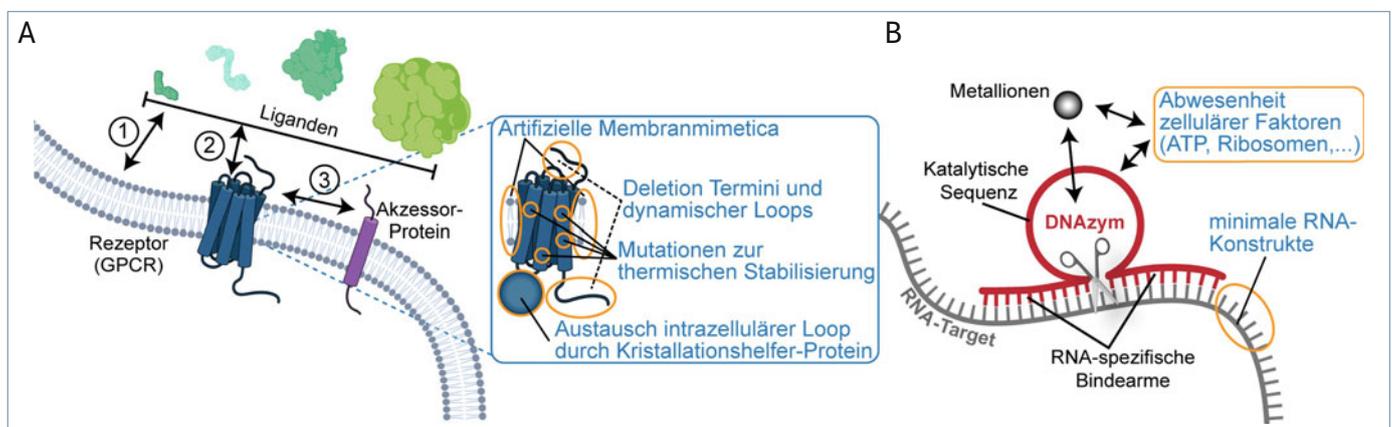
NMR-Spektroskopie auszeichnet sind hierbei:

1. die Möglichkeit, dynamische Prozesse mit atomarer und zeitlicher Auflösung zu verfolgen
 2. die große Bandbreite an lebensnahen Bedingungen und Umgebungen, unter denen die Messungen erfolgen können
- Parallel zum methodischen Fortschritt ist ebenfalls ein klarer Trend zu komplexeren Systemen zu erkennen, welcher der

Umgebung des Zielmoleküls eine wichtigere Rolle einräumt. Die daraus resultierende zelluläre Strukturbiologie profitiert in der Regel enorm von integrativen Ansätzen, welche die Stärken verschiedener Techniken bündeln, um die bestmöglichen Einblicke unter möglichst nativen Bedingungen zu erhalten.

Im Folgenden soll ein Bereich unserer Forschung vorgestellt werden, der einen Beitrag dazu leisten soll, verbesserte NMR-basierte Methoden zu etablieren. Hierbei konzentrieren wir uns auf Fragestellungen bei denen die Stärken der NMR sowie die damit verbundenen zeitgemäßen Anwendungsmöglichkeiten in integrativen (zellulären) strukturellen Projekten besonders zum Tragen kommen können. Die NMR-Untersuchung unter möglichst lebensnahen Bedingungen, im Folgenden mit *native-state-NMR* benannt, bildet dabei einen wesentlichen Schwerpunkt.

Membransysteme sowie die DNA-vermittelte Biokatalyse sind zwei Themengebiete, welche konkret von verbesserten *native-state-NMR*-Methoden profitieren können, da für beide Bereiche der Einfluss der Umgebung sowie dynamische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen.



