

Temperatur-, hydrostatische Druck- und Kosolvens-
effekte auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung
verschiedener Proteinsysteme

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

vorgelegt von

Hasan Çınar

aus Kamen (Deutschland)

eingereicht an der
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

Dortmund
August 2022

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2018 bis August 2022 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Prüfungskommission:

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik



Für meine Familie

*„Mehr als die Vergangenheit interessiert mich die Zukunft,
denn in ihr gedenke ich zu leben.“*

ALBERT EINSTEIN

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für das interessante und vielfältige Thema, sowie die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei **Frau Andrea Jeworrek** möchte ich mich sowohl für die freundliche Hilfe bei verwaltungstechnischen Angelegenheiten und für die netten Gespräche bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank an **Dr. Samy Al-Ayoubi, Dr. Paul Hendrik Schummel, Dr. Artem Levin** und **Nisrine Jahmidi-Azizi** für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die phantastische gemeinsame Zeit.

An dieser Stelle nutze ich die Gelegenheit um mich bei **allen Mitarbeitern** sowie **ehemaligen Mitarbeitern** des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre zu bedanken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben meinen **lieben** und **langjährigen Freunden** meinen beiden Geschwistern **Dr. Süleyman Çınar** und **Rukiye Çınar**, die meine Arbeit mit großem Engagement unterstützt haben. Der größte Dank gebührt jedoch meinen **Eltern**, ohne deren unermüdliche Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Biologie und Biotechnologie.....	1
1.2	Thermodynamik der temperaturabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge	4
1.3	Thermodynamik der biomolekularen druckabhängigen LLPS und des reentranten Phasenverhaltens.....	7
2	Experimentelle Methoden.....	13
2.1	Chemikalien und Proteine.....	13
2.2	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR).....	14
2.2.1	Grundlagen der IR-Spektroskopie ^[66]	14
2.2.2	Funktionsweise eines FT-IR Spektrometers ^[66]	17
2.2.3	IR-Spektroskopie an Proteinen ^[66]	19
2.2.4	Experimentelles	21
2.3	Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen.....	24
2.3.1	Grundlagen der Lichtstreuung an Flüssig-Flüssig-Phasengemischen	24
2.3.2	Experimentelles	26
2.4	Drucksprung-Relaxationsstudie.....	28
2.4.1	Keimbildung und Wachstumsmodelle der Phasentrennung.....	28
2.4.2	Experimentelles	29
2.5	Lichtmikroskopie.....	31
2.5.1	Grundlagen der Lichtmikroskopie ^[66]	31
2.5.2	Experimentelles	32
3	Temperatur-, Druck- und Osmolyteeffekte auf die LLPS von γ D-Kristallin & α -Elastin	35
3.1	Probenpräparation.....	36
3.1.1	Proteinexpression von γ D-Kristallin.....	36

3.1.1.1	Transformation.....	36
3.1.1.2	Proteinexpression.....	37
3.1.1.3	Zelllyse und Aufreinigung.....	37
3.1.2	FT-IR Messungen.....	39
3.1.3	Turbiditätsmessungen und Lichtmikroskopie.....	40
3.2	Druck- und Osmolyt-abhängige LLPS des globulären Proteins γ D-Kristallin.....	42
3.2.1	Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen.....	43
3.2.2	Temperatur- und druckabhängige Lichtmikroskopie.....	47
3.2.3	Druckabhängige FT-IR Messungen.....	51
3.3	Druck- und Osmolyt-abhängige LLPS des intrinsisch ungeordneten Proteins α -Elastin.....	55
3.3.1	Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen.....	57
3.3.2	Temperatur- und druckabhängige Lichtmikroskopie.....	59
3.4	Erklärung der T -, p -, und TMAO-abhängigen Protein-LLPS hinsichtlich der lösungsmittelvermittelten Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen.....	64
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	76
4	Drucksprung-Relaxationsstudie: Der Einfluss von Kosolventien und Crowder auf die Kinetik der Protein-Kondensatbildung auf Grundlage der LLPS von γ D-Kristallin.....	79
4.1	Probenpräparation.....	82
4.1.1	FT-IR Messungen.....	82
4.1.2	Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen.....	83
4.1.3	Lichtmikroskopie.....	83
4.2	Temperatur- und druckabhängige FT-IR Messungen.....	85
4.3	Temperaturabhängige Turbiditätsmessungen.....	91
4.4	Drucksprung-Relaxationsexperimente.....	97
4.5	Zusammenfassung und Fazit.....	105
5	Druckempfindliche SynGAP/PSD95 Kondensate als Modell für die PSD und ihre biophysikalischen und neurologischen Auswirkungen.....	109

5.1	Probenpräparation.....	111
5.1.1	Turbiditätsmessungen.....	111
5.1.2	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	111
5.1.3	Förster Resonanz Energie Transfer-Messungen (FRET).....	112
5.2	Druck- und konzentrationsabhängige Turbiditätsmessungen.....	114
5.3	Druck- und konzentrationsabhängige Lichtmikroskopie.....	117
5.4	Druckabhängige Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-Messungen am SynGAP/PSD95-System.....	122
5.5	Physikalische Interpretation des druckabhängigen Phasenverhaltens des SynGAP/PSD95-Modellsystems.....	124
5.6	Zusammenfassung und Fazit.....	128
6	Der Einfluss von Kosolventien und Crowding Agenzien auf die Stabilität und die Übergangskinetik des SynGAP/PSD95-Kondensats.....	129
6.1	Probenpräparation.....	131
6.1.1	<i>Steady-state</i> Fluoreszenzspektroskopie.....	131
6.1.2	Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen.....	132
6.1.3	Lichtmikroskopie.....	132
6.2	Druckabhängige Turbiditätsmessungen.....	134
6.3	Druckabhängige Lichtmikroskopie.....	136
6.4	Druckabhängige <i>steady-state</i> Fluoreszenzmessungen.....	138
6.5	Drucksprung-Relaxationsexperimente.....	142
6.6	Zusammenfassung und Fazit.....	145
7	Zusammenfassung.....	149
8	Summary.....	153
9	Anhang.....	157
	Literaturverzeichnis.....	183
	Abkürzungsverzeichnis.....	201
	Publikationsliste.....	205

Konferenzbeiträge	207
-------------------------	-----

1 Einleitung

1.1 Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Biologie und Biotechnologie

Für die biologische Funktion von Proteinen sind physikalisch-chemische Prozesse verantwortlich, die durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Biomolekülen reguliert werden. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen ist nicht nur für die Entschlüsselung biologischer Funktionen von großer Bedeutung, sondern auch für die Erforschung von Krankheitsprozessen und für zukünftige biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten. Von besonderem Interesse ist, wie diese Wechselwirkungen das Verhalten von hochkonzentrierten Proteinlösungen beeinflussen, welche die Zustände *in vivo* imitieren.^[1-5] Das Innere einer biologischen Zelle stellt eine außerordentlich dicht gepackte Umgebung dar, die sich aus Nukleinsäuren, Polysacchariden, Proteinen, Ribonukleoproteinen, und einer Vielzahl von weiteren Biomolekülen zusammensetzt.^[4-6] Beispiele hierfür sind rote Blutkörperchen, deren Proteinanteil ca. 35 % des Gesamtgewichts ausmacht oder die Zellen der Augenlinse, die bis zu 60 % Proteine enthalten. Auch bei einer Vielzahl von Krankheiten spielt die Proteininteraktion eine wichtige Rolle. Krankheiten wie Katarakt, Sichelzellenanämie oder Amyloidose (z.B. amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer, Parkinson) sind auf Proteininteraktionen zurückzuführen, die kondensierte oder aggregierte Zustände auslösen.^[1,7,8] Demzufolge würde ein umfassenderes Verständnis der Proteinwechselwirkung in kondensierten Umgebungen dazu beitragen, Strategien zur Vorbeugung und Behandlung solcher Krankheiten zu entwickeln.

Bereits vor 120 Jahren entstand die Idee^[9], dass kondensierte, tropfenartige Granula zur Struktur des Protoplasmas beitragen. Jedoch wurde erst in den letzten 10 Jahren^[10] neben der durch "klassische" Lipid-Doppelschichtmembranen gestützte Kompartimentierung (z.B. Plasmamembran, Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) erkannt, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (*Liquid-Liquid phase separation*, LLPS) von Proteinen und Nukleinsäuren eine wichtige Rolle bei der membranlosen Kompartimentierung von Zellen durch die Bildung von biomolekularen Kondensaten spielten. Solche Kondensationsprozesse sind mit zahlreichen intrazellulären Organismen an der subzellulären Organisation wie

(siehe Referenz^[11-14], und Referenzen darin), *P-bodies (processing bodies)*, Stressgranula, Keimgranula und Zentrosomen im Zytoplasma und Nukleoli, Chromatin und Cajal-Körper im Zellkern beteiligt. Unter anderem sind diese Kondensate an Membranfunktionen, wie beim Kernporenkomplex beteiligt^[15] oder man findet sie, wie im Fall der postsynaptischen Dichte, in der Nähe von Zellmembranen wieder.^[16,17] Die Entstehung von biomolekularen Kondensaten kann durch Wechselwirkungen zwischen gefalteten globulären Proteinen^[16,17], intrinsisch ungeordneten Proteinen (*intrinsically disordered protein*, IDP) und/oder intrinsisch ungeordneten Proteinregionen (*intrinsically disordered region*, IDRs)^[18,19] begünstigt werden. Dabei können sie überwiegend aus gefalteten Proteinen, nur aus IDRs oder aus Proteinen mit gefalteten Domänen und ungeordneten Linkern bestehen.^[20] Wie die jüngsten Forschungsergebnisse über Clusterbildung von Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerasen und Kondensation von Coaktivatoren im zellulären Transkriptionsapparat zeigen, ist die LLPS vermutlich für Zellen eine energetisch effiziente Möglichkeit, gewisse Proteine und RNAs zu konzentrieren, und so die Bindungsaffinitäten von Biomolekülen und die Aktivitäten spezifischer biochemischer Reaktionen zu regulieren.^[21-23] Auch in der Membranbiophysik hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten eine vergleichbare Sichtweise hinsichtlich der funktionellen Rolle der Phasentrennung durchgesetzt. Es wird angenommen, dass Wechselwirkungen zwischen eingebetteten Membrankomponenten die Bildung von phasengetrennten *Rafts* (d.h. flüssig-geordnete Domänen in einer flüssig-ungeordneten 2D-Membranmatrix) induzieren, die dann als membrangebundene Reaktions- und Signalplattformen dienen könnten.^[24,25] Solch ein Mechanismus soll z.B. dazu beitragen, den endozytotischen oder exozytotischen Membrantransport zu regulieren und spezifische Signale über die Plasmamembran zu übertragen. Interessanterweise könnten die biomolekulare LLPS und membranlose Kompartimentierung sogar eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Protozellen in der präbiotischen Evolution gespielt haben, wie erstmals in der Arbeit von Oparin im Jahr 1924^[26,27] vorgeschlagen und in jüngster Zeit erneut betont wurde.^[28-32] In der weitgehend isothermen Lebensumgebung auf der Erdoberfläche, insbesondere in der inneren Umgebung von homoiothermen Tieren, bedient sich die Natur anstelle der Temperatur häufig anderer Variablen, um die biomolekulare LLPS zu steuern. Dazu gehören Veränderungen der Protein- und/oder RNA-Konzentration, der Ionenstärke, des Osmolytgehalts, der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und der Ligandenbindung.^[1,23,33-36] Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der LLPS gegenüber sich ändernden Umweltbedingungen sind biomolekulare Kondensate häufig an Reaktionen beteiligt, die sich gegen externe Stressfaktoren wie dem Hitzeschock richten.^[37]

Ein weiterer wichtiger, aber weitgehend unerforschter Stressfaktor ist hoher hydrostatischer Druck (*high hydrostatic pressure*, HHP). Über 60 % der Organismen der irdischen Biosphäre existieren in einer Tiefe von mehr als 1000 m und bei Drücken über 100 bar. Am tiefst gelegenen Meeresgrund der Erde, dem Marianengraben, herrschen sogar Drücke von 1 kbar. Auf Grund dessen sind für ein besseres Verständnis über das Leben in der Tiefsee, die bekanntlich auch als potenzieller Geburtsort des Lebens auf der Erde gilt, HHP-Studien an biomolekularen Systemen von großer Bedeutung.^[38,39] Darüber hinaus kann der Druck als thermodynamische Variable zur Beeinflussung intermolekularer Proteinwechselwirkungen verwendet werden, um die Konformationslandschaft und das Phasenverhalten der Proteine aufzudecken. Da das partielle Molvolumen von Biomolekülen empfindlich auf Änderungen der Hydratation reagiert, können Druckstudien wertvolle Einblicke sowohl in die Packungs- als auch in die Hydratationseigenschaften von Biomolekülen liefern.^[40–42]

1.2 Thermodynamik der temperaturabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge

Die Thermodynamik der temperaturabhängigen biomolekularen Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge wurde in neueren Arbeiten und Reviews sehr gut beschrieben (siehe Referenz^[43–48]). Auf Grund dessen soll die Beschreibung in diesem Kapitel nicht im Detail erfolgen und soll lediglich für ein besseres Verständnis der hierauf folgenden Kapitel dienen. Werden zwei reine Flüssigkeiten miteinander vermischt, ändert sich die Gibbs-Energie des Systems um

$$\Delta G_m = RT (x_1 \ln \gamma_1 x_1 + x_2 \ln \gamma_2 x_2) \quad (1.1)$$

mit x_i als Stoffmengenanteil der Flüssigkeiten, γ_i der Aktivitätskoeffizient der Flüssigkeit i im Gemisch, T der Temperatur und R die Gaskonstante. Beide Flüssigkeiten sind bei konstant bleibender Temperatur T vollständig miteinander mischbar, wenn ΔG_m gegen x_1 für alle x_1 konkav nach oben verläuft.^[49] Wenn jedoch die Aktivitätskoeffizienten wesentlich mehr als den Wert 1 annehmen, kann ΔG_m in Abhängigkeit von x_1 ein lokales Maximum aufweisen, wie Abbildung 1.1b bei $T' < T_c$ zeigt. Dies hat zur Folge, dass für eine gegebene Temperatur T' für jede Zusammensetzung der Flüssigkeiten zwischen den beiden Punkten **A** und **B** eine spontane Phasentrennung stattfinden kann. Die Punkte **A** und **B** repräsentieren die jeweiligen Minima.^[49]

In Abbildung 1.1a ist eine typische Koexistenzkurve für eine binäre Lösung mit partieller Mischbarkeit und einer oberen kritischen Lösungstemperatur (*upper critical solution*, UCST) dargestellt, wie es z.B. bei dem globulären Linsenprotein γ D-Kristallin beobachtet wird.^[50–53] Daher liegt das System oberhalb der kritischen Temperatur ($T > T_c$) vollständig gemischt vor, während unterhalb von T_c ($T' < T_c$) eine spontane Entmischung im System stattfinden kann. Hierbei wird T_c als die Temperatur beschrieben, an der die ΔG_m -Kurve flach verläuft und den Übergang zwischen einem lokalen Minimum und einem lokalen Maximum bildet (Abbildung 1.1b).^[49] Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein System anstelle einer UCST eine untere kritische Lösungstemperatur (*lower critical solution*, LCST) vorweist. Demzufolge würde im Gegensatz zur UCST oberhalb von T_c eine spontane Entmischung im System stattfinden, während unterhalb von T_c ein vollständig durchgemischtes Sys-

tem vorliegen würde. Ein Beispiel für eine Proteinlösung mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur ist das intrinsisch ungeordnete α -Elastin.^[53,54]

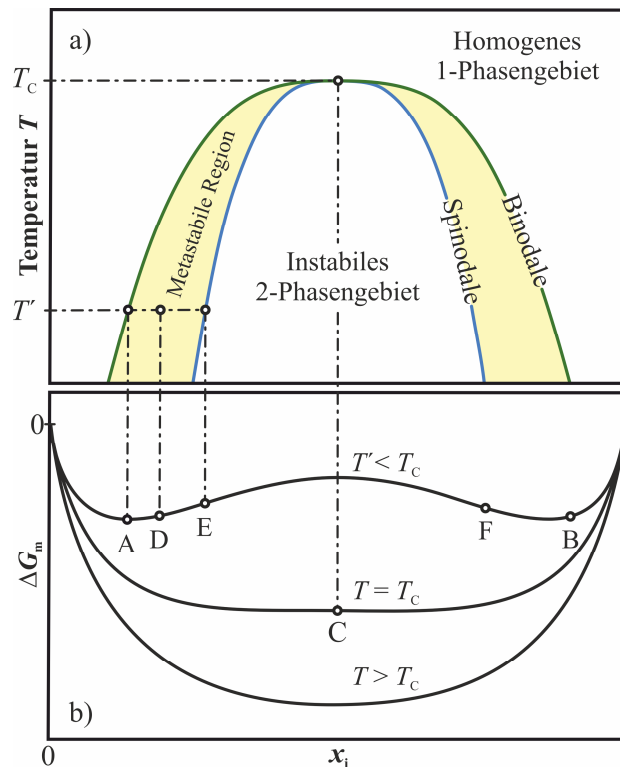


Abbildung 1.1: a) Typische temperaturabhängige Koexistenzkurve einer binären Lösung mit partieller Mischbarkeit und einer oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST). Das homogene 1-Phasengebiet und das instabile 2-Phasengebiet werden durch die Koexistenzkurve (Binodale) voneinander getrennt. Die Phasentrennung in der metastabilen Region erfolgt durch die Keimbildung und das Wachstum von Phasentröpfchen. Im instabilen 2-Phasengebiet erfolgt die Phasentrennung durch eine spinodale Entmischung. b) Möglicher Verlauf von ΔG_m in Abhängigkeit von x_i bei Temperaturen über, unter und gleich der kritischen Temperatur T_c . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[49]

Wie in Abbildung 1.1a veranschaulicht, unterteilt sich die Koexistenzkurve in eine metastabile und eine instabile Region. In der metastabilen Region ist bei einer Temperatur T' ein 1-Phasengebiet mit der Zusammensetzung **D** gegenüber kleinen Fluktuationen stabil, da ΔG_m immer noch konkav nach oben gerichtet ist. Demzufolge sind größere Konzentrationsschwankungen erforderlich, um eine Phasentrennung innerhalb des metastabilen Bereichs herbeizuführen. Ein System, dessen Zusammensetzung nahe dem lokalen Maximum von ΔG_m liegt, ist grundsätzlich instabil und entsprechend phasenetrennt, da schon minimale Fluktuationen in der Konzentration stets zu einer Verringerung von ΔG_m führen.^[49] Die Wendepunkte **E** und **F** in Abbildung 1.1b repräsentieren die Grenze zwischen dem metastabilen und instabilen Verhalten. Die Lage der temperaturabhängigen Wendepunkte wird durch die Spinodale beschrieben.^[55,56]

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen der metastabilen Region und dem instabilen 2-Phasengebiet ist der Prozess der Phasentrennung. Die Phasentrennung im metastabilen Bereich ist geprägt durch die Keimbildung und das Wachstum von kleinen Phasentröpfchen,^[57] die durch Diffusion der umliegenden gelösten Stoffe weiterwachsen und durch Kondensation größere Phasen bilden.^[49,58] Eine erfolgreiche Keimbildung kann jedoch nur stattfinden, wenn die thermischen Fluktuationen es dem Tröpfchen ermöglichen, eine (systemabhängige) kritische Keimgröße zu überschreiten, so dass die Volumenenergiegewinne die Oberflächenenergiekosten überwiegen.^[49]

Direkte Temperatursprünge in den instabilen Bereich führen nicht wie in der metastabilen Region zur Phasentrennung durch Tröpfchenbildung. Stattdessen findet die Phasentrennung durch eine spinodale Entmischung statt.^[55,57,59] Während dieses Prozesses bilden sich zeitgleich in der gesamten Flüssigkeit Bereiche höherer und niedrigerer Konzentration. Da sich die Oberflächengrenzen der Phasen erst in den späten Stadien der Phasentrennung bilden, besteht keine anfängliche Aktivierungsbarriere, die überwunden werden muss.^[49]

1.3 Thermodynamik der biomolekularen druckabhängigen LLPS und des reentranten Phasenverhaltens

Da der Druck als thermodynamische Variable und die entsprechenden hydrostatischen Hochdruck (HHP)-Studien eine gewichtige Rolle in dieser Arbeit spielen, richtet sich die Aufmerksamkeit dieses Abschnitts auf die Druckaspekte der grundlegenden Thermodynamik, die für die LLPS-Phänomene im Temperatur-Druck-Phasenraum relevant sind.^[60–63] Wenn ein Flüssigkeitsgemisch unter Druck gesetzt wird, ändert sich deren kritische Lösungstemperatur T_c , die abhängig vom System mit zunehmendem Druck p beziehungsweise abnimmt. So hat sich gezeigt, dass bei Systemen mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST) diese Temperatur sich in der Regel, aber nicht ausschließlich, mit steigendem Druck erhöht. Im Allgemeinen wird die Auswirkung des Drucks p auf die kritische Lösungstemperatur T_c durch den folgenden Ausdruck dT_c/dp beschrieben. Diese Beziehung lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass am kritischen Punkt die zweite Ableitung der freien Energie des Systems nach dem Protein-Stoffmengenanteil x null wird (Gleichung (1.2)).^[60–62]

$$\frac{dT_c}{dp} = \lim_{\substack{T \rightarrow T_c \\ x \rightarrow x_c}} \left(\frac{(\partial^2 V_m / \partial x^2)_{T,p}}{(\partial^2 S_m / \partial x^2)_{T,p}} \right) = \lim_{\substack{T \rightarrow T_c \\ x \rightarrow x_c}} \left(\frac{T(\partial^2 V_m / \partial x^2)_{T,p}}{(\partial^2 H_m / \partial x^2)_{T,p}} \right) \quad (1.2)$$

x_c ist der Stoffmengenanteil des Proteins bei T_c und S_m die molare Entropie, V_m das molare Volumen und H_m die molare Enthalpie der Mischung bei dem Stoffmengenanteil x des Proteins. Eine ähnliche Gleichung gilt für die entsprechenden thermodynamischen Exzessfunktionen. Jede molare Exzessfunktion, die hier mit Z_m^E bezeichnet wird ($Z =$ Volumen (V), Entropie (S), Enthalpie (H) usw.), ist definiert als die molare Funktion Z_m einer realen Mischung abzüglich der idealen Mischungsfunktion bei gleichem T , p und x . Dementsprechend kann das molare Volumen der Mischung, V_m , als Summe zweier Terme beschrieben werden: (i) dem idealen Term $\sum_i x_i V_{m,i}^*$, der die molaren Volumina $V_{m,i}^*$ der reinen, mit i gekennzeichneten Komponenten berücksichtigt, und (ii) dem molaren Exzessvolumen V_m^E als Korrektur. Für H_m gilt ein analoger Zusammenhang. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass die zweite Ableitung nach x_i nur die Exzesskomponenten V_m^E und H_m^E enthält.^[53] Im Prinzip können experimentelle Daten für V_m^E aus präzisen p - V - T -Daten für verschiedene Mischungen und reine Komponenten gewonnen werden. Allerdings sind solche Daten sehr selten und für Proteinlösungen bisher nicht verfügbar.

Typischerweise beinhaltet H_m in der Nähe einer UCST $H_m^E > 0$,^[60–62] d.h. die Mischung wird durch die Enthalpie ungünstig beeinflusst. In diesem Fall wird $(\partial^2 H_m^E / \partial x^2)_{T,p} < 0$ erwartet, da H_m^E für eine reine Komponente ($x = 0$ oder 1) per Definition wegfällt. Somit sollte H_m^E mit zunehmendem x einen allgemeinen Trend aufweisen, der zunächst zunimmt (von $H_m^E = 0$ bei $x = 0$ zu $H_m^E > 0$ bei $x < 1$) und dann abnimmt (zu $H_m^E = 0$ bei $x = 1$). Gemäß Gleichung (1.2) würde bei einer experimentellen Beobachtung von $(dT_c/dp) < 0$ die zweite Ableitung des Exzessvolumens nach dem Stoffmengenanteil positiv sein $(\partial^2 V_m^E / \partial x^2)_{T,p} > 0$. Entsprechend ergibt sich daraus ein negatives Exzessvolumen $V_m^E < 0$. Umgekehrt ergibt sich aus einer experimentellen Beobachtung von $(dT_c/dp) > 0$ mit $(\partial^2 V_m^E / \partial x^2)_{T,p} < 0$ ein positives Exzessvolumen $V_m^E > 0$. Im Gegensatz dazu ist bei einem System mit einer LCST typischerweise $H_m^E < 0$, d.h. die Mischung wird durch die Enthalpieänderung begünstigt. Daraus folgt, dass für eine LLPS mit einer LCST das Vorzeichen von (dT_c/dp) gleich dem von $(\partial^2 V_m^E / \partial x^2)_{T,p}$ und entgegengesetzt zu dem von V_m^E sein wird. Im speziellen Fall einer regulären binären Lösung mit den Komponenten 1 und 2 ($V_m^E = B_V x_1 \cdot x_2$ und $H_m^E = B_H x_1 \cdot x_2$, mit $x_2 = (1-x_1)$, B_V und B_H sind Konstanten) erhält man die Gleichung (1.3).^[60–62]

$$\frac{dT_c}{dp} = \frac{T_c V_{m,c}^E}{H_{m,c}^E} \quad (1.3)$$

Demnach wäre nicht nur das Vorzeichen, sondern auch der Betrag von (dT_c/dp) direkt durch den Quotienten von V_m^E und H_m^E gegeben. Für ein System mit einer UCST und erwartetem $H_{m,c}^E > 0$ (wenn $B_V > 0$; d.h., $V_m^E > 0$) würde $(dT_c/dp) > 0$ sein. Daraus folgt, dass bei einer gegebenen Temperatur oberhalb eines gewissen Drucks eine binäre Lösung nicht mehr mischbar wäre, wenn T_c höher ist als die angegebene Temperatur. Wenn dagegen $B_V < 0$ (d.h. $V_m^E < 0$) ist, wird $(dT_c/dp) < 0$ und somit gäbe es einen bestimmten Druck, oberhalb dessen eine vollständige Mischbarkeit erreicht wird (wenn T_c unterhalb der entsprechenden Temperatur liegt). Bei einem System mit einer LCST und $H_{m,c}^E < 0$ ist dieses Verhältnis umgekehrt.^[53]

In manchen Fällen kann sich V_m^E bei der kritischen Temperatur mit zunehmendem Druck von einem negativen zu einem positiven Wert ändern, wodurch ein reentranter Phasenübergang beobachtet werden kann. Zur Veranschaulichung dieses thermodynamischen Szenarios sind in Abbildung 1.2 zwei schematische 3D-Phasendiagramme dargestellt, die zeigen, wie die LLPS-Regionen mit einer UCST oder einer LCST von T und p abhängen können.

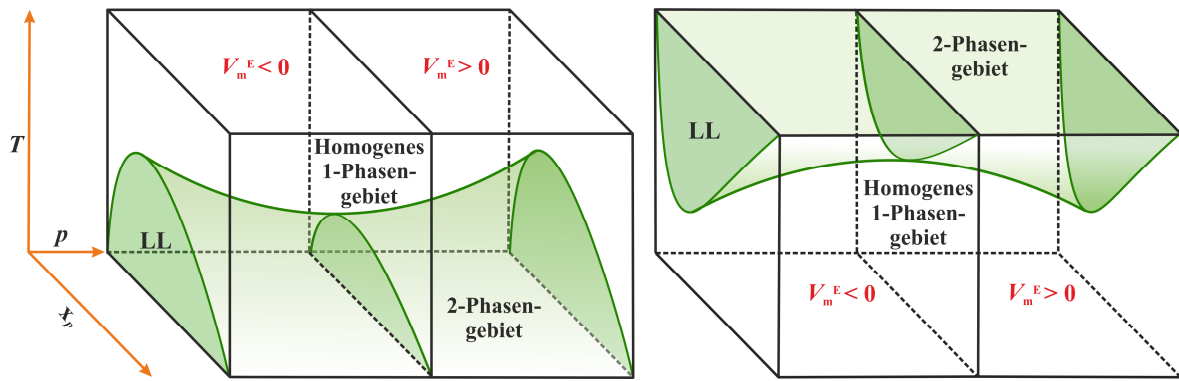


Abbildung 1.2: Schematische 3D-Phasendiagramme, die mögliche Auswirkungen des Drucks p auf binäre Flüssigkeitsgemische veranschaulichen. x_p ist der Protein-Stoffmengenanteil. Dargestellt sind Phasendiagramme mit einer UCST (links) und einer LCST (rechts) sowie p -induziertes reentrantes Phasenverhalten in den Zweiphasen-LLPS-Bereichen (LL), wie am Beispiel für konzentrierte Lysozym- bzw. Elastin-Lösungen beobachtet.^[53,54] Außerhalb der grün schattierten Bereiche herrschen Einphasenzustände, d.h. das System liegt in den jeweiligen Einphasengebieten (links und rechts) vollständig durchmischt vor. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Für ein tieferes physikalisches Verständnis, das über die allgemeine Thermodynamik der LLPS hinausgeht, sind statistisch-mechanische Analysen und eine Aufklärung der molekularen Grundlagen der zugrundeliegenden Wechselwirkungen erforderlich. Das Zusammenspiel von enthalpischen, entropischen und volumetrischen Effekten auf das Phasenverhalten von Proteinlösungen müsste im Hinblick auf Protein-Protein- und Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkungen untersucht werden und wie diese Wechselwirkungen durch die Konzentrationen verschiedener Komponenten, der Temperatur und den hydrostatischen Druck beeinflusst werden können.^[53] Es ist zu erwarten, dass die Bedingungen im wässrigen Milieu, das für die biomolekulare LLPS relevant ist, äußerst komplex sind. Ein Beispiel hierfür ist der reentrante Phasenübergang (*reentrant phase transition*, RPT), bei dem eine monotone Veränderung einer thermodynamischen Variable wie der Temperatur oder der Druck zu zwei aufeinander folgenden Phasenübergängen führt, wobei der Endzustand dem Anfangszustand makroskopisch ähnlich ist. Schneider et al. konnten in verschiedenen Zwei-Komponenten-Systemen, wie dem Methylpyridin-Wasser-Gemisch,^[8,60] einen hochdruckbedingten, nicht mischbaren Zustand und einen reentranten Phasenübergang nachweisen. So wies das Methylpyridin-Wasser-Gemisch eine mit steigendem Druck abnehmende Koexistenz auf, die bei ≈ 200 bar vollständig verschwand und oberhalb von 2 kbar sich erneut bildete. Dieses ungewöhnliche Phasenverhalten könnte auf phänomenologischer Ebene durch die oben beschriebene Temperatur- und Druckabhängigkeit der thermodynamischen Exzessfunktionen erklärt werden. Ein molekulares Modell ist jedoch nicht erstellt worden. Ein reentranter Pha-

senübergang bei Protein-LLPS wurde für das globuläre Protein Lysozym^[64] und das intrinsisch ungeordnete α -Elastin^[54] beobachtet.

Aus molekularer Sicht deutet der reentrante Phasenübergang darauf hin, dass bestimmte räumlich anisotrope Wechselwirkungen im System beteiligt sind, da es eher unwahrscheinlich ist, dass ein reentranter Phasenübergang in einem System stattfindet, welches ausschließlich aus kugelförmigen Molekülen besteht, die über isotrope potenzielle Energien miteinander wechselwirken. Bei wässrigen Systemen sind wahrscheinlich gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen die Ursache für diese Anisotropie.^[63] Wenn günstig gerichtete Wechselwirkungen sowohl zwischen gleichen als auch ungleichen Molekülen auftreten und die Summe der gerichteten und ungerichteten Wechselwirkungsenergien für ein Paar gleicher Moleküle günstiger ist als für ein Paar ungleicher Moleküle, würde die Lösung hypothetisch zur Phasentrennung neigen. Wenn zwischen ungleichen Molekülen keine günstig gerichteten Wechselwirkungen auftreten können, wie im Fall von unpolaren, gelösten Stoffen und wasserstoffbrückenbindendem Wasser, wird die Durchmischung noch weniger begünstigt, und die enthalpische Triebkraft für eine Phasentrennung wäre daher noch stärker. Diese enthalpische LLPS-treibende Kraft kann durch Erhöhung der Temperatur verstärkt werden, wodurch das System weniger in der Lage ist, den Mangel an günstig gerichteten Wechselwirkungen an der Grenzfläche ungleicher Moleküle durch die Bildung restriktiverer Molekülkonfigurationen zwischen gleichen Molekülen zu kompensieren. Wenn diese Kraft ausreichend stark ist, kann sie den Entropievorteil der mischbaren Phase überwinden und mit zunehmender Temperatur zur LLPS führen, d.h. das System würde eine LCST aufweisen. Wenn jedoch die T -abhängige enthalpische LLPS-treibende Kraft bei noch höheren Temperaturen im Wesentlichen zum Erliegen kommt (nämlich, wenn z.B. die Einschränkung der Molekülrotationen durch die gerichteten Wechselwirkungen bei hoher thermischer Bewegung vernachlässigbar wird), würde ein weiterer Temperaturanstieg jedoch die mischbare Phase begünstigen, da diese bei hohen Temperaturen eine günstigere entropische Konfigurationsenergie aufweist. In diesem Fall hätte das System eine UCST bei höherer Temperatur. Dies wäre ein mögliches physikalisches Szenario, in dem ein T -induzierter RPT auftreten könnte (Abbildung 1.2 rechts, obere LLPS-Region). Ein möglicher Mechanismus für den p -induzierten RPT ist, dass sich durch die Phasenseparation locker gepackte Hohlraumvolumina in den kondensierten Phasen bilden, die anschließend durch Druckeinwirkung teilweise bzw. vollständig beseitigt werden. Erwartungsgemäß würde die Kompression des Systems sowohl das Auflösen der LLPS als auch die vollständige Durchmischung des Systems bewirken, die wiederum das Gesamtvolumen verringert und die Mischungsentropie

des gesamten Systems erhöht. Der erneute Übergang in den phasenentmischten Zustand bei weiterer Druckerhöhung, wie im Falle von Lysozym und α -Elastin, könnte anschließend durch günstigere gerichtete Wechselwirkungen zwischen den gleichen Molekülen hervorgerufen werden, z.B. durch wasservermittelte Protein-Protein-Kontakte, die ein geringeres Volumen aufweisen als die in der durchmischten Lösung vorherrschenden Protein-Wasser-Kontakte. Explizite atomare Simulationen hydrophober Wechselwirkungen (z.B. Methan in Wasser) stützen dieses Szenario von T - und p -induzierten RPTs bis zu einem gewissen Grad,^[40,54,65] obwohl die strukturellen und energetischen Details biomolekularer Lösungen viel komplexer und bei Weitem nicht ausreichend erforscht sind.

2 Experimentelle Methoden

2.1 Chemikalien und Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Proteine aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Proteine.

Bezeichnung	Reinheit / Konzentration	Bezugsquelle
α -Elastin	n.a.	EPC, Inc.
γ D-Kristallin (Human)	n.a.	Siehe Kapitel 3.1.1
γ D-Kristallin (Ratte)	n.a.	Siehe Kapitel 3.1.1
Bariumsulfat	99 %	Sigma-Aldrich
Deuteriumchlorid in D ₂ O, 35 %	≥ 99 Atom % D	Sigma-Aldrich
Deuteriumoxid	99.96 %	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	97 %	MERCK
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	n.a.	MP Biomedicals, Inc.
Ficoll TM PM70	n.a.	GE Healthcare
Harnstoff	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Natriumdeuteriumoxid in D ₂ O, 30 %	99.5 %	Sigma-Aldrich
pET-30(+)-CRYGD	OD _{260/280} = 1.83	GenScript
PSD95 PDZ-SH3-GK	n.a.	Siehe Kapitel 5.0
PSD95 - Alexa405	n.a.	Siehe Kapitel 5.0
SynGAP CC-PBM	n.a.	Siehe Kapitel 5.0
SynGAP - Alexa488	n.a.	Siehe Kapitel 5.0
Trimethylamin- <i>N</i> -oxid (TMAO)	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	≥ 99.8 %	Sigma-Aldrich

2.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

2.2.1 Grundlagen der IR-Spektroskopie^[66]

Die Grundlage der Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) bildet die Absorption von IR-Strahlen und die daraus resultierende Anregung von Molekülschwingungen. Das elektromagnetische Spektrum der Schwingungsspektroskopie erstreckt sich hierbei von etwa 800 bis 10^6 nm und setzt sich aus dem *Nahen* (NIR: 800 nm – 2.5 μ m) dem *Mittleren* (MIR: 2.5 – 50 μ m) und dem *Fernen Infrarot* (FIR: 50 – 10^3 μ m) zusammen. Voraussetzung für eine Absorption der IR-Strahlung durch ein Molekül ist, dass während des Schwingungsvorgangs eine periodische Änderung des elektrischen Dipolmoments stattfindet ($\partial\vec{\mu}_{el} / \partial r \neq 0$). Solche Schwingungen werden auch IR-aktive Molekülschwingungen genannt. Entsprechend werden aufgrund fehlenden Dipolmoments homonukleare zweiatomige Moleküle als IR-inaktiv bezeichnet. Das einfachste Modell zur Beschreibung von Molekülschwingungen ist das Modell des harmonischen Oszillators. Hierzu wird die Schwingung eines zweiatomigen Moleküls mit den Massen m_1 und m_2 betrachtet, die durch eine masselose elastische Feder mit der Federkonstante k verbunden sind. Hierbei spiegelt die Federkonstante die Kraft der chemischen Bindung zwischen den Molekülen wider. Findet nun eine durch Streckung oder Stauchung bedingte Änderung des Gleichgewichtsabstand r_0 statt, so wirkt auf das System eine rücktreibende Kraft $F_{\text{rück}}$, welche die beiden Massen wieder in ihren ursprünglichen Gleichgewichtsabstand bringt. Die während der Schwingung auftretende Auslenkung $\Delta_1 = r - r_0$ ist über das HOOKsche Gesetz definiert (Gleichung (2.1)).

$$F_{\text{rück}} = -k \cdot \Delta r \quad (2.1)$$

Während des Schwingungsvorgangs werden die potenzielle und die kinetische Energie ineinander umgewandelt und bilden zusammen die Gesamtenergie des schwingenden Systems. Diese bleibt über den gesamten Vorgang konstant. Die potenzielle Energie E_{pot} ist gegeben durch

$$E_{\text{pot}} = \frac{1}{2} k \cdot \Delta r^2 \quad (2.2)$$

und nimmt bei Auslenkung aus der Gleichgewichtslage parabolisch um r_0 zu. Ihr Maximum erreicht die potenzielle Energie bei maximaler Auslenkung, während die kinetische Energie

E_{kin} null beträgt. Umgekehrt wird beim Durchschwingen durch die Gleichgewichtslage die potenzielle Energie vollständig in die kinetische Energie umgewandelt, wodurch diese ihren maximalen Wert erreicht. Aus der Lösung der SCHRÖDINGER-Gleichung für ein zweiatomiges Model wird ersichtlich, dass von dem harmonischen Oszillator nur bestimmte Energiewerte angenommen werden können:

$$E_v = hv_0 \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (2.3)$$

mit $v = 0, 1, 2, 3 \dots$ als Schwingungsquantenzahl. Für die Eigenfrequenz des Oszillators v_0 gilt:

$$v_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.4)$$

mit $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ als reduzierte Masse. k ist die Federkonstante.

Gemäß der Gleichung (2.3) sind die möglichen Energieniveaus diskret und äquidistant, da stets der gleiche Energiebetrag von hv_0 zur Anregung auf ein höheres Niveau benötigt wird.

Da weder die Abstoßungen der Kerne mit zunehmender Annäherung noch die mögliche Moleküldissoziation bei großen Schwingungsamplituden berücksichtigt werden, eignet sich der harmonische Oszillator nur bedingt zur Beschreibung realer Moleküle. Ein weitaus realistischeres Modell für reale Moleküle ist das eines anharmonischen Oszillators und das zugehörige MORSE-Potenzial (Abbildung 2.1).

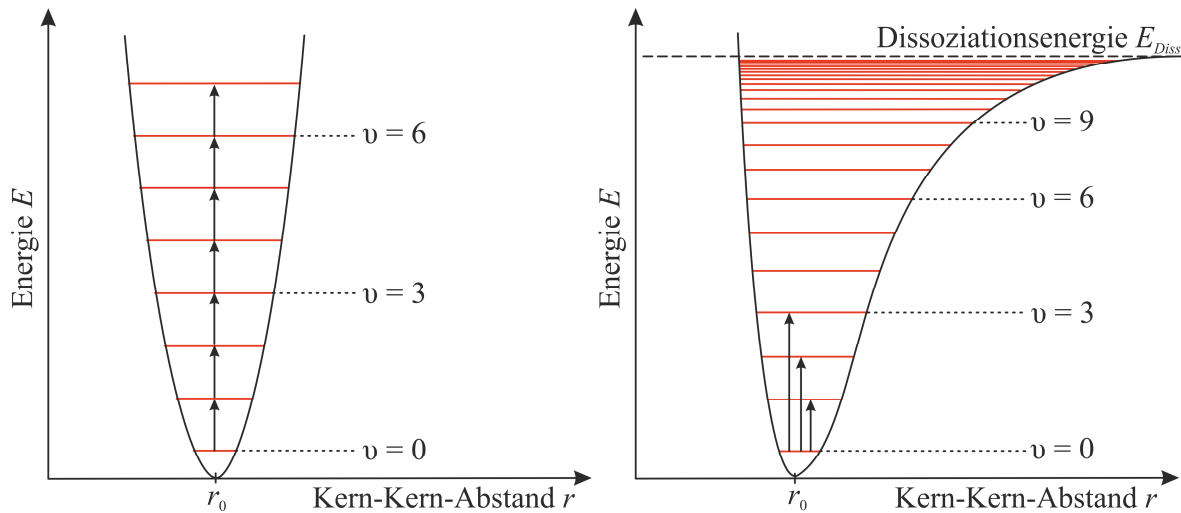


Abbildung 2.1: Potentialkurven des harmonischen Oszillators (links) und des MORSE-Potentials (rechts). Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[66]

Während für kleine Schwingungszahlen der Kurvenverlauf der potenziellen Energie näherungsweise einer Parabel entspricht wie dem des harmonischen Oszillators, flacht jedoch mit zunehmendem Kernabstand das Potenzial ab, bis ein Plateau erreicht wird und das Molekül zu dissoziieren beginnt. Somit ergeben sich für den anharmonischen Oszillator die möglichen Energieniveaus durch

$$E_v = h\nu_a \left(v + \frac{1}{2} \right) - h\nu_a x_a \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.5)$$

mit x_a als die Anharmonizitätskonstante der Schwingung, ν_a der hypothetischen Schwingungsfrequenz um die Ruhelage r_0 und mit $v = 0, 1, 2, 3, \dots$ als Schwingungsquantenzahl. Wie in der Abbildung 2.1 angedeutet, sind die Abstände zwischen den Energieniveaus nicht mehr äquidistant, d.h. mit zunehmender Annäherung des Energieniveaus an die Dissoziationsgrenze konvergieren die Termabstände gegen null. Des Weiteren begrenzen sich die Übergänge nicht wie bei dem harmonischen Oszillator nur auf die nächst höher liegenden Niveaus ($\Delta v = \pm 1$), es sind auch höher liegende Energieniveaus erlaubt ($\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$). Grundsätzlich lassen sich die unterschiedlichen Schwingungsformen eines mehratomigen Moleküls entweder in die Gruppe der Valenz- bzw. der Deformationsschwingungen einordnen. Charakteristisch für Valenzschwingungen sind die Auslenkung der Atome aus der Ruhelage in Richtung der Bindungsachse und entsprechend der sich periodisch verändernde Bindungsabstand zwischen den Atomen. Im Gegensatz zur Valenzschwingungen ändern sich bei der Deformationsschwingung lediglich die Bindungswinkel, während der Bindungsabstand konstant bleibt. Um die Anzahl der Normalschwingungen in einem mehratomigen System be-

stimmen zu können, schaut man sich die Anzahl seiner Freiheitsgrade an, die weder auf Translations- noch auf Rotationsbewegungen entfallen. Somit beträgt die Anzahl der Valenzschwingungen für ein N -atomiges lineares Molekül $3N-5$ und für ein nichtlineares Molekül $3N-6$.

2.2.2 Funktionsweise eines FT-IR Spektrometers^[66]

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie, kurz FT-IR, stellt eine Weiterentwicklung der klassischen IR-Spektroskopie dar. Der entscheidende Vorteil der FT-IR Spektroskopie gegenüber der herkömmlichen IR-Spektroskopie ist, dass jede Wellenlänge nicht über ein disperses Element sequenziell gemessen wird, sondern der gesamte Frequenzbereich zeitgleich gescannt werden kann. Daraus ergibt sich zum einen eine deutlich verkürzte Aufnahmezeit und somit die Möglichkeit von kinetischen Messungen. Des Weiteren ergibt sich aus dem fehlenden Einsatz von Spalten und Blenden ein erhöhter Energiedurchsatz, der zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis führt. Das ausschlaggebende Element in einem FT-IR Spektrometer ist das MICHELSON-Interferometer, das sich in drei Hauptbestandteile aufteilen lässt (Abbildung 2.2). Das Interferometer besteht aus einem halbdurchlässigen Spiegel, der den aus der Lichtquelle stammenden IR-Strahl in einem rechten Winkel aufspaltet und einen Teil der Strahlen zu einem beweglichen und einen Teil zu einem festen Spiegel lenkt. Die beiden Spiegel sind in einem rechten Winkel zueinander ausgerichtet, wodurch die auf den Strahlenteiler zurückreflektierten Strahlen interferieren. Von dort aus werden die Strahlen über den Probenraum weiter zum Detektor geleitet.

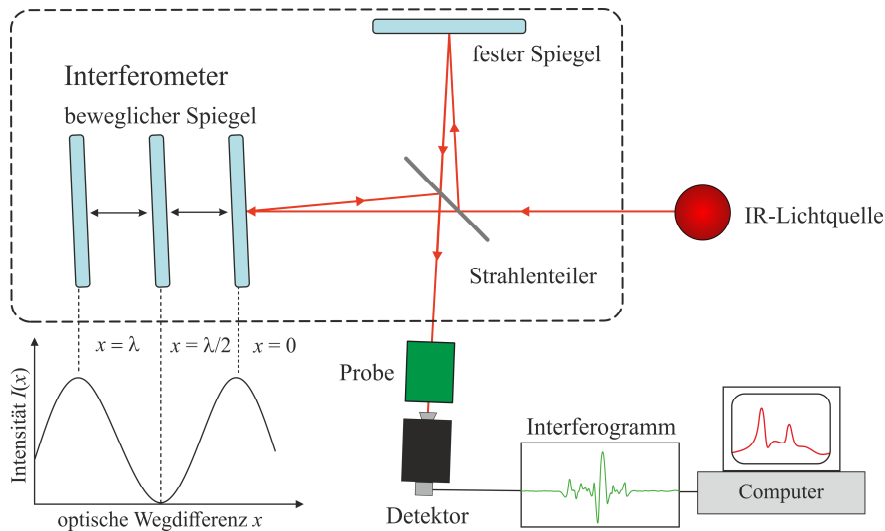


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines FT-IR Spektrometers mit einem MICHELSON-Interferometer. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[66]

Befinden sich sowohl der feste, als auch der bewegliche Spiegel im gleichen Abstand zum Strahlenteiler, so ergibt sich daraus eine optische Wegdifferenz von $\Delta x = 0$ und es folgt eine konstruktive Interferenz beider Teilstrahlen am Strahlenteiler. Somit wird der austretende Strahl maximal. Ist $\Delta x \neq n\lambda$ mit $n = 0, 1, 2, \dots$, so befinden sich die beiden Teilstrahlen außer Phase und es resultiert eine destruktive Interferenz und demnach eine verringerte Intensität. In einem FT-IR Spektrometer wird die Intensität der Strahlung als Funktion der optischen Weglängendifferenz x gemessen:

$$I(x) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu})(1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x))d\tilde{\nu} \quad (2.6)$$

Die entsprechende Interferogramm-Funktion für den Intensitätsverlauf ist gegeben durch:

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) d\tilde{\nu} \quad (2.7)$$

Nach der FOURIER-Transformation der Interferogramm-Funktion erhält man die spektrale Intensität $A(\tilde{\nu})$ als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1/\lambda$.

$$A(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (2.8)$$

2.2.3 IR-Spektroskopie an Proteinen^[66]

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) hat sich als nützliches Werkzeug zur Charakterisierung der Proteinen-Sekundärstruktur erwiesen^[67–70] und ist dementsprechend ein fester Bestandteil in der Proteinanalytik geworden, um zeit-, temperatur- oder druckabhängige sekundärstrukturelle Veränderungen aufzudecken.^[71]

Wie zuvor in Kapitel 2.2.1 erwähnt, steigt mit zunehmender Molekülgröße die Anzahl der Normalschwingungen. Dies hat zur Folge, dass große Biomoleküle sehr komplexe IR-Spektren aufweisen, wodurch eine sinnvolle Analyse von einzelnen Schwingungsmodi als nahezu unmöglich erscheint. Dessen ungeachtet weisen viele Biomoleküle eine Vielzahl von charakteristischen Banden auf, die es ermöglichen, aus ihrer Lage und Form im IR-Spektrum Aussagen über die Struktur und Wechselwirkung der jeweiligen Biomoleküle zu treffen. Dementsprechend können verschiedene charakteristische IR-Absorptionsbanden den Proteinen zugeordnet werden, die im Wesentlichen auf das Peptidrückgrat zurückzuführen sind.^[66,72] Eine Zusammenstellung der fünf relevantesten Amid-Schwingungsbanden ist in der Tabelle 2.2 gegeben.

Tabelle 2.2: Amid-Gruppenschwingungen in Proteinen.^[66]

Bande	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	Hauptbeiträge
Amid B	3250 – 3300	N-H-Streckschwingung
Amid-I	1600 – 1700	C=O-Streckschwingung
Amid-II	1480 – 1575	N-H-Biegeschwingung, C-N-Streckschwingung
Amid-III	1230 – 1330	N-H-Biegeschwingung, C-N-Streckschwingung
Amid-IV	625 – 770	O=C-N-Deformationsschwingung

Für sekundärstrukturelle Analysen eignet sich besonders die Amid-I-Bande aufgrund ihrer hohen Aussagekraft und ist zugleich auch die am besten untersuchte Bande. Im Wesentlichen setzt sich die Amid-I-Bande aus den C=O-Streckschwingungen und in geringem Maße aus den C-N-Streck- und C-C-N-Deformationsschwingungen zusammen. Die Frequenzlage der Amid-I-Band richtet sich stark nach den gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C=O- und N-H-Gruppen in den α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen, die im Wesentlichen die Sekundärstruktur des Proteins bilden. Grundsätzlich gilt, dass sich mit zunehmender Stärke der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den C=O- und N-H-Gruppen

die Elektronendichte der C=O-Bindung zunehmend verringert und die Schwingungsfrequenz der Amid-I-Bande sich zu niedrigeren Werten verschiebt.^[70] Daher sind die Schwingungsfrequenzen der α -Helices im Vergleich zu den β -Faltblatt-Strukturen bei höheren Wellenzahlen wiederzufinden, da die Wasserstoffbrückenbindung in den β -Faltblatt-Strukturen vergleichsweise stark sind.^[73] Eine Auflistung der Sekundärstrukturen und die zugehörigen Wellenzahlbereiche befinden sich in der folgenden Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Sekundärstrukturen und die zugehörigen Wellenzahlbereiche (Richtwerte) der Proteine und Peptide in D₂O.^[68,73,74]

Sekundärstruktur	Wellenzahl $\tilde{\nu}$ / cm ⁻¹
exponierte Seitenketten, β -Faltblatt	1620 – 1640
ungeordnete Strukturen	1640 – 1650
α -Helix	1650 – 1658
Schleifenstrukturen	1660 – 1690
β -Faltblatt, exponierte Strangstrukturen	1675 – 1695

Ein weiterer Aspekt bei der IR-Spektroskopie von Proteinen, der nicht vernachlässigt werden sollte, ist die Wahl des Lösungsmittels. H₂O als Lösungsmittel erweist sich während der IR-Spektroskopie von Proteinen als nachteilig. Aufgrund der H–O–H Deformationsschwingung weist H₂O eine starke Absorptionsbande bei 1645 cm⁻¹ auf.^[73] Entsprechend ergibt dies eine Überlappung der H–O–H Deformationsschwingungsbande mit der Amid-I-Bande, wodurch sich die Sekundärstrukturanalyse als problematisch erweist. Diese Problematik kann weitestgehend durch die Verwendung von D₂O als Lösungsmittel vermieden werden, da die Absorption im Bereich der Amid-I-Bande sehr gering ist und somit weitestgehend vernachlässigt werden kann.^[73] Wird an Stelle von H₂O als Lösungsmittel D₂O verwendet, werden die entsprechenden Amid-Banden durch einen Apostroph (Amid-I'-Bande) gekennzeichnet.

2.2.4 Experimentelles

Alle temperatur- und druckabhängigen FT-IR Messungen wurden an einem Nicolet 6700-FT-IR Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), das über einen Stickstoff gekühlten MCT-Detektor (Quecksilber-Cadmium-Tellur) verfügt, durchgeführt. Für die temperaturabhängigen FT-IR Messungen wurden 20 μL der zu untersuchenden Protein-Lösung zwischen zwei runde Calciumfluorid-Fenster (CaF_2) (Durchmesser 25 mm, Dicke 4 mm, Sigma-Aldrich) pipettiert. Als Abstandhalter diente eine 50 μm dicke, ringförmige Mylarfolie. Anschließend wurde die eingeschlossene Probenlösung in eine mit Wasser thermostatisierte Stahlvorrichtung eingebaut (Abbildung 2.3) und die Temperatur mittels F32-HL Kälte-Umwälzthermostat der Firma Julabo reguliert. Des Weiteren wurde die gesamte Messkammer kontinuierlich mit Trockenluft gespült (Adsorptionstrockner Typ 15, Essen, Deutschland), um die in der Luft natürlich vorkommende hohe Wasserdampfmenge im Strahlengang zu minimieren und dem daraus folgenden Signalrauschen entgegenzuwirken.

