

Institut für Physikalische Biologie
(Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold)
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Neue Einblicke in die strukturelle Proteindynamik mittels
Kernspinresonanz-Spektroskopie:
Von Membranproteinen zu intrinsisch ungefalteten Proteinen**

Habilitationsschrift
(kumulatives Verfahren)
zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Biophysik
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Nils-Alexander Lakomek

September 2024

Diese kumulative Schrift gründet sich auf die folgenden Originalarbeiten:

Legende: # = korrespondierender Autor, * = geteilte Erstautorenschaft

- [1] **Lakomek, N.A.**, Ying, J., Bax, A., *Measurement of ^{15}N relaxation rates in perdeuterated proteins by TROSY-based methods*, **J. Biomol. NMR** **2012**, 53, 209-221.
- [2] **Lakomek, N.A.**, Kaufman J.D., Stahl J.S., Louis J.M., Grishaev A., Wingfield P.T., Bax A., *The homotrimeric HIV-1 viral coat protein gp41 shows a high degree of internal dynamics on multiple time scales*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2013**, 52(14), 3911-3915.
- [3] **Lakomek, N.A.**[#], Kaufman, J.D., Stahl, J.S., Wingfield, P.T.[#], *HIV-1 Envelope Protein gp41: An NMR study of dodecyl phosphocholine embedded gp41 reveals a dynamic prefusion intermediate conformation*, **Structure** **2014**, 22(9), 1311-1321.
- [4] **Lakomek, N.A.**^{*#}, Draycheva, A.^{*}, Bornemann, T., Wintermeyer, W.[#], *Electrostatics and intrinsic disorder drive translocon binding of the SRP receptor FtsY*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2016**, 55(33), 9544-9547.
- [5] Frey L., **Lakomek N.A.**, Riek R., Bibow S., *Micelles vs. bicelles vs. nanodiscs: Comparing the impact of membrane mimetics on membrane protein backbone dynamics*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2017**, 56(1), 380-383.
- [6] **Lakomek, N.A.**, Penzel, S., Lends, A., Cadalbert, R., Ernst, M., Meier, B.H., *Microsecond dynamics in ubiquitin probed by solid-state ^{15}N NMR spectroscopy $R_{1\rho}$ relaxation experiments under fast MAS (60–110 kHz)*, **Chem. Eur. J.** **2017**, 23(39), 9425-9433.
- [7] **Lakomek, N.A.**^{*}, Frey, L.^{*}, Bibow, S.^{*}, Böckmann, A., Riek, R., Meier, B.H., *Proton-detected NMR spectroscopy of nanodisc-embedded membrane proteins: MAS solid-state vs. solution methods*, **J. Phys. Chem. B** **2017**, 121(32), 7671-7680.
- [8] **Lakomek, N.A.**[#], Yavuz, H., Jahn, R.[#], Perez-Lara, A.[#], *Structural dynamics and transient lipid binding of synaptobrevin-2 tune SNARE assembly and membrane fusion*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **2019**, 16(18), 8699-8708.
- [9] Jirasko V.^{*}, **Lakomek N. A.**^{*}, Penzel S., Fogeron M.L., Bartenschlager R., Meier B.H., Böckmann A. *Proton-detected solid-state NMR of the cell-free synthesized α -helical transmembrane protein NS4B from Hepatitis C virus*, **Chembiochem.** **2020**, 21(10),1453-1460.
- [10] Jirasko V.^{*}, Lends A.^{*}, **Lakomek N.A.**^{*}, Fogeron M.L., Weber M., Malär A., Penzel S., Bartenschlager R., Meier B.H., Böckmann A., *Dimer organization of membrane-associated NS5A of hepatitis C virus as determined by highly sensitive ^1H -detected solid-state NMR*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2021**, 60(10), 5339-5347.
- [11] Stief T., Gremer L., Pribicevic S., Jahn R., Perez-Lara A., **Lakomek N.A.**[#], *Intrinsic disorder of the SNARE protein SNAP25a in its pre-fusion conformation*, **J. Mol. Biol.** **2023**, 435 (10), 168069.
- [12] Stief T., Vormann K., **Lakomek N.A.**[#], *Sensitivity-enhanced NMR ^{15}N R_1 and $R_{1\rho}$ relaxation experiments for the investigation of intrinsically disordered proteins at high magnetic fields*, **Methods** **2024**, 223,1-15.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	2
II. Abkürzungsverzeichnis	3
III. Kurze Zusammenfassung	4
1. Einleitung	5
1.1. Proteindynamik	5
1.2. Untersuchungen von struktureller Proteindynamik mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie in Lösung	5
1.3. Untersuchung von Membranproteinen mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie	7
1.4. Neuartige Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Methoden bei schnellen MAS-Frequenzen zur Untersuchung von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung	8
1.5. Charakterisierung der strukturellen Dynamik intrinsisch ungefalteter Proteine mittels NMR-Spektroskopie	9
Kapitel 2: Untersuchte Fragestellungen	10
Kapitel 3: Zusammenfassender Überblick	12
3.1. Verbesserung und Weiterentwicklung von NMR-Relaxationsmethoden zur Charakterisierung struktureller Proteindynamik mittels Lösungs-NMR	12
3.1.1. Zusammenhang von Proteindynamik und Relaxation	12
3.1.2. Theoretische Grundlagen	12
3.1.3. Qualitative Interpretation von NMR ^{15}N Relaxationsdaten	14
3.1.4. NMR Pulssequenzen für Relaxationsexperimente	16
3.2. Untersuchung der Struktur und Dynamik der Membranproteine HIV-1 gp41 und OmpX mittels Lösungs-NMR	19
3.3. Entwicklung und Anwendung von neuartigen protonen-detektierten Festkörper-NMR-Methoden, die eine Untersuchung der strukturellen Dynamik des Proteinrückgrats von Membranproteinen in einer natürlichen Lipid-Umgebung ermöglichen.	22
3.4. Untersuchung der strukturellen Dynamik von intrinsisch ungefalteten Proteinen, die mit Membranen interagieren, mittels Lösungs-NMR	29
Kapitel 4. Abschließende Zusammenfassung	35
Kapitel 5. Literaturverzeichnis	41
Kapitel 6. Anhang: Publikationen	49

Abkürzungsverzeichnis

Chol – cholesterol, englisch für Cholesterin

CSA – Chemical Shift Anisotropy, englisch für chemische Verschiebungsanisotropie

DPC – n-dodecyl-phosphocholine (englisch)

DHPC – 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (englisch)

DMPC – 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (englisch)

Env – Envelope, englisch Hülle (im Kontext des HIV-Virus)

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Immunschwäche-Virus des Menschen)

IDP – Intrinsically Disordered Protein, englisch für intrinsisch ungeordnetes Protein

IDR – Intrinsically Disordered Region, englisch für intrinsisch ungeordnete Region

MAS – Magic Angle Spinning, englisch für das Drehen um den Magischen Winkel

NMR – Nuclear Magnetic Resonance, englisch für Kernspinresonanz

NOE – Nuclear Overhauser Effect, englisch für den Kern-Overhauser-Effekt

PC – phosphatidyl choline (englisch)

SNAP25 – Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa (englisch)

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor (englisch)

Syb-2 – Synaptobrevin-2

VAMP-2 – Vesicle Associated Membrane Protein 2 (englisch)

III Kurze Zusammenfassung

Die Dynamik von Proteinen ist essentiell für ihre Funktion. So treten Proteine häufig in verschiedenen räumlichen Konformationen auf. Den Übergang zwischen unterschiedlichen Konformationen bezeichnet man als strukturelle Proteindynamik. Ein besonderes Maß an Dynamik zeigen intrinsisch ungefaltete Proteine und Membranproteine, die an Membranfusion beteiligt sind und dafür mehrere Konformationsumwandlungen durchlaufen. Sie stehen im Fokus meiner Habilitationsschrift, insbesondere das HIV-1 Membranprotein gp41, das die Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle vorantreibt, und die SNARE-Proteine, die eine zentrale Rolle bei der Fusion synaptischer Vesikel und der damit verbundenen Freisetzung von Neurotransmittern spielen. Zwischen beiden Proteinsystemen gibt es Parallelen hinsichtlich der Membranfusion, da beide die Membranfusion durch die Ausbildung kompakter Helixbündel vorantreiben.

Ziel meiner Arbeiten ist ein besseres Verständnis der strukturellen Dynamik dieser Proteine auf molekularer Ebene und mit Aminosäurereste-spezifischer Auflösung. Zur Charakterisierung der strukturellen Dynamik intrinsisch ungeordneter Proteine oder von Membranproteinen wurden NMR-Relaxationsmethoden weiterentwickelt. Diese lassen sich auf eine Vielzahl von Proteinen anwenden.

Wir beobachteten eine hohe strukturelle Dynamik von HIV-1 gp41 auf mehreren Zeitskalen, sowohl auf der schnellen Piko- bis Nanosekunden-Zeitskala, die man an als Flexibilität des Proteins interpretieren kann, wie auch auf einer Mikrosekunden-Zeitskala, auf der strukturelle Umlagerungsprozesse und Konformationsänderungen stattfinden. Unsere Daten deuten auf die Population eines Prä-Fusions-Zwischenzustands hin. Für das vesikuläre SNARE-Protein Synaptobrevin-2 finden wir, dass es in seinem monomeren Zustand vor der Fusion intrinsisch ungefaltet ist und eine hohe intrinsische Flexibilität aufweist. Eine zunehmende Steifigkeit vom N- zum C-Terminus, die mit einer Steigerung der Lipidbindungsaffinität korreliert, wird beobachtet, ebenso wie eine schwache Lipidbindung des gesamten SNARE-Motivs, was eine Überarbeitung der derzeitigen Modelle der vesikulären Membranfusion nahelegt, die bisher von einer Membranbindung allein über die Transmembranregion ausgehen. Unsere Ergebnisse für das SNARE-Protein SNAP25a zeigen, dass es in seinem monomeren Zustand vor der Fusion hauptsächlich intrinsisch ungeordnet vorliegt – inklusive des C-terminalen SNARE-Motivs. Nur die N-terminalen 35 Aminosäurereste von SNAP25a weisen eine α -helikale Konformation auf. Dies legt eine Funktion als Nukleationspunkt für die Assemblierung des SNARE-Komplexes nahe.

Um die Größenlimitierung für eine Untersuchung des Proteinrückgrats mittels Lösungs-NMR (im Bereich von 100 kDa bis 200 kDa) zu überwinden, haben wir die Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Spektroskopie für die Anwendung an Membranproteinen optimiert. Wir konnten die ersten hochauflösenden Protonen-detektierten Festkörper-NMR-Spektren des β -Fass-Membranproteins OmpX in einer Lipid-Nanodisc-Umgebung mit schnellem MAS (100 kHz) aufnehmen. Darüber hinaus konnten Protonen-detektierte dreidimensionale Zuordnungsexperimente für die Nichtstrukturproteine NS4B und NS5A des Hepatitis C-Virus aufgenommen und strukturelle Einblicke in ihre Membrantopologie und Domänendynamik gewonnen werden.

1. Einleitung

1.1. Proteindynamik

Das Leben ist dynamisch – im Großen wie im Kleinen. Auf molekularer Ebene sind Proteine die „molekularen Maschinen“, die den Stoffwechsel einer Zelle aufrechterhalten und den Zellen weitreichende Fähigkeiten verleihen. Um ihre verschiedenen Funktionen zu erfüllen, müssen Proteine unterschiedliche räumliche Konformationen annehmen und zwischen diesen wechseln können – sie sind in Bewegung. Diese Dynamik ist mit Übergängen zwischen verschiedenen (lokalen) Minima in der Protein-Energielandschaft verknüpft und findet auf unterschiedlichen Zeitskalen statt. Je größer die Energiebarriere ist, die dabei überwunden werden muss, umso langsamer ist die assoziierte Dynamik (Abbildung 1). Hierbei unterscheidet man zwischen schnellen Fluktuationen, wie Änderungen der Dihedral- und Torsionswinkel entlang des Proteinrückgrats, und langsameren Bewegungen, etwa der Bewegungen einzelner Domänen, die mit Konformationsänderungen verknüpft sind. Erstere finden auf einer Pikosekunden- bis Nanosekunden-Zeitskala (ps-ns) statt und können als „Flexibilität“ des Proteins interpretiert werden. Letztere erfolgen meist auf einer Mikro- bis Millisekunden-Zeitskala (μ s-ms) (Abbildung 2).

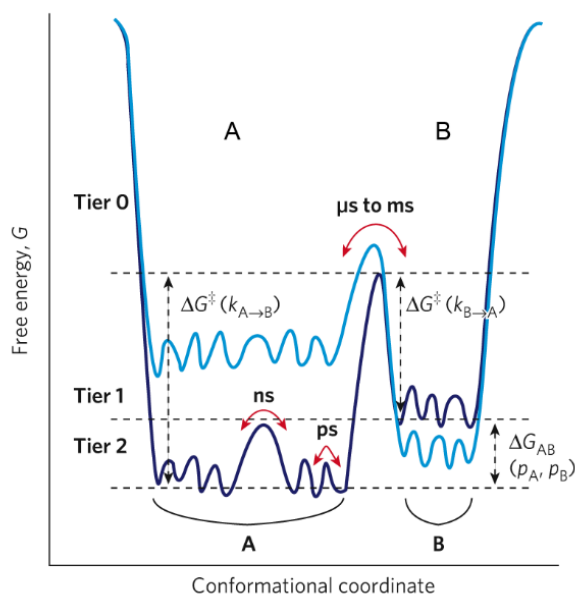


Abbildung 1: Die Dynamik von Proteinen ist mit dem Wechsel zwischen verschiedenen Minima auf der Energielandschaft eines Proteins verknüpft. Je höher die Energiebarriere zwischen zwei Minima (z.B. hier A und B) ist, die diese Minima voneinander trennt und die überwunden werden muss, umso langsamer ist die assoziierte Bewegung des Proteins (adaptiert von ¹).

1.2. Untersuchungen von struktureller Proteindynamik mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie in Lösung

Die Untersuchung von Proteindynamik in Lösung und bei physiologischen Temperaturen ist eine besondere Stärke der Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. NMR für Nuclear Magnetic Resonance). Proteindynamik kann hier mit Aminosäurereste-spezifischer Auflösung und ohne das Einbringen zusätzlicher Sonden (z.B. Fluorophore) beobachtet werden. Dabei kommen unterschiedliche Experimente zum Einsatz.

Man unterscheidet zwischen NMR-Experimenten, die schnelle Dynamik im Piko- bis Nanosekundenbereich (ps-ns) charakterisieren - schneller als die rotatorische Korrelationszeit, τ_R , eines Proteins (in der Größenordnung von wenigen Nanosekunden für kleine globuläre Proteine), und Methoden, die Dynamik langsamer als τ_R detektieren. Die rotatorische Korrelationszeit des Proteins, τ_R , ist die Zeit, die das Protein für eine Gesamtrotation (um einen Radianten) benötigt. Für die Charakterisierung schneller Proteindynamik im ps-ns Bereich, schneller als τ_R , werden meist ^{15}N Relaxationsmethoden, ^{15}N $R_{1\rho}$ und $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N Heteronuklear-NOE (engl. für Nuclear Overhauser Effekt) Messungen verwendet ²⁻⁵. Bewegungen, die schneller sind als τ_R , können mit der inneren Flexibilität des Proteins in Verbindung gebracht werden.

Zur Charakterisierung von Proteindynamik, die langsamer als τ_R ist, werden sogenannte Relaxationsdispersions-Experimente, $R_{1\rho}$ und CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)-Experimente eingesetzt, die eine Fluktuation der isotropen chemischen Verschiebung detektieren können und sensitiv für μs -ms Dynamik sind ⁶⁻¹¹ (schneller Austausch). Langsame Dynamik (langsamer Austausch) im Millisekundenbereich kann mittels ^{15}N -CEST (engl: Chemical exchange saturation transfer) ¹² oder über Austausch-Spektroskopie (engl: exchange spectroscopy, EXSY) beobachtet werden. Findet die Dynamik auf einer Zeitskala von einigen Sekunden oder im Bereich von Minuten oder Stunden statt, kann sie auch direkt zeitaufgelöst, z.B. in einer Serie ein- oder zweidimensionaler NMR-Messungen beobachtet werden ^{13,14}. Der PRE-Effekt (engl. für Paramagnetic Relaxation Enhancement) mittels paramagnetischer Sonden, die z.B. an Cysteine kovalent gebunden werden können, und sogenannte residuale dipolare Kopplungen (RDCs) können zur Untersuchung der Amplituden von Proteindynamik von Pikosekunden bis hin zu Millisekunden verwendet werden (allerdings ohne direkte Zeitauflösung) ¹⁵⁻¹⁸. Neuere Entwicklungen im Bereich der Festkörper-NMR-Spektroskopie, auf die in Kapitel 1.4. eingegangen werden soll, ermöglichen auch die Untersuchung von Membranproteindynamik in einer Lipidumgebung.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten, wurden klassische ^{15}N -Relaxationsexperimente, die schnelle ps-ns Dynamik charakterisieren, verbessert und erweitert, so dass sie auch für größere Proteine, z.B. Membranproteine, verwendet werden können und zuverlässige Daten liefern. Strukturelle Dynamik im ps-ns Zeitbereich kann als „Flexibilität“ eines Proteins aufgefasst werden. Die entwickelten Relaxationsexperimente wurden u.a. auf verschiedene Membranproteine und intrinsisch ungefaltete Proteine angewendet. Einen biologischen Schwerpunkt bilden hier Proteine, die an Membranfusionen beteiligt sind. Als erstes System wurde das virale Membranfusionsprotein gp41 des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) untersucht, als zweites die beiden SNARE-Proteine Synaptobrevin-2 und SNAP25, welche die Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran der neuronalen Synapse zwecks Neurotransmitter-Freisetzung vorantreiben.

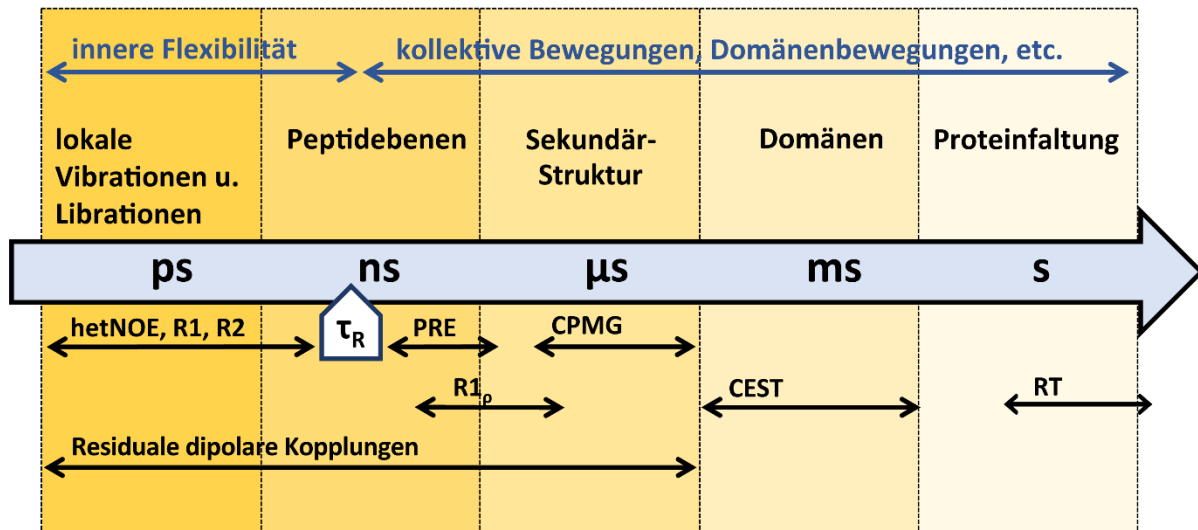


Abbildung 2: Zeitskalen struktureller Proteindynamik. NMR bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten und unterschiedlichen Methoden, Proteindynamik zu charakterisieren. Diese Methoden erstrecken sich über eine große Bandbreite von Zeitskalen, von Pikosekunden bis hin zu Sekunden und länger. Die verschiedenen Bewegungen des Proteinrückgrats werden dabei zusammen mit den assoziierten Zeitskalen angegeben, auf denen sie stattfinden. Unter dem Pfeil sind verschiedene NMR-Experimente und ihre Sensitivität für die jeweiligen Zeitskalen angegeben.

1.3. Untersuchung von Membranproteinen mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie

Für viele Membranproteine sind ihre strukturelle Dynamik und einhergehende Konformationsänderungen essentiell für ihre Funktion¹⁹⁻²¹. NMR-Spektroskopie ermöglicht wichtige Einblicke in diese strukturelle Dynamik von Membranproteinen bei physiologischen Temperaturen und mit Aminosäurereste-spezifischer Auflösung. Sie ist daher eine wichtige strukturbiochemische Technik und komplementär zur Röntgenkristallographie und zur Kryoelektronenmikroskopie, die häufig die Struktur des Grundzustands des Proteins bei kryogenen Temperaturen analysieren.

NMR-Studien an Membranproteinen, beispielsweise an G-Protein gekoppelten Rezeptoren, weisen auf das Vorhandensein einer erheblichen strukturellen Dynamik hin^{22,23}. Für Lösungs-NMR-Studien wurden die Membranproteine häufig in Detergenzmizellen oder kurzkettigen Lipiden solubilisiert und damit in Lösung gehalten^{22,23}. Als Alternative zu Detergenzmizellen wurden kleine Lipid-Nanodiscs²⁴ und kleine Lipid-Bizellen eingeführt^{25,26}. Diese haben den Vorteil, eine Lipiddoppelschicht als Membranumgebung zu ermöglichen, die eine physiologische Membran besser repräsentiert. Mit einem Molekulargewicht zwischen 80 kDa und 100 kDa, sind jedoch selbst kleine Lipid-Nanodiscs schon fast an der Obergrenze des Molekulargewichts, das durch die rotatorische Korrelationszeit des Gesamtkomplexes vorgegeben ist. Dies führt bei Experimenten an Membranprotein/Nanodisc-Komplexen mit mehr als 100-200 kDa zu einer starken Linienverbreiterung der Resonanzsignale des Proteinrückgrats bis unterhalb des Rauschens, so dass diese Signale in den entsprechenden Lösungs-NMR [¹H, ¹⁵N]-Korrelationsspektren verschwinden.

