

## Kryo-EM

# Neue Möglichkeiten für die Strukturbestimmung von Membranproteinen

THERESA GEWERING<sup>2</sup>, ARNE MÖLLER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ABTEILUNG STRUKTURBIOLOGIE, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

<sup>2</sup> ABTEILUNG STRUKTURBIOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIK, FRANKFURT A. M.

**Membrane proteins establish the connection between the outside and the inside of a cell. Even though 30 percent of proteins in a cell are membrane associated, their structural data is strongly underrepresented due to the high flexibility and low purification yield. The resolution revolution in cryo-EM opened up new opportunities to solve structures of dynamic membrane proteins that can only be purified in small quantities.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1469-0

© Die Autoren 2020

■ Zellen und Zellkompartimente sind von Lipiddoppelmembranen umgeben, die diese als natürliche Barrieren vor äußeren Einflüssen schützen. Membranproteine bilden Schnittstellen zwischen dem ansonsten getrennten Zellinneren und -äußeren und sind somit für wesentliche zelluläre Funktionen verantwortlich, wie die Signaltransduktion und den Transport durch die Membran.

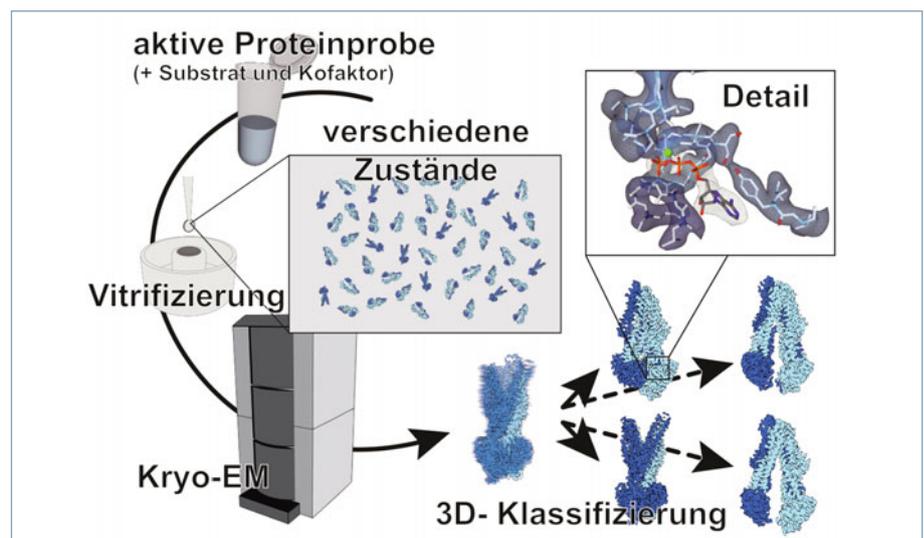
Rund 30 Prozent aller Proteine innerhalb einer Zelle sind Membranproteine, dennoch sind ihre Strukturen in den Datenbanken deutlich unterrepräsentiert und die ihrer Funktion zugrunde liegenden Mechanismen folglich ungenügend charakterisiert. Dies liegt zum einen daran, dass Membranproteine auf eine hydrophobe Umgebung, wie sie innerhalb der Lipidmembran vorherrscht, angewiesen sind, was biochemische Analysen erschwert und ihre Stabilität verringert. Zum anderen sind Membranproteine sehr flexibel und dynamisch und lassen sich, verglichen mit den meisten löslichen Proteinen, schlecht rekombinant herstellen. Noch vor wenigen Jahren waren kristallbasierte Methoden notwendig um hochaufgelöste 3-D-Daten eines Proteins zu ermitteln. Die am häufigsten verwendete Methode hierfür ist die Röntgenkristallographie. Fundamental für deren Anwendung ist es, dass sich die Proteine in einem hochregulären Kristallgitter exakt anordnen. Dynamische Zustände,

wie sie für die Charakterisierung von molekularen Mechanismen nötig sind, sind hiermit nur mühselig oder gar nicht darstellbar. Regelmäßig führt die Flexibilität eines Membranproteins und die notwendige hydrophobe Umgebung auch dazu, dass das Protein nicht stabil in einer Konformation gehalten werden kann, was die Strukturbestim-

mung scheitern lässt. Mit dem Aufkommen der modernen Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) wurde die hochaufgelöste Darstellung von flexiblen Proteinkomplexen in Lösung möglich, was für die Strukturbestimmung, insbesondere für Membranproteine, einzigartige Vorteile mit sich bringt (**Abb. 1**).