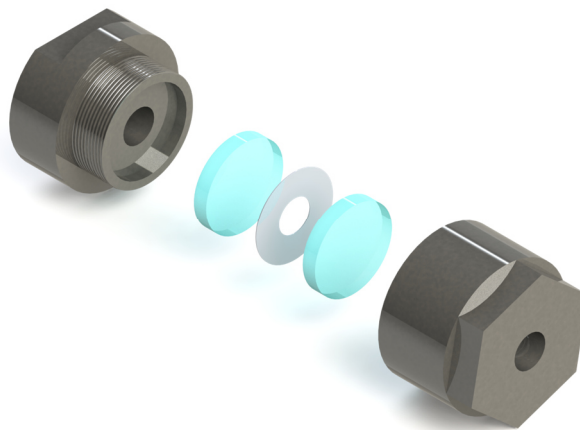


Abbildung 2.3: Explosionsdarstellung der temperierbaren FT-IR Messzelle. Die Probe wird zwischen die beiden CaF_2 -Fenster (hellblau) pipettiert. Das Probenvolumen wird durch die Dicke (50 μm) der Mylarfolie (hellgrau) als Abstandhalter definiert. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[75]

Für die druckabhängigen FT-IR Messungen wurde eine Diamantstempelzelle (P-Serie, High Pressure Diamond Optics, Tuscon, USA) mit Typ IIa-Diamanten (Oberflächendurchmesser von 0.73 mm) verwendet (Abbildung 2.4). Zwischen den beiden Diamanten diente rostfreier Stahl mit einer 0.5 mm zentralen Bohrung und einer Stärke von 50 μm (effektives Probenvolumen: 10 nL) als Abstandhalter. Die Bestimmung des Drucks innerhalb der Probe erfolgte durch Zugabe von Bariumsulfat (BaSO_4). Aufgrund der charakteristisch drucksensi-

tiven Streckschwingung der Sulfatgruppe bei ca. 983 cm^{-1} , die mit steigendem Druck zu höheren Wellenzahlen verschoben wird, eignet sich das schwerlösliche Bariumsulfat als guter Druckindikator. Die messbare Druckgenauigkeit beträgt ca. $\pm 200\text{ bar}$.^[76]

Die Messung aller Proben wurde in einem Wellenzahlbereich von $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} (Datenpunktabstand 0.964 cm^{-1}) aufgenommen, wobei es sich bei jedem Spektrum um einen Mittelwert aus 256 Einzelspektren handelt. Die Apodisierung wurde mit einer Happ-Genzel-Funktion durchgeführt. Vor jeder Messreihe erfolgte die Kalibrierung des Spektrometers mit Hilfe der OMNIC-Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hierbei wurde die Blendenöffnung so gewählt, dass die maximal zulässige Intensität während der Messungen nicht überschritten wurde.

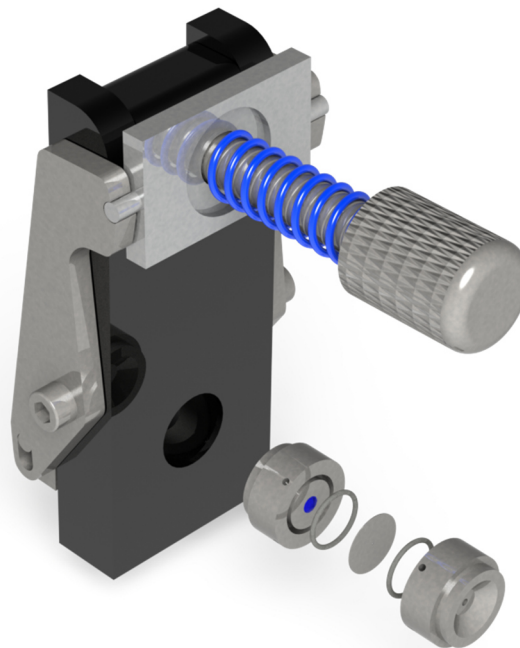


Abbildung 2.4: Die bei den druckabhängigen FT-IR Messungen eingesetzte Diamantstempelzelle. Das Probenvolumen definiert sich durch die Stärke und die Bohrung des verwendeten Metall-Gaskets. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[75]

Mit Hilfe der Software GRAMS/ AI 8 (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, USA) wurden das anschließende Prozessieren und die Analyse der gewonnenen Daten durchgeführt. Wie schon bereits in Kapitel 2.2.3 erwähnt, eignet sich die Amid-I-Bande aufgrund ihrer hohen Aussagekraft für die folgende Sekundärstrukturanalyse. Infolgedessen wurde nach Abzug des jeweiligen Pufferspektrums vom Probenspektrum der für die Amid-I'-Bande relevante Bereich ($1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$) des Spektrums freigestellt. Es folgte eine Basislinienkorrektur und eine anschließende Normierung der Fläche unter der Amid-I'-Ban-

denfläche auf eins, um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu erzielen. Im ersten Schritt der Sekundärstrukturanalyse wurden die Maxima der Subbanden ermittelt. In diesem Zusammenhang wurden die mit der FSD (FOURIER-Selbstentfaltung, *FOURIER-self-deconvolution*) behandelten Spektren mit der zweiten Ableitung der Spektren verglichen. Die Subbandenpositionen für das weitere Analyseverfahren ergaben sich aus den übereinstimmenden Wellenzahlen der Minima der zweiten Ableitung mit den Maxima der FSD-behandelten Spektren. Des Weiteren wurden die Startparameter, wie die Anzahl, Position und Halbwertsbreite der Subbanden, festgelegt. Die Anpassung der Subbanden an die Amid-I'-Bande geschah mittels gemischter Gauß-Lorenz-Funktionen. Die Subbanden konnten während der Anpassung ausschließlich positive Werte annehmen und die Verschiebung der Subbandenposition wurde auf $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ begrenzt. Die Fläche jeder Subbande entspricht den prozentualen Anteilen der gesamten Sekundärstruktur des Proteins. Hierbei wird jedoch vorausgesetzt, dass sich die Absorptionskoeffizienten (Übergangsdipolmomente) der verschiedenen Sekundärstrukturen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

2.3 Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen

2.3.1 Grundlagen der Lichtstreuung an Flüssig-Flüssig-Phasengemischen

Die präzise Bestimmung der Flüssig-Flüssig-Phasengrenzen ermöglicht ein besseres Verständnis des Phasenverhaltens von Proteinen und bildet zugleich eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen, unter anderem Studien über die Kinetik des Phasenübergangs. Dabei beruhen viele Methoden, die zur Messung der Flüssig-Flüssig-Koexistenzkurven eingesetzt werden, auf der sehr einfachen Prämisse, dass die Tröpfchenbildung beim Eintritt in das phasengetrennte System eine schlagartige Änderung der Trübung τ eines binären Flüssigkeitsgemischs bewirkt. Dies wiederum bewirkt eine abrupte Abnahme der Intensität I des durch die Probe transmittierten Lichts:

$$I = I_0 e^{-\tau l} \quad (2.9)$$

wobei I_0 die einfallende Lichtintensität und l die optische Weglänge ist. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass das elastische Streulichtsignal sowohl der gebildeten Tröpfchen als auch der Bulk-Lösung zur Gesamtrübung τ_{Gesamt} der Lösung beitragen:

$$\tau_{\text{Gesamt}} = \tau_{\text{Tröpfchen}} + \tau_{\text{Bulk}} \quad (2.10)$$

Es wird angenommen, dass die Temperatur, bei der eine durch Tröpfchenbildung bedingte Veränderung der Trübung auftritt, die so genannte Trübungspunkttemperatur T_t , mit der Temperatur der Koexistenzkurve übereinstimmt.

Findet keine Mehrfachstreuung an den Tröpfchen statt, so gilt für die Trübung $\tau_{\text{Tröpfchen}}$, die sich aus der Streuung an den Tröpfchen ergibt, folgender Ausdruck:

$$\tau_{\text{Tröpfchen}} = NC \quad (2.11)$$

mit N der Tröpfchenzahldichte und C dem Tröpfchenstreuquerschnitt, der abhängig von der Tröpfchengröße ist. Der Wert von C kann sich um mehrere Größenordnungen erhöhen, wenn der Tröpfchenradius zunimmt. Daher tritt bei einer Temperatur, bei der die Koexistenzkurve

überschritten wird, eine abrupte Änderung des Streulichtsignals ein.

τ_{Bulk} , der zweite Beitrag aus Gleichung (2.10), ergibt sich aus spontanen Zusammensetzungs- und Dichtefluktuationen in der flüssigen Bulk-Lösung. Sobald sich Tröpfchen bilden, wird $\tau_{\text{Tröpfchen}}$ in der Regel wesentlich größer als die Ausgangstrübung der Bulk-Lösung. Im Bereich der Spinodalkurve und des kritischen Punktes werden die Konzentrationsschwankungen sehr groß (kritische Opaleszenz). Im Rahmen dieser Arbeit kann dies jedoch vernachlässigt werden, da die Untersuchungen fern von den kritischen Bereichen erfolgten.

Für kleine Tröpfchenradien mit $x \ll 1$, wobei $x = k r = 2\pi r/\lambda$ ($k = 2\pi/\lambda$ Wellenvektorbetrag, $r =$ Tröpfchenradius, $\lambda =$ Wellenlänge des Lichts, 400 nm) ist, kann das Streusignal (für senkrecht zur Streu- und Detektionsebene linear polarisiertes Licht) durch die Rayleigh-Theorie^[49,77] beschrieben werden:

$$I_{\text{R}} = I_0 \frac{4k^4 r^6}{9R^2} (m-1)^2 \quad (2.12)$$

Hierbei ist R der Abstand zum Detektor und $m = n_{\text{d}}/n_{\text{bulk}}$ das Verhältnis der Brechungsindices des Tröpfchens (d) und der Bulk-Lösung (in der Regel $0.9 < m < 1.1$). Des Weiteren ist für die Rayleigh-Streuung der Tröpfchenstreuquerschnitt C gegeben durch

$$C_{\text{R}} \approx \pi k^4 r^6 (m-1)^2 \quad (2.13)$$

Sobald der Tröpfchenradius $\lambda/10$ übersteigt, wird das Lichtstreusignal besser durch die Rayleigh-Gans-Debye-Theorie (RGD) oder bei noch größeren Tröpfchen durch die Mie-Theorie beschrieben.

$$C_{\text{RGD}} \approx 2\pi k^2 r^4 (m-1)^2 \quad (2.14)$$

Wenn also der Tröpfchenradius um zwei Größenordnungen von 10 nm auf 1 μm ansteigt, erhöht sich der Streuquerschnitt um zehn Größenordnungen. Die daraus resultierende Zunahme der Trübung infolge der Tröpfchenbildung nach einem Sprung in den Zweiphasenbereich kann mittels Gleichung (2.11) berechnet werden. Bei Näherung an den kritischen Punkt nimmt die Lichtstreuung aufgrund der divergierenden Korrelationslängen der Dichte- und Konzentrationsfluktuationen $\xi \propto [(T_{\text{c}}-T)/T_{\text{c}}]^{-2\nu}$ mit dem kritischen Exponenten $\nu = 0.63$

dramatisch zu, nähert sich schließlich den Dimensionen des sichtbaren Lichts und führt zur kritischen Opaleszenz.^[78–80]

Die in dieser Arbeit gemessene Absorption $A = \log(I_0/I)$ bzw. Turbidität wird ausschließlich durch die Tröpfchenstreuung verursacht und hängt weitgehend von der Anzahl der gebildeten Phasentröpfchen und deren Größenverteilung ab (Gleichungen (2.12) – (2.14)), d.h. sie ist ein empfindliches Maß für den Volumenanteil der gebildeten Tröpfchenphase.

2.3.2 Experimentelles

Die temperaturabhängigen Turbiditätsmessungen wurden mit Hilfe eines Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) Spektrometers durchgeführt. Hierzu wurden UV/Vis-Absorptionsspektren von 250 – 500 nm mit einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Je nach untersuchtem Protein wurden die Messungen in einem Temperaturbereich zwischen -2 und 95 °C durchgeführt. Die Equilibrierungszeit nach jeder Temperaturänderung betrug ca. 2 min. Als Probengefäß wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1.0 mm verwendet, die in eine temperierbare Küvettenhalterung eingesetzt wurde. Die Temperaturregulierung der Probe wurde mittels F32-HL Kälte-Umwälzthermostat der Firma Julabo reguliert und zusätzlich mit einem externen Qtemp 500 Digitalthermometer (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überwacht.

Die druckabhängige Untersuchung der Koazervation wurde am Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis-Spektrometer (PerkinElmer Inc., Wellesley, USA) bei 400 nm mit einer Auflösung von 0.1 nm durchgeführt. In Abhängigkeit der gemessenen Proteinprobe erfolgten die Messungen in einem Druckbereich von 1 – 2300 bar bei unterschiedlichen Temperaturen (0 – 40°C). Zur Durchführung der druckabhängigen Experimente wurde eine im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Winter entworfene Hochdruckzelle verwendet (Abbildung 2.5). Als Fenstermaterial wurden zylindrisch geformte Saphirgläser mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Dicke von 10 mm eingesetzt, die den Probenraum beidseitig über O-Ring-Dichtungen umschlossen. Je nach verwendeten Dichtringen und des angelegten Drucks betrug die Schichtdicke der Probe ca. 1 mm.

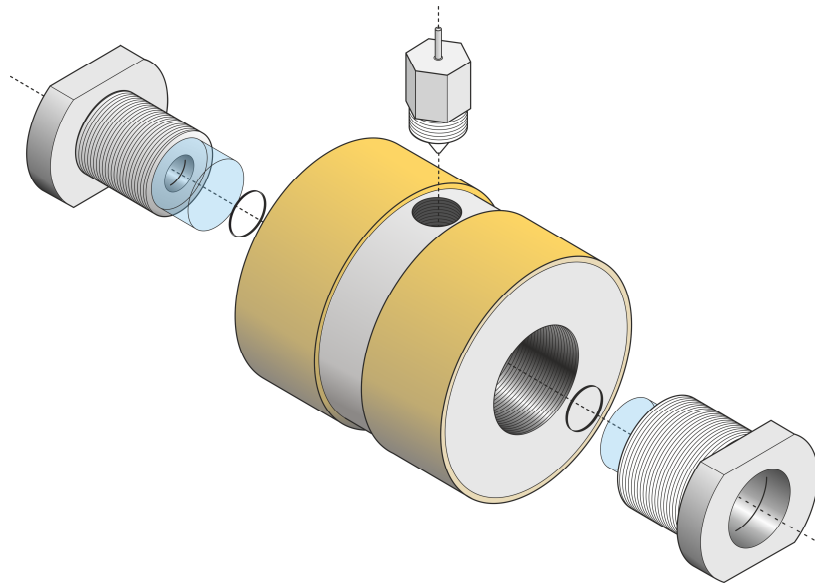


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der temperierbaren Hochdruckzelle für die druckabhängigen Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsstudien. Der Probenraum (ca. 350 μL) wird von den Saphirfenstern (hellblau) beidseitig über O-Ring-Dichtungen umschlossen. Nach der Befüllung der Probenkammer wird die Hochdruck-Handpumpe über eine Stahlkapillare an die Hochdruckzelle angeschlossen. Die schematische Darstellung wurde mit der Software CorelDRAW[®] Technical Suite erstellt.

Der Druck wurde mit einer Hochdruck-Handpumpe der Firma Nova SWISS erzeugt und mit einem Drucksensor (Burster Präzisionsmesstechnik, Gernsbach) gemessen. Als Druckmedium diente Wasser. Die Temperatur wurde wie zuvor mittels eines Umwälzthermostats der Firma Julabo reguliert und zusätzlich mit einem externen Qtemp 500 Digitalthermometer (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überwacht. Die Messkammer wurde während der gesamten Messung mit trockener Luft umspült, um die Kondensation von Wassertröpfchen auf den Saphirfenstern bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software Origin 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, U.S.A.).

2.4 Drucksprung-Relaxationsstudie

2.4.1 Keimbildung und Wachstumsmodelle der Phasentrennung

Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über die theoretischen Ansätze geben, die zur Auswertung der kinetischen Daten in Kapitel 4.4 und 6.5 herangezogen wurden. Wenn die Phasengrenze fernab eines kritischen Punktes überschritten wird und eine Phasentrennung zwischen der Binodalen und der Spinodalen einsetzt, kommt es zu einem Phasenübergang erster Ordnung. Während des Phasenübergangs kommt es zur Keimbildung und zum Wachstum von Tröpfchen der neuen Phase, die sich anschließend bis zum endgültigen entmischten Gleichgewichtszustand vergrößern. Die Kinetik des Phasenübergangs lässt sich zum einen in den Keimbildungs- und Wachstumsprozess, der typischerweise in den frühen Phasen dominiert und zum anderen in einen Reifeprozess (z.B. Ostwald-Reifung) unterteilen, der typischerweise in den späten Stadien vorherrscht. Die Ostwald-Reifung beschreibt das weitere Wachstum von großen Partikeln auf Kosten kleinerer Partikel, die im Gegenzug vollständig in der Lösung verschwinden.^[81,82] Eine häufig beobachtete Folge ist, dass die Tröpfchengröße und ihre Verteilung, d.h. die durchschnittliche Domänen- oder Tröpfchengröße $\langle R \rangle$, mit einer zeitabhängigen Potenzfunktion zunimmt, z.B. $\langle R \rangle = K t^m$.^[83] Häufig lassen sich die spezifischen Wachstums- oder Reifungsprozesse, die an dem Gesamtprozess der Phasentrennung beteiligt sind, durch den Vergleich von experimentell ermittelten Größen, wie R , mit theoretisch ermittelten Gleichgewichtsexponenten m und Vorfaktoren K ermitteln. Eine alternative kinetische Analyse, die auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, ist die Messung des Gesamtvolumenanteils der umgewandelten Tröpfchenphase (d), $\theta_d(t) = V_d(t)/V$ als Funktion der Zeit. Ein weit verbreiteter Ansatz, um die Kinetik von Phasenumwandlungen erster Ordnung zu analysieren, ist die Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov-Theorie (JMAK).^[83–87] Unter der typischen Annahme einer zufälligen Keimbildung und gleichmäßigen Wachstumsrate wird von der JMAK-Theorie vorausgesagt, dass sich θ_d beim Eintritt in den Zweiphasenbereich wie folgt entwickelt,

$$\theta_d = \frac{V_d(t)}{V} = 1 - C \cdot e^{-kt^n} \quad (2.15)$$

wobei C und k Konstanten sind und n der sogenannte Avrami-Exponent ist. Die Werte für n können aus den Fits von $\theta_d(t)$ ermittelt werden. Physikalisch plausible Mechanismen liefern Avrami-Exponenten zwischen 1 und 4. Die Werte von k und n lassen sich aus experimentel-

len Daten ermitteln, indem man $\ln[-\ln(1-\theta_d)]$ gegen $\ln[t]$ aufträgt. Ein häufig anzutreffender Fall ist das Wachstum mit konstanter Rate $\langle R(r) \rangle \sim t$ oder konstanter Volumenzunahme der umgesetzten Phase $V(t) \sim t^3$, woraus sich $n = 4$ für homogene Keimbildung (d.h. Keimbildungsrate, $J(t) = \text{konstant}$) und $k = (\pi/3)G^3I_V$ ($I_V = \text{Dichte der Keimbildungsrate}$, $G = \text{Wachstumsrate der sphärischen Teilchen}$) ergibt. Bei heterogener Keimbildung (z.B. Keimbildung an Grenzflächen) ist $n = 3$.^[49,80,83]

Die Annahmen der JMAK-Theorie werden ungültig, wenn die Diffusion die Wachstumsraten der Phasen steuert, wie es auch in vielen biologisch relevanten (z.B. intrazellulären) dicht gepackten Systemen der Fall ist. Solche Situationen treten höchstwahrscheinlich in späteren Wachstumsstadien auf, wenn die Diffusionszonen verschiedener Tröpfchen sich zu überschneiden beginnen. Im Fall des diffusionsbegrenzten Wachstums (DLG) sagt die JMAK-Theorie $n = 5/2$ für eine konstante Rate einer homogenen Keimbildung und $n = 3/2$ für eine heterogene Keimbildung voraus.^[49]

Abhängig von dem untersuchten System können spätere Wachstumsstadien (Reifung), wenn man sich dem Plateau von θ_d gegen t nähert, anspruchsvollere Ansätze und eine andere Theorie im Falle von diffusionsbegrenztem Wachstum und/oder Umsetzungen mit geringem Volumenanteil, z. B. bei diffusionsbegrenzter Präzipitation, erfordern. Unter der Voraussetzung, dass sich die Diffusionszonen der separierten Tröpfchen erheblich überlappen, ist die Annäherung an einen konstanten θ_d -Wert durch $n \approx 1$ charakterisiert. Dieser Langzeitexponent ergibt sich aus der allmählichen Abnahme des verfügbaren gelösten Stoffes. So wurde beispielsweise bei experimentellen in-vivo-Daten von optogenetisch gesteuerten, FUS-basierten Tröpfchen festgestellt, dass das vorhergesagte lineare $n = 1$ -Verhalten während dieser Phase tatsächlich vorliegt.^[83,88]

2.4.2 Experimentelles

Wie zuvor erwähnt, wurden auch die Messungen der Drucksprung-Relaxationsstudie an einem Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis-Spektrometer (PerkinElmer Inc., Wellesley, USA) bei 400 nm mit einer Auflösung von 0.1 nm und einer hauseigenen Hochdruckzelle durchgeführt. Der Druck wurde mit einer Hochdruck-Handpumpe der Firma Nova SWISS erzeugt und mit einem Drucksensor (Burster Präzisionsmesstechnik, Gernsbach) gemessen. Als Druckmedium diente Wasser. Die Temperatur wurde wie zuvor mittels eines Umwälzther-

mostaten der Firma Julabo reguliert und zusätzlich mit einem externen Qtemp 500 Digitalthermometer (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überwacht. Die Drucksprünge wurden durch Öffnen eines Ventils zwischen der Hochdruckzelle und einem Flüssigkeitsreservoir ermöglicht. Mit Hilfe der Drucksprungvorrichtung (Totzeit 50 – 100 ms) sind Drucksprünge mit variabler Amplitude (bis zu 2 kbar) in beide Richtungen möglich. Um den Effekt einer adiabatischen Temperaturänderung im Verlauf des Drucksprungs zu minimieren, wurde die Hochdruckzelle so konstruiert, dass sie nur ein sehr kleines Volumen des Druckmediums enthält. Um das Gleichgewicht des Systems vor und nach dem Drucksprung zu gewährleisten, betrug die Gesamtmesszeit jedes Experiments etwa 100 s. Die resultierenden Drucksprungdaten wurden mit der Software Origin 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, U.S.A.) analysiert.

2.5 Lichtmikroskopie

2.5.1 Grundlagen der Lichtmikroskopie^[66]

Die Lichtmikroskopie bzw. die optische Mikroskopie ermöglicht die Beobachtung von Details eines Präparates, die weit außerhalb des für das menschliche Auge Sichtbaren liegt. Die Hellfeldmikroskopie als die einfachste Methode in der Lichtmikroskopie und ihre diversen Spezialtechniken, wie der Phasenkontrast-, Polarisations-, Fluoreszenzmikroskopie und ihrer Weiterentwicklungen, bieten dem Beobachter die Möglichkeiten, sowohl die Morphologie als auch die Interaktionen von Zellen zu erforschen. Jedoch unterliegt die Vergrößerung von Objekten einer natürlichen Grenze, die durch das Auflösungsvermögen eines Mikroskops bestimmt wird. Die Auflösung oder auch kritischer Abstand d ist die minimale Entfernung zweier Objekte zueinander, um als solche wahrgenommen zu werden und ist durch die Beugung der Lichtwellen begrenzt. Erstmals wurde 1870 durch Ernst ABBÉ der Zusammenhang des Auflösungsvermögens des Mikroskops mit der Wellenlänge λ des verwendeten Lichts als

$$d = \frac{0.61 \lambda}{n \cdot \sin(\alpha/2)} \quad \text{mit} \quad \text{NA} = n \cdot \sin(\alpha/2) \quad (2.16)$$

beschrieben.^[89] n ist der Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums und α der Öffnungswinkel des Objektivs. $n \cdot \sin(\alpha/2)$ lässt sich zur numerischen Apertur (NA) des Objektivs zusammenfassen, die einen maximalen Wert von $\text{NA} = 1.7$ erreichen kann. Wie aus der Gleichung (2.16) ersichtlich wird, kann das Auflösungsvermögen des Mikroskops zum einen durch den Einsatz von Licht kleinerer Wellenlänge und zum anderen durch die Verwendung von Immersionsflüssigkeiten mit hohem Brechungsindex (z.B. Immersionsöl mit $n \approx 1.5$) erhöht werden. Unter der Prämisse, dass der Brechungsindex im Allgemeinen unterhalb von $n < 2$ liegt, erhält man aus der Gleichung (2.16) für zwei gerade noch auflösbare Objektpunkte den Abstand $d \approx \lambda/2$. Vereinfacht lässt sich sagen, dass zwei Objektpunkte nicht mehr voneinander unterschieden werden können, wenn deren Abstand unterhalb der halben Wellenlänge des verwendeten Lichts liegt.

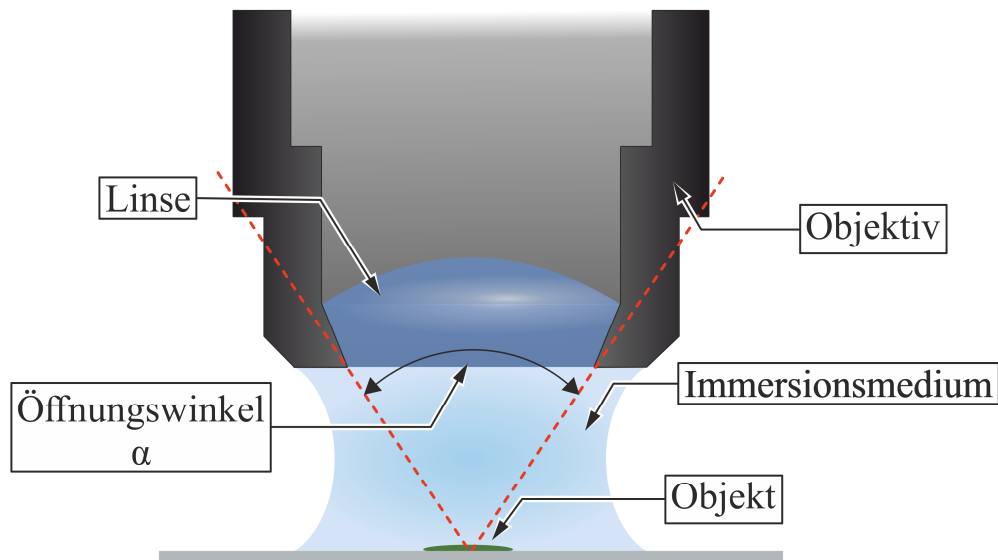


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels α der Objektivblende eines Lichtmikroskops. Die schematische Darstellung wurde mit der Software CorelDRAW® Technical Suite erstellt.

Auch die zuvor erwähnten Mikroskopie-Techniken, wie die Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskopie, unterliegen der beugungsbegrenzten Auflösung und sind nicht in der Lage, die Auflösung zu verbessern. So ermöglichen die beiden genannten Techniken entweder die Untersuchung von transparenten und kontrastarmen Objekten (Phasenkontrastmikroskopie) oder erlauben es, durch Fluoreszenzmarkierung für die Untersuchung relevante Bereiche in einer Probe hervorzuheben (Fluoreszenzmikroskopie). Ein Beispiel für eine Mikroskopie-Technik, die auch Auflösungen unterhalb des ABBÉ-Limits ermöglicht, ist die STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*).^[66] Die beugungsbegrenzte Auflösung des Mikroskops wird umgangen, indem Fluorophore zum Einsatz kommen, die sowohl fluoreszieren als auch vorübergehend und reversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand versetzt werden können.^[90] Diese Technik wurde jedoch in dieser Arbeit nicht verwendet und so soll im Weiteren nicht näher darauf eingegangen werden.

2.5.2 Experimentelles

Die druck- und temperaturabhängigen Lichtmikroskopie-Messungen wurden mithilfe eines inversen Mikroskops des Modells Eclipse TE2000-U (Nikon, Tokiyo, Japan) durchgeführt, welches mit einem Objektiv des Typs CFI Plan Apo λ 10x (NA = 0.45, WD (*working distance*) = 4.0 mm, Nikon, Tokio, Japan) ausgestattet war. Für die Aufnahme der Phasentröpfchen wurde die Monochrom-Industriekamera DMK 33UX 264 (The Imaging Source,

Bremen, Deutschland) verwendet und mit der Software IC Capture 2.4 (The Imaging Source, Bremen, Deutschland) gesteuert. Das Einfügen einer Maßstabsleiste und die Kontrasterhöhung der Bilder erfolgten unter Verwendung der Software ImageJ.^[91]

Für die temperaturabhängige Mikroskopie wurde eine im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Winter entworfene Mikroskopiezelle eingesetzt (Abbildung 2.7). Diese setzte sich aus einem Teflonblock (Länge = 42 mm, Breite = 41 mm, Höhe = 2.9 mm) und zwei Borosilikat-Deckgläschen (Länge = 22 mm, Breite = 22 mm, Dicke = 0.17 mm) zusammen. Der Teflonblock dient als Abstandshalter und weist ein 2.9 mm tiefes und 15 mm breites Loch auf, das beidseitig von den Deckgläschen umschlossen wird, woraus sich ein Probenvolumen von ca. 500 μL ergibt. Durch eine zusätzlich auf die Messzelle befestigte Stahlhalterung wurde die Probe auf die erforderliche Temperatur temperiert.

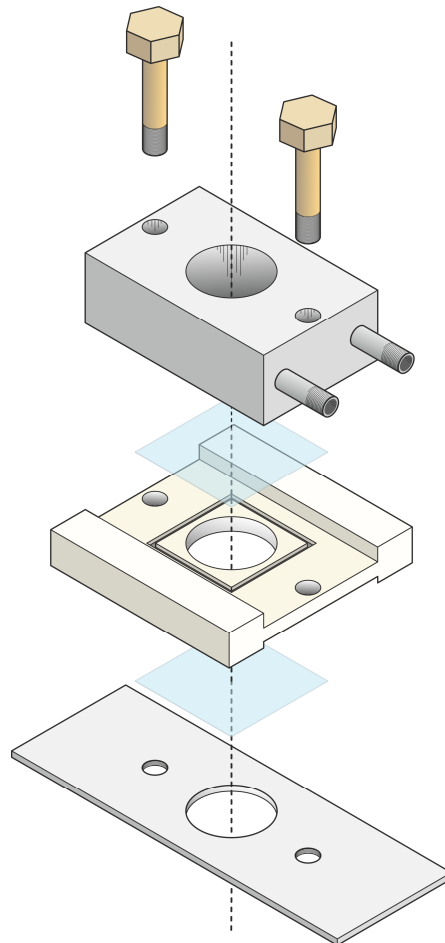


Abbildung 2.7: Explosionsdarstellung der temperierbaren Mikroskopiezelle. Der Probenraum (Tiefe = 2.9 mm, Durchmesser = 15 mm, Volumen = $\sim 500 \mu\text{L}$) wird von den Borosilikat-Deckgläschen (hellblau) beidseitig umschlossen. Die schematische Darstellung wurde mit der Software CorelDRAW[®] Technical Suite erstellt.

Für die druckabhängigen Mikroskopie-Experimente wurde eine wie in Abbildung 2.8 dargestellte Hochdruckzelle (Länge = 21 mm, Breite = 90 mm, Höhe = 80 mm) verwendet.^[52,53] Die Temperatur wurde durch ein zirkulierendes Wasserbad geregelt. Als optisches Fenstermaterial wurden auf beiden Seiten flache Diamantfenster von 0.8 mm Dicke und einem Durchmesser von 6 mm verwendet. Der Probenraum (Tiefe = 5 mm, Durchmesser = 8 mm) wies ein Volumen von circa 250 μL auf. Der Druck wurde, wie in den vorig beschriebenen Kapiteln, hydrostatisch durch eine Hochdruck-Handpumpe mit Wasser als druckübertragende Flüssigkeit erzeugt. Für das Temperieren der Probe diente eine an ein Wasserbad angeschlossene Stahlhalterung, die eigens für die Druckzelle konstruiert wurde. Die gesamte Konstruktion passt zu einem inversen Standardmikroskop mit handelsüblichen Objektiven für die Langdistanzmikroskopie.^[52-54]

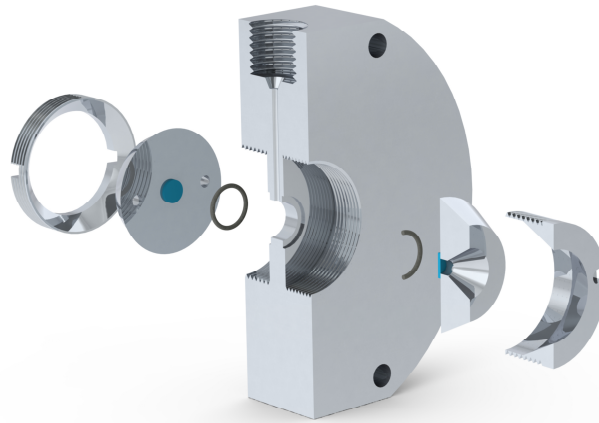


Abbildung 2.8: Explosionsdarstellung der Hochdruck-Mikroskopiezelle (Länge = 21 mm, Breite = 90 mm, Höhe = 80 mm). Der Probenraum (Tiefe = 5 mm, Durchmesser = 8 mm, Volumen ca. 250 μL) wird von den Diamantfenstern (Dicke = 0.8 mm, Durchmesser = 6 mm) beidseitig über O-Ring-Dichtungen umschlossen. Die Abbildung wurde entsprechend der Referenz neu erstellt.^[52]

3 Temperatur-, Druck- und Osmolyteffekte auf die LLPS von γ D-Kristallin & α -Elastin[†]

Angesichts der zu Beginn genannten Überlegungen befasst sich dieses Kapitel mit der Druckvariablen p im Zusammenspiel mit der Temperatur T und dem Osmolyten TMAO auf die LLPS von gefalteten globulären Proteinen und IDPs. Die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in kondensierter Umgebung ist nicht nur für die oben beschriebene biologische und biomedizinische Forschung von hoher Relevanz, sondern auch ein intellektuell anspruchsvolles Forschungsgebiet der theoretischen Biophysik. Ein detailliertes Verständnis des Phasenverhaltens von konzentrierten Proteinlösungen ist auch Voraussetzung für viele biotechnologische Anwendungen, nicht zuletzt für das Design von IDP-ähnlichen Strukturen und verwandten synthetischen Heteropolymeren mit innovativen Materialeigenschaften.^[45,92–96] Die Kenntnis des Phasenverhaltens von Proteinen ist auch in Bereichen wie Proteinreinigung und Langzeitlagerung sowie für die Hochdruck-Lebensmittelverarbeitung unerlässlich.^[2,33,42,97–99] Im Bestreben, biomolekulare LLPS besser zu verstehen, konzentriert sich diese Arbeit auf die Gleichgewichtsthermodynamik, wegen der grundlegenden physikalischen Erkenntnisse, die sie bietet, ohne die Tatsache aus den Augen zu lassen, dass biologisch funktionelle Kondensate in vielerlei Hinsicht hochkomplexe "aktive Lösungen" sind,^[31,100] die durch chemische Reaktionen, posttranslationale Modifikationen und andere gleichgewichtsunabhängige Prozesse reguliert werden.^[23,35,36] Die im folgenden Kapitel vorgestellten Daten wurden mittels FT-IR Spektroskopie, Turbiditätsmessungen sowie der Lichtmikroskopie in Verbindung mit verschiedenen Geräten für Hochdruckmessungen gewonnen, um die Struktur und die Phaseneigenschaften der Proteine über einen weiten Temperatur-, Druck- und Osmolyt-Konzentrationsbereich zu untersuchen. Am Beispiel von γ D-Kristallin, α -Elastin und einer N-terminalen IDR von Ddx4[‡] werden repräsentative Ergebnisse für verschiedene Arten von Proteinsystemen vorgestellt und ein

[†] Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der folgenden Referenz publiziert:

S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.^[52]

H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. H. A. Winter, *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 13049–13069.^[53]

[‡] Die Untersuchungen am IDR Ddx4 wurden von Zamira Fetahaj durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[53] publiziert.

allgemeiner Ansatz zur Erklärung der beobachteten T -, p - und der Osmolytabhängigkeit von Protein-LLPS erörtert.

3.1 Probenpräparation

3.1.1 Proteinexpression von γ D-Kristallin

3.1.1.1 Transformation

Das für die Untersuchungen verwendete Protein γ D-Kristallin wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Winter exprimiert und aufgereinigt. Hierzu wurde ein pET-30(+) Plasmidvektor mit der entsprechend klonierten DNA vom humanem γ D-Kristallin (CRYGD) und aus der Ratte von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) erworben. Die zugehörige Plasmidkarte ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Aminosäuresequenzen von humanen γ D-Kristallin und der Ratte sind im Anhang zu finden (Abbildung 9.1).

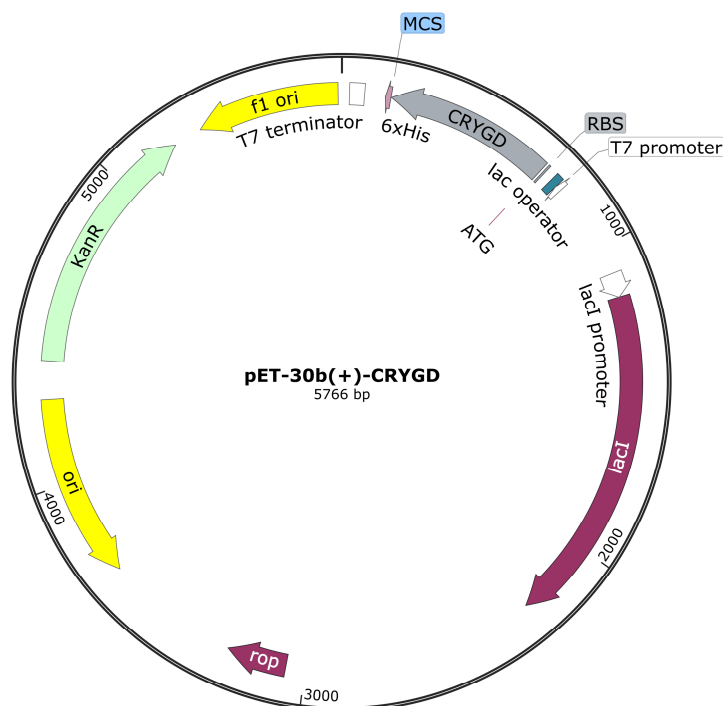


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des pET-30(+)-Plasmidvektors mit der klonierten DNA von humanem γ D-Kristallin. Für das γ D-Kristallin Protein der Ratte wurde der gleiche pET-30(+)-Plasmidvektor verwendet. Die Schematische Darstellung wurde mit der Software SnapGene[®] erstellt.

Für die Transformation der Plasmidvektoren wurden im ersten Schritt chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen von der Firma Agilent Technologies (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) vorsichtig auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μ L Plasmid versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgt durch die Hitzeschockbehandlung bei 42 °C für 30 s, gefolgt von einer zwei minütigen Abkühlphase auf Eis. Nach der Zugabe von 500 μ L vorgewärmten *Lysogeny broth* (LB)-Medium werden die Bakterienzellen für eine weitere Stunde bei 37 °C und 130 rpm im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 300 μ L der Lösung auf antibiotikahaltige Agarplatten (Kanamycin und Chloramphenicol) ausplattiert und man ließ die Zellen im Anschluss bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht wachsen.

3.1.1.2 Proteinexpression

Für die Expression des humanen γ D-Kristallins und des γ D-Kristallin-Proteins der Ratte wurden zu Beginn Vorkulturen angesetzt. Hierzu wurden 50 mL eines mit Kanamycin und Chloramphenicol haltigen LB-Mediums mit kompetenten *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen, die den jeweiligen γ D-Crys-Plasmid in sich tragen, angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden in 4 Kolben mit jeweils 750 mL LB-Lösung erneut Kanamycin und Chloramphenicol hinzugegeben und mit 7.5 mL der Vorkultur angeimpft. Während der Inkubation bei 37 °C und 130 rpm wurde das Wachstum der Bakterien mittels BioPhotometer Plus der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verfolgt. Beim Erreichen einer OD_{600} (Optische Dichte bei 600 nm) von 0.6 wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) die Proteinexpression des γ D-Kristallin induziert. Die Hauptkultur wurde ein weiteres Mal über die Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert und das gewonnene Zellpellet wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.1.3 Zelllyse und Aufreinigung

Um das rekombinante Protein zu isolieren, wurde das Zellpellet mit 130 mL Lysepuffer, DNase und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) versetzt und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die proteinhaltige Lösung wurde durch Zentrifugieren für 30 min bei 25000 rpm und 10 °C von den übrigen Zellrückständen getrennt. Die Aufreinigung des Pro-

teins erfolgte mittels einer HisTrapTM HP Ni-NTA-Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden). Zunächst wurde die Ni-NTA-Säule mit 50 mL Puffer I gewaschen und anschließend mit dem Protein beladen. Bestandteile, die nicht an die Säule gebunden haben, wurden durch einen zweiten Waschlösungsdurchlauf mit Puffer I von der Säule entfernt. Die Eluierung erfolgte mittels eines Puffergradienten, von Puffer I zu Puffer II über ein Gesamtvolumen von 100 mL, in 1.5 mL Fraktionen. Zur Detektion der Fraktionen mit dem Protein wurde das Chromatographie-System ÄKTAprime plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die detektierten Proteinfractionen wurden zu einer Probe zusammengefügt und auf ein Volumen von 2 mL aufkonzentriert. Abschließend wurde mittels einer Gelfiltration ein Pufferaustausch auf Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die während der Zellyse und dem Aufreinigungsschritt verwendeten Lösung und ihre Zusammensetzungen sind in der folgenden Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Reinheit der Proteinfractionen nach der Gelfiltration wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.2).

Tabelle 3.1: Für die Zellyse und Aufreinigung eingesetzten Pufferlösungen und deren Zusammensetzungen.

Probe	Zusammensetzung
Puffer I: Lyse-/Waschpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 2.5 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH = 8.0
Puffer II: Elutionspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH = 8.0
TRIS-Puffer	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4

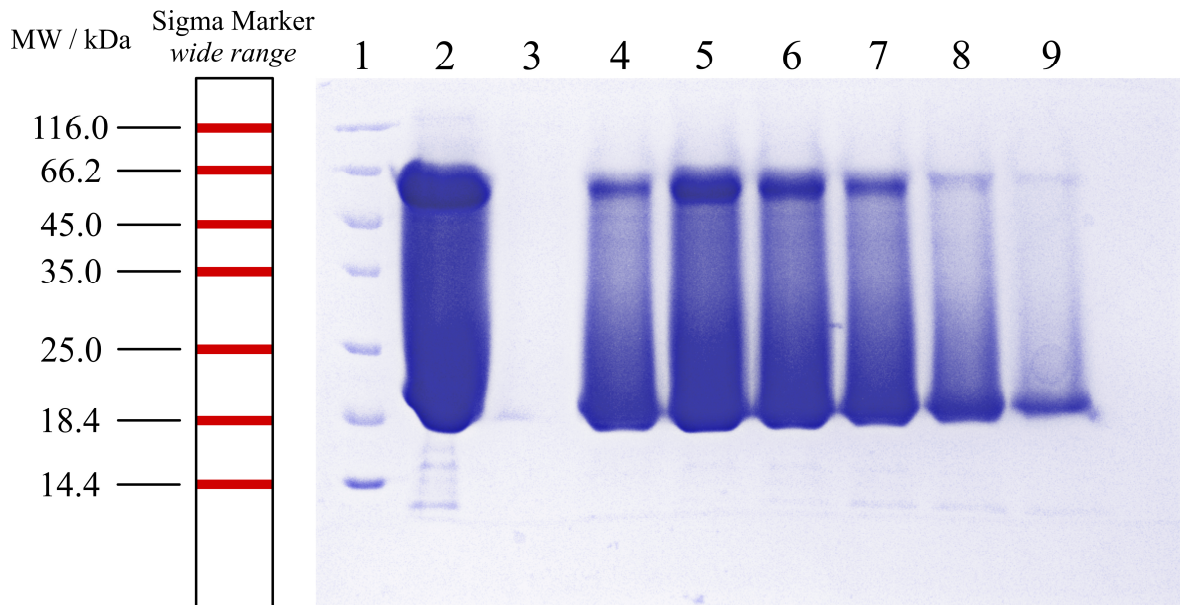


Abbildung 3.2: Repräsentative SDS-PAGE des humanen γ D-Kristallin Proteins nach der Gelfiltration. Das Protein wurde in den Fraktionen 2 und 4 – 9 nachgewiesen. In der Spalte eins ist der Molekulargewichtsstandard (SigmaMarker, *wide range*, S8445-1VL) aufgetragen

3.1.2 FT-IR Messungen

Für die folgenden FT-IR Messungen wurde wegen der überlagernden H_2O -Deformations-schwingung bei 1645 cm^{-1} D_2O als Lösungsmittel eingesetzt. Wie in Kapitel 2.2.3 erwähnt, besitzt D_2O eine relativ geringe Absorption im Bereich von $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$ und ist daher als Lösungsmittel besser geeignet.^[73] Für die druckabhängigen Messungen wurde aufgrund der charakteristischen pD-Druckstabilität TRIS- D_2O -Puffer verwendet. Zur Bestimmung des pD-Werts der Pufferlösung wurde eine herkömmliche pH-Elektrode verwendet. Für eine korrekte pD-Einstellung der Lösung musste die Korrektur $\text{pD} = \text{pH-Meter-Anzeige} + 0.4$ berücksichtigt werden.^[101] Anschließend wurde eine 5 Gew.-% (50 mg mL^{-1}) γ D-Kristallin-Lösung hergestellt. Als Ausgangslösung diente eine Protein-Stammlösung, die mit dem vorbereiteten TRIS- D_2O -Puffer entsprechend verdünnt werden musste. Die Konzentrationen der jeweiligen Stammlösungen unterschieden sich voneinander und die Zusammensetzung der Endprobe musste individuell berechnet werden. Das endgültige Probenvolumen betrug $200\text{ }\mu\text{L}$. Im nächsten Präparationsschritt wurde für den H/D-Austausch die Probe dreimal im Wechsel lyophilisiert und wieder mit D_2O aufgefüllt. Im finalen Durchlauf wurde die Probe über Nacht lyophilisiert und unmittelbar vor der Messung in $200\text{ }\mu\text{L}$ D_2O -Lösung gelöst, sodass eine Proteinkonzentration von 5 Gew.-% vorlag. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Die für die temperatur- und druckabhängigen FT-IR Messungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
γ D-Kristallin	5 Gew.-% γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4

3.1.3 Turbiditätsmessungen und Lichtmikroskopie

Die Probenlösungen wurden unmittelbar vor jeder Versuchsdurchführung präpariert, um die Messungen bei möglichst identischen Bedingungen durchführen und somit mögliche präparative Fehler ausschließen zu können. Das humane γ D-Kristallin und das der Ratte lagen als Stammlösungen vor und wurden in 500 μ L Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je nach Expressionserfolg der Proteine konnten die Stammlösungen unterschiedliche Konzentrationen vorweisen. Des Weiteren wurde eine Stammlösung von 1 M TMAO-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) hergestellt. Zum Herstellen der γ D-Kristallin-Probenlösungen wurden die jeweiligen γ D-Kristallin-Stammlösungen unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetaut und mit der TMAO-Lösung in der gewünschten Zusammensetzung vermischt und mit TRIS (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) auf das endgültige Probenvolumen aufgefüllt.

Für die Elastin-Proben wurde im Vorfeld α -Elastin in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) gelöst. Aufgrund der besseren Löslichkeit des Proteins bei Kälte wurde die Lösung nach Zugabe des α -Elastins und zwei-minütigem Vortexen für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und erneut für zwei Minuten gevortext. Im Anschluss wurde die Lösung von α -Elastin mit der 1 M TMAO-Stammlösung in der gewünschten Zusammensetzung gemischt. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Die für die Turbiditäts- und Lichtmikroskopie-Untersuchungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
γ D-Kristallin (Human)	55 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	0.38 M TMAO, 55 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	0.6 M TMAO, 55 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
γ D-Kristallin (<i>Rattus norvegicus</i>)	55 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
α -Elastin	20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	10 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	20 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	30 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	40 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	80 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
	200 mM TMAO, 20 mg mL ⁻¹ α -Elastins, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4

3.2 Druck- und Osmolyt-abhängige LLPS des globulären Proteins γ D-Kristallin

Mit einem Proteinanteil von 30 – 35 % gehört die Augenlinse zu den proteinreichsten Organen des menschlichen Organismus. Bei den Kristallin-Proteinen der Augenlinse von Wirbeltieren handelt es sich um Strukturproteine, die die Transparenz und den hohen Brechungsindex der Linse gewährleisten, wodurch das einfallende Licht auf die Netzhaut des Auges fokussiert wird. Während der Linsenentwicklung und dem damit verbundenen Ausbilden der Linsenfasern werden zeitgleich die Zellorganellen einschließlich der Zellkerne bis auf die Ribosomen in den Fasern abgebaut.^[102,103] Letztendlich bleibt nur das Cytoskelett erhalten, welches durch die Kristallin-Proteine ausgefüllt wird. Die daraus resultierenden reifen Faserzellen enthalten außergewöhnlich hohe Konzentrationen an Kristallin, die fast 90 % des Trockengewichts der menschlichen Linse ausmachen.^[104] Bei den Wirbeltieren bilden α -, β - und γ -Kristallin die drei Haupttypen, wobei β - und γ -Kristallin aufgrund ihrer gemeinsamen Funktion zur β/γ -Superfamilie zusammengefasst werden, die an der Regelung der lichtbrechenden Eigenschaften der Linse beteiligt sind. Bei α -Kristallin handelt es sich um ein kleines Hitzeschockprotein, das als Holdase-Chaperon agiert, d.h. es bindet an ungefaltete Proteine um die Aggregation zu verhindern, ohne eine eigene ATPase-Aktivität zu besitzen.^[104–106] Die Sekundärstrukturen der β - und γ -Kristalline sind in zwei Domänen unterteilt, die als N-terminale Domäne (N-td) und C-terminale Domäne (C-td) bezeichnet werden, die wiederum in vier Subdomänen gruppiert sind, die als *greek key motifs* bezeichnet werden und antiparallele β -Stränge enthalten. Ein wichtiger biologischer Unterschied zwischen den β - und γ -Kristallin-Proteinen besteht darin, dass β -Kristalline domänenvertauschte Dimere bilden, während die γ -Kristalline in Lösung nur als Monomer vorliegen.^[107–110] Humanes γ D-Kristallin (H γ D-Crys) ist das dritthäufigste γ -Kristallin, welches im menschlichen Auge vorzufinden ist. Es ist ein globuläres Protein, bestehend aus 173 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 20 kDa.^[111,112] Seine Sekundärstruktur besteht aus antiparallelen β -Faltblättern und Schleifen, die in zwei Domänen gruppiert sind, die durch einen Looplinker verbunden sind. Die hier vorgestellte Studie betraf sowohl humanes γ D-Kristallin als auch das der Ratte (*Rattus norvegicus*), die das Produkt des γ D-Gens sind.^[113] Die Aminosäuresequenzen der Proteine beider Spezies sind zu 85.1 % identisch. Ihre Prozentsätze der basischen und sauren Reste sind gleich, aber der Anteil der hydrophoben Aminosäuren in γ D-Kristallin der Ratte ist etwas höher.^[52]

3.2.1 Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen

Wie schon in der Studie von M. Broide et. al.^[114] gezeigt, weist eine Vielzahl von Proteinen aus der Familie der Kristalline eine temperaturabhängige Phasentrennung auf. Entsprechend wurde in dieser Studie einleitend das temperaturabhängige Phasenverhalten von humanem γ D-Kristallin und das der Ratte mittels Turbiditätsmessungen untersucht.

In Abbildung 3.3 sind exemplarisch die Absorptionsspektren einer 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung und das der Ratte in einem Wellenlängenbereich von 250 – 450 nm gezeigt. Die Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von 1 – 20 °C bei Atmosphärendruck.

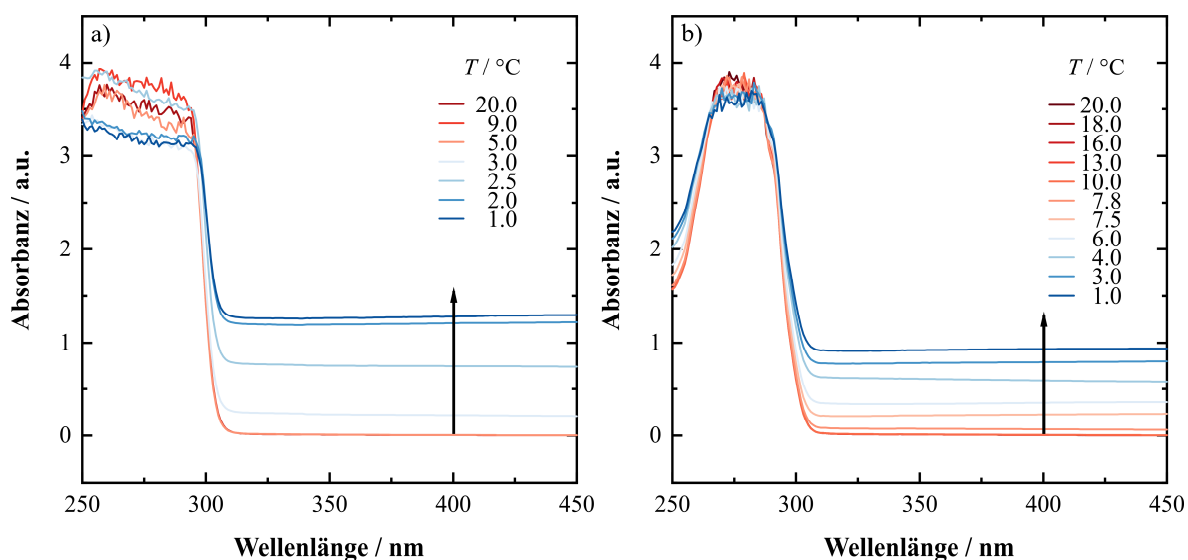


Abbildung 3.3: UV/VIS-Absorptionsspektren (250 – 450 nm) einer a) 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und b) das der Ratte bei ausgewählten Temperaturen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

Beide Spektren weisen, aufgrund der in der Aminosäuresequenz der Proteine enthaltenen, aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, eine erhöhte Absorption bei 250 – 300 nm auf. Das Signalrauschen in diesem Wellenlängenbereich ist auf die hohe Proteinkonzentration zurückzuführen, wodurch die höchstmögliche, durch den Detektor messbare Absorption erreicht war. Dieser Wellenlängenbereich ist für die weitere Auswertung nicht von Bedeutung und kann daher außer Acht gelassen werden.

Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt ist die durch Phasentrennung bedingte Trübung der Lösung auf Streuprozesse zurückzuführen. Da keine Absorption stattfindet, spricht man hier auch von einer scheinbaren Absorption. Die Bestimmung der Trübungs-

punkte erfolgte bei einer Wellenlänge von 400 nm, da bei geringeren Wellenlängen (< 400 nm) das Absorptionssignal sich zum einen aus der Streuung an den Tröpfchen und zum anderen aus der Absorption der aromatischen Aminosäuren ergibt. Bei 400 nm liegt jedoch keine Absorption der aromatischen Aminosäuren vor und das Absorptionssignal ist lediglich auf die Streuprozesse durch Phasentrennung zurückzuführen.

Die aus den Absorptionsspektren erhaltenen Trübungspunkte bei 400 nm wurden im Anschluss als Funktion der Temperatur aufgetragen und sind in Abbildung 3.4 gezeigt. Wie in der Abbildung 3.4a zu erkennen ist, wird für beide Proteine mit abnehmender Temperatur und der damit einhergehenden Bildung der Koazervate eine Intensitätszunahme bei 400 nm beobachtet, die annäherungsweise einem sigmoidalen Kurvenverlauf folgt.