1.4. Neuartige Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Methoden bei schnellen MAS-Frequenzen zur Untersuchung von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung

Im Gegensatz zur Lösungs-NMR ist die Festkörper-NMR-Spektroskopie nicht durch die rotatorische Korrelationszeit eingeschränkt und besitzt prinzipiell keine Limitierung des Molekulargewichts der untersuchten Membrankomplexe. Das obere Limit wird allein durch die Komplexität der Spektren und deren Auflösung begrenzt. Damit ist es möglich, Membranproteine eingebettet in Liposomen oder 2D-Lipid-Kristallen zu untersuchen^{27,28}. Diese Lipidumgebung ist für die Lösungs-NMR aufgrund der Größe des Systems unzugänglich (z. B. Megadalton für Proteoliposomen). Seit der Einführung der Protonendetektion in der biologischen Festkörper-NMR können experimentelle Strategien, die für die Lösungs-NMR typisch sind, auf die Festkörper-NMR übertragen werden^{29,30}. Die Protonendetektion ermöglicht u.a. auch die Untersuchung der Dynamik des Proteinrückgrats in ähnlicher Weise wie bei der Lösungs-NMR³¹, liefert aber auch ergänzende Informationen zur Lösungs-NMR. Denn anisotrope Wechselwirkungen, wie die chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) oder dipolare Kopplungen, werden nicht mehr durch die rotatorische Diffusion ausgemittelt, und die spektralen Leistungsdichten werden abhängig von der Frequenz des Magic-Angle-Spinnings (MAS)³².

Bei den niedrigen MAS-Frequenzen (10-20 kHz), die in ersten Arbeiten verwendet wurden³³⁻³⁶, mussten hohe Deuterierungsgrade (bis zu 90 %) verwendet werden, um eine ausreichende Auflösung in der Protonendimension zu erreichen. In den letzten zehn Jahren haben zunehmend schnellere MAS-Frequenzen von 100 kHz und mehr die Anforderungen an die Verdünnung des Protonennetzwerks durch Deuterierung verringert. Hochaufgelöste protonen-detektierte Spektren können bei 100 kHz inzwischen auch für vollständig protonierte Proben aufgenommen werden^{37,38}. Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Experimente mit einer MAS-Frequenz von 100 kHz erfordern Mengen von weniger als einem Milligramm an Protein, ermöglichen gleichzeitig aber eine Empfindlichkeit, die mit standardmäßigen ¹³C-detektierten Experimenten mit niedrigen MAS-Frequenzen (10-20 kHz) vergleichbar ist, welche jedoch die zwanzigfache Probenmenge erfordern. Der Grund dafür ist das höhere gyromagnetische Verhältnis von Protonen verglichen mit ¹³C-Kohlenstoff, die geringere Linienbreite bei schnellen MAS-Frequenzen und der bessere Füllfaktor der NMR-Spule bei Verwendung kleinerer Rotoren, die für schnelle MAS geeignet sind. Daher verringern Protonendetektion und schnelle MAS-Frequenzen den Aufwand der Probenvorbereitung und ermöglichen die Untersuchung von Proteinen, die sich nur in geringen Mengen exprimieren lassen, was z. B. für viele Membranproteine gilt. In der Tat gewinnt die Arbeit an Membranproteinen unter Verwendung von Festkörper-NMR mit Protonendetektion und schnellen MAS-Frequenzen (> 60kHz) zunehmend an Bedeutung, wie zum Beispiel in einer Übersichtsarbeit von Schubeis et al.³⁹ beschrieben wird.

1.5. Charakterisierung der strukturellen Dynamik intrinsisch ungefalteter Proteine mittels NMR-Spektroskopie

Über 30 % des eukaryotischen Proteoms bestehen aus intrinsisch ungeordneten Proteinen (englisch: intrinsically disordered proteins, kurz: IDPs) oder Proteinen mit intrinsisch ungeordneten Regionen (englisch: intrinsically disordered regions, kurz: IDRs)⁴⁰⁻⁴³. Sie spielen eine zentrale Rolle bei vielen zellulären Prozessen, wie z. B. der Signaltransduktion und Transkription⁴⁰⁻⁴³, und sind häufig an biomolekularen Kondensaten beteiligt⁴⁴⁻⁴⁷. IDPs zeichnen sich durch das Fehlen einer wohldefinierten dreidimensionalen nativen Struktur unter physiologischen Bedingungen aus, kombiniert mit einer schwach trichterförmigen oder zerklüfteten Energielandschaft^{47,48}. Aufgrund der geringen Hydrophobizität und der starken elektrostatischen Abstoßung, die über das Rückgrat von IDPs oder IDRs verteilt sind, fehlt eine treibende Kraft für die Faltung zu einer globulären Struktur⁴⁹. IDPs nehmen häufig eine gefaltete Konformation an, wenn sie im Komplex mit anderen Bindungspartnern vorliegen^{40,50,51}. Auch posttranslationale Modifikationen erweitern die Faltungsmöglichkeiten von IDPs oder IDRs^{52,53}. Die Fehlfaltung von IDPs wurde als Ursache verschiedener Krankheiten, einschließlich neurodegenerativer Erkrankungen, identifiziert^{45,54-56}.

IDPs und IDRs haben eine hohe interne Flexibilität^{51,57,58}. Konformationsensembles, die die Variation von Atompositionen und Flächenwinkeln zeigen, wurden aus Molekulardynamik-Simulationen und Randbedingungen abgeleitet, die aus experimentellen Daten gewonnen wurden⁵⁹⁻⁶². Aufgrund der diffusen Elektronendichte und der hohen internen Dynamik von IDPs ist es schwierig, sie mit strukturellen Methoden wie Kryo-Elektronenmikroskopie oder Röntgenkristallographie zu charakterisieren. Auch die Kristallisationsbedingungen oder Probenvorbereitungstechniken für Experimente bei kryogenen Temperaturen können sich auf den Konformationsraum von IDPs auswirken. Lösungs-NMR ist jedoch besonders sensitiv für hochdynamische Proteine und ist daher für die Untersuchung von IDPs hervorragend geeignet^{46,50,52,58-68}. Die Amidgruppe des Proteinrückgrats wird häufig als Sonde für die strukturelle Proteindynamik des Proteinrückgrats verwendet. Hier bietet die Lösungs-NMR verschiedene Experimente zur Untersuchung der internen Proteindynamik über einen weiten Bereich von Zeitskalen (Abbildung 1), die in erster Linie auf der Spin-Relaxation basieren (vgl. Kapitel 1.2)^{61,63,68-72}.

Kapitel 2: Untersuchte Fragestellungen

Ein wesentliches Ziel der in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten ist ein besseres Verständnis der strukturellen Dynamik von Proteinen auf molekularer Ebene mit Aminosäurereste-spezifischer Auflösung. Dazu wurden moderne Kernspinresonanz-Methoden (englisch: Nuclear Magnetic Resonance, kurz: NMR), insbesondere sogenannte Relaxationsmethoden, auf den Gebieten der Lösungs-NMR- und Protonen-detektierten Festkörper-NMR-Spektroskopie weiterentwickelt und angewendet. Die hier vorgestellten Methoden lassen sich auf eine Vielzahl von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung und intrinsisch ungeordnete Proteine anwenden.

Ein besonderes Maß an Dynamik zeigen Proteine, die an der Membranfusion beteiligt sind. Membranfusionen treten bei vielen biologischen Vorgängen auf, z.B. bei Transportprozessen oder bei der Signalweiterleitung, u.a. an der Synapse zwischen zwei Neuronen. Aber auch bei viralen Infektionsprozessen spielt Membranfusion eine entscheidende Rolle, wenn z.B. die Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle fusioniert, um die virale RNA (oder DNA) zur Replikation in die Wirtszelle einzuschleusen. Das virale Membranprotein gp41 auf der Hülle des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) ist für die Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle verantwortlich und einer der Schwerpunkte der hier vorgestellten Arbeiten. Wir haben eine hohe intrinsische Mobilität des HIV-1 Membranproteins gp41 auf mehreren Zeitskalen beobachtet. Die beobachtete Plastizität von gp41 ermöglicht neue Ansatzpunkte für antivirale Medikamente zu entwickeln, die sogenannten Fusionsinhibitoren.

Bei der Neurotransmitterfreisetzung an der neuronalen Synapse, durchlaufen die SNARE-Proteine (englisch: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) eine Reihe von Konformationsänderungen. Die Bildung des SNARE-Komplexes, eines Vier-Helix-Bündels aus den SNARE-Proteinen, treibt die synaptische Membranfusion voran, so dass eine Fusionspore ausgebildet wird und Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. In ihrem Zustand vor der Fusion sind die SNARE-Proteine intrinsisch ungefaltet. Die in dieser Arbeit vorgestellte Analyse der strukturellen Dynamik sowie der Membranwechselwirkungen der monomeren SNARE-Proteine Synaptobrevin-2 und SNAP25a soll zu einem tieferen Verständnis der molekularen Dynamik dieser Proteine beitragen, was wiederum eine grundlegende Voraussetzung für das umfassendere Verständnis des Membranfusionsmechanismus auf molekularer Ebene darstellt.

Wichtig für die Untersuchung von Membranproteinen ist die Verwendung realistischer Membranmimetika. Liposomen oder Lipid-Nanodiscs kommen hierbei der physiologischen Membran recht nahe. Allerdings sind diese Systeme mittels Lösungs-NMR wegen der bestehenden Größenlimitierung nur schwer zugänglich. Deshalb wurden im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten neuartige Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Methoden bei schnellen MAS (englisch Magic Angle Spinning) - Frequenzen für die Anwendung an Membranproteinen entwickelt, die diese Größenlimitierung nicht aufweisen. Ziel ist auch hier ein verbessertes Verständnis der strukturellen Proteindynamik.

Die übergeordnete Zielsetzung meiner Arbeiten ist die Charakterisierung der Struktur und Dynamik von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung und intrinsisch ungefalteter Proteine, die mit Membranen interagieren - zwecks eines besseren Verständnisses ihrer Funktion. Dazu wurden die zur Verfügung stehenden NMR-Methoden verbessert und erweitert und auf verschiedene Proteine angewendet. Einen Schwerpunkt bilden hier Membranproteine und intrinsisch ungefaltete Proteine, welche die Membranfusion vorantreiben. Diese Habilitationsarbeit gliedert sich in vier Themenschwerpunkte. Die Zuordnung der zugrundeliegenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu diesen Themenschwerpunkten ist nachfolgend gekennzeichnet:

1. Verbesserung und Weiterentwicklung von NMR-Relaxationsmethoden zur Charakterisierung von struktureller Proteindynamik mittels Lösungs-NMR (Publikation [1] und [12]).
2. Anwendung der entwickelten Methoden zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Membranproteinen mittels Lösungs-NMR (Publikation [2], [3] und [5]). Einen Schwerpunkt bildet hier das Membranprotein HIV-1 gp41, welches eine zentrale Rolle bei der viralen Membranfusion spielt.
3. Entwicklung und Anwendung neuartiger protonen-detektierter Festkörper-NMR-Methoden, die eine Untersuchung der strukturellen Dynamik des Proteinrückgrats von Membranproteinen in einer natürlichen Lipid-Umgebung ermöglichen (Publikationen [6], [7], [9] und [10]).
4. Untersuchung der strukturellen Dynamik intrinsisch ungefalteter Proteine, die mit Membranen interagieren, mittels Lösungs-NMR. Einen Schwerpunkt bilden hier die SNARE-Proteine, die im Rahmen der neuronalen Exozytose die Membranfusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran vorantreiben (Publikationen [4], [8] und [11]).

Diese zuvor genannten vier Themenschwerpunkte werden nachfolgend in einem zusammenhängenden Überblick dargestellt. Diese kumulative Habilitationsschrift basiert auf insgesamt 12 Publikationen. In neun dieser Publikationen bin ich Erstautor und in vier Arbeiten korrespondierender Autor. Diese Publikationen entstanden während meiner Zeit als Postdoktorand an den National Institutes of Health (NIH, bei Washington D.C., USA), meiner Tätigkeit als unabhängiger Wissenschaftler am Max-Planck Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen (gefördert durch das DFG/NIH Research Career Transition Award Program) und an der ETH Zürich (gefördert durch ein Marie-Curie Stipendium der Europäischen Union), sowie in der Zeit als unabhängiger Gruppenleiter an der HHU Düsseldorf (gefördert durch das Heisenberg-Programm der DFG).

Kapitel 3: Zusammenfassender Überblick

3.1. Verbesserung und Weiterentwicklung von NMR-Relaxationsmethoden zur Charakterisierung struktureller Proteindynamik mittels Lösungs-NMR

3.1.1. Zusammenhang von Proteindynamik und Relaxation

Strukturelle Proteindynamik führt zu einer Fluktuation der N-H Bindungsorientierungen der Amidgruppen im Proteinerückgrat. Deshalb können Amidgruppen als Sonden für die Dynamik der einzelnen Aminosäuren innerhalb des Proteinerückgrats dienen. Diese durch die innere Proteindynamik verursachte Fluktuation führt zur sogenannten Spin-Relaxation^{2,6,11,57,73-78}. Auf Zeitskalen, die kürzer als die rotatorische Diffusionszeit, τ_R , des Proteins sind, sind die anisotrope chemische Verschiebung (engl. chemical shift anisotropy, CSA) und die dipolare Kopplung (D) aktiv und werden nicht durch die Rotationsdiffusion des Proteins ausgemittelt. Die interne Dynamik des Proteinerückgrats umfasst u.a. Bewegungen der Peptidebenen und die Verdrehung der Rückgrat-Dihedralwinkel. Diese Veränderungen induzieren eine stochastische Fluktuation der anisotropen chemischen Verschiebungen und der dipolaren Kopplungen, die zu einer Variation des lokalen Magnetfelds am Kernort führen, was letztlich die NMR-Spinrelaxation bewirkt^{74,75,79,80}. Diese Fluktuationen können durch eine Korrelationsfunktion beschrieben werden. Die Fourier-Transformierte der Autokorrelationsfunktion wird als spektrale Leistungsdichte bezeichnet. In der semiklassischen Redfield-Relaxationstheorie können die NMR-Relaxationsratenkonstanten durch die Summen und die Differenzen dieser spektralen Leistungsdichte beschrieben werden⁸¹.

Im Folgenden sollen die „klassischen“ ^{15}N -NMR-Relaxationsexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit verbessert und auch für größere Proteine, wie z.B. Membranproteine, nutzbar gemacht wurden, kurz vorgestellt werden. Es handelt sich hierbei um ^{15}N R_1 , $R_{1\rho}$ und $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NOE (engl. Nuclear Overhauser Effekt) Relaxationsexperimente²⁻⁵. Zwecks eines besseren Verständnisses wird kurz auf die theoretischen Grundlagen eingegangen, und danach die qualitative Interpretation der Relaxationsdaten anhand unserer Daten an Synaptobrevin-2 vorgestellt. Diese ermöglicht Aminosäure-spezifische Einblicke in die strukturelle Dynamik der diskutierten Proteine und spielt daher eine wesentliche Rolle für die in dieser Schrift zusammengefassten Arbeiten. Zum Abschluss dieses Kapitels wird noch kurz eines der NMR-Relaxationsexperimente vorgestellt.

3.1.2. Theoretische Grundlagen

Longitudinale Relaxation

Die longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation, die durch die T_1 -Zeit oder die Relaxationsrate $R_1 = 1/T_1$ gekennzeichnet ist, beschreibt die Rückkehr der Magnetisierung zur Boltzmann-Gleichgewichtsmagnetisierung. Im Gleichgewicht ist die Magnetisierung entlang der Achse des äußeren Magnetfelds ausgerichtet, welche die z-Achse des Labor-Koordinatensystems

definiert. Spektrale Leistungsdichten bei hohen (^1H) und kleinen (^{15}N) Larmor-Frequenzen (gleichbedeutend mit den Kernspinresonanz-Frequenzen, z. B. 600 MHz für ^1H bei einem 14,1-Tesla-Magneten) sowie deren Summen und Differenzen tragen zur ^{15}N - R_1 -Relaxation bei, welche durch die in $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessenen ^{15}N - R_1 -Relaxationsraten charakterisiert wird. Bewegungen auf Zeitskalen, die zu diesen Larmor-Frequenzen invers sind, also Bewegungen auf der Piko- bis Nanosekunden-Zeitskala, tragen zur Relaxationsrate R_1 bei.

Transverse Relaxation (^{15}N R_2)

Die Relaxationsrate R_2 beschreibt die Relaxation der transversalen Magnetisierung (in der xy-Ebene, orthogonal zum äußeren Magnetfeld) aufgrund des Verlusts der Phasenkohärenz zwischen den Spins, was zum Abklingen der detektierbaren Gesamtmagnetisierung führt^{80,81}. Ähnlich wie bei der Relaxationsrate R_1 trägt die spektrale Leistungsdichte bei hohen und kleinen Frequenzen zu R_2 bei. Der größte Beitrag zu R_2 stammt jedoch von der spektralen Leistungsdichte bei der Frequenz Null. Aus diesem Grund wird R_2 von der rotatorischen Diffusion dominiert, die durch die Rotationskorrelationszeit τ_R charakterisiert wird. Darüberhinaus tragen die langsameren Bewegungen des Rückgrats im Bereich von Hunderten von Pikosekunden bis zu wenigen Nanosekunden am meisten bei. Konformationsänderungen des Rückgrats, die eine Modulation der isotropen chemischen Verschiebung der ^{15}N -Kerne verursachen, fügen im Prinzip einen Austauschbeitrag, $R_{2,\text{ex}}$, zu den R_2 -Relaxationsraten hinzu^{9-11,73,76}. In den in dieser Arbeit nachfolgend beschriebenen $R_{1\rho}$ -Experimenten wird der $R_{2,\text{ex}}$ -Beitrag durch einen Spinlock unterdrückt, der Dynamik, die langsamer als die inverse Kreisfrequenz des Spinlocks ist, refokussiert. Bei dem Spinlock handelt es sich um einen langen, kontinuierlichen Hochfrequenzpuls, der die Magnetisierung entlang der Achse des eingestrahlten effektiven Magnetfelds $B_{1,\text{eff}}$ ausrichtet (welches sich aus der Vektorsumme des ω_1 -Felds des Spinlocks und der relativen chemischen Verschiebung gegenüber der ^{15}N -Trägerfrequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Welle ergibt). Die Relaxation der entlang der $B_{1,\text{eff}}$ -Achse ausgerichteten Magnetisierung wird als $R_{1\rho}$ -Relaxation bezeichnet, die eine R_1 -Komponente und eine R_2 -Komponente besitzt. Unter Verwendung von Formel (1) kann R_2 aus $R_{1\rho}$ und R_1 berechnet werden^{11,82}:

$$R_2 = \frac{R_{1\rho}}{\sin^2 \theta} - \frac{R_1}{\tan^2 \theta} \quad (1).$$

Der Winkel zwischen der Achse des effektiven Magnetfelds $B_{1,\text{eff}}$ und dem äußeren Magnetfeld B_0 ist $\theta = \arctan\left(\frac{\omega_1}{\Omega}\right)$. ω_1 ist die RF-Amplitude des Spinlock und Ω der chemische Verschiebungs-Offset zwischen der ^{15}N chemischen Verschiebung des entsprechenden Aminosäurerestes und der ^{15}N -Trägerfrequenz^{11,82}.

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N Nuclear Overhauser Effect ($\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE)

Der heteronukleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N Nuclear Overhauser Effekt ($\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE), beschreibt den Magnetisierungstransfer von den Amidprotonen zu den ^{15}N -Amidkernen über Kreuzrelaxation während der Sättigung der Amidprotonen^{2,80,81,83,84}. Die Kreuzrelaxation, die während des

heteronuklearen NOE-Transfers auftritt, hängt von der spektralen Leistungsdichte der Summe und der Differenz der ^1H - und ^{15}N -Larmorfrequenzen ab. Daher ist der heteronukleare NOE sensitiv für schnelle Pikosekunden-Dynamik (< 100 ps).

3.1.3. Qualitative Interpretation von NMR ^{15}N Relaxationsdaten

Heteronukleare NOE-Daten und ^{15}N R_2 -Relaxationsraten sind leichter zu interpretieren als ^{15}N R_1 -Daten, so dass wir mit ersteren beginnen. Exemplarisch werden ^{15}N Relaxationsraten des SNARE-Proteins Synaptobrevin-2 (vgl. Kapitel 3.4.2., sowie [12] und [8]) diskutiert, das im monomeren Zustand vor der Fusion zum SNARE-Komplex als intrinsisch ungeordnetes Protein vorliegt.

Heteronukleare NOE-Werte

Heteronukleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Werte sind sensitiv für interne Dynamik auf der schnellen Pikosekunden-Zeitskala (< 100 ps) und können in der Regel Werte zwischen Null und (etwas weniger als) Eins annehmen. Sie charakterisieren die innere Flexibilität eines Proteins. Je kleiner der heteronukleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Wert ist, desto dynamischer ist der betreffende Aminosäurerest. Bei intrinsisch ungefalteten Proteinen (IDPs) werden typischerweise kleine Aminosäurereste-spezifische heteronukleare NOEs beobachtet, z. B. in der Größenordnung von 0,5 und kleiner bei einer 600 MHz ^1H Larmorfrequenz des Spektrometers (die dazugehörige Magnetfeldstärke beträgt 14.1 T). Es werden jedoch auch negative heteronukleare NOE-Werte für IDPs gefunden, was auf eine noch höhere interne Dynamik hinweist (Abbildung 3C).

