

**Purification and stabilisation of an atypical HCN  
channel for structural studies**

Inaugural-Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln vorgelegt von

**Zhuoyan Chen**

aus Beijing, China

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Elmar Behrmann

Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp

Die Dissertation wurde von Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 07. 2021

## Abstract

Ion channels are highly specialized in order to respond selectively to one or more cues. There is a wide range of possible cues, including variations in transmembrane voltage and chemical ligands. Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated (HCN) channels are essential for controlling rhythmic activity in cardiac and neuronal cells.

Recently, a new category of channels resembling HCN channels has been discovered in the sperm of zebrafish (termed HCNL1). In comparison with other voltage-gated ion channels, HCNL1 exhibits a peculiar biophysical property: it is highly selective for protons. However, little is known about the structural architecture of HCNL1. To understand the functional diversities between classical HCN channels and HCNL1, we set out to establish suitable strategies for visualizing HCNL1 structure using single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM).

Here, we report a successfully established expression and purification strategy of HCNL1 based on GFP nanobody-based affinity chromatography. Furthermore, we used MSP nanodisc and amphipol A8-35 to reconstitute HCNL1 for improving the stability and homogeneity of HCNL1 in a non-detergent environment. The conventional biochemical assays, including SEC and DLS, suggest that HCNL1 particles are homogenous in aqueous solution. Unexpectedly, our EM data indicated that assembled HCNL1 was fragile and unstable in vitrified ice. In light of this structural instability, we adopted a chemical crosslinking approach on proteins to maintain HCNL1 structure in cryogenic sample preparation.

Employing negative staining EM, we visualized four types of HCNL1: HCNL1-LMNG, HCNL1-LMNG-CX, HCNL1-APol and HCNL1-APol-CX. In conjunction with a previous published high-resolution structure of human HCN1 (hHCN1), we demonstrated that the model of non-crosslinked HCNL1 exhibited a better-defined contour, with a hydrophobic “head” region and hydrophilic “tail” region, than HCNL1-CX. Nevertheless, in the cryogenic environment, cross-linked HCNL1 revealed excellent stability and monodispersity with sufficient particle density for high-resolution structure studies.

Additionally, to obtain sufficient purified target proteins for the investigation of cryo-EM, we have developed a methodology to improve the reproducibility of HCNL1 during the course of

this study. To conclude, this work provides a preliminary exploration on visualising the behaviours of the HCNL1 channel in various environments.

## Kurzzusammenfassung

Ionenkanäle sind darauf spezialisiert selektiv auf einen oder mehrere Reize zu reagieren und in Folge dessen den Fluss von Ionen zu ändern. Dabei gibt es eine breite Palette möglicher Signale einschließlich der Änderungen der Transmembranspannung oder chemischer Liganden. Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-modulated (HCN Kanäle) sind essentiell für die Kontrolle der rhythmischen Aktivität in kardialen und neuronalen Zellen.

Vor Kurzem wurde eine neue Kategorie von Kanälen, die HCN-Kanälen ähneln, im Sperma von Zebrafischen entdeckt (bezeichnet als HCNL1). Im Vergleich zu anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen weisen diese die besondere biophysikalische Eigenschaft auf, dass sie hochselektiv für Protonen sind. Allerdings ist wenig über die strukturelle Architektur von HCNL1 bekannt. Um die funktionellen Unterschiede zwischen klassischen HCN-Kanälen und HCNL1-Kanäle zu verstehen, haben wir uns vorgenommen, geeignete Strategien zur Visualisierung der HCNL1-Struktur mit Hilfe der Einzelteilchen-Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) zu entwickeln.

Hier berichten wir über eine erfolgreich etablierte Expressions- und Reinigungsstrategie von HCNL1, die auf GFP-Nanobody-basierter Affinitätschromatographie beruht. Um die Stabilität und Homogenität von HCNL1 in einer detergentenfreien Umgebung zu verbessern, wird MSP Nanodisk und Amphipol A8-35 zur Rekonstitution von HCNL1 verwendet. Die konventionellen biochemischen Assays, einschließlich SEC und DLS, legen nahe, dass HCNL1 Moleküle in wässriger Lösung homogen sind. Unerwarteterweise deuteten unsere Kryo-EM Daten darauf hin, dass assemblierter HCNL1 in vitrifiziertem Eis fragil und instabil ist. Diese strukturelle Instabilität machte es erforderlich, dass wir die Proteine chemisch vernetzen, um die HCNL1-Struktur bei der kryogenen Probenvorbereitung zu konservieren.

Darüber hinaus konnten wir mit Hilfe der Negativkontrastierung vier verschiedene HCNL1 Proben sichtbar machen: HCNL1-LMNG, HCNL1-LMNG-CX, HCNL1-APol und HCNL1-APol-CX. Im Vergleich zu einer kürzlich veröffentlichten Struktur des humanen HCN1 konnten wir zeigen, dass Modell des nicht vernetzten HCNL1, im Gegensatz zu HCNL1-CX, eine gut definierte Kontur aufweist, die sowohl eine hydrophobe "Kopf"-Region als auch eine hydrophile "Schwanz"-Region enthält. Dennoch zeigte das vernetzte HCNL1 in der kryogenen Umgebung

eine ausgezeichnete Stabilität und Monodispersion mit einer ausreichender Partikeldichte für hochauflösende Strukturanalysen aus, die ohne Vernetzung nicht möglich ist.

Um ausreichend gereinigte Zielproteine für die Untersuchung der Kryo-EM zu erhalten, haben wir außerdem eine Methodik entwickelt, um die Reproduzierbarkeit von HCNL1 im Verlauf dieser Studie zu verbessern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit eine vorläufige Untersuchung zur Visualisierung des HCNL1-Kanals in verschiedenen Umgebungen darstellt.