

Proteinstrukturen

Plastizität bakterieller ESCRT-III-Strukturen bei der Membranremodellierung

ESTHER HUDINA^{1,2}, BENEDIKT JUNGLAS¹, CARSTEN SACHSE^{1,2}

¹ ERNST-RUSKA CENTRUM FÜR MIKROSKOPIE UND SPEKTROSKOPIE MIT ELEKTRONEN, ER-C-3: STRUKTURBIOLOGIE, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH

² DEPARTMENT BIOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Bacterial ESCRT-III proteins protect and maintain the structural integrity of prokaryotic membranes. Cryo-electron microscopy studies of ESCRT-III family members PspA and Vipp1 revealed the structural basis of helical rod, ring and stacked ring assembly formation. Although the basic ESCRT-III fold remained conserved in the observed structures, monomers adopted a remarkable degree of structural plasticity. Minor conformational changes resulted in major shifts in assembly architectures and are important for the ability to remodel membranes.

DOI: 10.1007/s12268-025-2597-3

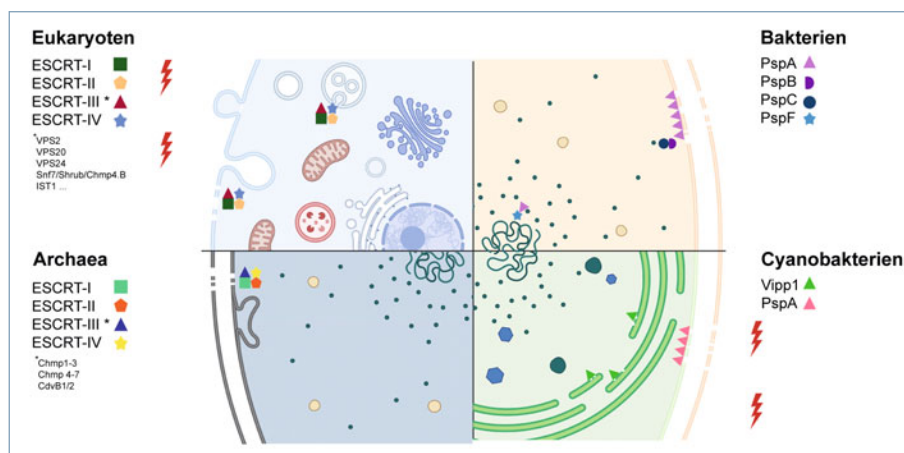
© The Author(s) 2025

■ Die Aufrechterhaltung der Membranstruktur und -integrität ist eine zelluläre Funktion, die essenziell für alle Domänen des Lebens ist. Dafür ist der Prozess der Membranremodellierung unabdingbar, d. h. die Fähigkeit, fluide Biomembranen in neue Formen zu überführen. In Eukaryoten nimmt hierfür das ESCRT(*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*)-System eine zentrale Stellung ein und übernimmt dabei verschiedene zelluläre Aufgaben vom endo-

somalen Vesikeltransport, der Zellteilung, der Membranreparatur bis zur Exosomfreisetzung (**Abb. 1** links oben). Topologisch gemein ist fast all diesen Prozessen, eine Membranknospung weg vom Zytosol. Insbesondere die evolutionär konservierte Gruppe der lediglich ca. 240 Aminosäure-großen ESCRT-III-Proteine sind hierbei die Haupteffektoren der Membranumbauprozesse. Die biologische Funktion dieser Proteine ist dabei eng mit der Ausbildung von homo-

und/oder heteropolymere Strukturen wie Ringe, Filamente, Kuppeln oder Spiralen verknüpft.

