

# Förster-Resonanzenergietransfer mit einzelnen Molekülen

## Konformationsbewegungen von aktiven Membrantransportern

REBECCA MÄCHTEL, CHRISTIAN GEBHARDT, THORBEN CORDES  
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, LMU MÜNCHEN

**Mechanistic understanding of biological and biochemical processes requires methods to analyze structures and states but also conformational dynamics of biomacromolecules at room temperature under physiologically relevant conditions. Single-molecule Förster resonance energy transfer (smFRET) has evolved to a versatile tool for exactly this, the observation of intra- and intermolecular conformational dynamics and interactions of biomacromolecules. We here outline the basic principles and illustrate the applications of smFRET for understanding molecular mechanisms of active membrane transporters.**

DOI: 10.1007/s12268-018-0945-2  
© Die Autoren

■ Proteine erfüllen mannigfaltige Aufgaben, von enzymatischer Katalyse über Transport bis hin zu mechanischer Arbeit. Für das grundlegende Verständnis von Proteinfunktionen ist die Kenntnis ihrer dreidimensionalen atomaren Struktur unerlässlich, aber nicht hinreichend. Die vollständige Beschreibung biochemischer Mechanismen erfordert zusätzliche Informationen, unter anderem die der Proteinbewegung (Strukturdynamik) und die Kenntnis der Abfolge von Zuständen innerhalb einer Reaktion. Dies gilt generell für Proteine bzw. Makromoleküle, hat aber besondere Bedeutung bei Proteinkomplexen oder molekularen Maschinen, die oft aus mehreren funktionell verschiedenen Untereinheiten bestehen. Leider sind diese dynamischen Informationen aber nicht durch etablierte strukturelle Methoden zugänglich. Eine Möglichkeit, Strukturänderungen in Echtzeit zu beobachten, ist der Einsatz von Einzelmolekülspektroskopie bzw. -mikroskopie in Verbindung mit Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Diese Technik macht sowohl konformelle Änderungen als auch Wechselwirkungen von Proteindomänen direkt sichtbar. Damit können bei Raumtemperatur und in physiologisch relevanter Umgebung Informationen über konformelle Zustände, die Heterogenität der Probe und letztlich

kinetische Raten von Zustandswechseln erhalten werden.

### FRET als Nanometerstab für die biochemische Reaktionskoordinate

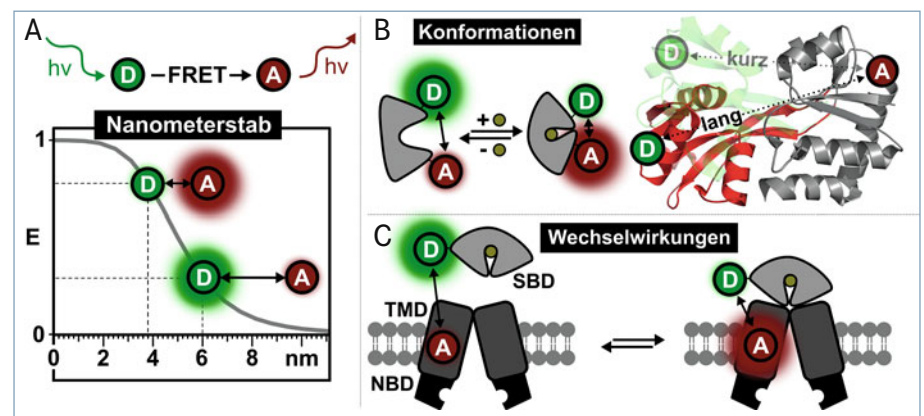
FRET ist ein strahlungsloser Energieübertrag von einem Donorfluorophor D zu einem Akzeptorfluorophor A nach elektronischer

Anregung des Donors durch Licht der passenden Wellenlänge (**Abb. 1A**). Die distanzabhängige Reduktion der Donorfluoreszenz und die damit verbundene rote Fluoreszenz des Akzeptors ohne dessen direkte Anregung sind charakteristisch für FRET. Die Effizienz  $E$  oder „Ausbeute“ des Energieübertrags sinkt dabei mit ansteigendem Abstand gemäß