▲ Abb. 1: Beispiel von zwei Systemen, welche von geeigneten *native-state-NMR*-Untersuchungen profitieren können. **A,** Wichtige dynamische Wechselwirkungen in Membransystemen beinhalten Protein-Lipid-Interaktionen (1), Liganden-Rezeptor-Interaktionen (2) und Interaktionen zwischen verschiedenen Membranproteinen (3). Gängige artifizielle Modifikationen der wichtigen Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind gesondert hervorgehoben (blauer Kasten). **B,** Aufbau eines DNAzyms (rot), welches eine RNA (grau) gezielt binden und zerschneiden kann. Gängige artifizielle Modifikationen sind hervorgehoben.

Die dynamischen Prozesse im Bereich der Membransysteme beinhalten verschiedene molekulare Interaktionen, wie die zwischen Peptiden und der Membran, zwischen Liganden und Membranrezeptoren sowie zwischen verschiedenen Membranproteinen (**Abb. 1A**, 1–3).

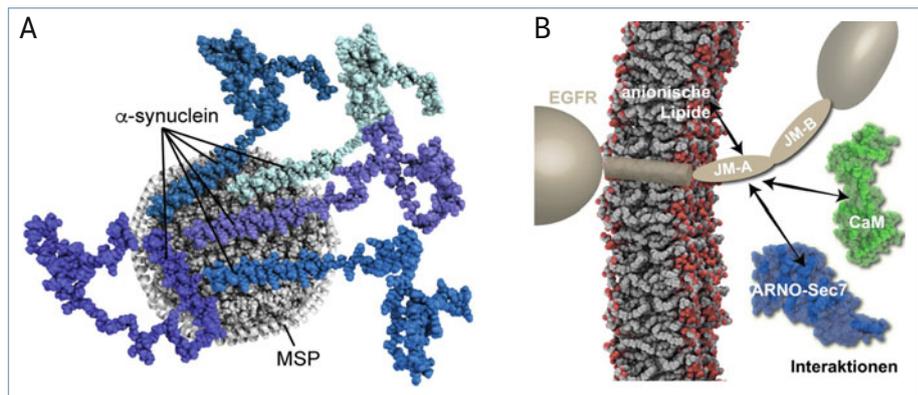
Während wichtige Erfolge auf diesem Gebiet erzielt wurden, werden atomare Einblicke häufig unter Zuhilfenahme einer Vielzahl nicht nativer Modifikationen mit meist ungeklärten Effekten gewonnen. Dies gilt insbesondere für die wichtige Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; **Abb. 1A**, blauer Kasten). Eine *native-state-NMR*-Charakterisierung der Struktur und Dynamik dieser Systeme ist daher in vielen Fällen besonders erstrebenswert.

Die DNA-vermittelte Biokatalyse mittels DNAzyme hat ein sehr hohes therapeutisches Potenzial, da mit dieser Technik sehr gezielt eine ungewollte RNA eliminiert werden kann (**Abb. 1B**). Leider lässt sich die hohe *in vitro*-Aktivität der DNAzyme meist nicht in Zellen übertragen, was mit einem ungenügenden Verständnis ihres Wirkmechanismus einhergeht. Auf diesem Gebiet ist daher sowohl ein besseres Verständnis der Struktur und Dynamik *in vitro* als auch der limitierenden Effekte *in vivo* wichtig.

Um eine Möglichkeit zu haben, einzelne Effekte der Umgebung besser zu verstehen, kann es ebenfalls hilfreich sein, gut definierte und aussagekräftige *in vitro*-Systeme zu verwenden.

Aussagekräftige *in vitro*-Bedingungen

Bei Studien, die gezielt bestimmte Effekte der zellulären Umgebung untersuchen, ist es generell sinnvoll, gut definierte Bedingungen zu verwenden, um verlässliche Rückschlüsse auf einzelne Faktoren ziehen zu können. Im Bereich der Membransysteme spielt hierbei die meist notwendige membranmimetische Umgebung eine zentrale Rolle. Im Allgemeinen gibt es eine große Auswahl an membranmimetischen Systemen, bei denen fast jedes System Vorteile in bestimmten Bereichen gegenüber anderen Systemen zeigt. Bei der Auswahl geeigneter Mimetika für die oben beschriebene Art der Untersuchungen sollte jedoch die Bereitstellung einer gut definierten, stabilen und homogenen Umgebung ein besonderer Stellenwert zukommen. Diese Eigenschaften werden insbesondere von Lipid-Nanodiscs erreicht [1]. Nanodiscs bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche mittels eines