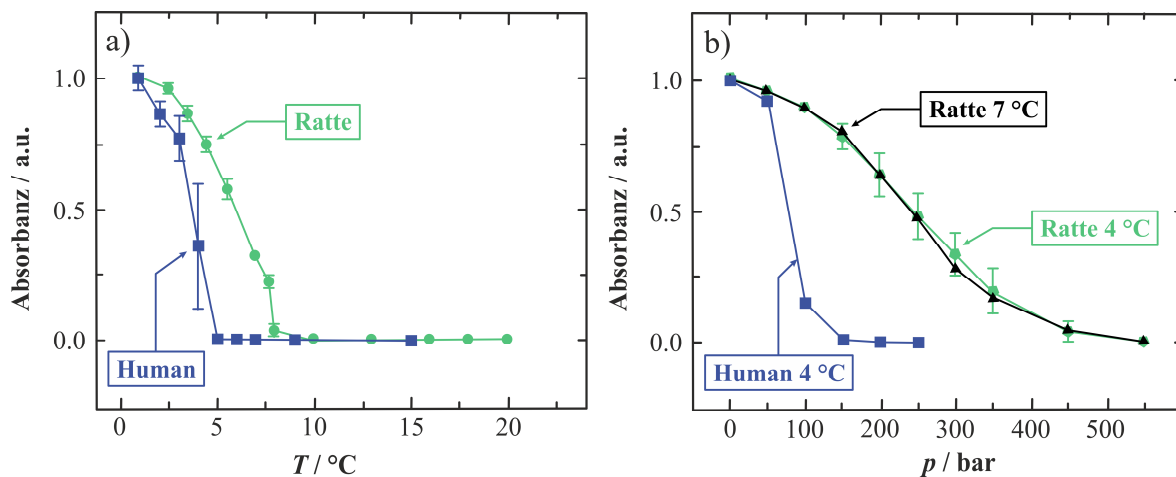


Abbildung 3.4: Temperatur- und druckabhängige UV/Vis-Absorptionsintensitäten (Trübung) bei 400 nm für eine 55 mg mL^{-1} -Lösung von humanem und Ratten γ D-Kristallin (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$), gemessen als Funktion (a) der Temperatur und (b) des Drucks bei ausgewählten Temperaturen. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte normiert (Absorption = 1.0). Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Das humane γ D-Kristallin weist bei Umgebungsdruck einen temperaturinduzierten Trübungspunkt bei ~ 4 °C auf, der den Beginn der Koazervation darstellt und durchläuft somit eine Phasentrennung mit einer oberen kritische Lösungstemperatur (UCST). Oberhalb von ~ 5 °C herrscht eine homogene Phase vor, welches sich in einer scheinbaren Absorption von $A \approx 0$ widerspiegelt. Der Trübungspunkt des γ D-Kristallins der Ratte liegt im Vergleich zum humanen Protein bei ~ 6 °C etwas höher, wobei der entsprechende Übergang in die homogene Lösung bei 8 °C abgeschlossen ist. Trotz der hohen Übereinstimmung innerhalb der Aminosäuresequenzen weisen beide Proteine unterschiedliche Trübungspunkte auf, was an dieser Stelle vermuten lässt, dass schon geringe Änderungen in der Aminosäurezusammen-

setzung/-sequenz zu einem beobachtbaren Unterschied in den temperaturabhängigen Trübungspunkten führt.

Ein weiteres globuläres Protein, welches bei hohen Proteinkonzentrationen ein ähnliches temperaturabhängiges Phasenverhalten zeigt, ist das im Eiweiß vorkommende Lysozym. Es ist ein Enzym, das die schützenden Zellwände von Bakterien angreift, indem es die Kohlenhydratketten in den Wänden aufbricht und so die strukturelle Integrität der bakteriellen Zellwände zerstört.^[53] Wie in der Studie von Cardinaux et al. gezeigt^[115], weist auch das hochkonzentrierte Lysozym bei niedrigen Temperaturen eine Phasentrennung auf, während bei hohen Temperaturen eine homogene Lösung vorliegt. Somit besitzt Lysozym wie γ D-Kristallin eine obere kritische Lösungstemperatur (UCST), die mit einer kritischen Proteinkonzentration von 23 ± 1 Gew.-% (w/v) (0.5 M NaCl, pH = 7.8) bei $T_c \approx 18$ °C liegt.^[115]

Des Weiteren wurden druckabhängige Turbiditätsmessungen bei 400 nm in einem Druckbereich von 1 bis 700 bar durchgeführt. Für die druckabhängigen Messungen wurden die Temperaturen nahe der zuvor bestimmten Übergangstemperaturen des humanen und des Ratten γ D-Kristallin gewählt. Abbildung 3.4b zeigt die druckabhängige Änderung der Absorptionsintensität (normiert auf eins) einer 55 mg mL^{-1} -Lösung von humanem und Ratten γ D-Kristallin bei 4 °C und 7 °C. Die druckabhängigen UV/Vis-Daten für das humane γ D-Kristallin zeigen, dass nur eine relativ geringe Erhöhung des Drucks von 1 bar auf ~ 125 bar benötigt wird, um die phasenseparierte humane γ D-Kristallin-Lösung bei 4 °C zurück in eine homogene Phase zu überführen (Übergangsmittel bei $p_{1/2} \approx 80$ bar). Bei γ D-Kristallin der Ratte ist der Übergang von der phasenseparierten Lösung in die homogene Phase bei 4 °C und 7 °C breiter. Die druckbedingte Intensitätsabnahme folgt hierbei einem Sigmoidal-ähnlichen Kurvenverlauf und endet bei ~ 450 bar. Die Übergangsmittel liegt bei ungefähr ~ 250 bar. Aus der Abbildung 3.4b wird auch ersichtlich, dass der druckabhängige Phasenübergang für das Ratten γ D-Kristallin sowohl bei 4 °C als auch bei 7 °C nahezu identisch ist. Die hier gemachten Beobachtungen stimmen mit Literaturdaten überein, die darauf hinweisen, dass relativ kleine Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung/-sequenz einen signifikanten Einfluss auf die Trübungspunkttemperatur und auf den druckabhängigen Trübungspunkt haben können.^[116]

In der biologischen Zelle können Kosolventien die relative Stabilität biomolekularer Zustände beeinflussen. Um ein besseres Verständnis dafür zu erlangen wie sich Kosolventien auf die biomolekulare LLPS auswirken, wurde der Einfluss von TMAO auf das Phasenverhalten von γ D-Kristallin untersucht. Der Osmolyt TMAO stabilisiert bekanntermaßen den

gefalteten nativen Zustand globulärer Proteine aufgrund günstiger TMAO-Wasser-Wechselwirkungen und ungünstiger TMAO-Protein-Wechselwirkungen, die zu einer höheren thermodynamischen Stabilität von Proteinkonfigurationen mit geringerer vom Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, SASA) führt.^[6,117–119] Außerdem wird TMAO in Tiefseeorganismen in hohem Maße gebildet, woraus sich die Annahme ergibt, dass TMAO als Druckkompensator oder "Piezolyt" dient.^[120] Aufgrund der größeren Relevanz von humanem γ D-Kristallin gegenüber dem der Ratte beschränken sich die hierauf folgenden Forschungsdaten auf das humane γ D-Kristallin.

Die Osmolyt- und temperaturabhängige Koazervation von humanem γ D-Kristallin wurde mittels Turbiditätsmessungen verfolgt. Hierzu wurden temperaturabhängige Absorptionsspektren einer 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung bei ausgewählten TMAO-Konzentrationen in einem Wellenlängenbereich von 250 – 500 nm aufgenommen. Anschließend wurden die aus den Absorptionsspektren erhaltenen Trübungspunkte bei 400 nm als Funktion der Temperatur aufgetragen und auf ihre maximalen Absorptionsintensitätswerte normiert ($A = 1$). Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 3.5a gezeigt.

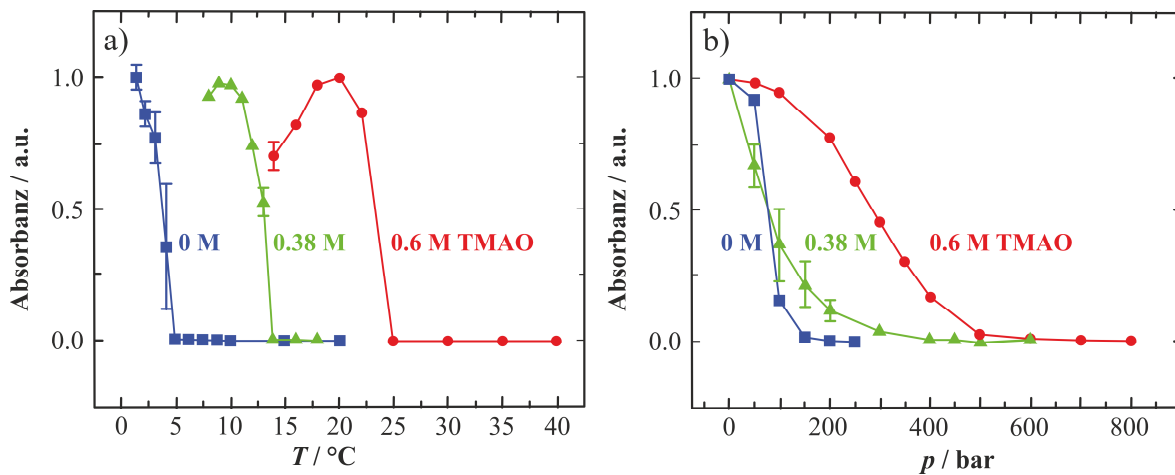


Abbildung 3.5: Temperatur- druck- und TMAO-abhängige Turbiditätsmessungen bei 400 nm für eine 55 mg mL^{-1} humane γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4). Gezeigt werden die Einflüsse von 0.38 M und 0.6 M TMAO auf a) die temperatur- und b) die druckabhängige Koazervation von humanem γ D-Kristallin bei 4 °C. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte normiert (Absorption = 1.0). Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Wie sich zeigt, führt die Zugabe von TMAO zu einer drastischen Erhöhung der Trübungspunkttemperatur der humanen γ D-Kristallin-Lösung. An dieser Stelle wird der Trübungspunkt als die letzte vor dem Einsetzen der Trübung gemessene Temperatur definiert. Für eine 55 mg mL^{-1} Lösung von humanem γ D-Kristallin wurde bei Zugabe von 0.38 M TMAO

eine Verschiebung des Trübungspunkts von ~ 5 auf ~ 15 °C beobachtet, während eine Konzentration von 0.6 M TMAO den Trübungspunkt auf ~ 25 °C verschiebt (Abbildung 3.5a). Es ist auffällig, dass bei der 0.38 M und der 0.6 M TMAO-Lösung anfangs die Absorptionsintensität mit abnehmender Temperatur drastisch ansteigt und nach dem Erreichen eines Maximums bei weiterer Temperaturverringering stark abnimmt. Daraus ließe sich ableiten, dass auf eine anfänglich zunehmende Koazervation bei weiterer Temperaturverringering eine erneute Abnahme der Koazervation folgt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Abnahme der Absorptionsintensität auf die Koaleszenz der phasenseparierten Tröpfchen zurückzuführen ist, die in Gegenwart von TMAO schneller eintritt. Demnach bilden sich mit sinkender Temperatur vermehrt kleine Phasentröpfchen, die wiederum zu größeren Phasen kondensieren und in der Küvette zu Boden sinken, d.h. es kommt allmählich zu einer makroskopischen Phasentmischung.

Als nächstes wurde die Druckempfindlichkeit der LLPS von humanem γ D-Kristallin in Gegenwart von TMAO untersucht. Die druckabhängigen Turbiditätsmessungen wurden bei 400 nm in einem Druckbereich von 1 bis 900 bar und 4 °C durchgeführt (Abbildung 3.5b). Aus den Daten wird ersichtlich, dass TMAO nicht nur einen bedeutsamen Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur hat, sondern auch die Druckempfindlichkeit der Flüssig-Flüssig-Phasenseparation von γ D-Kristallin verringert. Während für eine reine γ D-Kristallin-Lösung nur eine geringe Druckerhöhung von 1 bar auf ~ 125 bar benötigt wird, um wieder eine vollständig durchmischte klare Lösung zu erhalten, wird in Gegenwart von 0.38 M TMAO der druckinduzierte Trübungspunkt von ~ 125 bar auf ~ 400 bar verschoben. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 0.6 M TMAO führt zu einer weiteren Verschiebung des Trübungspunkts auf ~ 600 bar.

3.2.2 Temperatur- und druckabhängige Lichtmikroskopie

Um die Bildung und das Auflösen der Tröpfchen während des LLPS-Prozesses direkt zu visualisieren, wurden lichtmikroskopische Untersuchungen einer γ D-Kristallin-Lösung in Abhängigkeit der Temperatur, des Drucks und der TMAO-Konzentration durchgeführt. In Abbildung 3.6 ist die temperaturabhängige Koazervation einer reinen 55 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung gezeigt.

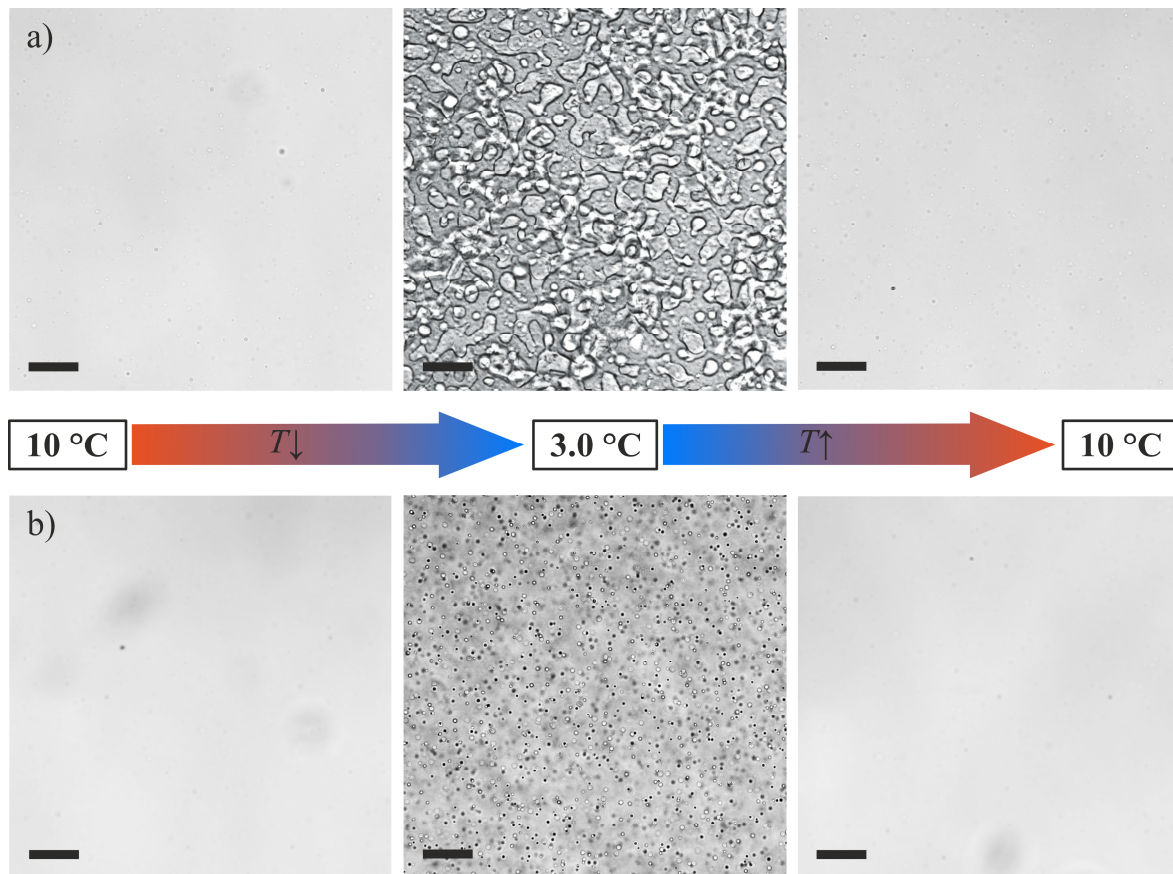


Abbildung 3.6: Temperaturabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4). Temperaturinduzierter Phasenübergang von einer klaren homogenen Phase in eine phasenseparierte Lösung und wieder zurück in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag bei a) auf der inneren Oberfläche der transparenten Zelle (Glasoberfläche) und bei b) in der Volumenphase der γ D-Kristallin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Zu Beginn der Untersuchung ist bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ eine klare transparente, homogene Lösung zu beobachten. Nach dem Herunterkühlen der Lösung auf $3 \text{ }^\circ\text{C}$ bilden sich kleine Koazervattröpfchen mit einem Durchmesser von etwa $5 \text{ }\mu\text{m}$ (Abbildung 3.6b), die innerhalb von 7 min zu Boden sinken. Wie in der Abbildung 3.6a ersichtlich, kondensieren die kleinen Phasentröpfchen auf der Oberfläche zu größeren, unregelmäßig geformten Phasen, die einen Durchmesser von $>50 \text{ }\mu\text{m}$ besitzen. Nach erneutem Aufheizen der Lösung auf die Ausgangstemperatur von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ lösen sich sowohl auf der Glasoberfläche als auch in der Lösung die Tröpfchen vollständig auf und es bildet sich erneut eine transparente, homogene Lösung.

Begleitend zu den druckabhängigen Turbiditätsmessungen wurden auch druckabhängige lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Turbiditätsmessungen bewirkt eine Druckerhöhung in einer 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ die Bildung einer homogenen Phase. In Abbildung 3.7 ist zu sehen, dass

bei einem Druck von ~ 200 bar der Phasenübergang von einer phasenetrennten Lösung in eine homogene Lösung vollständig abgeschlossen ist, während eine Druckentspannung eine erneute Flüssig-Flüssig-Phasentrennung induziert. Daraus lässt sich schließen, dass der Prozess offenbar vollständig reversibel ist. Des Weiteren konnte (Video^[52]) gezeigt werden, dass für die reine γ D-Kristallin-Lösung eine erneute Phasentrennung nach der Druckentlastung erst bei einem Druck von ~ 50 bar stattfand. Die beobachteten geringfügigen Unterschiede der ermittelten Übergangsdreücke lassen sich zum einen durch die Hysterese und zum anderen durch den zeitabhängigen Nukleationsprozess erklären.

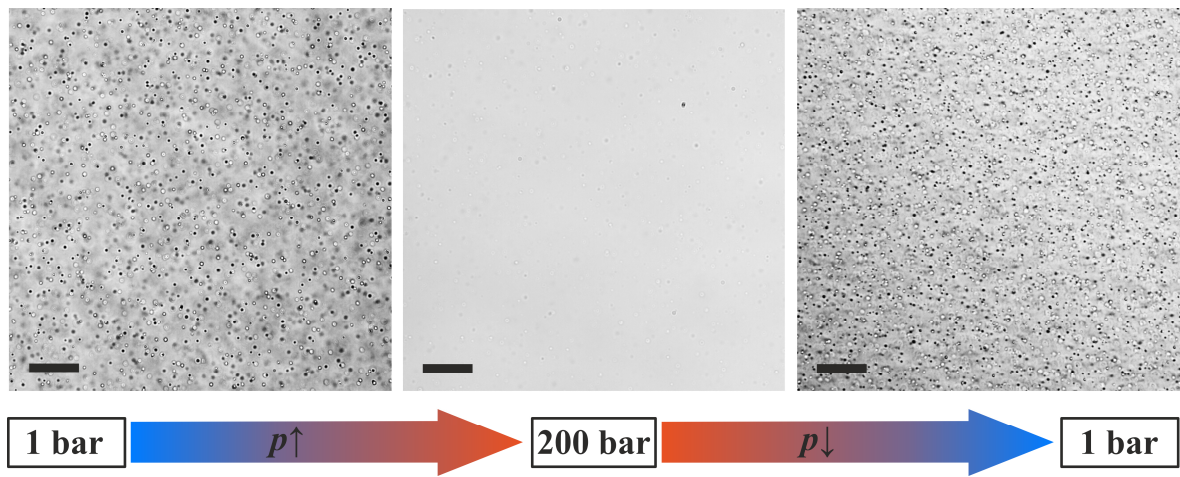


Abbildung 3.7: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Druckinduzierter Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase und wieder zurück in eine phasenseparierte Lösung. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der γ D-Kristallin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Abschließend wurde mittels Lichtmikroskopie der Einfluss von TMAO auf die Trübungspunkttemperatur und die Druckempfindlichkeit der LLPS von humanem γ D-Kristallin untersucht. Erwartungsgemäß verschiebt sich in Gegenwart von TMAO die Trübungspunkttemperatur zu höheren Werten. In Abbildung 3.8 werden temperaturabhängige Mikroskopiedaten für humanes γ D-Kristallin in einer 0.6 M TMAO -Lösung gezeigt. In Übereinstimmung zu den temperaturabhängigen Turbiditätsmessungen (Abbildung 3.5a) liegt oberhalb von $28 \text{ }^\circ\text{C}$ eine vollständig homogene durchmischte Lösung vor (Abbildung 3.8, links). Durch Herunterkühlen der Lösung auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ wird die Tröpfchenbildung in der Lösung und der damit verbundene Übergang in den phasenseparierten 2-Phasenzustand induziert. Ein erneutes Aufheizen der Lösung auf $28 \text{ }^\circ\text{C}$ bewirkt den Wiedereintritt in die homogene Phase. Eine augenscheinliche Veränderung der gebildeten Phasentröpfchen konnte in Gegenwart von 0.6 M TMAO nicht festgestellt werden.

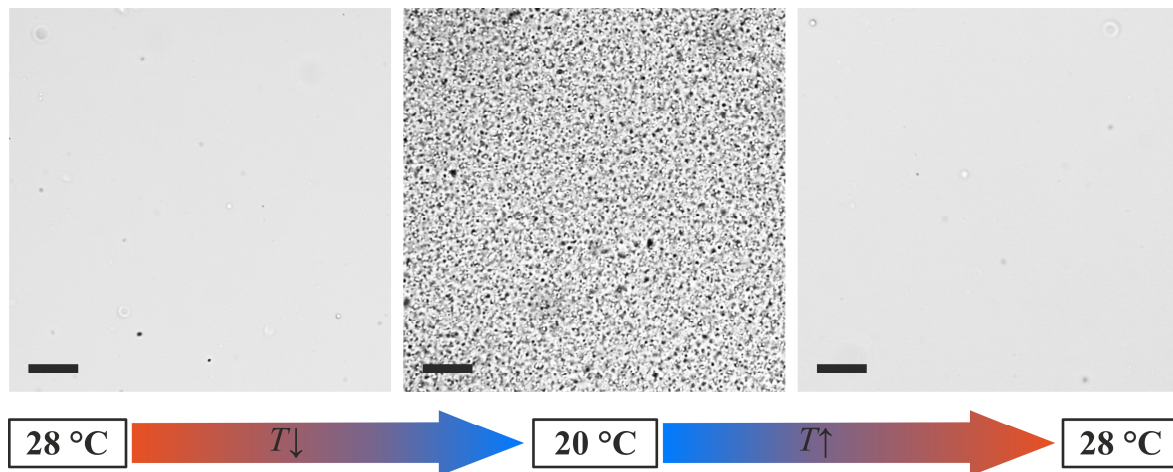


Abbildung 3.8: Temperaturabhängige Lichtmikroskopiebilder einer 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) in Abhängigkeit von 0.6 M TMAO. Temperaturinduzierter Phasenübergang von einer klaren homogenen Phase in eine phasenseparierte Lösung und wieder zurück in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der γ D-Kristallin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Wie bei einer reinen γ D-Kristallin-Lösung bilden sich während des temperaturinduzierten Phasenübergangs in der Lösung Phasentröpfchen mit einem Durchmesser von $\sim 5 \mu\text{m}$ (Abbildung 9.2). Auch die druckabhängigen Mikroskopiedaten bestätigen die Ergebnisse der druckabhängigen Turbiditätsmessungen einer γ D-Kristallin-Lösung in Gegenwart von 0.6 M TMAO bei 4 °C (Abbildung 9.5). Mit zunehmendem Druck wurde eine stetige Abnahme der Tröpfchenzahl und die damit verbundene Verringerung der Trübung beobachtet. Ab einem Druck von $\sim 680 \text{ bar}$ lag die γ D-Kristallin-Lösung vollständig als klare homogene Phase vor. Die erneute Phasentrennung während der Druckentlastung konnte erst bei einem Druck von $\sim 500 \text{ bar}$ beobachtet werden, welche sich durch die Hysterese und den zeitabhängigen Nukleationsprozess erklären lässt (Abbildung 3.9).

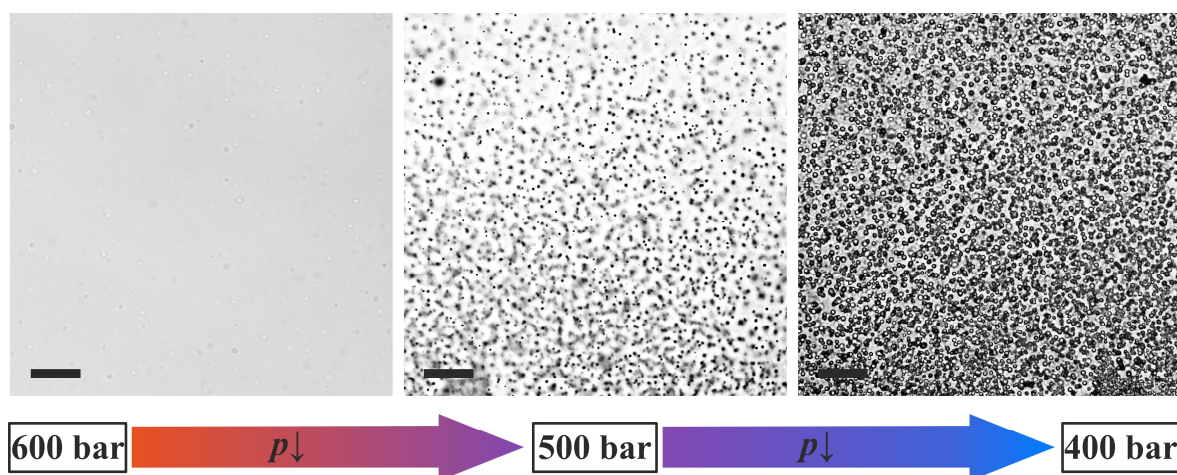


Abbildung 3.9: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer 55 mg mL^{-1} humanen γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) in Abhängigkeit von 0.6 M TMAO bei 4°C . Druckinduzierter Phasenübergang von einer klaren homogenen Phase in eine phasenseparierte Lösung. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der γ D-Kristallin-Probe. Die Maßstabskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

3.2.3 Druckabhängige FT-IR Messungen

Um festzustellen, ob das Flüssig-Flüssig-Phasenverhalten von γ D-Kristallin durch die Assoziation einzelner nativ gefalteter Moleküle oder durch die Assoziation spezifischer druckentfalteter Proteinformen zustande kommt, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen druckabhängige FT-IR- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Aufgrund der hohen Sensitivität der Infrarot-Absorptionsspektroskopie gegenüber Sekundärstrukturänderungen eignet sich diese Methode besonders gut zur Analyse der Proteinstruktur, insbesondere auch für nicht-transparente Proben. Es wurde die Änderung der Amid-I'-Bande in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks betrachtet. Hierzu wurde γ D-Kristallin in D_2O in einem Druckbereich von 1-3000 bar bei ausgewählten Temperaturen untersucht. In Abbildung 3.10a und c sind die aus den Messungen erhaltenen druckabhängigen Amid-I'-Banden einer 5 Gew.-% γ D-Kristallin-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) bei 24°C und 1°C dargestellt. Wie schon im vorausgehenden Kapiteln erwähnt, ergibt sich die Amid-I'-Bande aus der Summe aller Sekundärstrukturanteile des gemessenen Proteins, wobei das Maximum der Amid-I'-Bande bereits einen ersten Hinweis auf die Verteilung der Sekundärstrukturen des Proteins gibt. Beide IR-Spektren weisen im Bereich der Amid-I'-Region ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) eine breite Bande mit einem Maximum bei 1638 cm^{-1} auf (Abbildung 3.10a und c), die in Übereinstimmung mit den Literaturdaten^[108,121] auf die cha-

rakteristische β -Faltblattreiche Struktur des γ D-Kristallins deutet. Aus den Daten ist zu entnehmen, dass mit steigendem Druck bis auf 3000 bar für beide Temperaturen nur eine leichte, druckabhängige, elastische Rotverschiebung der Absorptionsbanden zu kleineren Wellenzahlen stattfindet.

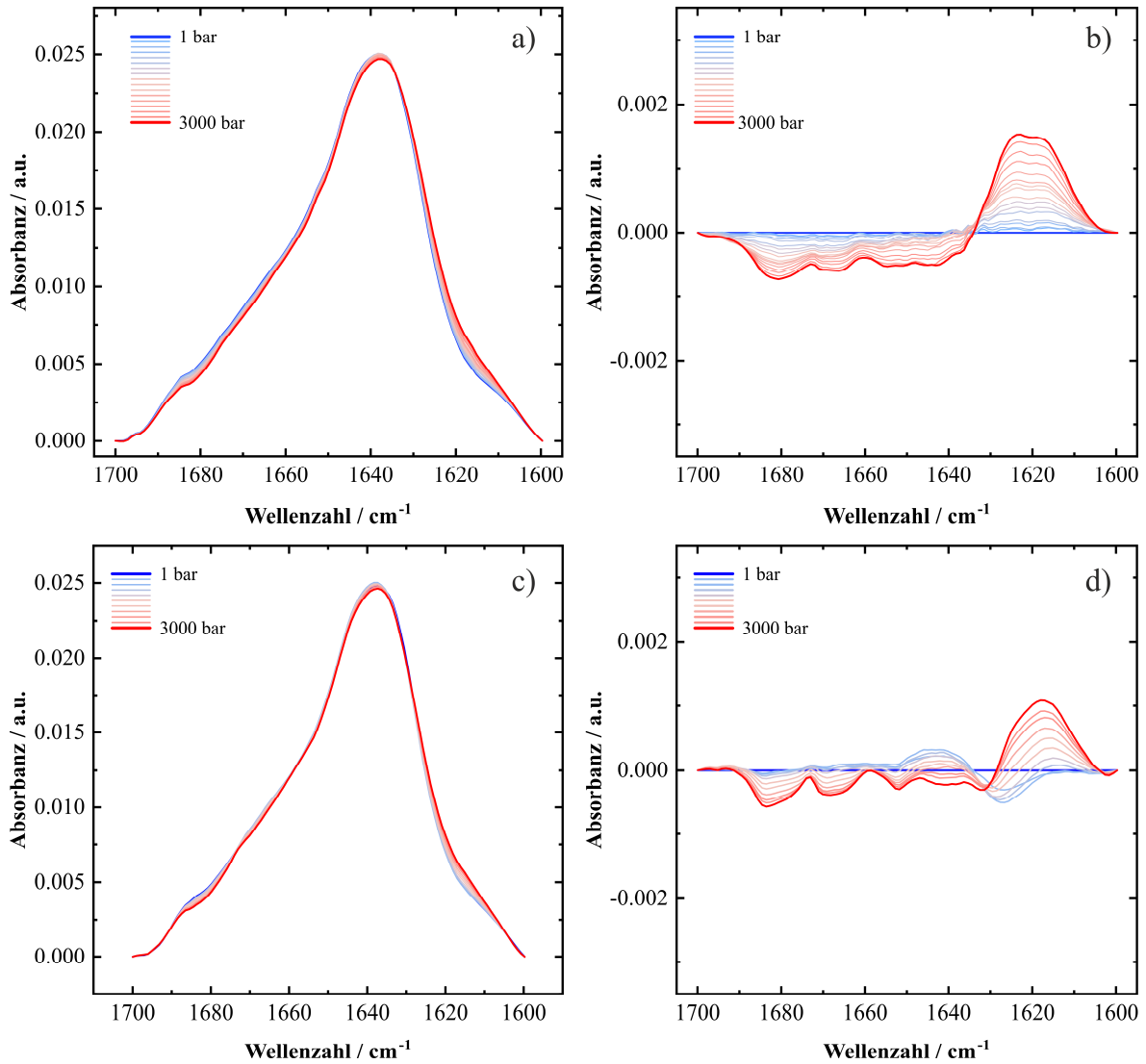


Abbildung 3.10: Flächennormierte FT-IR Spektren ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) der druckabhängigen Messungen einer 5 Gew.-% γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) in einem Druckbereich von 1-3000 bar bei a) 24 °C und c) 1 °C. b) und d) sind die zugehörigen Differenzspektren. Die Amid-I'-Banden bei 1 bar dienen als Referenzspektrum und wurden von allen anderen Amid-I'-Banden abgezogen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Die leichte Rotverschiebung lässt sich dadurch erklären, da steigender Druck stabilisierend auf die Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins wirkt, was wiederum zu einer Abnahme der Elektronendichte an den Carbonylgruppen führt. Daraus folgt eine kleinere Kraftkonstante k und eine Verschiebung der Amid-I'-Bande zu kleineren Wellenzahlen.^[122,123] Somit

ist davon auszugehen, dass keine druckbedingten Entfaltungen stattgefunden haben (Abbildung 3.10b und d). Die Temperaturen während der druckabhängigen Messungen wurden so gewählt, dass eine Lösung sich im phasenseparierten Zustand befindet, während die zweite Lösung weiterhin eine klare, homogene Phase aufweist. Der direkte Vergleich beider Amid-I'-Banden bei 24 °C und 1 °C zeigt, dass augenscheinlich keine Änderung der Sekundärstruktur an der Flüssig-Flüssig-Phasenseparation beteiligt ist (Abbildung 9.3). Weitere detaillierte FT-IR Messungen werden in Kapitel 4 präsentiert.

Ergänzend zu den FT-IR Untersuchungen wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Hierzu wurden intrinsische Tryptophan-Fluoreszenzspektren von 0.1 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4, $T = 4$ °C) bis zu einem Druck von 2.5 kbar aufgenommen, um mögliche druckentfaltete Formen des Proteins innerhalb des gemessenen Druckbereichs aufzudecken.[§] Wird während der Proteinfaltung ein intrinsischer Tryptophanrest eines Proteins zum Wasser hin exponiert, verschiebt sich die Tryptophan-Fluoreszenzbande zu größeren Wellenlängen (Rotverschiebung), was wiederum auf einen – zumindest lokalen – Konformationswechsel des Proteins deutet. Abbildung 3.11 zeigt das druckabhängige Fluoreszenzspektrum von 0.1 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin in einem Emissionswellenlängenbereich von 300 – 500 nm mit einem Maximum bei 320 nm. In Übereinstimmung mit den FT-IR Messungen zeigen die Daten der Fluoreszenzmessung (Abbildung 3.11) weder eine Veränderung in der Intensität noch eine Verschiebung der Fluoreszenzbande von 1 bar bis 2.4 kbar, was darauf hinweist, dass das Protein über den gesamten gemessenen Druckbereich im nativen gefalteten Zustand bleibt. Im Falle einer druckinduzierten Entfaltung wäre, aufgrund der Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz von der Umgebungspolarität, eine Bandenverschiebung von 320 nm (hydrophobes Milieu) zu 350 nm (polares Lösungsmittel) zu beobachten.

[§] Die druckabhängigen Messungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von γ D-Kristallin wurden von Dr. Süleyman Çınar durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[52] publiziert.

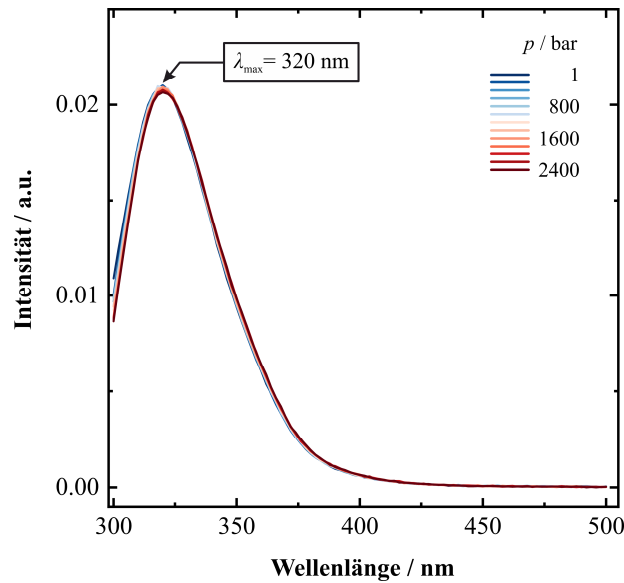


Abbildung 3.11: Druckabhängige Messungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz einer 0.1 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Anregungswellenlänge: 295 nm, Emissionswellenlänge: 300 – 500 nm. Die Probenpräparation, die Messungen und die Interpretation der Fluoreszenzdaten wurden von Dr. Süleyman Çınar durchgeführt.^[52] Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Die Ergebnisse der Untersuchungen am globulär gefalteten Protein γ D-Kristallin zeigen zwei wichtige Erkenntnisse über die Protein – Flüssig-Flüssig-Phasentrennung: Zum einen können Drücke von nur einigen Zehn bar ein phasensepariertes System zurück in eine homogene Lösungsphase überführen und zum anderen sind kompatible Osmolyte, wie das hier diskutierte Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO), in der Lage, diese Proteinkondensate, die für manche biologische Funktionen von entscheidender Bedeutung sind, gegen eine druckinduzierte Auflösung zu stabilisieren. Der stabilisierende Effekt der kompatiblen Osmolyte auf Proteinkonfigurationen mit geringerer Lösungsmittlexposition gegenüber Zuständen mit höherer Lösungsmittlexposition^[124], wie z.B. die Stabilisierung gefalteter Proteine gegenüber Entfaltungsprozessen oder die Stabilisierung kondensierter LLPS-Zustände gegenüber einer Auflösung, hängt wahrscheinlich mit der Tatsache zusammen, dass die Wechselwirkungen zwischen diesen Osmolyten und den verschiedenen Komponenten von Polypeptidketten im Allgemeinen ungünstig sind.^[125] Diese ungünstige Wechselwirkung zwischen den Proteinen und den Osmolyten führt zu einem bevorzugten Ausschluss der Osmolyte von den Proteinoberflächen und zu energetisch bevorzugten kompakteren Konfigurationen.^[126] Eine physikalisch sinnvolle Erklärung für die kombinierte druck- und Osmolyt-abhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin, wobei auch die Auswirkungen der Hohlraumvolumina^[52] auf die Druckempfindlichkeit berücksichtigt werden müssen, wird in Kapitel 3.4 diskutiert.

3.3 Druck- und Osmolyt-abhängige LLPS des intrinsisch ungeordneten Proteins α -Elastin

Die in den letzten zwei Jahrzehnten erzielten Fortschritte bei der Erforschung der wichtigen biologischen Funktionen von intrinsisch ungeordneten Proteinen und intrinsisch ungeordneten Proteinregionen (siehe Referenz^[127,128] und Verweise darin) bestätigen die Auffassung, dass alle Konformationszustände von Biomolekülen, einschließlich der ungeordneten Konformationen, für lebenswichtige Prozesse innerhalb der Zelle genutzt werden können. Neben der Protein-LLPS, die gefaltete globuläre Proteine betrifft, werden in vielen Fällen biomolekulare LLPS durch dynamisch multivalente Wechselwirkungen von ungeordneten Proteinregionen angetrieben.^[13,129,130] LLPS-bedingte multivalente Wechselwirkungen können daher auch zwischen chemischen Gruppen, wie hydrophobe, aromatische und geladene Resten, stattfinden.

Von allen lösungsmittelvermittelten biomolekularen Triebkräften^[131] ist die hydrophobe Wechselwirkung am bekanntesten für ihre besondere Temperaturabhängigkeit, insbesondere im Zusammenhang mit der kalten Denaturierung von Proteinen.^[132–135] Unter dem Phänomen der Kältedenaturierung versteht man, dass entfaltete Proteine durch Temperaturerhöhung vom entfalteten in den gefalteten Zustand übergehen, was der LLPS mit einer LCST ähnlich ist. Bei gefalteten Proteinen liegt die Temperatur der kalten Denaturierung jedoch in der Regel deutlich unter dem Gefrierpunkt der Lösung. Als Beispiel für druck- und Osmolyt-abhängige LLPS von IDPs werden in dieser Arbeit Forschungsdaten von α -Elastin mit einer LCST präsentiert.

Vernetztes Elastin ist neben Kollagen ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, die dem Gewebe der Wirbeltiere, einschließlich der Blutgefäße und der Haut, Elastizität verleiht.^[136] Dabei besteht das Elastin-Netzwerk aus langen amorphen Polymerketten, die im Gewebe durch Desmosin und Isodesmosin kovalent miteinander quervernetzt sind.^[137] Das wasserlösliche Monomer der Elastin-Polymerkette ist das Tropoelastin mit einer molekularen Masse von 60 kDa. Die Aminosäuresequenz des asymmetrischen Moleküls weist eine alternierende hydrophobe und hydrophile Domänenstruktur auf. Tropoelastin lässt sich in die funktionell voneinander getrennte N- und C-terminale Region unterteilen, die über eine hoch Protease-empfindliche *bridge*-Region miteinander verbunden sind. Die hohe Elastizität innerhalb des Proteinnetzwerks wird durch die lange elastische *coil*-Struktur innerhalb der N-terminalen Region bewerkstelligt, während die direkt darauffolgende *hinge*-Region für

die intermolekularen Quervernetzungen zur Verfügung steht. Die C-terminale Region dient als Interaktionseinheit und ermöglicht das Binden einer N-terminalen Region eines weiteren Monomers zu einer langen Polymerkette.^[138]

α -Elastin ist das lösliche Produkt, das durch Oxalsäurehydrolyse aus den Elastinfasern gewonnen wird. Die Koazervationseigenschaften von α -Elastin ähneln denen von Tropoelastin.^[139,140] Wie bei Tropoelastin hat auch das α -Elastin eine alternierende hydrophobe und hydrophile Domänenstruktur. Die hydrophoben Bereiche weisen unpolare Aminosäurereste mit dem sich wiederholenden Motiv VGVAPG auf.^[54,141–144] Insgesamt machen die hydrophoben Reste ~80 % der Primärsequenz aus. Die Konformationen von α -Elastin in Wasser sind weitgehend ungeordnet. Ein wesentlicher Unterschied zu dem Tropoelastin sind die am α -Elastin zurückgebliebenen Fragmente der Quervernetzung, die durch die Hydrolyse der Elastinfasern entstanden sind.

In voran gegangenen Studien untersuchten Çınar et al. die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung vom intrinsisch ungeordneten Protein (IDP) α -Elastin.^[54] Diese zeigten, dass α -Elastin unterhalb der Raumtemperatur bei Umgebungsdruck als eine homogene wässrige Lösung vorliegt, die sich jedoch beim Erwärmen trübt, d.h. eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST) aufweist. Des Weiteren wurde in der Studie im mittleren Temperaturbereich (~30 °C) ein druckinduzierter reentranter Phasenübergang nachgewiesen. Da die LLPS von α -Elastin durch eine LCST charakterisiert ist, wurde für das α -Elastin bei höheren Temperaturen für alle gemessenen Drücke eine phasengetrennte Lösung beobachtet.^[54] Um festzustellen, ob Änderungen der Sekundärstruktur für die LLPS in α -Elastin verantwortlich sind, wurden in der Studie zusätzlich FT-IR-Spektroskopie-Messungen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass mit zunehmender Temperatur nur eine leichte Abnahme der ungeordneten Strukturen und eine damit einhergehende Zunahme der Loop/Turn-Struktur stattfand. Es wurde auch gezeigt, dass sich die Struktur des konformationellen Ensembles von α -Elastin selbst bis zu Drücken von 10 kbar nicht signifikant verändert.^[54]

3.3.1 Temperatur- und druckabhängige Turbiditätsmessungen

Auf Grundlage der vorangegangenen Studien von α -Elastin wurde weiterführend das temperaturabhängige Phasenverhalten von α -Elastin in Gegenwart von TMAO untersucht. Zur Bestimmung der TMAO-abhängigen Trübungspunkttemperaturen wurden temperaturabhängige Absorptionsspektren einer 20 mg mL^{-1} α -Elastin-Lösung in einem Wellenlängenbereich von 250 – 500 nm bei ausgewählten TMAO-Konzentrationen (0 – 200 mM) aufgenommen (Abbildung 9.4). Die Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von 20 – 95 °C bei 1 bar. Anschließend wurden die Absorptionsintensitäten, die sich aus den Absorptionsspektren bei 400 nm ergeben, als Funktion der Temperatur aufgetragen und sind in Abbildung 3.12 gezeigt.

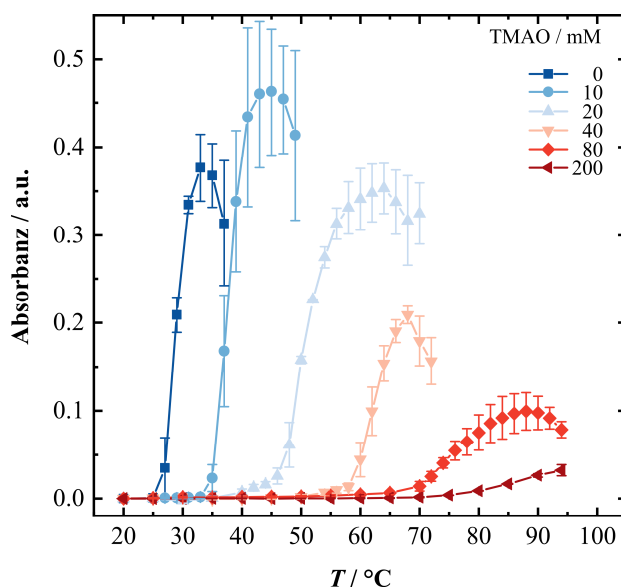


Abbildung 3.12: Temperatur- und Osmolyt-abhängige LLPS von α -Elastin. Dargestellt ist die UV/Vis-Absorption bei 400 nm von 10 mM α -Elastin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) als Funktion der Temperatur bei verschiedenen TMAO-Konzentrationen (0-200 mM). Das Einsetzen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung ist mit einer drastischen Trübung der Lösung durch Tröpfchenbildung proteinreicher Phasen verbunden, was zu einem steilen Anstieg der Absorption (Trübung) führt. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Die während der Messungen beobachteten hohen Absorptionsintensitäten sind auf die zunehmende Trübung (Lichtstreuung) und die damit verbundene Tröpfchenbildung (Koazervation) in der Probenlösung zurückzuführen. Dem entsprechend spiegeln Absorptionsintensitäten von $A \approx 0$ eine klare, homogene Phase in der Probenlösung wider. Eine reine Lösung von 20 mg mL^{-1} α -Elastin weist einen klar definierten temperaturinduzierten Trübungspunkt bei $\approx 25 \text{ °C}$ auf, der den Beginn der Koazervation signalisiert. Nach dem Überschreiten der

Trübungspunkttemperatur ist ein abrupter Absorptionsintensitätsanstieg zu beobachten, der bei weiterer Temperaturerhöhung (~ 30 °C) zu sinken beginnt. Wie in den vorherigen Beobachtungen bei γ D-Kristallin würde die sinkende Absorptionsintensität eine Abnahme der Tröpfchenzahl suggerieren. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass auch hier die Koaleszenz der phasenseparierten Tröpfchen die Ursache für die abnehmende Absorptionsintensität ist.

Wie aus den Daten ersichtlich wird, haben bereits sehr geringe Konzentrationen von TMAO einen signifikanten Einfluss auf das LLPS-Verhalten von Elastin. So wird der Trübungspunkt einer 20 mg mL^{-1} α -Elastin-Lösung durch die Zugabe von 10 mM TMAO um 7 °C erhöht. Eine weitere Erhöhung der TMAO-Konzentration auf 40 mM bewirkt eine Verschiebung der Trübungspunkttemperatur auf ~ 50 °C. Bei einer 200 mM TMAO-Lösung wurde eine Trübung der Lösung erst oberhalb einer Temperatur von ~ 70 °C beobachtet. Interessanterweise führt die Zugabe von TMAO, neben der Trübungspunkterhöhung, auch zu einem früheren Übergang von der Intensitätszunahme zur Intensitätsabnahme. Mit zunehmender TMAO-Konzentration weisen die Kurvenverläufe der Absorptionsintensitäten geringere Maxima auf. Vermutlich tritt die Koaleszenz der phasenseparierten Tröpfchen in Gegenwart von TMAO schneller ein.

Die druckabhängigen Turbiditätsmessungen wurden bei 400 nm in einem Druckbereich von $1 - 2000 \text{ bar}$ und einem Temperaturbereich von $26 - 35$ °C durchgeführt. Abbildung 3.13 zeigt den Vergleich der druckabhängigen Änderung der Absorptionsintensität, in einem Temperaturbereich von $26 - 35$ °C, einer reinen 20 mg mL^{-1} α -Elastin-Lösung und einer α -Elastin-Lösung in Anwesenheit von 10 mM TMAO. Die druck- und temperaturabhängigen Turbiditätsmessungen der reinen α -Elastin-Lösung wurden basierend auf den Daten von Çınar et al.^[54] reproduziert. Bei etwa 26 °C und Umgebungsdruck, Bedingungen bei denen für die reine α -Elastin-Lösung eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beobachtet wird, reicht bereits ein Druck von $\approx 200 \text{ bar}$ aus, um eine homogene Phase zu induzieren. Eine weitere Kompression der Probe bis auf 1800 bar führt zu einem Wiedereintritt in eine phasenseparierte Lösung (Abbildung 3.13a). Weiterführende Messungen bei höheren Temperaturen haben gezeigt, dass sich mit zunehmender Temperatur der Abstand zwischen den jeweiligen Übergangsdrücken verkleinert. So wird bei einer Temperatur von 30 °C der Übergang vom ersten phasenseparierten Zustand in eine homogene Lösung bei einem Druck von etwa 500 bar beobachtet, während eine erneute Phasentrennung schon ab 1500 bar stattfindet. Da die LLPS von α -Elastin durch eine LCST charakterisiert ist, bleibt die α -Elastin-Lösung bei höheren Temperaturen für alle gemessenen Drücke phasenetrennt. Dennoch weist die Tur-

biditätsmessung auch bei diesen erhöhten Temperaturen weiterhin ein Minimum im mittleren Druckbereich auf (Abbildung 3.13a).

Auch in Anwesenheit von 10 mM TMAO wird bei der α -Elastin-Lösung bis 32 °C ein druckinduziertes reentrantes Phasenverhalten beobachtet, wobei die Phasenübergangstemperaturen und -drücke gegenüber α -Elastin ohne TMAO leicht verschoben sind (Abbildung 3.13b). So ist bei einer Temperatur von 30 °C der Phasenübergang in die homogene Phase erst ab einem Druck von ungefähr 800 bar vollständig abgeschlossen, während eine erneute Phasentrennung oberhalb von 1500 bar induziert wird.

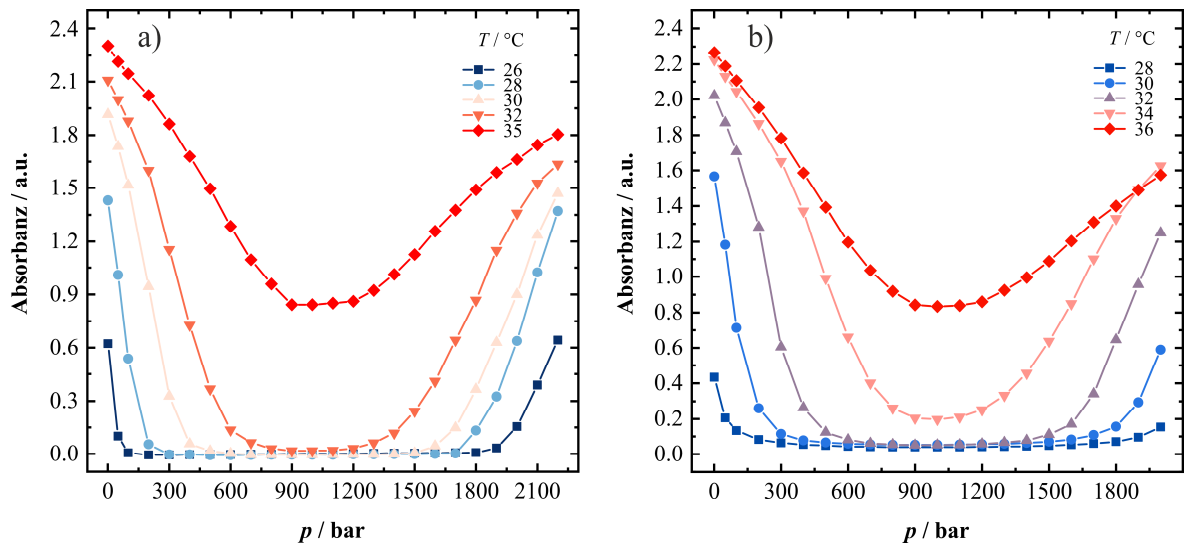


Abbildung 3.13: Druckinduzierter Wiedereintritt in den phasenseparierten Zustand einer α -Elastin-Lösung. Dargestellt sind UV/Vis-Absorptionsspektren (400 nm) (a) einer reinen 20 mg mL⁻¹ α -Elastin-Lösung und (b) einer α -Elastin-Lösung mit 10 mM TMAO in Abhängigkeit des Drucks (bis ~2 kbar) bei ausgewählten Temperaturen. Die in der Abbildung a) dargestellten Daten wurden, basierend auf den Daten von Çınar et al.^[54], reproduziert. Die Abbildungen wurden gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

3.3.2 Temperatur- und druckabhängige Lichtmikroskopie

Um das temperaturabhängige Phasenverhalten des Elastin-Systems direkt zu visualisieren, wurden, begleitend zu den Turbiditätsmessungen, lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden bei ausgewählten Temperaturen und in einem Druckbereich von 1 bis 1600 bar aufgenommen. In Abbildung 3.14 ist das temperatur- und druckabhängige Phasenverhalten einer reinen 20 mg mL⁻¹ α -Elastin-Lösung gezeigt. In guter Übereinstimmung mit den Turbiditätsmessungen ist bei 30 °C ein reentrantes Phasenverhalten von α -Elastin zu beobachten. Nach dem Erhitzen einer homogenen α -Elastin-Lösung

auf 30 °C ist eine Phasentrennung mit kondensierten Phasentröpfchen zu beobachten, die sich bei einem Druck von 800 bar vollständig auflösen und sich, bei weiterer Kompression der Lösung auf 1600 bar, wieder bilden. Bei Temperaturen über 32 °C können über den gesamten Druckbereich Phasentröpfchen beobachtet werden.