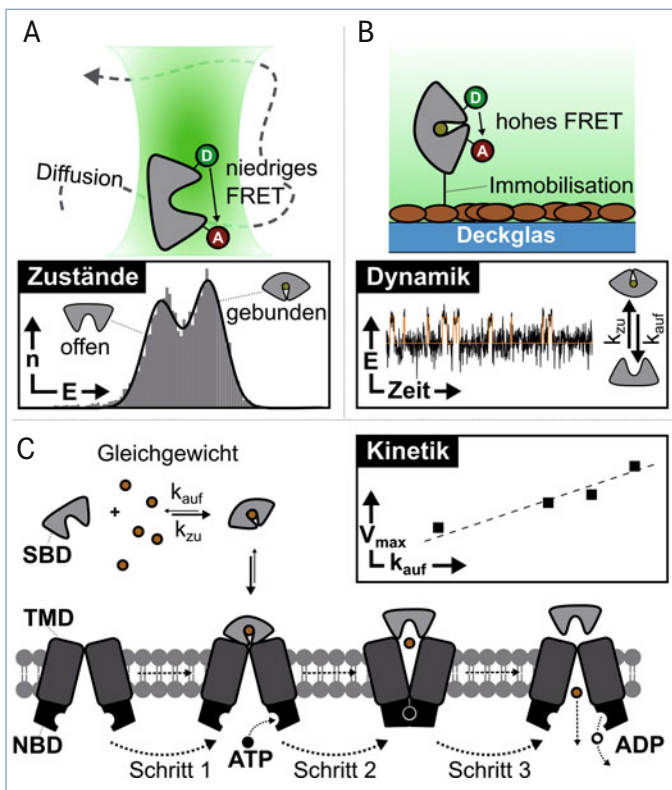
$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

innerhalb weniger Nanometer von 100 Prozent ( $E = 1$ ) auf nahezu 0 Prozent ( $E = 0$ ) und beträgt 50 Prozent am fluorophorabhängigen Förster-Radius  $R_0$ . Das FRET-Signal kann somit für quantitative Abstandsmessungen auf Nanometerebene im Bereich von etwa zwei bis zehn Nanometer verwendet werden – man könnte auch sagen: als „Nanometerstab“.

Die eigentliche Abstandsbestimmung erfolgt dabei auf unterschiedliche Arten: Entweder wird die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfluorophors bestimmt, also nach welcher Zeitspanne der Lichtabsorption im Mittel die Emission stattfindet. Die Lebensdauer des



▲ **Abb. 1:** FRET als Nanometerstab zur Analyse von Konformationsbewegungen und Wechselwirkungen in Proteinen und Proteinkomplexen. **A**, FRET ist ein strahlungsloser Energieübergang von Donor- (D) zu Akzeptorfluorophor (A), dessen Effizienz  $E$  distanzabhängig abnimmt (zum Teil aus [4]). **B**, Beispiel für die Visualisierung von intramolekularer, ligandeninduzierter Strukturdynamik, die eine Abstandsänderung der Fluorophore bewirkt (zum Teil aus [4]). **C**, FRET zeigt die Interaktionen von unterschiedlichen Proteindomänen an, die zu erhöhtem  $E$  nach Komplexbildung führen. Hier gezeigt ist die vereinfachte Form eines bakteriellen ABC-Importers mit Substratbindedomäne (SBD), Transmembrandomäne (TMD) und Nukleotidbindedomäne (NBD).



◀ **Abb. 2:** Messmethodik von smFRET. **A,** Das FRET-Histogramm von Substratbindedomänen (SBDs) bei mittlerer Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$  zeigt die offene und geschlossene Konformation (zum Teil aus [4]). **B,** Einzelne fixierte Moleküle können direkt beobachtet werden, während sie zwischen der offenen und geschlossenen Konformation mit den Raten  $k_{zu}$  und  $k_{auf}$  wechseln [4]. **C,** Derzeit akzeptiertes, vereinfachtes Modell für den Transport von Substraten durch bakterielle Typ-I-ABC-Importer [12]. Die maximale Transportgeschwindigkeit  $v_{max}$  ist durch die Rate vom gebundenen zum ungebundenen Zustand des Bindeproteins  $k_{auf}$  beschränkt [3]. TMD: Transmembrandomäne; NBD: Nukleotidbindedomäne; E: Effizienz.