^{15}N - R_2 -Relaxationsraten

Die ^{15}N R_2 -Relaxationsraten sind sensitiv für ps-ns-Dynamik, bei der die Orientierungen der N-H-Bindungsvektoren durch die rotatorische Diffusion des Proteins, die Bewegung der Peptidebenen oder die Verdrehung der Rückgrat-Dihedralwinkel moduliert werden. Anders als die $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -NOE-Werte und R_1 -Relaxationsraten werden die ^{15}N - R_2 -Relaxationsraten von der spektralen Leistungsdichte bei Null, $J(0)$, dominiert, die mit der rotatorischen Diffusion des Proteins verknüpft ist. Daher sind die ^{15}N - R_2 -Relaxationsraten in ihrer Größe entsprechend der Gesamtrotation und Größe des Proteins skaliert. Die ^{15}N - R_2 -Relaxationsraten ermöglichen jedoch auch die Unterscheidung der inneren Aminosäurereste-spezifischen Mobilität. Je kleiner die beobachtete ^{15}N - R_2 -Relaxationsrate ist, desto mobiler ist der betreffende Rest. Hohe ^{15}N - R_2 -Relaxationsraten sind charakteristisch für Sekundärstrukturelemente, wie α -Helices oder β -Stränge. Niedrige R_2 -Relaxationsratenkonstanten sind charakteristisch für Schleifen und intrinsisch ungeordnete Regionen (Abbildung 3B).

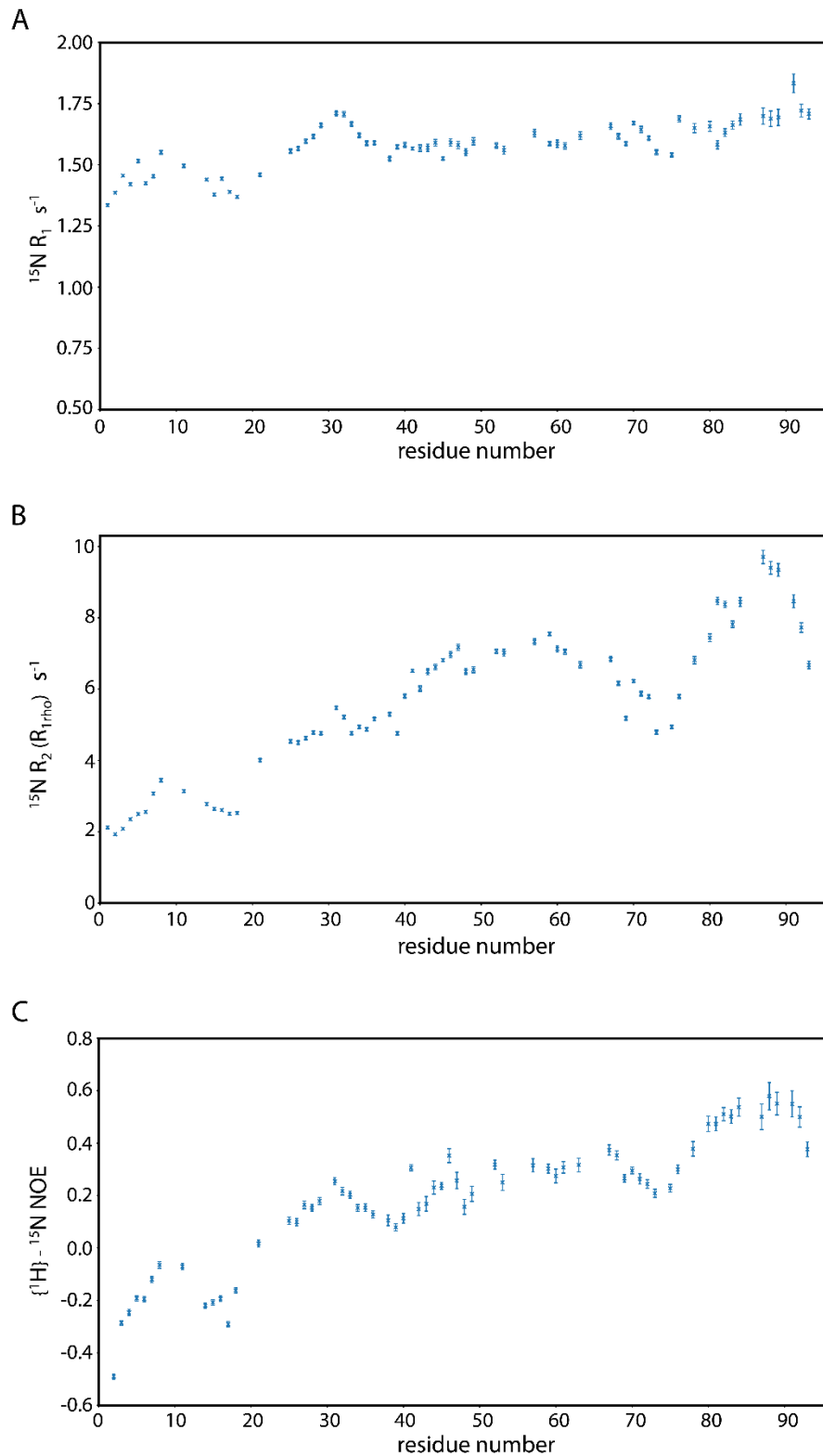


Abbildung 3: NMR-Relaxationsdaten von Synaptobrevin-2 (1-96) gemessen bei 600 MHz und 5°C. Die ^{15}N Relaxationsraten wurden mit den in [12] publizierten ^{15}N -Relaxationsexperimenten mit sensitivitätsverstärktem HSQC und verbesserter Wasserunterdrückung aufgenommen (vgl. Kapitel 3.1.4), bzw. die $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Werte mit der unter [1] veröffentlichten Pulssequenz. A: Aminosäurereste-spezifische $^{15}\text{N } R_1$ -Relaxationsrate entlang des Proteinrückgrats von Syb2 (1-96). B: ^{15}N - R_2 -Relaxationsratenkonstanten, berechnet aus $R_{1\rho}$ - und R_1 -Raten unter Verwendung der Formel (1). C: Heteronukleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Werte entlang des Proteinrückgrats von Syb2 (1-96).

¹⁵N-R₁-Relaxationsraten

Die R₁-Relaxationsraten sind empfindlich für Pikosekunden (ps) - und schnellere Nanosekunden (ns) - Dynamik. Ihre direkte Interpretation in Bezug auf innere Dynamik ist jedoch komplexer als die der vorherigen Relaxationsdaten. Es gibt ein T₁ - Minimum, wenn T₁ als Funktion der rotatorischen Korrelationszeit, τ_R , aufgetragen wird: Das T₁-Minimum liegt bei $\tau_{R, \min} = 1/\omega$. Für schnell rotierende Moleküle mit einem $\tau_R < \tau_{R, \min}$, z. B. kleine Moleküle oder kleine IDPs, weisen niedrigere R₁-Relaxationsraten auf eine erhöhte Dynamik des Proteinrückgrats hin (wie bei R₂, Abbildung 3A). Bei größeren Proteinen mit $\tau_R > \tau_{R, \min}$ ist es umgekehrt, und höhere R₁-Relaxationsraten bedeuten eine erhöhte Dynamik (anders als bei R₂).

3.1.4. NMR Pulssequenzen für Relaxationsexperimente

(Publikationen [1] und [12] in der vorherigen Übersicht)

Exemplarisch soll hier die ¹⁵N R₁ Pulssequenz aus [12] kurz diskutiert werden: Die Pulssequenz zur Messung der ¹⁵N R₁-Relaxationsraten (Abbildung 4) wird mit einer sensitivitätsverstärkten HSQC (engl.: Heteronuclear Single Quantum Correlation) -Detektion ⁸⁵ aufgenommen, verbunden mit einer Echo / Anti-Echo Quadratur-Detektion [1,12]. Kurze Gradienten mit variabler Stärke und Länge werden für die Kohärenz-Selektion und eine verbesserte Wasserunterdrückung eingesetzt [12]. Während der Relaxationsphase klingt die N_z-Magnetisierung ab. Längere Abklingzeiten führen zu reduzierten Intensitäten in den zugehörigen 2D-Ebenen (welche zusammen als ein sogenanntes „Pseudo-3D-Experiment“ aufgenommen werden, mit den unterschiedlichen Relaxations-Zeitspannen in der dritten Dimension). Während der Relaxations-Zeitspanne wird der unten beschriebene Block in einer Schleife n-fach ausgeführt. Während dieser Zeit kehrt die ¹⁵N-Magnetisierung in den Gleichgewichtszustand zurück, und die N_z-Komponente der Magnetisierung relaxiert entlang der z-Achse. Da die kreuzkorrelierte Relaxation zwischen der ¹⁵N-anisotropen chemischen Verschiebung (CSA) und der ¹H-¹⁵N dipolaren Kopplung (D) auch während der Relaxationszeit aktiv ist, ist ein zentraler I-BURP-2-Puls von 180° ⁸⁶, der auf den Amidprotonen selektiv ist, erforderlich, um den Beitrag der kreuzkorrelierten Relaxation zu refokussieren (ansonsten würden fehlerhafte ¹⁵N-R₁-Relaxationsraten gemessen). Durch einen +/- 180° Phasenwechsel vor der eigentlichen Relaxationsphase kann das Abklingen der Magnetisierung nachfolgend als abklingende Exponentialfunktion gefittet werden.

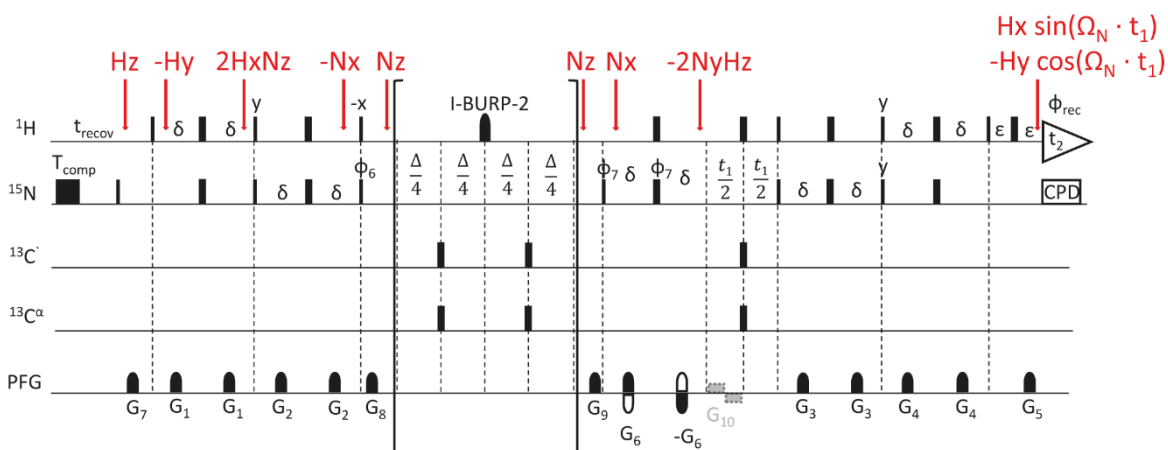


Abbildung 4: Pulssequenzschemata für die Bestimmung der ^{15}N R_1 -Relaxationsraten unter Verwendung eines HSQC-Detektions-Schemas mit gesteigerter Empfindlichkeit, so wie unter [12] veröffentlicht. $90^\circ(x)$ -Pulse werden durch schmale Rechtecke und $180^\circ(x)$ -Pulse durch breite Rechtecke dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Der folgende Phasenzyklus wird angewendet: $\phi_6 = y, y, -y, -y$; $\phi_7 = y, -y$, $\phi_{\text{rec}} = y, -y, -y, y$. Die Quadraturdetektion wird durch Umkehrung der Polarität des Gradienten G_6 und des Phasenzyklus von ϕ_7 erreicht (Echo/Anti-Echo-Detektion). In roter Farbe sind die zu dem jeweiligen Zeitpunkt aktiven Produktoperatoren dargestellt, die den Magnetisierungstransfer beschreiben.

In den im Rahmen meiner Zeit als Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Dr. Ad Bax an den National Institutes of Health (NIH, nahe Washington D.C., USA) durchgeführten Arbeiten konnten wir zeigen, dass es wichtig ist, die Refokussierung der kreuzkorrelierten Relaxation während der Relaxationsphase nur mit selektiven Pulsen durchzuführen und diese mit genügendem zeitlichen Abstand (hier 40 Millisekunden) zu positionieren. Diese Pulse sind selektiv für die Amidprotonen und dürfen die Resonanz des Wassers nicht anregen, sonst käme es zu Artefakten. So führten die bis dahin üblichen harten 180° Rechteckpulse, die in kurzem zeitlichem Abstand (5 ms) gepulst werden, zu einer partiellen Sättigung des Wassers. Verbunden mit chemischem Austausch von Amidprotonen mit dem Wasser während der Relaxationszeit führt dies zu einem Verlust von Kohärenzen und letztendlich zu einem schneller abklingenden Signal. Dadurch sind die extrahierten Relaxationsraten bei der konventionellen Methode artifiziell erhöht. Weitere systematische Fehler in Zusammenhang mit der Messung von ^{15}N R_1 und $R_{1\rho}$ Relaxationsraten sowie von heteronuklearen $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Werten konnten im Rahmen von Präzisionsmessungen identifiziert werden. In den nachfolgend entwickelten verbesserten Relaxationsexperimenten konnten wir diese systematischen Fehler bis auf unter 1% reduzieren [1]. Gleichzeitig wurde die Anwendbarkeit der Pulssequenzen auf Proteine mit höherem Molekulargewicht (> 20 kDa) erweitert, indem ein TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)⁸⁷ -basiertes Detektionsschema verwendet wurde [1]. Diese TROSY-basierten ^{15}N Relaxationssequenzen [1] haben sich zu einer der verwendeten Standard-Relaxationsexperimente entwickelt (234 Zitate, laut Google Scholar, Stand 30.09.2024).

Vor kurzem haben wir eine optimierte Version der ^{15}N R_1 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsexperimente vorgestellt, die für vollständig protonierte Proteine geeignet sind [12]. Die NMR-Pulssequenzen sind konzeptionell ähnlich wie die TROSY-basierten Sequenzen und ihr HSQC-Gegenstück [1]. Anstelle des TROSY-Detektionsschemas wurde ein empfindlichkeitsverbessertes HSQC-Detektionsschema mit verbesserter und einfacher optimierter Wasserunterdrückung verwendet [12]. Die vorgestellten Pulssequenzen wurden auf die zytoplasmatische Domäne des SNARE-Proteins Synpatobrevin-2 (Syb-2) angewendet (vgl. Kapitel 3.4.2.), das in seinem monomeren Zustand vor der Fusion intrinsisch ungeordnet ist [8]. Für dieses intrinsisch ungeordnete Protein konnte eine zweifache Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht werden (Tabelle 1). Das ermöglicht eine vierfache Verkürzung der Messzeit im Vergleich zur TROSY-detektierten Version. Die Pulssequenzen wurden bei 600 MHz und 1200 MHz ^1H -Larmor-Frequenz getestet und sind somit in einem breiten Magnetfeldbereich einsetzbar. Ein Vergleich zwischen protonierten und deuterierten Proteinproben zeigt eine hohe Übereinstimmung, was darauf hindeutet, dass zuverlässige ^{15}N R_1 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten für vollständig protonierte und deuterierte Proben extrahiert werden können. Diese Pulssequenzen sind nicht nur für IDPs, sondern auch für eine ganze Reihe von Proteinen kleiner und mittlerer Größe geeignet.

Experiment	read out	field MHz	/ SNR
$R_{1\rho}$	HSQC	1200	972
$R_{1\rho}$	TROSY	1200	388
R_1	HSQC	1200	1014
R_1	TROSY	1200	404
$R_{1\rho}$	HSQC	600	469
$R_{1\rho}$	TROSY	600	237
R_1	HSQC	600	477
R_1	TROSY	600	228

Tabelle 1. Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) für die ^{15}N R_1 und R_2 ($R_{1\rho}$) NMR-Relaxationsexperimente, gemessen an ^1H ^{15}N Syb-2, unter Verwendung der sensitivitätsverstärkten HSQC-Detektion [12] im Vergleich mit dem TROSY-Detektionsschema [1].

3.2. Untersuchung der Struktur und Dynamik der Membranproteine HIV-1 gp41 und OmpX mittels Lösungs-NMR

HIV-1 gp41 (Publikationen [2] und [3])

Bei Membranproteinen, die eine Membranfusion vorantreiben, indem sie zwei Membranen aneinander ziehen, muss eine besonders große konformationelle Dynamik vorhanden sein. Im Falle von HIV-1 gp41 beispielsweise, welches die Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle vorantreibt, muss gp41 zunächst über sein Fusionspeptid in die Membran der Wirtszelle eindringen, bevor eine Konformationsänderung in der zentralen Ektodomäne die Virusmembran und die Membran der Wirtszelle aneinander ziehen kann.

Die genauen Mechanismen dieses Prozesses – und insbesondere der Fusionsschritt selbst – sind jedoch auf molekularer Ebene noch lange nicht vollständig verstanden⁸⁸. Ein Grund ist, dass hochaufgelöste Strukturinformationen zum Fusionsprozess mit atomarer Auflösung bisher nur für isolierte Domänen oder verkürzte Konstrukte vorliegen, ohne die Transmembrandomäne und unter Vernachlässigung der Lipidumgebung. Auch aktuelle Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM)-Strukturen beschränken sich auf den nicht-aktivierten gp120-gp41 Komplex auf der HIV-1 Membranhülle^{89,90}. Vorhandene Modelle zum Fusionsprozess basieren im Wesentlichen auf der Kristallstruktur des kompakten Sechs-Helix-Bündels⁹¹⁻⁹⁴. Die hohe strukturelle Dynamik von gp41 vor der Fusion hat vermutlich dazu beigetragen, dass eine strukturelle Analyse von gp41 in voller Länge mittels Kryo-EM oder Röntgenkristallographie bislang schwierig ist.

Das Hüllprotein (engl.: envelope protein) bildet eine Art Stachel (engl. spike) auf der Hülle der HIV-Membran. Es besteht aus einem Homotrimer der Homodimere gp120-gp41. Nach der CD-4 Erkennung und gp120-Abspaltung verweilt gp41 vor der eigentlichen Fusion eine längere Zeit in einer intermediären Konformation. Dadurch ist es für die humorale Immunantwort zugänglich, bevor die eigentliche Infektion stattfindet⁹⁵. Eine Störung oder Fixierung dieser intermediären Konformation würde den Übergang zum gp41 Sechs-Helix-Bündel, der Struktur nach der Fusion, hemmen und somit die virale Membranfusion und damit die virale Infektion verhindern. Damit stellt gp41 ein äußerst attraktives Ziel für die Anti-HIV-Wirkstoffentwicklung dar. Es wird angenommen, dass die neueste Klasse antiviraler HIV-1-Medikamente, die sogenannten Fusionshemmer, auf diesem Wirkmechanismus basieren. Ein prominentes Beispiel dafür ist der gp41-spezifische Fusionshemmer T-20 (Enfuvirtide/Fuzeon, Roche). Strukturelle Einsichten in diesen intermediären Zustand von gp41 sind deshalb von hohem pharmazeutischen Interesse.

Die Untersuchung des Protein gp41 (1-194) umfasste das Fusionspeptid, die Ektodomäne und die Transmembranregion (Abbildung 5). Das Konstrukt wurde in Mizellen aus Dodecylphosphocholin (DPC) rekonstituiert und mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei haben wir eine hohe intrinsische Mobilität von gp41 auf mehreren Zeitskalen beobachtet (Abbildung 6) – mit deutlichen Hinweisen darauf, dass ein intermediärer Präfusions-Zustand vorliegt, wie zuvor diskutiert [2]. In einem nachfolgenden Artikel konnten wir weitere Beweise dafür vorlegen, dass wir tatsächlich eine Präfusions-Zwischenkonformation von gp41 beobachten [3]. Wir konnten u.a. zeigen, dass gp41 in einem

Monomer-Trimer-Gleichgewicht vorliegt, mit einer Dissoziationskonstanten K_D im niedrigen μM -Bereich. Dieses Gleichgewicht wird durch die Lipidinteraktionen beeinflusst und spielt möglicherweise eine wichtige Rolle während des Fusionsprozesses [3]. Abbildung 7 zeigt unser Modell für die Konformationsumwandlung von gp41 von einem Zustand vor der Fusion zu einem intermediären Prä-Fusions-Zwischenzustand.

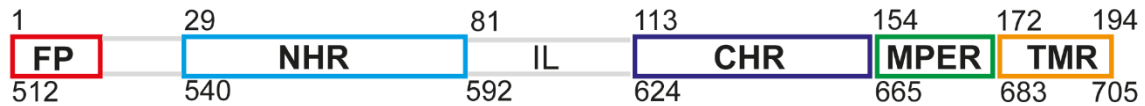


Abbildung 5 (adaptiert von [2]). Schematische Darstellung des untersuchten gp41 (1-194)-Konstruktes, einschließlich des Fusionspeptids (FP), der N-terminalen Heptad-Repeat-Region (NHR), der immundominanten Schleifenregion (IL), der C-terminalen Heptad-Repeat-Region (CHR), der membrannahen externen Region (MPER) und der Transmembranhelix (TM), die gp41 in der Virushülle verankert. Die Nummerierung 1-194 bezieht sich auf das gp41(1-194)-Konstrukt; die Nummerierung 512-705 bezieht sich auf die Position im Env-Vorläufer-Protein.

