

**Poul Nissen modtog
Carlsbergfondets
Forskningspris i 2018**

Professor på Aarhus Universitet Poul Nissen er uden sammenligning den højest profilerede strukturbilog i Skandinavien. Allerede som ph.d.-studerende publicerede han i 1995 i Science, hvor han ved hjælp af røntgenkrystallografi havde bestemt strukturen af det protein-RNA-kompleks der sørger for at placere aminosyernerne i korrekt rækkefølge på ribosomet, som laver cellens proteiner. Siden blev han som postdoc på Yale University en af de drivende kræfter bag bestemmelsen af strukturen af netop ribosomet, som oversætter genetisk information til syntese af proteiner i alle celler.

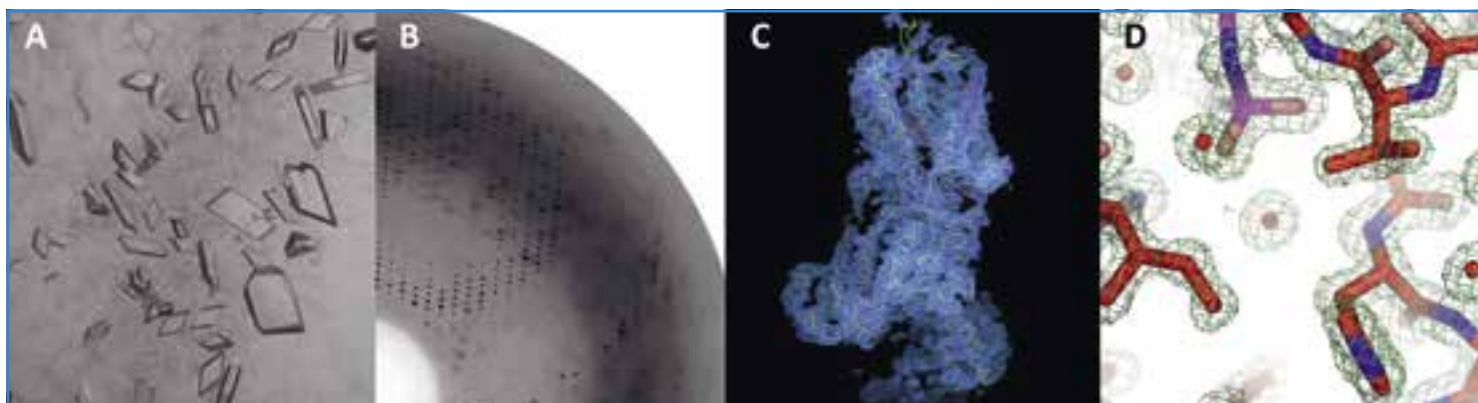
Poul Nissen har også med stor succes arbejdet med membranproteiner, der er notorisk vanskelige at få til at danne de krystaller eller præparater som er nødvendige for at bestemme molekulære strukturer i stor detalje med røntgenkrystallografi eller elektronmikroskopi.

Af
POUL NISSEN
PROFESSOR, PH.D.
INSTITUT FOR
MOLEKYLÆRBIOLOGI
OG GENETIK,
AARHUS UNIVERSITET

2

STRUKTUR- BIOLOGI – NU OG I FREMtiden

Strukturbiolegen vil revolutionere vores indsigt i det levende – biologi, medicin og bioteknologi. Men vi får ikke kun ny viden om livsprocesser i alle led fra anatomiske data til fysisk-kemiske modeller på atomart niveau. Vi kan også udvikle nye lægemidler og dermed forbedre behandlinger inden for en række sygdomme, såsom psykiske sygdomme og hjertekarsygdomme. Professor og strukturbilog Poul Nissen gennemgår i denne artikel de underliggende principper og de vidtrækkende perspektiver og muligheder som strukturbiolegen stiller til rådighed i det store og det små.