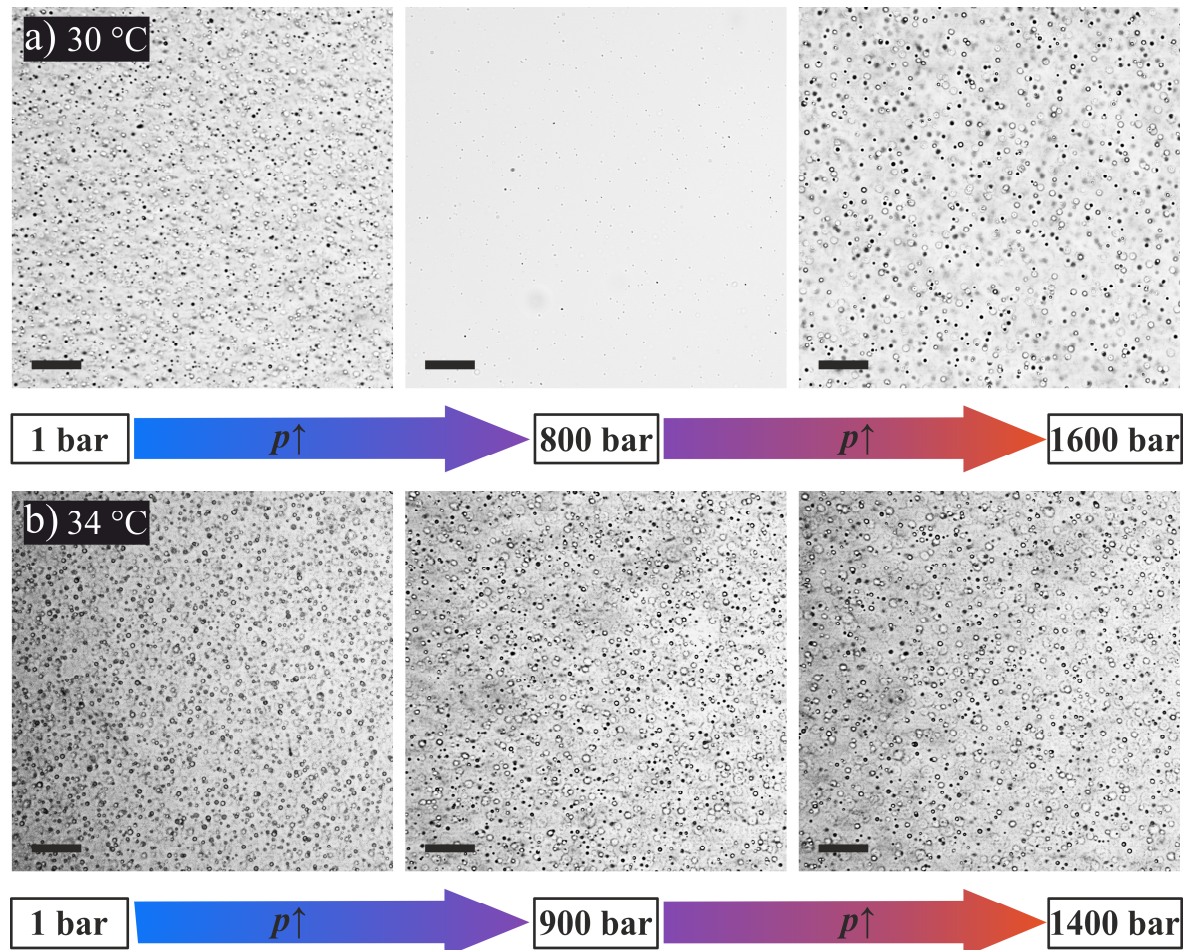


Abbildung 3.14: Temperatur- und druckabhängige LLPS einer reinen 20 mg mL⁻¹ α -Elastin-Lösung. Gezeigt werden hier lichtmikroskopische Aufnahmen von α -Elastin bei a) 30 °C und b) bei 34 °C. Die Messungen erfolgten in einem Druckbereich von 1 – 1800 bar. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der α -Elastin -Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Unabhängig von der Temperatur und dem herrschenden Druck beträgt der Durchmesser der Tröpfchen sowohl im ersten als auch im zweiten phasenseparierten Zustand ungefähr 5 μm . In Anwesenheit von 10 mM TMAO ist eine leichte Verschiebung der Phasengrenzen zu beobachten. Der Abstand der Übergangsdruöcke nimmt, wie schon zuvor in den Turbiditätsmessungen gezeigt, ab (Abbildung 3.15). Auch in Gegenwart von TMAO liegt die α -Elastin-Lösung bei höheren Temperaturen aufgrund seiner unteren kritischen Lösungstemperatur über den gesamten gemessenen Druckbereich phasenetrennt vor (Abbildung 9.6).

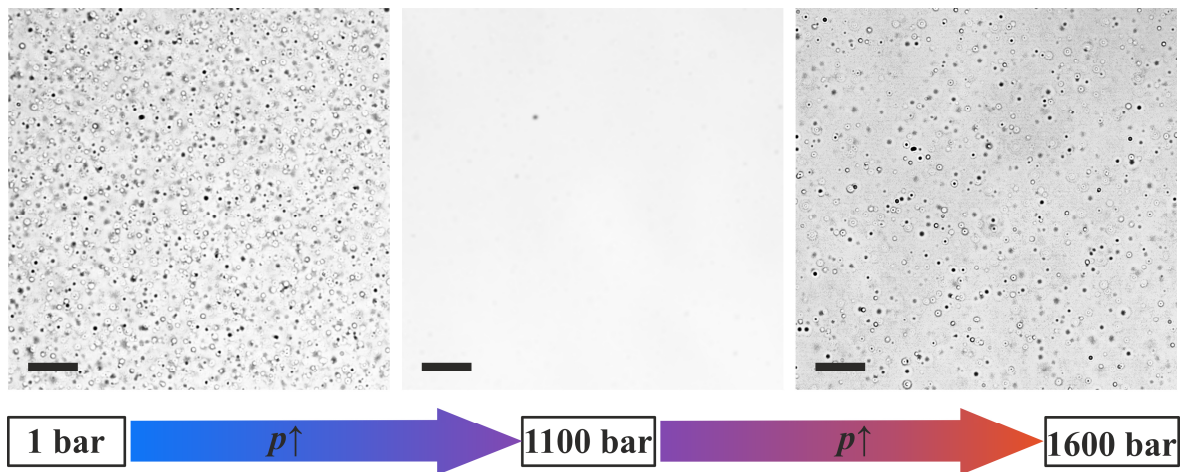


Abbildung 3.15: Druckabhängige LLPS von 20 mg mL^{-1} α -Elastin in einer 10 mM TMAO-Lösung. Gezeigt werden hier lichtmikroskopische Aufnahmen von α -Elastin bei $32 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Messungen erfolgten in einem Druckbereich von $1 - 1600 \text{ bar}$. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der α -Elastin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

In der folgenden Abbildung 3.16 ist ein vorläufiges T - p -Phasendiagramm von einer reinen α -Elastin-Lösung und einer Lösung zuzüglich 10 mM TMAO gezeigt, das durch Turbiditätsmessungen ermittelt und durch Mikroskopieaufnahmen bei ausgewählten Temperatur-Druck-Punkten reproduziert wurde. Aus den Daten geht deutlich hervor, dass die Zugabe des Osmolyts TMAO zu einer Verkleinerung des Einphasenbereichs in der Temperatur-Druck-Ebene bei mittlerer bis hoher Temperatur führt. Auch der verringerte Abstand zwischen den Übergangsdrukken der jeweiligen Phasen ist im Phasendiagramm gut erkennbar.

Eine plausible Erklärung für das hier beobachtete temperatur- und druckabhängige Phasenverhalten des intrinsisch ungeordneten Proteins (IPD) α -Elastin wurde von Çınar et al. vorgeschlagen.^[54] Das physikalische Modell basiert auf der Annahme, dass bei atmosphärischem Druck der phasenseparierte kondensierte Zustand des α -Elastins weitgehend durch günstige hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Aminosäureresten stabilisiert wird. So geht aus NMR- und molekulardynamischen *all-atom* Simulationsdaten hervor, dass die Stabilisierung der kondensierten Phase zumindest teilweise durch transiente (d.h. zeitlich begrenzte) unpolare Seitenkettenkontakte erfolgt, wobei die Seitenketten selbst auch in der kondensierten Phase signifikant hydratisiert sind. Des Weiteren geht aus den Daten hervor, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung die Bildung von hydrophoben Domänen beinhaltet, die sich aus der Bildung von zeitlich begrenzten β -Schleifen in den hochdynamischen und ungeordneten Ketten ergeben.^[145,146]

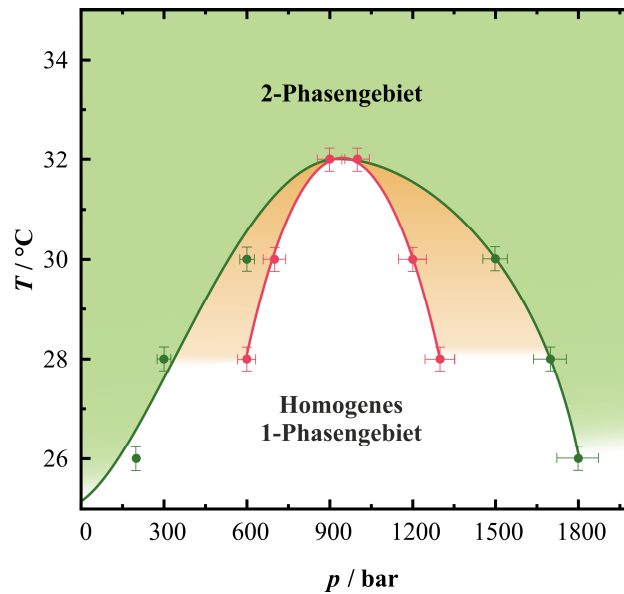


Abbildung 3.16: Gezeigt ist hier das Zusammenspiel von Temperatur, Druck und Osmolyteffekte auf die LLPS von α -Elastin. Das T - p -Phasendiagramm von α -Elastin ohne TMAO ist grün und das entsprechende Phasendiagramm mit 10 mM TMAO rot. Das Flüssig-Flüssig-phasengetrennte Gebiet ist, entsprechend der jeweiligen Proben, farbige gekennzeichnet, während das homogene 1-Phasengebiet durch weiße Flächen gekennzeichnet ist. Die Datenpunkte für die Trübungspunktbestimmung wurden aus den Turbiditätsmessungen entnommen (die Fehlerbalken ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Messungen). Die gemessenen LLPS-Daten für die reine α -Elastin-Lösung stammen von Çınar et al.^[54] Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Daher kann die Annahme getroffen werden, dass bei geringen Drücken die dynamischen Kettenkonfigurationen im kondensierten flüssigen Zustand große Mengen an wasserfreien Hohlraumvolumina beinhalten. Unter dieser Voraussetzung würde eine Druckerhöhung die Destabilisierung der kondensierten Phase bewirken, da ein Übergang in die homogene, verdünnte Phase ein vergleichsweise geringeres Gesamtvolumen bewirken würde. Da bei weiterer Druckerhöhung für α -Elastin sich eine zweite kondensierte Flüssigphase bei Temperaturen unterhalb von ~ 32 °C bildet (Abbildung 3.16), wurde weiterführend von Çınar et al. die Hypothese aufgestellt, dass dies eine Folge besonderer Solvatationseffekte sein könnte.^[54] Diese seien ähnlich zu den Solvatationseffekten, die bei Simulationen paarweiser unpolare Wechselwirkungen beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass durch Wasser vermittelte unpolare Seitenkettenkontakte zu einem geringeren Gesamtvolumen führen können, als wenn das Seitenkettenpaar oder die unpolare gelösten Stoffe einzeln dem Lösungsmittel exponiert sind.^[40,147]

Bei höheren Temperaturen wird jedoch keine homogene Phase beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die temperaturbedingte, zunehmende Stärke der hydrophoben Kontakte die homogene Phase im Verhältnis zu den kondensierten Phasen bei niedrigen und

hohen Drücken destabilisiert, so dass bei mittlerem Druck und höheren Temperaturen keine ausgeprägte homogene Phase zu beobachten ist.^[54]

Ein weiteres intrinsisch ungeordnetes Polypeptid, das sowohl in vitro als auch in Zellen eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung aufweist, ist der N-terminale Rest der DEAD-Box-Helikase^[148], Ddx4.^[149] Ddx4 agiert in der Zelle als RNA-Helikase und ist ein wichtiger Bestandteil der Keimgranula.^[18] Die hochkonservierte DEADbox-Domäne besitzt eine ATP getriebene Helikase-Aktivität, die für das Entwirren der dsRNA verantwortlich ist.^[131,148] An diese Domäne gliedern sich die intrinsisch ungeordneten N- und C-Termini an. Die Wildtyp-Aminosäuresequenz 1 – 236 der N-terminalen ungeordneten Region von Ddx4^{N1} enthält alternierende geladene Blöcke, die jeweils mit negativ und positiv geladenen Aminosäureresten angereichert sind.^[18,150] Aufgrund des Musters der geladenen Blöcke ist es dem Ddx4 IDR möglich, eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur auszubilden. Ein Verlust dieses Blockmusters führt zu einer als Ddx4^{N1} CS bekannten Mutante, welche aufgrund der gestörten Ladungsänderung eine verringerte Neigung zur Phasentrennung besitzt.^[18,150] Daraus ergibt sich, dass das sequenzspezifische Ladungsmuster und nicht die Summe der positiven und negativen Ladungen pro Sequenz wichtig für das Phasenverhalten von Ddx4^{N1} ist.^[18,150] Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen sind für das Phasenverhalten von Ddx4^{N1} auch Aminosäurereste wichtig, die in der Lage sind, π - π -Wechselwirkungen zu bilden. Mutationen wie das Ersetzen von Arginin durch Lysin oder das Entfernen von aromatischen Ringen bewirken eine verringerte Neigung zur Phasenseparation.^[18,150,151] In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass die Koazervation von Ddx4 IDR durch Herabsenken der Temperatur bzw. der Salzkonzentration induziert wird^[18,150], wobei eine Veränderung der Sekundärstruktur nicht beobachtet wurde.^[150] Druck- und TMAO-abhängige Studien^{**} haben gezeigt, dass auch im Fall von Ddx4 IDR die Zugabe des Osmolyten TMAO zu einer signifikanten Verschiebung des Trübungspunktdrucks hin zu höheren Drücken führt.^[53] Im Gegensatz zu α -Elastin wurde für die Ddx4 IDR in dieser Studie kein reentranter Phasenübergang in dem vermessenen Druckbereich bis 300 bar beobachtet.^[53]

^{**} Die Untersuchungen am IDR Ddx4 wurden von Zamira Fetahaj durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[53] publiziert.

3.4 Erklärung der *T*-, *p*-, und TMAO-abhängigen Protein-LLPS hinsichtlich der lösungsmittelvermittelten Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen^{††}

Angesichts der Bedeutung biomolekularer Kondensate in der Biologie, Biomedizin und Biotechnologie ist ein umfassendes physikalisches Verständnis des biomolekularen LLPS-Phänomens wichtig für grundlegende wissenschaftliche Fortschritte. Das gewonnene Wissen würde auch technologische Anwendungen, wie die Entwicklung neuartiger Therapeutika und die Herstellung neuer polymerer Materialien, auf der Grundlage des Designs proteinähnlicher Sequenzen mit gewünschten LLPS-Eigenschaften ermöglichen. Die theoretische Untersuchung biomolekularer LLPS steckt noch in den Kinderschuhen und birgt zahlreiche Herausforderungen, aber auch Chancen. Idealerweise würde man LLPS-Systeme anhand von Theorien und Modellen untersuchen wollen, die genaue strukturelle und energetische Details enthalten. Derzeit ist ein solcher Ansatz jedoch noch limitiert. Simulationen biomolekularer LLPS mit einem expliziten Wassermolekülmodell, wie sie für γ II-Kristallin^[152] und Elastin-ähnliche Polypeptide^[146] durchgeführt wurden, sind sehr rechenintensiv, da eine aussagekräftige Modellierung der LLPS – die eine Eigenschaft vieler Moleküle ist – eine beträchtliche Anzahl von Proteinmolekülen berücksichtigt muss. Darüber hinaus ist bekannt, dass gängige atomare Kraftfelder für IDPs und ungefaltete Zustände globulärer Proteine ungenau sind, da sie dazu neigen, Konformationen vorherzusagen, die stark kraftfeldabhängig sind^[153] und oft viel kompakter sind als die experimentellen Beobachtungen.^[154] Mit dem Einsatz der modifizierten Kraftfelder a03ws,^[155] CHARMM36m,^[156] und a992B-disp^[157] wurde versucht, die Leistung der Kraftfelder für IDP-Anwendungen zu verbessern. Keine der bisher vorgeschlagenen modifizierten Kraftfelder eignet sich jedoch für globuläre Proteine oder für IDPs, wodurch die Frage aufgeworfen wird, ob die mathematischen Ausdrücke der paarweisen Wechselwirkungen in den derzeitigen Kraftfeldern limitiert sind und beispielsweise Mehrkörpereffekte einbezogen werden müssen, um diese biomolekularen Systeme genauer zu erfassen.^[158–160] Allerdings wurden in diesem Zusammenhang bereits Fortschritte erzielt hinsichtlich der Frage, wie die LLPS von IDPs von ihren Aminosäuresequenzen abhängen, indem *coarse-grained* Ansätze verwendet wurden. Dazu gehören die analytische Theorie^[44,47,161–163], Gitter^[164] und Kontinuum-basierte^[165–167] explizite Ketten-

^{††} Die hier beschriebenen physikalischen Überlegungen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Hue Sun Chan. Die Daten wurden in der Referenz^[53] publiziert.

modelle,^[168] und feldtheoretische Simulationen. Diese Studien zeigen, dass die LLPS nicht nur auf die elektrische Nettoladung einer IDP, sondern auch auf das Ladungsverteilungsmuster entlang ihrer Aminosäuresequenz empfindlich reagiert.^[169–171] *Mean-field* und *coarse-grained* Ansätze haben ebenfalls wichtige Erkenntnisse über die LLPS von globulären Proteinen, IDPs und IDRs sowie über die Rolle der Kationen- π -Interaktionen^[161,172] und RNA geliefert.

Von allen Arten der lösungsmittelvermittelten Wechselwirkungen, die zur biomolekularen LLPS beitragen können, sind hydrophobe Wechselwirkungen bezüglich der Temperatur und Druckabhängigkeit wahrscheinlich am besten charakterisiert. Obwohl das Wissen selbst in diesem Fall noch rudimentär ist, können aus experimentellen Daten^[132,173,174] und expliziten Wassersimulationen über einfache hydrophobe Wechselwirkungen^[40,41,147,175,176] nützliche Einblicke in T - und p -abhängige LLPS-Phänomene gewonnen werden.^[54] Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs die Stärke günstiger hydrophober Wechselwirkungen mit steigender Temperatur zunimmt.^[132,173,174] Jüngste bioinformatische Analysen wiesen einen ähnlichen Trend auf.^[177] Solch eine Temperaturabhängigkeit deutet darauf hin, dass die hydrophobe Triebkraft, durch die kompakte einkettige Proteinkonformationen begünstigt werden, bei niedrigeren Temperaturen verringert wird. Somit bietet sie eine physikalische Erklärung für die Kältedenaturierung von Proteinen, wie sie seit den späten 1980er Jahren mit Hilfe der analytischen *mean-field*-Theorie^[133] und der Gittermodelle untersucht wurde.^[134,135,178] Der gleiche temperaturabhängige Trend der hydrophoben Wechselwirkungen kann bei einem mehrkettigen Proteinsystem, das zunächst in einer homogenen Lösungsphase vorliegt, zu einer LLPS bei ausreichend hohen Temperaturen und somit zu einer LCST führen. Dies wurde erst kürzlich für IDP-ähnliche Sequenzen beschrieben.^[44,92,179,180]

Zur Erörterung der durch die Hydrophobizität getriebenen T - und p -abhängigen LLPS wurden die relevantesten Ergebnisse expliziter Wassersimulationen paarweiser hydrophober Wechselwirkungen^[181–183] in Abbildung 3.17 zusammengefasst, wobei gelöste Methanmoleküle als einfaches Modell für die hydrophoben Gruppen in den Proteinen dienen. Das Potential der mittleren Kraft (*potential of mean force*, PMF) eines in Wasser gelösten Stoffpaares ist die effektive, durch das Lösungsmittel vermittelte freie Wechselwirkungsenergie zwischen den gelösten Stoffen in Abhängigkeit ihres räumlichen Abstands. Typischerweise weisen PMFs für ein Paar hydrophober gelöster Stoffe ein Kontaktminimum (*contact minimum*, cm) auf, an dem die anziehende Wechselwirkung am günstigsten ist, außerdem eine

Desolvatationsbarriere (*desolvation barrier*, db), an der die Wechselwirkung am ungünstigsten (abstoßend) ist und ein lösungsmittelgetrenntes Minimum (*solvent-separated minimum*, ssm), welches ebenfalls günstig ist (ist üblicherweise jedoch geringer als das Kontaktminimum).

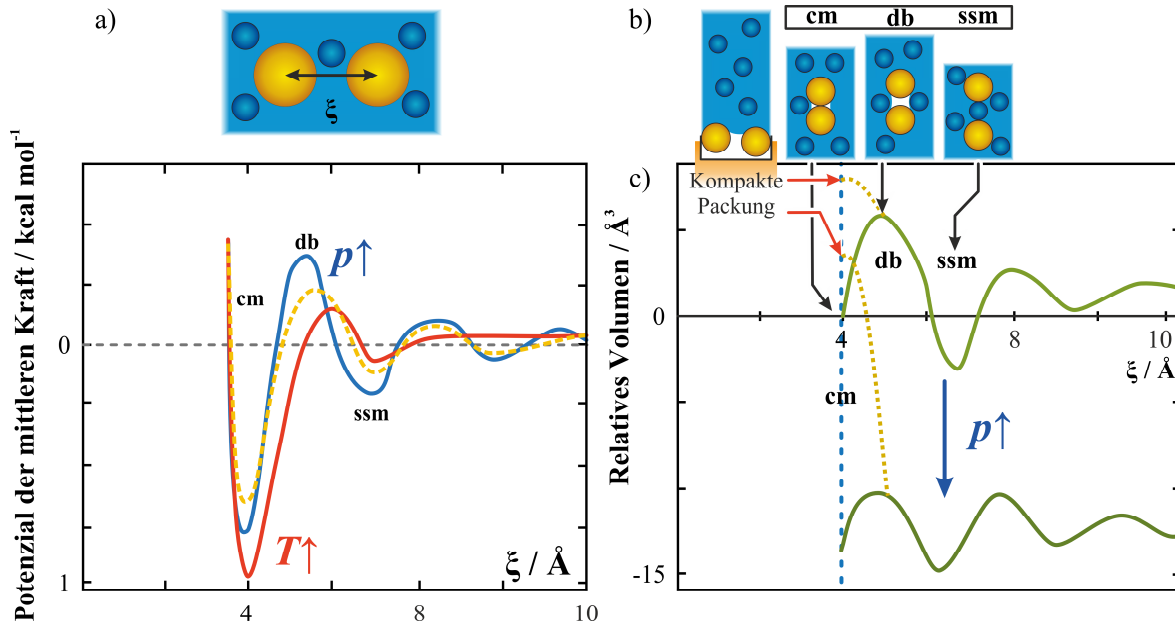


Abbildung 3.17: Temperatur- und Druckabhängigkeit paarweiser hydrophober Wechselwirkungen. Die simulierten Eigenschaften der wasservermittelten Wechselwirkung zwischen einem Methan-Paar (Solvent), die durch einen variablen Abstand ξ getrennt sind, wurden durch Mittelung über die Freiheitsgrade von Wasser (Lösungsmittel), unter Verwendung des expliziten TIP4P-Modells von Wasser in NPT -Ensembles, bei einem gegebenen Druck erhalten.^[40,175] "cm", "db" und "ssm" beziehen sich jeweils auf ein Methanpaar bei ξ -Werten für das Kontaktminimum, die Desolvatationsbarriere und das lösungsmittelgetrennte Minimum ihres mittleren Kraftpotenzials (PMF). Die Ergebnisse bei erhöhter Temperatur bzw. erhöhtem Druck gegenüber den Umgebungswerten werden durch die Buchstaben "T" und "p" mit einem nach oben gerichteten Pfeil angezeigt. In den schematischen Darstellungen (a) und (b) sind die Methan- und Wassermoleküle als orangefarbene bzw. dunkelblaue Kugeln dargestellt. Die hellblauen Bereiche stellen den Raum im System dar, der für die Wassermoleküle zugänglich ist, während die Hohlräumvolumina, die für die Wassermoleküle sterisch unzugänglich sind, weiß dargestellt sind. Zwei-Methan-PMFs bei $T = 298.15$ K, $p = 1$ atm = 1.013 bar (gestrichelte gelbe Kurve); $T = 313$ K, $p = 1$ atm (rote Kurve); und $T = 298.15$ K, $p = 3000$ atm = 3.040 kbar (blaue Kurve). Die Veränderung des Gesamtvolumens des Methan-Paares zuzüglich des Wassersystems bei unterschiedlichem Methan-Methan-Abstand ξ wird durch die unterschiedlichen Kastengrößen der schematischen Zeichnungen hervorgehoben. c) Simuliertes ξ -abhängiges Partialvolumen eines Methan-Paares in Wasser bei $T = 298.15$ K und $p = 1$ atm (obere hellgrüne durchgezogene Kurve) und $p = 3000$ atm (untere dunkelgrüne durchgezogene Kurve). Die aufgetragenen Volumina (vertikale Skala) sind relativ zu einer Basislinie, die dem Teilvolumen zweier unendlich getrennter, nicht wechselwirkender Methanmoleküle bei $p = 1$ atm entspricht (horizontale Achse). Die gestrichelten gelben Kurven zeigen mögliche Zunahmen des Partial-volumens von zwei Methanmolekülen, wenn sie Teil eines größeren kompakten Aggregats mit zunehmendem Hohlraumvolumen sind. Der Rest des Aggregats wird schematisch durch die orangefarbene Schattierung ganz unten, in der linken Zeichnung (b), dargestellt. Teile dieser Abbildung wurden von Shimizu und

Chan^[175], Dias und Chan^[40] und Çınar et al.^[53] übernommen und modifiziert, wobei rechnerisch ermittelte Details angegeben sind.

Abbildung 3.17a zeigt, dass das Kontaktminimum herabgesetzt wird, daher günstiger wird, wenn T die Raumtemperatur übersteigt.^[175] Dieser Trend stimmt mit den Beobachtungen einer Kältedenaturierung oder einer LCST für bestimmte Proteine überein, die maßgeblich an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sind. Wenn der Druck über den Umgebungsdruck hinaus erhöht wird, werden sowohl das Kontaktminimum als auch das lösungsmittelgetrennte Minimum herabgesetzt, während sich die Desolvatationsbarriere erhöht. Die druckbedingte Erhöhung der Desolvatationsbarriere ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass das partielle Molvolumen des gelösten Stoffpaares und damit das Gesamtvolumen des Systems größer ist, wenn sich die gelösten Stoffe in der Konfiguration der Desolvatationsbarriere befinden, da ein für Wasser sterisch unzugänglicher Hohlraum entsteht (Abbildung 3.17b). Dies hat zur Folge, dass Konfigurationen mit größeren Systemvolumina bei höheren Drücken eher ungünstig sind. Daraus geht hervor, dass das Gesamtsystemvolumen erwartungsgemäß mit zunehmendem Druck von 1 – 3000 atm abnimmt, wobei die Konfigurationen der Desolvatationsbarriere stets eines der größten Partialvolumina bei gegebenem Druck aufweisen. Dieses physikalische Modell, das im Wesentlichen auf einer geometrischen Vorgabe beruht, erweist sich als zuverlässig, da ähnliche Volumenbarrieren auch in den simulierten PMFs größerer Proteinfragmente auftreten.^[184–186] Dieses simulierte Szenario bietet somit eine physikalische Grundlage für die experimentelle Beobachtung positiver Aktivierungsvolumina bei der Proteinfaltung, die sich in einer langsameren Faltungskinetik unter hohem Druck äußert.^[40] Außerdem wird aus der Abbildung 3.17c ersichtlich, dass das Partialvolumen der beiden hydrophoben Solute am geringsten ist, wenn sie sich in der Konfiguration des lösungsmittelgetrennten Minimums befinden, wenn also ein Wassermolekül eng zwischen beide Moleküle zu liegen kommt. Daraus lässt sich schließen, dass diese Konfiguration unter hohem hydrostatischem Druck begünstigt werden kann.

Aus konzeptioneller Sicht ist es jedoch wichtig zu erkennen, dass druckabhängige paarweise PMFs als solche nicht ausreichen, um ein adäquates physikalisches Verständnis bezüglich der Druckeffekte auf kompakte Proteinkonfigurationen zu erhalten. PMFs berücksichtigen nur Hydratationseffekte, wenn das gelöste Paar als Ganzes in hohem Maße dem Wasser exponiert ist. Kompakte Proteinkonfigurationen, wie gefaltete Zustände globulärer Proteine oder kondensierte Proteintröpfchen, können jedoch aufgrund fehlerhafter Packung ein beträchtliches Hohlraumvolumen aufweisen. Solche Hohlraumvolumina können sogar deutlich größer sein als diejenigen, die bei der Konfiguration der Desolvatationsbarriere auftreten

(Abbildung 3.17b, linke Zeichnung und die gelb gestrichelten Kurven in Abbildung 3.17c).^[40] Daraus folgt, dass eine Darstellung der druckinduzierten Proteinfaltung, die ausschließlich auf druckabhängige paarweise PMFs^[147] basiert, unvollständig ist, da die Hohlraumvolumina in kompakten Proteinzuständen nicht berücksichtigt wird. Wie bereits gezeigt wurde,^[187] hängt es von dem für die PMF-Simulation verwendeten Kraftfeld ab, ob das lösungsmittelgetrennte Minimum bei hohem Druck stabiler ist als das Kontaktminimum. Dies gilt bei einem 2D-Toy-Modell für Kälte- und Druckdenaturierung^[188,189], nicht aber für die PMFs, die mit Hilfe des TIP4P-Wassermodells simuliert wurden (Abbildung 3.17a). Ein Ansatz der besagt, dass das lösungsmittelgetrennte Minimum bei hohen Drücken immer stabiler ist als das Kontaktminimum, steht außerdem im Widerspruch zu den experimentellen Beobachtungen, wonach Proteinhelices durch hohe Drücke stabilisiert oder zumindest nicht destabilisiert werden.^[190,191] Unter Berücksichtigung aller Überlegungen wird deutlich, dass der Einfluss des Drucks auf die Proteinkonfiguration am besten als eine Kombination aus Hydratations- und Hohlraumvolumeneffekten zu verstehen ist. In der Tat konnten quantitative Modelle, die auf dem letztgenannten konzeptionellen Ansatz beruhen, erfolgreich das druckabhängige Verhalten kurzer helikaler Peptide^[192] und der partiellen Molvolumina globulärer Proteine beschreiben.^[193]

Entsprechend wurde diese Sichtweise genutzt, um die druckinduzierte reentrante LLPS von α -Elastin zu beschreiben.^[54] Das beobachtete LCST-Verhalten von Elastin und Elastin-ähnlichen Peptiden^[194] stimmt mit der allgemeinen Auffassung überein, dass die LLPS von Elastin weitgehend von hydrophoben Effekten angetrieben wird.^[146] Es wird davon ausgegangen, dass bei ausreichend hoher Temperatur und bei (niedrigem) Umgebungsdruck die kondensierte Elastin-Phase durch dynamische hydrophobe Kontakte stabilisiert wird, die dem Kontaktminimum und dem lösungsmittelgetrennten Minimum des Zwei-Methan-PMF entsprechen. Aus geometrischer Sicht enthalten solche locker gepackten dynamischen Kettenkonfigurationen wahrscheinlich viele transiente Hohlräume. Wird der Druck erhöht, werden diese kondensierten Konfigurationen instabil, da der homogene Zustand nicht nur eine größere Konfigurationsfreiheit (Entropie), sondern auch ein geringeres Hohlraumvolumen aufweist, da wesentlich weniger hydrophobe Kontakte vorhanden sind. Dies führt bei mittleren Drücken zur Ausbildung einer homogenen Phase. Wird der Druck weiter erhöht, werden lösungsmittelgetrennte (*solvent-separated*) Konfigurationen aufgrund ihrer geringeren partiellen Molvolumina stabiler. Daher kann das System einem durch Druck begünstigtes geringeres Volumen erreichen, indem es eine kondensierte Phase bildet, die durch lösungsmittelgetrennte hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Teilchen stabilisiert wird. In

dem hier vorliegenden Beispiel unterscheidet sich wahrscheinlich die kondensierte Hochdruckphase in geringem Maße von der kondensierten Niederdruckphase. Da es keine starken Volumenbeschränkungen gibt, bietet die kondensierte Niederdruckphase wahrscheinlich ein höheres Maß an Flexibilität bei der Konfiguration ihrer hydrophoben Wechselwirkungen und besitzt damit eine größere Konfigurationsentropie.^[54] Diese Hypothese muss jedoch noch experimentell überprüft werden.

Im Vergleich zur Hydrophobizität wurde die (T,p) -Abhängigkeit anderer potenziell LLPS-induzierenden Wechselwirkungen weniger erforscht. Abbildung 3.18 zeigt repräsentative PMFs für solche Wechselwirkungen, die aus der Literatur entnommen wurden. Die Berechnungen hierfür erfolgten lediglich für Umgebungsbedingungen.^[195–197] Abbildung 3.18a zeigt ein Kationen- π -Potenzial. Abgesehen von Wasserstoffbrückenbindungen sind auch Kationen- π - und π - π -Wechselwirkungen für die biomolekulare Struktur und LLPS von Bedeutung.^[151,198,199] Insbesondere die Kationen- π -Wechselwirkungen sind wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die LLPS von Ddx4^[18,150,161], FUS^[172] und anderen IDP-Systemen.^[200,201] Aus Abbildung 3.18a geht hervor, dass Kationen- π -Wechselwirkungen in wässrigem Milieu wesentlich stärker sein können als ionische Salzbrückenwechselwirkungen. (PMF ≈ -6 bzw. -2 kcal mol⁻¹). Andere Berechnungen ähnlicher Kationen- π -Wechselwirkungen für Proteine ergaben etwas schwächere jedoch auch starke Wechselwirkungen.^[202] Quantenchemische Berechnungen von π - π -Wechselwirkungen^[203,204] deuten darauf hin, dass π - π -Wechselwirkungen von Aminosäureanaloga genauso stark sein können wie die Kation- π -Wechselwirkungen.^[203] Die in Abbildung 3.18a fehlende Desolvatationsbarriere in den Wechselwirkungspotenzialen ist wahrscheinlich auf die implizite Solvatisierung zurückzuführen, die bei der Berechnungen verwendet wurde, wodurch die partikelförmige Natur (endliche Größe) der Wassermoleküle vernachlässigt wird. Im Gegensatz dazu weisen in Abbildung 3.18b-d alle mit explizitem Wasser simulierten PMFs trotz der hohen Empfindlichkeit gegenüber dem verwendeten Kraftfeld Desolvatationsbarrieren auf. Selbst bei den PMFs für ein Aminosäurepaar mit gleichen Ladungsvorzeichen ist eine Desolvatationsbarriere zu erkennen (Abbildung 3.18c). Auch die in Abbildung 3.18d gezeigten PMFs weisen eine niedrige, aber dennoch erkennbare Desolvatationsbarriere auf.

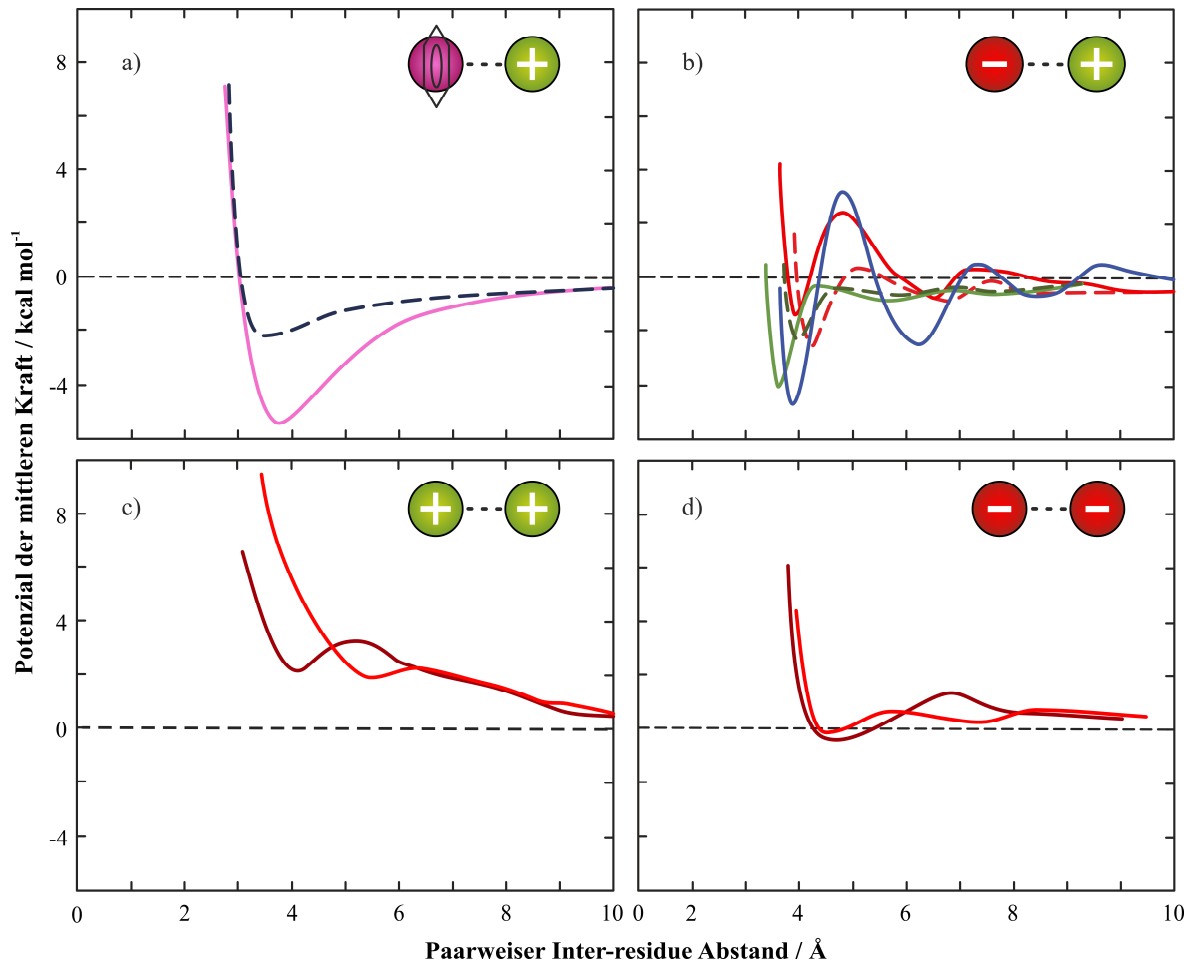


Abbildung 3.18: Beispiele für PMFs, die zu biomolekularen Wechselwirkungen beitragen können. Die Arten der Wechselwirkungen werden durch die Karikaturen mit positiven und negativen Ladungen bzw. einem Benzolring angezeigt. a) PMFs von Methylammoniumacetat- (gestrichelte Kurve) und Methylammoniumbenzol-Wechselwirkungen (magentafarbene Kurve) als Modelle für Salzbrücken- bzw. Kation- π -Wechselwirkungen in wässriger Lösung. Gallivan und Dougherty verwendeten für die Quantenberechnung Gaussian 94 in Verbindung mit einer impliziten Solvatisierung (Wasser).^[195] b-d) Beispiele für PMFs, die mit (nicht quantenmechanischen) *explicit-water atomic* Simulationen berechnet wurden. b) PMFs für ein Aminosäurepaar mit entgegengesetzter Ladung: Arg+/Glu- (blaue Kurve), Lys+/Glu- (durchgängige und gestrichelte rote Kurven sind für Side-to-Side bzw. kollineare Konfigurationen; Die Simulationsdaten stammen von Masunov und Lazaridis)^[196] und Arg+/Asp- (durchgängige und gestrichelte grüne Kurven wurden mit den Kraftfeldern OPLS 2005 bzw. AMBER ff13a berechnet; Die Simulationsdaten stammen von Debiec et al.).^[197] c) PMFs für ein Aminosäurepaar mit positiver Ladung: Lys+/His+. d) PMFs für ein Aminosäurepaar mit negativer Ladung: Glu-/Glu-. Sowohl in c) als auch in d) sind die dunkel- und hellroten Kurven für kollineare bzw. orthogonale Konfigurationen; Die Simulationsdaten wurden von Masunov und Lazaridis übernommen.^[196] Die Simulationen von Debiec et al. wurden mit dem TIP4P-Ew Wassermodell bei $T=298.15$ K für $p = 1$ atm durchgeführt. Für die Simulationen von Masunov und Lazaridis wurde das TIP3P Wassermodell bei gleicher Temperatur und gleichem Druck verwendet.^[205] Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Die Temperaturabhängigkeit der PMFs von Aminosäureanaloge ist nur in geringem Maße untersucht worden. So zeigen beispielsweise mit explizitem Wasser simulierte PMFs von

Acetat und Methylguanidinium eine leichte Zunahme der günstigen Kontaktwechselwirkung von $T = 300$ K bis 400 K. Auch in diesen PMFs werden Desolvatationsbarrieren beobachtet.^[206] Das Auftreten solcher Desolvatationsbarrieren und lösungsmittelgetrennter Minima, die denen für hydrophobe Wechselwirkungen ähneln (Abbildung 3.17a), suggeriert, dass die Überlegungen zu den Hohlraumvolumina, hinsichtlich der Druckabhängigkeit und den lösungsmittelgetrennten Konfigurationen mit geringem Volumen auch für π - und Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen gelten könnten. Um weitere Einblicke in die physikalischen Grundlagen der (T, p) -abhängigen biomolekularen LLPS zu gewinnen, sollten künftige Bemühungen auf die Aufklärung der Temperatur- und Druckabhängigkeit dieser Wechselwirkungen gerichtet sein.

Aufgrund der geladenen und hydrophoben Reste auf der Proteinoberfläche von gefaltetem γ -Kristallin ist davon auszugehen, dass die LLPS-Bildung bei geringer Temperatur und Umgebungsdruck durch transiente elektrostatische, hydrophobe und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Proteinmolekülen stabilisiert wird. Basierend auf geometrischen Überlegungen sowie computergestützten Simulationen wird angenommen, dass sich in den kondensierten Tröpfchenphasen, aufgrund der sich vorübergehend berührenden Proteinmoleküle, eine große Menge an wasserfreien Hohlräumen befindet.^[40,184,186,192] Dies ist vergleichbar mit den Hohlraumvolumina in gefalteten Proteinen, wobei die Hohlräume in den Proteinen im Wesentlichen statisch sind, während die Hohlräume in den Phasentröpfchen als dynamisch angesehen werden müssen. Wie die druckabhängige Destabilisierung gefalteter Proteine^[42,123,207–209] oder das Auflösen voluminöser Wasserkäfige im Bulk-Wasser, kann auch die kondensierte Tröpfchenphase von γ -Kristallin unter hohem Druck destabilisiert werden, da der Übergang von der kondensierten in die homogene verdünnte Phase, gemäß dem Prinzip von Le Chatelier,^[210] zu einer Verringerung des Hohlraumvolumens führt und zudem durch eine höhere Mischungsentropie begünstigt wird. Wie schon zuvor beschrieben, können auch hier die hydrophoben Kontakte im Vergleich zu den kompakten, aber lösungsmittelgetrennten Konfigurationen, durch hohen Druck destabilisiert werden.^[40,53]

Die oben beschriebenen experimentellen Ergebnisse für γ D-Kristallin, α -Elastin und Ddx4 IDR zeigen, dass TMAO die Druckabhängigkeit der LLPS dieser Proteine effektiv beeinflussen kann. Die Fähigkeit von TMAO, die gefaltete Struktur von globulären Proteinen zu stabilisieren, ist seit langem bekannt.^[211] Jedoch gibt es keine allgemeine Auffassung über den detaillierten strukturellen und energetischen Mechanismus, durch den TMAO lösungs-

mittelvermittelte biomolekulare Wechselwirkungen beeinflusst, da die Ergebnisse von Simulationen auf atomarer Ebene sehr empfindlich auf das verwendete Kraftfeld reagieren.^[117,212–215] Dennoch gilt allgemein die Ansicht, dass TMAO kompaktere Proteinkonfigurationen stabilisiert, da es mit den Proteinen ungünstig wechselwirkt, während es starke Wasserstoffbindungen zu Wasser bildet. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung gestützt, dass TMAO in der Nähe von Proteinoberflächen stark abgereichert wird.^[117,118,126] Das Ausmaß der ungünstigen Wechselwirkung zwischen TMAO und den verschiedenen Aminosäureresten ist unterschiedlich, da er von dem jeweiligen Rest abhängt. Dennoch weisen die experimentellen Daten auf einen allgemeinen Ausschluss von TMAO sowohl von den hydrophoben als auch von den polaren Oberflächen von Proteinen hin.^[125,216] Die Wechselwirkung von TMAO mit hydrophoben Resten wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Auf diese Weise sollte TMAO in der Lage sein, der druckinduzierten Auflösung der Tröpfchen entgegenzuwirken, wie es auch in den oben genannten Experimenten beobachtet wurde. Diese physikalische Sichtweise wird durch das Schema in Abbildung 3.19 veranschaulicht.

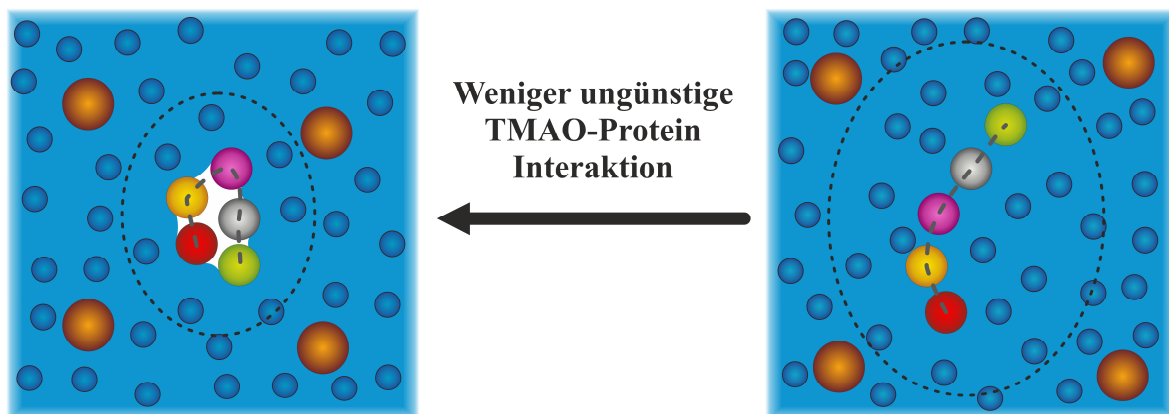


Abbildung 3.19: TMAO stabilisiert kompakte Proteinkonfigurationen und verhindert, dass sie sich in offene Konfigurationen mit größerer exponierter Oberfläche entfalten. TMAO-Moleküle sind in diesem Schema als braune Kugeln dargestellt. Wassermoleküle, wasserzugängliche Bereiche und Hohlraumvolumina sind im Stil von Abbildung 3.17 dargestellt. Hydrophobe, aromatische, positiv und negativ geladene Reste sind durch farbkodierte Kugeln gekennzeichnet: Hydrophob = orange, aromatisch = magenta, positiv = grün negativ = rot und polar = grau (nicht maßstabsgerecht gezeichnet). Es ist zu erwarten, dass TMAO weitgehend aus dem wasserzugänglichen Volumen nahe der Proteinoberfläche (symbolisiert durch die gestrichelten Ellipsen) ausgeschlossen wird, um ungünstige Kontakte mit den Aminosäureresten zu vermeiden. Dementsprechend sollte die für TMAO unzugängliche Oberfläche bei offenen Proteinkonfigurationen größer sein als bei kompakten Proteinkonfigurationen. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

In der Abbildung 3.19 wird der Ausschluss der TMAO-Moleküle von der Proteinoberfläche einer kompakten Proteinkonfigurationen (links) und einer offenen Proteinkonfigurationen

(rechts) gezeigt. Da das für TMAO ausgeschlossene Volumen bei einer offene Proteinkonfigurationen größer ist als bei der kompakten Proteinkonfigurationen, wird die kompakte (gefaltete) Proteinkonfigurationen in Anwesenheit von TMAO stabilisiert.

Abbildung 3.20 ist eine grafische Zusammenfassung der in dieser Arbeit vorgeschlagenen, physikalischen Überlegungen. Die Schemata ordnen das LLPS globulärer gefalteter Proteine und IDPs in denselben allgemeinen konzeptionellen Rahmen ein^[217], wobei die zentrale Rolle der Hohlraumvolumina (weiße Flächen) hervorgehoben wird. Die gesamte weiße Fläche ist am größten, wenn das Gesamtvolumen des Systems am größten ist (linke Spalte von Abbildung 3.20), was dem Zustand bei niedrigem Druck entspricht. Es ist jedoch zu beachten, dass die hier aufgeführten Szenarien nicht umfassend sind. Im Prinzip sind auch zahlreiche andere Varianten der (T, p) -abhängigen Phasentrennung möglich.^[60] Gefaltete Proteine werden hier auf abstrakte Weise dargestellt, ähnlich wie bei *patchy-sphere*-Modellen von Flüssigkeitsgemischen.^[218–220] Die LLPS gefalteter Proteine wird durch alle Arten transien-ter Wechselwirkungen zwischen den Proteinoberflächen bestimmt. Die Assoziierung verschiedener Typen von Aminosäureresten mit den unterschiedlichen LLPS-Szenarien in Abbildung 3.20 sind nur ein Hinweis auf eine allgemeine Verhaltenstendenz. Bei realen Proteinen tragen alle Interaktionstypen dazu bei, auch wenn einige je nach Aminosäuresequenz einen dominanteren Einfluss haben können als die anderen. So entsprechen beispielsweise die LLPS-Eigenschaften in Abbildung 3.20a denen von γ D-Kristallin. In diesem Fall wurde nicht wie bei α -Elastin innerhalb des untersuchten Druckbereichs ein druckinduzierter Wiedereintritt in den phasenetrennten Zustand beobachtet, obwohl nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass ein Wiedereintritt bei noch höheren Drücken erfolgt. Abbildung 3.20b zeigt die Auswirkungen von TMAO auf die LLPS gefalteter Proteine, wie zuerst für γ D-Kristallin diskutiert wurde.^[52] Wie bereits dargelegt, ist der Ausschluss von TMAO von den Proteinoberflächen allgemein gültig, einschließlich der beiden folgenden Szenarien mit IDPs. Der Trend in Abbildung 3.20c entspricht dem von α -Elastin. Dieser könnte als Prototyp der IDP-LLPS dienen, die vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben wird und Merkmale aufweist, die mit den Wechselwirkungen kleiner unpolare gelöster Stoffe in Wasser vergleichbar sind. Das Szenario in Abbildung 3.20d stimmt mit der LLPS von Ddx4 IDR überein, die durch elektrostatische und Kationen- π - sowie π - π -Wechselwirkungen induziert wird. Es ist davon auszugehen, dass noch zahlreiche Details über die T -, p - und Osmolyt-abhängige LLPS von Biomolekülen unbekannt sind.

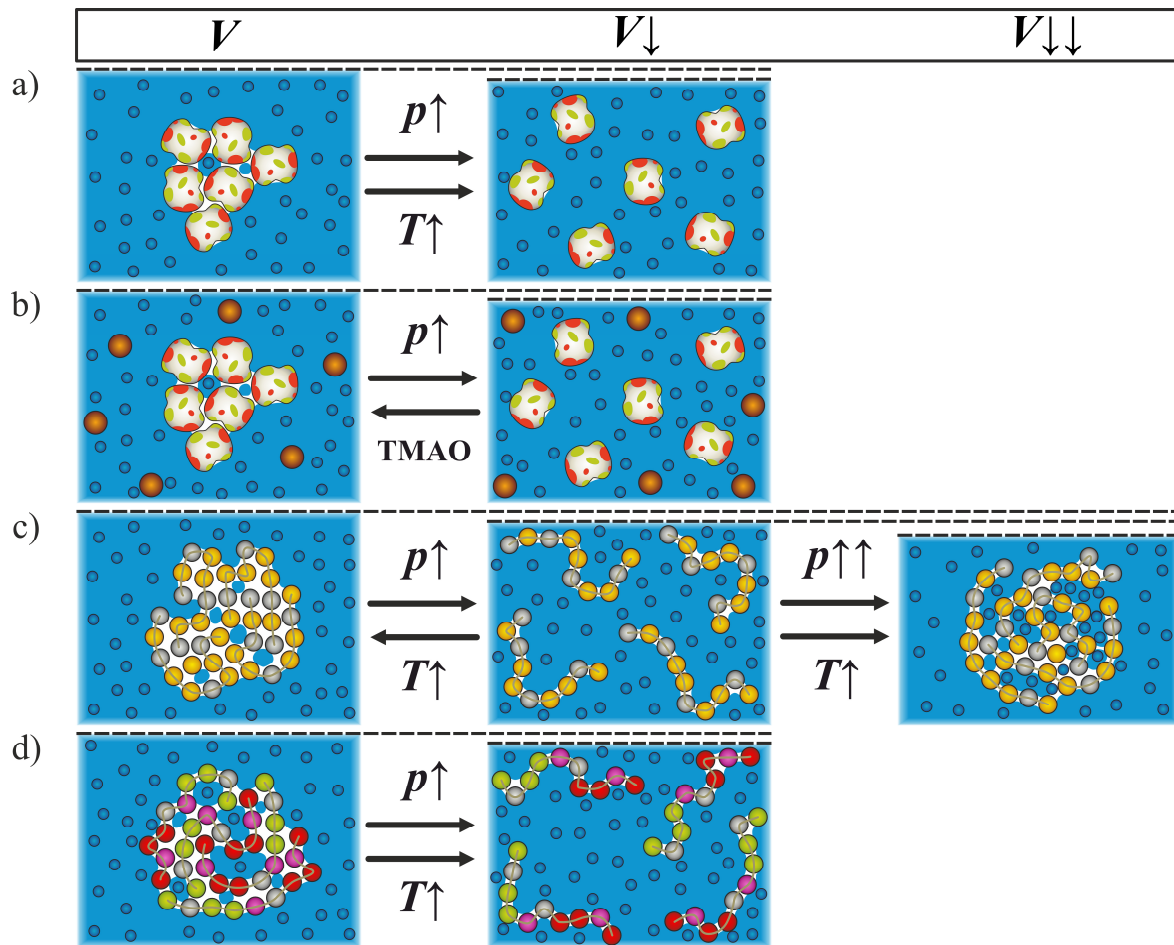


Abbildung 3.20: Unterschiedliche Protein-LLPS Szenarien und deren mögliche physikalischen Ursachen. Die schematische Darstellung der Wassermoleküle, der wasserzugänglichen Volumina, der Hohlräumvolumina, der verschiedenen Arten von Aminosäureresten und TMAO folgt dem in Abbildung 3.17 und Abbildung 3.19 gezeigtem Stil. Gefaltete Proteine sind als unregelmäßig geformte Strukturen dargestellt (a und b). Die verschiedenen Typen von Aminosäureresten auf den gefalteten Proteinoberflächen werden schematisch durch Farbflecke dargestellt. IDPs sind als Ketten zusammenhängender Kugeln dargestellt (c und d). Die Veränderung des Gesamtvolumens (V) des Systems wird durch die unterschiedliche Systemboxhöhe angezeigt. Die jeweiligen aufwärts bzw. abwärts gerichteten Pfeile neben p , V und T zeigen eine Zunahme bzw. Abnahme dieser thermodynamischen Variablen an. Doppelpfeile deuten dementsprechend eine weitere Zunahme bzw. Abnahme an. Die horizontalen Pfeile geben die Richtung der Änderung einer thermodynamischen Variable oder der Osmolyt-Konzentration vor. Es sind vier repräsentative LLPS-Verhaltensweisen abgebildet: a) UCST für ein gefaltetes Protein; b) TMAO-Stabilisierung der phasengetretenen kondensierten Zustände eines gefalteten Proteins; c) LCST für ein IDP mit p -induziertem reentranten Phasenübergang; d) UCST für ein IDP. Wie im Text erläutert, entsprechen diese Szenarien den Fällen von (a, b) γ D-Kristallin, (c) α -Elastin und (d) Ddx4-IDR. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

Die hier präsentierten Forschungsergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass für das Auflösen von biomolekularen Kondensaten weitaus weniger Druck erforderlich ist als für die Entfaltung globulärer Proteine und lässt sich vermutlich auf die folgenden drei Ursachen zurückführen:

- I. Die kohäsiven Wechselwirkungen sind in einem Kondensat tendenziell schwächer als im Inneren eines gefalteten Proteins.
- II. Eine lockere Packung in der kondensierten Phase führt zu einem vergleichsweise größeren Hohlraumvolumen als im Kern gefalteter Proteine (ca. 0.5 %), was wiederum zu einer geringeren Stabilität des Kondensats unter hydrostatischem Druck führt.
- III. Die Zunahme der Konfigurationsentropie, infolge der Auflösung eines Kondensats in mehrere Moleküle mit unabhängigen translatorischen Freiheitsgraden ist wahrscheinlich größer als die Zunahme der Konformationsfreiheit im Verlaufe der Entfaltung eines globulären Proteins in eine ungeordnete, jedoch zusammenhängende Kette.