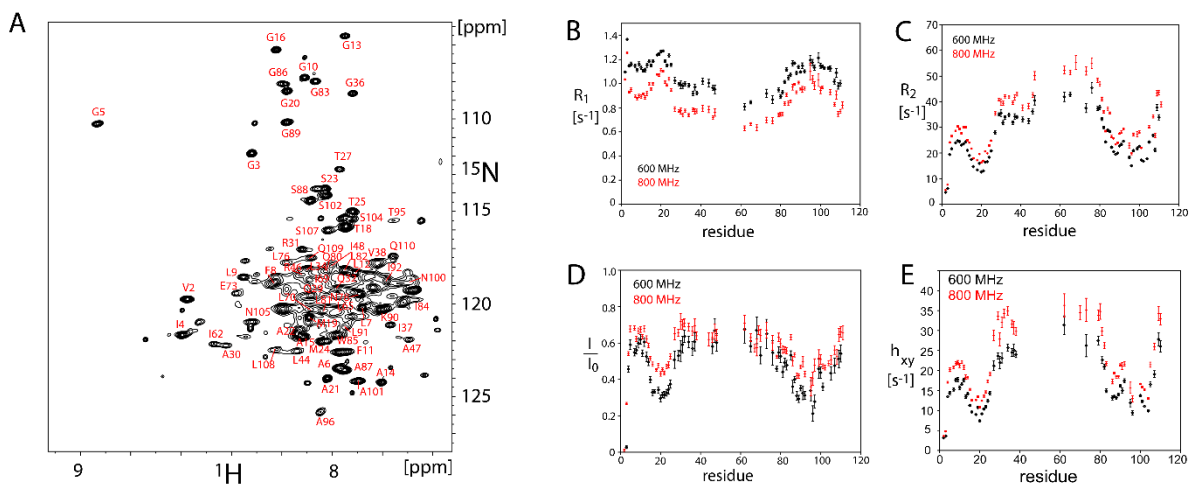


Abbildung 6 (adaptiert von [2]). 800 MHz ^1H ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrum und ^{15}N -Relaxationsdaten, aufgenommen für das gp41 (1-194)-Konstrukt in DPC-Mizellen. A) 800 MHz ^1H ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektrum von $500\ \mu\text{M}$ ^2H , ^{15}N , ^{13}C gp41(1-194) in DPC-Mizellen, 50 mM Natriumacetat, 25 mM KCl, pH 4.0 aufgenommen bei 40°C . B) ^{15}N R_1 -Relaxationsdaten, aufgenommen bei 600 MHz (schwarz) und 800 MHz (rot). C) ^{15}N R_2 -Relaxationsdaten bei 600 MHz (schwarz) und 800 MHz. D) $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE-Werte. e) Transversale CSA-dipolare kreuzkorrelierte Relaxationsraten η_{xy} .

Meine Arbeiten während meines Postdoc-Aufenthaltes am NIH waren die ersten Untersuchungen an einem größeren Konstrukt des HIV-1 Membranproteins gp41. Diese Forschung hat weitere Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Dr. Ad Bax (NIH) angestoßen, die bis heute fortgeführt werden⁹⁶⁻⁹⁹. Unsere Lösungs-NMR-Ergebnisse motivierten auch die Arbeitsgruppen von Prof. James Chou an der Harvard Medical School (Boston, USA) und Prof. Mei Hong (MIT, Boston) mit Lösungs-NMR bzw. Festkörper-NMR Studien an HIV-1 gp41 zu beginnen.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵

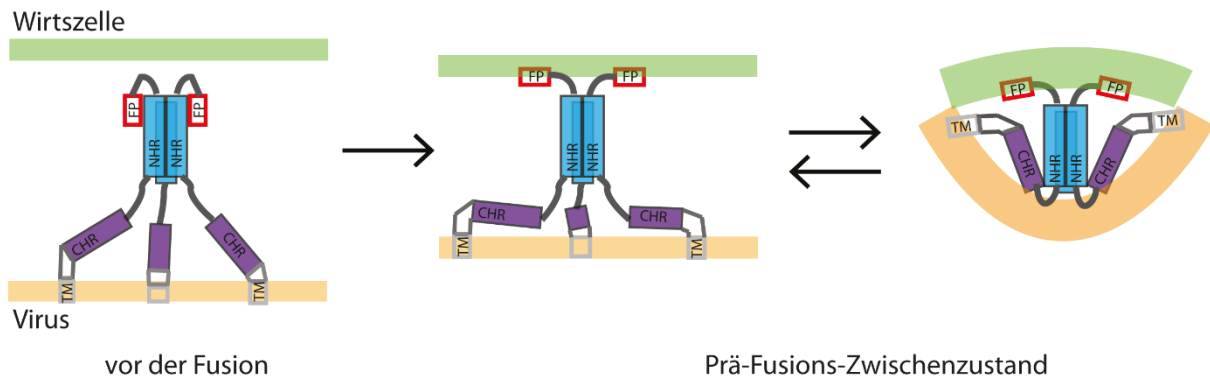


Abbildung 7 (adaptiert von [3]). Das Modell zeigt die Konformationsumwandlung von gp41 von einem Zustand vor der Fusion zu einem Prä-Fusions-Zwischenzustand. Die Membran der Wirtszelle ist grün dargestellt, die Virusmembran gelb. Die Abkürzungen FP, NHR, CHR und TM stehen für das Fusionspeptid, die N-terminale Ektodomäne (englisch: N-terminal Heptat Repeat), die C-terminale Ektodomäne (englisch: C-terminal Heptat Repeat) und die Transmembranregion.

OmpX (Publikation [5])

An der ETH Zürich untersuchten wir die strukturelle Dynamik des β -Barrel Membranproteins OmpX in verschiedenen Membranmimetika und stellten dabei Einflüsse auf die strukturelle Dynamik fest [5]. OmpX ist ein Virulenzfaktor, der in der äußeren Membran von *E. coli* vorkommt und ein achtsträngiges antiparalleles β -Barrel bildet^{106,107}. Mit aminosäurespezifischer Auflösung konnten wir zeigen, dass OmpX zwar ein stabiles β -Barrel in n-Dodecylphosphocholin (DPC)-Detergenzmizellen, 1,2-Diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DHPC)/1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC)-Bizellen und DMPC-Nanodiscs ausbildet, die Bewegungen im Piko- bis Nanosekunden- sowie im Mikro- bis Millisekundenbereich jedoch erheblich zwischen der Detergenz- und der Lipidumgebung variieren. Insbesondere die β -Stränge zeigen eine ausgeprägte dynamische Variabilität in der Lipidumgebung, während diese Dynamik in Mizellen unterdrückt scheint. Dieses unerwartet komplexe und von der Membranmimetik abhängige dynamische Verhalten deutet darauf hin, dass der häufige Verlust der Membranproteinaktivität in Detergenzien mit einer reduzierten inneren Dynamik zusammenhängen könnte und die Membranproteinaktivität eng mit der Dynamik in der Lipidumgebung korreliert [5].

3.3. Entwicklung und Anwendung von neuartigen protonen-detektierten Festkörper-NMR-Methoden, die eine Untersuchung der strukturellen Dynamik des Proteinrückgrats von Membranproteinen in einer natürlichen Lipid-Umgebung ermöglichen. (Publikationen [6], [7], [9] und [10])

Nach der Einführung der Protonendetektion in der biologischen NMR-Spektroskopie durch Reif, Rienstra und Mitarbeitende³³⁻³⁶ sowie durch neue technische Fortschritte beim Bau von Magic-Angle-Spinning (MAS) Festkörper-NMR-Probenköpfen, die immer schnellere MAS-Frequenzen ermöglichen, konnten die anisotropen Wechselwirkungen und die damit verbundene Linienverbreiterung so weit reduziert werden, dass Protonendetektion für die Festkörper-NMR möglich wurde. Bei MAS-Frequenzen von 100 kHz wird die Linienbreite nahezu linear zur MAS-Frequenz reduziert – je schneller die Drehung, desto schärfer die Linien. Dadurch wird die Protonendetektion für vollständig protonierte Proben möglich^{108,109}. Gegenwärtig werden NMR-Strategien der Lösungs-NMR auf die Festkörper-NMR übertragen. An der ETH Zürich war ich maßgeblich an der Entwicklung dieser neuen Technik beteiligt [6, 7, 9, 10]. Protonen-detektierte Festkörper-NMR-Experimente bei einer MAS-Frequenz von 100 kHz erfordern nur Sub-Milligramm-Mengen an Proteinproben und bieten eine Empfindlichkeit, die mit der standardmäßiger ¹³C-detektierter Experimente bei niedrigen MAS-Frequenzen vergleichbar ist (die jedoch 20-40 mal mehr Probe benötigen). Diese erhöhte Effizienz ist auf das höhere gyromagnetische Verhältnis von Protonen im Vergleich zu ¹³C, die geringere Linienbreite bei schnellen MAS-Frequenzen sowie den besseren Füllfaktor der NMR-Spule bei kleineren, für schnelles MAS geeigneten Rotoren zurückzuführen^{108,109}. Durch die Kombination von Protonendetektion und schnellem MAS konnte die benötigte Probenmenge um etwa den Faktor 20 reduziert werden, was auch die Kosten für die Probenherstellung erheblich senkt. Damit werden nun auch schwer zu exprimierende Proteine, wie viele Membranproteine, zugänglich für die Festkörper-NMR-Analyse¹¹⁰.

Untersuchung der Proteindynamik mit Protonen-detektierter Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schnellen MAS-Frequenzen (Publikation [6])

An der ETH Zürich habe ich einen neuen Ansatz zur Detektion von Proteindynamik auf der schnellen Mikrosekunden-Zeitskala entwickelt, basierend auf MAS-abhängigen Festkörper-NMR ¹⁵N R_{1ρ}-Relaxationsexperimenten bei sehr schnellen MAS-Frequenzen (60-110 kHz). In der Festkörper-NMR-Spektroskopie, in der die rotatorische Diffusion entweder fehlt oder langsamer als die spektrale Zeitskala (> 10 ms) ist, hängen ¹⁵N R_{1ρ}-Relaxationsexperimente von der MAS-Frequenz ab.¹¹¹ Bei MAS-Frequenzen von 100 kHz sind diese Experimente für Zeitskalen von Hunderten von Nanosekunden bis wenigen Mikrosekunden sensitiv, die mit Lösungs-NMR nur schwer zu charakterisieren sind (vgl. Abbildung 8).

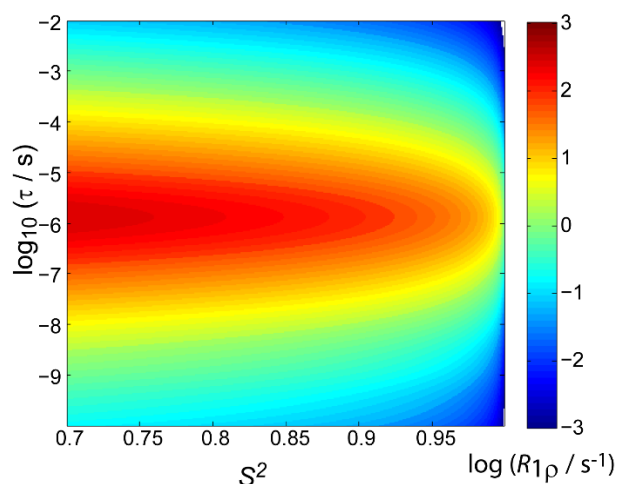


Abbildung 8 (adaptiert von [6]). Empfindlichkeit der MAS-abhängigen ^{15}N $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten gegenüber Proteindynamik. Die ^{15}N $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten sind als Funktion des Ordnungsparameters S^2 und der Korrelationszeit τ dargestellt, unter den experimentellen Bedingungen von 110 kHz MAS-Frequenz und einer Spinlock-Radiofrequenz (RF)-Amplitude von 13 kHz.

Durch MAS-frequenzabhängige ^{15}N $R_{1\rho}$ -Messungen (60-110 kHz) und einen vereinfachten „Model-free“-Ansatz konnten wir Aminosäurereste-spezifische Korrelationszeiten für mikrokristallines Ubiquitin bestimmen (Abbildung 9). Das Protein zeigte eine Dynamik mit kleiner Amplitude auf einer Zeitskala von etwa 1 μs , die über das gesamte Protein verteilt ist [6]. Interessanterweise wurde diese „Rocking“-Bewegung auch unabhängig von Paul Schanda und Mitarbeitenden beobachtet, was unsere Ergebnisse bestätigte ¹¹². Zusätzlich konnten wir eine Dynamik mit größerer Amplitude auf der 1 μs -Zeitskala für mehrere Bereiche des Proteins, einschließlich der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Schleife (G10-T12) und des N-Terminus der α -Helix (E24 und N25), beobachten [6].

Wir konnten damit Proteindynamik in mikrokristallinem Ubiquitin in einem zuvor unzugänglichen sehr schnellen μs -Zeitfenster nachweisen [6]. Für die $\beta 1$ - $\beta 2$ -Schleife konnte eine erhöhte Amplitude der Dynamik bereits im Rahmen meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Griesinger am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie aus der Messung und Analyse Residualer Dipolarer Kopplungen (RDCs) in der Lösungs-NMR abgeleitet werden ^{113,114}. Nachfolgend wurde diese Zeitskala auf etwa 10 ± 9 μs bei Raumtemperatur eingegrenzt, wie aus Relaxationsdispersionsmessungen an unterkühlten Proben und dielektrischen Relaxationsexperimenten extrapoliert wurde ¹¹⁵. Auch in mikrokristallinem Ubiquitin ist eine Dynamik auf dieser Zeitskala zu beobachten, jedoch mit geringerer Amplitude, was vermutlich auf die Restriktionen im mikrokristallinen Zustand zurückzuführen ist.

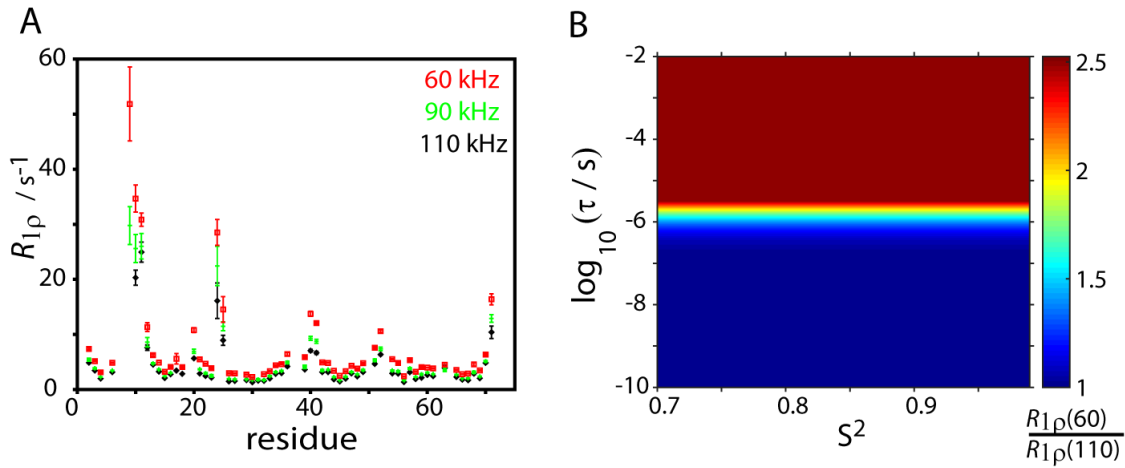


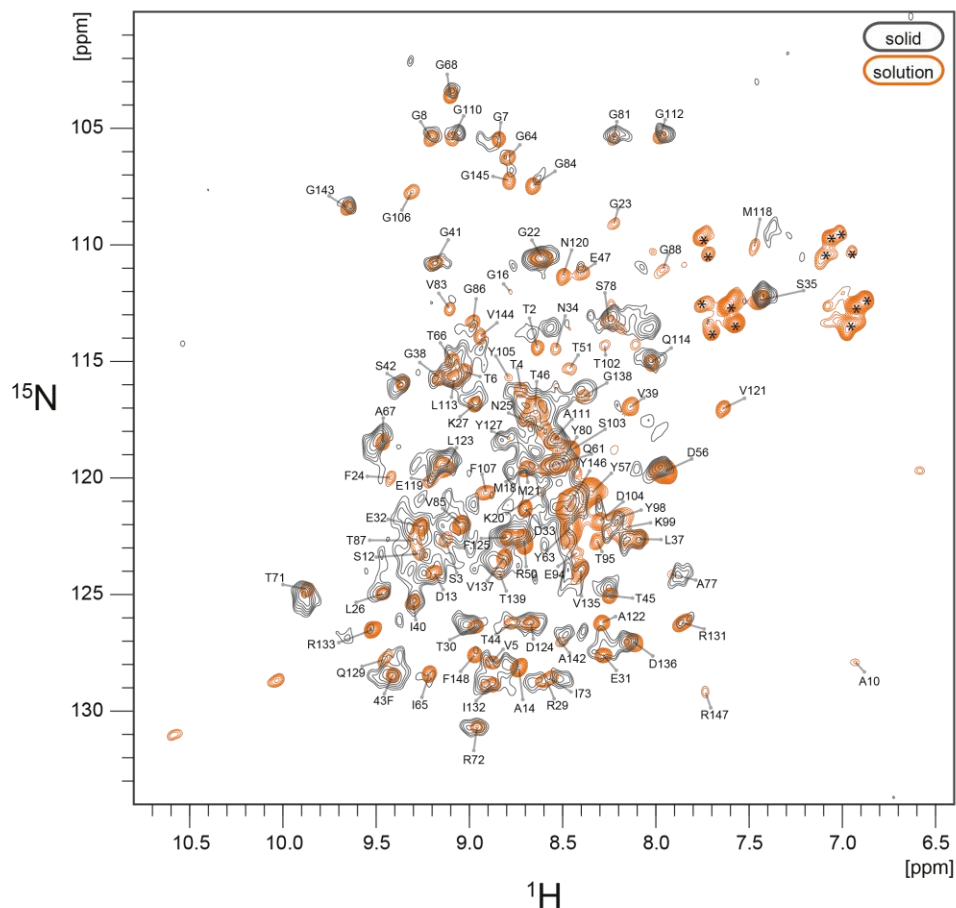
Abbildung 9 (adaptiert aus [6]). Messung und Analyse der ^{15}N $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten in mikrokristallinem Ubiquitin. (A) ^{15}N $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten für $[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -markiertes Ubiquitin, bei dem 100 % der NH- und austauschbaren Seitenkettenprotonen protoniert sind. Die Experimente wurden bei 850 MHz und $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durchgeführt, die Spinlock-RF-Amplitude betrug 13 kHz, die MAS-Frequenzen betrugen 60 kHz (rot), 90 kHz (grün) und 110 kHz (schwarz). (B) Simuliertes Verhältnis der ^{15}N $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten bei 60 kHz MAS gegenüber 110 kHz MAS, $R_{1\rho}(60 \text{ kHz})/R_{1\rho}(110 \text{ kHz})$ (mit einer festen Spinlock-RF-Amplitude von 13 kHz) als Funktion des Ordnungsparameters S^2 und der Korrelationszeit τ_c (logarithmische Skala) [6].

Untersuchung von Membranproteinen in einer Lipidumgebung mittels Protonen-detektierter Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schnellen MAS-Frequenzen (Publikationen [7], [9] und [10])

Das β -Barrel Membranprotein OmpX in Lipid-Nanodiscs (Publikation [7])

Um die Anwendbarkeit der protonen-detektierten Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schnellen MAS-Frequenzen für Membranproteine in einer natürlichen Lipidumgebung zu demonstrieren, habe ich an der ETH Zürich Lösungs-NMR- und Festkörper-NMR-Spektren des E. coli β -Barrel-Membranproteins OmpX in Lipid-DMPC/DMPG-Nanodiscs aufgenommen (vgl. Kapitel 3.2). Zunächst wurden Lösungs-NMR-Spektren gemessen, anschließend wurde die Probe durch Zentrifugation in den MAS-Rotor sedimentiert und Festkörper-NMR-Spektren bei einer MAS-Frequenz von 100 kHz aufgenommen [7].

Die auf Kreuzpolarisation basierenden protonendetektierten Festkörper-NMR- $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -Korrelationsspektren von $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem OmpX (Amide protoniert), eingebettet in Lipid-DMP/DMPG-Nanodiscs, wurden bei 20 T (entsprechend einer Protonen-Larmor-



Für die Festkörper-NMR-Spektren wurden 8 nmol (0,14 mg) der OmpX-Probe verwendet. Die Festkörper-NMR-Spektren zeigten eine ^1H -Linienbreite von 40 bis 80 Hz für die meisten Resonanzen. Zusätzlich konnten Resonanzen aus dem Transmembranbereich sichtbar gemacht werden. Darüberhinaus verdeutlicht die Überlagerung der zweidimensionalen Festkörper-NMR und Lösungs-NMR [^1H , ^{15}N]-Korrelationsspektren von OmpX ihre große Ähnlichkeit (Abbildung 10). Solche [^1H , ^{15}N]-Korrelationsspektren sind wie ein “Fingerabdruck” und reagieren sehr empfindlich auf äußere (chemische) Einflüsse (wie z.B. Pufferbedingungen). Daraus schließen wir, dass sich OmpX in Lipid-Nanodiscs in einem sehr ähnlichen Zustand befindet, unabhängig davon, ob in Lösung oder in einem Festkörper-NMR-Rotor unter schnellem Drehen um den magischen Winkel (hier 100 kHz MAS-Frequenz).

Wie in einer nachfolgend erschienenen Übersichtsarbeit von Schubeis et al. beschrieben³⁹, gehören unsere NMR-Spektren zu den am besten aufgelösten ^1H -Festkörper-NMR-Spektren von Membranproteinen (Abbildung 11).

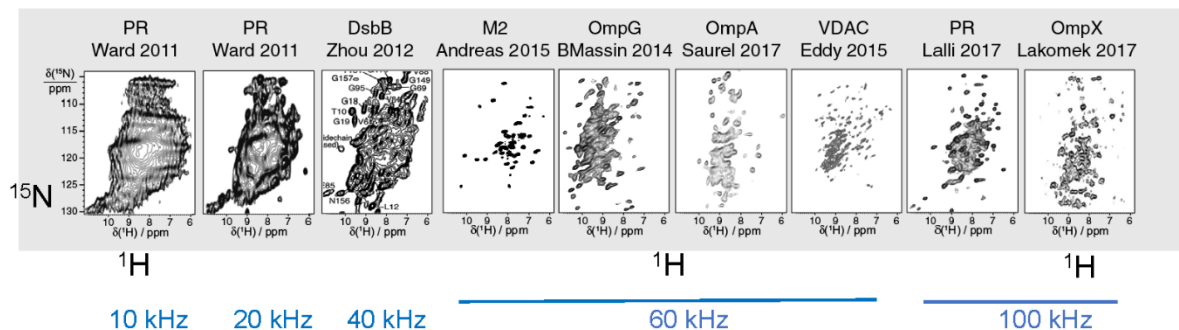


Abbildung 11 (adaptiert von Schubeis et al.³⁹). Übersicht über publizierte Festkörper $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -Korrelationsspektren von Membranproteinen, die bei verschiedenen MAS-Frequenzen gemessen wurden.