Donors nimmt mit zunehmender FRET-Effizienz  $E$  ab [1]. Alternativ kann das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenzintensität als Maß für eine scheinbare FRET-Effizienz dienen. Dieser intensitätsbasierte Wert der scheinbaren FRET-Effizienz muss allerdings für absolute Abstandsmessungen in jedem Experiment aufgrund apparaturbedingter Fehler korrigiert werden [2].

Um FRET in der Biologie und Biochemie zu verwenden, beispielsweise um den Mechanismus aktiver Membrantransporter zu verstehen (**Abb. 1B, C**), bindet man beide Fluorophore selektiv an ein Protein oder verschiedene Proteindomänen. Der biochemische bzw. Konformationszustand kann dann durch die FRET-Effizienz (also den Abstand) direkt ausgelesen werden. Ein Beispiel aus unserer Arbeitsgruppe [3] ist die Visualisierung der Zustände von Substratbindedomänen (SBDs) in offener und substratgebundener/geschlossener Struktur, wie sie bei ABC-Transportern vorkommen (**Abb. 1B**). Genauso können molekulare Interaktionen beispielsweise zwischen verschiedenen Untereinheiten eines Proteinkomplexes durch geeignete Fluoreszenzmarker sichtbar gemacht werden (**Abb. 1C**).

Für die Fluoreszenzmarkierung werden geeignete Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins beispielsweise gegen Cysteine [4] oder auch nicht-natürliche Aminosäuren [5] ausgetauscht, die kovalente Ankerpunkte

lichen Anforderungen sind kritische Punkte beim Design von FRET-Experimenten.

### Beobachtung von Strukturänderungen und Proteinbewegungen

Welche Informationen sind durch FRET-Messungen zugänglich? Neue Messmethoden [4] nutzen FRET nicht nur als Nanometerstab (**Abb. 1A**), sondern erlauben auch gleichzeitig die Detektion einzelner Biomoleküle und werden daher als smFRET (*single-molecule FRET*) bezeichnet. Dies hat zwei entscheidende Vorteile: (1) In heterogenen Proben, die unterschiedliche Konformationszustände enthalten, wird nicht über viele Moleküle ein mittlerer Abstand gemessen, sondern die unterschiedlichen Zustände werden wirklich sichtbar (**Abb. 2A**). So können auch seltene Konformationen beobachtet werden, die sonst übersehen würden. (2) Bei der direkten Beobachtung einzelner Moleküle ist es möglich, kinetische Raten direkt aus den Messungen zu extrahieren (**Abb. 2B**).

Wie werden smFRET-Messungen technisch realisiert? Konformelle Zustände bzw. Wechselwirkungen zwischen Proteinen können durch smFRET während ihrer Diffusion durch das Anregungsvolumen eines konfokalen Mikroskops detektiert werden [2, 6]. Auf diese Weise kann man beispielsweise beobachten, dass Bindeproteine von Membrantransportern bei mittlerer Substratkonzentration sowohl in offener als auch in geschlossener

für reaktive Donor- und Akzeptorfluorophore bilden. Die Wahl der auszutauschenden Aminosäuren muss neben dem Kriterium für maximale Sensitivität gegenüber Distanzänderungen auch die biochemische Funktionalität des Proteins enthalten. Diese oft gegensätzlichen

Form in Lösung vorliegen (**Abb. 2A**), was durch ähnliche viele niedrige (= offene Konformation) als auch hohe (= geschlossene Konformation)  $E$ -Werte angezeigt wird.

Auch die Kinetik der Bewegungsänderungen muss neben dem Kriterium für maximale Sensitivität gegenüber Distanzänderungen auch die biochemische Funktionalität des Proteins enthalten. Diese oft gegensätzlichen Anforderungen sind kritische Punkte beim Design von FRET-Experimenten.