Es wird angenommen, dass alle drei Faktoren zu einer geringeren thermodynamischen Stabilität des kondensierten Zustands führen. Ob und wie sie jedoch auf bestimmte Proteine zutreffen, ist noch nicht im Detail geklärt und hängt sicher von Details der Aminosäuresequenz ab.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier vorgestellten experimentellen Beobachtungen eindeutig zeigen, dass Druck, d.h. volumetrische Effekte, einen erheblichen Einfluss auf die Phasentrennung von Proteinen haben. Druckänderungen von einigen zehn bis einigen hundert bar können ausreichen, um die biomolekulare LLPS aufzuheben oder zu induzieren. Grundsätzlich ist ein umfassenderes Verständnis der Art und Weise, wie die Eigenschaften biomolekularer Kondensate von allen thermodynamischen Variablen (Temperatur, Druck und Aktivität aller Lösungsmittelkomponenten) abhängen, wichtig für das Verständnis normaler wie auch krankheitsverursachender biomolekularer Prozesse. Dieses Wissen wird auch Aufschluss über die möglichen evolutionären Vorteile und Grenzen der Nutzung der LLPS für biologische Funktionen geben und weitere Einblicke in die Prozesse der Selbstorganisation ermöglichen, die der zellulären Evolution angesichts externer Stressfaktoren zugrunde liegen. Hypothetisch könnten die ersten Schritte der biologischen Zellbildung die Phasentrennung von biologischen Makromolekülen in fluide Koazervate gewesen sein,^[13,26–29,31,43] wie sie in Oparins bahnbrechendem Buch "*Simple and complex coacervates*" als Hauptüberschrift des Kapitels "*The development of organic multimolecular systems—their organization in space and time*" beschrieben wird.^[26] Da der Geburtsort des Lebens auf der Erde die Tiefsee gewesen sein könnte,^[38,39] sollte die hier gezeigte Studie, die sich mit dem Einfluss von Druck und niedrigen Temperaturen (wie sie in den Tiefen der Ozeane auftreten) auf die biomolekulare LLPS befasste, auch Fragen zur Bildung von Protozellen unter präbiotischen Bedingungen beantworten können. Außerdem zeigen die hier vorgestellten Daten, dass die Hochregulierung des natürlichen Osmolyts TMAO die Tröpfchenphase selbst bei Drücken von mehreren hundert bar stabilisieren kann, wie sie auch in der Tiefsee vorzufinden sind (der durchschnittliche Druck in den Weltmeeren beträgt ≈ 400 bar). So ist von vielen Meerestieren bekannt, dass TMAO den physiologisch schädlichen Einflüssen, die durch den hydrostatischen Druck entstehen, am wirksamsten entgegenwirkt.^[120,221,222] In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass die TMAO-Konzentration in den Zellen von vielen Meeresorganismen mit steigender Ozeantiefe (bis maximal 0.5 M TMAO) zunimmt. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass TMAO als allgemeiner Druckkompensator, als sogenannter "Piezolyt", dient.^[120,221]

Aus den oben beschriebenen Studien lässt sich ableiten, dass Organismen stabilisierende Osmolyte wie TMAO nicht nur nutzen könnten, um extreme Umweltbedingungen zu kompensieren und Proteine vor der Entfaltung und Denaturierung zu bewahren, sondern auch

um biomolekulare LLPS-Prozesse aufrechtzuerhalten und zu regulieren, die für zelluläre Funktionen entscheidend sind. Hierzu gehören beispielweise druckempfindliche Prozesse wie die Polymerisation von Biomolekülen und die synaptische Signaltransmission.^[223,224] Abgesehen von den stabilisierenden Effekten der Osmolyte muss noch erforscht werden, wie unterschiedliche Proteinsequenzen dazu beitragen, dass sich Organismen an den hohen hydrostatischen Druck anpassen können.^[225] Für die derzeitigen Bemühungen proteinähnliche Heteropolymersequenzen mit neuartigen Materialeigenschaften, einschließlich des gewünschten LLPS-Verhaltens, zu entwickeln, ist eine genaue Kenntnis des LLPS-Verhaltens von Proteinen in Abhängigkeit von allen thermodynamischen Variablen, einschließlich des Drucks, unerlässlich.^[45,92-96,194,226] In einem breiteren technologischen Kontext sind solche Kenntnisse auch in Bereichen wie der Proteinkristallisation (LLPS tritt im Allgemeinen unter Bedingungen auf, bei denen das Protein im Hinblick auf die Kristallisation metastabil ist), der Proteinreinigung, der Entwicklung von Formulierungen für therapeutische Proteine und der Hochdruck-Lebensmittelverarbeitung von Bedeutung.^[2,3,42,99,225,227-229]

4 Drucksprung-Relaxationsstudie: Der Einfluss von Kosolventien und Crowder auf die Kinetik der Protein-Kondensatbildung auf Grundlage der LLPS von γ D-Kristallin^{‡‡}

Die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen hängt von einem hohen Organisationsgrad ab, der von biomolekularen Komplexen bis hin zu größeren subzellulären Strukturen wie Organellen reicht. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass Assemblierungsvorgänge auf Grundlage der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) von Protein- und Protein-Nukleinsäure-Gemischen, die als membranlose Organellen dienen, eine wichtige Rolle bei der zellulären Organisation spielen.^[1,13,16,28,31,43,115,150] Beispiele für solche membranlosen Organellen sind zytoplasmatische Granula, Nukleoli, Cluster von Proteinen, die an der Signalübertragung beteiligt sind, und postsynaptische Dichten, d.h. proteinreiche zelluläre Kompartimente unter der postsynaptischen Membran.^[13,16,28,31,43,150] Die Existenz und die Lage der Phasenübergänge, einschließlich komplexer biomolekularer Mischungen, die eine LLPS durchlaufen, hängen grundsätzlich von thermodynamischen Variablen wie der Temperatur, dem Druck und der Konzentration (Aktivität) der Komponenten ab. Die thermodynamischen Grundlagen eines solchen Mehrkomponentensystems beschreiben lediglich das Gleichgewichtsverhalten des Systems, liefern jedoch keine Informationen über die Kinetik des zugrunde liegenden Phasentrennungsprozesses. Solche Informationen sind allerdings erforderlich, um die Funktion solcher LLPS-gesteuerten biologischen Kompartimentierungsvorgänge vollständig zu verstehen. Es ist zu erwarten, dass biologisch relevante LLPS-Prozesse (das Bilden und Auflösen kondensierter Phasen) in einem zeitlichen Rahmen ablaufen, der für die chemischen Prozesse innerhalb solcher Phasen notwendig ist. Für Signalprozesse und enzymatische Reaktionen, die eine gemeinsame Lokalisierung der Reaktanden in den flüssigen Kondensaten benötigen, wird üblicherweise die Bildung bzw. das Auflösen der LLPS der geschwindigkeitsbeschränkende Schritt sein. So müssten sich beispielsweise in sehr kurzer Zeit Stressgranula bilden, wenn ein Organismus plötzlich äußerem Stress ausgesetzt ist.

^{‡‡} Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz publiziert:
H. Cinar, R. Winter, *Scientific Reports* 2020 **2020**, 10, 1–16.^[51]

Daher können die Auswirkungen von Flüssig-Flüssig-Phasenübergängen, wie sie in fluiden Protein- oder Protein/Nukleinsäure-Kondensaten auftreten, nur unter Berücksichtigung ihrer Kinetik richtig eingeschätzt werden. Dieser kinetische Aspekt ist der Schwerpunkt dieses Kapitels.

Voraussetzung der kinetischen Untersuchung ist die genaue Kenntnis des Phasendiagramms des Systems bei unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen. Bezüglich der Temperaturabhängigkeit weisen die meisten Proteinkondensate eine obere kritische Lösungstemperatur (UCST) auf, bei der die LLPS unterhalb einer kritischen Temperatur T_c auftritt (d.h. $T_c = UCST$, die Proteinkonzentration bei T_c ist ihre kritische Konzentration c_c ; siehe Abbildung 4.1). Es sind jedoch auch Systeme mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST) oder sogar Systeme mit reentranter Phasentrennung bekannt.^[43,53,54]

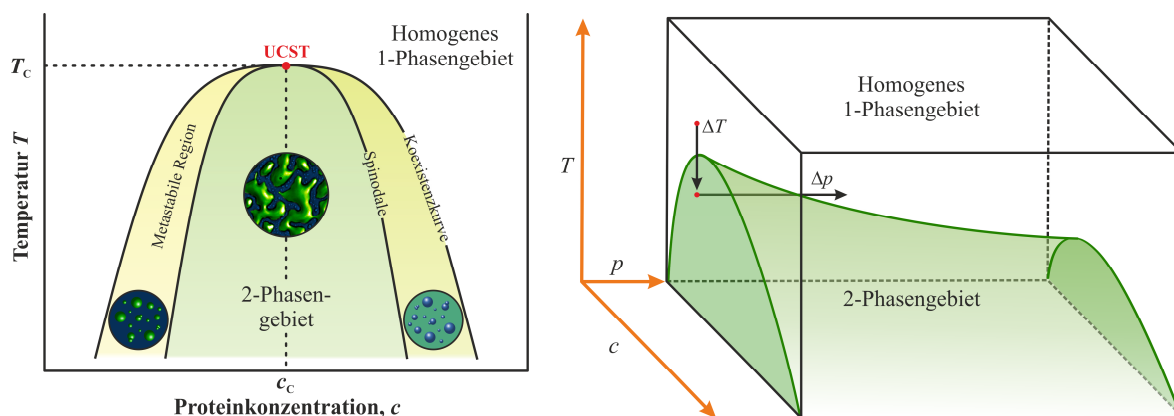


Abbildung 4.1: Links: Ein typisches T - c -Phasendiagramm für ein partiell mischbares Flüssigkeitsgemisch (z.B. eine hochkonzentrierte Lysozym- oder γ -Kristallin-Lösung)^[52] mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST). Die Kinetik der Phasentrennung kann je nach durchquertem Bereich des Phasendiagramms und je nach System zeitlich stark variieren. In den metastabilen Bereichen findet die Phasentrennung durch Tröpfchennukleation und -wachstum statt, während am kritischen Punkt und unterhalb der Spinodale eine spinodale Entmischung stattfindet. Rechts: Schematische Darstellung des T , p , c -Phasendiagramms eines LLPS-Systems (z.B. γ -Kristallin) mit einer UCST (c , Proteinkonzentration). Die Pfeile kennzeichnen die Richtung der Temperatur- bzw. Druckmessungen an. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

In Kapitel 3.2 konnte am Beispiel von γ D-Kristallin gezeigt werden, dass einige der Proteinsysteme, die eine LLPS aufweisen, zudem sehr druckempfindlich sind. So konnte bei γ D-Kristallin ein Druck von mehreren hundert bar den Übergang vom phasentrennten in den homogenen Lösungszustand bewirken.^[52–54] Der Einsatz von Hochdruck im Bereich der Proteinfaltung gewinnt zunehmend an Bedeutung, da er sich besonders auf nichtkovalente Bindungen, insbesondere auf hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, sowie auf Proteinsysteme mit erheblichen Packungsdefekten bzw. Hohlraumvolumina auswirkt.

[42,123,207,210] Darüber hinaus hat sich die notwendige technische Entwicklung für die spektroskopische und kinetische Analyse unter hohem Druck stark weiterentwickelt und ist inzwischen in zahlreichen Laboratorien verfügbar.^[230–233] Das Drucksprung-Verfahren hat gegenüber anderen Techniken (Temperatur- bzw. pH-Sprünge) zur Erforschung der Kinetik von Phasenübergängen eine Reihe von Vorteilen. So wird durch pH-Sprünge die Oberflächenladungsverteilung des Proteins und somit seine Stabilität verändert, während Temperatursprünge Auswirkung auf die intermolekularen Wechselwirkungen und somit auf die Konformationsdynamik des Proteins haben können.^[42,123,207,210] Drucksprungmessungen haben den Vorteil, dass Sprünge vom phasenetrennten in den homogenen durchmischten Zustand und umgekehrt möglich sind, ohne dass dabei thermische Effekte auftreten. Des Weiteren sind druckinduzierte Phasenübergänge im Allgemeinen vollständig reversibel. Druckexperimente werden durch die volumetrischen (Packungs-) Eigenschaften des Systems gesteuert, die ebenfalls stark von den Solvatationsbedingungen der Biomoleküle abhängen und daher keine Änderung der thermischen Energie im System erfordern. Gemäß dem Prinzip von Le Chatelier liegt die treibende Kraft in der Verringerung des Gesamtvolumens, etwa durch Auffüllen von Hohlräumen mit Lösungsmittel oder durch Elektrostriktion, d.h. die Hydratisierung von Ladungen bei der Dissoziation von Ionenpaaren und die damit einhergehende Verringerung des Volumens.^[42,123,207,210,231–233]

In dieser Studie wurden UV/Vis-Turbiditätsmessungen, die FT-IR Spektroskopie und die Lichtmikroskopie in verschiedenen Hochdruckprobenzellen eingesetzt, um die Phaseneigenschaften und die Kinetik des LLPS-Systems von γ D-Kristallin zu untersuchen. Da Kosolventien und Crowding Agenzien häufige Bestandteile des zellulären Milieus sind und bekanntermaßen die relative Stabilität biomolekularer Systeme, einschließlich Proteinkondensate, beeinflussen,^[5,6,52,53,117] wurde die kinetische Studie erweitert, indem auch der Einfluss von Harnstoff, Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) und des Crowding Agens Ficoll auf die Phasenstabilität und die Kinetik des Systems untersucht wurde. Es hat sich gezeigt, dass TMAO in Organismen, die in der Tiefsee bei hohen Drücken von mehreren hundert bar leben, hochreguliert wird. Daher wird angenommen, dass TMAO als Druckkompensator bzw. als "Piezolyt" dient, wobei seine physikalisch-chemischen Eigenschaften in den vergangenen Jahren eingehend untersucht wurden.^[119,120,214,234]

4.1 Probenpräparation

4.1.1 FT-IR Messungen

Für die folgenden FT-IR Messungen wurde wegen der überlagernden H₂O-Deformationsschwingung bei 1645 cm⁻¹ D₂O als Lösungsmittel eingesetzt. Wie in Kapitel 2.2.3 erwähnt, besitzt D₂O eine relativ geringe Absorption im Bereich von 1700 – 1500 cm⁻¹ und ist daher als Lösungsmittel besser geeignet.^[73] Für die druckabhängigen Messungen wurde aufgrund der charakteristischen pD-Stabilität TRIS -D₂O-Puffer verwendet. Zur Bestimmung des pD-Werts der Pufferlösung wurde eine herkömmliche pH-Elektrode verwendet. Für eine korrekte pD-Einstellung der Lösung musste die Korrektur $pD = pH\text{-Meteranzeige} + 0.4$ ^[101] berücksichtigt werden. Anschließend wurde eine 5 Gew.-% γ D-Kristallin-Lösung hergestellt. Als Ausgangslösung diente eine Protein-Stammlösung, die mit dem vorbereiteten TRIS-D₂O-Puffer entsprechend verdünnt werden musste. Die Konzentrationen der jeweiligen Stammlösungen unterschieden sich voneinander und die Zusammensetzung der finalen Probe musste individuell berechnet werden. Das endgültige Probenvolumen betrug 200 μ L. Im nächsten Präparationsschritt wurde für den H/D-Austausch die Probe dreimal im Wechsel lyophilisiert und wieder mit D₂O aufgefüllt. Im finalen Durchlauf wurde die Probe über Nacht lyophilisiert und unmittelbar vor der Messung in 200 μ L D₂O-Lösung gelöst, sodass eine Proteinkonzentration von 5 Gew.-% vorlag. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Die für die temperatur- und druckabhängigen FT-IR Messungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
γ D-Kristallin	5 Gew.-% γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4

4.1.2 Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen

Das für die Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen verwendete humane γ D-Kristallin Protein wurde, wie in Kapitel 3.1.1 erläutert, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Winter exprimiert, aufgereinigt und aufkonzentriert. Die erhaltenen Stammlösungen konnten je nach Expressionserfolg unterschiedliche Konzentrationen aufweisen. Die Probenlösungen wurden unmittelbar vor jeder Versuchsdurchführung präpariert, um die Messungen bei möglichst identischen Bedingungen durchzuführen und somit mögliche präparative Fehler ausschließen zu können. Zur Bestimmung des *T-c*-Phasendiagramms einer reinen γ D-Kristallin Lösung wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 25 – 150 mg mL⁻¹ in 25 mg mL⁻¹ Schritten hergestellt. Zur Verdünnung der Stammlösung wurde ein TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) verwendet.

Für die Kosolvens- bzw. Crowder-abhängigen Messungen wurden im Vorfeld Stammlösungen von einer 1 M TMAO-Lösung, 1 M Harnstoff- und 300 mg mL⁻¹ Ficoll® PM 70-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) vorbereitet. Anschließend wurden die Stammlösungen mit γ D-Kristallin auf die gewünschte Zusammensetzung der jeweiligen Probe zusammen pipettiert. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 4.2 aufgelistet.

4.1.3 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopischen Messungen wurden im Vorfeld Stammlösungen von einer 1 M TMAO-, 1 M Harnstoff- und 300 mg mL⁻¹ Ficoll® PM 70-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) hergestellt. Anschließend wurden die Stammlösungen mit humanem γ D-Kristallin auf die gewünschte Zusammensetzung der jeweiligen Probe zusammen pipettiert. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 4.2 aufgelistet.

Tabelle 4.2: Die für die Lichtmikroskopie, die temperatur-/druckabhängigen Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
γ D-Kristallin	25 – 150 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH=7.4
50 – 100 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin- TMAO	0.3 M TMAO, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4 0.5 M TMAO, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
50 – 100 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin- Harnstoff	0.1 M Harnstoff, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4 0.3 M Harnstoff, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4
50 – 100 mg mL ⁻¹ γ D-Kristallin-Ficoll	100 mM Ficoll [®] PM 70, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4 150 mM Ficoll [®] PM 70, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4 200 mM Ficoll [®] PM 70, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4

4.2 Temperatur- und druckabhängige FT-IR Messungen

Voraussetzung der kinetischen Untersuchung ist neben der genauen Kenntnis über das Phasendiagramm des Systems auch die Kenntnis der temperatur- und druckabhängigen sekundärstrukturellen Veränderung des Proteins notwendig. Aufbauend auf den vorläufigen FT-IR Untersuchungen aus Kapitel 3.2.3 erfolgt in diesem Kapitel eine detaillierte Untersuchung der temperatur- und druckabhängigen Sekundärstrukturveränderung einer reinen γ D-Kristallin-Lösung. Zu Beginn wurde γ D-Kristallin in D_2O im Temperaturbereich von 20 – 85 °C gemessen. In Abbildung 4.2 sind die temperaturabhängigen Amid-I'-Banden von 5 Gew.-% γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) dargestellt. Bei 20 °C weist die Amid-I'-Region (1700 – 1600 cm^{-1}) eine breite Bande mit einem Maximum bei 1638 cm^{-1} auf (Abbildung 4.2a), die sich mit steigender Temperatur verringert, während sich bei 1615 cm^{-1} eine markante Bande und bei 1682 cm^{-1} eine Schulter ausbildet. Dies deutet auf eine temperaturbedingte Entfaltung und anschließende Aggregation des Proteins um die 80 °C hin. Die temperaturabhängigen Änderungen der Amid-I'-Bande lassen sich besser in einem Differenzspektrum darstellen. Hierzu diente die Amid-I'-Bande bei 20 °C als Referenz, die von den Amid-I'-Banden bei höheren Temperaturen subtrahiert wurde (Abbildung 4.2b).

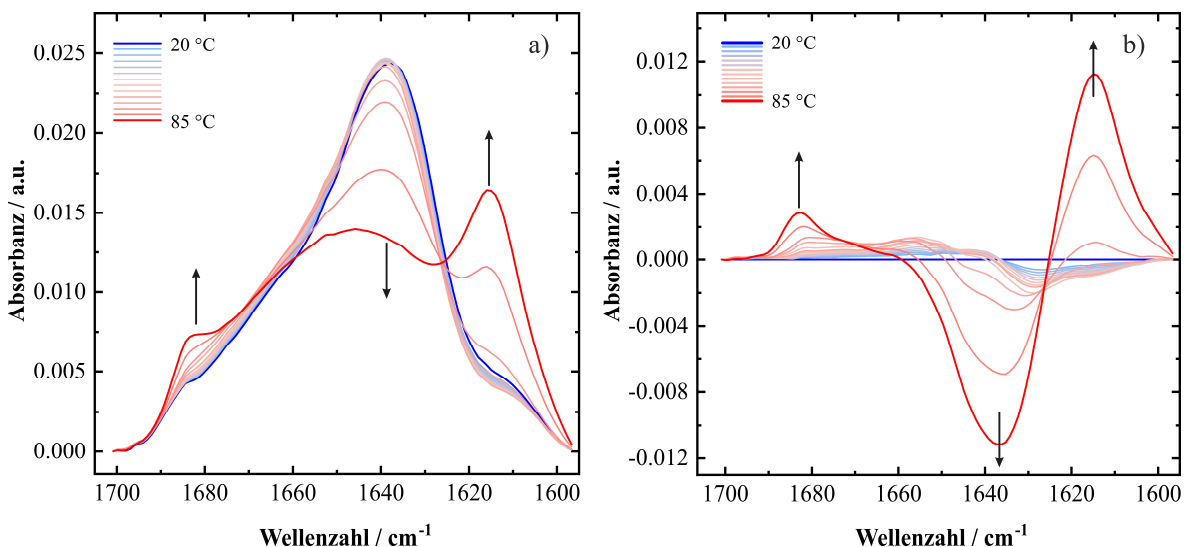


Abbildung 4.2: Flächennormierte FT-IR Spektren (1700 – 1600 cm^{-1}) der temperaturabhängigen Messungen einer γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) im Bereich von 20 – 85 °C bei Atmosphärendruck und b) die zugehörigen Differenzspektren. Die Amid-I'-Bande bei 20 °C diente als Referenzspektrum und wurde von allen anderen Amid-I'-Banden abgezogen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Für die genauere Bestimmung der sich mit der Temperatur verändernden Sekundärstrukturanteile wurde eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die zweite Ableitung der Amid-I'-Bande und die entsprechende FSD miteinander verglichen (Abbildung 4.3b). Aus den übereinstimmenden Minima der zweiten Ableitung und den Maxima der FSD wurde die Bandenposition der Subbanden erhalten. Aus dem Vergleich konnten insgesamt sieben Subbanden ermittelt werden. In Abbildung 4.3a wird die Amid-I'-Bande mit den angepassten Subbanden bei 20 °C dargestellt.

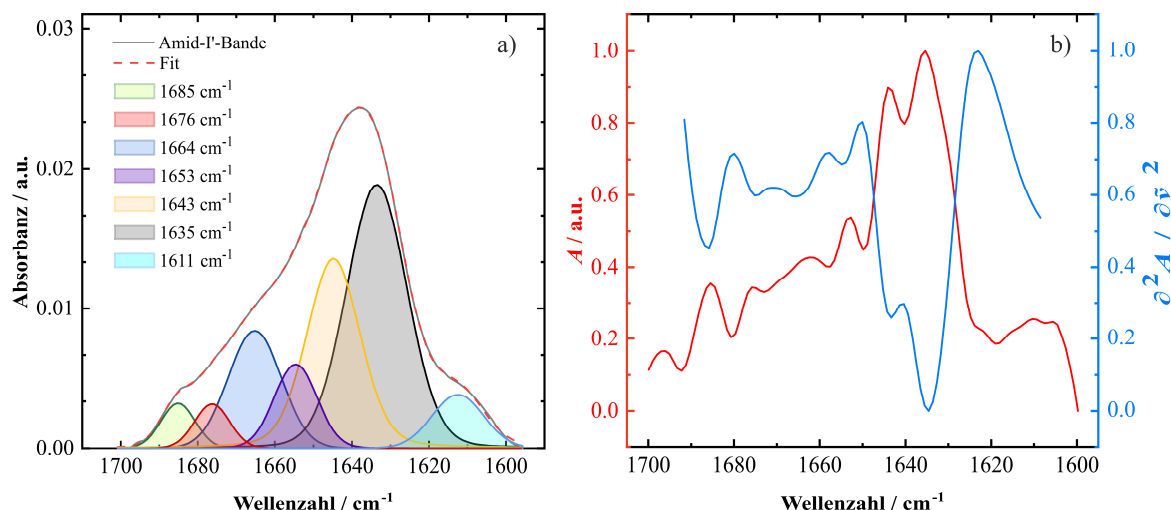


Abbildung 4.3: a) Flächennormierte Amid-I'-Bande (1700 – 1600 cm⁻¹) bei 20 °C von γ D-Kristallin in D₂O-Lösung mit den angepassten Subbanden bei 1 bar. b) FSD behandelte Spektren (rot) und die zweite Ableitung (blau), anhand derer die Subbandenpositionen bestimmt wurden (A ist die Absorbanz). Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Die Subbanden bei 1685 cm⁻¹, 1676 cm⁻¹ und die dominante Bande bei 1635 cm⁻¹ können den β -Faltblattstrukturen zugeordnet werden, während die Bande bei 1664 cm⁻¹ mit β -Turns assoziiert werden kann. Die Bande bei 1653 cm⁻¹ lässt sich α -helikalen Strukturen zuordnen. Die Bande bei 1643 cm⁻¹ kann mit ungeordneten Strukturen in Verbindung gebracht werden, während die kleine Bande bei 1611 cm⁻¹ durch exponierte β -Faltblätter erklärt werden kann.^[235] Wie schon in Kapitel 2.2.3 erwähnt, entsprechen die Flächen der jeweiligen Subbanden dem prozentualen Anteil der Sekundärstrukturen. Durch Auftragen der prozentualen Sekundärstrukturanteile als Funktion der Temperatur lässt sich die temperaturabhängige Veränderung der Subbanden grafisch nachverfolgen (Abbildung 4.4). Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass bis zu einem Temperaturanstieg von ~ 70 °C keine merklichen Veränderungen in der Sekundärstruktur stattfinden. Oberhalb von 70 °C wird eine deutliche Abnahme der ungeordneten (22.5 % \rightarrow 12.5 %) und β -Faltblattstrukturen (35 % \rightarrow 22.5 %) beobachtet, während der prozentuale Anteil an exponierten β -Faltblättern von 5 % auf 30 %

ansteigt. Daraus lässt sich schließen, dass ab einer Temperatur von 70 °C die Entfaltung und anschließende Aggregation des humanen γ D-Kristallin eintritt.

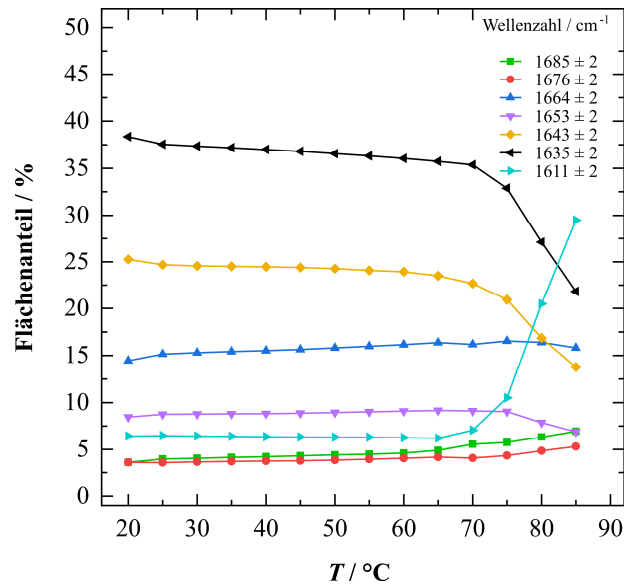


Abbildung 4.4: Sekundärstrukturanalyse von γ D-Kristallin (PDB: 1H4A). Prozentualer Flächenanteil der Sekundärstrukturen als Funktion der Temperatur bei 1 bar. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Um festzustellen, ob die native Proteinfaltung von γ D-Kristallin bis zum höchsten in dieser kinetischen Studie verwendeten Druck erhalten bleibt, wurden zusätzlich zu den temperaturabhängigen FT-IR Messungen druckabhängige Messungen durchgeführt. Die druckabhängigen strukturellen Eigenschaften von γ D-Kristallin wurden sowohl in der homogenen Phase bei 24 °C und im phasengetrenten Zustand bei 4 °C untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es auch, mögliche strukturelle Veränderungen beim Übergang von der homogenen Phase zum phasengetrenten Zustand zu erkennen. Darüber hinaus ermöglichen die Daten auch festzustellen, ob die LLPS einen stabilisierenden bzw. destabilisierenden Einfluss auf die strukturelle Stabilität des Proteins hat. Abbildung 4.5 zeigt die druckabhängigen Amid-I'-Banden von 5 Gew.-% γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) bei 4 °C und 24 °C in einem Druckbereich von 1 – 10000 bar.

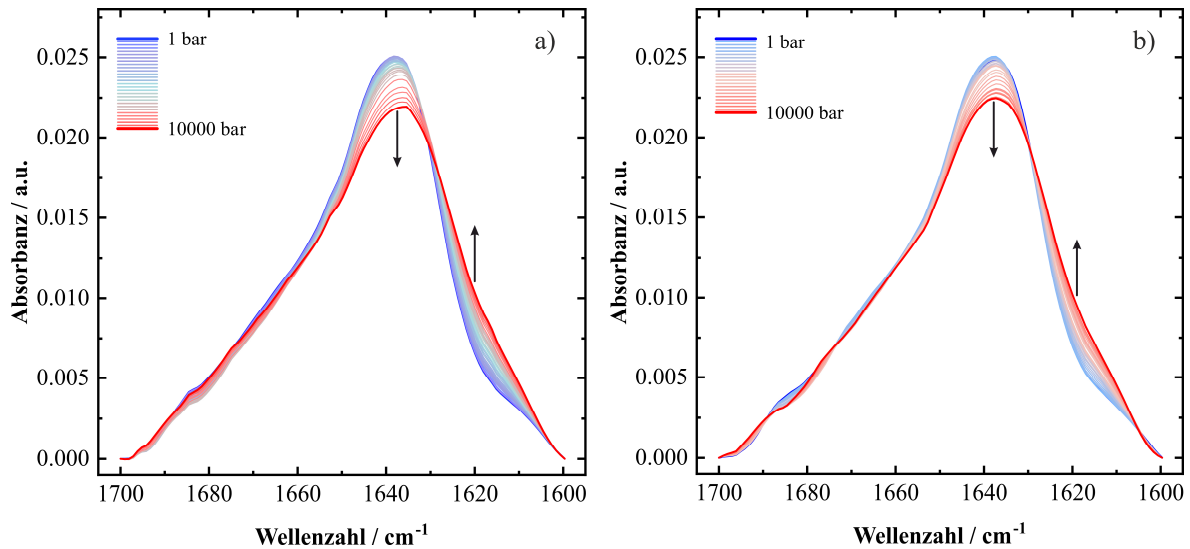


Abbildung 4.5: Flächennormierte FT-IR Spektren ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) der druckabhängigen Messungen einer γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pD = 7.4) im Bereich von 1 – 10000 bar bei a) 24 °C und b) bei 4 °C. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Beide Amid-I'-Banden besitzen bei Atmosphärendruck ein Maximum bei 1639 cm^{-1} , dessen Intensität mit zunehmendem Druck abnimmt, während sich zeitgleich eine Schulter bei $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ bildet, die auf eine geringfügige druckabhängige Strukturänderung hinweist. Diese Veränderungen sind in den zugehörigen Differenzspektren deutlicher zu erkennen (Abbildung 9.7). Aus der Intensitätsverschiebung lässt sich deuten, dass der Anteil der ungeordneten Strukturen mit zunehmendem Druck abnimmt, während der Anteil der β -Faltblätter und exponierten Seitenketten gleichzeitig zunimmt. Ein direkter Vergleich der druckabhängigen FT-IR-Absorptionsspektren bei 4 °C und 24 °C (Abbildung 4.5) zeigt keine signifikanten Unterschiede. Um diese vorläufige Vermutung zu validieren, wurde eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse durchgeführt. In Analogie zu den temperaturabhängigen Messungen wurden aus dem Vergleich der zweiten Ableitung der Amid-I'-Bande und der FSD sieben Subbanden ermittelt. Die sich daraus ergebenden Amid-I'-Banden bei 24 °C und 4 °C werden mit den angepassten Subbanden in Abbildung 4.6 dargestellt.

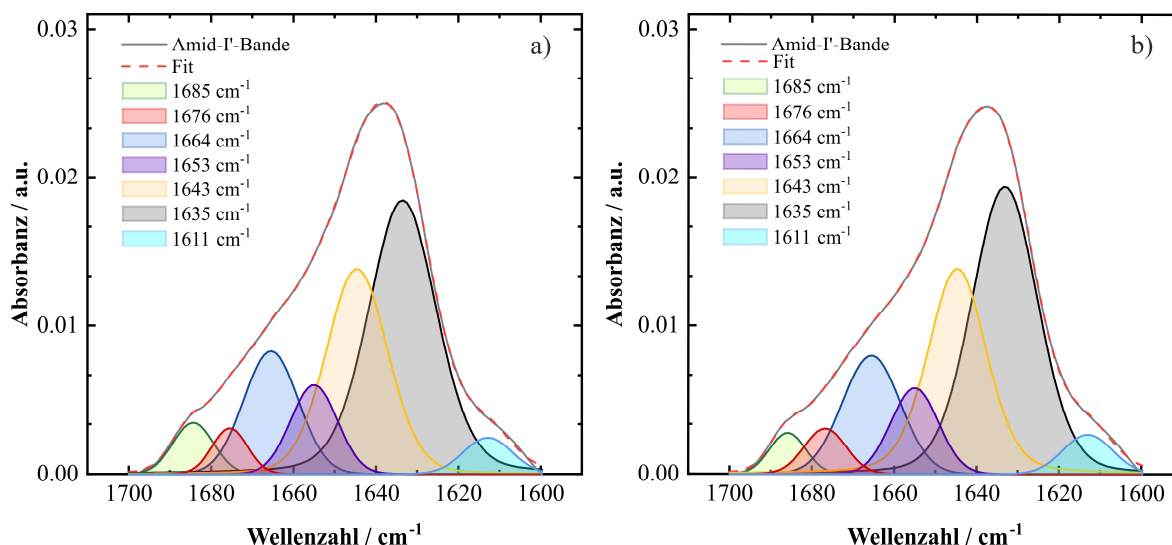


Abbildung 4.6: Flächennormierte Amid-I'-Banden ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) bei a) $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und b) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ von γ D-Kristallin in D_2O -Lösung mit den angepassten Subbanden bei 1 bar. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Die Zuordnung der Subbanden zu den jeweiligen Sekundärstrukturen entspricht der Zuordnung wie bei den zuvor gezeigten temperaturabhängigen FT-IR Messungen. Der direkte Vergleich der Subbanden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $24 \text{ }^\circ\text{C}$ zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede in den prozentualen Sekundärstrukturanteilen gibt (Tabelle 4.3). Dies deutet darauf hin, dass die Bildung der LLPS nicht durch eine Sekundärstrukturänderung des Proteins angetrieben wird.

Tabelle 4.3: Sekundärstrukturanteile von γ D-Kristallin in D_2O -Lösung bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $1 \text{ }^\circ\text{C}$ bei Atmosphärendruck.

Wellenzahl / cm^{-1}	1685	1676	1664	1653	1643	1635	1611
$24 \text{ }^\circ\text{C}$	4.2 %	3.2 %	13.7 %	8.4 %	26.8 %	40.3 %	3.5 %
$4.0 \text{ }^\circ\text{C}$	3.0 %	3.8 %	14.0 %	8.3 %	26.5 %	40.7 %	3.9 %

Die detaillierte Sekundärstrukturanalyse in Abbildung 4.7 zeigt, dass das phasentrennte System während der Druckerhöhung weder eine stabilisierende noch eine destabilisierende Wirkung auf das Protein hat. Zwischen 1 und ~ 5 kbar unterliegt γ D-Kristallin nur einer sehr geringen Konformationsänderung, wobei der prozentuale Anteil der β -Faltblattstrukturen auf Kosten der ungeordneten Strukturen leicht zuzunehmen scheint. Dieser Trend ist bei Drücken jenseits von 5 kbar ausgeprägter, wobei sich diese Veränderungen bei 10 kbar auf etwa 10 % belaufen. Eine druckinduzierte Entfaltung des Proteins hätte erfahrungsgemäß

zum Auftreten einer Subbande bei 1643 cm^{-1} geführt^[42,231], die der *random-coil*-Struktur entspricht. Insgesamt ist γ D-Kristallin sehr druckstabil und selbst bei einem Druck von 10 kbar findet keine Entfaltung statt. Monomere Proteine entfalten üblicherweise bei einem Druck zwischen 4 und 8 kbar.^[42,123,207,210,236] Daher finden im gesamten Druckbereich der im weiteren Verlauf vorgestellten Drucksprung-Kinetikstudien keine strukturellen Veränderungen des Proteins statt.

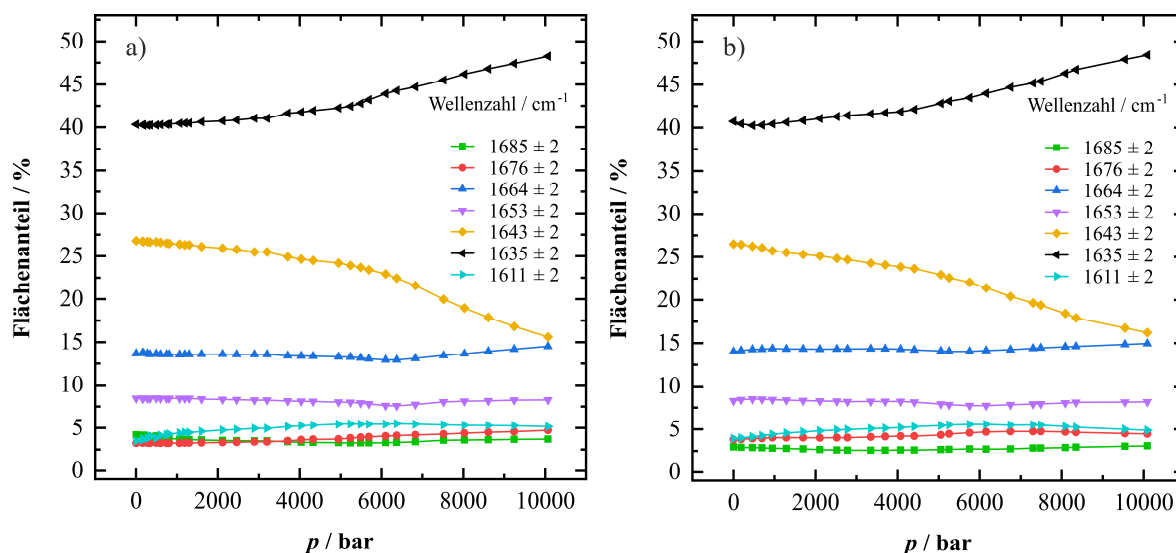


Abbildung 4.7: Sekundärstrukturanalyse von γ D-Kristallin (PDB: 1H4A). Prozentualer Flächenanteil der Sekundärstrukturen als Funktion des Drucks bei a) $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ und b) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

4.3 Temperaturabhängige Turbiditätsmessungen

Als zweite Voraussetzung für die Drucksprung-Relaxationsstudie galt es, das Phasendiagramm des LLPS-Systems bei unterschiedlichen Kosolvens-Bedingungen zu erstellen. Zu Beginn der Studie wurde das konzentrationsabhängige Phasenverhalten einer reinen γ D-Kristallin-Lösung bestimmt. Hierzu wurden temperaturabhängige Turbiditätsmessungen von γ D-Kristallin bei 400 nm in einem Konzentrationsbereich von 20 – 150 mg mL⁻¹ aufgenommen. Für eine exakte Bestimmung der konzentrationsabhängigen Trübungspunkte wurden die jeweiligen Proben verschiedener Konzentrationen in 0.5 °C-Schritten heruntergekühlt, bis ein Anstieg der scheinbaren Absorption beobachtet wurde. Die aus den Turbiditätsmessungen gewonnenen Trübungspunkttemperaturen wurden anschließend gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Das daraus resultierende T - c_{CryGD} -Phasendiagramm für γ D-Kristallin in einem Konzentrationsbereich von 20 – 150 mg mL⁻¹ wird in der folgenden Abbildung 4.8 gezeigt.

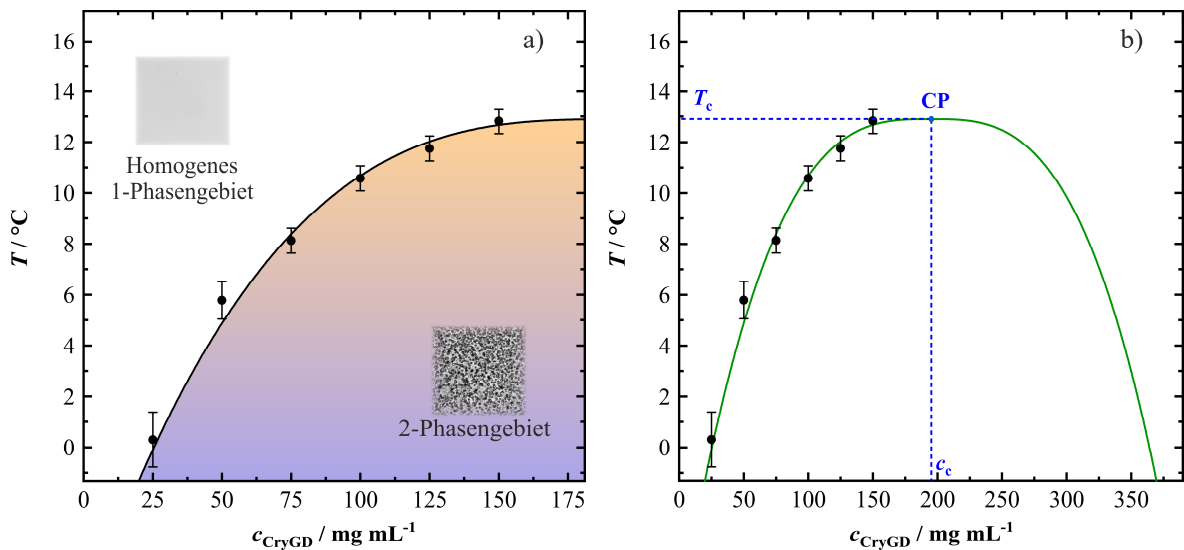


Abbildung 4.8: a) T - c_{CryGD} -Phasendiagramm von γ D-Kristallin in reiner Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) bei Umgebungsdruck. Der LLPS-Bereich ist durch eine farbige Schattierung gekennzeichnet (orange zu lila: abnehmende Temperatur). Die homogenen und phasengetrenten Bereiche sind durch lichtmikroskopische Bilder hervorgehoben. Die Datenpunkte zur Bestimmung der Trübungspunkte stammen aus den temperatur- und konzentrationsabhängigen Turbiditätsmessungen. b) Anpassung der Koexistenzkurve an die Datenpunkte gemäß der Gleichung (4.1) und dem kritischen Parameter $\beta = 0.33$, der die Form der Koexistenzkurve im Bereich des kritischen Punktes (CP) beschreibt. c_c ist die kritische Konzentration und T_c die kritische Temperatur. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Aus den konzentrationsabhängigen Messungen geht hervor, dass die Trübungspunkttemperatur stark von der Proteinkonzentration abhängig ist. Besonders im unteren Konzentrationsbereich von 25 – 100 mg mL⁻¹ ist mit zunehmender Proteinkonzentration ein drastischer Anstieg der Trübungspunkttemperatur zu verzeichnen, der bei weiterer Konzentrationserhöhung allmählich abflacht und sich scheinbar einem Plateau nähert. Bei einer Proteinkonzentration von 25 mg mL⁻¹ wurde eine Trübungspunkttemperatur von 0.0 ± 1.1 °C ermittelt, die sich bei einer Konzentrationserhöhung auf 100 mg mL⁻¹ auf 10.5 ± 0.5 °C verschiebt. Bei der höchsten gemessenen Proteinkonzentration von 150 mg mL⁻¹ wurde eine weitere, jedoch geringe Verschiebung der Trübungspunkttemperatur auf 12.8 ± 0.5 °C beobachtet. Messungen der T - $c_{\text{Cr}y\text{GD}}$ -Zweiphasen-Koexistenzregion bei höheren Proteinkonzentrationen erwies sich als schwierig, da die Viskosität der Lösung mit zunehmender Konzentration drastisch anstieg, was schließlich zur Gelbildung führte. In Anlehnung an die Studie von Thomson et al.^[237] ist es möglich, eine Zweiphasen-Koexistenzkurve an die gemessenen Datenpunkte zu fitten und somit auf theoretischer Ebene die Phasentrennung in der Nähe des kritischen Punkts zu beschreiben. Dementsprechend wurde eine Anpassung der Koexistenzkurve an die gemessenen Datenpunkte gemäß der folgenden Gleichung vorgenommen.

$$\left| \frac{c-c_c}{c_c} \right| = w \left| \frac{T_c-T}{T_c} \right|^\beta \quad (4.1)$$

Hierbei ist $c = c_{\text{Cr}y\text{CD}}$ die Konzentration einer der beiden Phasen in mg mL⁻¹, c_c die kritische Konzentration, T_c die kritische Temperatur in Kelvin K und w eine dimensionslose Größe, die die Breite der Koexistenzkurve charakterisiert. Mit dem kritischen Parameter $\beta = 0.33$ wurde für die kritische Konzentration ein Wert von $c_c = 195 \pm 14$ mg mL⁻¹ ermittelt. Für die kritische Temperatur ergibt sich somit ein Wert von $T_c = 13.0 \pm 0.5$ °C und für $w = 2.4 \pm 0.1$. Abbildung 4.8b zeigt den kritischen Punkt (CP) und die angepasste Koexistenzkurve, die sich aus den genannten Parametern und der Gleichung (4.1) ergeben.

In Anlehnung an das konzentrationsabhängige Phasenverhalten einer reinen γD -Kristallin-Lösung wurde als nächstes die temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung bei unterschiedlichen γD -Kristallin-Lösungen und Kosolvens-Bedingungen untersucht. Wie bei der reinen Proteinlösung wurde die Turbidität von γD -Kristallin für verschiedene Kosolvens-Bedingungen bei 400 nm gemessen. Während der Untersuchungen wurde das Osmolyt TMAO, das Crowding Agens Ficoll und das chaotrope Agens Harnstoff bei ausgewählten Konzentrationen eingesetzt. Für eine exakte Bestimmung der konzentrationsabhängigen

Trübungspunkte wurden die Proben verschiedener Konzentrationen schrittweise (in 0.5 °C-Schritten) herunter gekühlt, bis ein Anstieg der scheinbaren Absorption beobachtet wurde.

Abbildung 4.9a zeigt die aus den Turbiditätsmessungen gewonnenen Trübungspunkttemperaturen als Funktion der TMAO-Konzentration bei ausgewählten γ D-Kristallin-Konzentrationen.

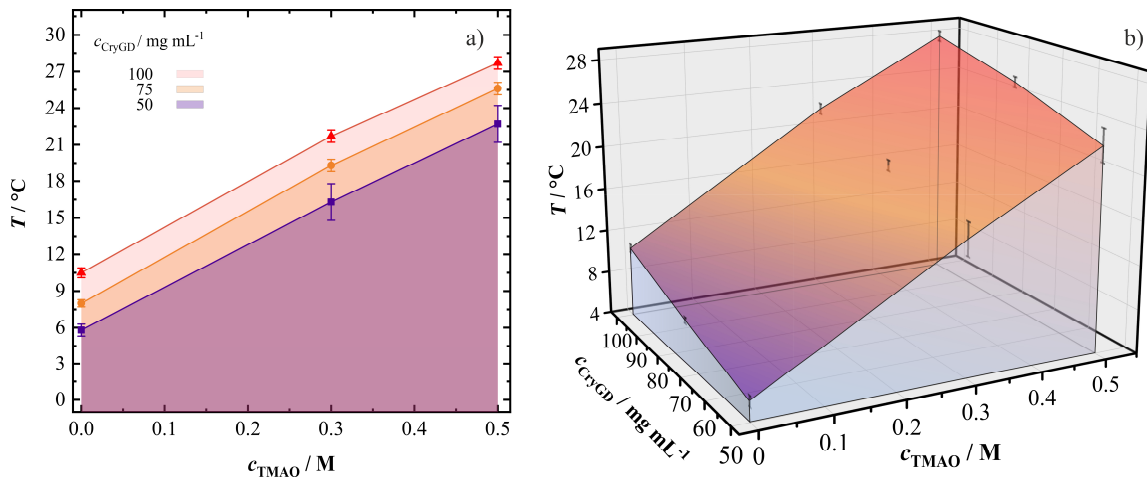


Abbildung 4.9: a) Der Einfluss von Temperatur, TMAO und der Proteinkonzentration auf die LLPS von γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und b) das zugehörige T - c_{CrGD} - c_{TMAO} 3D-Phasendiagramm. Die Datenpunkte für die Bestimmung der Trübungspunkte wurden den Turbiditätsexperimenten entnommen (die Fehlerbalken ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Messungen). Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Wie schon in Kapitel 3.2 gezeigt, führt die Zugabe von TMAO zu einer deutlich erkennbaren Erhöhung der Trübungspunkttemperatur. Für eine 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung erhöht sich die Trübungspunkttemperatur in Anwesenheit von 0.5 M TMAO von $5.8 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $22.7 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Durch zusätzliche Erhöhung der Proteinkonzentration auf 100 mg mL^{-1} wird eine weitere Verschiebung der Trübungspunkttemperatur auf $27.7 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ beobachtet. Die Messdaten lassen vermuten, dass innerhalb des gemessenen Protein- und TMAO-Konzentrationsbereichs eine Erhöhung der TMAO-Konzentration einen gleichmäßigen Anstieg der Trübungspunkttemperatur bewirkt. Somit war es möglich, die Trübungspunkttemperatur der jeweiligen γ D-Kristallin-Konzentrationen durch die Zugabe von TMAO um das 3 – 3.5 fache zu erhöhen. Abbildung 4.9b zeigt das entsprechende T - c_{CrGD} - c_{TMAO} 3D-Phasendiagramm. Im Phasendiagramm wird der temperaturerhöhende Effekt auf die Trübungspunkttemperatur, der sich aus dem Zusammenspiel der Protein- und TMAO-Konzentration ergibt, nochmals verdeutlicht.

Da bekanntermaßen die Auswirkungen von Harnstoff auf biomolekulare Strukturen im Allgemeinen denen von TMAO entgegengesetzt sind^[238,239], wurde ebenfalls der Einfluss von

Harnstoff als Kosolvens auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin untersucht. Die aus den Turbiditätsmessungen gewonnenen Trübungspunkttemperaturen wurden als Funktion der Harnstoffkonzentration bei ausgewählten γ D-Kristallin-Konzentrationen aufgetragen und sind in der Abbildung 4.10 gezeigt.

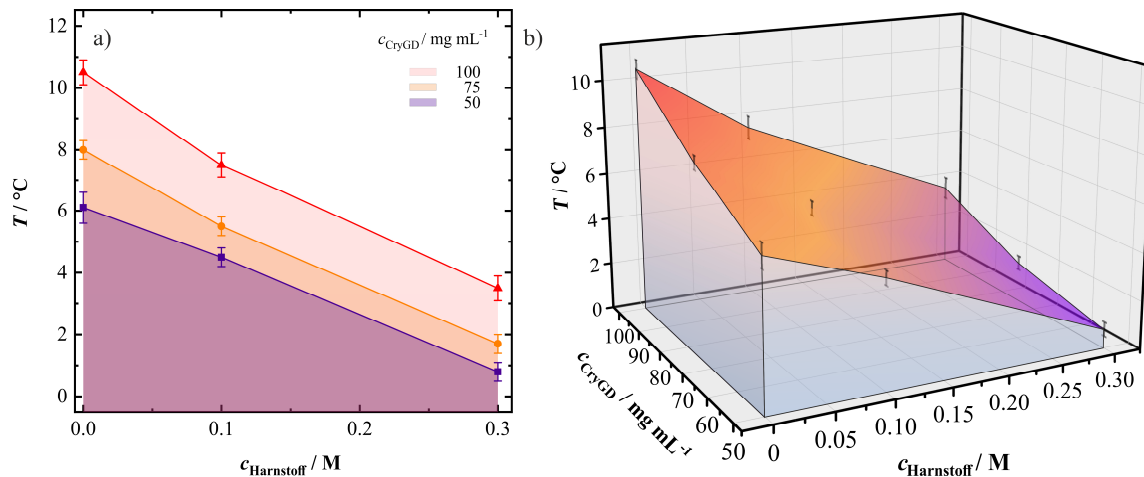


Abbildung 4.10: a) Der Einfluss von Temperatur, Harnstoff und Proteinkonzentration auf die LLPS von γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und b) das zugehörige T - c_{CryGD} - $c_{\text{Harnstoff}}$ 3D-Phasendiagramm. Die Datenpunkte für die Bestimmung der Trübungspunkte wurden den Turbiditätsexperimenten entnommen (die Fehlerbalken ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Messungen). Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Im Gegensatz zu TMAO zeigen die Turbiditätsmessungen, dass Harnstoff die Trübungspunkttemperatur senkt. Die Trübungspunkttemperatur von 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 0.3 M Harnstofflösung verringert sich von $6.1 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $0.8 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$, während eine gleichzeitige Steigerung der Proteinkonzentration auf 100 mg mL^{-1} die Trübungspunkttemperatur lediglich um $2.7 \text{ }^\circ\text{C}$ wieder erhöht. Des Weiteren fällt auf, dass der temperaturerhöhende Effekt durch die Proteinkonzentrationserhöhung in Anwesenheit von Harnstoff geringfügig reduziert wird. In reiner Lösung von γ D-Kristallin bewirkt die Konzentrationserhöhung auf 100 mg mL^{-1} eine Verschiebung der Trübungspunkttemperatur um $4.4 \text{ }^\circ\text{C}$, während in Gegenwart von Harnstoff die Verschiebung zu höheren Temperaturen nur noch $2.7 - 3 \text{ }^\circ\text{C}$ beträgt.