Vertreter dieses ESCRT-Systems lassen sich auch in nicht-eukaryotischen Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien oder Archaea finden. Mehrere der kürzlich identifizierten Genome von Asgard-Archaeen codieren eine Vielzahl eukaryotischer Signaturproteine (ESPs), unter denen auch homologe Komponenten für ESCRT-I-, -II- und -III-Proteine sowie für Vps4 zu finden sind (**Abb. 1** links unten, [1]). Für Bakterien hingegen konnten bisher lediglich Homologe der ESCRT-III-Familie identifiziert werden: PspA (Phage Shock Protein A) in Bakterien und Cyanobakterien, sowie Vipp1 (Vesicle-inducing Protein in Plastids 1, auch als IM30 bekannt) in Cyanobakterien (und Chloroplasten; **Abb. 1** rechts). Diese Proteine besitzen vor allem Membranschutzfunktionen für die Membranremodellierung unter Stressbedingungen wie Licht. Neben den entfernten Sequenzhomologien der Primärstruktur und den ausschließlich α -helikalen Sekundärstrukturanteilen inklusive dem charakteristischen Haarnadelmotiv weisen die beiden Proteine auch wichtige funktionelle Gemeinsamkeiten zu den eukaryotischen ESCRT-III-Proteinen auf [2–5].



▲ **Abb. 1:** Das ESCRT-System in Eukaryoten, Archaea, Bakterien und Cyanobakterien. Links oben: Eukaryoten, links unten: Archaea, rechts oben: Bakterien und links unten: Cyanobakterien. Komponenten des ESCRT-Systems und ihre Lokalisation innerhalb der Zellen. Erstellt in BioRender. <https://BioRender.com/0duy2de>, [9].

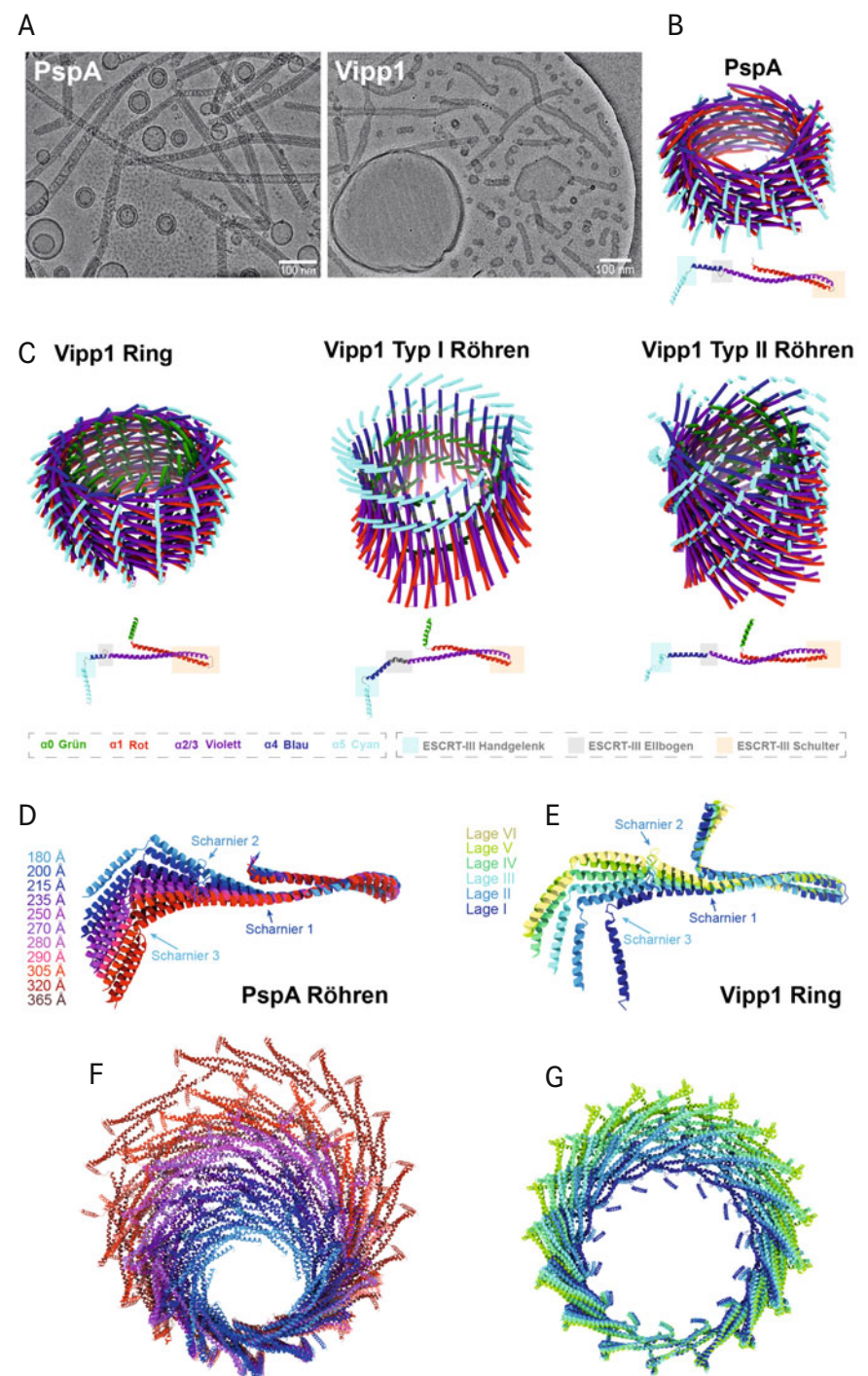
Die grundlegende Struktur der bakteriellen ESCRT-III-Proteine Vipp1 und PspA