Für ABC-Transporter konnte das smFRET-Verfahren nun genutzt werden, um mechanistische Aspekte des aktiven Importzyklus von Aminosäuren direkt nachzuweisen [3], der bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist: Das zurzeit akzeptierte Modell beschreibt den ersten notwendigen Schritt für den Transport als Transfer des Substrats von einem Bindeprotein (SBD) zur Transmembrandomäne (TMD; **Abb. 2C**). Dafür wechselt das Bindeprotein zwischen dem offenen, ligandenfreien Zustand und dem geschlossenen, ligandengebundenem Zustand (**Abb. 2C**, Gleichgewicht). Für den ATP-getriebenen Pumpschritt muss eine Reihe konformeller Änderungen koordiniert werden, die alle drei Domänen betreffen. Während dieser Schritte muss der Ligand das Bindeprotein wieder verlassen und an die Transmembrandomäne übergeben werden. Durch smFRET bzw. die Kombination mit biochemischen Messungen der maximalen Transportrate  $v_{max}$  konnten wir nun eine direkte Korrelation zwischen der Öffnungsrate des Bindeproteins und  $v_{max}$  nachweisen. Dieses Verhalten zeigt, dass die Verweildauer des Bindeproteins im substrat-

gebundenen Zustand und die Öffnungsrate ein limitierender Faktor für den Import von Substraten sein können (**Abb. 2C**). Dies wurde bisher zwar vermutet, aber noch nicht direkt nachgewiesen [3].

Die smFRET-Technik eignet sich auch für Analysen von Membrantransportern in synthetischen Membranen oder für *in vivo*-Messungen [4], da die Methodik selbst unempfindlich gegen heterogene Mischungen von Proteinen und Substraten ist. Neben Substrataffinität, Binde- und Transportraten, Halbwertszeiten etc. können so auch komplexere Sachverhalte geklärt werden, z. B. ob die Substratbindung eher nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erfolgt oder dem Modell einer Venusfliegenfalle ähnelt. Letzteres konnten wir für bestimmte ABC-Transporter nachweisen [3].

### smFRET für Struktur- und Dynamik oder mehr?

Die direkte Beobachtung von Strukturbewegungen und Probenheterogenität unter physiologischen Bedingungen ist sicherlich als Alleinstellungsmerkmal für die smFRET-Methode zu nennen. Obwohl sich dadurch die schnelle Entwicklung und Ausbreitung der Technik in Biologie, Chemie und auch Katalyseforschung in den letzten zwei Jahrzehnten erklären lässt, sind damit die Möglichkeiten bei Weitem noch nicht ausgeschöpft [4]. Insbesondere zur Erforschung komplexer Makromoleküle kann smFRET mit weiteren Techniken kombiniert werden [8]. Ist der Donor beispielsweise umgebungssensitiv, so kann neben der FRET-Effizienz gleichzeitig eine Veränderung des Donorsignals beobachtet werden. Mit dieser Methode lässt sich nicht nur die Veränderung einer Makromolekülstruktur, sondern auch der Bindevorgang des Proteins selbst feststellen [9]. Dadurch oder durch Kombination von FRET mit anderen photophysikalischen Effekten (Fluoreszenzlebensdauer, Anisotropie, Vielfarben-FRET [8]) oder biophysikalischen, kraftbasierten Techniken (AFM, optische Pinzette [8]) können korrelierte Bewegungen direkt visualisiert werden [4].

FRET kann aufgrund seines quantitativen Charakters weiterhin direkt in der Struktur- und Dynamikklärung eingesetzt werden [10]. Die so gelösten Strukturen entsprechen dabei weit aus besser den physiologischen Bedingungen als in einer Kristallstruktur; zum Teil können sogar Strukturen aufgeklärt werden, für die nur Strukturinformationen durch Homologe bekannt sind. Die Möglichkeit, verschiedene

Positionen eines Proteinkomplexes mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern zu versehen [11] und mit anderen Techniken zu kombinieren, macht FRET zu einem vielseitigen Werkzeug mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten. Jüngst veröffentlichte FRET-Studien zum Lipidtransporter MsbA [13], dem Vitamin B<sub>12</sub>-Transporter BtuCD [14] und dem Peptidtransporter McjD [15] untermauern dies, da es hierbei gelang, Konformationsänderungen von TMDs und NBDs durch smFRET zu visualisieren. Die Messungen konnten dabei sowohl mit Detergenz als auch mit Liposomen bzw. Lipid-*nanodiscs* durchgeführt werden. Die Methode des smFRET hat sich mittlerweile auch zur Untersuchung lebender Zellen etabliert und wurde für Biosensing und andere Anwendungen entdeckt [4].