Biomembraner er en basal forudsætning for liv. De består primært af fedtstoffer kaldet lipider og af proteiner som er placeret i eller på biomembranen, såkaldte membranproteiner. Biomembraner omslutter cellerne, som dermed kan definere et indre miljø og opretholde store koncentrationsforskelle af bl.a. natrium, kalium og calcium og elektrisk spænding i forhold til det ydre miljø. Disse store forskelle i saltkoncentrationer og ladning – også kaldet elektrokemiske gradienter – er af helt central betydning da de styrer en lang række andre energikrævende transportprocesser, såsom optag af cellers næringsstoffer, byggematerialer og signalstoffer, pH kontrol, ændringer i cellers volumen, form og bevægelse samt elektriske impulser i nerve- og hjerneceller. Disse processer tapper omvendt af de elektrokemiske gradienter, som derfor konstant må genoprettes. Dette arbejde med at genoprette gradienterne udføres i alle celler af membranproteiner, der er enzymer kaldet ionpumper. De kan enten være drevet af lys som i planters fotosyntese eller af kemiske processer der frigør energi, fx ved spaltning af det energirige molekyle ATP (adenosin triphosphat) – såkaldte transport ATPaser.

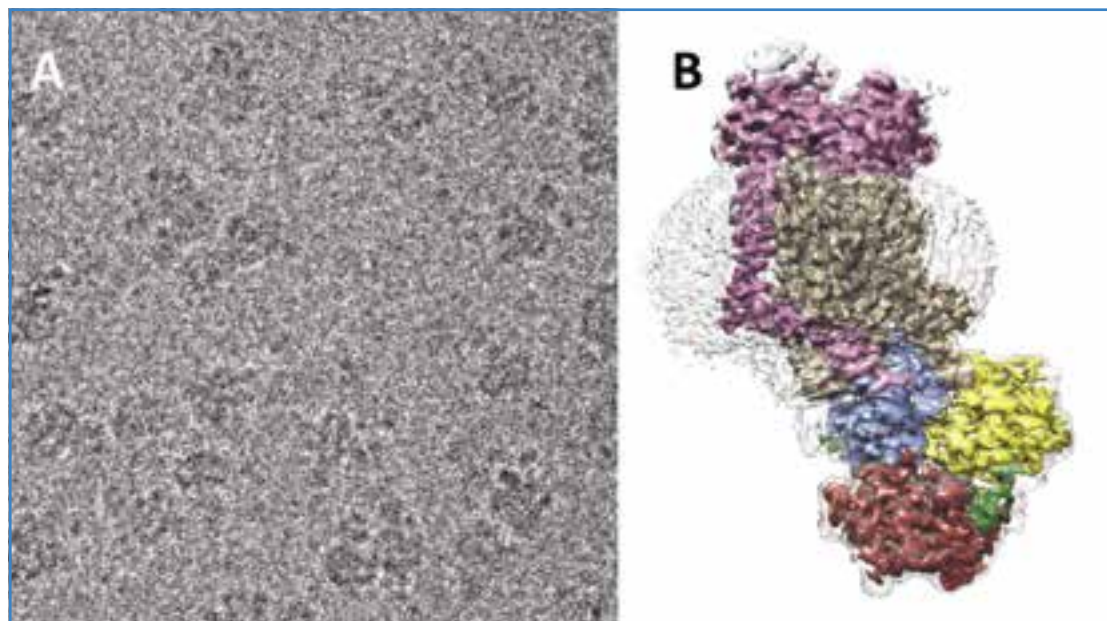
Vi har længe udforsket en stor og vigtig klasse af de iontransporterende ATPaser kaldet "Phosphorylation-type (P-type) ATPases"¹. De omfatter den danske Nobelprismodtager Jens Chr. Skous natrium-kaliumpumpe (Na^+, K^+ -ATPase), mavesyre-pumpen (H^+, K^+ -ATPase) og calciumpumpe (Ca^{2+} -ATPase) samt andre vitale funktioner såsom kobberpumpe (Cu(I) -ATPase) og svampe og planters plasmamembran-protonpumpe (H^+ -ATPase). Vi undersøger tillige transportproteiner, som udnytter de stærke iongradienter, fx Na^+ afhængige aminosyretransportører, som sørger for at vigtige aminosyrer føres ind i cellen, hvor de indgår i proteinsyntesen og fungerer som vigtige signalstoffer mellem celler. Disse aminosyretransportører udnytter således

energien som natrium-kaliumpumpen lægger i at opbygge Na^+ gradienten.