Aufgebaut ist das PspA-Monomer aus sechs α -Helices, Vipp1 aus sieben α -Helices, mit einer vier Helix-Kernstruktur, wobei Helix α_1 und Helix $\alpha_2/3$ das charakteristische Haarnadelmotiv ausbilden. Nach der biochemischen Reinigung zeigt sich sowohl PspA als auch Vipp1 in Form von großen Polymerstrukturen, die im Elektronenmikroskop als helikale Röhren erkennbar sind (**Abb. 2A**). Dabei bilden die α -Helices α_1 – α_4 die Wand der PspA-Röhren und α_5 zeigt nach außen (**Abb. 2B**, [3, 5]). Sowohl PspA als auch Vipp1 besitzen eine N-terminale amphipathische Helix, die essenziell für die Membranbindung ist und im Falle von PspA in Abwe-

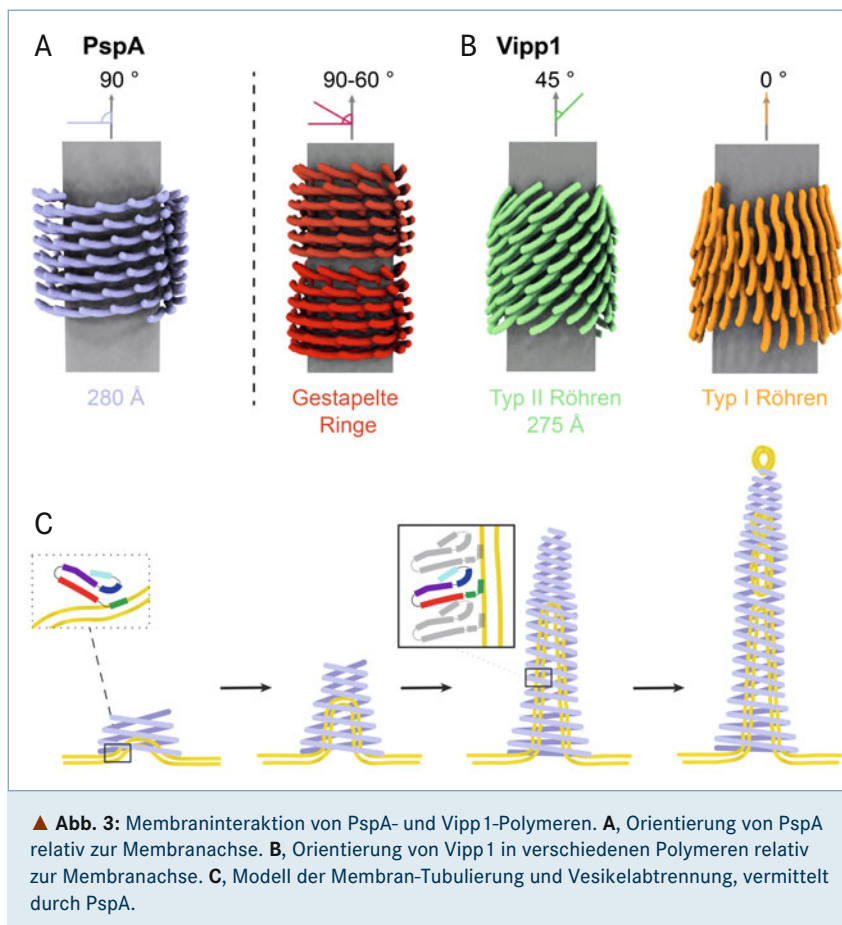
senheit von Membran ungefaltet vorliegt. Vipp1 bildet neben Ringstrukturen und gestapelten Ringröhren in Anwesenheit von Membran auch helikale Röhren, teppichartige Strukturen und Spiralen aus (Abb. 2C, [6–8]). Besonders interessant ist, dass – obwohl sich die Polymere der verschiedenen ESCRT-III-Proteine in ihrer Quartärstruktur stark unterscheiden – die Tertiärstruktur der Monomere hingegen zu großen Teilen konserviert zu sein scheint. So liegt das in ESCRT-III konservierte Haarnadelmotiv sowohl in PspA als auch in Vipp1 (und den bisher gelösten Strukturen der Archaea und Eukaryoten) vor [1]. Die vereinfachte Form eines ESCRT-III-Moleküls erinnert dabei an einen Arm, bei dem das Haarnadelmotiv (Helix $\alpha 1$ und $\alpha 2/3$) der Schulter zugeordnet werden kann, an der sich der bewegliche Ellbogen als Verbindung von Helix $\alpha 2/3$ und