### Danksagung

Die Autoren wurden durch einen ERC Starting Grant (ERC StG 638536 – SM-IMPORT) und das GRK2062 (Project C3, Molecular Principles of Synthetic Biology) unterstützt. ■

### Literatur

- [1] Kalinin S, Peulen T, Sindbert S et al. (2012) A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nat Methods* 9:1218–1225
- [2] Hohlbein J, Craggs TD, Cordes T (2014) Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond. *Chem Soc Rev* 43:1156–1171
- [3] Gouridis G, Schuurman-Wolters GK, Ploetz E et al. (2015) Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ. *Nat Struct Mol Biol* 22:57–64
- [4] Lerner E, Cordes T, Ingargiola A et al. (2018) Toward dynamic structural biology: two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer. *Science* 359:6373
- [5] Roy R, Hohng S, Ha T (2008) A practical guide to single-molecule FRET. *Nat Methods* 5:507
- [6] Deniz AA, Dahan M, Grunwell JR et al. (1999) Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing

- molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3670–3675
- [7] Ha T, Enderle T, Ogletree DF et al. (1996) Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6264–6268
- [8] Hohng S, Lee S, Lee J et al. (2014) Maximizing information content of single-molecule FRET experiments: multi-color FRET and FRET combined with force or torque. *Chem Soc Rev* 43:1007–1013
- [9] Ploetz E, Lerner E, Husada F et al. (2016) Förster resonance energy transfer and protein-induced fluorescence enhancement as synergistic multi-scale molecular rulers. *Sci Rep* 6:33257
- [10] Craggs TD, Kapanidis AN (2012) Six steps closer to FRET-driven structural biology. *Nat Methods* 9:1157
- [11] Husada F, Gouridis G, Vietrov R et al. (2015) Watching conformational dynamics of ABC transporters with single-molecule tools. *Biochem Soc Transactions* 43:1041
- [12] Locher KP (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* 23:487–493
- [13] Liu Y, Liu Y, He L et al. (2018) Single-molecule fluorescence studies on the conformational change of the ABC transporter MsbA. *Biophys Rep* 4:153–165
- [14] Yang M, Levanon NL, Acar B et al. (2018) Single-molecule probing of the conformational homogeneity of the ABC transporter BtuCD. *Nat Chem Biol* 14:715–722
- [15] Husada FH, Bountra K, Tassis K et al. (2018) Conformational dynamics of the ABC transporter McjD seen by single-molecule FRET. In Revision.

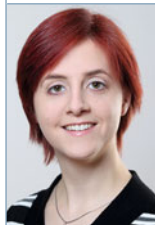
### Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Thorben Cordes  
Physikalische und Synthetische Biologie  
Fakultät für Biologie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Großhadernerstraße 2–4  
D-82152 Planegg-Martinsried  
Tel.: 089-2180-74623  
Fax: 089-2180-74520  
cordes@bio.lmu.de  
[www.mikrobiologie.biologie.uni-muenchen.de/forschung/ag\\_cordes](http://www.mikrobiologie.biologie.uni-muenchen.de/forschung/ag_cordes)

### AUTOREN



#### Rebecca Mächtel

Jahrgang 1991. Biologiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg (B. Sc.) und TU München (M. Sc.), mit Aufenthalt an der Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Italien. Seit 2017 Promotion in Biologie an der LMU München.



#### Christian Gebhardt

Jahrgang 1992. Physik- und Informatikstudium an der LMU München, mit Aufenthalt am Centre de Recherche Paul Pascal, Bordeaux, Frankreich. 2017 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Quantenoptik, Garching. Seit 2017 Promotion in Biologie an der LMU München.



#### Thorben Cordes

Jahrgang 1980. Chemiestudium an der TU Braunschweig, mit Aufenthalt am University College Cork, Irland. 2008 Promotion in Physik an der LMU München, 2008–2009 Postdoc dort und 2010–2011 an der Universität Oxford, UK. 2011–2016 Assistant Professor, 2016–2017 Associate Professor an der Universität Groningen, Niederlande. Seit 2017 Professor für Physikalische und Synthetische Biologie an der LMU München.