Das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B) des Hepatitis-C-Virus (Publikation [9])

Weiterhin war ich an der Untersuchung des Nichtstrukturproteins 4B (NS4B) des Hepatitis-C-Virus (HCV) mittels Protonen-detektierter Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schnellen MAS-Frequenzen beteiligt. Das Nichtstrukturprotein 4B (NS4B) des Hepatitis-C-Virus (HCV) spielt eine zentrale Rolle bei der Replikation des viralen Genoms und dem Zusammenbau von Virionen¹¹⁶⁻¹¹⁹. NS4B ist ein Transmembranprotein, das aus 261 Aminosäureresten besteht und als oligomeres, α -helikales Transmembranprotein mit drei Subdomänen beschrieben wird¹²⁰⁻¹²². Die zentrale Subdomäne von NS4B enthält vier vorhergesagte Transmembransegmente¹²³, während die N- und C-terminalen Subdomänen vermutlich jeweils aus zwei amphipathischen Helices bestehen, die mit der Membranoberfläche interagieren. Bisherige Strukturinformationen beschränken sich auf die isolierten amphipathischen Helices am N- und C-Terminus, die mittels NMR-Spektroskopie in Lösung untersucht wurden.

Da NS4B in konventionellen Systemen wie *E. coli* schwer in großen Mengen zu exprimieren ist, wurde es zellfrei in Weizenkeimextrakten hergestellt, über einen Detergenz-Zwischenschritt solubilisiert und schließlich in Liposomen rekonstituiert (durchgeführt von meinem Kollegen Vlastimil Jirasko). Anschließend führten wir ein Screening verschiedener Lipidumgebungen durch, um mittels zweidimensionaler $[\text{}^1\text{H}-\text{}^{15}\text{N}]$ -NMR-Spektren die optimale spektrale Auflösung zu ermitteln (Abbildung 12). Dabei zeigte sich, dass die geringste Linienbreite auf eine Abnahme der inhomogenen statt der homogenen Linienbreite zurückzuführen ist.

Unter optimierten Bedingungen (Phosphatidylcholin (PC): Cholesterol = 70:30) konnten wir 2D- und 3D- ^1H -detektierte Korrelationsspektren sowohl an vollständig als auch selektiv markiertem NS4B aufnehmen und begannen mit der sequentiellen Zuordnung der NMR-Signale zu den Aminosäureresten entlang des Proteinrückgrats. Wir stellten außerdem fest, dass die optimale Lipidumgebung stark von der Schmelztemperatur der Lipide abhängt, die den Übergang von der gelartigen zur flüssigen Phase der Lipiddoppelschicht bestimmt. Diese sollte idealerweise in der Nähe der Messtemperatur liegen, die in der Regel im Bereich der Raumtemperatur liegt und ein Kompromiss aus der Erwärmung durch Reibungswärme und der Kühlung durch den Stickstoffstrom darstellt.

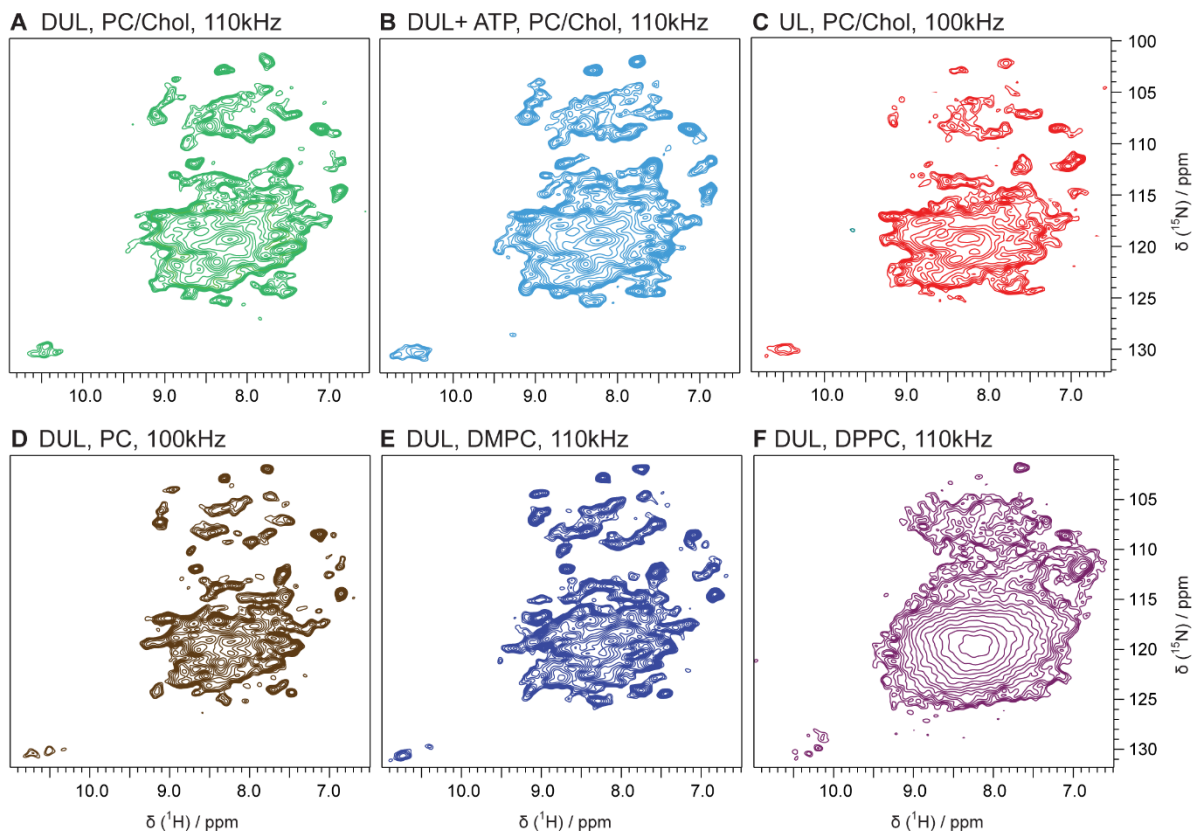


Abbildung 12 (adaptiert aus [9]). Zweidimensionale [^1H , ^{15}N]- Festkörper-NMR-Spektren von NS4B in verschiedenen Lipidumgebungen (rekonstituiert in Liposomen): A)-C) PC/Chol, D) PC, E) DMPC und F) DPPC. In den Spektren A), B), D), E), F) wurde deuteriertes uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertes (dUL) NS4B und in C) uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertes NS4B verwendet. Die Spektren wurden bei 850 MHz und einer MAS-Frequenz von 110 kHz und ca. 23°C aufgenommen.

Das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) des Hepatitis-C-Virus

Das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) des Hepatitis-C-Virus ist ein membrangebundenes Protein mit 447 Aminosäuren, das eine zentrale Rolle bei der Bildung der Replikationsorganelle des Virus in Form sogenannter Doppelmembranvesikel (DMV) spielt^{124,125}. Antivirale

Medikamente, die auf NS5A abzielen, sind mittlerweile ein Eckpfeiler der antiviralen Therapie bei Hepatitis C. Der Wirkmechanismus dieser Medikamente auf molekularer Ebene ist jedoch noch weitgehend unverstanden¹²⁶.

Das von uns untersuchte NS5A AH-D1-Konstrukt, das sowohl die N-terminale amphipathische Helix (AH-Domäne) als auch die D1-Domäne umfasst, war das erste und längste NS5A-Konstrukt, das bis dahin in einer Lipidumgebung detailliert untersucht wurde (Abbildung 13). Die Analyse der NMR-Spektren zeigte, dass sowohl der N-terminale AH-Membrananker als auch die Linkerregion flexibel sind. Mithilfe von durch Paramagnetismus verstärkter Relaxation (PRE, für "paramagnetic relaxation enhancement") konnten wir nachweisen, dass die Dimeranordnung in Gegenwart der Membran anders ist als bisher angenommen. Da die klinisch verwendeten NS5A-Inhibitoren sehr wahrscheinlich mit der Dimerstruktur von NS5A interagieren, sind unsere Ergebnisse auch aus pharmazeutischer Sicht von hoher Relevanz.

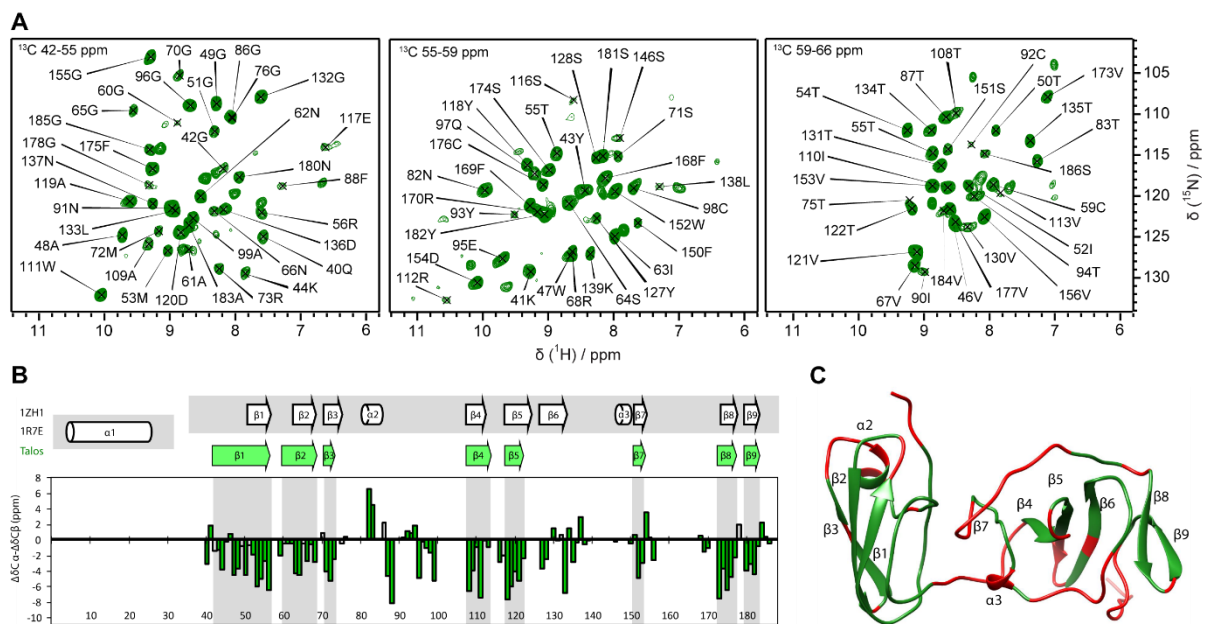


Abbildung 13 (adaptiert von [10]). Zuordnung der NMR-Resonanzen der AH-D1-Domänen von NS5A. A) Ebenen aus drei Abschnitten des hCANH-Spektrums. B) NS5A-AHD1 sekundäre chemische Verschiebungen ($\Delta\delta C\alpha$ ($-\Delta\delta C\beta$)), negative Werte kennzeichnen β -Stränge. Die aus den sekundären chemischen Verschiebungen mittels TALOS+¹²⁷ bestimmte Sekundärstruktur ist entlang der Sequenz in grün und die aus der Röntgenstruktur¹²⁸ (PDB 1zh1) abgelesene Sekundärstruktur in weiß dargestellt. Die N-terminale Helix¹²⁹ (PDB 1r7E) ist ebenfalls weiß eingefärbt. Graue Kästen geben die Länge der N-terminalen AH-Domäne bzw. der daran anschließenden Domäne D1 an. Graue Balken im Diagramm zeigen Glycinreste an. C) Sequentiell zugeordnete Aminosäurereste sind grün eingefärbt, nicht zugeordnete rot. Das gezeigte Strukturmodell des Monomers ist ein Homologiemodell, basierend auf der Röntgenstruktur (PDB 1zh1¹²⁸).

3.4. Untersuchung der strukturellen Dynamik von intrinsisch ungefalteten Proteinen, die mit Membranen interagieren, mittels Lösungs-NMR (Publikationen [4], [8] und [11])

3.4.1. Der bakterielle SRP-Rezeptor FtsY

Nach der Translation und Proteingenese am Ribosom im Zytoplasma müssen neu synthetisierte Membranproteine in die Membran eingebaut werden. Dieser Vorgang erfolgt über das Translocon, nachdem die Membranproteine vom Translocon als solche erkannt wurden. Die Erkennung erfolgt durch das Signalerkennungspartikel (englisch: Signal Recognition Particle, kurz: SRP) und den SRP-Rezeptor. SRP scannt die Ribosomen während der Translation und dirigiert die naszierenden Membranproteine über eine Wechselwirkung mit dem SRP-Rezeptor zum Translocon.

Dieser Mechanismus funktioniert in Bakterien ähnlich wie im Menschen. In Bakterien wird der SRP-Rezeptor als FtsY und das Translocon als SecYEG bezeichnet. Für die Funktionalität von FtsY, insbesondere zur Rekrutierung von SRP und zur Bildung des Transferkomplexes am Translocon, ist die Bindung an die Membran erforderlich¹³⁰⁻¹³³. Zwei Regionen von FtsY sind an der Lipidbindung beteiligt: die N-terminale A-Domäne und eine Region an der Schnittstelle zwischen A- und N-Domäne, die sogenannte Membran-Zielsequenz (MTS, englisch: Membrane Targeting Sequence) (Abbildung 14A), wie durch chemische Quervernetzungsexperimente gezeigt wurde^{130,134-138}. Diese Experimente zeigten auch, dass die A-Domäne an die exponierten zytosolischen C4/C5-Schleifen von SecY bindet^{139,140}. Im Gegensatz zur strukturierten N- und G-Domäne fehlte die A-Domäne in allen bekannten Strukturmodellen von FtsY, sei es ungebunden, im Komplex mit dem Translocon SecYEG oder in Kombination mit SRP, das an ein Ribosom mit naszierendem Protein gebunden ist¹⁴¹. Basierend auf H/D-Austausch-Experimenten wurde daher angenommen, dass die A-Domäne von FtsY intrinsisch ungeordnet ist^{136,142}.

Um die Wechselwirkungen der A-Domäne mit *E. coli*-Phospholipiden und SecYEG zu untersuchen, führten wir Lösungs-NMR- und Fluoreszenz-Messungen an FtsY durch, in voller Länge und an der isolierten FtsY A-Domäne (vgl. Abbildung 14). Die NG-Domäne war aufgrund ihrer Größe, verbunden mit Glycerin im Puffer und möglicherweise auch aufgrund von Oligomerisierung in den Lösungs-NMR-Spektren nicht sichtbar. Für die Untersuchung der Wechselwirkung waren die *E. coli*-Phospholipide und SecYEG in Lipid-Nanodiscs eingebettet. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die A-Domäne hochflexibel ist und die Eigenschaften eines intrinsisch ungeordneten Proteins (IDP) aufweist [4]. Unsere Daten legen nahe, dass die positiv geladene N-terminale Region der A-Domäne sowie die C-terminale Membran-Zielsequenz (MTS) an Phospholipide binden, vermutlich in einer α -helikalen Konformation. Die negativ geladene zentrale Region der A-Domäne bindet hingegen unspezifisch an das Translocon, was auf eine elektrostatische Wechselwirkung mit den positiv geladenen zytoplasmatischen Schleifen von SecY hindeutet.

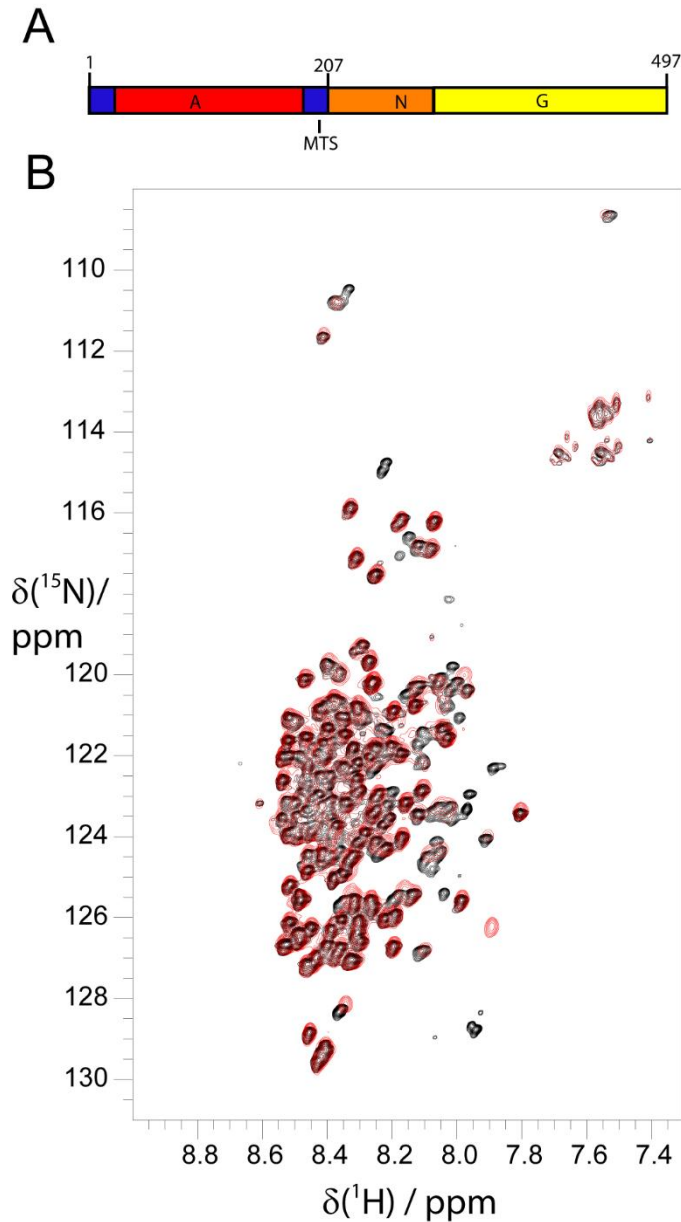


Abbildung 14. NMR-Untersuchung von FtsY und FtsY-A207. A) Domänen-Struktur von FtsY. B) Überlagerung der ^1H - ^{15}N 2D TROSY-HSQC-Spektren von $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem FtsY (rot) und FtsY-A207 (schwarz).

3.4.2. Strukturelle Dynamik und Lipid-Interaktionen der SNARE-Proteine Synaptobrevin-2 und SNAP25

SNARE-Proteine

Die neuronale Exozytose lässt sich in drei aufeinander folgende Schritte unterteilen: Andocken der Vesikel, Priming und Fusion. Die Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Plasmamembran wird durch die Bildung des N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor-Attachment-Rezeptor (SNARE)-Komplexes angetrieben¹⁴³. Der neuronale SNARE-Komplex besteht aus drei Proteinen: Synaptobrevin-2 (Syb-2), auch bekannt als VAMP-2 (für Vesicle Associated

Membrane Protein 2), das in in der Vesikelmembran verankert ist, sowie dem Synaptosomalen Nerven-assoziierten Protein 25a (SNAP-25a) und Syntaxin-1a (Syx-1a), die beide in der Plasmamembran verankert sind. Jedes dieser Proteine enthält ein Heptad-Repeat-Motiv, das sogenannte SNARE-Motiv (wobei SNAP-25a zwei solcher Motive besitzt).

Im aktuellen Modell wird die Fusion durch das N- bis C-terminale Zusammenziehen der SNARE-Motive von Syb-2, SNAP25 und Syx-1a angetrieben, ähnlich wie bei einem Reißverschluss. Dabei bildet sich ein Vier-Helix-Bündel, der SNARE-Komplex, welcher die vesikuläre Membranfusion fördert (Abbildung 15).

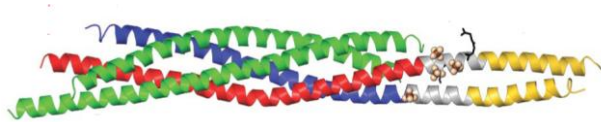


Abbildung 15 (adaptiert von Stein et al. ¹⁴⁵). Kristallstruktur des Vier-Helix-Bündels des SNARE-Komplexes (PDB-Code: 3HD7). Syntaxin-1a (rot) und SNAP-25a (grün) befinden sich an der Plasmamembran, während Synaptobrevin-2 (blau) in der Vesikelmembran verankert ist. Der Transmembranbereich ist gelb gefärbt.

In den hier vorgestellten Arbeiten wurden Syb-2 und SNAP-25a in ihrem monomeren Zustand vor der Fusion untersucht [8, 11]. **Abbildung 16** zeigt das Domänen-Schema beider Proteine.

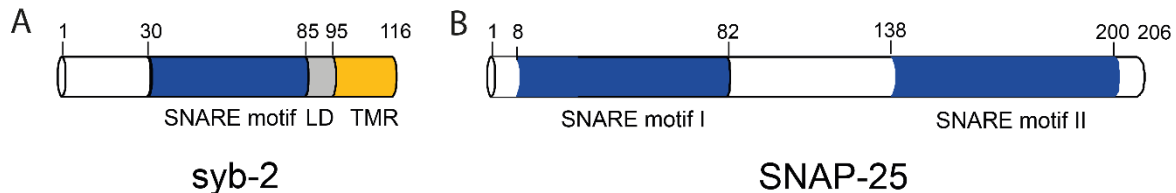


Abbildung 16. Domänen-Schema der SNARE Protein (A) Synaptobrevin-2 (116 Aminosäurereste, insgesamt ein SNARE-Motiv und eine Tranmembranregion). (B) SNAP25 (206 Aminosäurereste, zwei SNARE Motive). LD kennzeichnet die die Linker Domäne und TMR die Transmembranregion.