Helix $\alpha 4$ anschließt. Weiterführend folgt das Handgelenk, durch das die Helix $\alpha 5$ von Helix $\alpha 4$ abgespreizt wird. Die beschriebenen Molekülabschnitte von ESCRT-III-Schulter, -Ellbogen und -Handgelenk lassen sich in allen verschiedenen Homologen wiederfinden.

Strukturelle Vielfalt von PspA- und Vipp1-Polymeren

Die dargestellten Struktureinsichten der bakteriellen ESCRT-III-Modelle wurden in den letzten vier Jahren vor allem mithilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) gewonnen. Kryo-EM ermöglicht es, die detaillierte Struktur großer Proteinkomplexe in wässrigem Milieu aufzulösen und damit zuverlässige atomare Modelle zu erzeugen. Ein besonderer Vorteil der Kryo-EM-Methode im Vergleich zu Kernresonanzspektroskopie oder Röntgenkristallographie liegt darin, auch heterogene Proben für die Strukturbestimmung nutzbar zu machen. Durch computergestützte Klassifizierung von verschiedenen Partikelpopulationen lassen sich eine Vielzahl von Konformationszuständen in ein und derselben Probe auflösen. Im besonderen Fall von PspA und Vipp1 lagen eine Vielzahl von sehr ähnlich breiten homopolymeren Ringen oder helikalen Röhren in den Proben vor, die letztlich genau sortiert und dann mit den zugeordneten Symmetrien separat rekonstruiert wurden. Mithilfe dieser rechenintensiven Bildbearbeitung war es möglich, in einer Probe bis zu 10 verschiedene PspA- bzw. Vipp1-Konformationszustände bei hoher Auflösung zu beschreiben. Zusammen mit veränderten Probenbedingungen lässt sich nun eine nahezu kontinuierliche