### Moderne Technik macht es möglich

Seit kurzem kann Kryo-EM Auflösungen erreichen, die der Röntgenkristallographie in nichts nachstehen [1]. Innerhalb von nur wenigen Jahren bescherte eine Vielzahl von technologischen Durchbrüchen der Kryo-EM eine rasante Entwicklung von einer Nischenmethode mit stark begrenzten Anwendungen hin zu ihrer heutigen Dominanz. Neben stark verbesserten Elektronenmikroskopen mit stabileren Probenhaltern sowie der fortschreitenden Automatisierung der langwierigen Aufnahmeprozesse, konnte das Feld auch von der Computerspielindustrie profitieren. Diese verlangt nach immer weiter verbesserten Grafikprozessoren (GPUs), wel-



▲ **Abb. 1:** Der Arbeitsablauf von einer Proteinprobe zur Kryo-EM-Struktur. Die aktive Proteinprobe wird durch biochemische Methoden aufgereinigt und auf dem Probenträger vitrifiziert. In den hochauflösenden Mikroskopen werden mit automatischer Datenaufnahme tausende Bilder an einem Tag aufgenommen, aus denen dann durch verschiedene Prozessierungsschritte die Struktur ermittelt wird. Bei aktiven Proteinproben können durch eine Datenaufnahme mehrere hochaufgelöste Strukturen entstehen, die die konformationelle Dynamik des Proteins bis in kleinste Details abbilden.

che auch für die Analyse der elektronenmikroskopischen Daten eingesetzt werden können und dort verschiedene Prozesse rapide beschleunigen. Basierend auf der somit stark gestiegenen Rechenkapazität konnte eine Vielzahl von Programmen entwickelt werden, mit denen völlig neue Analysen möglich sind. Zum Beispiel können mittlerweile sogar Unzulänglichkeiten bei der Mikroskopeinstellung im Nachhinein korrigiert werden, was regelmäßig zu neuen Auflösungsrekorden führt [2]. Besonders hervorzuheben sind neuartige Kameras, mit denen Elektronen unmittelbar detektiert werden können, ohne, wie zuvor, erst in Photonen und dann in Photoelektronen übersetzt werden zu müssen. Dadurch steigt die Präzision der Aufnahme, was das entstehende Bild viel schärfer macht und Voraussetzung für die Hochauflösung ist. Neben dieser namensgebenden direkten Detektion (*direct detector*) bieten diese Systeme noch einen weiteren entscheidenden Vorteil. Im Gegensatz zu konventionellen Kameras wird die Probe über mehrere Sekunden mit sehr hoher Bildfrequenz gefilmt, wodurch die feinen Bewegungen der Zielproteine während der Aufnahme ausgeglichen werden können, die normalerweise das Bild verschwimmen lassen würden. Auf diese Weise entsteht immer ein gestochen scharfes Bild, das sich für die Einzelpartikelanalyse nutzen lässt. Zusammengefasst erlauben diese Vorteile nicht nur die 3-D-Rekonstruktion mit hoher Auflösung, sondern auch die Analyse von vergleichsweise kleinen Komplexen, was insbesondere für Membranproteine von großer Bedeutung ist.

### Minimale Probenmengen von heterogenen Proben

Ein weiterer Schlüssel zum Erfolg der Kryo-EM war die große Flexibilität in Bezug auf die Probenvorbereitung und der gleichzeitig deutlich geringere Bedarf an Material. Insbesondere Membranproteine lassen sich häufig nur schlecht überexprimieren und nur in niedrigen Mengen aufreinigen. Ein einzelner Objektträger (*Grid*), mit dem sich ein ganzer Datensatz aufnehmen lassen kann, benötigt in der Kryo-EM nur zwei bis drei Mikroliter einer Proteinprobe in Lösung. Obwohl in einem typischen Strukturexperiment zahl-

reiche dieser *Grids* präpariert werden müssen, ist der Gesamtbedarf, verglichen mit der Kristallographie, minimal, sodass sogar die Analyse endogen exprimierter Proteinkomplexe möglich wird [3]. Mit moderner, auf Mikro-Dispersion basierender Technologie, lassen sich die Probenmengen sogar auf wenige Nanoliter pro *Grid* minimieren, was die Analyse von Komplexen aus einem Mikroliter Zellysate erlaubt [4]. Solche Technologien haben gerade erst den Markt erreicht und man darf gespannt sein, welche Ergebnisse damit in Zukunft erzielt werden können.