Vi undersøger disse transportprocesser for at opnå en direkte indsigt i hvordan de som biomolekylære funktioner spiller sammen med mange andre biomolekyler og danner grundlag for liv, herunder meget avancerede processer som hjernens tankevirksomhed, hukommelsesfunktion og sanseapparat, der repræsenterer de mest komplekse systemer vi kender i universet. Med denne indsigt kan vi også forstå hvordan genetiske mutationer der leder til fejlfunktion af ionpumperne, kan medføre ubalancer i de elektrokemiske gradienter og sygdomme forårsaget heraf. Dette omfatter bl.a. en række neurologiske og psykiatriske lidelser, hjertekarsygdomme, stofskifte og hormonelle lidelser. Dertil kommer at denne information også bringer gode muligheder for at udvikle lægemidler som regulerer ionpumperne og dermed afhjælper ubalancer i sygdomme. Og ved decideret at blokere ionpumpernes livsvigtige funktion specifikt i kræftceller eller sygdomsfremkaldende mikroorganismer kan vi udvikle fx kræftmedicin, antibiotika og agrokemiske planteværn.

Figur 1
Krystaller, røntgendiffraction og elektrontæthedskort af ionpumper. Elektrontæthedskortet til højre (det grå net) er opnået med høj opløsning og viser derfor stor detalje af den atomare struktur, inklusive vandmolekyler som sidder bundet til overfladen af proteinmolekylet.

“
Denne forskningsdisciplin, hvor biomolekylers atomare struktur afklares på basalt niveau, betegnes strukturbioologi, og den tilføjer den videnskabeligt set meget vigtige kobling af cellebiologi, fysiologi og medicin med kemi og fysik, som beskriver disse biomolekyler på grundlag af atomare modeller og dermed fundamentale kemiske og fysiske principper
”



Figur 2
Nye studier med cryo-EM på en P-type ATPase der transporterer lipider i cellemembranen. De enkelte molekyler anes som svagt mørke konturer. Knap 1 million enkeltmolekyle-observationer af denne type identificeres og sammenstykes til at rekonstruere den viste 3D struktur. Farvelægning angiver forskellige områder af proteinet og et omkringliggende bælte der efterligner en membran. Figurer: Milena Timcenko og Joseph A. Lyons

Visualisering af membranproteiner med røntgenkrystallografi

For at opnå denne indsigt i biomolekyleres funktion søger vi detaljeret information om de tredimensionelle strukturer af de involverede transportproteiner, og dette helt ned på atomart niveau. Denne forskningsdisciplin, hvor biomolekyleres atomare struktur afklares på basalt niveau, betegnes strukturbiologi, og den tilføjer den videnskabeligt set meget vigtige kobling af cellebiologi, fysiologi og medicin med kemi og fysik, som beskriver disse biomolekyler på grundlag af atomare modeller og dermed fundamentale kemiske og fysiske principper. Det er med andre ord vores overordnede, store mål at forstå livsprocesser i alle led fra anatomiske data til fysisk-kemiske modeller på atomart niveau. Pudsigt nok kommer anatomi af det græske ord for at "skære op", og atom er af samme oprindelse, nemlig et andet ord for "udeleligt".

Store biomolekyler som proteiner betegnes også som makromolekyler da de er opbygget af tusinder af atomer og dermed er langt større end almindelige organiske molekyler som fx sukkerstoffer, vitaminer og aminosyrer. De enkelte atomers fordeling og kontakter definerer tredimensionelle strukturer og dynamiske bevægelser af biomolekylerne. Men detaljerne er alt for fine til at kunne visualiseres med almindelig lysmikroskopi da synligt lys har bølgelængder der er mange tusinde gange større end atomers og kemiske bindingers dimensioner. Lys er elektromagnetiske bølger, så hvis vi i stedet for lys vælger elektromagnetisk stråling med bølgelængder i samme størrelsesorden som atomer

og kemiske bindinger (hvilket vil sige røntgenstråling), kan vi visualisere disse strukturer. I praksis kan vi dog desværre ikke måle og fokusere røntgenstråling fra et enkelt molekyle og dermed danne detaljerede "røntgenbilleder" af det. Hvis de undersøgte biomolekyler derimod kan bringes til at danne krystaller, hvor mange milliarder molekyler har ordnet sig på ganske bestemt vis i forhold til hinanden, vil røntgenstråling reflekteres fra krystallen i nogle bestemte vinkelretninger hvor signalet mangfoldiggøres i konstruktiv interferens (dvs. at bølger forstærker hinanden) fra alle de mange milliarder molekyler på en gang (Figur 1). Disse kraftige røntgensignaler fra en krystal betegnes diffraktion, og det samlede datasæt rummer tusinder af reflekser, der alle kan måles præcist og føre til kortlægning af det krystalliserede biomolekyles tredimensionelle struktur.