▲ **Abb. 2:** Polymerausbildung und strukturelle Vielfalt der bakteriellen ESCRT-III-Proteine PspA und Vipp1. **A**, links: elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme von PspA mit Lipiden der *Escherichia coli*-Membran. Rechts: EM-Bild von Vipp1 mit *E. coli*-Membran. **B**, Röhrenpolymer (oben) und Monomer (unten) von PspA (280 Å-Durchmesser; PDB 8AKW) in Ribbon-Darstellung. **C**, Ring- und Röhrenpolymere (oben) und dazugehörige Monomere von Vipp1 (unten) (C16 Ring aus PDB 7O3Y, Typ-I-Röhre aus PDB 8QFV und Typ-II-Röhre aus PDB 9EOO) in Ribbon-Darstellung. Die Schulter-, Ellbogen- und Handgelenk-Abschnitte des gefalteten ESCRT-III-Moleküls sind grün, grau bzw. beige hinterlegt. **D**, Überlagerung der PspA-Monomere mit Röhrendurchmesser 180–365 Å. **E**, Überlagerung der Monomere der sechs Lagen eines Rings. **F**, Draufsicht auf die Überlagerung von 11 PspA-Röhren mit einem Durchmesserbereich zwischen 180 und 365 Å. Ausrichtung entlang der $\alpha 1/\alpha 2$ -Haarnadelstruktur. PDB: 8AKQ, 8AKR, 8AKS, 8AKT, 8AKU, 8AKV, 8AKW, 8AKY, 8AKX, 8AKZ, 8AL0. **G**, Draufsicht auf die Überlagerung von Vipp1-Ringen (C14–C18). Ausrichtung entlang der $\alpha 1/\alpha 2$ -Haarnadelstruktur. PDB: 7O3W, 7O3X, 7O3Y, 7O40, 7O3Z.



Anpassung der Polymerstruktur darstellen, die auf eine erstaunliche molekulare Plastizität zurückzuführen ist.

Die beobachtete strukturelle Plastizität ist vor allem auf drei Scharnierregionen innerhalb der Monomere zurückzuführen, die eine Bewegung einzelner Helices relativ zueinander ermöglichen: am Übergang $\alpha 2$ - $\alpha 3$, in der Verbindung zwischen $\alpha 3$ - $\alpha 4$ und zwischen $\alpha 4$ - $\alpha 5$. In 11 analysierten PspA-Röhren (Durchmesser 180–365 Å) treten die größten Winkeländerungen im zweiten Scharnier ($\sim 45^\circ$ bis 20°) auf, während die übrigen Scharniere geringere Flexibilität zeigen (**Abb. 2D**). In den C16-Ringen von Vipp1 erfolgt die stärkste Biegung an der ersten Scharnierregion, in oberen Ringlagen zusätzlich an der dritten ($\alpha 5$) (**Abb. 2E**). Diese Flexibilität der einzelnen PspA- und Vipp1-Monomere bildet den Grundstein für die hohe kontinuierliche Konformationsplastizität von PspA und Vipp1 und kann vor allem durch Vergleich aller Modelle der Röhren- und Ringdurchmesser deutlich gemacht werden (**Abb. 2F, G**). Insgesamt zeigt sich, dass die strukturelle Vielfalt der ESCRT-III-Komplexe aus einer Kombination von

evolutionär stark konservierten Resten und nicht konservierten hydrophoben Wechselwirkungen zwischen benachbarten Monomeren ermöglicht wird und dabei die konservierte ESCRT-III-Monomerfaltung prinzipiell aufrecht erhalten bleibt.