Für hoch dynamische und flexible Proben bietet die Kryo-EM noch weitere große Vorteile. Inhärent für die Einzelpartikelanalyse ist es, dass jeder der im vitrifizierten Puffer eingebetteten Partikel individuell betrachtet und beschrieben werden kann. So können Einzelbilder korrigiert und auch verschiedene Zustände innerhalb einer Probe gleichzeitig aufgelöst werden. Auf diese Weise können die Konformations- und Kompositionsvariabilität der Probe weitgehend kompensiert werden, was auch die Analyse heterogener Proben erlaubt (**Abb. 1**, [5]).

### So nativ wie möglich

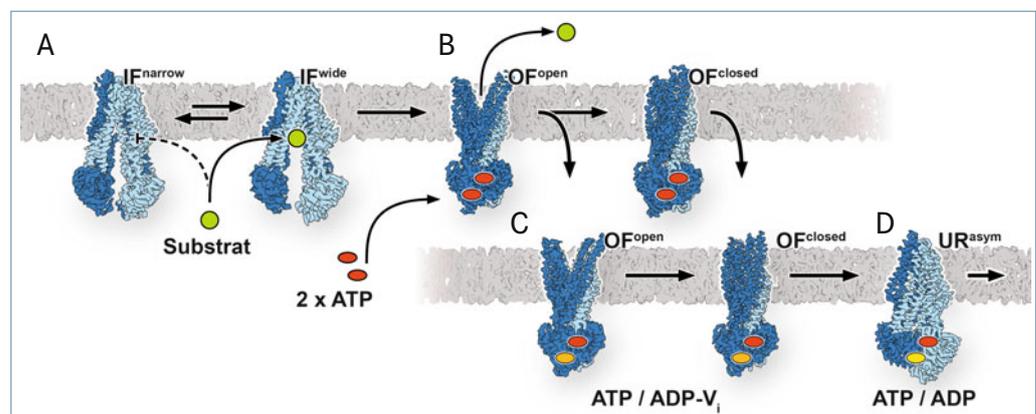
Membranproteine reagieren häufig sehr sensibel auf die Komposition und etwaige Veränderungen ihrer hydrophoben Umgebung. Die Kryo-EM bietet viele Möglichkeiten zur Stabilisierung der Probe, da das gesamte Repertoire an Detergenzien, Nanodiscs und weiteren Alternativen verwendet werden kann [6, 7]. Insbesondere die Fähigkeit Mem-

branproteine in Lipid-Nanodiscs einzubetten, scheint sehr attraktiv zu sein, da dieses System eine Lipidumgebung bietet und gleichzeitig eine hochauflösende Strukturbestimmung ermöglicht [8]. Vor Kurzem haben hochaufgelöste Analysen von Membranproteinen in Liposomen und extrazellulären Vesikeln eine weitere Möglichkeit aufgezeigt, um die Strukturbestimmung in nahezu nativen Membranen durchzuführen [9]. Ein Trend, der sich wahrscheinlich in der Zukunft weiter verstärken wird.

### ABC-Transporter als Beispiel

Transportproteine durchspannen die Lipiddoppelschicht und können ein Substrat entlang oder gegen einen Konzentrationsgradienten über die ansonsten undurchlässige Membran transportieren. Eine große Untergruppe, die in allen Phyla des Lebens vorkommt, bilden hier die ABC-Transporter (*ATP binding cassette-transporter*). Sie nutzen die Bindung und Hydrolyse von ATP sowie die Freisetzung der Spaltprodukte als Energiequelle, um verschiedene Substrate durch die Membran zu transportieren.