Abschließend wurden die Auswirkungen des Crowder-Moleküls Ficoll auf das temperaturabhängige Phasenverhalten von γ D-Kristallin untersucht. Für die Untersuchungen wurde Ficoll[®] PM 70 (Molekülmasse: 70 kDa) verwendet, dessen hydrodynamischer Radius R_0 (Stokes-Radius) 5.1 nm beträgt und verhältnismäßig doppelt so groß ist wie das des monomeren γ D-Kristallin-Proteins ($R_0 = 2.3 \pm 0.1 \text{ nm}$).^[240] Wie bei dem Osmolyt TMAO wird in Anwesenheit von Ficoll eine Verschiebung der LLPS zu höheren Temperaturen beobachtet.

Für eine 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung mit 200 mg mL^{-1} Ficoll, was einer typischen makromolekularen „Crowding“-Situation in biologischen Zellen entspricht,^[241] wurde eine Trübungspunkttemperatur von $5.8 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $18.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ beobachtet. Im Zusammenspiel mit einer 100 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung konnte die Phasenübergangstemperatur bis auf $30.5 \text{ }^\circ\text{C}$ verschoben werden (Abbildung 4.11). Im Gegensatz zu Harnstoff verstärkt Ficoll den temperaturerhöhenden Effekt der Proteinkonzentrationserhöhung.

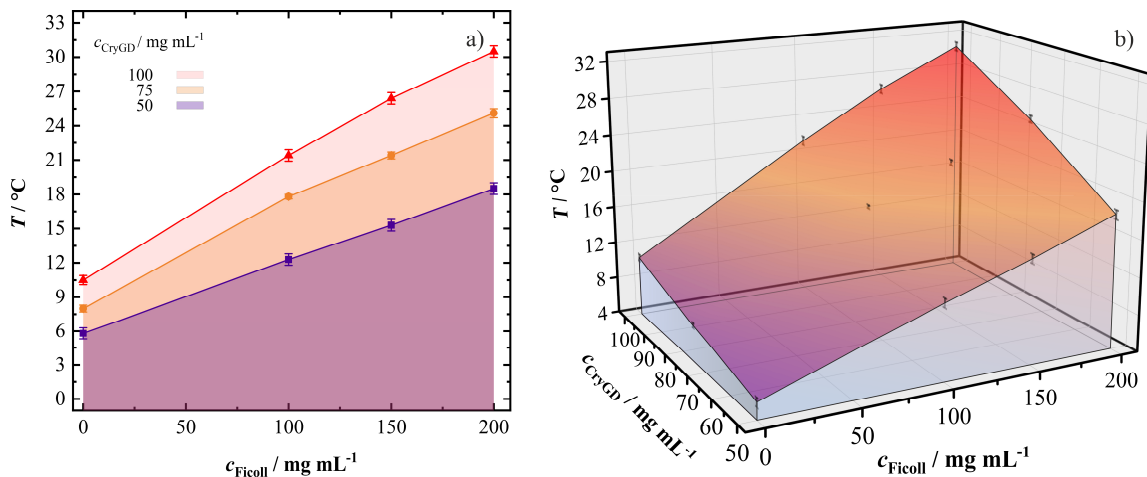


Abbildung 4.11: a) Der Einfluss von Temperatur, Ficoll und der Proteinkonzentration auf die LLPS von γ D-Kristallin (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und b) das zugehörige T - c_{CryGD} - c_{Ficoll} 3D-Phasendiagramm. Die Datenpunkte für die Bestimmung der Trübungspunkte wurden den Turbiditätsexperimenten entnommen (die Fehlerbalken ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Messungen). Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

In Abbildung 4.12 werden die UV/Vis-Absorptionsdaten von reinem 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin als Funktion der Temperatur bei atmosphärischem Druck und in Gegenwart der drei Kosolventien TMAO, Harnstoff und Ficoll bei ausgewählten Konzentrationen zusammengefasst. Das γ D-Kristallin weist bei Umgebungsdruck einen temperaturbedingten Trübungspunkt, T_{cloud} , bei $\sim 6 \text{ }^\circ\text{C}$ auf, während sich oberhalb von $\sim 7 \text{ }^\circ\text{C}$ eine homogene Phase bildet. Die Zugabe von 0.3 M Harnstoff führt zu einer Abnahme von T_{cloud} auf $1 \text{ }^\circ\text{C}$. Umgekehrt führt die Zugabe von 15 Gew.-% Ficoll und 0.3 M TMAO zu einem Anstieg der T_{cloud} auf $\sim 15 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $\sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abbildung 4.12a). Die repräsentativen lichtmikroskopischen Bilder verdeutlichen den phasentrennten und homogenen Zustand der Pufferlösung. Das Aussehen der Tröpfchenphase, d.h. die Größe ($\sim 5 \text{ }\mu\text{m}$) und die Form der Tröpfchen, scheint sich mit den verschiedenen Kosolventien nicht wesentlich zu verändern.

Abbildung 4.12b zeigt die druckabhängigen Absorptionsdaten bei $T = 1 \text{ }^\circ\text{C}$ für die vier verschiedenen Lösungsmittelbedingungen. Wie deutlich zu erkennen ist, bewirkt die Zugabe der Kosolventien eine Verschiebung des Drucks, der den Übergang vom entmischten zum

homogenen Zustand bewirkt. Harnstoff verschiebt den Übergang zu niedrigeren Drücken. Umgekehrt sind in den Lösungen mit Ficoll und TMAO deutlich höhere Drücke erforderlich, um den Übergang einzuleiten, d.h. das Kosolvens TMAO und das Crowding Agens Ficoll stabilisieren die Tröpfchenphase von γ D-Kristallin, während der chaotrope Harnstoff den gegenteiligen Effekt bewirkt.

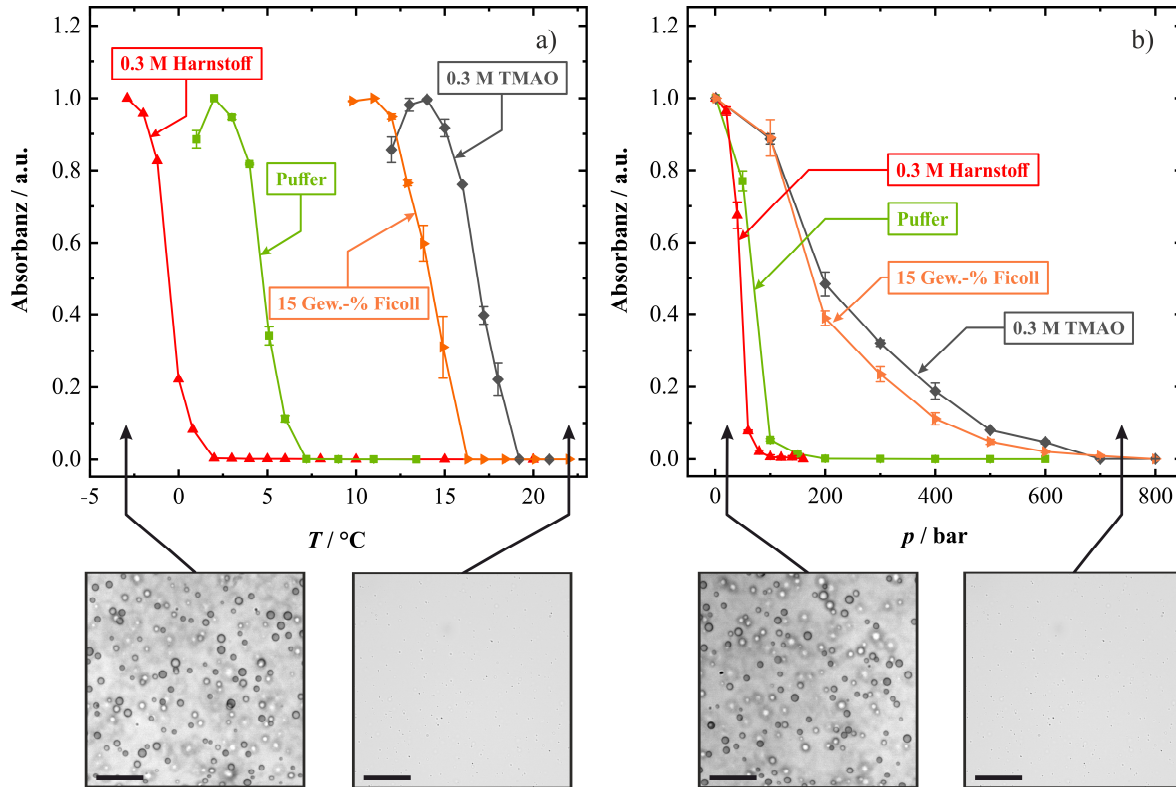


Abbildung 4.12: Repräsentative Turbiditätsmessungen bei 400 nm einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung in Abhängigkeit a) der Temperatur in Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4), 0.3 M Harnstoff, 15 Gew.-% Ficoll und 0.3 M TMAO und b) des Drucks bei $T = 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Unten: Lichtmikroskopische Momentaufnahmen von γ D-Kristallin, die den phasengetretenen und den homogenen Zustand der Lösung zeigen. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $30 \text{ }\mu\text{m}$. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

4.4 Drucksprung-Relaxationsexperimente

Aufbauend auf der Kenntnis der Phasengrenzen des Zweiphasensystems des Proteins bei unterschiedlichen Lösungsmittelbedingungen konnten anschließend die Kinetikmessungen durchgeführt werden. Die hier verwendeten schnellen und zeitlich hoch aufgelösten (Totzeit 50 – 100 ms) p -Sprünge über die Phasengrenzen hinweg eignen sich hervorragend zur Untersuchung der Kinetik der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung. Prinzipiell wären auch lasertechnikgestützte Temperatursprünge möglich. Jedoch wird, abhängig von den Eigenschaften der Probe und den damit verbundenen Relaxationszeiten, oft das Temperaturprofil und nicht der eigentliche Prozess des Systems erfasst. Auch eine Temperaturänderung zu niedrigeren Temperaturen ist schwierig zu bewerkstelligen. Da druckabhängige Prozesse unterhalb eines Drucks von 10 kbar bei Proteinen in der Regel vollständig reversibel sind, eignen sich bidirektionale p -Sprünge, wie sie hier verwendet werden, besser. Zu Beginn des Experiments befindet sich das System in einem stabilen Gleichgewichtszustand, der durch eine abrupte Druckänderung gestört wird und so eine Zustandsänderung des Systems hervorruft. Währenddessen wird die Zeit gemessen, die das System benötigt, um den neuen Gleichgewichtszustand zu erreichen.

Zunächst wurde das Phasenverhalten von γ D-Kristallin bei zyklisch wiederholenden Drucksprüngen untersucht. Abbildung 4.13 zeigt eine Reihe von aufeinanderfolgenden Druckzyklen ($\Delta p = 800$ bar) durch den Phasenübergangsbereich von einer reinen 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin. Die während der Drucksprünge abrupt ansteigenden Absorptionsintensitäten sind auf die zunehmende Trübung (Lichtstreuung) und die damit verbundene Tröpfchenbildung (Koazervation) in der Probenlösung zurückzuführen. Dementsprechend spiegeln Absorptionsintensitäten von $A \approx 0$ eine klare, homogene Phase in der Probenlösung wider. Die hier gezeigte Messreihe setzt sich aus acht Drucksprungzyklen zusammen, während sich ein Drucksprungzyklus aus einer abrupten Druckverringerung und anschließender Druckerhöhung zusammensetzt. Aus den Daten geht hervor, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin sowohl eine gute druckinduzierte Schaltfähigkeit als auch eine vollständige Reversibilität der Phasenübergänge aufweist.

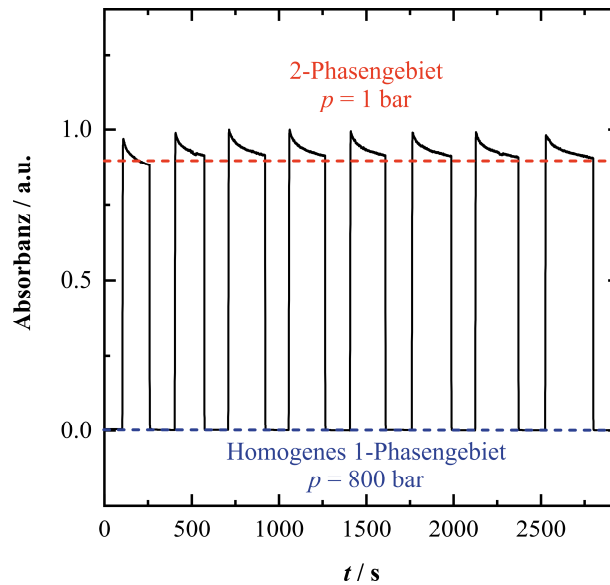


Abbildung 4.13: Drucksprungzyklen durch den Phasenübergangsbereich von 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in Pufferlösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$, wobei die vollständige Reversibilität des Phasenübergangs gezeigt wird. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

In Abbildung 4.14a sind die Absorptionsdaten einer reinen 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung bei $3 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem schnellen p -Sprung von verschiedenen Anfangsdrücken in Richtung des Umgebungsdrucks (1 bar) zum Zeitpunkt $t = 0$ gezeigt. Die scheinbare Absorption (Turbidität) A nimmt beim Übergang aus der homogenen Phase in den Flüssig-Flüssig-phasengetrennten Bereich rasch zu und flacht nach etwa 4.4 s beim Erreichen des neuen Gleichgewichtszustands ab. Abbildung 4.14b zeigt die p -Sprungdaten in Richtung der Druckerhöhung. Wie aus den Daten ersichtlich wird, weist der drucksprunginduzierte Übergang vom phasenseparierten Zustand in die homogene Phase eine dreimal schnellere Übergangskinetik auf als der Phasenübergang von der homogenen in die phasenetrennte Lösung.

Zur Auswertung der Kinetikdaten wurde an die zeitabhängig gemessenen Drucksprungdaten die Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov-Funktion (JMAK) gefittet. Gemäß der Gleichung (2.15) gilt für den Übergang in den LLPS-Bereich $\theta_d \sim A = 1 - \exp(-kt)^n$ sowie $\theta_d \sim A = \exp(-kt)^n$ beim Wiedereintritt in die homogene Phase, wobei n der sogenannte Avrami-Exponent und k eine scheinbare Geschwindigkeitskonstante ist. $A(t)$ ist proportional zum zeitabhängigen Volumenanteil $V_{\text{Tröpfchen}}/V$ der kondensierten Tröpfchenphase. Aufgrund der normierten Absorptionsdaten wird der Vorfaktor C in Gleichung (2.15) auf $C = 1$ gesetzt. Aus den gemessenen Kinetikdaten konnte direkt die Gesamtübergangszeit t_{tr} und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt werden. Hierbei ist t_{tr} die Zeit, die das System für den vollständigen

Phasenübergang und zum Erreichen des neuen Gleichgewichtszustands benötigt, während $t_{1/2}$ die Zeit ist, in der die Hälfte der Absorptionsintensitätsänderungen erreicht wird. Zusätzlich zu den Messungen bei unterschiedlichen Druckamplituden wurden auch Messungen bei weiteren ausgewählten Temperaturen durchgeführt. Die erhaltenen Daten für eine reine 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung sind in der Tabelle 9.1 und Tabelle 9.2 der aufgeführt

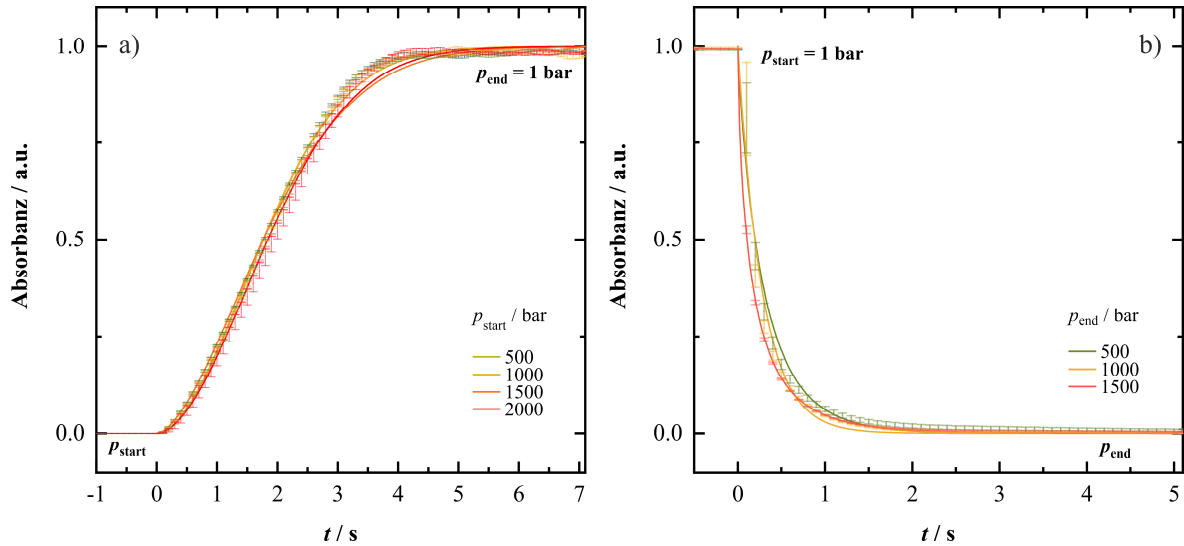


Abbildung 4.14: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption (Turbidität) A einer reinen 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$) bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Druckamplitude a) von hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung) und b) von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Bei einer Temperatur von $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden für den Phasenübergang von der homogenen Phase in den LLPS-Bereich (Druckverringering) eine Gesamtübergangszeit von $t_{\text{tr}} = 4.4 \pm 0.3 \text{ s}$ und eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1.8 \pm 0.1 \text{ s}$ erhalten. Interessanterweise hat die Änderung der p -Sprungamplitude keinen ersichtlichen Einfluss auf die Kinetik der Phasentröpfchenbildung. Eine Verringerung der Temperatur von $3 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ führt zu einer leichten Erhöhung der Werte (etwa 1.0 s für t_{tr} und 0.3 s für $t_{1/2}$). Aus dem Vergleich der Abbildung 4.14a und b ergibt sich, dass in Richtung der Druckerhöhung, d.h. vom LLPS-Bereich zur homogenen Phase, die Kinetik schneller verläuft als in die gegengesetzte Richtung. So wurden für den Phasenübergang vom LLPS-Bereich in die homogene Phase Werte von $t_{\text{tr}} = 1.5 \pm 0.2 \text{ s}$ und $t_{1/2} = 0.2 \pm 0.1 \text{ s}$ bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde der Einfluss unterschiedlicher TMAO-Konzentrationen auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung untersucht. Wie schon

zuvor bei einer reinen Lösung von γ D-Kristallin beobachtet, hat auch hier die Änderung der p -Sprungamplitude keinen ersichtlichen Einfluss auf die Kinetik der Phasentröpfchenbildung (Abbildung 9.13, Tabelle 9.3). Dementsprechend werden in Abbildung 4.15 die Auswirkungen unterschiedlicher TMAO-Konzentrationen auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung bei $T = 3^\circ\text{C}$ und einer konstanten p -Sprungamplitude von 1000 bar gezeigt.

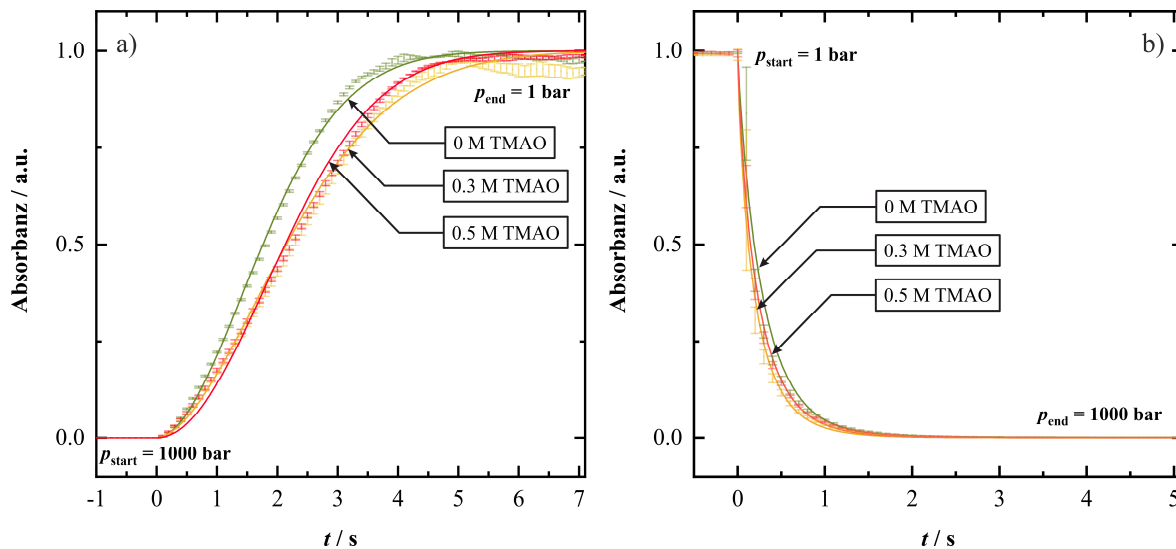


Abbildung 4.15: Der Einfluss unterschiedlicher TMAO-Konzentrationen auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) bei $T = 3^\circ\text{C}$ a) während der Druckverringерung (LLPS-Bildung) und b) der Druckerhöhung (Verschwinden des LLPS) bei konstanter p -Sprungamplitude von 1000 bar. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Aus den Daten (Tabelle 9.5) ist zu entnehmen, dass mit zunehmender TMAO-Konzentration ein leichter Anstieg der Gesamtübergangszeit ($t_{\text{tr}} = 4.9 \pm 0.1 \text{ s}$ für 0.3 M TMAO und $t_{\text{tr}} = 5.4 \pm 0.1 \text{ s}$ für 0.5 M TMAO) während der LLPS-Bildung bei 3°C stattfindet ($t_{1/2} = 2.2 \text{ s}$). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass mit zunehmender TMAO-Konzentration die Bildung größerer Phasentröpfchen leicht benachteiligt wird, da TMAO die energetisch ungünstige Bildung von kleineren Tröpfchen stabilisiert. TMAO ist in der Lage, bevorzugt mit Bulk-Wasser zu interagieren, was zu einer verstärkten Wasserstoffbrückenbindung führt. Gleichzeitig wird TMAO bevorzugt von der Protein-Grenzfläche ausgeschlossen, wodurch die Hydratation verstärkt wird. Aufgrund des *excluded-volume* Effekts werden dichtere und kompaktere Strukturen begünstigt.^[6,117] Wie in der reinen Pufferlösung ist die Übergangskinetik von der phasentrennten in die homogene Lösung (Druckerhöhung) um ein 10-faches schneller. Eine signifikante Auswirkung auf die Phasenübergangskinetik konnte an dieser

Stelle nicht festgestellt werden (Tabelle 9.5). Zwar lässt sich die Konzentration des Kosolvens TMAO in der proteinreichen Tröpfchenphase nicht ohne Weiteres bestimmen, da TMAO vorzugsweise mit dem Bulk-Wasser interagiert und von der Proteingrenzfläche ausgeschlossen wird, jedoch dürfte seine Konzentration in der proteinreichen Phase sehr viel geringer sein, so dass der Einfluss auf die Phasenübergangskinetik geringer ist, wie auch hier beobachtet wurde. Ähnlich wie bei γ D-Kristallin in reiner Pufferlösung bewirkt eine Erhöhung der Temperatur von 3 auf 11 °C eine leichte Verschiebung der Werte (~ 0.6 s für t_{tr} und 0.2 s für $t_{1/2}$) nach unten.

Aus den vorangegangenen Gleichgewichtsmessungen ging hervor, dass Harnstoff einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der LLPS von γ D-Kristallin hat. So zeigten die Untersuchungen, dass eine Harnstoffkonzentration von 0.5 M die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin vollständig unterdrückt und man bis zum Gefrierpunkt der Lösung eine homogene Phase beobachten konnte (Abbildung 9.8). Abbildung 4.16 zeigt den Einfluss verschiedener Harnstoffkonzentrationen auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin-Lösung bei $T = -2$ °C und einer konstanten p -Sprungamplitude von 1000 bar.

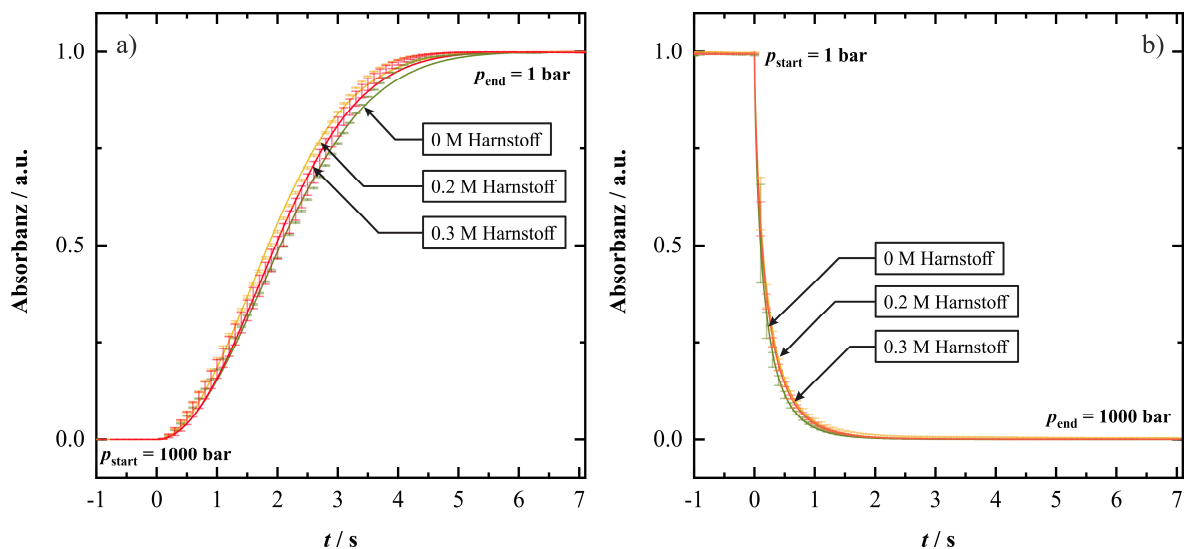


Abbildung 4.16: Der Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentration auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) bei $T = -2$ °C a) während der Druckverminderung (LLPS-Bildung) und b) der Druckerhöhung (Verschwinden des LLPS) bei konstanter p -Sprungamplitude von 1000 bar. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Im Gegensatz zu den Auswirkungen von Harnstoff auf das Gleichgewichtsphasenverhalten der Protein-LLPS hat die Zugabe von 0.2 M und 0.3 M Harnstoff keinen erkennbaren Effekt auf die Phasenübergangskinetik von γ D-Kristallin gezeigt (Tabelle 9.8). Auch variierende p -Sprungamplituden hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der Tröpfchenbildung (Abbildung 9.14, Tabelle 9.6)

Als letztes wurde der Einfluss des Crowding Agens Ficoll auf die Übergangskinetik von γ D-Kristallin untersucht. Auch in diesem Fall hat die Änderung der p -Sprungamplitude keine Auswirkung auf die Kinetik der Phasentröpfchenbildung (Abbildung 9.15 und Tabelle 9.9). Entsprechend sind in Abbildung 4.17 die Auswirkungen von unterschiedlichen Ficoll-Konzentrationen auf die Übergangskinetik der Protein-LLPS bei $T = 3\text{ °C}$ und einer konstanten p -Sprungamplitude von 1000 bar gezeigt.

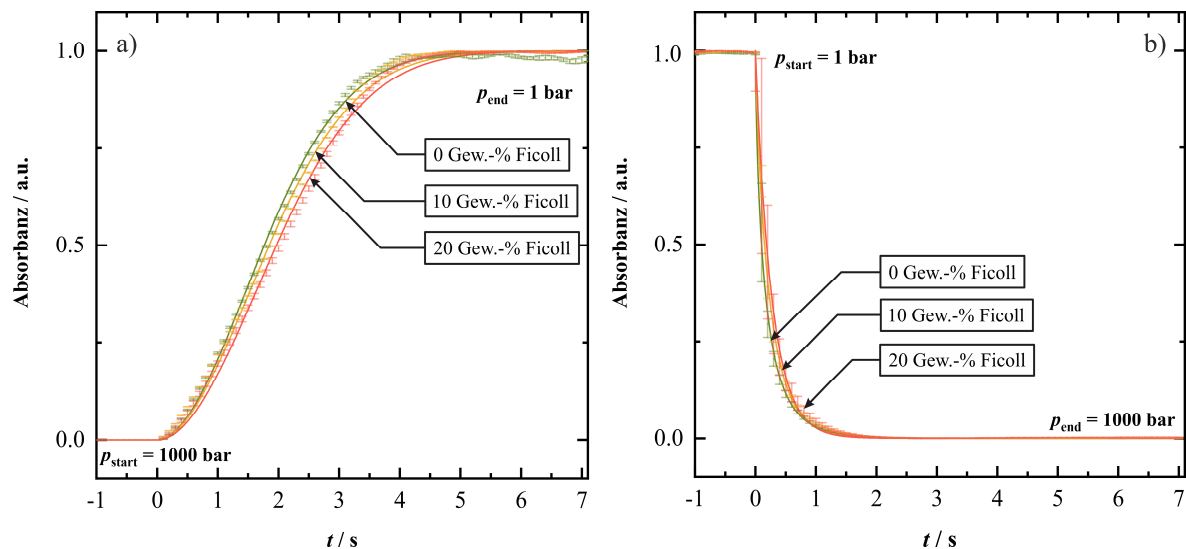


Abbildung 4.17: Der Einfluss unterschiedlicher Ficoll-Konzentration auf die Übergangskinetik einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) bei $T = 3\text{ °C}$ a) während der Druckverringerung (LLPS-Bildung) und b) der Druckerhöhung (Verschwinden des LLPS) bei konstanter p -Sprungamplitude von 1000 bar. Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[51]

Für Ficoll wurde ein ähnliches Verhalten wie bei TMAO beobachtet. So wurde mit steigender Ficoll-Konzentration eine leichte Erhöhung der Gesamtübergangszeit ($t_{\text{tr}} = 4.4 \pm 0.1\text{ s}$ für 0 Gew.-% Ficoll, $t_{\text{tr}} = 5.0 \pm 0.1\text{ s}$ für 10 Gew.-% Ficoll und $t_{\text{tr}} = 5.3 \pm 0.1\text{ s}$ für 20 Gew.-% Ficoll) beobachtet. Auch hier lässt sich diese Beobachtung durch den *excluded-volume* Effekts des Crowdners erklären, der kleinere Tröpfchen stabilisiert und somit deren Wachstumsrate verringert. Für den Phasenübergang von der phasenetrennten in die homogene Phase (Druckerhöhung) ist die Übergangskinetik mit $t_{\text{tr}} = 1.5\text{ s}$ und $t_{1/2} = 0.2\text{ s}$ erwar-

tungsgemäß schneller. Wie bei TMAO war keine konzentrationsbedingte Auswirkung auf die Phasenübergangskinetik zu beobachten (Tabelle 9.11). Dies war jedoch zu erwarten, da der makromolekulare Crowder weitgehend von der Tröpfchenphase ausgeschlossen wird, was auch der Grund für die erhöhte Temperaturstabilität der Tröpfchen ist.

Weiterführend wurden neben der Gesamtübergangszeit und der Halbwertszeit der Parameter k und der Avrami-Exponent n für die verschiedenen Kosolvens-Bedingungen bestimmt. Der Avrami-Exponent n kann physikalisch plausible Werte zwischen 1 und 4 annehmen, während der Parameter k eine Geschwindigkeitskonstante ist, die von der Keimbildung und der Wachstumsrate abhängt. Des Weiteren sind n und k abhängig von der Temperatur und können sich mit der Zeit ändern. Wie aus den Tabellen 9.5, 9.8 und 9.11 hervorgeht, beträgt der Avrami-Parameter n für alle Lösungsmittelbedingungen bei der LLPS-Bildung 1.9 ± 0.2 und liegt, unabhängig von der Kosolvens-Konzentration, innerhalb des experimentellen Fehlers. Die Geschwindigkeitskonstante k bewegt sich in der Größenordnung von 0.2 s^{-1} . Während die Geschwindigkeitskonstanten in reinem Puffer und in einer Harnstoff-Lösung ähnlich zueinander sind, nehmen die Geschwindigkeitskonstanten während der LLPS-Bildung in Anwesenheit von TMAO und Ficoll leicht ab. So sinkt beispielweise die Geschwindigkeitskonstante in einer 0.5 M TMAO-Lösung von $k = 0.24 \text{ s}^{-1}$ auf 0.15 s^{-1} und in einer 20 Gew.-% Ficoll-Lösung auf $k = 0.17 \text{ s}^{-1}$ bei $3 \text{ }^\circ\text{C}$ und spiegelt die Abnahme der Keimbildungs- und der Wachstumsrate bei Zugabe dieser Kosolventien wider. Für den Übergang von der phasenetrennten Lösung in die homogene Phase sinkt der Avrami-Exponent n und nimmt ein Wert um die 1.0 ($n = 0.9 \pm 0.1$) für alle Lösungsmittelbedingungen an. Hier finden keine Keimbildungs- und Wachstumsprozesse statt. Die Tröpfchen lösen sich lediglich schnell auf und bilden eine homogene Phase. In Übereinstimmung mit den oben angegebenen t_{tr} - und $t_{1/2}$ -Werten steigt die Geschwindigkeitskonstante k für den Übergang von der phasenetrennten Lösung in die homogene Phase bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ auf etwa $3.5 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ und ist für alle Lösungsmittelbedingungen ähnlich.

Ein Avrami-Parameter von $n = 2$ deutet auf eine nicht konstante Keimbildungsrate bei der LLPS-Bildung hin, für die sich $n = 4$ für eine homogene Keimbildung oder $n = 3$ für den unwahrscheinlichen Fall einer heterogenen Keimbildung ergeben würde.^[49,80,83] Im vorliegenden Fall wird ein diffusionsbegrenzter Wachstumsmechanismus beobachtet, der für eine konstante homogene Keimbildungsrate einen Wert von $n = 5/2$ voraussagt. Die geringe Abweichung von $n = 5/2$ könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Wachstumsrate sich mit der Zeit ändert. Dies spiegelt sich auch in den geringen Abweichungen zwischen

den angepassten Kurven und den experimentellen Datenpunkten zu Beginn und am Ende des Übergangs wider. Eine spinodale Entmischung wurde für keine der Lösungsbedingungen und Drucksprungamplituden beobachtet, woraus hervorgeht, dass Übergänge nur zwischen der homogenen Phase und dem metastabilen Zweiphasengebiet stattfanden (Abbildung 4.1).

4.5 Zusammenfassung und Fazit

Unter Verwendung von humanem γ D-Kristallin als Modellsystem für die Flüssig-Flüssig-Phasentrennungsphänomene globulärer Proteine wurde der Einfluss verschiedener Kosolventien auf das Gleichgewichtsphasenverhalten des Koexistenzbereichs und die Phasenübergangskinetik untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Drucksprung-Relaxationsmethode angewandt, die es ermöglichte, die Kinetik und den ihr zugrunde liegenden Mechanismus unter isothermen Bedingungen, daher ohne Änderung der thermischen Energie und der Stabilität des Proteins, zu untersuchen.

Als Voraussetzung für die kinetischen Untersuchungen wurde zunächst die Stabilität des Proteins für alle verwendeten Lösungsmittelbedingungen, Temperaturen und Drücke untersucht und die entsprechenden p , T , c -Phasendiagramme der LLPS bestimmt (Abbildung 4.8 – 4.11). Basierend auf der Studie von Thomson et al.^[237] konnten für die kritische Konzentration und für die kritische Temperatur des reinen Proteinsystems die Werte $c_c = 195 \text{ mg mL}^{-1}$ bzw. $T_c = 13 \text{ °C}$ ermittelt werden. Aus den temperatur- und druckabhängigen FT-IR Experimenten ging hervor, dass während der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung keine Veränderungen der Sekundärstruktur des Proteins stattfinden.

Grundsätzlich wird die LLPS-Bildung des Proteins durch eine Erhöhung der Temperatur und des Drucks ungünstig beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird bei niedrigen Temperaturen und Umgebungsdruck die kondensierte Phase von γ D-Kristallin durch zeitlich begrenzte (transiente) elektrostatische, hydrophobe und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Proteinmolekülen stabilisiert.^[53,54] Das Auflösen der Tröpfchenphase bei hohen Temperaturen kann durch einen Anstieg der Mischungsentropie erklärt werden, die bei ausreichend hohen Temperaturen den Term der kohäsiven intermolekularen Wechselwirkung dominiert. Des Weiteren wird angenommen, dass sich in den kondensierten Tröpfchenphasen, aufgrund der sich vorübergehend berührenden Proteinmoleküle, wasserfreie Hohlräume bilden. Infolgedessen wird die kondensierte Tröpfchenphase unter hohem Druck destabilisiert, da gemäß dem Prinzip von Le Chatelier^[210] eine Verringerung des Hohlraumvolumens durch eine homogene, verdünnte Phase erreicht werden kann, deren Bildung auch durch eine höhere Mischungsentropie begünstigt wird.^[53] Darüber hinaus werden hydrophobe Kontakte im Vergleich zu kompakten, aber lösungsmittelgetrennten Konfigurationen durch hohen Druck destabilisiert.^[40,53]

Die Forschungsdaten haben gezeigt, dass TMAO und das Crowding Agens Ficoll eine deutliche stabilisierende Wirkung auf den phasenseparierten Zustand von γ D-Kristallin haben. So wurde für eine 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung, nach Zugabe von 0.3 M TMAO bzw. 20 Gew.-% Ficoll, eine Erhöhung der Trübungspunkttemperatur ΔT_{cloud} , bis zu $\sim 17 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\sim 14 \text{ }^\circ\text{C}$ beobachtet. Außerdem wurde eine deutliche Erhöhung der Druckstabilität des Flüssig-Flüssig-Phasenbereichs beobachtet (z.B.: $\Delta p_{\text{cloud}} \approx 600 \text{ bar}$ für 0.3 M TMAO und $\Delta p_{\text{cloud}} \approx 600 \text{ bar}$ für 15 Gew.-% Ficoll). Eine physikalisch sinnvolle Erklärung für die erhöhte Temperatur- und Druckstabilität der LLPS von γ D-Kristallin durch TMAO wurde bereits in Kapitel 3.4 diskutiert.^[52,53] Aufgrund der starken Wechselwirkung von TMAO mit Wasser und zugleich ungünstigen Wechselwirkung mit Proteinen werden kompakte Proteinkonfigurationen in Anwesenheit von TMAO stabilisiert.^[6,117] Demnach kann TMAO dem druckbedingten Auflösen der Phasentröpfchen entgegenwirken, da die dichte Tröpfchenphase eine geringere lösungsmittlexponierte Proteinoberfläche und somit weniger ungünstige Wechselwirkungen mit TMAO aufweist als in der dispergierten homogenen Phase. Ein ähnliches Szenario kann für das Crowding Agens Ficoll in Betracht gezogen werden. Aufgrund des vom Crowding Agens verursachten repulsiven *excluded-volume* Effekts werden auch in diesem Fall kondensierte Strukturen begünstigt, was zu einer Erhöhung der Temperatur- und Druckstabilität der Tröpfchenphase führt. Die hier gezeigte drastische Erhöhung der Temperatur- und Druckstabilität der LLPS-Region, die durch die Zugabe des Tiefsee-Osmolyten TMAO und des makromolekularen Crowders erreicht wird, bietet Organismen, die extremen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, die Möglichkeit, die Stabilität ihrer Proteinkondensate zu regulieren. Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe des Chaotrops Harnstoff eine Destabilisierung des phasengetretenen Zustands. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Wechselwirkung von Harnstoff mit dem Proteinrückgrat und den Seitenketten von γ D-Kristallin zurückzuführen, wodurch eine Verringerung der schwachen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen in der Tröpfchenphase erreicht wird. Interessanterweise ist bereits 0.5 M Harnstoff in der Lage, T_{cloud} unter den Gefrierpunkt der Lösung zu verschieben.

Basierend auf den für verschiedene Lösungsmittelbedingungen erstellten Phasendiagrammen wurden schnelle Drucksprünge im Bereich der Phasengrenzen durchgeführt, um die LLPS-Kinetik von γ D-Kristallin zu untersuchen. Da die druckabhängigen Prozesse vollständig reversibel waren, konnten darüber hinaus auch bidirektionale p -Sprünge durchgeführt werden, wodurch die Bildungs- und Auflösungsrate der Proteintröpfchenphase bestimmt

werden konnte. Die Bildung der Tröpfchenphase erwies sich als sehr schneller Prozess mit Gesamtübergangszeiten von $t_{tr} \approx 4$ s. Während mit steigender TMAO- und Ficoll-Konzentration die Gesamtübergangszeit für den Übergang von der homogenen in den phasengetreunten Zustand leicht zunahm ($\Delta t_{tr} \approx 1$ s), wurde bei einer Zugabe von 0.3 M Harnstoff keine signifikante Auswirkung auf die Phasenübergangskinetik beobachtet. Eine Erhöhung der Temperatur führte zu einem leichten Anstieg der Phasenübergangsgeschwindigkeit (z.B. $\Delta t_{tr} \approx -0.6$ s von 3° C auf 11 °C). Beim Übergang vom phasengetreunten Zustand in die homogene Phase ist die Übergangskinetik etwa um das 10-fache schneller ($t_{tr} \approx 1.5$ s) und für alle Lösungsmittelbedingungen ähnlich.

Zur Auswertung der Kinetikdaten wurde an die zeitabhängig gemessenen Drucksprungdaten die Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov-Funktion (JMAK) gefittet. Aus den gefitteten Daten konnte anschließend der Avrami-Exponent n und die Geschwindigkeitskonstante k ermittelt werden. Bei allen Lösungsmittelbedingungen wurde für die LLPS-Bildung ein Avrami-Parameter nahe $n \approx 2$ ermittelt. Die Geschwindigkeitskonstante k lag hierbei in einer Größenordnung von 0.2 s^{-1} . Während die Geschwindigkeitskonstanten in reinem Puffer und in der Harnstoff-Lösung ähnlich waren, nahmen die Geschwindigkeitskonstanten der LLPS-Bildung in Anwesenheit von TMAO und Ficoll leicht ab. So sank beispielweise die Geschwindigkeitskonstante in einer 0.5 M TMAO-Lösung von $k = 0.24 \text{ s}^{-1}$ auf 0.15 s^{-1} und in einer 20 Gew.-% Ficoll-Lösung auf $k = 0.17 \text{ s}^{-1}$ bei 3 °C und spiegelt die Abnahme der Keimbildungs- und Wachstumsrate bei Zugabe dieser Kosolventien wider. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass bei Zugabe von TMAO und Ficoll die Energiebarriere für die Tröpfchenbildung und Koaleszenz erhöht wird, was insgesamt zu einer Verlangsamung des Phasenübergangs führt. Eine derartig geringe Verringerung der Keimbildungs- und Wachstumsrate würde auch mit einem allgemeinen *confinement*-Effekt übereinstimmen. Der Anteil der Tröpfchen, bei dem eine Keimbildung stattfand, ist gegeben durch $f = 1 - \exp[-J_v N V_d]$ (J_v ist die intrinsische Keimbildungsrate im stationären Zustand, N und V_d sind die Anzahl bzw. das Volumen des umschließenden Raums). Selbst bei unveränderter Energiebarriere nimmt die Keimbildungsrate $J = J_v N V_d$ mit abnehmender Systemgröße ab.^[242] Ein Avrami-Parameter von $n \approx 2$ deutet darauf hin, dass die Keimbildungsrate bei der LLPS-Bildung nicht konstant ist. Vielmehr scheint der Phasenübergang über einen diffusionsbegrenzten Keimbildungs- und Wachstumsmechanismus zu erfolgen, wobei sich die Wachstumsrate wahrscheinlich mit der Zeit ändert. Ein solches Szenario wird auch für biologisch relevante (z.B. intrazelluläre) dicht gepackte Systeme erwartet. Zusammengefasst ist die Bildung und

anschließende Auflösung des Proteinkondensats ein sehr schneller Prozess, der auf einer Zeitskala von nur einigen Sekunden abläuft. Es ist davon auszugehen, dass die schnelle Phasenübergangskinetik der LLPS den relevanten Zeitrahmen erfüllt, der für biochemische Prozesse in solchen Strukturen benötigt wird. Beispiele hierfür sind stressabhängige Sequestrierung von Signalmolekülen, die Signalcluster bilden oder die Kolokalisierung von biomolekularen Einheiten, die zur Steigerung der Reaktivität erforderlich sind (z.B. Kolokalisierung von Enzymen für das *substrate channeling*). Ungeachtet der ausgeprägten Wirkung von Kosolventien auf die Stabilität des LLPS-Bereichs ist ihr Einfluss auf die Phasenübergangskinetik bei biologisch relevanten Konzentrationen quasi vernachlässigbar, was im zellulären Kontext ein besonderer Vorteil sein könnte, da eine schnelle Kinetik der LLPS-Bildung, d.h. eine schnelle Umschaltbarkeit des Phasenübergangs durch die Anwesenheit von Kosolventien, nicht beeinträchtigt werden sollte. Besonders Organismen, die unter Hochdruckbedingungen in der Tiefsee leben, müssen in der Lage sein, die Druckempfindlichkeit ihrer biomolekularen Kondensate zu kontrollieren, um Beeinträchtigungen ihrer Zellphysiologie zu vermeiden.^[52] Die hier gezeigten Forschungsergebnisse belegen, dass der in Tiefseefischen hochregulierte Osmolyt TMAO die Stabilität der kondensierten Proteintröpfchen deutlich erhöht, ohne die schnelle Phasenübergangskinetik der LLPS-Bildung und Auflösung der Proteinkondensate globulärer Proteine signifikant zu beeinflussen.

5 Druckempfindliche SynGAP/PSD95 Kondensate als Modell für die PSD und ihre biophysikalischen und neurologischen Auswirkungen^{§§}

Bekanntermaßen wirkt sich hoher hydrostatischer Druck auf verschiedene biomolekulare Systeme aus, wie zum Beispiel auf Lipidmembranen, Proteine (z.B. Enzyme), Membrantransporter, das Zytoskelett und Nukleinsäure-Hairpins.^[42,123,207,210,243,244] Abhängig von dem zu beobachtenden System werden Drücke von mehreren Hundert bis Tausend bar benötigt, um signifikante Konformations- und damit einhergehende Funktionsänderungen zu erzielen. Im Gegensatz dazu werden bei Wirbeltieren, die hohem Druck ausgesetzt werden, schwere neurologische Störungen beobachtet, die als neurologisches Hochdruck-Syndrom (*high pressure nervous syndrome*, HPNS) bekannt sind.^[245] Bereits bei Drücken von einigen zehn Atmosphären werden für die HPNS typische Symptome wie Schwindel, Koordinationsstörungen einschließlich Zittern, Krämpfe und ein verändertes Elektroenzephalogramm (EEG) beobachtet.^[223,224,246,247] Obwohl die Bekanntheit der HPNS weit verbreitet ist, sind die zugrunde liegenden physiologischen und biomolekularen Ursachen noch weitgehend unerforscht. Bislang ist lediglich bekannt, dass die Funktion einiger Rezeptoren und Ionenkanäle durch die unterdrückte Freisetzung verschiedener Neurotransmitter gestört wird.^[223,224,246,247] Die molekularen Auswirkungen des Drucks auf komplexere synaptische Verbindungen, wie z.B. die postsynaptische Dichte, sind noch immer weitgehend unbekannt.^[224]

Synapsen sind im gesamten Nervensystem vertreten und stellen eine spezifische Art von membranumschlossenen Kompartimenten dar, die an der Steuerung der Signalübertragung beteiligt sind. Unter der postsynaptischen Plasmamembran der Synapse befindet sich ein proteinreiches Subkompartiment, die so genannte postsynaptische Dichte (PSD). Diese ist verantwortlich für den Empfang, die Verarbeitung und die Speicherung der von den präsynaptischen axonalen Enden übertragenen Signale.^[16,17,248] Die PSD setzt sich nachweislich aus hunderten von dicht gepackten Proteinen zusammen, die große Strukturen mit einer Breite von einigen hundert Nanometern und eine Dicke von 30 – 50 nm ausbilden.^[249,250]

^{§§} Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz publiziert:

H. Cinar, R. Oliva, Y. H. Lin, X. Chen, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26*, 11024–11031.^[257]

Umfassende Studien konnten eine Vielzahl an Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzeigen, die das PSD-Protein-Netzwerk organisieren, zu denen auch die beiden Proteine SynGAP und PSD95 gehören.^[16,17,249] SynGAP und PSD95 sind zwei sehr häufig vorkommende Proteine, die in der PSD in einem nahezu stöchiometrischen Verhältnis vorzufinden sind.^[251] Untersuchungen ergaben, dass Mutationen von SynGAP oder PSD95 zu schwerwiegenden psychischen Störungen beim Menschen führen, zu denen geistige Behinderung und Autismus gehören.^[252–254]

SynGAP ist ein hirnspezifisches GTPase-aktivierendes Protein, das vorwiegend in den PSDs lokalisiert ist, indem es spezifisch an PSD95 bindet.^[255,256] Dabei bildet das Protein ein paralleles *coiled-coil*-Trimer aus, das gleichzeitig an mehrere PSD95 Proteine binden kann. Diese multivalente Interaktion zwischen SynGAP und PSD95 führt sowohl in vitro als auch in der lebenden Zelle zur Bildung einer Flüssig-Flüssig-Phasentrennung.^[16,17,248] Die Art und Weise, wie die einzelnen SynGAP- und PSD95-Monomere im LLPS-Zustand genau miteinander assoziiert sind und Komplexe höherer Ordnung bilden, ist strukturell noch nicht vollständig geklärt. Die Aminosäurezusammensetzung der Moleküle, die an der Interaktion beteiligt ist, lässt vermuten, dass die günstigen Kontakte eine Kombination aus hydrophoben und π -Wechselwirkungen sind.

Um die Rolle der LLPS bei druckinduzierten neurologischen Schädigungen zu erforschen, wurden Turbiditätsmessungen, fluoreszenzspektroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen mit unterschiedlichen Hochdruck-Messzellen an diesem Modellsystem durchgeführt. Ziel war es, die Struktur und die Phaseneigenschaften des SynGAP/PSD95-Systems zu untersuchen, wobei ein Druckbereich bis zu 1500 bar abgedeckt wurde. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist die LLPS des SynGAP/PSD95-Systems sehr druckempfindlich und wird weit unterhalb von 1 kbar instabil, d.h. bei Drücken wie sie auch bei Tiefseeorganismen vorkommen können.

5.1 Probenpräparation

Für die in Kapitel 5 gezeigte Studie wurden Proteinlösungen von PSD95 PDZ-SH3-GK und SynGAP CC-PBM in 50 mM TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) verwendet. Die Expression und Aufreinigung der Proteine^[16] sowie der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Mingjie Zhang^{***} und wurden für diese Studie in Form von konzentrierten Stammlösungen zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Stammlösungen konnten je nach Expressionserfolg unterschiedliche Konzentrationen aufweisen.

5.1.1 Turbiditätsmessungen

Für die konzentrationsabhängigen Turbiditätsmessungen des SynGAP/PSD95-Systems wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 20 – 150 μ M in 10 μ M Schritten hergestellt. Zur Verdünnung der Stammlösung wurde ein TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) verwendet, wobei in allen Probenlösungen das Mischungsverhältnis von SynGAP und PSD95 stets eins zu eins (1:1) war. Für die druckabhängigen Turbiditätsmessungen wurde eine 50 μ M SynGAP/PSD95-Probenlösung in TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) hergestellt. Da die Probenlösungen unmittelbar nach dem Pipettieren beider Proteinlösungen eine Phasentrennung aufwiesen, wurden beide Proteinlösungen erst kurz vor der Messung zusammen pipettiert. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet.

5.1.2 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die druck- und konzentrationsabhängigen lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden SynGAP/PSD95-Proben mit einer Proteinkonzentration zwischen 50 – 150 μ M hergestellt. Zur Verdünnung der Stammlösung wurde ein TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) verwendet, wobei in allen Probenlösungen das Mischungsverhältnis von SynGAP und PSD95 stets eins zu eins (1:1) war. Für die fluoreszenz-

*** Division of Life Science, State Key Laboratory of Molecular Neuroscience, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong, China

mikroskopischen Untersuchungen wurde den unmarkierten Proteinen fluoreszenzmarkierte SynGAP-Proteine hinzugefügt. Als Fluorophor wurde Alexa488 verwendet. Die Gesamtkonzentration des markierten SynGAP-Proteins betrug 0.23 μM . Wie schon in Kapitel 5.1.1 erwähnt, wurden beide Proteinlösungen erst kurz vor der Messung zusammen pipettiert. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Die für die Mikroskopie und Turbiditätsmessungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
SynGAP/PSD95	20 – 150 μM SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP/PSD95	50 μM SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP/SynGAP-Alexa488/PSD95	50 μM SynGAP/PSD95 (1:1), 0.23 μM SynGAP-Alexa488, 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8

5.1.3 Förster Resonanz Energie Transfer-Messungen (FRET)

Die Probenpräparation und die druckabhängigen FRET-Messungen wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt. Für die Messungen wurde eine mit Alexa405 (Donor) markierte 2.5 μM PSD95-Lösung in TRIS (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) hergestellt. Als Akzeptor diente mit Alexa488 (Akzeptor) markiertes SynGAP, dessen Konzentration zwischen 0 – 14.8 μM variiert wurde. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2: Die für die druckabhängigen FRET-Messungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
PSD95-Alexa405	2.5 μ M PSD95-Alexa405, 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP-Alexa488	0 – 14.8 μ M SynGAP-Alexa488, 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8

5.2 Druck- und konzentrationsabhängige Turbiditätsmessungen

Vorangegangene Studien von M. Zeng et al.^[16] haben gezeigt, dass die beiden Proteine SynGAP und PSD95 durch Bilden eines SynGAP–PSD95-Komplexes eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung durchlaufen, während sie als eigenständige Proteinlösungen eine klare homogene Lösung aufweisen. Aufbauend auf diesen Forschungsergebnissen wurde zu Beginn dieser Studie das temperaturabhängige Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems untersucht.