Strukturelle Dynamik und Lipid-Interaktionen von Synaptobrevin-2 (Syb-2)

Der genaue Mechanismus, wie die SNARE-Proteine mit Lipiden interagieren, um die Verschmelzung der Vesikel- und Plasmamembran zu fördern und die Bildung der Fusionsporen zu initiieren, ist bislang nur unzureichend verstanden. Verschiedene alternative Modelle wurden hierzu vorgeschlagen^{143,144}. Eine zentrale offene Frage ist, wie die SNARE-Proteine mit Membranen in ihren Präfusions- und Fusionszuständen interagieren und wie diese Interaktionen den "SNARE-Reißverschluss" sowie die Membranfusion beeinflussen können¹⁴⁵. Eine NMR-Studie an Synaptobrevin-2 (Syb-2), das in DPC-Detergenzmizellen rekonstituiert wurde, zeigte, dass das SNARE-Motiv von Syb-2 an die Mizellenmembran bindet und eine zusätzliche α -helikale Region ausbildet¹⁴⁶. Im Gegensatz dazu legten NMR-Experimente an Syb-2, das in Liposomen rekonstituiert wurde, nahe, dass das SNARE-Motiv intrinsisch ungeordnet bleibt und keine Lipidbindung zeigt¹⁴⁷. Dieser scheinbare Widerspruch ist von

großer Bedeutung, da er entscheidende mechanistische Konsequenzen für die Art und Weise hat, wie der SNARE-Komplex die Membranfusion einleitet.

Um diesen Widerspruch aufzuklären, haben wir Syb-2 in voller Länge in Liposomen rekonstruiert und untersucht, sowie Syb-2 (1-96), das nicht die C-terminale Transmembranregion umfasst. Mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie und Fluoreszenzmessungen (durchgeführt von Dr. Angel Perez-Lara) konnten wir die strukturelle Dynamik und die Lipidinteraktionen von Syb-2 charakterisieren [8]. Die NMR-Daten zeigten, dass der größte Teil von Syb-2 (1-116) weiterhin sichtbar und daher ungeordnet bleibt, selbst wenn Syb-2 über seine Transmembranregion (TMR) in Liposomen verankert ist. Interessanterweise verschwanden bei Syb-2 (1-116) sowie bei Syb-2 (1-96), das die TMR nicht enthält, mehrere NMR-Signale in Gegenwart von Lipiden (Abbildung 17B und C) im Vergleich zur ungebundenen Form von Syb-2 (1-96) in Abwesenheit von Lipiden (Abbildung 17A). Dies lässt eindeutig darauf schließen, dass Syb-2 auch in anderen Regionen als der TMR an Lipide bindet. Damit widersprechen unsere Ergebnisse der bisherigen Annahme, dass Syb-2 ausschließlich über die TMR in der Lipidmembran verankert ist¹⁴⁷.

(Anmerkung und Ausführung zur NMR-Spektroskopie: Alles, was an das Liposom gebunden ist, wird aufgrund des hohen Molekulargewichts der Liposomen und der daraus resultierenden langen rotatorischen Korrelationszeit und dementsprechend schnellen transversalen Relaxation in der Lösungs-NMR nicht sichtbar sein. Intrinsisch ungeordnete Teile des Proteins sind jedoch aufgrund ihrer hohen intrinsischen Flexibilität dynamisch entkoppelt und haben wegen ihrer schnellen internen Dynamik sehr günstige Relaxationseigenschaften. Deshalb bleiben sie sichtbar, selbst wenn ein Teil des Proteins an ein System mit größerem Molekulargewicht gebunden ist, das für die Lösungs-NMR unsichtbar ist).

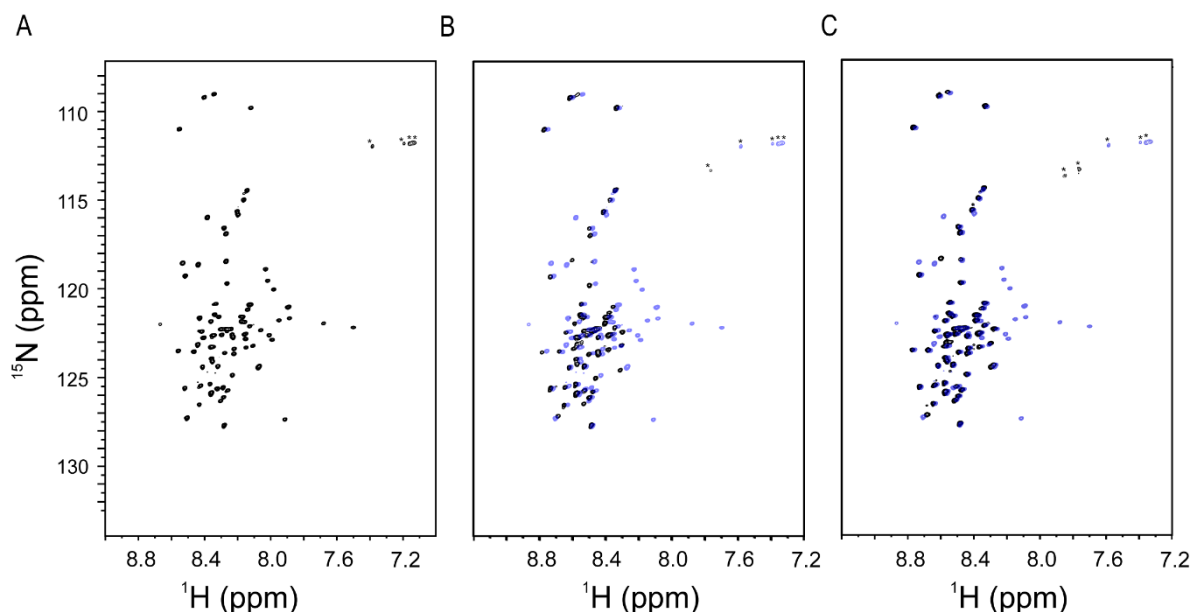


Abbildung 17 (adaptiert von [8]): Lipid-Wechselwirkungen des SNARE-Proteins Syb-2. Alle ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC-Spektren wurden bei 800 MHz und 5°C aufgenommen. A) Spektrum von 200 μM ^2H , ^{13}C , ^{15}N Syb-2 1-96 (ohne den Transmembranbereich), gelöst in 20 mM MES-Puffer, 250 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM TCEP, pH=6,1. B) Spektrum von 75 μM ^2H , ^{13}C , ^{15}N Syb-2 (1-116) (schwarz, einschließlich der Transmembranregion), rekonstituiert in kleinen Liposomen, die aus einer

Lipidmischung von PC: PE: PS: Chol = 5:2:2:1 bestehen, in 20 mM HEPES, 150 mM KCl und 0,1 mM TCEP, pH=7,4 (bei 5°C). Das Lipid:Protein-Verhältnis betrug 100:1. Zum Vergleich ist das Spektrum von Syb-2 (1-116) (schwarz) mit dem Spektrum von Syb-2 (1-96) (blau) aus Bild (A) überlagert. C) Spektrum von 20 μM ^2H , ^{13}C , ^{15}N Syb-2 (1-96) (schwarz) in Gegenwart von Liposomen (PC: PE: PS: Chol = 5:2:2:1), verglichen mit dem Spektrum von Syb-2 (1-96) ohne Lipide (blau).

Die Untersuchungen mittels einer Kombination von NMR-Relaxations- und Lipidbindungsstudien sowie Fluoreszenzmessungen (in konstantem und gestopptem Fluss) zeigten, dass Syb-2 in seiner monomeren Form vor der Fusion eine zunehmende Steifigkeit vom N- zum C-Terminus aufweist. Diese Steifigkeit korreliert mit einer erhöhten Lipidbindungsaffinität (Abbildung 18). Wir fanden Hinweise auf das Vorhandensein einer lipidgebundenen Konformation des SNARE-Motivs, die im Austausch mit einer intrinsisch ungeordneten, ungebundenen Konformation steht [8].

Unsere Ergebnisse haben wichtige Konsequenzen für bestehende Fusionsmodelle, die bisher davon ausgehen, dass Syb-2 ausschließlich über seine Transmembranregion in der Lipidmembran verankert ist und sonst keine weiteren Interaktionen mit der Lipidmembran eingeht. Diese Annahme wurde durch unsere Ergebnisse widerlegt, was nahelegt, dass die bisherigen Modelle der Membranfusion, insbesondere in Bezug auf die Lipid-Wechselwirkungen der SNARE-Proteine, überarbeitet werden müssen.

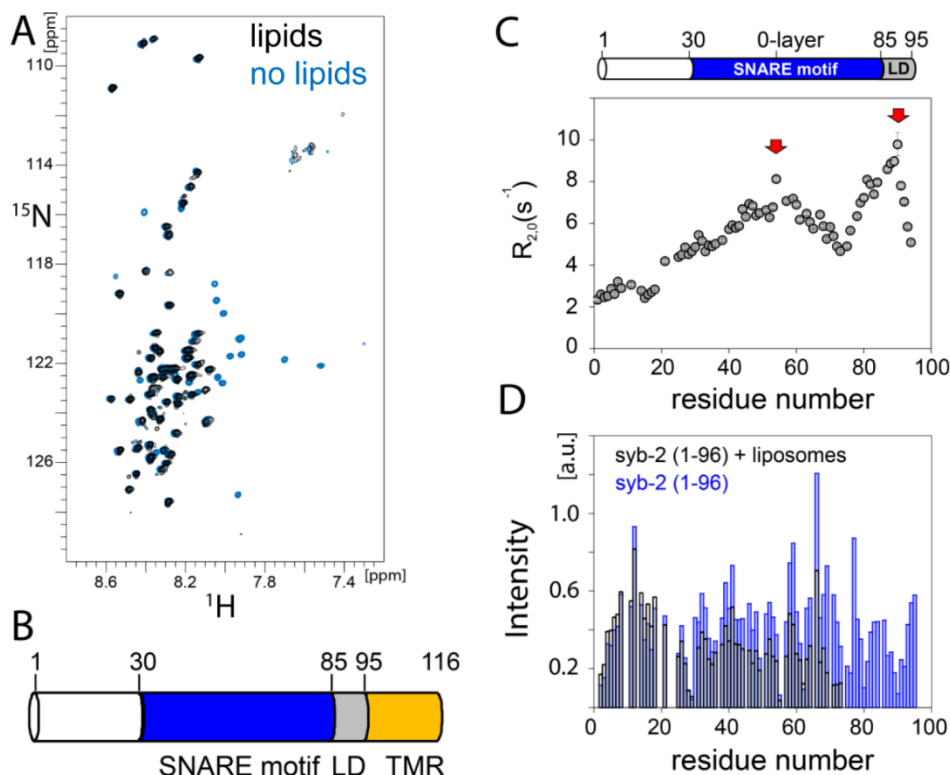


Abbildung 18 (adaptiert von [8]). Übersicht über die wesentlichen Lösungs-NMR-Ergebnisse an Syb-2. A) ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC an Syb-2 (1-96) in Gegenwart/Abwesenheit von Liposomen. B) Schematische Darstellung der Syb-2-Domänen. C) ^{15}N R_2 -Relaxationsdaten von Syb-2 (1-96). D) Intensitätsdiagramm der in A gezeigten Spektren.

Strukturelle Dynamik von SNAP25a

Das synaptosomale nerven-assoziierte Protein 25 (SNAP25) ist ein lösliches Protein mit 206 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 23,3 kDa. Im Gegensatz zu Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1a besitzt SNAP25 keinen Transmembrananker, sondern ist durch die Palmitylierung von vier Cystein-Resten an der Plasmamembran verankert^{148,149}. Es existiert in zwei Isoformen, SNAP25a und SNAP25b, die sich in 9 Aminosäuren unterscheiden¹⁵⁰. Interessanterweise werden diese Isoformen in verschiedenen Entwicklungsstadien des Nervensystems unterschiedlich exprimiert: SNAP25a vor allem im embryonalen Stadium und SNAP25b postnatal. Vor Beginn unserer Untersuchungen lagen keine experimentellen Strukturinformationen zu SNAP25 in seiner monomeren, nicht assemblierten Konformation vor der Fusion vor.

In meiner Arbeitsgruppe an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU) haben wir die Sekundärstruktur und strukturelle Dynamik von monomerem SNAP-25a mittels Lösungs-NMR, Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, in Kooperation) untersucht. Die SAXS-Daten zeigen, dass monomeres SNAP-25a kompakter als eine frei bewegliche Aminosäurekette vorliegt, jedoch immer noch die Charakteristika eines ungefalteten Knäuels aufweist. Mit NMR konnten wir für SNAP25a feststellen, dass nur der N-terminale Bereich (Aminosäuren A5 - V36) des ersten SNARE-Motivs (SN1, L11 - L81) eine helikale Struktur ausbildet und zwei α -Helices umfasst (Abbildung 19). Ab der Position E37 ist SNAP25a größtenteils ungeordnet und weist eine hohe innere Flexibilität auf, einschließlich des C-terminalen Teils von SN1, nahezu des gesamten zweiten SNARE-Motivs (SN2, N144 - A199) sowie der verbindenden Schleifenregion. Abgesehen von den N-terminalen Helices zeigen nur die C-terminalen Bereiche von SN1 (E73 - K79) und SN2 (T190 - A199) sowie zwei kurze Regionen in der Verbindungsschleife (D99 - K102 und E123 - M127) eine schwach ausgeprägte α -helikale Struktur (mit einer α -helikalen Population von weniger als 25 %).

Wir vermuten, dass die N-terminalen Helices (A5 - Q20 und S25 - V36), die den N-terminalen Teil von SN1 bilden, als Nukleationsstelle für die Initiierung des SNARE-Reißverschlusses dienen könnten.

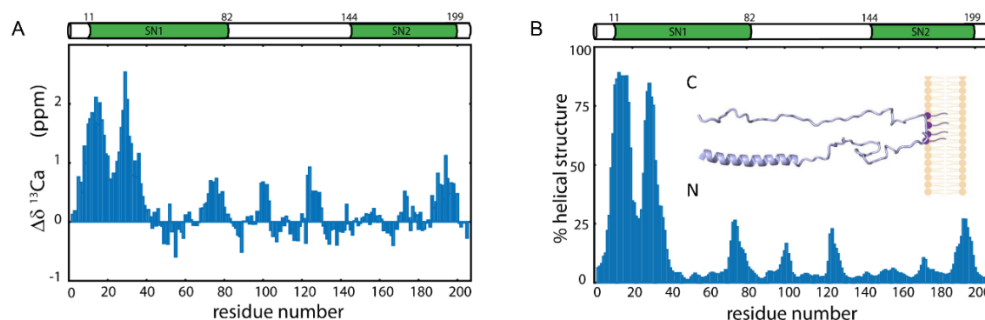


Abbildung 19 (adaptiert nach [11]). (A) Sekundäre Cα-chemische Verschiebungen entlang der Sequenz von SNAP-25a. Positive Werte ($> 0,5$ ppm) weisen auf α -Helikalität hin (Werte um etwa 3-4 ppm deuten auf eine stabile α -Helix hin). Negative Werte ($< -0,5$ ppm) deuten auf eine β -Faltblattstruktur hin. Werte zwischen -0,5 ppm und 0,5 ppm entsprechen einer Random-Coil-Charakteristik. (B) Balkendiagramm der prozentualen Helixpopulation von SNAP-25a (berechnet mit der Software CheSPI)¹⁵¹. Unsere Daten zeigen, dass SNAP25a größtenteils intrinsisch ungeordnet ist, mit Ausnahme der N-terminalen Region (A5 bis V36), die eine deutliche α -helikale Neigung aufweist und teilweise mit dem N-terminalen SNARE-Motiv SN1 überlappt. Dies wird im Modell innerhalb von (B) veranschaulicht.

4. Abschließende Zusammenfassung

Die in dieser kumulativen Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten entstanden während meiner Postdoktoranden-Zeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Ad Bax an den National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA), als unabhängiger DFG-Projektleiter am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Marie-Curie-Stipendiat an der ETH Zürich und als unabhängiger Heisenberg-Gruppenleiter an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und am Forschungszentrum Jülich.

Der biologische Fokus meiner in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten sind **Membranproteine** und **intrinsisch ungeordnete Proteine**, die an der viralen Membranfusion oder an der **Membranfusion** synaptischer Vesikel beteiligt sind. Ziel ist ein besseres Verständnis der strukturellen Dynamik dieser Proteine auf molekularer Ebene und mit Aminosäure-spezifischer Auflösung. Denn ein tieferes Verständnis der strukturellen Dynamik ermöglicht auch ein besseres Verständnis der Funktion dieser Proteine auf molekularer Ebene. Das bildet die Grundlage, um neue Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Medikamente bei neuronalen Störungen oder anti-virale HIV Fusionshemmer zu identifizieren.

Zur **Charakterisierung der strukturellen Dynamik** dieser Proteine mittels **Lösungs-NMR** und **Protonen-detektierter Festkörper-NMR-Spektroskopie bei schnellen MAS-Frequenzen** wurden u.a. **NMR-Relaxationsmethoden** weiterentwickelt [1, 6, 12]. Diese ermöglichen die Untersuchung der strukturellen Proteindynamik auf verschiedenen Zeitskalen. Essentielle Membraninteraktionen wurden untersucht. Die Durchführbarkeit strukturbioologischer Studien an Membranproteinen in einer Lipidumgebung mittels Protonen-detektierter Festkörper-NMR bei schnellen MAS-Frequenzen wurde für **Liposomen** und **Lipid-Nanodics** gezeigt [7, 9, 10]. Die entwickelten Methoden lassen sich auf eine Vielzahl von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung und intrinsisch ungeordneter Proteine anwenden.

Die vorgestellten Arbeiten tragen zu einem besseren Verständnis der strukturellen Proteindynamik der an Membranfusion beteiligten Proteine bei. Einen Schwerpunkt bilden hier das **HIV-1 Membranprotein gp41** und die **SNARE-Proteine** [2, 3, 8, 11], die eine zentrale Rolle bei der Fusion synaptischer Vesikel und der damit verbundenen Freisetzung von Neurotransmittern spielen. Zwischen beiden Proteinsystemen gibt es Parallelen hinsichtlich der Membranfusion, da beide die Membranfusion durch die Ausbildung kompakter Helixbündel vorantreiben.

Das HIV-1 Membranprotein gp41 bildet zusammen mit gp120 den Stachel (englisch „Spike“) auf der Hülle des Virus. Gp41 verursacht durch eine Konformationsänderung von einer ausgestreckten Präfusionsstruktur hin zu einem kompakten Sechshelixbündel die Membranfusion mit der Wirtszelle. Wenn man mit antiviralen Medikamenten, sog. Fusionshemmern, diese Konformationsänderung unterbinden kann, verhindert das die Membranfusion und letztendlich die Infektion. Das für die Lösungs-NMR-Experimente verwendete Membranproteinkonstrukt umfasste 194 Aminosäuren, und beinhaltete das Fusionspeptid, die N- und C-terminale Ektodomänen, die immundominante Schleife sowie die

Transmembranregion. Letztere hatte bis dahin in jeder anderen hochauflösenden Strukturstudie von HIV-1 gp41 gefehlt. Das untersuchte Konstrukt ist mit 66 kDa eines der größten Membranproteine, die bis dahin mittels Lösungs-NMR untersucht wurden. Mit Detergenzmizellen betrug die Gesamtmasse 180 kDa. Wir beobachteten eine hohe intrinsische Mobilität von gp41 auf mehreren Zeitskalen, sowohl auf der schnellen ps-ns Zeitskala, die man als Flexibilität des Proteins interpretieren kann, als auch auf einer μ s-Zeitskala, auf der strukturelle Umlagerungsprozesse und Konformationsänderungen stattfinden. U.a. konnten wir mit Relaxationsmessungen und der Bestimmung der sekundären chemischen Verschiebungen zeigen, dass das α -helikale Fusionspeptid durch einen transient α -helikalen Linker mit der zentralen Ektodomäne verbunden ist [2]. Unsere Daten deuten darauf, dass ein Prä-Fusions-Zwischenzustand vorliegt [3].

Zur Untersuchung der **strukturellen Dynamik des Proteinrückgrats** von Membranprotein/Membranmimetika-Komplexen war es nötig, die verwendeten NMR ^{15}N R_1 , R_2 ($R_{1\rho}$)-**Relaxationsexperimente** und heteronuklearen Nuklear Overhauser-Effekt Experimente auf Proteine bzw. Proteinkomplexe mit hohem Molekulargewicht zu erweitern. Dazu wurden ^{15}N NMR-Relaxationspulssequenzen entwickelt, die auf TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) - Detektion basieren und sich damit besonders gut für Proteine mit hohem Molekulargewicht eignen [1].

Bei der Untersuchung von Membranproteinen kommt den verwendeten Membranmimetika eine große Bedeutung zu. Deswegen haben wir für ein Modellsystem, das β -Fass-Membranprotein OmpX, **Detergenzmizellen, kleine Lipid-Bizellen und Lipid-Nanodiscs** verglichen. Obwohl OmpX in allen drei Membranmimetika ein stabiles β -Fass mit einer ähnlichen 3D-Struktur bildete, unterschied sich die Dynamik auf der ps-ns und μ s-ms Skala zwischen der Detergenz- und der Lipidumgebung. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die intrinsische Flexibilität von Membranproteinen in Detergenzmizellen stark beeinträchtigt ist, was die häufig beobachtete Abnahme der funktionellen Aktivität erklären könnte [4].