ABC-Transporter sind typischerweise aus zwei Monomeren aufgebaut, die je eine Nukleotidbindedomäne (NBD) im cytosolischen Bereich besitzen. Für die Hydrolyse des ATPs müssen die NBDs dimerisieren, sodass sich die jeweiligen aktiven Zentren ergänzen. Diese dramatische Konformationsänderung überträgt sich auf die Transmembrandomänen (TMDs), die das Verbindungsstück der beiden Monomere bilden. Sind die NBDs geöffnet, befindet sich der Transporter,



▲ **Abb. 2:** Übersicht über den Transportzyklus eines heterodimeren ABC-Transporters. **A**, In der *inward facing* (IF)-Konformation existieren zwei Zustände parallel, die untereinander transient sind. Das Substrat kann nur an IF<sup>wide</sup> binden. **B–C**, Der Übergang zu den *outward facing* (OF)-Konformationen erfolgt dann durch die Bindung von zwei ATP an den dimerisierenden Nukleotidbindedomänen (NBD). Der Transporter öffnet sich extrazellulär und gibt das Substrat ab, ATP wird zu ADP hydrolysiert. **D**, Nach der Abgabe des Phosphats (*unlocked return*, UR<sup>asym</sup>) wird das intrazelluläre Tor leicht geöffnet und die NBDs beginnen sich zu teilen. Der Transporter kann in einen neuen Zyklus übergehen.

und mit ihm auch die TMDs, in einer nach innen geöffneten Konformation (*inward-facing*, IF). Bei Exportern kann in diesem Zustand das zu transportierende Substrat gebunden werden. Dimerisieren die NBDs, öffnet sich der Transporter zur extrazellulären Seite (*outward-facing*, OF) und das Substrat wird auf der anderen Seite der Membran entlassen.

Die Analyse solcher hochdynamischen Prozesse stellt gängige strukturbiochemische Methoden vor große Herausforderungen, da hiermit vor allem statische Zustände eines Proteins ermittelt werden können. Bisher konnte die Beschreibung der molekularmechanischen Abläufe nur durch große Umwege und unter Zuhilfenahme verschiedenster Methoden und Modellierungen erreicht werden. Als direkte Folge ergaben sich daraus viele Unwägbarkeiten und Ungenauigkeiten.

### Bewegungsspektren entdecken

Aufgrund der bereits genannten Vorteile kann die Kryo-EM eingesetzt werden, um die dynamische Bandbreite eines Proteins darzustellen. Dieser Umstand wurde genutzt, um mit acht hochaufgelösten Strukturen das konformationelle Spektrum eines ABC-Transporters zu bestimmen (**Abb. 2**, [8]). Als Modellorganismus in dieser Studie von S. Hofmann, D. Janulienė, A. R. Mehdipour *et al.* wurde der heterodimere ABC-Exporteur TmrAB aus *Thermus thermophilus* genutzt, der eine kanonische und eine nicht-kanonische ATP-Bindestelle besitzt, wobei nur erstere katalytisch aktiv ist. Unter Zugabe von Substrat, ATP und  $Mg^{2+}$  wurde TmrAB unter *turnover*-Konditionen aufgenommen und die einzelnen Zustände analysiert. Diese innovative Herangehensweise zeigte zwei IF-Konformationen, die sich in der Öffnung der intrazellulären Substratbindungsstelle voneinander abgrenzten. Dieser Unterschied wird hauptsächlich durch Verschiebungen nur einer transmembranen Helix bedingt. Bei dem weit geöffneten Zustand (IFwide) konnte gebundenes Substrat gefunden werden, dieselbe Bindestelle war in IFnarrow leer.

Das Binden von ATP an die IF-Konformation und das darauffolgende Dimerisieren der NBDs führt zur OF-Konformation und erlaubt die extrazelluläre Öffnung des Transporters. Interessanterweise sind ATP-gebundene und durch ATP und  $Vi$  stabilisierte Zwischenzustände strukturell äquivalent. In dem *turnover*-Experiment konnte eine bisher unbe-

kannte Konformation gefunden werden (*unlocked return*-Zustand,  $UR^{asym}$ ), die das fehlende Bindeglied zwischen den OF- und IF-Konformationen darstellt. In diesem Zustand ist die Hydrolyse von ATP an der kanonischen Bindestelle bereits vollzogen, die NBDs beginnen sich zu separieren und werden nur durch das an der nicht-kanonischen Seite gebundene ATP zusammengehalten. Gleichzeitig hat sich der Transporter bereits leicht nach innen geöffnet. Somit bereitet die Freisetzung des anorganischen Phosphats den Transporter auf einen neuen Zyklus vor (**Abb. 2**). Dieses Experiment ist ein Beispiel dafür, wie es mit der modernen Kryo-EM möglich ist, die dynamischen Bewegungen eines Proteins zu beschreiben und somit dessen molekularmechanischen Funktionen zu verstehen.