Interaktion von Vipp1 und PspA mit der Membran

PspA und Vipp1 sind der Lage die innere Membran von Bakterien zu stabilisieren und Protonenverlust über eine geschädigte innere Membran zu reduzieren. Vipp1 ist zudem essenziell für die Thylakoidmembranbildung und den Umbau von Thylakoidmembranen [9]. Diese essenzielle Rolle der Proteine beim Membranschutz und Membranumbau macht eine Betrachtung der Polymerstruktur in Gegenwart von Lipid besonders interessant. Nach Inkubation mit negativ geladenen Membranen ist sowohl PspA als auch Vipp1 in der Lage, Membranen im Lumen der Ring- bzw. Röhrenstrukturen zu internalisieren und zu tubulieren. Die Ausrichtung der PspA- und Vipp1-Monomere relativ zur Membranachse unterscheidet

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer

sich stark. Bei PspA dominiert die horizontale Orientierung (90°) der Monomere aller PspA-Röhren [5]. Bei Vipp1 findet sich diese Anordnung bei (gestapelten) Ringen, wobei die Ausrichtung innerhalb eines Rings leicht variiert ($60\text{--}90^\circ$). Bei den Vipp1-Röhren lassen sich hingegen zwei unterschiedliche Polymeranordnungen finden (Typ-I und Typ-II-Röhren), wobei bei Typ-I-Röhren die Vipp1-Monomere relativ zur Membranachse vertikal (0°) angeordnet sind und bei Typ-II-Röhren eine 45° -Anordnung vorliegt (Abb. 3A, [6]).

Möglicher Mechanismus der Membranabschnürung

Erst die hohe strukturelle Plastizität von PspA und Vipp1 erlaubt es diesen bakteriellen ESCRT-III-Proteinen, ihre Aufgabe des Membranumbaus zu erfüllen. Die Tubulation von Membranen benötigt umso weniger Energie, je breiter der Röhrendurchmesser und damit je niedriger deren Membrankrümmung zu Beginn ist [10]. Ist diese erste Energiebarriere erstmal überwunden, kann die Membran im Inneren der Röhren gehalten werden, selbst wenn diese ihren Durchmesser verengen. Der sich verjüngende Röhrendurchmesser steuert ab hier die Möglichkeit der spontanen Membranabschnürung, was im Falle von PspA zu kleinen, abgeschnürten Vesikeln führt (Abb. 3C). Zusammengekommen stützen unsere Daten die Vorstellung, dass die ESCRT-III-Polymere mögliche Membranübergangszustände stabilisieren, die für die Membranfusion, Membranabschnürung und den Membranumbau nötig sind [6,10]. Eine solche strukturelle Plastizität ist eine gemeinsame Eigenschaft der gesamten ESCRT-III-Proteinfamilie [5], denn auch eukaryotische ESCRT-III-Proteine bilden polymorphe Strukturen wie Ringe, Röhren und Spiralen. Konformationsänderungen in ESCRT-III-Proteinen wie CHMP1B und IST1 korrelieren mit unterschiedlichen Helixdurchmessern. Ebenso variieren die Durchmesser von CHMP2A/CHMP3-Röhren, was möglicherweise Membranverengung unterstützt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mitglieder der ESCRT-III-Superfamilie ein erstaunliches Maß an struktureller Plastizität aufzeigen, welche essenziell für ihre Membranumbau- und Membranschutz-Funktion zu sein scheint [1]. Diese

Arbeiten zu den bakteriellen Membranschutz-Proteinen zeigen, dass ESCRT-III-Proteine mehr als bisher bekannt in einer Vielzahl von Strukturen aktiv vorliegen können und die Kryo-EM als Methode der experimentellen Strukturblogie besonders geeignet ist, die Aufklärung der vielen Konformationszustände zu ermöglichen.

Danksagung

Wir danken Dirk Schneider (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) für die langfristigen und gewinnbringenden Kooperationsarbeiten zu PspA und Vipp1 sowie Holger Gohlke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Forschungszentrum Jülich) für die Molekulardynamiksimulation von PspA mit Lipidmembranen.