Detergenzmizellen wurden häufig in Lösungs-NMR-Studien an Membranproteinen verwendet. Der Grund ist, dass die verwendeten Detergenzmizellen ein relativ kleines Molekulargewicht (MW) im zweistelligen kDa Bereich aufweisen, und damit deutlich kleiner sind als Liposomen (MW > 1 MDa). Kleine Lipid-Nanodiscs (siehe oben) stellen hier eine Alternative dar. Aber auch für diese ist die **Größenlimitierung** für eine Untersuchung des Proteinrückgrats **mittels Lösungs-NMR** schnell erreicht. Diese liegt im Bereich von 100-200 kDa für das Proteinrückgrat. Um diese **Größenlimitierung** zu **umgehen** und die Untersuchung von Proteindynamik in einer natürlichen Lipidumgebung (z.B. Liposomen) zu ermöglichen, werden Festkörper-NMR-Messungen zunehmend attraktiv. Standard **Festkörper-NMR-Spektroskopie** verwendet in der Regel ^{13}C -Detektion, weil der ^{13}C -Kern einen größeren Spektralbereich aufweist und weil die Linienbreiten in der ^1H -Dimension bei Standard MAS (engl. Magic Angle Spinning) -Frequenzen von 10 kHz bis 20 kHz für vollständig protonierte Proben wegen der nicht ausreichend gemittelten ^1H - ^1H dipolaren Kopplungen zu breit sind. Neue technische Entwicklungen ermöglichen jedoch immer schnellere MAS-Frequenzen, so dass ab einer MAS-Frequenz von 100 kHz auch vollständig protonierte Membranproteine mittels **Protonendetektion** untersucht werden können. Diese haben eine höhere Sensitivität pro

Proteinmasse (vgl. mit ^{13}C) und reduzieren somit die benötigte Proteinmengen auf weniger als 1 mg bei **100 kHz MAS-Frequenz**.

Wir konnten die ersten hochauflösenden Protonen-detektierten Festkörper-NMR-Spektren des **β -Fass-Membranproteins OmpX** in einer Lipid-Nanodisc-Umgebung mit schnellem MAS (100 kHz) aufnehmen [7]. Dabei zeigte sich, dass die Linienbreiten und Linienintensitäten, also letztendlich die Auflösung und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, entscheidend von der Proben temperatur und insbesondere von der Temperatur des Phasenübergangs der Lipide (von der gelförmigen zur flüssigen Phase der Lipid-Doppelschicht) abhängen. Darüber hinaus konnten wir hochaufgelöste protonen-detektierte dreidimensionale Zuordnungsexperimente an den **Nichtstrukturproteinen NS4B und NS5A des Hepatitis C-Virus** aufnehmen und strukturelle Einblicke in ihre Membrantopologie und Domänendynamik gewinnen ([9] und [10]).

Des Weiteren haben wir die Proteindynamik des Proteinrückgrats mittels Festkörper-NMR untersucht. Dazu habe ich eine neue Methode entwickelt, die auf MAS-Frequenz-abhängigen ^{15}N $R_{1\rho}$ -Messungen basiert und Amplituden und Zeitskalen von Bewegungen in in einem Zeitfenster von Hunderten von Nanosekunden bis hin zu wenigen Mikrosekunden zugänglich macht. Wir haben in mikrokristallinem Ubiquitin, das hier als Modellsystem verwendet wurde, eine Dynamik mit kleinen Amplituden auf einer Zeitskala von etwa 1 μs für das gesamte Protein und Bewegungen mit größeren Amplituden, ebenfalls auf der Zeitskala von 1 μs , für mehrere Bereiche beobachtet - einschließlich der β 1- β 2-Schleife und des N-Terminus der α -Helix [6].

Die **NMR-Spektroskopie** ist aber nicht nur für die Untersuchung der strukturellen Dynamik von Membranproteinen gut geeignet, sondern auch **besonders gut für die Untersuchung intrinsisch ungeordneter Proteine**, da diese hochdynamisch sind und nur langsam relaxieren, was hervorragende Voraussetzungen für eine Untersuchung mittels Lösungs-NMR sind. Umgekehrt sind intrinsisch ungeordnete Proteine wegen ihrer hohen intrinsischen Dynamik und damit diffusen Elektronendichte nicht gut für eine Untersuchung mittels kristallographischer Methoden oder mittels Kryo-Elektronenmikroskopie geeignet.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Wintermeyer (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) konnten wir zeigen, dass die N-terminale A-Domäne des **SRP-Rezeptors** (Signal Recognition Particle) FtsY von *E. coli* intrinsisch ungeordnet ist und an das **Translocon** bindet. Die Bindung an das Translocon wird durch elektrostatische Wechselwirkungen gesteuert [4]. Die N-terminale A-Domäne war in vorausgehenden kristallographischen Methoden nicht sichtbar.

Einen Schwerpunkt meiner Arbeiten an intrinsisch ungefalteten Proteinen bilden die SNARE-Proteine, welche die Membranfusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran vorantreiben und eine zentrale Rolle bei der neuronalen Exozytose spielen. Durch eine Kombination von NMR- und Fluoreszenzspektroskopie-Methoden konnten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) zeigen, dass das vesikuläre **SNARE-Protein Synaptobrevin-2** in seinem monomeren Zustand vor der Fusion **intrinsisch ungefaltet** ist. Synaptobrevin-2 weist eine hohe **intrinsische Flexibilität** auf, zeigt aber auch eine hohe dynamische Bandbreite und

zunehmende Steifigkeit vom N- zum C-Terminus. Die allmähliche **Zunahme der Steifigkeit korreliert mit einer Steigerung der Lipidbindungsaffinität vom N- zum C-Terminus** [8]. Wider Erwarten fanden wir eine schwache Lipidbindung des gesamten SNARE-Motivs. Dies erfordert eine Überarbeitung der derzeitigen Modelle der vesikulären Membranfusion.

Kürzlich fanden wir in meiner Arbeitsgruppe an der HHU Düsseldorf heraus, dass auch das **SNARE-Protein SNAP-25a** in seinem monomeren Zustand vor der Fusion **hauptsächlich intrinsisch ungeordnet** vorliegt, inklusive des C-terminalen SNARE-Motivs, das im assemblierten SNARE-Komplex α -helikal wird [11]. Nur die **N-terminalen 35 Reste** von SNAP25a weisen eine **α -helikale Konformation** auf. Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von SNAP25a als **Nukleationspunkt** für die Assemblierung des SNARE-Komplexes dienen kann.

Zur Untersuchung der strukturellen Dynamik intrinsisch ungefalteter Proteine haben wir die ^{15}N NMR-Relaxationsexperimente um Pulssequenzen mit sensitivitätsverstärkter HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)-Detektion mit einer verbesserten Wasserunterdrückung ergänzt, die sich auch für sehr hohe magnetische Feldstärken (28 Tesla) und intrinsisch ungefaltete Proteine eignen [12]. Damit werden sich in naher Zukunft die Zeitbereiche innerer Flexibilität in intrinsisch ungeordneten Proteinen weiter einschränken lassen.

Dank an ...

Meinen wissenschaftlichen Werdegang, der in dieser Habilitationsschrift dargelegt wurde, habe ich einer Vielzahl von Menschen zu verdanken. Beginnend mit meiner Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Griesinger bedanken, der meine Begeisterung für die NMR-Spektroskopie und Proteindynamik geweckt und mir eine gute theoretische Grundlage für Verständnis von NMR-Experimenten mitgegeben hat.

An den National Institutes of Health (NIH) in den U.S.A. habe ich sehr viel von meinem Postdoc-Supervisor Dr. Ad Bax und seinen Mitarbeitern Dr. Jinfa Ying, Dr. Dusty Baber und Dr. Frank Delaglio über biophysikalische NMR-Spektroskopie gelernt, insbesondere auch grundlegende Kenntnisse zur Pulssequenzentwicklung erlernt. Während meines gut einjährigen Aufenthalts am Max-Planck-Institut in Göttingen in der Abteilung Neurobiologie konnte ich mein biologisches Verständnis von Membran- und insbesondere SNARE-Proteinen vertiefen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Jahn für wertvolle wissenschaftlichen Diskussionen und seine kontinuierliche Unterstützung sowie seinen Mitarbeitenden, insbesondere Dr. Halenur Yavuz und Dr. Angel Perez-Lara für wertvolle Hinweise zur Proteinexpression- und Aufreinigung von SNARE-Proteinen und ihrer Lipidrekonstitution. An der ETH Zürich konnte ich danach bei Prof. Dr. Beat Meier und Prof. Dr. Matthias Ernst sowie ihren Mitarbeitenden, insbesondere Dr. Francesco Ravotti und Dr. Vipin Agarwal, die theoretischen und praktischen Grundlagen der Festkörper-NMR-Spektroskopie erlernen und vertiefen. Dazu zählt u.a. das methodische Know-how zur Protonendetektion mittels schnellem Magic-Angle-Spinning.

An der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dem Forschungszentrum Jülich möchte ich mich bei meinem Institutsleiter und Mentor dieser Arbeit Prof. Dr. Dieter Willbold sowie bei Prof. Dr. Henrike Heise für ihre kontinuierliche Unterstützung und den kollegialen und freundschaftlichen Umgang bedanken. Wir haben interessante Kooperationen zu neurodegenerativen Proteinen und d-Peptiden sowie zur Untersuchung des Konformationsraumes von intrinsisch ungefalteten Proteinen mittels DNP-verstärkter Festkörper-Spektroskopie gestartet.

Gute Wissenschaft erfolgt immer auch in Kooperation. Ich bin dankbar für die Möglichkeit, neben den bereits genannten mit weiteren hervorragenden Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern zusammenzuarbeiten: in meiner Postdoktoranden-Phase an den National Institutes of Health insbesondere mit Joshua Kaufman und Dr. Paul Wingfield, am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie mit Dr. Albena Draycheva und Prof. Dr. Wolfgang Wintermeyer. An der ETH Zürich mit Dr. Vlastimil Jirasko, Dr. Lukas Frey und Dr. Stefan Bibow und Prof. Roland Riek. Wichtig war immer auch die zuverlässige technische Unterstützung durch die Werkstätten, hier insbesondere durch Andreas Hunkeler und Alexander Däpp.

An der Universität Düsseldorf möchte ich mich besonders bei Dr. Lothar Gremer, Jun. Prof. Dr. Wolfgang Hoyer, Dr. Manuel Etzkorn und Prof. Dr. Georg Groth sowie Prof. Dr. Birgit Strodel für die kreative und freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Am gemeinsamen NMR-Zentrum der Universität Düsseldorf und des Forschungszentrums Jülich, bedanke ich mich

ganz herzlich bei Kevin Bochinsky, Dr. Rudolf Hartmann, Dr. Matthias Stoldt und Dr. Philipp Neudecker für ihre tatkräftige Unterstützung und wertvolle Diskussionen.

Forschung bedarf auch immer einer guten Forschungsförderung. Hier möchte ich mich insbesondere bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für den DFG/NIH Research Transition Award und für die Aufnahme in das Heisenberg-Programm bedanken. Bei der Europäischen Union bedanke ich mich für die Förderung im Rahmen eines Marie-Sklódowska-Curie-Stipendiums und bei der Helmholtz-Gesellschaft für Drittmittel im Rahmen des COVIPA-Verbundprojektes.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre zuverlässige und gewissenhafte Arbeit bedanken, vor allem bei den Doktorandinnen und Doktoranden Tobias Stief, Katharina Vormann, Moritz Lemke, Mirko Kraus und Sophia Werner. Ebenso gilt mein Dank allen Master- und Bachelorstudierenden, die ihre Abschlussarbeiten in meiner Arbeitsgruppe angefertigt haben.

Allen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen möchte ich für eine gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis sowie ihre jahrelange und andauernde Unterstützung.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Henzler-Wildman, K. & Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964-972, doi:10.1038/nature06522 (2007).
- 2 Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **28**, 8972-8979, doi:10.1021/bi00449a003 (1989).
- 3 Peng, J. W. & Wagner, G. Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments. *Biochemistry* **31**, 8571-8586, doi:10.1021/bi00151a027 (1992).
- 4 Farrow, N. A. *et al.* Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed SRC homology-2 domain studied by N-15 NMR relaxation. *Biochemistry* **33**, 5984-6003, doi:10.1021/bi00185a040 (1994).
- 5 Tolman, J. R. & Ruan, K. NMR residual dipolar couplings as probes of biomolecular dynamics. *Chem Rev* **106**, 1720-1736, doi:10.1021/cr040429z (2006).
- 6 Mittermaier, A. & Kay, L. E. Review - New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science* **312**, 224-228, doi:10.1126/science.1124964 (2006).
- 7 Mulder, F. A. A., Skrynnikov, N. R., Hon, B., Dahlquist, F. W. & Kay, L. E. Measurement of slow (μs-ms) time scale dynamics in protein side chains by N-15 relaxation dispersion NMR spectroscopy: Application to Asn and Gln residues in a cavity mutant of T4 lysozyme. *J Am. Chem. Soc.* **123**, 967-975, doi:10.1021/ja003447g (2001).
- 8 Tollinger, M., Skrynnikov, N. R., Mulder, F. A. A., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain. *J Am. Chem. Soc.* **123**, 11341-11352, doi:10.1021/ja011300z (2001).
- 9 Akke, M. & Palmer, A. G. Monitoring macromolecular motions on microsecond to millisecond time scales by R(1)ρ-R(1) constant relaxation time NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 911-912, doi:10.1021/ja953503r (1996).
- 10 Loria, J. P., Rance, M. & Palmer, A. G. A relaxation-compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence for characterizing chemical exchange by NMR spectroscopy. *J Am. Chem. Soc.* **121**, 2331-2332, doi:DOI 10.1021/ja983961a (1999).
- 11 Palmer, A. G. & Massi, F. Characterization of the dynamics of biomacromolecules using rotating-frame spin relaxation NMR spectroscopy. *Chem Rev* **106**, 1700-1719, doi:10.1021/cr0404287 (2006).
- 12 Vallurupalli, P., Bouvignies, G. & Kay, L. E. Studying "Invisible" Excited Protein States in Slow Exchange with a Major State Conformation. *J Am. Chem. Soc.* **134**, 8148-8161, doi:10.1021/ja3001419 (2012).
- 13 Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *J Chem Phys* **71**, 4546-4553, doi:Doi 10.1063/1.438208 (1979).
- 14 Palmer, A. G., Kroenke, C. D. & Loria, J. P. Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Meth. Enzymol* **339**, 204-238, doi:Doi 10.1016/S0076-6879(01)39315-1 (2001).
- 15 Clore, G. M. & Iwahara, J. Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes. *Chem. Rev.* **109**, 4108-4139, doi:10.1021/cr900033p (2009).
- 16 Iwahara, J. & Clore, G. M. Detecting transient intermediates in macromolecular binding by paramagnetic NMR. *Nature* **440**, 1227-1230, doi:10.1038/nature04673 (2006).
- 17 Lakomek, N. A. *et al.* Residual dipolar couplings as a tool to study molecular recognition of ubiquitin. *Biochem Soc Trans* **36**, 1433-1437, doi:10.1042/BST0361433 (2008).
- 18 Johnson, C. N. & Libich, D. S. Paramagnetic Relaxation Enhancement for Detecting and Characterizing Self-Associations of Intrinsically Disordered Proteins. *Jove-J Vis Exp*, doi:10.3791/63057 (2021).

- 19 Eddy, M. T. *et al.* Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A(2A) Adenosine Receptor. *Cell* **172**, 68-80 (2018).
- 20 Nygaard, R. *et al.* The Dynamic Process of beta(2)-Adrenergic Receptor Activation. *Cell* **152**, 532-542, doi:DOI 10.1016/j.cell.2013.01.008 (2013).
- 21 Isogai, S. *et al.* Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the beta1-adrenergic receptor. *Nature* **530**, 237-241, doi:10.1038/nature16577 (2016).
- 22 Liang, B. Y. & Tamm, L. K. NMR as a tool to investigate the structure, dynamics and function of membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 468-474 (2016).
- 23 Reckel, S. *et al.* Solution NMR structure of proteorhodopsin. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 11942-11946, doi:10.1002/anie.201105648 (2011).
- 24 Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T. & Wagner, G. Optimized Phospholipid Bilayer Nanodiscs Facilitate High-Resolution Structure Determination of Membrane Proteins. *J Am Chem Soc* **135**, 1919-1925 (2013).
- 25 Sanders, C. R. & Landis, G. C. Reconstitution of Membrane-Proteins into Lipid-Rich Bilayered Mixed Micelles for Nmr-Studies. *Biochemistry* **34**, 4030-4040, doi:DOI 10.1021/bi00012a022 (1995).
- 26 Laguerre, A. *et al.* From Nanodiscs to Isotropic Bicelles: A Procedure for Solution Nuclear Magnetic Resonance Studies of Detergent-Sensitive Integral Membrane Proteins. *Structure* **24**, 1830-1841, doi:10.1016/j.str.2016.07.017 (2016).
- 27 Lange, A. *et al.* Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. *Nature* **440**, 959-962, doi:10.1038/nature04649 (2006).
- 28 Retel, J. S. *et al.* Structure of outer membrane protein G in lipid bilayers. *Nat Commun* **8** (2017).
- 29 Chevelkov, V., Rehbein, K., Diehl, A. & Reif, B. Ultrahigh resolution in proton solid-state NMR spectroscopy at high levels of deuteration. *Angew Chem Int Edit* **45**, 3878-3881 (2006).
- 30 Linser, R. *et al.* Proton-Detected Solid-State NMR Spectroscopy of Fibrillar and Membrane Proteins. *Angew Chem Int Edit* **50**, 4508-4512 (2011).
- 31 Chevelkov, V., Fink, U. & Reif, B. Accurate Determination of Order Parameters from H-1,N-15 Dipolar Couplings in MAS Solid-State NMR Experiments. *J Am Chem Soc* **131**, 14018-14022 (2009).
- 32 Kurbanov, R., Zinkevich, T. & Krushelnitsky, A. The nuclear magnetic resonance relaxation data analysis in solids: General R-1/R-1 rho equations and the model-free approach. *J Chem Phys* **135** (2011).
- 33 Chevelkov, V., Rehbein, K., Diehl, A. & Reif, B. Ultrahigh resolution in proton solid-state NMR spectroscopy at high levels of deuteration. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 3878-3881 (2006).
- 34 Linser, R. *et al.* Proton-Detected Solid-State NMR Spectroscopy of Fibrillar and Membrane Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 4508-4512 (2011).
- 35 Zhou, D. H. *et al.* Proton-detected solid-state NMR Spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz magic-angle spinning. *J Am Chem Soc* **129**, 11791-11801, doi:Doi 10.1021/Ja073462m (2007).
- 36 Zhou, D. H. *et al.* Solid-state protein-structure determination with proton-detected triple-resonance 3D magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 8380-8383, doi:DOI 10.1002/anie.200702905 (2007).
- 37 Agarwal, V. *et al.* De Novo 3D Structure Determination from Sub-milligram Protein Samples by Solid-State 100 kHz MAS NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, doi:10.1002/anie.201405730 (2014).
- 38 Andreas, L. B. *et al.* Structure of fully protonated proteins by proton-detected magic-angle spinning NMR. *P Natl Acad Sci USA* **113**, 9187-9192 (2016).
- 39 Schubeis, T., Le Marchand, T., Andreas, L. B. & Pintacuda, G. (1)H magic-angle spinning NMR evolves as a powerful new tool for membrane proteins. *J Magn Reson* **287**, 140-152, doi:10.1016/j.jmr.2017.11.014 (2018).
- 40 Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 18-29, doi:10.1038/nrm3920 (2015).
- 41 van der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev* **114**, 6589-6631, doi:10.1021/cr400525m (2014).

- 42 Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 527-533, doi:10.1016/s0968-0004(02)02169-2 (2002).
- 43 Dyson, H. J. & Wright, P. E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 54-60, doi:10.1016/s0959-440x(02)00289-0 (2002).
- 44 Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **44**, 18-30, doi:10.1016/j.sbi.2016.10.015 (2017).
- 45 Patel, A. *et al.* A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* **162**, 1066-1077, doi:10.1016/j.cell.2015.07.047 (2015).
- 46 Abyzov, A., Blackledge, M. & Zweckstetter, M. Conformational Dynamics of Intrinsically Disordered Proteins Regulate Biomolecular Condensate Chemistry. *Chem. Rev.* **122**, 6719-6748, doi:10.1021/acs.chemrev.1c00774 (2022).
- 47 Uversky, V. N. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim Biophys Acta* **1834**, 932-951, doi:10.1016/j.bbapap.2012.12.008 (2013).
- 48 Papoian, G. A. Proteins with weakly funneled energy landscapes challenge the classical structure-function paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14237-14238, doi:10.1073/pnas.0807977105 (2008).
- 49 Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415-427, doi:10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::aid-prot130>3.0.co;2-7 (2000).
- 50 Bah, A. *et al.* Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **519**, 106-109, doi:10.1038/nature13999 (2015).
- 51 Tompa, P., Schad, E., Tantos, A. & Kalmar, L. Intrinsically disordered proteins: emerging interaction specialists. *Curr Opin Struct Biol* **35**, 49-59, doi:10.1016/j.sbi.2015.08.009 (2015).
- 52 Dyson, H. J. & Wright, P. E. Perspective: the essential role of NMR in the discovery and characterization of intrinsically disordered proteins. *J Biomol NMR* **73**, 651-659, doi:10.1007/s10858-019-00280-2 (2019).
- 53 Adamski, W. *et al.* A Unified Description of Intrinsically Disordered Protein Dynamics under Physiological Conditions Using NMR Spectroscopy. *J Am. Chem. Soc.* **141**, 17817-17829, doi:10.1021/jacs.9b09002 (2019).
- 54 Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890, doi:10.1038/nature02261 (2003).
- 55 Bertonecini, C. W. *et al.* Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1430-1435, doi:10.1073/pnas.0407146102 (2005).
- 56 Buell, A. K. *et al.* Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in alpha-synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7671-7676, doi:10.1073/pnas.1315346111 (2014).
- 57 Salvi, N., Abyzov, A. & Blackledge, M. Atomic resolution conformational dynamics of intrinsically disordered proteins from NMR spin relaxation. *Prog Nucl Mag Res Sp* **102**, 43-60, doi:10.1016/j.pnmrs.2017.06.001 (2017).
- 58 Schneider, R., Blackledge, M. & Jensen, M. R. Elucidating binding mechanisms and dynamics of intrinsically disordered protein complexes using NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* **54**, 10-18, doi:10.1016/j.sbi.2018.09.007 (2019).
- 59 Rezaei-Ghaleh, N., Blackledge, M. & Zweckstetter, M. Intrinsically disordered proteins: from sequence and conformational properties toward drug discovery. *Chembiochem* **13**, 930-950, doi:10.1002/cbic.201200093 (2012).
- 60 Jensen, M. R., Salmon, L., Nodet, G. & Blackledge, M. Defining conformational ensembles of intrinsically disordered and partially folded proteins directly from chemical shifts. *J Am Chem Soc* **132**, 1270-1272, doi:10.1021/ja909973n (2010).
- 61 Camacho-Zarco, A. R. *et al.* NMR Provides Unique Insight into the Functional Dynamics and Interactions of Intrinsically Disordered Proteins. *Chem Rev* **122**, 9331-9356, doi:10.1021/acs.chemrev.1c01023 (2022).
- 62 Mittag, T. & Forman-Kay, J. D. Atomic-level characterization of disordered protein ensembles. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 3-14, doi:10.1016/j.sbi.2007.01.009 (2007).