Um festzustellen, ob das SynGAP/PSD95-System einen temperaturinduzierten Phasenübergang vom phasenseparierten in den homogenen Lösungszustand aufweist, wurden temperaturabhängige Absorptionsspektren einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung in einem Wellenlängenbereich von 250 – 500 nm aufgenommen. Die Messungen erfolgten in einem breiten Temperaturbereich von 5 – 60 $^{\circ}\text{C}$ bei Atmosphärendruck. Anschließend wurden die Absorptionsintensitäten, die sich aus den Absorptionsspektren bei 400 nm ergaben, als Funktion der Temperatur aufgetragen und sind in Abbildung 5.1a gezeigt.

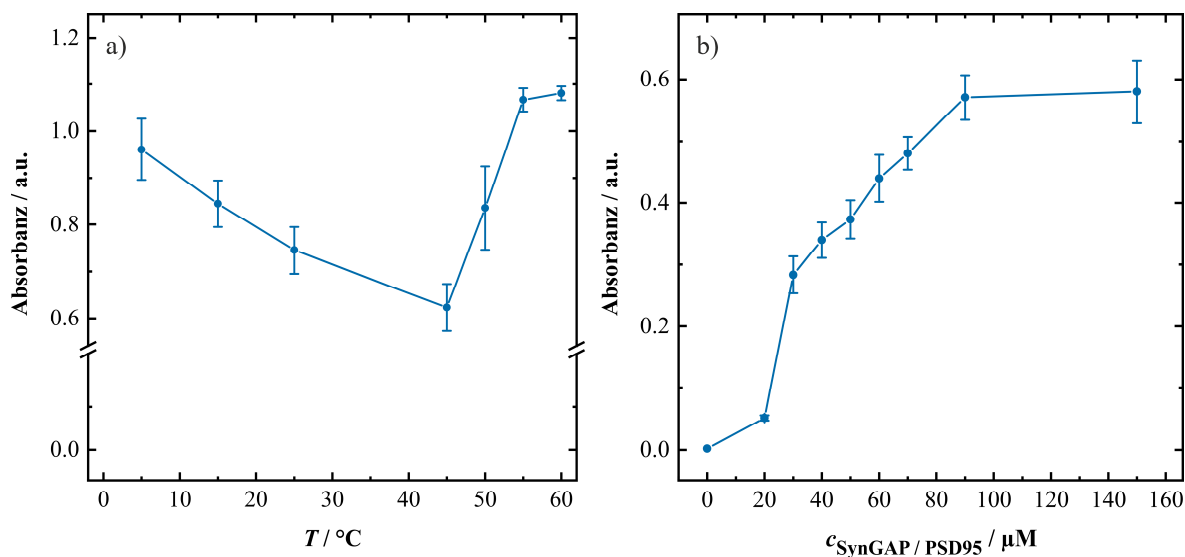


Abbildung 5.1: Dargestellt ist die UV/Vis-Absorptionsintensität bei 400 nm einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) als Funktion der Temperatur und b) die UV/Vis-Absorptionsintensität bei 400 nm einer SynGAP/PSD95-Lösung als Funktion der Proteinkonzentration bei $T = 25 ^{\circ}\text{C}$. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

Über den gesamten gemessenen Temperaturbereich wird eine hohe Absorptionsintensität beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass das SynGAP/PSD95-System sich über den ge-

samten gemessenen Temperaturbereich in einem phasenseparierten Lösungszustand befindet und somit keine Phasenübergangstemperatur in eine homogene Phase besitzt. Ein vollständiger Phasenübergang in die homogene Phase würde sich in einer scheinbaren Absorption von $A \approx 0$ widerspiegeln. Mit zunehmender Temperatur wird eine Verringerung der Absorptionsintensität beobachtet, die jedoch ab einer Temperatur von 45 °C wieder zunimmt und auf eine Aggregation innerhalb der Proteinlösung zurückzuführen ist. Die Abnahme der Absorptionsintensität im mittleren Temperaturbereich könnte auf eine Abnahme der Phasentröpfchen hindeuten. Denkbar ist jedoch, dass es zu einer zeitlich bedingten Kondensation der Phasentröpfchen und anschließenden makroskopischen Phasentrennung kommt. Im Anschluss wurden konzentrationsabhängige Turbiditätsmessungen durchgeführt, um den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des binären Proteinsystems zu untersuchen. Abbildung 5.1b zeigt die Änderung der Absorptionsintensität als Funktion der SynGAP/PSD95-Konzentration (Verhältnis 1:1) bei einer Wellenlänge von 400 nm und 25 °C. Wie in der Abbildung zu sehen ist, nimmt mit steigender Proteinkonzentration die Absorptionsintensität zu. Besonders im unteren Konzentrationsbereich von 20 – 40 μM ist ein drastischer Intensitätsanstieg zu beobachten, der im mittleren Konzentrationsbereich stetig zunimmt und jenseits einer Proteinkonzentration von 90 μM einen Plateauwert erreicht, was auf eine maximale Tröpfchenbildung hindeuten könnte. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass bei hoher Proteinkonzentration die Koaleszenz der phasenseparierten Tröpfchen und die damit verbundene makroskopische Phasentrennung die Ursache sind. Unterhalb einer Konzentration von 20 μM geht die Absorptionsintensität gegen $A \approx 0$, was auf eine homogene Phase hindeutet.

Um den Einfluss von hohem hydrostatischem Druck auf das Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den konzentrationsabhängigen Messungen bidirektionale, druckabhängige Turbiditätsmessungen an einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (1:1) durchgeführt. Als Puffersystem wurde eine 50 mM TRIS-Lösung (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) mit einem pH-Wert von 7.8 verwendet. Die in Abbildung 5.2a dargestellten druckabhängigen UV/Vis-Daten zeigen, dass eine Druckerhöhung über ~ 500 bar zu einer homogenen Phase bei $T = 25$ °C führt, wobei die Tröpfchenzahl bis zu diesem Druck kontinuierlich abzunehmen scheint. Bei der anschließenden Druckentlastung verschiebt sich der Trübungspunkt der Lösung leicht zu niedrigeren Drücken und die erneute Tröpfchenbildung findet unterhalb eines Drucks von ~ 400 bar statt. Die hier beobachtete Hysterese war jedoch aufgrund des Nukleationsprozesses während des Phasenübergangs zu erwarten. Darüber hinaus wurden druckabhängige Turbiditätsmessungen bei

37 °C durchgeführt, die der physiologischen Temperatur des Menschen entspricht. Im Vergleich zu den Druckmessungen bei 25 °C sind keine drastischen Änderungen der Übergangsdreie zu beobachten (Abbildung 5.2b). Der Übergangsdruck während der Druckerhöhung scheint sich lediglich zu etwas höheren Werten zu verschieben, während bei der Druckentlastung der Übergangsdruck sich nicht merklich verändert hat.

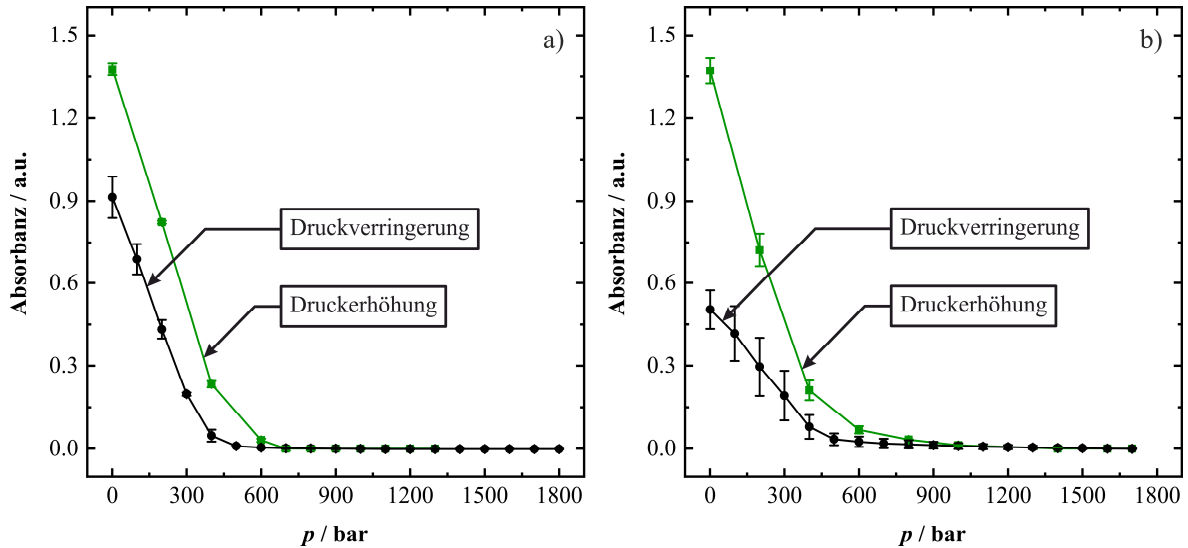


Abbildung 5.2: Druckabhängige Änderung der UV/Vis-Absorptionsintensität (Trübung) einer 50 µM SynGAP/PSD95-Lösung (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH-Wert = 7.8) bei einer Wellenlänge von 400 nm und bei a) 25 °C und b) 37 °C. Die Messungen wurden dreimal wiederholt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

5.3 Druck- und konzentrationsabhängige Lichtmikroskopie

Um das konzentrationsabhängige Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems visuell darzustellen, wurden lichtmikroskopische Untersuchungen einer SynGAP/PSD95-Lösung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration durchgeführt. In Abbildung 5.3 ist die Koazervation einer SynGAP/PSD95-Lösung bei Konzentrationen zwischen 50 – 150 μM und einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ gezeigt.

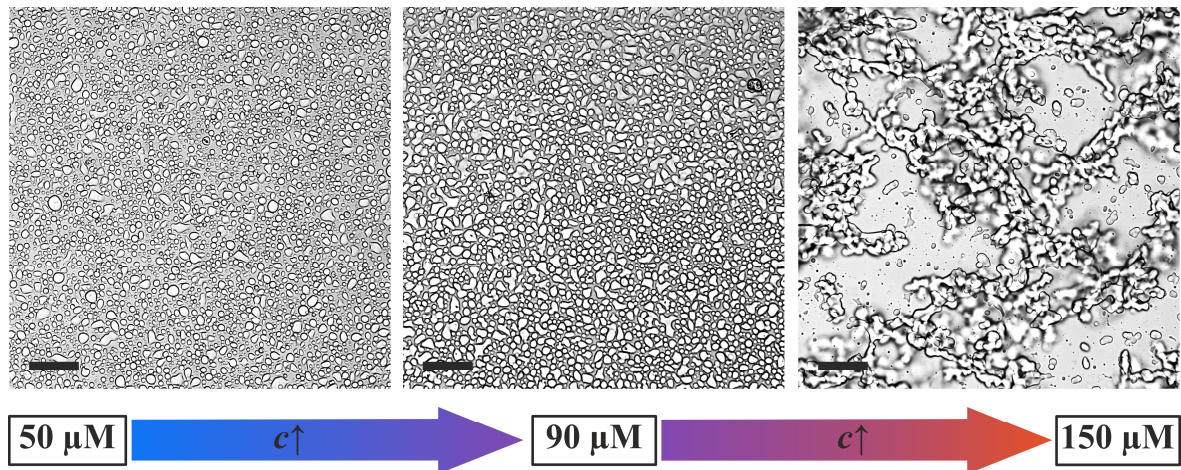


Abbildung 5.3: Konzentrationsabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei ausgewählten Proteinkonzentrationen und $T = 25^{\circ}\text{C}$. Der Fokus des Objektivs lag auf der inneren Oberfläche der transparenten Zelle (Glasoberfläche). Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

Unmittelbar nach dem Mischen beider Proteine bilden sich in der Lösung Tröpfchen mit einem Durchmesser von $\sim 5 \mu\text{m}$, die mit fortschreitender Zeit zu makroskopischen Phasentröpfchen kondensieren. Innerhalb von 15 Minuten sinken die proteinreichen Phasentröpfchen zu Boden und bilden auf der unteren Fensteroberfläche der Mikroskopiezelle ausgedehnte Flüssig-Flüssig-phasengetrennte Bereiche. Wie in der Abbildung 5.3 (links) zu sehen ist, beträgt bei einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung der Durchmesser für den Großteil der Tröpfchen 15 – 20 μm . Eine Erhöhung der Konzentration auf 90 μM bewirkt, dass der Durchmesser der kondensierten Phasen drastisch zunimmt. So sind in der mittleren Abbildung dicht beieinander liegende Phasen zu erkennen, die einen Durchmesser von $>50 \mu\text{m}$ aufweisen. Bei einer Proteinkonzentration von 150 μM bildet sich in der gesamten Lösung ein Netzwerk aus Phasentröpfchen, welches sich über einen Bereich von 100 μm erstreckt.

Zusätzlich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden Fluoreszenzbilder der kondensierten Phasentröpfchen aufgenommen (Abbildung 5.4). Zu diesem Zweck wurden den un-

markierten Proteinen fluoreszenzmarkierte SynGAP-Proteine hinzugefügt. Als Fluorophor wurde Alexa488 verwendet. Die Gesamtkonzentration des markierten SynGAP-Proteins betrug $0.23 \mu\text{M}$. Wie aus der Abbildung 5.4a ersichtlich, befinden sich auf der Glasoberfläche kondensierte, unregelmäßig geformte Phasentröpfchen, die einen Durchmesser von $>50 \mu\text{m}$ besitzen. Im zugehörigen Fluoreszenzbild (Abbildung 5.4b) sind die kondensierten Phasentröpfchen als fluoreszierende Bereiche erkennbar und zeigen eine eindeutige Übereinstimmung mit den Phasentröpfchen im Lichtmikroskopiebild. Die hohe Fluoreszenzintensität der Bereiche deutet auf eine hohe Konzentration des markierten SynGAP-Proteins innerhalb der Phasen hin, während die schwarzen Bereiche auf eine sehr geringe Proteinkonzentration deuten. Somit wird durch die Fluoreszenzbilder bestätigt, dass es sich um kondensierte Phasentröpfchen des SynGAP/PSD95-Komplex handelt.

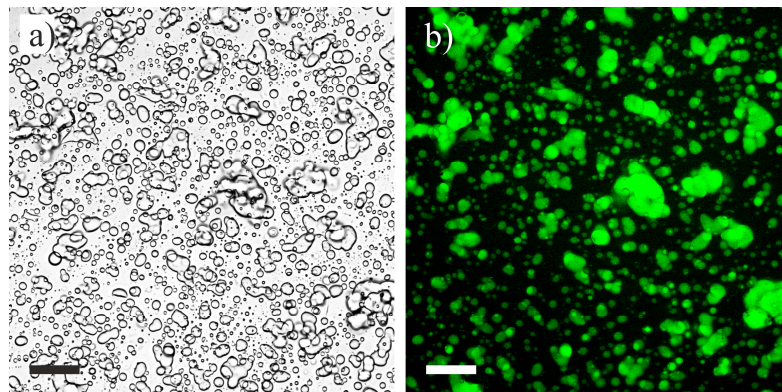


Abbildung 5.4: a) Lichtmikroskopie- und b) Fluoreszenzmikroskopiebilder einer fluoreszenzmarkierten SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Gesamtkonzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins SynGAP-Alexa488 betrug $0.23 \mu\text{M}$. Der Fokus des Objektivs lag auf der inneren Oberfläche der transparenten Zelle (Glasoberfläche). Die Maßstabsskala (schwarzer bzw. weißer Balken) entspricht einer Länge von $50 \mu\text{m}$.

Unterstützend zu den druckabhängigen Turbiditätsmessungen wurden lichtmikroskopische Untersuchungen bei ausgewählten Drücken durchgeführt. Alle im Nachfolgenden präsentierten Daten der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigen das Phasenverhalten einer $50 \mu\text{M}$ SynGAP/PSD95-Lösung. Um mögliche Oberflächeneffekte während der Mikroskopie ausschließen zu können, befand sich der Fokus des Objektivs innerhalb der Lösung. Abbildung 5.5 zeigt das druckabhängige Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

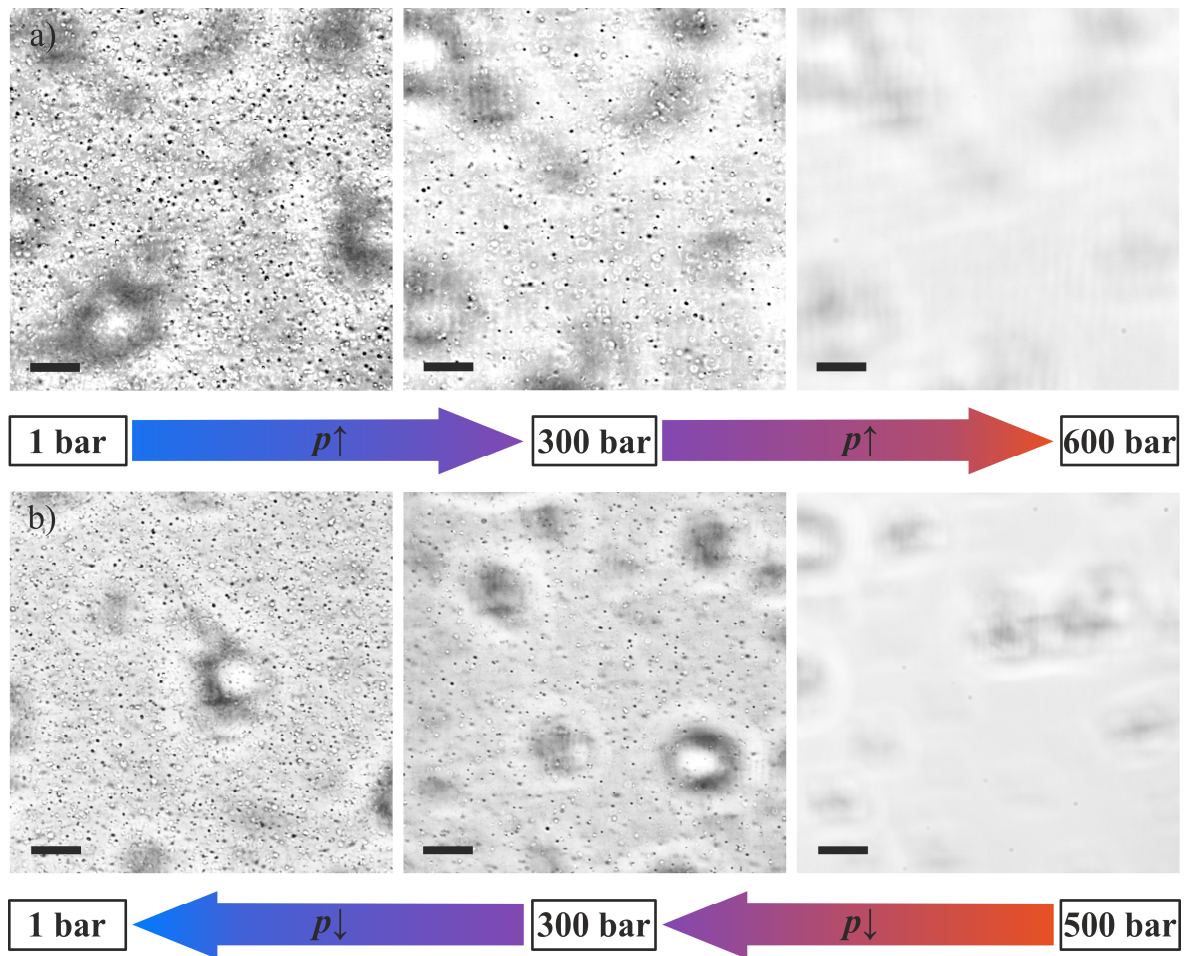


Abbildung 5.5: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen 50 µM SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei 25 °C. Gezeigt ist der a) druckinduzierte Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase und b) die phasenseparierte Lösung nach Druckentlastung auf 1 bar. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der SynGAP/PSD95-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 µm. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

Unmittelbar nach dem Zusammenmischen beider Proteinlösungen bilden sich kleine gleichmäßig geformte Phasentröpfchen mit einem Durchmesser von 5 µm. In Übereinstimmung mit den Turbiditätsdaten nimmt mit steigendem Druck die Anzahl der Phasentröpfchen in der Lösung kontinuierlich ab, bis eine vollständig homogene Phase oberhalb von ~500 bar vorliegt. Nach der Druckentlastung konnte ein erneuter Wiedereintritt in den phasenseparierten Zustand und somit die Bildung neuer Phasentröpfchen bei einem Druck von 400 bar nachgewiesen werden.

Wie zuvor in den Turbiditätsmessungen gezeigt, wird auch hier eine Verschiebung der Übergangsdruöcke bei einer Temperaturerhöhung auf 37 °C beobachtet (Abbildung 5.6).

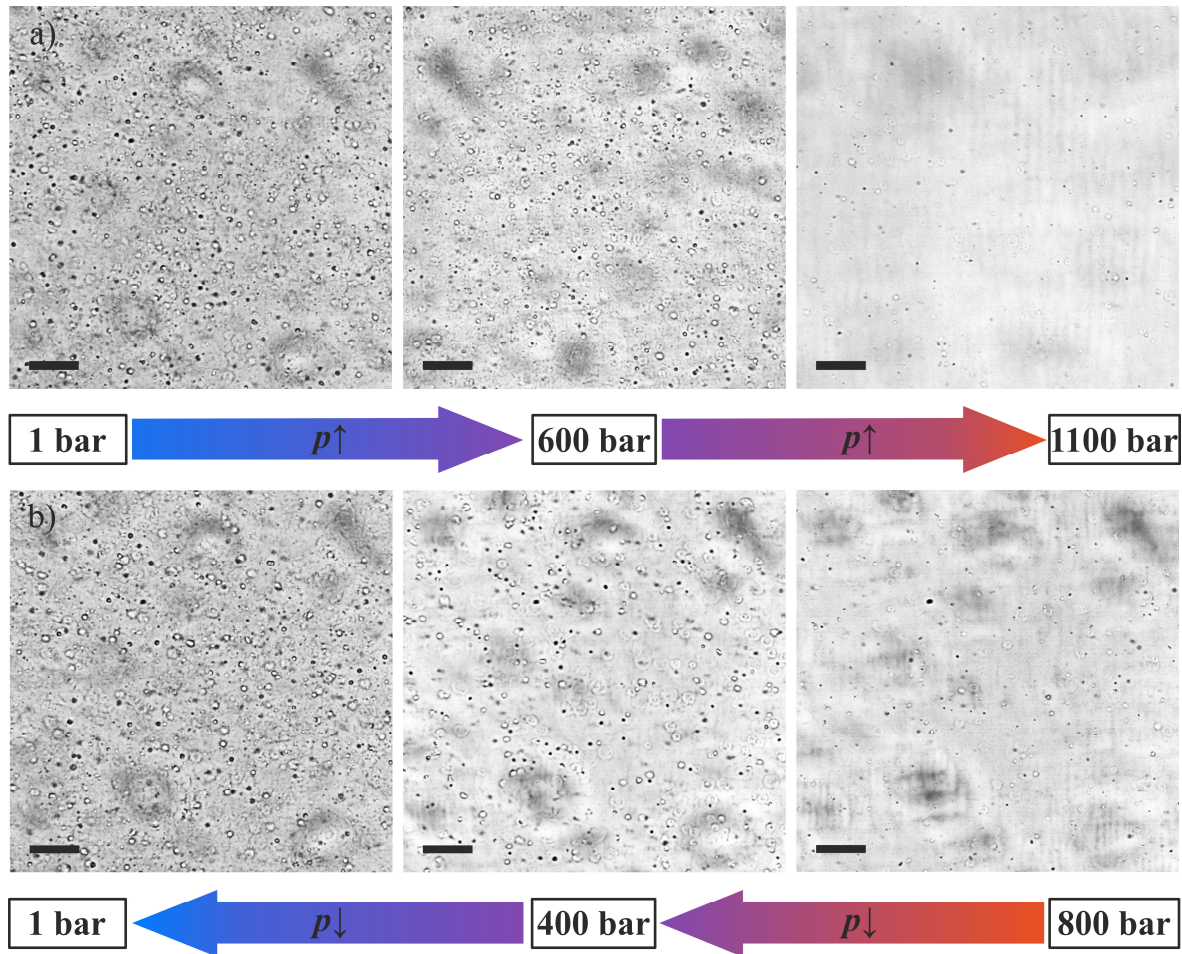


Abbildung 5.6: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Gezeigt ist der a) druckinduzierte Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase und b) die phasenseparierte Lösung nach Druckentspannung auf 1 bar. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der SynGAP/PSD95-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

Obwohl die Anzahl der Phasentröpfchen mit zunehmendem Druck drastisch abnahm, wurden bei der Druckerhöhung im gesamten gemessenen Druckbereich von 1 – 1100 bar weiterhin in geringer Zahl Phasentröpfchen in der Bulk-Lösung beobachtet. Während der Druckentspannung wurde eine deutliche Zunahme der Tröpfchen erst ab einem Druck von ~ 400 bar beobachtet und würde mit dem erneuten Intensitätsanstieg der druckabhängigen Turbiditätsmessung bei 37 $^{\circ}\text{C}$ übereinstimmen.

Anknüpfend an die mikroskopischen Untersuchungen der Phasentröpfchen in der Bulk-Lösung wurde der Einfluss von möglichen Oberflächeneffekten auf den Phasenübergangsdruck der LLPS von SynGAP/PSD95 untersucht (Abbildung 5.7). Hierzu wurde der Fokus des Objektivs auf die innere Oberfläche der transparenten Zelle gesetzt. Wie zuvor bei den konzentrationsabhängigen lichtmikroskopischen Untersuchungen erläutert, bilden sich unmittel-

telbar nach dem Mischen beider Proteine in der Lösung Phasentröpfchen mit einem Tröpfchendurchmesser von $\sim 5 \mu\text{M}$, die mit fortschreitender Zeit zu makroskopischen Phasentröpfchen kondensieren und ausgedehnte Flüssig-Flüssig-phasengetrennte Bereiche auf der unteren Fensteroberfläche der Mikroskopiezelle bilden. Anschließend wurde schrittweise der Druck erhöht, bis sich die Flüssig-Flüssig-phasengetrennten Bereiche auf der Oberfläche auflösen und eine vollständig homogene Phase erreicht wird. Wie aus den Momentaufnahmen ersichtlich wird, weisen die Phasen bei atmosphärischem Druck einen Durchmesser von $\sim 50 \mu\text{m}$ auf, der mit steigendem Druck abnimmt. Erst nach einem Druck von 1300 bar haben sich alle Phasentröpfchen auf der Glasoberfläche vollständig aufgelöst und eine homogene Lösung liegt wieder vor. Im Vergleich zur Bulk-Lösung verschiebt sich der Phasenübergangsdruck für die Phasentröpfchen auf der Glasoberfläche um 800 bar zu höheren Drücken, d.h. die Wechselwirkung mit der Glasgrenzfläche führt zu einer Stabilisierung der Tröpfchenphase.

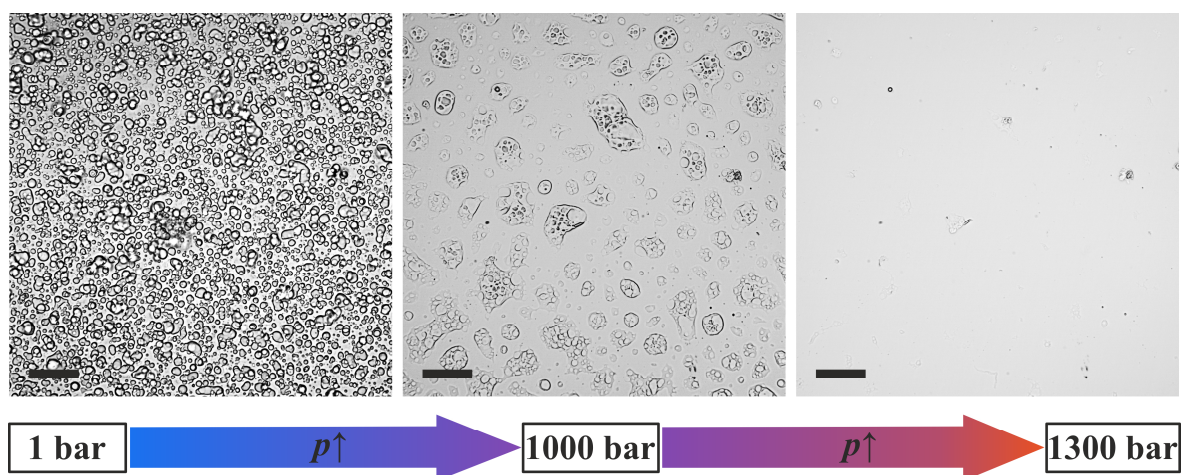


Abbildung 5.7: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer reinen $50 \mu\text{M}$ SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei 25°C . Gezeigt wird der Einfluss des Oberflächeneffekts auf den Phasenübergangsdruck der LLPS von SynGAP/PSD95. Der Fokus des Objektivs lag auf der inneren Oberfläche der transparenten Zelle (Glasoberfläche). Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

5.4 Druckabhängige Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-Messungen am SynGAP/PSD95-System^{†††}

Um die Auswirkungen des Drucks auf die Bindung zwischen SynGAP und PSD95 zu untersuchen, wurden Fluoreszenzmessungen bei ausgewählten Drücken durchgeführt. Diesbezüglich wurde Alexa405 markiertes 2.5 μM PSD95 mit Alexa88 (Akzeptor) markiertem SynGAP (0 – 14.8 μM) titriert. Zur Vermeidung des sogenannten *inner filter* Effekts (IFE) wurde die Konzentration von PSD95 so gewählt, dass die Absorption bei der Anregungswellenlänge weniger als 0.05 betrug. Die Anregung der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 402 nm, während die Emissionsspektren im Bereich von 420 – 630 nm aufgenommen wurden. Die Messungen erfolgten in einem Druckbereich von 1 – 2000 bar bei $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$. In Abbildung 5.8a sind exemplarisch die Emissionsspektren ($\lambda = 420 - 630\text{ nm}$) bei atmosphärischem Druck und $25\text{ }^\circ\text{C}$ gezeigt (für die restlichen druckabhängigen Daten siehe Abbildung 9.9).

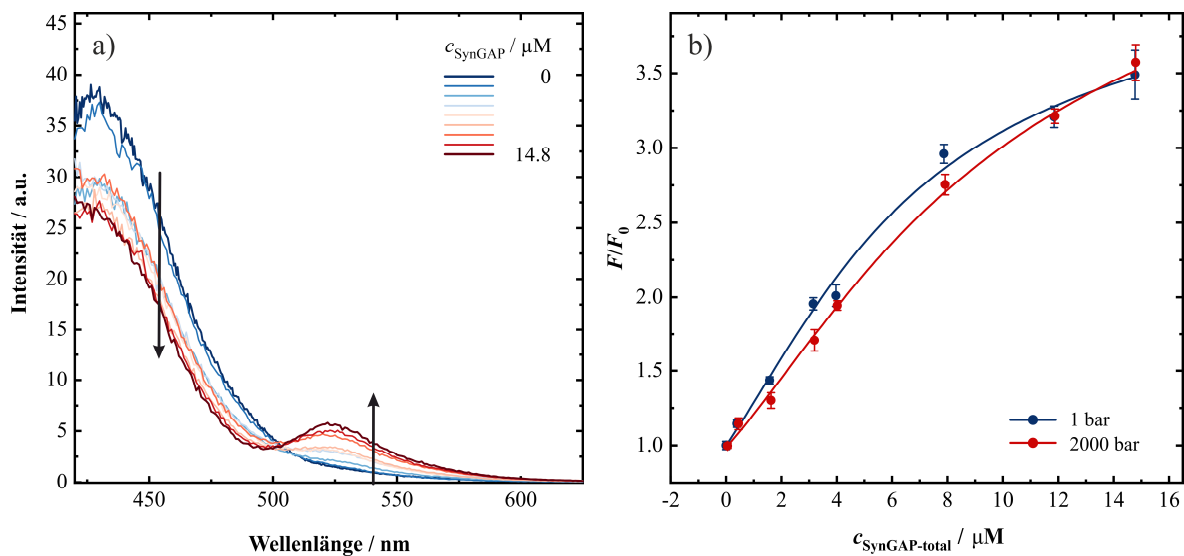


Abbildung 5.8: a) Fluoreszenzemissionsspektren bei Umgebungsdruck und b) druckabhängige Bindungsisothermen aus der Titration von Alexa405-markiertem PSD95 mit Alexa488-markiertem SynGAP bei $25\text{ }^\circ\text{C}$. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d wurden die aufgetragenen Datenpunkte an ein 1:1-Bindungsmodell angepasst. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

^{†††} Die druckabhängigen FRET-Messungen am SynGAP/PSD95-System wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[257] publiziert.

Mit steigender SynGAP Konzentration ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei ~ 430 nm von PSD95-Alexa408 und gleichzeitige Zunahme bei ~ 522 nm von SynGAP-Alexa488 zu beobachten, was auf den Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den beiden Fluorophoren zurück zu führen ist. Anschließend wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität F/F_0 als Funktion der SynGAP-Konzentration (in μM) aufgetragen, wobei F_0 die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit und F in Anwesenheit unterschiedlicher SynGAP-Konzentrationen ist. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde ein Modell eines 1:1-Bindungsverhältnisses verwendet. Die Daten sind in Abbildung 5.8b für 1 bar und 2000 bar gezeigt. Die sich aus der Datenanpassung ergebenden Dissoziationskonstanten K_d sind für die jeweiligen Drücke in der Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Druckabhängige Dissoziationskonstanten K_d des SynGAP/PSD95-Komplexes.

Druck / bar	K_d / μM
1	1.72 ± 0.09
500	1.79 ± 0.06
1000	2.08 ± 0.09
1500	2.27 ± 0.05
2000	2.17 ± 0.09

Mit steigendem Druck nimmt die Dissoziationskonstante für die Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen SynGAP und PSD95 leicht zu. Dementsprechend hemmt steigender Druck die Bildung des SynGAP/PSD95-Komplexes und zeigt eine gute Übereinstimmung mit den übrigen druckabhängigen LLPS-Daten. Da nur geringe Änderungen des K_d -Werts beobachten wurden, ist jedoch davon anzugehen, dass andere Effekte eine wichtigere Rolle bei der ausgeprägten Druckempfindlichkeit der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des SynGAP/PSD95-Systems spielen.

5.5 Physikalische Interpretation des druckabhängigen

Phasenverhaltens des SynGAP/PSD95-Modellsystems^{†††}

Wie bereits erwähnt, gehört der hydrostatische Druck zu den Umweltbedingungen in unserer Biosphäre, die erhebliche Auswirkungen auf die Evolution vieler Wasserorganismen hatten. Obwohl die Auswirkungen des Drucks auf einfache biomolekulare Systeme wie Lipiddoppelschichten^[42,123,207–210,233,243,244,258,259], Proteine und Nukleinsäuren recht gut erforscht sind, ist der Einfluss des hydrostatischen Drucks auf komplexere biomolekulare Strukturen noch weitgehend unerforscht. In diesem Kapitel wurden die Auswirkungen des Drucks auf die LLPS zweier Hauptkomponenten der PSD untersucht. PSDs konzentrieren und organisieren eine Vielzahl von Proteinen und dienen zur Signalübertragung bei synaptischen Aktivitäten.^[16,17,248] In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die LLPS des SynGAP/PSD95-Modellsystems zu den druckempfindlichsten biomolekularen Systemen gehört, die bisher identifiziert wurden. Eine Druckerhöhung von mehreren zehn bis hundert bar kann zu einer drastischen Abnahme der phasengetrennten Tröpfchen führen, wobei bereits ein Druck von ca. 600 bar ausreicht, um den phasengetrennten Bereich des SynGAP/PSD95-Systems bei Raumtemperatur vollständig aufzulösen. Aus biophysikalischer Sicht ist es besonders interessant, dass sich die paarweise Wechselwirkung zwischen SynGAP und PSD95 als ziemlich druckunempfindlich erwies (Tabelle 5.3), woraus zu schließen ist, dass die Bindungsstelle eines einzelnen SynGAP/PSD95-Komplexes weitgehend frei von Hohlräumen und daher ziemlich dicht gepackt ist. Es hat sich sogar herausgestellt, dass der paarweise Komplex bis zu einem Druck von 2 kbar stabil ist. Daher lässt sich die hohe Druckempfindlichkeit der SynGAP/PSD95-Phasentröpfchen nicht nur durch die Druckabhängigkeit der paarweisen Bindung erklären. An dieser Stelle wäre aus physikalischer Sicht denkbar, dass das für Wassermoleküle unzugängliche Hohlraumvolumen in der kondensierten Phase wesentlich größer ist als in der homogenen Phase. Im Allgemeinen lassen sich aus geometrischer Sicht Hohlraumvolumina durch eine fehlerhafte Packung in den kompakten Konformationszuständen erklären,^[119] wie sie auch in den gefalteten Strukturen globulärer Proteine beobachtet werden.^[40,192,193,209] So könnten Hohlraumvolumeneffekte eine mögliche Erklärung für die druckabhängige LLPS biomolekularer Kondensate sein, wobei die Hohlräume als ein

^{†††} Die hier beschriebenen physikalischen Überlegungen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Hue Sun Chan. Die Daten wurden in der Referenz^[257]publiziert.

zeitlich begrenzter (transienter) Zustand angesehen werden muss, während die Hohlräume in den gefalteten Proteinen im Wesentlichen statisch sind.^[53,54]

Mit Hilfe eines sehr vereinfachten Modells der SynGAP/PSD95-Phasentrennung sollen die Auswirkungen des Hohlraumvolumens in den SynGAP/PSD95-Tröpfchen halbquantitativ untersucht werden. Da die Wechselwirkungen zwischen SynGAP und PSD95 strukturell spezifisch sind, ist es angemessener anstelle eines Flory-Huggins-Polymer-Modells mit unspezifischen Kontaktwechselwirkungen ein Gel-Modell zu verwenden, das eine bestimmte Anzahl von "Sticker" für jedes Molekül vorsieht. Dass die SynGAP/PSD95-Tröpfchen eher flüssig als gelartig sind, soll an dieser Stelle außer Acht gelassen werden. Da die beiden Proteine SynGAP (1308 Aminosäurereste) und PSD95 (721 Reste) weitgehend gefaltet sind und zur Komplexbildung mit einer 3:2-Stöchiometrie neigen, wurde in diesem Modell eine einzelne generische Molekülspezies mit begrenzter struktureller Flexibilität und einem Molekülvolumen V_p angenommen, das dem 5000-fachen eines Aminosäurerests entspricht ($\approx 139.6 \text{ \AA}^3$). Basierend auf dem SynGAP/PSD95-Interaktionsmuster werden in dem Modell jeder Einheit vier „Sticker“ zugewiesen. Dabei entspricht die druckabhängige Stärke der Wechselwirkung zwischen einem Sticker-Paar den Werten in Tabelle 5.3. Die aus der Untersuchung resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Nähere Angaben zu dem verwendeten Modell, wobei die Auswirkungen des Hohlraumvolumens vernachlässigt werden, befinden sich im Anhang (vgl. S.181 und 182). Wie bereits vermutet, zeigt sich, dass die druckabhängigen K_d -Werte in Tabelle 5.3 nur eine sehr geringe Veränderung der bevorzugten LLPS-Bildung bewirken (schmales graues Feld). Die Tatsache, dass der phasenseparierte Zustand oberhalb von ~ 500 bar experimentell nicht mehr beobachtet wird (das gesamte graue Feld liegt im phasenetrennten Bereich), wurde hierbei nicht berücksichtigt. Dies wird auch durch die Energieprofile in Abbildung 5.9b verdeutlicht, die alle bimodal sind und eine kondensierte Phase bevorzugen.

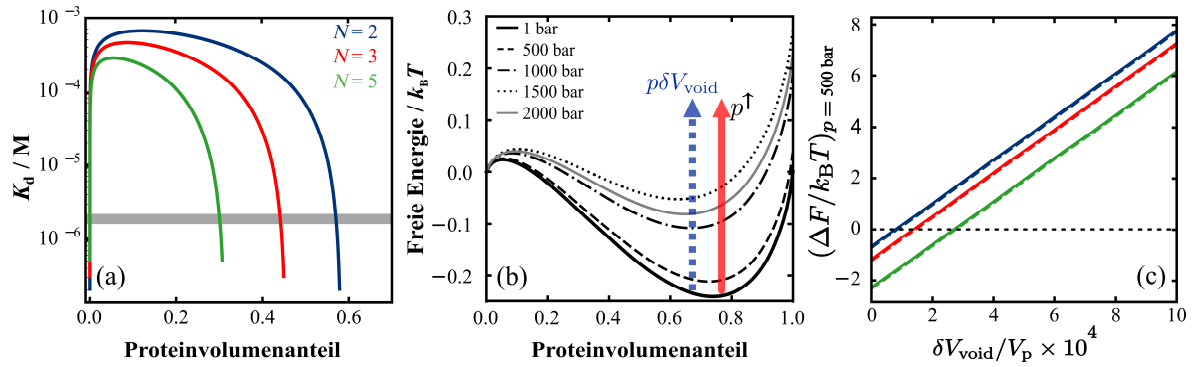


Abbildung 5.9: Ermittlung der Zunahme des Hohlraumvolumens infolge der kondensierten SynGAP/PSD95-Phasenbildung auf der Grundlage eines einfachen Semenov-Rubinstein-Gel-Modells.^[260] (a) Phasendiagramme (Koexistenzkurven) von drei alternativen Modellen, wobei N die effektive Anzahl der starren Einheiten darstellt und daher ein größeres N für flexiblere SynGAP- und PSD95-Moleküle sorgt. Die graue Fläche kennzeichnet den Bereich der paarweisen Dissoziationskonstanten in Tabelle 5.3. (b) Druckabhängige Energieprofile des $N = 2$ Modells. Die vertikale Variable entspricht $F_V(\phi, p) - \phi F_V(1, 1)$ (vgl. Anhang S.181 und 182) wobei ϕ der Proteinvolumenanteil und F_V die freie Energie pro Volumeneinheit (in der Einheit von $k_B T$; k_B ist Boltzmann-Konstante und $T = 300$ K die absolute Temperatur) ist. Der rote Pfeil verdeutlicht die Destabilisierung des lokalen Minimums der kondensierten Phase bei $\phi \approx 0.7$ aufgrund des steigenden Drucks ($p \uparrow$): Der blaue gestrichelte Pfeil zeigt an, dass ein höheres Hohlraumvolumen die kondensierte Phase destabilisieren kann. (c) ΔF ist die Differenz der freien Energie pro Proteinkomplex zwischen dem lokalen Maximum bei niedrigem ϕ -Wert und dem lokalen Minimum bei hohem ϕ -Wert in Anwesenheit eines hypothetischen δV_{void} . Die Ergebnisse werden für den Druck $p = 500$ bar und für die drei Modelle angegeben, die in Abbildung a) verwendet wurden. Die Kennzeichnung der Ergebnisse erfolgt wie in a) durch den gleichen Farbcode für N . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[257]

Da im Modell keine Effekte des Hohlraumvolumens berücksichtigt werden, soll nun gezeigt werden, wie sich eine zusätzliche Zunahme des Hohlraumvolumens δV_{void} von der verdünnten zur kondensierten Phase auf das Phasenverhalten auswirken würde. Bei einem Druck p wird die freie Energie des kondensierten Phasenzustands durch δV_{void} um $p\delta V_{\text{void}}$ erhöht (gestrichelter Pfeil in Abbildung 5.9b), wodurch zu erwarten ist, dass ein positives δV_{void} die kondensierten Tröpfchen destabilisiert. Da die Phasengrenzen durch die zweite Ableitung der freien Energie nach dem Volumenanteil bestimmt werden,^[47] müsste das Hohlraumvolumen für alle Proteinvolumenanteile (und nicht nur für die Differenz zwischen der kondensierten und der verdünnten Phase) bekannt sein, um die Auswirkungen des Hohlraumvolumens auf das Phasenverhalten exakt bestimmen zu können. Ungeachtet dessen sind ungefähre Angaben nur auf der Grundlage von δV_{void} möglich, da es wahrscheinlich ist, dass eine Phasentrennung nicht mehr stattfindet, wenn die freie Energie der kondensierten Phase über die gemeinsame Grenze zwischen der verdünnten und der kondensierten Phase angehoben wird. Unter Verwendung einer solch annähernden Vorgehensweise und der Voraussetzung, dass bei 500 bar keine LLPS auftritt, wird δV_{void} als Anteil des Protein-Molekularvolumens

auf 0.01 – 0.03 % geschätzt ($\Delta F = 0$ Schnittpunkte in Abbildung 5.9c). An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Änderung der Modellparameter N (bis auf $N = 10$) und V_p (z.B. Verringerung von V_p auf 2000 Reste wie bei einem SynGAP/PSD95-Komplex) keine wesentlichen Auswirkungen auf diese Werte hat. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass eine Verringerung der K_d -Werte in Tabelle 5.3 zu relativ größeren δV_{void} -Werten führen würde. Trotz der erwähnten Modellierungs- und experimentellen Ungenauigkeiten und unter Berücksichtigung aller genannten Überlegungen ist es wahrscheinlich, dass das Hohlraumvolumen eine wichtige Rolle bei der Druckempfindlichkeit der SynGAP/PSD95-Phasentröpfchen spielt. Unter diesem Gesichtspunkt wird die kondensierte Tröpfchenphase gemäß dem Prinzip von Le Chatelier^[210] unter hohem Druck instabil, da beim Auflösen der Tröpfchen und der Bildung einer homogenen verdünnten Phase teilweise eine Verringerung des Hohlraumvolumens erreicht wird, was auch durch eine höhere Mischungsentropie begünstigt wird.^[53]

Die vorliegende Angabe von $\delta V_{\text{void}}/V_p \approx 0.01 - 0.03 \%$ ist physikalisch plausibel, da sie keine großen, für Wasser unzugänglichen Hohlräume bedingt, die im flüssigen Zustand nur schwer aufrechtzuerhalten wären. Tatsächlich ist dieses $\delta V_{\text{void}}/V_p$ -Verhältnis viel kleiner als das für gefaltete globuläre Proteine geschätzte $\delta V_{\text{void}}/V_p \approx 7 \%$.^[193] Demnach entsteht die Druckempfindlichkeit der SynGAP/PSD95 Phasentröpfchen nicht durch ein großes δV_{void} . Wahrscheinlicher ist, dass sich die Druckempfindlichkeit aus dem Zusammenspiel eines geringen δV_{void} und einer Reihe von Tröpfchen bildenden kohäsiven Wechselwirkungen ergibt (Tabelle 5.3), die viel schwächer sind als die Wechselwirkungen, die den gefalteten Zustand globulärer Proteine bewirken.

5.6 Zusammenfassung und Fazit

Wie bereits erwähnt, ist der korrekte Aufbau von PSDs von entscheidender Bedeutung für die neuronale Funktion. Ein interessantes Beispiel ist, dass bei Mäusen die PSDs durch Schlaf herunterreguliert werden kann.^[261] So werden Mutationen und Funktionsstörungen der postsynaptischen Dichten mit verschiedenen neuropsychiatrischen und neurologischen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht.^[223,224,245–247] Wenn man bedenkt, dass das Nervensystem eines der empfindlichsten Ziele für hohen Druck ist^[245,247], ist es umso interessanter, dass der Phasenübergangsdruck des PSD-imitierenden SynGAP/PSD95-Systems um etwa eine Größenordnung geringer ist als der Druck, der für gewöhnlich zur Proteinfaltung führt.^[42,210] Obwohl noch weitere Anstrengungen nötig sind (z.B.: Konstruktion künstlicher PSDs unter Verwendung komplexerer In-vitro-Systeme^[17]), um die Struktur-Funktions-Beziehung von PSDs aufzuklären, bieten die vorliegenden Beobachtungen einen neuen Ansatz zur Untersuchung der neurologischen Auswirkungen durch den hydrostatischen Druck. Wenn die Druckempfindlichkeit natürlicher PSDs ähnlich oder gar höher ist als die der SynGAP/PSD95-Phasentröpfchen, könnten die vorliegenden Ergebnisse dazu beitragen, die zugrundeliegenden Mechanismen der druckbedingten, neurologischen Störungen bei Wirbeltieren zu entschlüsseln.^[224]

6 Der Einfluss von Kosolventien und Crowding Agenzien auf die Stabilität und die Übergangskinetik des SynGAP/PSD95-Kondensats^{§§§}

Auf Grundlage der in Kapitel 5 gezeigten Forschungsergebnisse, konzentriert sich diese Studie auf potenzielle adaptive Mechanismen der postsynaptischen Dichte. Insbesondere liegt der Fokus darauf, ob die Hochregulierung spezifischer zellulärer Komponenten die PSDs vor einer druckbedingten Schädigung bewahren kann. Wie schon zuvor beschrieben, stellt die postsynaptische Dichte ein proteinreiches Subkompartiment unter der postsynaptischen Plasmamembran der Synapse dar und ist sowohl für den Empfang als auch für die Verarbeitung und Speicherung der Signale verantwortlich, die von den präsynaptischen axonalen Enden übertragen werden.^[16,17,248] Als Modell für die PSD wurde das SynGAP/PSD95-System verwendet. SynGAP und PSD95 sind zwei primäre Bestandteile der PSD, die sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage sind, gemeinsam eine LLPS hervorzurufen.^[16] Obwohl die biologischen PSDs zahlreiche andere Proteinkomponenten enthalten,^[17] legt das Verhalten des einfachen SynGAP/PSD95-Modells der postsynaptischen Dichte nahe, dass die PSD-Tröpfchenphase zumindest teilweise durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den gefalteten PDZ-Domänen von PSD95 und dem Proteinbindungsmotiv von SynGAP stabilisiert wird.^[262]

Da makromolekulare Crowding Agenzien und Kosolventien häufige Bestandteile des zellulären Milieus sind und bekanntermaßen die relative Stabilität biomolekularer Systeme beeinflussen,^[5,6] werden hier die Auswirkungen des makromolekularen Crowding Agens Ficoll sowie der Kosolventien Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff auf die Stabilität der SynGAP/PSD95-Kondensate untersucht. Im Allgemeinen stellt das Zellinnere eine mit Proteinen, Makromolekülen und Membranoberflächen dicht bepäckte Umgebung dar, wodurch der zur Verfügung stehende Raum erheblich eingeschränkt wird. Um dieses dicht bepäckte Milieu in der Zelle nachzustellen, wurde in den vorliegenden Untersuchungen das 5.1 nm (Stokes-Radius, R_0) große Polysaccharid Ficoll[®] PM 70 als Crowder Molekül eingesetzt. Als Kosolvens wurde das kompatible Osmolyt TMAO ausgewählt, da es in Organis-

^{§§§} Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz publiziert:

H. Cinar, R. Oliva, H. Wu, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 1734–1741.^[268]

men, die in der Tiefsee bei hohen Drücken von mehreren hundert bar leben, hochreguliert ist.^[120,234] Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass TMAO als Druckkompensator bzw. "Piezolyt" agiert.^[117,119,214,263,264] Als weiterer Kosolvens wurde hier Harnstoff untersucht, da seine Auswirkungen auf biomolekulare Strukturen im Allgemeinen denen von TMAO entgegengesetzt sind.^[238,239] Die Erforschung der TMAO-Auswirkung auf die PSD ist auch für die menschliche Physiologie von Bedeutung. TMAO ist das Oxidationsprodukt von Trimethylamin und zugleich ein hepatischer Metabolit des Menschen, der aus dem Katabolismus der Nahrungsmittel durch die Darmmikrobiota stammt. Besonders bei Diabetikern sowie bei Patienten mit kognitiven Störungen und Demenz konnte eine erhöhte TMAO-Konzentration im Blutkreislauf und in der zerebralen Rückenmarksflüssigkeit festgestellt werden.^[265-267] Es ist anzunehmen, dass TMAO wahrscheinlich die Expression von präsynaptischen und postsynaptischen Rezeptoren beeinflusst. Des Weiteren besteht die Annahme, dass TMAO zu Defiziten in der Expression von Proteinen (z.B. PSD95) hervorrufen kann, die maßgebend für die synaptische Plastizität sind und zum anderen den mTOR-Signalweg herunterreguliert. Diese Effekte könnten erhebliche neurologische Konsequenzen mit sich bringen, da eine verminderte Expression von PSD95 sowohl zu kognitiven Störungen als auch zu Gedächtnisproblemen führt.^[265]

Ein grundlegender Unterschied zwischen der Kompartimentierung durch Lipid-Doppelschichtmembranen und durch die LLPS besteht darin, dass sich biomolekulare Kondensate als Reaktion auf biomolekulare Konzentrationsgradienten oder auf Umweltreize schneller bilden und auflösen können. In Anbetracht dessen ist die Kinetik des Auf- und Abbaus von biomolekularen Kondensaten von zentraler Bedeutung für deren biologische Funktion. Aus diesem Grund wurde mittels Drucksprung-Relaxationsspektroskopie die LLPS-Kinetik des SynGAP/PSD95-Modellsystems in Abhängigkeit unterschiedlicher Kosolventien untersucht. Der Einsatz von Druck als physikalische Größe bietet im Vergleich zu anderen Techniken, die zur Untersuchung der Kinetik von Phasenübergängen eingesetzt werden können, eine Vielzahl von Vorteilen.^[51,210] Zum einen erweist sich der Druck als ein sehr mildes Störmittel, das unmittelbar und gleichmäßig auf die Probe einwirkt (zusätzliches Mischen ist nicht erforderlich) und zum anderen können Drucksprünge vom phasentrennten in den homogenen durchmischten Zustand und umgekehrt durchgeführt werden, ohne eine Veränderung der Probenzusammensetzung herbeizuführen. Des Weiteren wurden zusätzlich zu den Drucksprung-Relaxationsmessungen druckabhängige UV/Vis-Absorptionsmessungen

und lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um das druckabhängige LLPS-Verhalten des SynGAP/PSD95-Systems in reiner Lösung und in Anwesenheit unterschiedlicher Kosolventien zu untersuchen.

6.1 Probenpräparation

Wie in Kapitel 5.1 wurden für die vorliegende Studie Proteinlösungen von PSD95 PDZ-SH3-GK und SynGAP CC-PBM in 50 mM TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) verwendet. Die Expression und Aufreinigung der Proteine^[16] sowie der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Mingjie Zhang^{****} und wurden für diese Studie in Form von konzentrierten Stammlösungen zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Stammlösungen konnten je nach Expressionserfolg unterschiedliche Konzentrationen aufweisen.