Mere præcist opnår vi et tredimensionelt kort over molekylets fordeling af elektroner (det er primært atomernes elektronskyer som vekselvirker med røntgenstrålingen), og det udstikker placeringen af de enkelte atomer. Denne metode kaldes røntgenkrystallografi, og den har i over 100 år været altafgørende for vores forståelse af atomer, kemiske bindinger og molekylers dimensioner og struktur. Den har som metode været central for et væld af Nobelprisarbejder i fysik, kemi og medicin og har skabt grundlag for en række spektroskopiske metoder. Røntgenkrystallografi er dog i sagens natur begrænset af krystaldannelsen, som er en meget vanskelig proces for biomolekyler, og især for store membranproteiner.

Ionpumpers krystalstruktur, funktion og mekanisme

Siden 2004 har jeg sammen med forskerkolleger kunnet visualisere calciumpumpens funktion med røntgenkrystallografi². Calciumpumpen er vigtig i alle celler og særligt aktiv i styringen af muskelkontraktion. Dette sker ved at muskelceller først øger calciumkoncentrationen ved at åbne for calciumindstrømning fra et indre lager i cellen omsluttet af den såkaldte sarco-endoplasmatiske membran. Calciumionerne aktiverer muskelfibrenes aktivitet. Calciumpumpen skal derefter hurtigt pumpe calciumionerne tilbage i lageret når muskelspændingen skal afsluttes, og for at genopfylde lagret. Calciumpumpen kan renfremstilles i store mængder af fx kaninmuskel og svinehjerter.

Vi har kunnet krystallisere calciumpumpen i mange forskellige tilstande, fx med og uden calcium og med forskellige stoffer som efterligner forskellige trin af ATPase cyklus^{3,4}. Calciumpumpen kendes derfor i næsten alle strukturelle trin, som spænder fra binding af calcium og ATP inde i cellen, dannelse af phosphoenzymet, frigørelse af calcium på den anden side af cellemembranen, og til spaltning af phosphoenzymet og tilbageførsel af pumpen til starttilstanden. Kaninmuskel- calciumpumpe er 97 procent identisk med calciumpumpe i menneskeceller, så disse strukturer kan bl.a. forklare os hvordan små molekyler som kan danne grundlag for nye lægemidler, specifikt binder til bestemte områder af calciumpumpen. De kan også fortælle hvad effekten af sygdomsmutationer er, og hvad man evt. kan gøre ved det.

Med røntgenkrystallografi har vi også undersøgt planters calciumpumper og protonpumpe^{5,6} ligesom vi i mere end 10 år har undersøgt natrium-kaliumpumpen som kan isoleres fra bl.a. svinenyre eller produceres ved gensplejsning af gærsvampe. Vi har bl.a. kunnet krystallisere og beskrive både natrium- og kalium-bundne tilstande^{7,8} og hvordan lægemidler af typen hjerteglycosider, som oprindeligt isoleredes fra fingerbølplanten – også kendt som *Digitalis*, svækker natrium-kaliumpumpens funktion⁹. Vi har ligeledes kunnet forklare og udmåle ef-

ekten af mutationer som giver neurologiske sygdomme og forhøjet blodtryk¹⁰⁻¹². Vores mål for fremtidige studier af natrium-kaliumpumpe er især at beskrive muterede former forbundet med den neurologiske sygdom kaldet "alternating hemiplegia of childhood" (AHC). Her har den store udfordring været at opnå krystaller af de muterede former, hvilket endnu ikke er lykkedes for os, men vi har forventninger om at kunne undersøge strukturerne med en ny elektronmikroskopimethode.

Visualisering af membranproteiner med elektronmikroskopi

I de senere år har elektronmikroskoper (EM) opnået stærkt øget følsomhed og udlæsningshastighed, og vi kan nu måle informationer om biomolekyleres struktur med denne mikroskopimethode, som således ikke fordrer krystaldannelse. Elektroner vekselvirker meget kraftigt med molekyler, som til gengæld meget nemt ødelægges, så man må bruge stråling med få elektroner. Elektronerne har en meget veldefineret energi bestemt af et højt spændingsfelt på op til 300.000 volt. Som at se i næsten mørke er observationer af det enkelte molekyle meget svage og kan ikke afdække et atomart niveau, men ved omhyggelig sammenstykning af EM-målinger af mange tusinde molekyler i alle mulige forskellige orienteringer forstærkes signalet ligesom ved røntgenkrystallografi, og det kan lede os til detaljerede informationer om molekylets tredimensionelle struktur (Figur 2). Molekylerne er fastholdt i en ultratynd hinde af is (mindre end 0,1 mikrometer tyk), og metoden betegnes derfor cryo-EM, mere præcist "single-particle cryo-EM with 3D reconstruction".