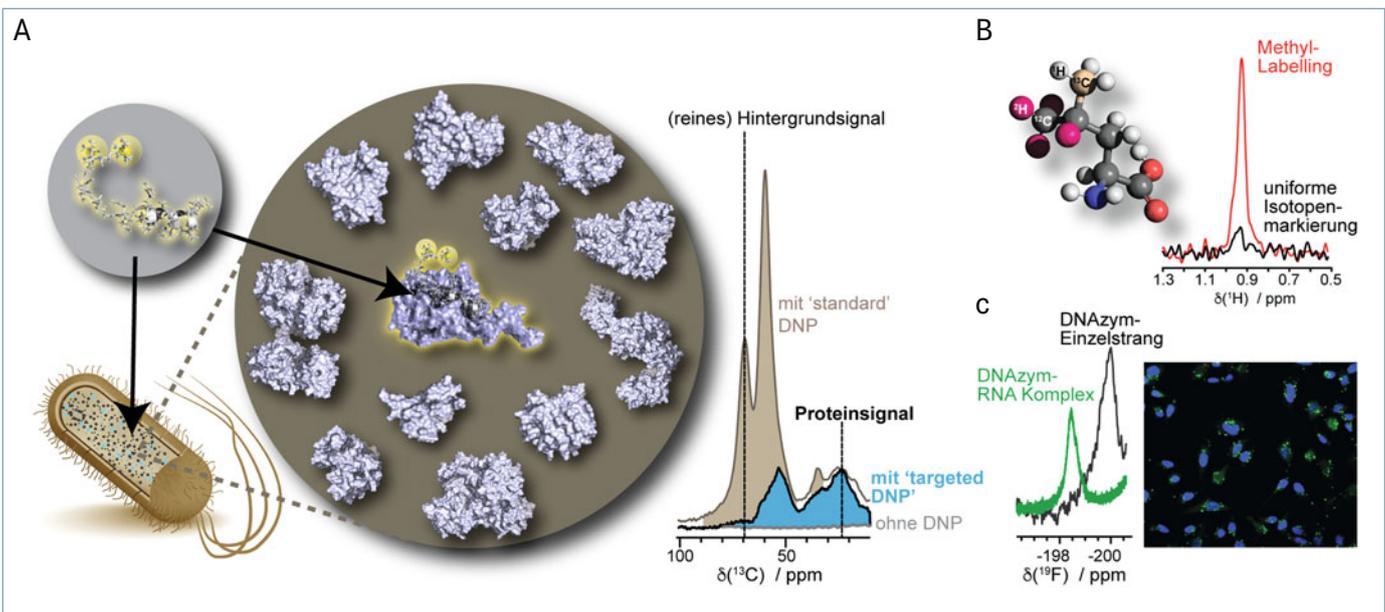
▲ **Abb. 2:** Beispiele von Protein-Lipid-Interaktionen, welche wir mittels geeigneter Membranmimetica untersuchen konnten. **A**, Lipidmembran-Nanodiscs, bestehend aus zwei *membrane scaffold*-Proteinen (MSP, weiße Helices) und etwa 160 Lipiden (weiße Kugeldarstellung), ermöglichen die Untersuchung der Bindemodi des Proteins α -Synuclein mit der Membranoberfläche [6]. **B**, Interaktionen mit Lipiden spielen ebenfalls eine Rolle für ein Netzwerk von intrazellulären Modulatoren des EGF-Rezeptors [7].