### Kryo-EM in der Zukunft

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Kryo-EM eröffnen sich immer neue Anwendungsgebiete. Die hohe Auflösung wird sich weiter verbessern und der strukturbasierten Entwicklung von Medikamenten zugutekommen. Membranproteine werden innerhalb ihrer natürlichen Umgebung analysiert werden und die Beschreibung zahlreicher Zustände in einer Publikation wird Alltag. Des Weiteren wird die Miniaturisierung der Probenvorbereitung weiter fortschreiten und somit Analysen von endogenen Komplexen ermöglichen. Es ist nun von absoluter Wichtigkeit, die Kryo-EM allgemein zugänglich zu machen. Analog zum Erfolg der Röntgenkristallographie werden hierfür große Zentren benötigt, die die teure und komplexe Technologie einer breiten Gruppe, auch von nicht spezialisierten Wissenschaftlern, eröffnet.

### Danksagung

Wir möchten uns bei all unseren Kollegen und Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für Biophysik für ihre Unterstützung und den regen Austausch bedanken. Des Weiteren danken wir der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgesellschaft (Mo2752/2, AM) und dem Boehringer Ingelheim Fonds (TG) für die finanzielle Unterstützung unserer Projekte. ■

### Literatur

- [1] Kühlbrandt W (2014) The resolution revolution. *Science* 343:1443–1444
- [2] Nakane T, Kotecha A, Sente A *et al.* (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.22.110189>
- [3] Bles A, Janulienė D, Hofmann T *et al.* (2017) Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* 551:525–528

- [4] Schmidli C, Albiez S, Rima L *et al.* (2019) Microfluidic protein isolation and sample preparation for high-resolution cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:15007–15012
- [5] Zivanov J, Nakane T, Forsberg BO *et al.* (2018) New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* 7:e42166
- [6] Chae PS, Rasmussen SGF, Rana RR *et al.* (2010) Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 7:1003–1004
- [7] Nath A, Atkins WM, Sligar SG (2007) Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* 46:2059–2069
- [8] Hofmann S, Janulienė D, Mehdipour AR *et al.* (2019) Conformation space of a heterodimeric ABC exporter under turnover conditions. *Nature* 571:580–583
- [9] Zeev-Ben-Mordehai T, Vasishtan D, Siebert CA (2014) The full-length cell-cell fusions EFF-1 is monomeric and upright on the membrane. *Nat Commun* 5:3912

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Theresa Gewering  
Prof. Dr. Arne Möller  
Strukturbiochemie  
Universität Osnabrück  
Barbarastraße 13  
D-49076 Osnabrück  
Theresa.gewering@biophys.mpg.de  
Arne.Moeller@uni-osnabrueck.de

### AUTOREN



#### Theresa Gewering

2012–2015 Bachelorstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. 2015 Auslandssemester an der Nelson Mandela Metropolitan University in Port Elizabeth, Südafrika. 2016–2018 Masterstudium in Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. Seit 2018 Doktorandin am Max-Planck-Institut für Biophysik, Abt. Strukturbiochemie und Fellow des Boehringer Ingelheim Fonds.

#### Arne Möller

2000–2005 Diplomstudium in Biologie an der Universität Mainz. 2005–2009 Doktorand an der Universität Mainz, Abt. Zoologie, Prof. Dr. J. Markl. 2009–2014 Post-Doctoral Fellow am Scripps Research Institute, La Jolla, US, National Resource for Automated Molecular Microscopy, Prof. Dr. B. Carragher. 2014–2015 Assistant Professor an der Aarhus University, Dänemark. 2015–2017 Projektleiter am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M., Abt. Strukturbiochemie. 2017–2019 Unabhängiger Forschungsgruppenleiter am MPI für Biophysik, Abt. Strukturbiochemie. Seit 2020 – Professor (W3) an der Universität Osnabrück, Abt. Strukturbiochemie.