



Doctoral Thesis

Cell-free expression, purification, reconstitution and solid-state NMR of the HCV NS5A protein

Author(s):

Lends, Alons

Publication Date:

2019

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000353767> →

Rights / License:

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

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

DISS. ETH NO. 25810

Cell-free expression, purification, reconstitution and solid-state NMR of the HCV NS5A protein

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Alons Lends

MEng Chemical Engineering, Riga Technical University

born on 26.06.1988

Citizen of Latvia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier

Prof. Dr. Roland Riek

Dr. Anja Böckmann

2019

Abstract

Proteins can be looked as biological machines responsible for numerous processes in living organisms. The knowledge of protein 3D structure can reveal essential information about such biochemical processes. Solid-state NMR is a fairly recent method for structure determination of proteins and it is particularly advantageous for study of membrane proteins in the proteo-liposome form, which is a close mimic of their conformation in the native membrane environment. Other analytical methods like liquid-state NMR or X-ray crystallography are limited due to the specific sample requirements. A recent development in solid-state NMR technology has increased the achievable rotational frequencies for magic-angle sample spinning (MAS), which also has dramatically improved the quality of ^1H detected spectra even in the solid state. ^1H detection enables higher spectral sensitivity and, thus, smaller (sub-milligram) sample amounts are sufficient for such NMR experiments. This is especially advantageous for biological samples which are difficult to produce.

The aim of this thesis is to study the structure of the non-structural 5A (NS5A) protein of hepatitis C virus (HCV) using solid-state NMR and employing ^1H detected experiments at fast MAS. The NS5A protein plays an important role in the lifecycle of the HCV protein. However, due to lack of structural information, details on its function are still unknown. The wheat germ extract (WGE) cell-free expression method enables the expression of many proteins that cannot be produced by other techniques. In this thesis, WGE cell-free expression methods are developed and applied to the preparation of the NS5A protein constructs, which are studied using NMR experiments based on ^1H detection at fast MAS.

Chapter 1 offers a short theoretical overview of solid-state NMR and an introduction to the biology of HCV.

Chapter 2 describes a newly developed WGE preparation protocol for cell-free expression of proteins using a bilayer method, which was tested in terms of suitability for NMR studies using ubiquitin as a model system. We assessed the transaminase activity of isotope scrambling by using selectively aspartate labeled sample. We also determined which amino acids were involved in transaminase catalysed deuterium back-exchange to protons. Potential

transaminase inhibitors reduced the yield of production and could not be used for our home-made WGE. Additionally, the levels of incorporation of endogenous amino acids from WG cell-free extract was determined.

The NS5A protein is composed of an amphipathic helix (AH), a structural D1 part and unstructured D2 and D3 parts. The methods we used to prepare HCV NS5A protein constructs are depicted in **Chapter 3**. I described the WGE expression of all constructs of NS5A protein, e.g. D1, D1D2D3 and improved expression and purification protocol of AHD1 and full length (FL) NS5A proteins. Moreover, the optimized proteo-liposome sample preparation of insoluble AHD1 and FL NS5A is illustrated, which resulted in fast (2 days) and efficient AHD1 protein production and subsequent insertion into lipid membranes. The obtained proteo-liposomes were confirmed with negative staining electron microscopy and gradient ultracentrifugation analysis.

Chapter 4 shows the 2D and 3D ^1H detected spectra for AHD1 protein at fast MAS. The good spectral sensitivity and the large number of isolated peaks with narrow linewidths, which are comparable to model membrane proteins, allowed for a partial assignment of AHD1. This revealed residues which might be involved in a potential drug binding site and could open the way for new structural studies.

In **Chapter 5**, I present a new selective 3D assignment experiment based on ^1H detection, which can be used for deuterated and NH proton back-exchanged proteins at fast MAS. In the described experiment, the polarization is directly transferred from the backbone nitrogen to selected carbon atoms of the backbone or side-chains. The pulse sequence consists of ^1H - ^{15}N cross-polarization (CP) transfers which are ~30% more efficient than conventionally used ^1H - ^{13}C CP transfer steps. Additionally, the experiment was implemented with a dipolar based INEPT transfer between ^{15}N and ^{13}C nuclei. The pulse sequence also contains a REDOR period in combination with selective π pulses used as refocusing pulses. By avoiding $^1\text{H}(\text{N})$ - ^{13}C and ^{13}C - ^{13}C transfers, we achieved higher selectivity and, therefore, increased signal intensities compared to other pulse sequences which use inefficient long-range CP transfers. The connections in 3D spectra between NH groups and aliphatic as well as aromatic side-chain carbons were demonstrated for deuterated ubiquitin protein and deuterated MLF peptide.