Gürtels bestehend aus dem *membrane scaffold protein* (MSP) stabilisiert wird (**Abb. 2A**). Bei richtiger Verwendung lassen sich mit diesem System sehr homogene und gut definierte Lipidzusammensetzungen in Form einer membranähnlichen Doppelschicht generieren. Diese sind aufgrund ihrer hohen Stabilität, Löslichkeit und Pufferkompatibilität für eine große Bandbreite an biophysikalischen und biochemischen Messverfahren geeignet [2].

Neben der Untersuchung von Membranproteinen [3–5] verwenden wir das Nanodiscsystem in Kombination mit der NMR-Spektroskopie in unserer aktuellen Forschung insbesondere dafür, neuartige Einblicke in die Interaktion von Peptiden und Proteinen mit der Membranoberfläche zu erhalten. Mit diesem Ansatz haben wir z. B. das für die Parkinsonerkrankungen wichtige Protein α -Synuclein sowie den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), einen zentralen Schalter in vielen Krebserkrankungen, untersucht [6, 7]. Faktoren, die sich auf diese Weise untersuchen lassen, beinhalten die Abhängigkeit der Membraninteraktion von der Lipidzusammensetzung, der Ionenkonzentration, der zur Verfügung stehenden Membranoberfläche, der Fluidität der Membran sowie der Anwesenheit konkurrierender Proteine. Mittels integrativer Ansätze konnten wir für das α -Synuclein zudem einen Link zwischen der Membranbindung und der Aggregation etablieren [6] und für das EGFR-System ein konkurrierendes Netzwerk intrazellulärer Faktoren, welches bestimmte Lipide einschließt und die Signalweiterleitung modifizieren kann, identifizieren [7].

Abbildung des nativen Zustands

Die Anforderung an einen *native state* hängt immer von dem jeweiligen System ab. Je komplexer die Umgebungen, desto höher sind in der Regel auch die Anforderungen an die technische Umsetzung geeigneter hochauflösender Messmethoden. Die zelluläre NMR ist hierbei im Wesentlichen durch zwei Faktoren limitiert: (i) ein zu geringes Signal des Zielproteins, und (ii) ein zu großes Hintergrundsignal der anderen Komponenten. Theoretisch könnte eine Signalverstärkung, welche selektiv nur für das Zielprotein erfolgt, daher direkt beide zentrale Limitierungen aufheben. Erfreulicherweise ist dies genau das, was wir mit unserem *targeted DNP*-Ansatz erreichen konnten [8]. DNP steht hierbei für *dynamic nuclear polarization*, einer mittlerweile etablierten Methode, das NMR-Signal durch Übertragung des um ein Vielfaches größeren Signals des Elektronenspins auf die umliegenden Kernspins zu verstärken. Dies kann konventionell durch Zugabe von löslichen Biradikalen und der Verwendung spezieller elektromagnetischer Einstrahlung erreicht werden. Der konventionelle Ansatz erhöht aber das Signal des Zielproteins und anderer Moleküle in der Probe etwa in gleichem Maße. Um eine zielgerichtete Signalverstärkung zu erhalten, haben wir daher die Biradikale kovalent an einen Liganden des Zielproteins gebunden. Die Spezifität der Protein-Liganden-Interaktion ermöglicht so einen zielgerichteten Transfer. Dieser kann dazu verwendet werden, das Signal eines Zielproteins unter Bedingungen zu detektieren, welche den Proteinkonzentrationen von Ziel- und Hinter-