Ishinden skal være amorf som glas, dvs. uden iskrystaller, da disse ellers ville afbøje elektronstrålingen, som beskrevet for røntgenkrystallografi. Metoden virker bedst på meget store biomolekyler, hvor den opnåede billedkontrast til den amorfte is er størst. Denne metode revolutionerer i disse år strukturbioingen på samme måde som Hubble-teleskopet med sin højere opløselighed bragte astronomien ind i en helt ny æra. Cryo-EM-faciliteter skyder op overalt i verden og efterhånden også i store



Som strukturbilog er det med største glæde at kigge både bagud og frem på en spændende verden af uløste gåder og store muligheder i det store og små



bioteknologiske og farmaceutiske virksomheder. Aarhus Universitet var tidligt med og har sammen med Københavns Universitet opbygget fremragende faciliteter som koordineres på både nationalt, skandinavisk og europæisk plan i større netværk af cryo-EM-faciliteter, og der uddannes i dag mange forskere til cryo-EM-studier. Efter i en årrække at have brugt især røntgenkrystallografi som vores centrale metode undersøger vi nu en række af vores vigtigste, nye spørgsmål med cryo-EM.

Membranproteiners dynamik undersøges

Et er molekylers struktur, men lige så vigtigt er det at forstå deres dynamiske egenskaber. Med afsæt i de atomare strukturer som strukturbiologiske metoder kortlægger, kan computermødelles simulere dynamiske egenskaber. Dette er dog mest troværdigt og skalerbart på mindre fænomener af dynamik i et biomolekyle og på meget små tidsskalaer af nanosekunder, så der er stadig langt til en pumpecyklus, biokemiske reaktioner og biomolekylære netværk. Ultimativt vil store netværksmodeller af biomolekyler i celler og over lange tidsskalaer fordr simuleringer af en helt anden kaliber, og denne videnskab er da også i spirende udvikling med håndtering af "big data", kunstig intelligens og kraftige supercomputer-opsætninger.

Hvor synligt lys som nævnt ikke kan bruges til at afdække detaljeret struktur, så kan lysmikroskopi til gengæld give os vigtig, eksperimentel information om biomolekylers dynamik. Dette kan bl.a. gøres med såkaldte fluorescensdonor og -acceptorpar, som kan absorbere laserlys og udsende fluorescens med forskellige bølgelængder der kan måles fra enkelt-molekyler. En fluorescensdonors evne til at overføre lysenergi til acceptor afhænger af parrets indbyrdes afstand, en effekt som kaldes "Förster Resonance Energy Transfer" (FRET). Ved at placere henholdsvis donor og acceptor på to positioner i et pumpemolekyle som ændrer deres relative afstand under pumpecyklus, kan vi aflæse pumpens dynamiske egenskaber direkte ved FRET, og helt ned til ca. en tusindedels sekunds tidsopløsning. På denne måde har vi eksempelvis kunnet tilføje hidtil ukendt information om meget dynamiske overgange¹³ hvor

calciumpumpen skifter orientering i forhold til membranen (Figur 3).

Hvad byder fremtiden?