Zusammenfassung

Proteine sind biologische Maschinen, welche für eine Vielzahl von Prozessen in lebenden Organismen verantwortlich sind. Informationen über die dreidimensionale, räumliche Proteinstruktur sind essentiell für das Verständnis solcher biochemischer Prozesse. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie eignet sich zur Strukturaufklärung von Proteinen, insbesondere um Membranproteine in der Form von Proteoliposomen zu studieren, da diese die Konformation solcher Proteine in ihrer nativen Membranumgebung bestmöglich imitieren. Weitere analytische Methoden wie Flüssig-NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie sind aufgrund spezifischer Anforderungen an die Probenpräparation häufig in ihrer Anwendung limitiert. Neue technische Entwicklungen von Probenköpfen für die Festkörper-NMR ermöglichen heutzutage signifikant höhere Rotationsfrequenzen in Magic-angle sample spinning (MAS) Experimenten, was in einer substanziellen Steigerung der Auflösung in ^1H -detektierten Spektren im Festkörper resultiert. Die Detektion von ^1H -Kernen ermöglicht eine höhere Empfindlichkeit, und somit werden deutlich geringere Probenmengen (im sub-Milligramm Bereich) benötigt. Dies ist insbesondere für biologische Proben von Bedeutung, deren Präparation in grösseren Mengen schwierig ist. Das Ziel dieser Arbeit ist die Struktur des nicht-strukturierten (non-structural) 5A (NS5A) Proteins des Hepatitis C Virus (HCV) mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie und speziell unter Einbeziehung von ^1H -detektierten Experimenten bei schnellen MAS-Frequenzen aufzuklären. Das NS5A Protein spielt eine wichtige Rolle im Lebenszyklus des HCV Proteins. Aufgrund fehlender struktureller Informationen sind die Details der Funktionsweise dieses Proteins weitgehend unbekannt. Die zellen-freie Expressionsmethode mit Weizenkeim-Extrakt (WGE) ermöglicht die Expression zahlreicher Proteine, welche nicht durch andere Präparationstechniken zugänglich sind. In dieser Arbeit wurden WGE zellen-freie Methoden entwickelt und für die Präparation von NS5A Proteinkonstrukten angewandt, welche mit Hilfe von NMR-Experimenten basierend auf der ^1H -Detektion bei schnellen MAS-Frequenzen untersucht wurden.

Kapitel 1 gibt eine kurze Einführung in die Theorie der Festkörper-NMR-Spektroskopie

sowie in die Biologie der HCV-Proteine.

Die neu entwickelten WGE Präparationsprotokolle für eine zellen-freie Expression von Proteinen mit der Verwendung einer Lipiddoppelschicht werden in **Kapitel 2** präsentiert. Deren Anwendbarkeit für Probenpräparation in NMR wird anhand des Modellproteins Ubiquitin diskutiert. Die Transaminaseaktivität von Isotopen-Scrambling unter Verwendung einer selektiv markierten Aspartatprobe wird untersucht. Ferner werden die Aminosäuren bestimmt, die in dem transaminase-katalysierten Deuterium-Proton-Rücktausch involviert sind. Potentielle Transaminase Inhibitoren reduzieren die Ausbeute und können nicht für die hausgemachten WGE angewendet werden. Des Weiteren wurde das Mass an Einlagerung von endogenen Aminosäuren aus dem WG zellen-freien Extrakt ermittelt. Das NS5A Protein setzt sich aus einer amphipathischen Helix (AH), einer strukturierten Domäne D1 und den unstrukturierten Domänen D2 und D3 zusammen. Die Methoden zur Präparation dieser Domänen werden in **Kapitel 3** dargestellt. Die WGE Expression sämtlicher NS5A-Konstrukte, z.B. D1, D1D2D3 sowie verbesserte Protokolle für AHD1 und für das Gesamtlängenprotein (FL) werden präsentiert. Ausserdem wird die optimierte Proteoliposom Probenpräparation des unlöslichen AHD1 und FL NS5A illustriert, welche in einer schnellen (2 Tage) und effizienten AHD1 Proteinpräparation mit anschliessender Einlagerung in Lipidmembranen resultierte. Die erhaltenen Proteoliposome wurden mit Hilfe von Negative Staining Elektronenmikroskopie und Gradientenultrazentrifugation charakterisiert.

In **Kapitel 4** werden die 2D und 3D ^1H -detektierten Spektren bei hohen MAS Rotationsfrequenzen für das AHD1 Protein diskutiert. Das gute Signal-zu-Rausch Verhältnis der resultierenden Spektren und die grosse Zahl isolierter Peaks mit Linienbreiten, die vergleichbar mit denen anderer Modellmembranproteine sind, ermöglichte eine partielle Resonanzzuordnung für AHD1. Hierbei konnten Residuen identifiziert werden, welche an der Bindung von Medikamenten beteiligt sein könnten, was neue Ansätze für strukturelle Studien liefert.

In **Kapitel 5** werden neuartige, selektive 3D Resonanzzuordnungsexperimente basierend auf ^1H -Detektion vorgestellt, welche sowohl für deuterierte, als auch NH Protonen-rückausgetauschte Proteine bei schnellem MAS angewendet werden können. Das neu entwickelte Experiment basiert auf einem direkten Polarisationstransfer von den Stickstoffatomen im Proteinrückgrat zu ausgewählten Rückgrat- oder Seitenketten-Kohlenstoffatomen. Die Pulssequenz beinhaltet einen ^1H - ^{15}N Kreuzpolarisationsschritt (CP), welcher ca. 30% effizienter ist als konventionell verwendete ^1H - ^{13}C CP-Transferschritte. Ergänzend wurde das Experiment mit einem auf J-Kopplungen basierenden INEPT-Transfer zwischen ^{15}N und

^{13}C durchgeführt. Die Pulssequenz beinhaltet ferner eine REDOR-Periode kombiniert mit selektiven π -Pulsen, die zur Refokussierung verwendet wurden. Da $^1\text{H}(\text{N})$ - ^{13}C und ^{13}C - ^{13}C Transfers vermieden wurden, wird eine höhere Selektivität, und somit eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen Pulssequenzen erzielt, die auf ineffizienten langreichweitigen CP-Schritten beruhen. Die Konnektivitäten in 3D Spektren zwischen NH-Gruppen und aliphatischen sowie aromatischen Seitenkettenkohlenstoffatomen wurden für deuteriertes Ubiquitin und für das deuterierte Tripeptid MLF demonstriert.