▲ **Abb 3:** NMR-basierte Verfahren, welche Untersuchungen des nativen (zellnahen) Zustands verbessern können. **A,** Das *targeted DNP*-Verfahren kann durch eine selektive Verstärkung des Signals eines Zielproteins eine gezielte NMR-Messung von selbst geringen Proteinkonzentrationen vor einem großen Hintergrund ermöglichen [8], einer Situation, wie sie bei einem Zielprotein in einer zellulären Umgebung vorherrscht. **B,** Stereoselektiv-isotopenmarkiertes Valin führt zu einer deutlichen Verbesserung des NMR-Signals, auch in eukaryotischen Expressionssystemen [11]. **C,** DNAzyme lassen sich sehr gut in Zellen einbringen (die Aufnahme im rechten Teil zeigt fluoreszenzmarkierte DNAzyme (grün), welche sich in eukaryotischen Zellen befinden). Für zelluläre Anwendungen ist die ^{19}F -NMR besonders geeignet, da zelluläre System in der Regel keine ^{19}F -Kerne haben und das NMR-Signal somit eindeutig dem ^{19}F -markierten Zielmolekül zugeordnet werden kann. Die NMR-Spektren im linken Bereich zeigen, dass ^{19}F -NMR markierte DNAzyme die Untersuchung der DNAzyme-RNA-Komplexbildung ermöglichen [12] und somit ideale Sensoren für zelluläre NMR darstellen

grundproteinen in lebenden Zellen entsprechen (**Abb. 3A**). Aktuell sind wir dabei, den Ansatz auf die Untersuchung von GPCR-Systemen in nativen Membranen auszubauen.

Es sollte an dieser Stelle angemerkt werden, dass – neben einer eingeschränkten spektralen Auflösung – die notwendige Verwendung tiefer Proben temperaturen (im Bereich von 100 K) ein klarer Nachteil der DNP-Technik ist, insbesondere für Dynamikmessungen. Die quantitative Bestimmung dynamischer Gleichgewichtsprozesse und deren Beeinflussung durch verschiedene Liganden oder Wirkstoffkandidaten ist jedoch eine zentrale Fragestellung der GPCR-Forschung, deren angemessene Beantwortung möglicherweise ausschließlich durch geeignete *native-state-NMR*-Verfahren realisiert werden kann.

Eine Möglichkeit, die Dynamik des Rezeptors in nativen Membranen zu untersuchen, bieten spezielle Polymere, welche native Membranfragmente aus der Membran herauslösen können und, ähnlich wie Nanodiscs, in Lösung stabilisieren können. Ein Nachteil der meisten hierfür geeigneten Polymere, wie SMA [9] und DIBMA [10], ist ihre hohe negative Ladungsdichte, welche unspezifische Interaktionen begünstigt. Für

viele Systeme wird es daher wichtig sein, eine neue Generation von Polymeren zu entwickeln, welche keine ungewollten Interaktionen mit den verschiedenen Komponenten der Probe (Liganden, Ko-Faktoren) eingehen. Zusätzlich ist abzusehen, dass diese nativen Membrandiscs etwas größer und heterogener als NMR-optimierte Nanodiscs sind. Um dennoch eine Lösungs-NMR-basierte Untersuchung der Dynamik zu ermöglichen, haben wir in Kooperation mit den Gruppen von Vladimir Gelev (Sophia University) und Haribabu Arthanari (Harvard) ein neues Isotopenmarkierungsverfahren entwickelt [11]. Dieses beruht auf einer neuen Möglichkeit, kosteneffizient eine stereospezifische Methylgruppenmarkierung (**Abb. 3B**) in eukaryotischen Expressionssystemen zu verwenden. Unsere Testmessungen zeigen, dass das resultierende NMR-Signal deutlich verbessert ist (**Abb. 3B**) und deuten darauf hin, dass auch Messungen dynamischer Prozesse mit nicht modifiziertem Rezeptor in nativen Membrandiscs möglich sein werden.

Da es so gut wie kein Hintergrundsignal in biologischen Systemen gibt, kann die Verwendung von ^{19}F -Isotopenmarkierungen ebenfalls deutliche Vorteile für zelluläre Anwendungen haben. Für Nukleinsäuresys-

teme ist die ^{19}F -Markierung zusätzlich häufig auch kostengünstiger als gängige $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Markierungen. Wir konnten ^{19}F -NMR z. B. dafür verwenden, Einblicke in die DNAzyme-RNA-Komplexbildung sowie die atomare Struktur des Komplexes zu erzielen (**Abb. 3C**, [12]). ^{19}F -Spins können so als Sensoren für zelluläre NMR-Untersuchung der DNA-vermittelten Biokatalyse dienen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die NMR-basierte zelluläre Strukturbiologie gerade in einer spannenden Phase befindet, in der nun effektive Methoden zur Verfügung stehen, welche zweifelsohne neuartige Einblicke in zentrale Fragestellungen im Bereich der Membransysteme und der Biokatalyse eröffnen werden.