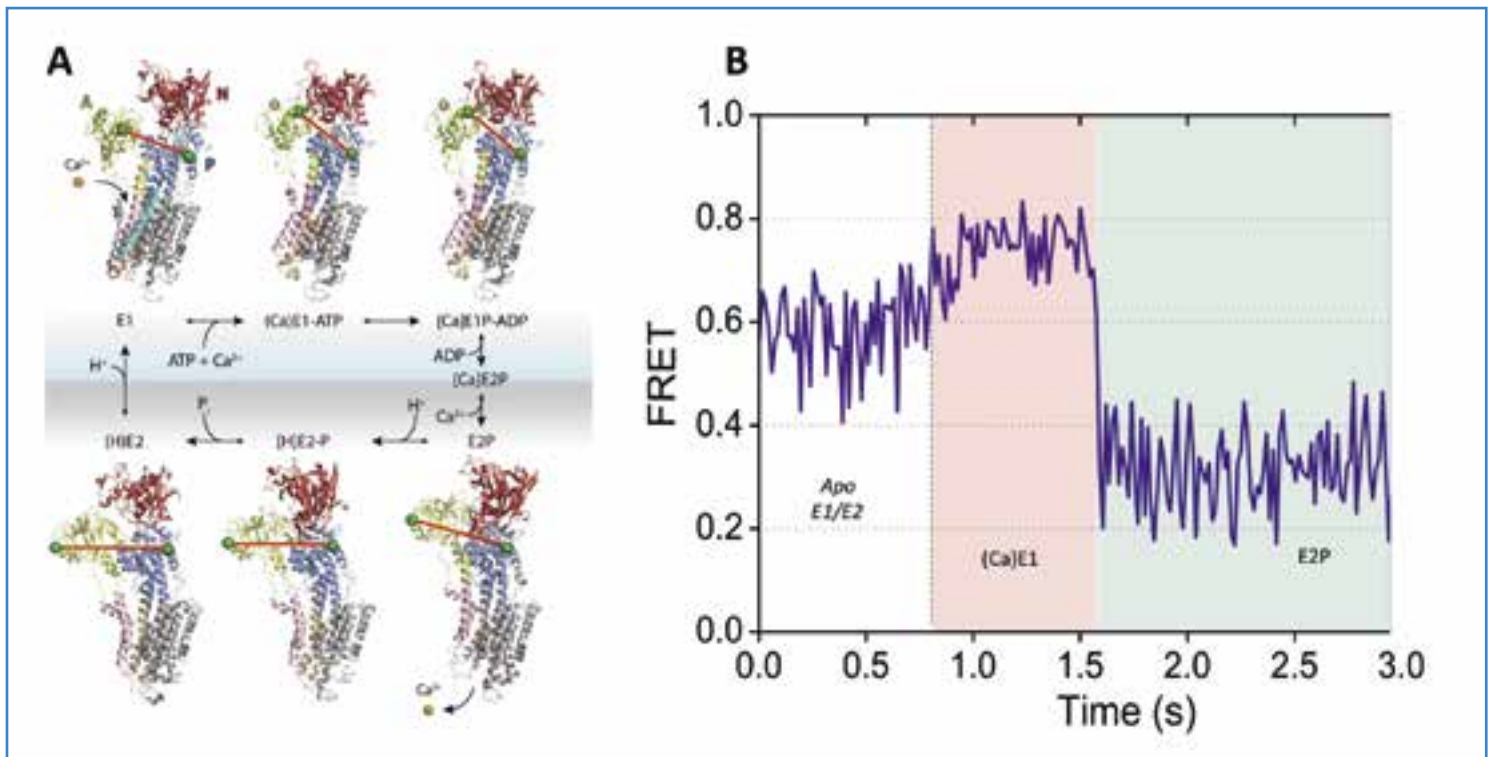
Neutronstråling kan tilføje central information om biomembraners dynamik og tillige om ekstrafine detaljer i biomolekylers struktur. Hvor elektron- og røntgenstråling vekselvirker med elektronstrukturen af molekyler, så består neutronstråling af store og nærmest langsomme elementarpartikler som primært vekselvirker med atomkerners magnetiske egenskaber. Det giver meget komplementære informationer og tidsskalaer og gør det muligt at visualisere det mindste af alle atomer, nemlig brint og dens tunge isotop, deuterium. Brintatomet har kun partiel eller fraværende elektronstruktur og er næsten usynligt for røntgen- og elektronstråling, men ikke desto mindre udgør brint ca. halvdelen af alle atomer i biomolekyler. Brint og deuterium vekselvirker meget forskelligt med neutroner, hvilket åbner for et væld af eksperimentelle tilgange til at undersøge dynamik og strukturelle egenskaber i biomolekyler. Med neutronkrystallografi kan vi også visualisere deuteriumpositioner på de afledte 3D strukturkort. Med åbning af European Spallation Source (ESS) i Lund i 2020'erne, med dansk medværtsskab, vil vi have verdens kraftigste og mest avancerede neutronkilde i vores baggård og kunne studere blandt andet signalveje i membranproteiner som overfører brintioner, og undersøge dynamiske egenskaber af biomembraner som kan afkodes ved tidsopløste studier af deres neutronspredeegenskaber med brint og deuterium.