- 63 Dyson, H. J. & Wright, P. E. Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607-3622, doi:10.1021/cr030403s (2004).
- 64 Dyson, H. J. & Wright, P. E. NMR illuminates intrinsic disorder. *Curr Opin Struct Biol* **70**, 44-52, doi:10.1016/j.sbi.2021.03.015 (2021).
- 65 Sugase, K., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* **447**, 1021-1025, doi:10.1038/nature05858 (2007).
- 66 Bessa, L. M. *et al.* The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a. *Sci. Adv.* **8**, doi:ARTN eabm403410.1126/sciadv.abm4034 (2022).
- 67 Milles, S., Salvi, N., Blackledge, M. & Jensen, M. R. Characterization of intrinsically disordered proteins and their dynamic complexes: From in vitro to cell-like environments. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **109**, 79-100, doi:10.1016/j.pnmrs.2018.07.001 (2018).
- 68 Salvi, N., Abyzov, A. & Blackledge, M. Atomic resolution conformational dynamics of intrinsically disordered proteins from NMR spin relaxation. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **102-103**, 43-60, doi:10.1016/j.pnmrs.2017.06.001 (2017).
- 69 Gill, M. L., Byrd, R. A. & Palmer, A. G., III. Dynamics of GCN4 facilitate DNA interaction: a model-free analysis of an intrinsically disordered region. *Phys Chem Chem Phys* **18**, 5839-5849, doi:10.1039/c5cp06197k (2016).
- 70 Bertonecini, C. W. *et al.* Structural characterization of the intrinsically unfolded protein beta-synuclein, a natural negative regulator of alpha-synuclein aggregation. *J Mol Biol* **372**, 708-722, doi:10.1016/j.jmb.2007.07.009 (2007).
- 71 Rezaei-Ghaleh, N. *et al.* Local and Global Dynamics in Intrinsically Disordered Synuclein. *Angew Chem Int Ed Engl* **57**, 15262-15266, doi:10.1002/anie.201808172 (2018).
- 72 Rezaei-Ghaleh, N., Parigi, G. & Zweckstetter, M. Reorientational Dynamics of Amyloid-beta from NMR Spin Relaxation and Molecular Simulation. *J. Phys. Chem. Lett.* **10**, 3369-3375, doi:10.1021/acs.jpclett.9b01050 (2019).
- 73 Palmer, A. G. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem Rev* **104**, 3623-3640, doi:10.1021/cr030413t (2004).
- 74 Abragam, A. Principles of Nuclear Magnetism. *Oxford University Press* (1983).
- 75 Ernst, R. R., Bodenhausen, G., Wokaun, A. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. *Oxford University Press* (1990).
- 76 Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G. III, Skelton, N.J. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. *Academic Press* (1995).
- 77 Levitt, M. H. Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance *Wiley* (2008).
- 78 Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy. *Wiley* (2010).
- 79 Bloembergen, N., Purcell, E. M. & Pound, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review* **73**, 679-712, doi:DOI 10.1103/PhysRev.73.679 (1948).
- 80 Wangsness, R. K. & Bloch, F. The Dynamical Theory of Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **89**, 728-739, doi:DOI 10.1103/PhysRev.89.728 (1953).
- 81 Redfield, A. G. On the Theory of Relaxation Processes. *Ibm J Res Dev* **1**, 19-31, doi:DOI 10.1147/rd.11.0019 (1957).
- 82 Desvaux, H. & Berthault, P. Study of dynamic processes in liquids using off-resonance rf irradiation. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spect.* **35**, 295-340, doi:Doi 10.1016/S0079-6565(99)00011-4 (1999).
- 83 Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys Rev* **91**, 476-476 (1953).
- 84 Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **92**, 411-415, doi:DOI 10.1103/PhysRev.92.411 (1953).
- 85 Kay, L. E., Keifer, P. & Saarinen, T. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665, doi:10.1021/ja00052a088 (1992).
- 86 Geen, H. & Freeman, R. Band-selective radiofrequency pulses. *J. Magn. Reson.* **93**, 93-141, doi:https://doi.org/10.1016/0022-2364(91)90034-Q (1991).
- 87 Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wuthrich, K. Attenuated T-2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to

- NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12366-12371, doi:DOI 10.1073/pnas.94.23.12366 (1997).
- 88 Harrison, S. C. Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Adv Virus Res* **64**, 231-261, doi:10.1016/S0065-3527(05)64007-9 (2005).
- 89 Lee, J. H., Ozorowski, G. & Ward, A. B. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **351**, 1043-1048, doi:10.1126/science.aad2450 (2016).
- 90 Pan, J. H., Peng, H. Q., Chen, B. & Harrison, S. C. Cryo-EM Structure of Full-length HIV-1 Env Bound With the Fab of Antibody PG16. *J. Mol. Biol.* **432**, 1158-1168, doi:10.1016/j.jmb.2019.11.028 (2020).
- 91 Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273 (1997).
- 92 Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430, doi:10.1038/387426a0 (1997).
- 93 Chan, D. C. & Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684 (1998).
- 94 Harrison, S. C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 690-698, doi:10.1038/nsmb.1456 (2008).
- 95 Dimitrov, D. S. & Blumenthal, R. Photoinactivation and kinetics of membrane fusion mediated by the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**, 1956-1961 (1994).
- 96 Chiliveri, S. C., Louis, J. M. & Bax, A. Concentration-Dependent Structural Transition of the HIV-1 gp41 MPER Peptide into α -Helical Trimers. *Angew. Chem. Intl. Ed.* **60**, 166-170, doi:10.1002/anie.202008804 (2021).
- 97 Chiliveri, S. C., Louis, J. M., Best, R. B. & Bax, A. Real-time Exchange of the Lipid-bound Intermediate and Post-fusion States of the HIV-1 gp41 Ectodomain. *J. Mol. Biol.* **434**, doi:ARTN 16768310.1016/j.jmb.2022.167683 (2022).
- 98 Chiliveri, S. C., Louis, J. M., Ghirlando, R., Baber, J. L. & Bax, A. Tilted, Uninterrupted, Monomeric HIV-1 gp41 Transmembrane Helix from Residual Dipolar Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 34-37, doi:10.1021/jacs.7b10245 (2018).
- 99 Roche, J., Louis, J. M., Grishaev, A., Ying, J. F. & Bax, A. Dissociation of the trimeric gp41 ectodomain at the lipid-water interface suggests an active role in HIV-1 Env-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3425-3430, doi:10.1073/pnas.1401397111 (2014).
- 100 Piai, A., Dev, J., Fu, Q. & Chou, J. J. Stability and Water Accessibility of the Trimeric Membrane Anchors of the HIV-1 Envelope Spikes. *J Am Chem Soc* **139**, 18432-18435, doi:10.1021/jacs.7b09352 (2017).
- 101 Piai, A. *et al.* Structural basis of transmembrane coupling of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Nat Commun* **11**, 2317, doi:10.1038/s41467-020-16165-0 (2020).
- 102 Piai, A. *et al.* NMR Model of the Entire Membrane-Interacting Region of the HIV-1 Fusion Protein and Its Perturbation of Membrane Morphology. *J Am Chem Soc* **143**, 6609-6615, doi:10.1021/jacs.1c01762 (2021).
- 103 Kwon, B., Lee, M., Waring, A. J. & Hong, M. Oligomeric Structure and Three-Dimensional Fold of the HIV gp41 Membrane-Proximal External Region and Transmembrane Domain in Phospholipid Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 8246-8259, doi:10.1021/jacs.8b04010 (2018).
- 104 Kwon, B. *et al.* Cholesterol Interaction with the Trimeric HIV Fusion Protein gp41 in Lipid Bilayers Investigated by Solid-State NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Biol.* **432**, 4705-4721, doi:10.1016/j.jmb.2020.06.017 (2020).
- 105 Tran, N., Oh, Y., Sutherland, M., Cui, Q. & Hong, M. Cholesterol-Mediated Clustering of the HIV Fusion Protein gp41 in Lipid Bilayers. *J. Mol. Biol.* **434**, doi:ARTN 16734510.1016/j.jmb.2021.167345 (2022).
- 106 Vogt, J. & Schulz, G. E. The structure of the outer membrane protein OmpX from reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* **7**, 1301-1309, doi:Doi 10.1016/S0969-2126(00)80063-5 (1999).
- 107 Fernández, C. *et al.* Solution NMR studies of the integral membrane proteins OmpX and OmpA from. *Febs Lett* **504**, 173-178, doi:Doi 10.1016/S0014-5793(01)02742-9 (2001).

- 108 Agarwal, V. *et al.* De Novo 3D Structure Determination from Sub-milligram Protein Samples by Solid-State 100 kHz MAS NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 12253-12256, doi:10.1002/anie.201405730 (2014).
- 109 Andreas, L. B. *et al.* Structure of fully protonated proteins by proton-detected magic-angle spinning NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9187-9192 (2016).
- 110 Schubeis, T., Le Marchand, T., Andreas, L. B. & Pintacuda, G. (1)H magic-angle spinning NMR evolves as a powerful new tool for membrane proteins. *J. Magn. Reson.* **287**, 140-152, doi:10.1016/j.jmr.2017.11.014 (2018).
- 111 Kurbanov, R., Zinkevich, T. & Krushelnitsky, A. The nuclear magnetic resonance relaxation data analysis in solids: General equations and the model-free approach. *J. Chem. Phys.* **135**, doi:Artn 18410410.1063/1.3658383 (2011).
- 112 Ma, P. X. *et al.* Observing the overall rocking motion of a protein in a crystal. *Nat. Comm.* **6**, doi:ARTN 836110.1038/ncomms9361 (2015).
- 113 Lakomek, N. A. *et al.* Residual dipolar couplings as a tool to study molecular recognition of ubiquitin. *Biochem Soc Trans* **36**, 1433-1437, doi:10.1042/Bst0361433 (2008).
- 114 Lange, O. F. *et al.* Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471-1475, doi:10.1126/science.1157092 (2008).
- 115 Ban, D. *et al.* Kinetics of Conformational Sampling in Ubiquitin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 11437-11440, doi:DOI 10.1002/anie.201105086 (2011).
- 116 Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F. & Bartenschlager, R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3007-3019, doi:10.1128/jvi.77.5.3007-3019.2003 (2003).
- 117 Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M. & Glenn, J. S. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J. Virol.* **78**, 11393-11400, doi:10.1128/JVI.78.20.11393-11400.2004 (2004).
- 118 Lindstrom, H., Lundin, M., Haggstrom, S. & Persson, M. A. Mutations of the Hepatitis C virus protein NS4B on either side of the ER membrane affect the efficiency of subgenomic replicons. *Virus. Res.* **121**, 169-178, doi:10.1016/j.virusres.2006.05.008 (2006).
- 119 Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J. Virol.* **83**, 2163-2177, doi:10.1128/JVI.01885-08 (2009).
- 120 Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L. & Lai, M. M. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J. Virol.* **80**, 6013-6023, doi:10.1128/JVI.00053-06 (2006).
- 121 Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F. & Moradpour, D. Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J. Virol.* **84**, 12529-12537, doi:10.1128/JVI.01798-10 (2010).
- 122 Paul, D. *et al.* NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **85**, 6963-6976, doi:10.1128/JVI.00502-11 (2011).
- 123 Gouttenoire, J. *et al.* Aminoterminal amphipathic alpha-helix AH1 of hepatitis C virus nonstructural protein 4B possesses a dual role in RNA replication and virus production. *PLoS Pathog* **10**, e1004501, doi:10.1371/journal.ppat.1004501 (2014).
- 124 de Chassey, B. *et al.* Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* **4**, 230, doi:10.1038/msb.2008.66 (2008).
- 125 Reiss, S. *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**, 32-45, doi:10.1016/j.chom.2010.12.002 (2011).
- 126 Gao, M. *et al.* Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96-100, doi:10.1038/nature08960 (2010).
- 127 Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol NMR* **44**, 213-223, doi:10.1007/s10858-009-9333-z (2009).

- 128 Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374-379, doi:10.1038/nature03580 (2005).
- 129 Penin, F. *et al.* Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **279**, 40835-40843, doi:10.1074/jbc.M404761200 (2004).
- 130 Weiche, B. *et al.* A cleavable N-terminal membrane anchor is involved in membrane binding of the Escherichia coli SRP receptor. *J Mol Biol* **377**, 761-773, doi:10.1016/j.jmb.2008.01.040 (2008).
- 131 Bercovich-Kinori, A. & Bibi, E. Co-translational membrane association of the Escherichia coli SRP receptor. *J Cell Sci* **128**, 1444-1452, doi:10.1242/jcs.166116 (2015).
- 132 Neumann-Haefelin, C., Schafer, U., Muller, M. & Koch, H. G. SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J* **19**, 6419-6426, doi:10.1093/emboj/19.23.6419 (2000).
- 133 Valent, Q. A. *et al.* The Escherichia coli SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J* **17**, 2504-2512, doi:10.1093/emboj/17.9.2504 (1998).
- 134 Angelini, S., Boy, D., Schiltz, E. & Koch, H. G. Membrane binding of the bacterial signal recognition particle receptor involves two distinct binding sites. *J Cell Biol* **174**, 715-724, doi:10.1083/jcb.200606093 (2006).
- 135 Parltitz, R. *et al.* Escherichia coli signal recognition particle receptor FtsY contains an essential and autonomous membrane-binding amphipathic helix. *J Biol Chem* **282**, 32176-32184, doi:10.1074/jbc.M705430200 (2007).
- 136 Stjepanovic, G. *et al.* Lipids Trigger a Conformational Switch That Regulates Signal Recognition Particle (SRP)-mediated Protein Targeting. *J Biol Chem* **286**, 23489-23497, doi:10.1074/jbc.M110.212340 (2011).
- 137 Burk, J. *et al.* Depletion of the signal recognition particle receptor inactivates ribosomes in Escherichia coli. *J Bacteriol* **191**, 7017-7026, doi:10.1128/JB.00208-09 (2009).
- 138 Braig, D., Bar, C., Thumfart, J. O. & Koch, H. G. Two Cooperating Helices Constitute the Lipid-binding Domain of the Bacterial SRP Receptor. *J. Mol. Biol.* **390**, 401-413 (2009).
- 139 Angelini, S., Deitermann, S. & Koch, H. G. FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep* **6**, 476-481, doi:10.1038/sj.embor.7400385 (2005).
- 140 Kuhn, P. *et al.* The bacterial SRP receptor, SecA and the ribosome use overlapping binding sites on the SecY translocon. *Traffic* **12**, 563-578, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01167.x (2011).
- 141 Montoya, G., Svensson, C., Lührink, J. & Sinning, I. Crystal structure of the NG domain from the signal-recognition particle receptor FtsY. *Nature* **385**, 365-368, doi:10.1038/385365a0 (1997).
- 142 Stjepanovic, G. *et al.* Lipids trigger a conformational switch that regulates signal recognition particle (SRP)-mediated protein targeting. *J Biol Chem* **286**, 23489-23497, doi:10.1074/jbc.M110.212340 (2011).
- 143 Jahn, R. & Fasshauer, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201-207 (2012).
- 144 Rizo, J. & Sudhof, T. C. The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices-Guilty as Charged? *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 279-308, doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155818 (2012).
- 145 Han, J., Pluhackova, K. & Bockmann, R. A. The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Front Physiol* **8**, 5, doi:10.3389/fphys.2017.00005 (2017).
- 146 Ellena, J. F. *et al.* Dynamic structure of lipid-bound synaptobrevin suggests a nucleation-propagation mechanism for trans-SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20306-20311, doi:10.1073/pnas.0908317106 (2009).
- 147 Brewer, K. D., Li, W., Horne, B. E. & Rizo, J. Reluctance to membrane binding enables accessibility of the synaptobrevin SNARE motif for SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12723-12728, doi:10.1073/pnas.1105128108 (2011).
- 148 Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R. & Brunger, A. T. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J Biol Chem* **272**, 4582-4590 (1997).

- 149 Veit, M., Sollner, T. H. & Rothman, J. E. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-
SNARE SNAP-25. *Febs Lett* **385**, 119-123, doi:10.1016/0014-5793(96)00362-6 (1996).
- 150 Bark, I. C. Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exon encoding
distinct isoforms of the protein. *J. Mol. Biol.* **233**, 67-76 (1993).
- 151 Nielsen, J. T. & Mulder, F. A. A. CheSPI: chemical shift secondary structure population
inference. *J Biomol Nmr* **75**, 273-291, doi:10.1007/s10858-021-00374-w (2021).

6. Anhang

Publikationen

Legende: # = korrespondierender Autor, * = geteilte Erstautorenschaft

- [1] **Lakomek, N.A.**, Ying, J., Bax, A., *Measurement of ^{15}N relaxation rates in perdeuterated proteins by TROSY-based methods*, **J. Biomol. NMR** **2012**, 53, 209-221. DOI: [10.1007/s10858-012-9626-5](https://doi.org/10.1007/s10858-012-9626-5)
- [2] **Lakomek, N.A.**, Kaufman J.D., Stahl J.S., Louis J.M., Grishaev A., Wingfield P.T., Bax A., *The homotrimeric HIV-1 viral coat protein gp41 shows a high degree of internal dynamics on multiple time scales*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2013**, 52(14), 3911-3915. DOI: [10.1002/anie.201207266](https://doi.org/10.1002/anie.201207266)
- [3] **Lakomek, N.A.**[#], Kaufman, J.D., Stahl, J.S., Wingfield, P.T.[#], *HIV-1 Envelope Protein gp41: An NMR study of dodecyl phosphocholine embedded gp41 reveals a dynamic prefusion intermediate conformation*, **Structure** **2014**, 22(9), 1311-1321. DOI: [10.1016/j.str.2014.06.016](https://doi.org/10.1016/j.str.2014.06.016)
- [4] **Lakomek, N.A.**^{##}, Draycheva, A.^{*}, Bornemann, T., Wintermeyer, W.[#], *Electrostatics and intrinsic disorder drive translocon binding of the SRP receptor FtsY*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2016**, 55(33), 9544-9547. DOI: [10.1002/anie.201602905](https://doi.org/10.1002/anie.201602905)
- [5] Frey L., **Lakomek N.A.**, Riek R., Bibow S., *Micelles vs. bicelles vs. nanodiscs: Comparing the impact of membrane mimetics on membrane protein backbone dynamics*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2017**, 56(1), 380-383. DOI: [10.1002/anie.201608246](https://doi.org/10.1002/anie.201608246)
- [6] **Lakomek, N.A.**, Penzel, S., Lends, A., Cadalbert, R., Ernst, M., Meier, B.H., *Microsecond dynamics in ubiquitin probed by solid-state ^{15}N NMR spectroscopy $R_{1\rho}$ relaxation experiments under fast MAS (60–110 kHz)*, **Chem. Eur. J.** **2017**, 23(39), 9425-9433. DOI: [10.1002/chem.201701738](https://doi.org/10.1002/chem.201701738)
- [7] **Lakomek, N.A.**^{*}, Frey, L.^{*}, Bibow, S.^{*}, Böckmann, A., Riek, R., Meier, B.H., *Proton-detected NMR spectroscopy of nanodisc-embedded membrane proteins: MAS solid-state vs. solution methods*, **J. Phys. Chem. B** **2017**, 121(32), 7671-7680. DOI: [10.1021/acs.jpcc.7b06944](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b06944)
- [8] **Lakomek, N.A.**[#], Yavuz, H., Jahn, R.[#], Perez-Lara, A.[#], *Structural dynamics and transient lipid binding of synaptobrevin-2 tune SNARE assembly and membrane fusion*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **2019**, 16(18), 8699-8708. DOI: [10.1073/pnas.1813194116](https://doi.org/10.1073/pnas.1813194116)
- [9] Jirasko V.^{*}, **Lakomek N. A.**^{*}, Penzel S., Fogeron M.L., Bartenschlager R., Meier B.H., Böckmann A., *Proton-detected solid-state NMR of the cell-free synthesized α -helical transmembrane protein NS4B from Hepatitis C virus*, **Chembiochem.** **2020**, 21(10), 1453-1460. DOI: [10.1002/cbic.201900765](https://doi.org/10.1002/cbic.201900765)
- [10] Jirasko V.^{*}, Lends A.^{*}, **Lakomek N.A.**^{*}, Fogeron M.L., Weber M., Malär A., Penzel S., Bartenschlager R., Meier B.H., Böckmann A., *Dimer organization of membrane-associated NS5A of hepatitis C virus as determined by highly sensitive ^1H -detected solid-state NMR*, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **2021**, 60(10), 5339-5347. DOI: [10.1002/anie.202013296](https://doi.org/10.1002/anie.202013296)
- [11] Stief T., Gremer L., Pribicevic S., Jahn R., Perez-Lara A., **Lakomek N.A.**[#], *Intrinsic disorder of the SNARE protein SNAP25a in its pre-fusion conformation*, **J. Mol. Biol.** **2023**, 435 (10), 168069. DOI: [10.1016/j.jmb.2023.168069](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168069)

[12] Stief T., Vormann K., **Lakomek N.A.** [#], Sensitivity-enhanced NMR ^{15}N R_1 and $R_{1\rho}$ relaxation experiments for the investigation of intrinsically disordered proteins at high magnetic fields, *Methods* **2024**, 223,1-15. DOI: [10.1016/j.ymeth.2024.01.008](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2024.01.008)