Danksagung

Finanzielle Unterstützung der DFG, insbesondere im Rahmen des Emmy-Noether- und des Heisenberg-Programms sowie der Zugang zum Biomolekularen-NMR-Zentrum, welches gemeinsam durch die Heinrich-Heine-Universität und das Forschungszentrum Jülich betrieben wird, ist die Grundlage unserer Forschung. Ein besonderer Dank gilt allen Gruppenmitgliedern und Kooperationspartner:innen, die die beschriebenen Resultate erst möglich gemacht haben. ■

Literatur

- [1] Sligar SG, Denisov IG (2021) Nanodiscs: a toolkit for membrane protein science. *Protein Sci* 30: 297–315
- [2] Viegas A, Viennet T, Etzkorn M (2016) The power, pitfalls and potential of the nanodisc system for NMR-based studies. *Biol Chem* 397: 1335–1354
- [3] Etzkorn M, Raschle T, Hagn F et al. (2013) Cell-free expressed bacteriorhodopsin in different soluble membrane mimetics: Biophysical properties and NMR accessibility. *Structure* 21: 394–401
- [4] Hagn F, Etzkorn M, Raschle T, Wagner G (2013) Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J Am Chem Soc* 135: 1919–1925
- [5] Viennet T, Bungert-Plümke S, Elter S et al. (2019) Reconstitution and NMR characterization of the ion-channel accessory subunit barttin in detergents and lipid-bilayer nanodiscs. *Front Mol Biosci* 6: 13
- [6] Viennet T, Würdehoff MM, Uluca B et al. (2018) Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun Biol* 1: 44
- [7] Viegas A, Yin DM, Borggräfe J et al. (2020) Molecular architecture of a network of potential intracellular EGFR modulators: ARNO, CaM, phospholipids, and the juxtamembrane segment. *Structure* 28: 54–62
- [8] Viennet T, Viegas A, Kuepper A et al. (2016) Selective protein hyperpolarization in cell lysates using targeted dynamic nuclear polarization. *Angew Chemie* 55: 10746–10750
- [9] Knowles TJ, Finka R, Smith C et al. (2009) Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J Am Chem Soc* 131: 7484–7485
- [10] Oluwale AO, Danielczak B, Meister A et al. (2017) Solubilization of membrane proteins into functional lipid-bilayer nanodiscs using a diisobutylene/maleic acid copolymer. *Angew Chemie* 56: 1919–1924
- [11] Dubey A, Stoyanov N, Viennet T et al. (2021) Local deuteration enables NMR observation of methyl groups in proteins from eukaryotic and cell-free expression systems. *Angew Chemie* 60: 13783–13787
- [12] Borggräfe J, Victor J, Rosenbach H et al. (2022) Time-resolved structural analysis of an RNA-cleaving DNA catalyst. *Nature* 601: 144–149

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Manuel Etzkorn
 Institut für Physikalische Biologie
 Heinrich-Heine-Universität
 Universitätsstraße 1
 D-40225 Düsseldorf
 manuel.etzkorn@hhu.de
 www.etzkornlab.de

AUTOR



Manuel Etzkorn

1999–2004 Physikstudium Universität Göttingen. 2004–2008 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie. 2009–2012 Postdoktorand an der Harvard Medical School Boston und dem MIT/Harvard Center for Magnetic Resonance, Cambridge, USA. 2013–2020 Emmy-Noether-Nachwuchsgruppenleiter Universität Düsseldorf. Seit 2021 Heisenberg-Gruppenleiter Universität Düsseldorf.