Literatur

- [1] Nachmias D, Frohn BP, Sachse C et al. (2025) ESCRTs – a multi-purpose membrane remodeling device encoded in all life forms. *Trends Microbiol* 33: 665–687
- [2] Gupta TK, Klumpe S, Gries K et al. (2021) Structural basis for Vipp1 oligomerization and maintenance of thylakoid membrane integrity. *Cell* 184: 3643–3659.e23
- [3] Junglas B, Huber ST, Heidler T et al. (2021) PspA adopts an ESCRT-III-like fold and remodels bacterial membranes. *Cell* 184: 3674–3688.e18
- [4] Liu J, Tassinari M, Souza DP et al. (2021) Bacterial Vipp1 and PspA are members of the ancient ESCRT-III membrane-remodeling superfamily. *Cell* 184: 3660–3673.e18

- [5] Junglas B, Hudina E, Schönnenbeck P et al. (2025) Structural plasticity of bacterial ESCRT-III protein PspA in higher-order assemblies. *Nat Struct Mol Biol* 32: 23–34
- [6] Junglas B, Kartte D, Kutzner M et al. (2025) Structural basis for Vipp1 membrane binding: from loose coats and carpets to ring and rod assemblies. *Nat Struct Mol Biol* 32: 555–570
- [7] Naskar S, Merino A, Espadpas J et al. (2025) Mechanism for Vipp1 spiral formation, ring biogenesis, and membrane repair. *Nat Struct Mol Biol* 32: 571–584
- [8] Pan S, Gries K, Engel BD et al. (2025) The cyanobacterial protein Vipp1 forms ESCRT-III-like structures on lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol* 32: 543–554
- [9] Siebenaller C, Junglas B, Schneider D (2019) Functional Implications of Multiple IM30 Oligomeric State. *Front Plant Sci* 10: 1500
- [10] Hudina E, Schott-Verdugo S, Junglas B et al. (2025) The bacterial ESCRT-III PspA rods thin lipid tubules and increase membrane curvature through helix $\alpha 0$ interactions. *Nat Acad Sci USA* 122: e2506286122

Funding: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, 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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Korrespondenzadresse:

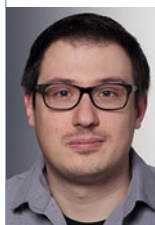
Prof. Dr. Carsten Sachse
 Ernst-Ruska Centrum für Mikroskopie und Spektroskopie mit Elektronen, ER-C-3: Strukturbiologie
 Forschungszentrum Jülich
 Wilhelm Johnen Straße
 D-52425 Jülich
 c.sachse@fz-juelich.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Esther Hudina

2016–2022 Studium Molekulare und Angewandte Biotechnologie an der RWTH Aachen. Seit 2022 Promotionsstudentin Strukturblogie, Ernst Ruska-Centrum, Forschungszentrum Jülich.



Benedikt Junglas

2011–2016 Studium Biomedizinische Chemie an der Universität Mainz. 2019 Promotion am Institut für Biochemie, Universität Mainz. 2020–2022 PostDoc Strukturblogie, Ernst Ruska-Centrum, Forschungszentrum Jülich. Seit 2022 Senior Scientist Strukturblogie, Ernst Ruska-Centrum, Forschungszentrum Jülich.



Carsten Sachse

1998–2003 Studium Biochemie an der Universität Jena. 2007 Promotion am Leibniz-Institut für Altersforschung Jena mit Aufenthalt an der Brandeis Universität Waltham, USA. 2007–2008 PostDoc Max-Planck-Research Unit “Enzymology of Protein Folding”, Halle. 2008–2009 PostDoc (EMBO Long-term Fellowship) am MRC – Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. 2010–2018 Gruppenleiter am EMBL Heidelberg (Structural and Computational Biology Unit). Seit 2018 Direktor für Strukturblogie, Ernst Ruska-Centrum, Forschungszentrum Jülich und Professor an der Universität Düsseldorf.