Cryo-EM åbner også helt nye veje med såkaldte tomografistudier. Hvis man i stedet for at måle på tusinder af enkeltmolekyler i renfremstillede præparater laver billeddannelse af sektioner af celler (eller endog hele bakterieceller) i systematiske serier med op til 140 graders rotation, kan man rekonstruere de tredimensionelle strukturer af disse sektioner. Billedopløsningen bliver ikke så høj som med single-particle metoden, men ved at udføre såkaldt "template matching" med computerprogrammer til billedbehandling som også bruges til fx ansigtsgenkendelse, vil man kunne tilordne kendte strukturer



Et er molekylers struktur, men lige så vigtigt er det at forstå deres dynamiske egenskaber. Med afsæt i de atomare strukturer som strukturbiologiske metoder kortlægger, kan computermødelles simulere dynamiske egenskaber





af biomolekyler i cellesektionen og dermed iagttage biomolekyleres vekselvirkninger direkte i deres naturlige miljø af en levende celle. Her vil ikke mindst studier af komplekse celler være oplagte mål, fx neuroner, som danner komplekse netværk og funktioner i hjernen.

Metoder og deres udvikling peger således frem mod kommende årtier, hvor strukturbiologien uden tvivl vil revolutionere vores indsigt i det levende – biologi, medicin og bioteknologi. Som strukturbiolog er det med største glæde at kigge både bagud og frem på en spændende verden af uløste gåder og store muligheder i det store og små.

Noter

1 Palmgren MG, Nissen P (2011). P-type ATPases. *Annual Reviews of Biophysics* 40, 243-66. **2** Sørensen TL, Møller JV, Nissen P (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 304, 1672-5. **3** Olesen C, Picard M, Winther AM, Gyrop C, Oxvig C, Morth JP, Møller JV, Nissen P (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450, 1036-1042. **4** Winther AM, Bublitz M, Karlens JL, Møller JV, Hansen JB, Nissen P*, Buch-Pedersen MJ (2013). The Sarcolipin-bound Calcium Pump Stabilizes Calcium Sites exposed to the Cytoplasm. *Nature* 495, 265-9. **5** Tidow H, Poulsen LR, Andreeva A, Knudsen M, Hein KL, Wiuf C, Palmgren MB, Nissen P (2012). A bimolecular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature* 491, 468-72. **6** Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG, Nissen P (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450, 1111-1114. **7** Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J,

Andersen JP, Vilsen B, Nissen P (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450, 1043-1049.

8 Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard L, Andersson M, Lindahl E, Fedosova N, Nissen P (2013). Crystal Structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-Bound State. *Science* 342, 123-7.

9 Laursen M, Gregersen JL, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU (2015). Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1755-60. **10** Poulsen H, Khandelia H, Morth JP, Bublitz M, Mouritsen OG, Egebjerg J, Nissen P (2010). Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *Nature* 467, 99-102. **11** Azizan EAB, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MJ, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo EAD, Davenport A, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GSH, Neogi S, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown M (2013). Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nature Genetics* 45, 1055-60. **12** Böttger P, Glerup S, Gesslein B, Illarianova N, Isaksen T, Heuck A, Clausen B, Fuchtbauer EM, Gramsbergen JB, Gunnarson E, Aperia A, Lauritzen M, Lambertsen K, Nissen P, and Lykke-Hartmann K (2016). Glutamate-system defects behind psychiatric manifestations in a familial hemiplegic migraine type 2 disease-mutation mouse model. *Sci Rep* 6, 22047.

13 Dyla M, Terry DS, Kjaergaard M, Sørensen TLM, Andersen JL, Andersen JP, Knudsen CR, Altman RA, Nissen P, Blanchard SB (2017). Dynamics of P-type ATPase transport revealed by single-molecule FRET. *Nature* 551, 346-351

Figur 3
Cyklus af Ca²⁺-ATPase i forskellige strukturelle tilstande afdækket ved røntgenkrystallografi. De røde streger angiver afstande der ændrer sig i løbet af cyklus. Til højre ses et eksempel på FRET-målinger af et enkelt-molekyle hvor strukturelle ændringer kan følges. Figurer fra Mateusz Dyla og Dan Terry