6.1.1 *Steady-state* Fluoreszenzspektroskopie

Die Probenpräparation und die druckabhängigen *steady-state* Fluoreszenzmessungen wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt. Hierzu wurde eine 2 μ M Lösung von Alexa405-markiertem PSD95 mit einer Lösung von unmarkiertem SynGAP im Bereich von 0 – 25 μ M titriert. Die Labelling-Effizienz des Alexa405-markierten PSD95 betrug 60 %. Als Puffer wurde 50 mM TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) verwendet. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 6.1 aufgelistet.

**** Division of Life Science, State Key Laboratory of Molecular Neuroscience, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong, China

Tabelle 6.1: Die für die *steady-state* Fluoreszenzmessungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
PSD95-Alexa405	2 μ M PSD95-Alexa405, 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP	0 – 25 μ M SynGAP, 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8

6.1.2 Turbiditäts- und Drucksprung-Relaxationsmessungen

Für die Kosolvens- bzw. Crowder-abhängigen Messungen wurden im Vorfeld Stammlösungen von einer 1 M TMAO-Lösung, 1 M Harnstoff- und 20 Gew.-% Ficoll[®] PM 70-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) vorbereitet. Da die Probenlösungen unmittelbar nach dem Pipettieren beider Proteinlösungen eine Phasentrennung aufwiesen, wurde zunächst der TRIS-Puffer mit SynGAP und dem jeweiligen Kosolvens oder Crowder gemischt und unmittelbar vor der Messung wurde abschließend die PSD95-Lösung hinzu pipettiert. In allen Messungen wurde eine SynGAP/PSD95-Konzentration von 50 μ M verwendet. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 6.2 aufgelistet.

6.1.3 Lichtmikroskopie

Gemäß Kapitel 6.1.2 wurden zu Beginn der Probenpräparation Stammlösungen von einer 1 M TMAO-, 1 M Harnstoff- und 20 Gew.-% Ficoll[®] PM 70-Lösung in TRIS-Puffer (50 mM, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) vorbereitet. Zunächst wurde der TRIS-Puffer mit SynGAP und dem jeweiligen Kosolvens bzw. Crowder gemischt und unmittelbar vor der Messung wurde abschließend die PSD95-Lösung hinzu pipettiert. In allen Messungen wurde eine SynGAP/PSD95-Konzentration von 50 μ M verwendet. Die verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung sind in der Tabelle 6.2 aufgelistet.

Tabelle 6.2: Die für die Lichtmikroskopie, Turbiditäts-, und Drucksprung-Relaxationsmessungen verwendeten Probenlösungen und ihre Zusammensetzung.

Probe	Zusammensetzung
SynGAP/PSD95	50 μ M SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP/PSD95-Harnstoff	0.1 – 0.2 M Harnstoff, 50 μ M SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP/PSD95-TMAO	0.1 – 0.5 M TMAO, 50 μ M SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8
SynGAP/PSD95-Ficoll	2.5 – 7.5 Gew.-% Ficoll [®] PM 70, 50 μ M SynGAP/PSD95 (1:1), 50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8

6.2 Druckabhängige Turbiditätsmessungen

Im vorangegangenen Kapitel wurde schon gezeigt, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des SynGAP/PSD95-Systems jenseits von 20 μM auftritt, während die temperaturabhängigen Untersuchungen in einem Temperaturbereich von 4 – 70 $^{\circ}\text{C}$ keine signifikante Auswirkung der Temperatur auf das Phasenverhalten zeigten.^[257] Ausgehend davon wurde das druckabhängige LLPS-Verhalten des SynGAP/PSD95-Systems in Anwesenheit unterschiedlicher Kosolventien untersucht. Als stabilisierende Kosolventien wurden das Osmolyt TMAO und das makromolekulare Crowding Agens Ficoll verwendet, während Harnstoff als typisch destabilisierender Kosolvens eingesetzt wurde. Einleitend in die Studie wurden druckabhängige Turbiditätsmessungen einer SynGAP/PSD95 Lösung bei einer Wellenlänge von 400 nm und bei ausgewählten Kosolvens-Konzentrationen durchgeführt. Da die vorangegangene Studie keinen temperaturabhängigen Einfluss auf das LLPS-Verhalten des SynGAP/PSD95-Systems zeigte, wurden die hier gezeigten Turbiditätsmessungen bei einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ aufgenommen.

In Abbildung 6.1 sind die druckabhängigen Turbiditätsdaten einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (1:1), (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) in Anwesenheit unterschiedlicher TMAO-, Ficoll- und Harnstoffkonzentrationen und in einem Druckbereich von 1 – 1800 bar gezeigt.

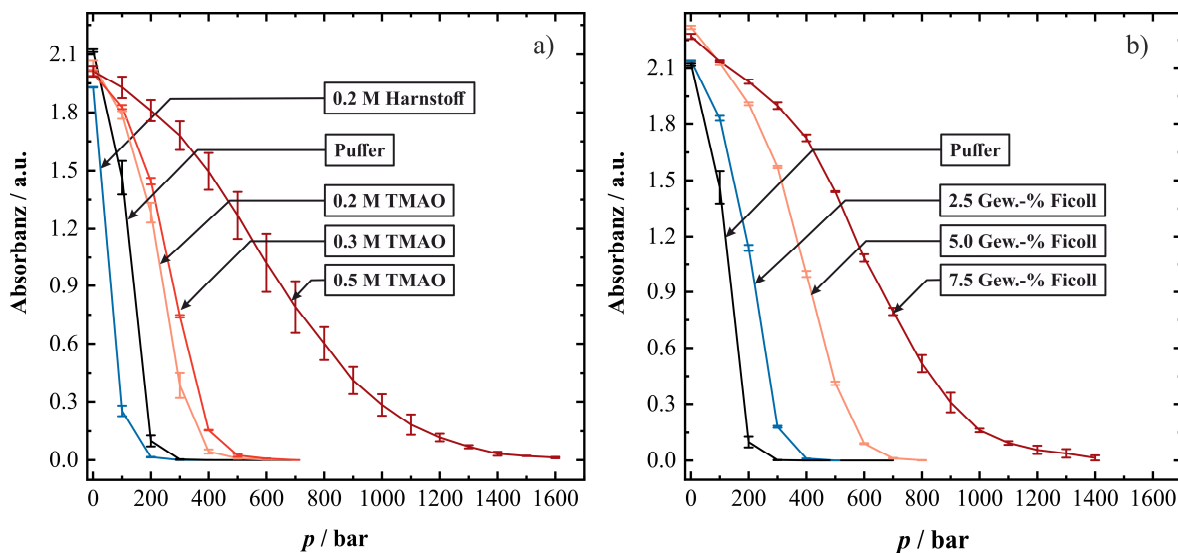


Abbildung 6.1: Repräsentative UV/Vis-Absorptionsdaten (Trübung) bei 400 nm einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) als Funktion des Drucks, in einer a) reinen Puffer-, 0.2 M Harnstoff- 0.2 – 0.5 M TMAO- und b) 2.5 – 7.5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[268]

Wie schon zuvor bei dem globulären Protein γ D-Kristallin und dem IDP α -Elastin beobachtet wurde, zeigen hier die druckabhängigen Turbiditätsdaten erneut den stabilisierenden Effekt von TMAO auf die LLPS des SynGAP/PSD95-Systems gegenüber erhöhtem Druck. Für eine reine 50 μ M SynGAP/PSD95-Lösung wurde erwartungsgemäß eine drastische Intensitätsabnahme der scheinbaren Absorption bis zu einem Druck von \sim 300 bar bei 25 °C beobachtet, was auf den vollständigen Phasenübergang von der phasengetrenten in die homogene Lösung deutet. Eine Zugabe von 0.3 M TMAO bewirkt eine Verschiebung des Phasenübergangdrucks von 300 bar auf \sim 600 bar, während eine weitere Erhöhung der TMAO-Konzentration den Übergangdruck in die homogene Phase auf circa 1.4 kbar verschiebt. Im Gegensatz zu TMAO bewirkt Harnstoff als chaotropes Agens eine Verschiebung des Phasenübergangs zu niedrigeren Drücken. So reicht bei 0.2 M Harnstoff lediglich ein Druck von \sim 200 bar aus, um die phasengetrente SynGAP/PSD95-Lösung in den homogenen Lösungszustand zu überführen. Wie auch das TMAO übt Ficoll eine stabilisierende Wirkung auf die Tröpfchenphase des SynGAP/PSD95-Systems aus, die sehr wahrscheinlich auf den *excluded-volume* Effekt zurückzuführen ist, der die Bildung der kompakten proteinreichen Phasentröpfchen begünstigt. Auffallend ist, dass bei einer makromolekularen Crowder-Konzentration von lediglich 7.5 Gew.-% Ficoll, die weit unter der typischen makromolekularen Crowding-Situation in einer biologischen Zelle (20 – 30 Gew.-%) liegt^[241], der Phasenübergangsdruk von der phasengetrenten in die homogene Phase deutlich über 1 kbar liegt.

6.3 Druckabhängige Lichtmikroskopie

Um das druck- und Kosolvens-abhängige Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems zu visualisieren, wurden unterstützend zu den druckabhängigen Turbiditätsmessungen lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 6.2 und 6.3 zeigen ausgewählte lichtmikroskopische Momentaufnahmen von 50 μM SynGAP/PSD95 in reiner Puffer (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8), 0.2 M TMAO- und 5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, die den phasengetrenten Zustand und den homogenen Lösungszustand in Abhängigkeit des Drucks darstellen. Hinsichtlich der Lage des LLPS-Stabilitätsbereichs stimmen die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Aufnahmen gut mit denen der Trübungsmessungen überein. In allen drei Lösungsmittelbedingungen wurde mit zunehmendem Druck eine stätige Abnahme der Tröpfchenzahl beobachtet, bis eine vollständig homogene Phase vorlag. So wurde für eine reine Pufferlösung eine vollständig homogene Lösung bei ~ 400 bar beobachtet (Abbildung 6.2), während der Übergangsdruck für eine 0.2 M TMAO- und 5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei 600 bar bzw. 900 bar lag (Abbildung 6.3a und b).

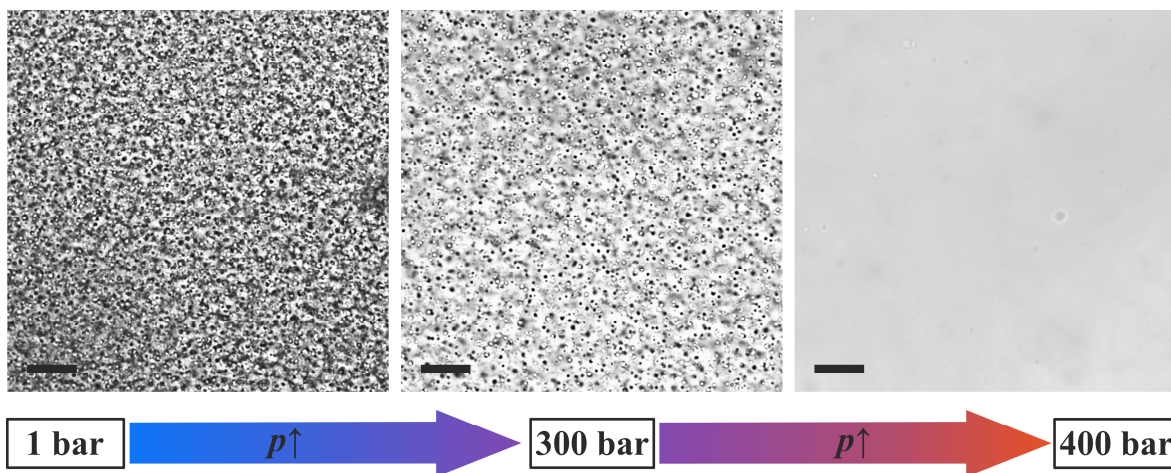


Abbildung 6.2: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei 25 $^\circ\text{C}$. Druckinduzierter Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der SynGAP/PSD95-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm . Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[268]

Übereinstimmend mit den Turbiditätsmessungen wurde in einer 0.2 M Harnstoff-Lösung die vollständig homogene Phase bereit bei ca. 200 bar erreicht (Abbildung 9.12). Sowohl in Gegenwart der beiden stabilisierenden Kosolventien als auch in Anwesenheit von Harnstoff wurden keine Veränderungen der Tröpfchenform und des Durchmessers beobachtet. Für alle untersuchten Bedingungen betrug der Durchmesser $\sim 5\text{ }\mu\text{m}$.

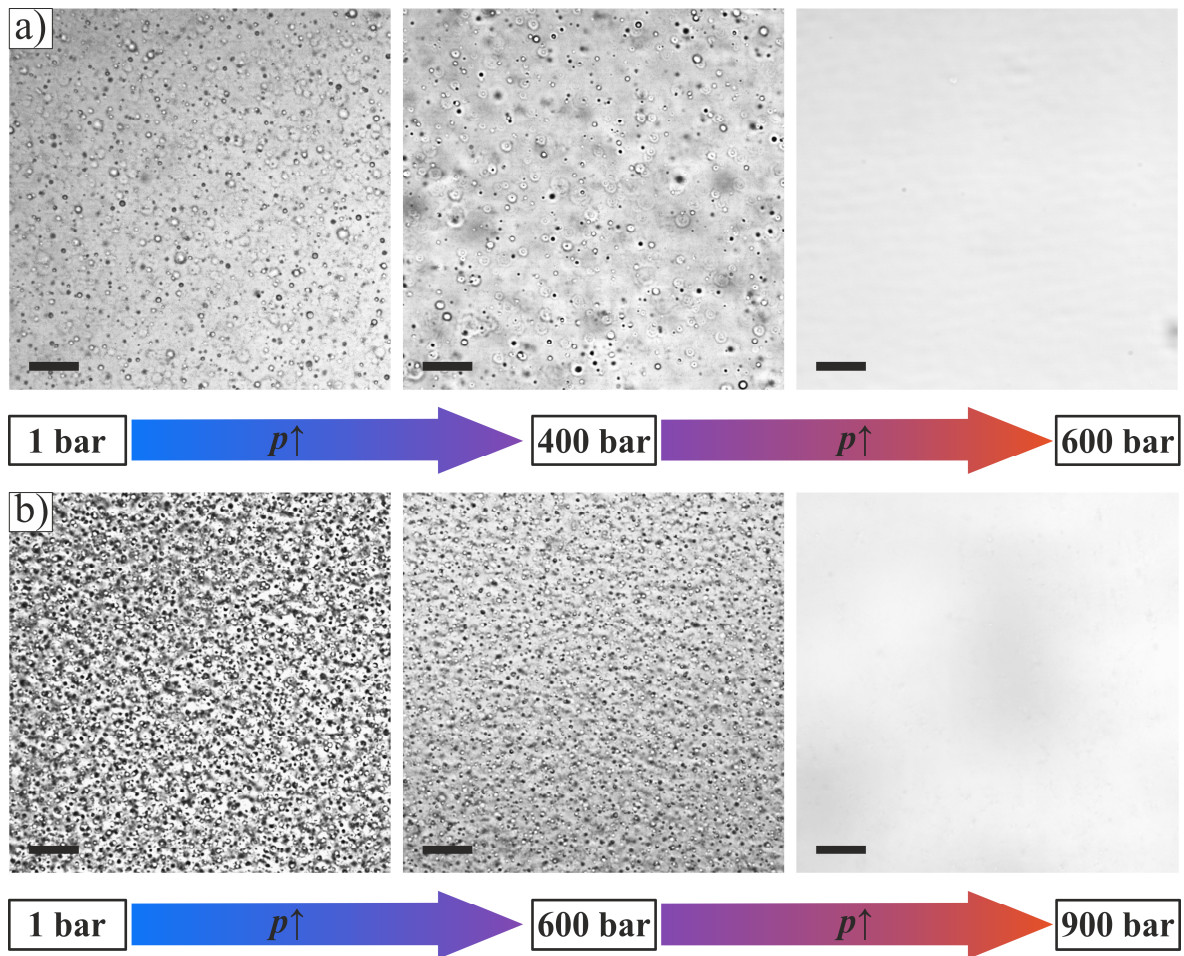


Abbildung 6.3: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder von 50 µM SynGAP/PSD95 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) in einer a) 0.2 M TMAO- und b) 5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei 25 °C. Druckinduzierter Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der SynGAP/PSD95-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 µm. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[268]

6.4 Druckabhängige *steady-state* Fluoreszenzmessungen^{††††}

Um Einblicke in die Mechanismen zu gewinnen, durch die Kosolventien die druckinduzierte Auflösung der Tröpfchenphase von SynGAP und PSD95 beeinflussen, wurde die *steady-state* Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d des SynGAP–PSD95-Komplexes eingesetzt. In diesem Zusammenhang wurde eine 2 μM Lösung von Alexa405-markiertem PSD95 mit einer Lösung von unmarkiertem SynGAP im Bereich von 0 – 25 μM titriert und die Änderungen der Fluoreszenzintensität von PSD-Alexa bei 426 nm ermittelt. Anschließend wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität F/F_0 als Funktion der SynGAP-Konzentration aufgetragen, wobei F_0 die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit und F in Anwesenheit unterschiedlicher SynGAP-Konzentrationen ist. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde das Model eines 1:1-Bindungsverhältnisses verwendet. Abbildung 6.4 zeigt die aus den Datenanpassungen erhaltenen Bindungsisothermen in reiner Pufferlösung und in 0.5 M TMAO- bzw. 7.5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C und ausgewählten Drücken. Eine vollständige Zusammenfassung der druckabhängigen Bindungskurven (500, 1000, 1500 und 2000 bar) in Gegenwart von 0.5 M TMAO und 7.5 Gew.-% Ficoll sind in der Abbildung 9.10 und der Abbildung 9.11 zu finden.

Die sich aus der Datenanpassung ergebenden Dissoziationskonstanten K_d für die jeweiligen Drücke sind in der Tabelle 6.3 aufgeführt. In den vorangegangenen FRET-Messungen (Kapitel 5.4) wurde für die Bildung des SynGAP–PSD95-Komplexes in reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) eine Dissoziationskonstante von $K_d = 1.7 \mu\text{M}$ bei 25 °C und Umgebungsdruck ($p = 1 \text{ bar}$) ermittelt.^[257] Die entsprechende Bindungskurve im vorliegenden Experiment ist in Abbildung 3a dargestellt. Die Datenanalyse ergab einen K_d -Wert von $5.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$, was angesichts der unterschiedlichen Methoden, die während der beiden Messungen verwendet wurden, eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung vorweist. Außerdem wurde die Dissoziationskonstante bei einem Druck von 2 kbar ermittelt, wobei ein Wert von $K_d = 8.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$ erhalten wurde. Wie schon zuvor erwähnt, deutet der geringe druckbedingte Anstieg der Dissoziationskonstante darauf hin, dass die Bildung des SynGAP–PSD95-Komplexes in verdünnter, homogener Lösung nahezu druckunempfindlich ist. Nichtsdestotrotz hängt der mit zunehmendem Druck

^{††††} Die *steady-State* Fluoreszenzmessungen am SynGAP/PSD95-System wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[268] publiziert.

geringfügig ansteigende K_d -Wert mit der abnehmenden Neigung zur LLPS-Bildung bei erhöhtem Druck zusammen, d.h. die druckabhängige Stabilität des SynGAP–PSD95-Kondensats wird durch die Stärke der paarweisen SynGAP–PSD95-Wechselwirkung in der verdünnten Lösung widerspiegelt.^[257]

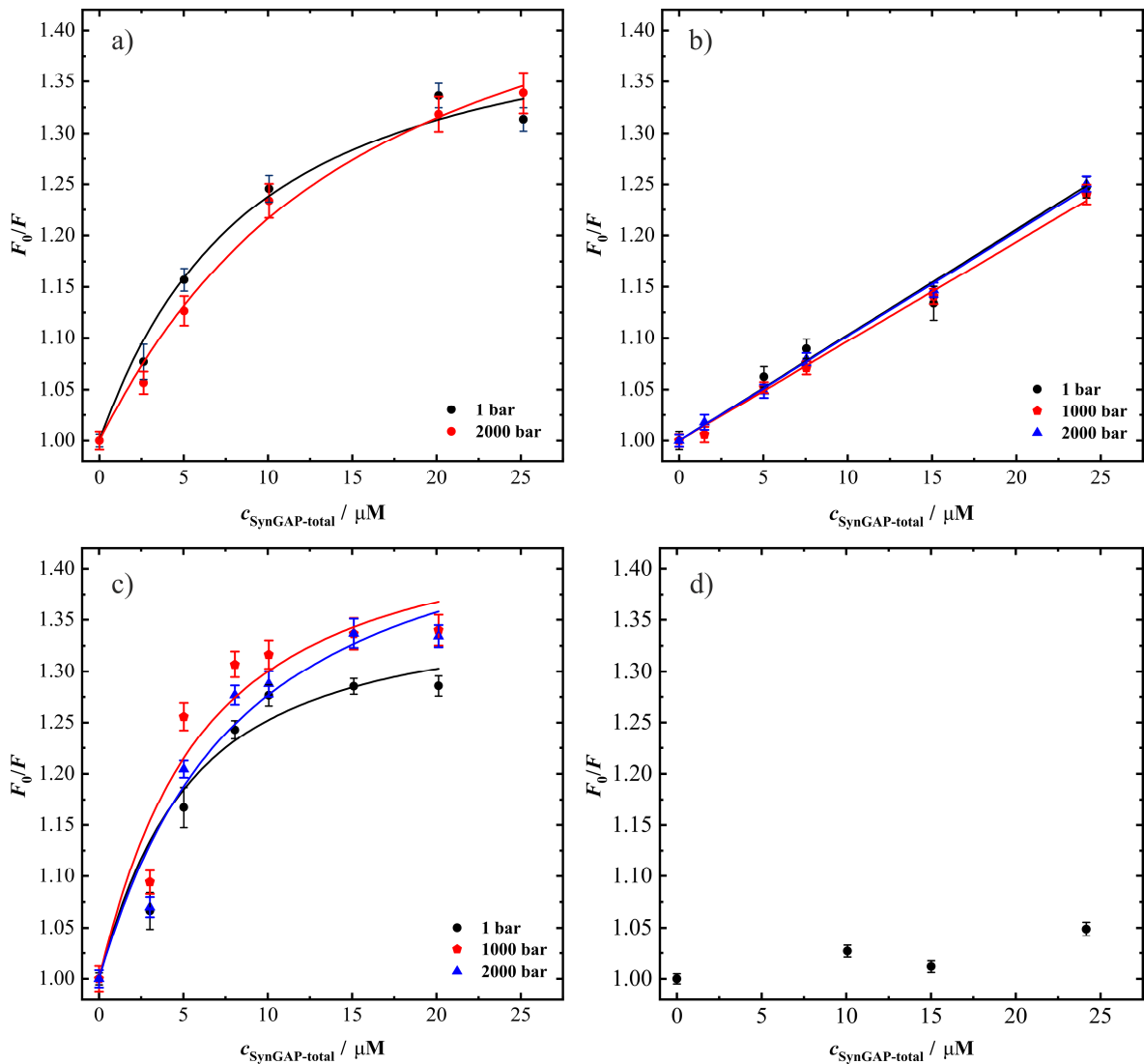


Abbildung 6.4: Druckabhängige Bindungsisothermen der Komplexbildung zwischen SynGAP und PSD95 bei $T = 25\text{ °C}$ in a) reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8), b) in 0.5 M TMAO-Lösung, c) in 7.5 Gew.-% Ficoll-Lösung und d) in 0.2 M Harnstoff-Lösung. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[268]

In Gegenwart von 0.5 M TMAO wurde für die Dissoziationskonstante ein K_d -Wert von $99\ \mu\text{M}$ ermittelt. Er ist im Verhältnis zur reinen Pufferlösung um das 20-fache höher. Daraus lässt sich schließen, dass die günstige Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen SynGAP und PSD95 in der verdünnten Phase durch TMAO stark beeinträchtigt wird. Dieses Verhalten könnte darauf zurückzuführen sein, dass TMAO das Wasserstoffbrückenbin-

dungsnetzwerk von Wasser und die Stabilität der Hydratationsschicht um die Proteine herum verstärkt.^[117,214,263,264] TMAO wechselwirkt auf unterschiedliche Weise mit verschiedenen chemischen Gruppen einer Proteinkette.^[269] Jüngste Studien haben gezeigt, dass TMAO in der Nähe unpolarer Gruppen in geringen Maßen angereichert werden kann, während es von den Amidgruppen der Proteinmoleküle stark verdrängt wird. Somit hängt die Verarmung von TMAO um die Proteinmoleküle stark von der Konfiguration der Moleküle ab.^[270,271] Unter diesem Gesichtspunkt deutet der hier beobachtete starke Anstieg des K_d -Wertes darauf hin, dass TMAO um die SynGAP–PSD95-Komplexe verhältnismäßig stärker abgereichert wird als um die freien (unkomplexierten) SynGAP- und PSD95-Moleküle. Dies könnte ein mögliches Szenario sein, da TMAO unterschiedliche Affinitäten für die unterschiedlichen chemischen Gruppen der beiden Proteine aufweist. Die Erhöhung des Drucks bis auf 2000 bar hatte keinen signifikanten Einfluss auf den hohen K_d -Wert (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3: Druckabhängige Dissoziationskonstanten K_d des SynGAP – PSD95-Komplexes in reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) und bei unterschiedlichen Kosolvens-Bedingungen.

Kosolvens	Druck / bar	K_d / μM
Pufferlösung	1	5.3 ± 1.5
	2000	8.8 ± 1.8
0.5 M TMAO-Lösung	1	99 ± 5.0
	500	100 ± 3.8
	1000	104 ± 2.3
	1500	104 ± 2.5
	2000	100 ± 1.4
7.5 Gew.-% Ficoll-Lösung	1	6.2 ± 3.2
	500	5.5 ± 3.9
	1000	4.6 ± 2.6
	1500	4.2 ± 1.9
	2000	6.6 ± 3.2

Trotz der Destabilisierung des paarweisen SynGAP–PSD95-Komplexes durch TMAO wird die dichte SynGAP/PSD95-Tröpfchenphase in der TMAO-haltigen Lösung im Vergleich

zur reinen Pufferlösung bei allen untersuchten Drücken stabilisiert (Kapitel 6.2, Abbildung 6.1a). Naheliegender ist, dass im kondensierten Zustand die unvorteilhafte Interaktion der Proteine an der Tröpfchengrenzfläche mit TMAO geringer ist und zu der beobachteten Stabilisierung der Tröpfchenphase gegenüber hohem Druck führt. Zusammenfassend deuten die scheinbar unterschiedlichen Auswirkungen von TMAO auf die paarweise SynGAP–PSD95-Assoziation und die SynGAP/PSD95-Phasentrennung darauf hin, dass die Stabilisierung des SynGAP/PSD95-Kondensats durch TMAO auf Wechselwirkungen höherer Ordnung (Vierteilchen-Wechselwirkungen) und nicht auf der paarweisen Wechselwirkung beruht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den jüngsten Forschungsergebnissen, wonach SynGAP/PSD95-Kondensate durch weitere Wechselwirkungen stabilisiert werden, die über die Wechselwirkungen in der verdünnten Phase hinausgehen.^[272]

In Anwesenheit des Denaturierungsmittels Harnstoff in einer Konzentration von 0.2 M wurden nur geringfügige Änderungen der Fluoreszenzintensität von PSD-Alexa bei Zugabe von SynGAP beobachtet, wodurch das Bestimmen einer Bindungskurve nicht möglich war (Abbildung 6.4d). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei Anwesenheit von Harnstoff die Komplexbildung derart unterdrückt wird, dass keine komplexbildende Bindung zwischen SynGAP und PSD95 beobachtet werden konnte. Im Unterschied zu TMAO korreliert die harnstoffinduzierte Verringerung der SynGAP–PSD95-Bindung in der verdünnten Phase mit der destabilisierenden Wirkung auf die Tröpfchenphase. Eine weitere Erhöhung des Drucks auf 2000 bar führte zu keiner sichtbaren Veränderung. Da die Wechselwirkungen von Harnstoff mit dem Proteinrückgrat und den Seitenketten bekanntlich den ungefalteten Zustand begünstigen, sind vermutlich die gleichen Wechselwirkungsarten auch für die beobachtete harnstoffinduzierte Abnahme der Tröpfchenstabilität verantwortlich (Abbildung 6.1a).

In Anwesenheit von 7.5 Gew.-% Ficoll wurde ein K_d -Wert von $6.2 \pm 3.2 \mu\text{M}$ ermittelt, der dem Wert in reiner Pufferlösung ähnlich ist (Tabelle 6.3). Folglich hat die Anwesenheit von Ficoll offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung eines paarweisen Komplexes zwischen PSD95 und SynGAP in verdünnter Lösung. Auch eine Druckerhöhung führte zu keiner signifikanten Änderung der Dissoziationskonstante. Es ist anzunehmen, dass Ficoll die Stabilisierung der Tröpfchenphase durch den entropischen *excluded-volume* Effekt hervorruft und somit die Tröpfchenphase von SynGAP/PSD95 begünstigt, da die kompakte Form des Kondensats ein geringeres für das Lösungsmittel ausgeschlossenes Volumen zur Folge hat.

6.5 Drucksprung-Relaxationsexperimente

Zusätzlich zu den Gleichgewichtsmessungen bei verschiedenen Drücken, die den Bedingungen in der Tiefsee nachempfunden waren, wurde der Druck auch als physikalische Messgröße zur Untersuchung der LLPS-Bildung verwendet. In Abbildung 6.5a sind die zeitabhängigen Absorptionsdaten einer reinen 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung (im molaren Verhältnis von 1:1) bei Raumtemperatur ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$), nach einem schnellen p -Sprung (Totzeit $\sim 50\text{ ms}$) von verschiedenen Anfangsdrücken in Richtung des Umgebungsdrucks (1 bar) zum Zeitpunkt $t = 0$ gezeigt. Die scheinbare Absorption A (Turbidität) nimmt beim Übergang aus der homogenen Phase in den Flüssig-Flüssig-phasengetrennten Bereich rasch zu und flacht nach etwa 6.4 s, beim Erreichen des neuen Gleichgewichtszustands, ab. Abbildung 6.5b zeigt die p -Sprungdaten in Richtung der Druckerhöhung. Aus den Daten wird ersichtlich, dass der drucksprunginduzierte Übergang vom phasenseparierten Zustand in die homogene Phase eine circa dreimal schnellere Übergangskinetik aufweist als der Phasenübergang von der homogenen in die phasengetrennte Lösung. Unabhängig davon ist der Phasenübergang in beide Drucksprungrichtungen insgesamt sehr schnell. Die beobachteten Prozesse laufen alle auf einer Zeitskala von wenigen Sekunden ab, wobei die Übergangszeit mit zunehmender Druckamplitude ($\Delta p = 600\dots 1600\text{ bar}$) leicht abnimmt.

Zur Auswertung der Kinetikdaten wurde an die zeitabhängig gemessenen Drucksprungdaten die Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov-Funktion (JMAK) gefittet. Gemäß der Gleichung (2.15), gilt für den Übergang in den LLPS-Bereich $\theta_d \sim A(t) = 1 - \exp(-kt)^n$ sowie $\theta_d \sim A(t) = \exp(-kt)^n$ beim Wiedereintritt in die homogene Phase, wobei n der sogenannte Avrami-Exponent und k eine scheinbare Geschwindigkeitskonstante ist. $A(t)$ ist proportional zum zeitabhängigen Volumenanteil $V_{\text{Tröpfchen}}/V$ der kondensierten Tröpfchenphase. Aufgrund der normierten Absorptionsdaten wird der Vorfaktor C in Gleichung (2.15) auf $C = 1$ gesetzt. Aus den gemessenen Kinetikdaten konnten direkt die Gesamtübergangszeit t_{tr} und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt werden. Hierbei ist t_{tr} die Zeit, die das System für den vollständigen Phasenübergang und zum Erreichen des neuen Gleichgewichtszustands benötigt, während $t_{1/2}$ die Zeit ist, in der die Hälfte der Absorptionsintensitätsänderungen erreicht wird (Tabelle 9.12 bis Tabelle 9.14).

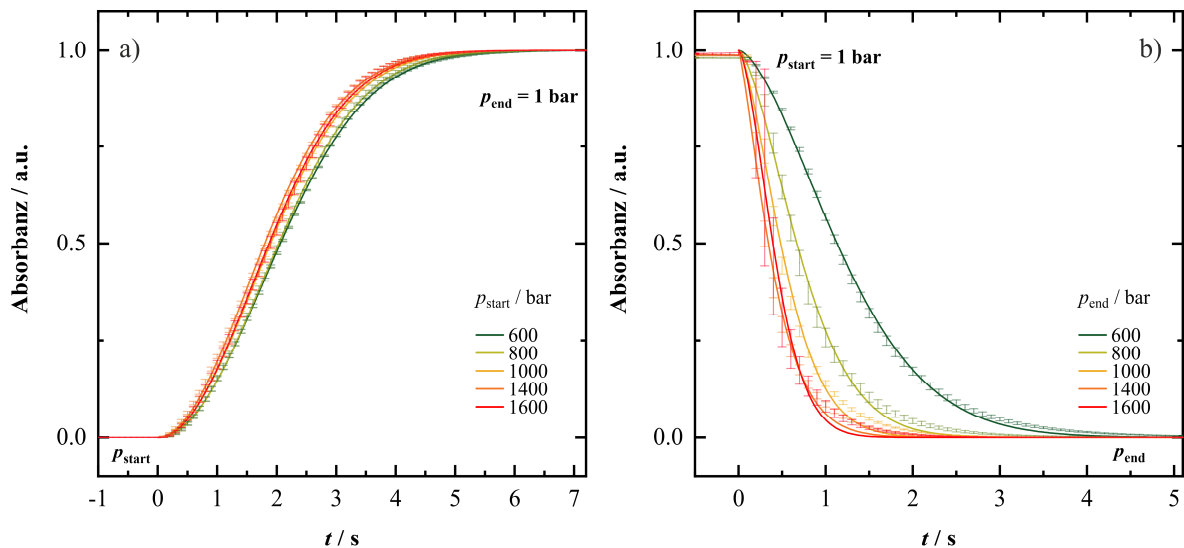


Abbildung 6.5: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption A (Turbidität) einer reinen $50 \mu\text{M}$ SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS , 100 mM NaCl , 1 mM EDTA , 1 mM DTT , $\text{pH} = 7.8$) bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Druckamplitude von a) hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung) und b) von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von SynGAP/PSD95 im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[268]

Exemplarisch sind in den Abbildungen 6.6a und b die Absorptionsdaten von SynGAP/PSD95 nach Zugabe von 0.2 M TMAO dargestellt. Die Anwesenheit von 0.2 M TMAO verschiebt die Gesamtübergangszeit der LLPS-Bildung von 6 s auf 12 s (Tabelle 9.13), während keine signifikante Auswirkung des Kosolvens auf die Auflösungskinetik der Zweiphasenregion beobachtet wurde. Die Erhöhung der TMAO-Konzentration von 0.2 M auf 0.3 M bewirkt eine weitere drastische Verschiebung der Gesamtübergangszeit der LLPS-Bildung auf 40 s . Demzufolge wird durch die Anwesenheit hoher TMAO-Konzentrationen die LLPS-Bildung erheblich verzögert (Tabelle 9.13). Ein ähnlicher Trend wurde auch in Gegenwart von 5 Gew.-% Ficoll beobachtet, obwohl der Effekt nicht so ausgeprägt war wie bei TMAO (Abbildung 6.6c & d und Tabelle 9.14).

Für die reine Puffer- und Ficoll-Lösung wurde ein Avrami-Exponent von $n \approx 2$ und für die 0.2 M TMAO -Lösung ein Wert von $n \approx 1.5$ ermittelt, was auf einen diffusionsbegrenzten Keimbildungs- und Wachstumsmechanismus bei der LLPS-Bildung hindeutet. Avrami-Exponenten zwischen $n \approx 1.5$ und $n \approx 2.5$ weisen auf ein Keimbildungs- bzw. Wachstumsverhalten hin, das einer gemischten heterogenen ($n \approx 1.5$) und homogenen ($n \approx 2$) Keimbildung entspricht. Wenn sich die Diffusionszonen benachbarter Tröpfchen zu überschneiden begin-

nen, lässt sich ein Übergang zu einem $n \approx 1$ -Verhalten beobachten, wie es bei der hochkonzentrierten (0.3 M) TMAO-Lösung beobachtet wurde (Tabelle 9.13).

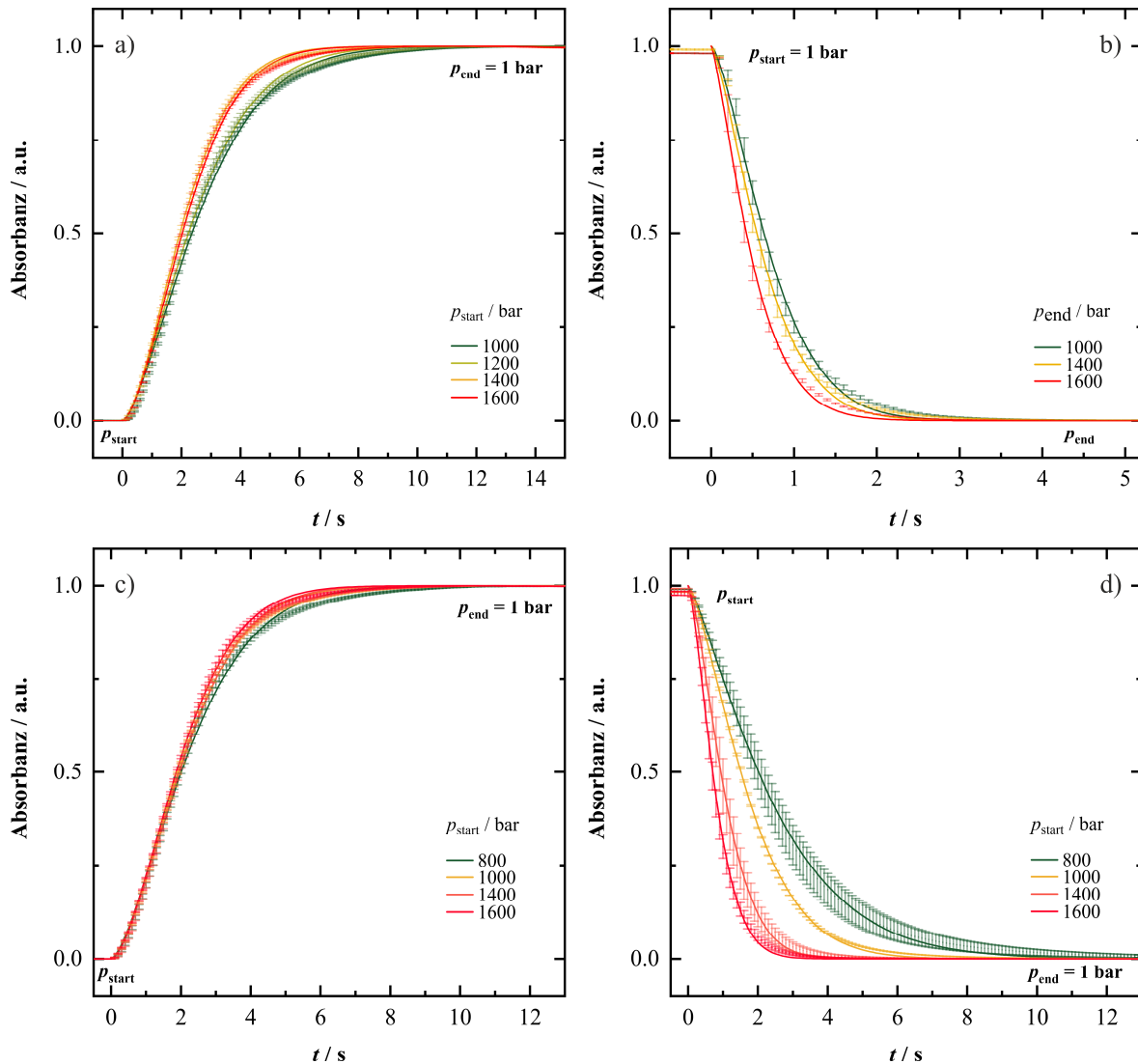


Abbildung 6.6: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption A (Turbidität) einer $50 \mu\text{M}$ SynGAP/PSD95-Lösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Druckamplitude in Gegenwart von a-b) 0.2 M TMAO und c-d) 5 Gew.-% Ficoll. a) und c) sind Drucksprünge von hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung). b) und d) sind Drucksprünge von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von SynGAP/PSD95 im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt.

6.6 Zusammenfassung und Fazit

In dieser Studie wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Kosolventien und eines makromolekularen Crowding Agens auf die flüssigen Phasentröpfchen und die LLPS-Kinetik zweier Hauptkomponenten der PSDs untersucht. PSDs konzentrieren Rezeptoren von Neurotransmittern und dienen der Signalverarbeitung bei synaptischer Aktivität. Dabei tauschen sie Komponenten mit dem umgebenden Zytoplasma aus und werden durch die synaptische Plastizität verändert.^[16,17,273] Es konnte gezeigt werden, dass die flüssigen Phasentröpfchen des SynGAP/PSD95-Modellsystems zu den druckempfindlichsten biomolekularen Strukturen gehören, die bisher identifiziert wurden. Eine Druckerhöhung um mehrere zehn bis hundert bar bewirkte eine drastische Abnahme der Tröpfchenstabilität und das Ausbleiben der Phasentrennung für eine 50 μM SynGAP/PSD95-Lösung bei etwa 200 bar. Demnach ist der kritische Druck des PSD-SynGAP/PSD95-Modellsystems um mehr als eine Größenordnung geringer als der Druck, der normalerweise für die Entfaltung von Proteinen oder kanonischen Nukleinsäurestrukturen erforderlich ist.^[42,123,207,210,274,275] Aus der extremen Druckempfindlichkeit des SynGAP/PSD95-Systems lässt sich schließen, dass die Proteine in den Tröpfchen einen sehr großen partiellen Molvolumenunterschied im Vergleich zu ihrem Zustand in freier Lösung aufweisen. Dies kann mit den assoziierten bzw. dissoziierten Zuständen der beiden Proteine zusammenhängen und möglicherweise auch mit den Eigenschaften und der Menge des Hydratationswassers der Proteine in den Phasentröpfchen bzw. in der Bulk-Lösung. Die beobachtete Druckempfindlichkeit der SynGAP/PSD95-Tröpfchen lässt sich nicht ausschließlich durch die Druckabhängigkeit der paarweisen SynGAP-PSD95-Wechselwirkung erklären. Eine physikalische Erklärung ist, dass die beobachtete Druckempfindlichkeit der Phasentröpfchen sich aus dem Zusammenspiel von großen, für Wassermoleküle unzugängliche Hohlraumvolumina und dem Vielteilchen-Interaktionsnetzwerk ergibt. Demzufolge würde eine druckinduzierte Dissoziation der Tröpfchenphase zu einer generellen Volumenabnahme im System führen.^[257]

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass der kompatible Osmolyt TMAO in moderaten Konzentrationen die destabilisierende Wirkung des Drucks auf die Tröpfchen minimieren und die kondensierte Phase des SynGAP/PSD95-Systems bis in den kbar-Bereich stabilisieren kann. Zum Vergleich beträgt der durchschnittliche Druck in den Weltmeeren ~ 400 bar und erreicht im Marianengraben einen maximalen Druck von ~ 1100 bar.^[38,39]

Die makromolekulare Verdrängung, auch Crowding genannt, ist eine in der zellulären Umgebung allgegenwärtige thermodynamische Kraft, die hier durch das biologisch verträgliche Polysaccharid Ficoll imitiert wird und eine ähnlich ausgeprägte, stabilisierende Wirkung auf die Tröpfchenphase von SynGAP/PSD95 aufweist. Der Effekt des Crowders kann als eine effektive Verstärkung der Protein-Protein-Wechselwirkungen interpretiert werden, die durch das ausgeschlossene Volumen des Crowders entropisch begünstigt werden.

Offensichtlich trägt TMAO zum piezophilen Metabolismus bei und dient wahrscheinlich dazu, Proteine vor den schädlichen Auswirkungen hohen Drucks zu schützen.^[120,234,276] In Übereinstimmung mit dieser Erwartung wurde festgestellt, dass TMAO in den Zellen zahlreicher Meeresorganismen linear mit der Meerestiefe bis zu einer Konzentration von etwa 0.5 M ansteigt, was auch der maximalen TMAO-Konzentration entspricht, die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurde. Darüber hinaus haben Treberg et al.^[277] gezeigt, dass nicht nur in den Muskelzellen von Tiefseefischen der TMAO-Gehalt mit zunehmender Tiefe ansteigt, sondern auch eine Anreicherung von TMAO in verschiedenen anderen Geweben der Teleostee, einschließlich des Gehirns, zu beobachten ist. Außerdem kann die TMAO-Konzentration in verschiedenen Tiefseeorganismen um bis zu zwei Größenordnungen höher sein als in Flachwasserarten. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Organismen stabilisierende Osmolyte wie TMAO und zelluläres Crowding nicht nur nutzen können, um extreme Umweltbedingungen zu kompensieren und einzelne Proteinmoleküle vor der Entfaltung und Denaturierung zu schützen, sondern sie können dieselben Kosolventien auch nutzen, um biomolekulare LLPS-Prozesse bei hohem Umgebungsdruck aufrechtzuerhalten und zu steuern. Abgesehen von den stabilisierenden Effekten solcher Kosolventien könnten auch Sequenzvariationen von Proteinen zur Anpassung an Drücke beitragen, ähnlich wie bei den Proteinen in thermophilen Organismen, die an das Leben bei hohen Temperaturen angepasst sind. Bislang liegen jedoch keine validen Informationen vor. Daher sollten künftige Bemühungen unternommen werden, um diese Frage zu klären.

Aufgrund seines großen Dipolmoments ist TMAO in der Lage, stark mit Wasser zu interagieren, und es besteht offenbar Einigkeit darüber, dass TMAO im Allgemeinen nicht bevorzugt an Proteinoberflächen bindet,^[6,117,214,263,264] obwohl einige Studien darauf hindeuten, dass TMAO von den unpolaren Gruppen in den Proteinen leicht angezogen werden kann.^[270,271] Dies scheint auch der Grund für die hier beobachtete starke Stabilisierung der Tröpfchenphase zu sein. Es wird vermutet, dass TMAO als Ausgangspunkt dient, von dem aus sich das tetraedrische Wassernetzwerk aufbauen und stabilisieren kann. Des Weiteren

wird angenommen, dass TMAO in der Lage ist, der druckinduzierten strukturellen Störung des Wassers entgegenzuwirken.^[264] Demnach verhindert die TMAO-induzierte Zunahme der Wasserstoffbrückenbindung in der Wasserstruktur und ihrer Stärke das Eindringen von Wasser in die Hohlräume innerhalb kompakt gefalteter Proteinstrukturen, wodurch eine Volumenverringerng durch Entfaltung der Proteine bei hohem Druck unwahrscheinlicher wird.^[236] Ein vergleichbares Szenario könnte auch auf die dichte Tröpfchenphase von SynGAP/PSD95 zutreffen.

Die Drucksprungexperimente zeigen, dass die Bildung der Tröpfchenphase von SynGAP/PSD95 ein zeitlich relativ schneller Prozess ist, der innerhalb weniger Sekunden in den homogenen Phasenzustand und wieder zurück in den phasenseparierten Ausgangszustand überführt werden kann. Verglichen mit der ausgeprägten Wirkung von TMAO und Ficoll auf die Stabilität des LLPS-Zustands, ist deren Wirkung auf die Phasentrennungskinetik bei biologisch relevanten Konzentrationen eher gering. Dies könnte sich im zellulären Kontext als funktionell vorteilhaft erweisen, da in diesem Fall die Fähigkeit des schnellen Umschaltens zwischen dem Bilden und dem Auflösen tröpfchenförmiger membranloser Organellen nicht durch die Anwesenheit zellulärer Kosolventien beeinträchtigt wäre. Unter den untersuchten TMAO-Konzentrationen führt ausschließlich eine hohe Konzentration von 0.3 M zu einer etwa 10-fachen Erhöhung der Phasenübergangszeit. In anderen Worten ausgedrückt, kann das stark stabilisierende Osmolyt TMAO bei hohen Konzentrationen die Tröpfchenbildung verzögern, was zusammen mit seiner ausgeprägten Wirkung auf die Tröpfchenstabilität die Plastizität der PSDs beeinträchtigen und somit ihre Funktion in Neuronen sogar erheblich einschränken könnte. Angesichts des eher einfachen Charakters des SynGAP/PSD95-Kondensatmodells für die PSDs sind weitere Bemühungen erforderlich, um die Struktur-Funktionsbeziehung von PSDs unter Hochdruck- und Kosolvens-Bedingungen aufzuklären. Beispielsweise könnten biologisch relevantere In-vitro-PSD-Modelle^[17] für druck- und Kosolvens-abhängige Experimente präpariert und verwendet werden.

Die Druckstabilität des Nervensystems von Tiefseeorganismen (z.B. Elasmobranchier oder Teleosteer wie der Hadal-Schneckenfisch, der in Meerestiefen von bis zu 7000 m lebt) ist eine wichtige, während ihrer Evolution erworbene Eigenschaft. Im Gegensatz dazu kommt es bei menschlichen Tauchern zu dramatischen Veränderungen der motorischen Funktionen und der Erregbarkeit des Nervensystems, wie die Krankheitsfälle des HPNS zeigen.^[245] Vergleichbare physiologische, biochemische und biophysikalische Untersuchungen zur Hochdruckadaptation des Nervensystems stehen jedoch noch aus. Die vorliegende Untersuchung

der Druckabhängigkeit der LLPS des einfachen SynGAP/PSD95-Modells bietet jedoch neue biophysikalische Einblicke in die neurologischen Auswirkungen des hydrostatischen Drucks und wie bestimmte Kosolventien des zellulären Milieus (z.B. TMAO) die schädlichen Auswirkungen des Drucks kompensieren können.^[249,278]

7 Zusammenfassung

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) von Proteinen und Nukleinsäuren spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen innerhalb der Zelle. So wurde erst in den letzten 10 Jahren erkannt,^[10] dass neben der "klassischen" Lipid-Doppelschichtmembran gestützten Kompartimentierung, wie bei der Plasmamembran, den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum, auch biomolekulare Kondensate an der zellulären Organisation beteiligt sind. Beispiele für solche membranlosen Organellen sind zytoplasmatische Granula, Nukleoli, Cluster von Proteinen, die an der Signalübertragung beteiligt sind, und postsynaptische Dichten, d.h. proteinreiche zelluläre Kompartimente unter der postsynaptischen Membran.^[13,16,28,31,43,150] Die Existenz und die Lage der Phasenübergänge, einschließlich komplexer biomolekularer Gemische, die eine LLPS durchlaufen, hängen hierbei stark von der Temperatur, dem Druck, der Ionenstärke und der Konzentration der Komponenten ab. Aufgrund dieser hohen Empfindlichkeit der LLPS gegenüber sich ändernden Umweltbedingungen, sind biomolekulare Kondensate häufig an Reaktionen beteiligt, die sich gegen externe Stressfaktoren wie dem Hitzeschock richten.^[37] Neben der Beteiligung an biologischen Prozessen, welche die Zellaktivität aufrechterhalten, spielen kondensierte oder aggregierte Zustände auch eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Krankheiten, wie der amyotrophen Lateralsklerose oder dem Katarakt.^[1,7,8] Weiterführend könnte die biomolekulare LLPS und membranlose Kompartimentierung sogar eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Protozellen in der präbiotischen Evolution gespielt haben, wie erstmals in der Arbeit von Oparin im Jahr 1924^[26,27] vorgeschlagen wurde. Da über 60 % der irdischen Organismen im Ozean in einer Tiefe von mehr als 1000 m und bei Drücken über 100 bar (im Marianengraben herrschen sogar Drücke von 1 kbar) existieren, der zugleich auch als potenzieller Geburtsort des Lebens auf der Erde gilt,^[38,39] wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf den hydrostatischen Druck (*high hydrostatic pressure*, HHP) als Stressfaktor gelegt.

Im Bestreben, biomolekulare LLPS-Prozesse zu verstehen, konzentrierte sich diese Arbeit auf die Gleichgewichtsthermodynamik der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung unterschiedlicher Proteinsysteme in Abhängigkeit der Temperatur, des Druckes und unterschiedlicher Kosolvens-Bedingungen. Um die Funktion solcher LLPS-gesteuerten biologischen Kompartimentierungsvorgänge vollständig verstehen zu können, reicht jedoch die Kenntnis des

Gleichgewichtsverhaltens solcher LLPS-Prozesse nicht aus. Aufgrund dessen wurde die Arbeit auf die Untersuchung der Phasenübergangskinetik der LLPS-Prozesse erweitert.

Im ersten Teilprojekt wurden die Phasenübergangseigenschaften und die Struktur unterschiedlicher Proteine über einen weiten Temperaturen-, Druck- und TMAO-Konzentrationsbereich untersucht. Hierzu wurden das globuläre, gefaltete Protein γ -Kristallin und das intrinsisch ungeordnete Protein (IDP) α -Elastin als Proteinsysteme ausgewählt. Als drittes System wurde die intrinsisch ungeordnete Proteinregionen DDx4 ausgewählt. Die Ergebnisse hierzu stammten aus der Publikation von Çınar et al.^[53] Die Untersuchungen ergaben, dass neben dem temperaturinduzierten Phasenübergang besonders Druck als thermodynamische Variable und die sich daraus ergebenden volumetrischen Effekte einen empfindlichen Einfluss auf die Phasentrennung der hier gezeigten Systeme hat. Druckänderungen von einigen zehn bis hundert bar können ausreichen um die biomolekulare LLPS vollständig aufzuheben. Diese druckbedingte Destabilisierung der Phasentröpfchen kann durch die Zugabe des natürlichen Osmolyts TMAO verhindert werden. Aus den Daten geht hervor, dass schon moderate TMAO-Konzentrationen (wie sie auch in Tiefseefischen zu finden sind) ausreichen, um die Tröpfchenphase selbst bei Drücken von mehreren hundert bar zu stabilisieren. Begründet wird diese Beobachtung dadurch, dass TMAO in der Lage ist, bevorzugt mit Bulk-Wasser zu interagieren, während es von der Proteingrenzfläche vorwiegend ausgeschlossen wird. Demzufolge besitzen die Proteine in der kondensierten Tröpfchenphase eine geringere exponierte Proteinoberfläche, im Vergleich zum homogenen Lösungszustand, was energetisch günstiger ist. FT-IR spektroskopische Untersuchungen ergaben zudem, dass während des temperatur- und druckabhängigen LLPS-Phasenübergangs keine sekundärstrukturellen Veränderungen stattfinden.

Im zweiten Teilprojekt konzentrierten sich die Untersuchungen auf das globuläre, gefaltete Protein γ D-Kristallin. Ziel war es, die Phasenübergangskinetik des γ D-Kristallin-Systems zu untersuchen. Da Kosolventien und Crowding Agenzien häufige Bestandteile des zellulären Milieus sind und bekanntermaßen die relative Stabilität biomolekularer Systeme, einschließlich der Proteinkondensate, beeinflussen,^[5,6,52,53,117] wurde zusätzlich der Einfluss von Harnstoff, Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) und dem Crowding Agens Ficoll auf die Phasenstabilität und die Übergangsphasenkinetik des Systems untersucht. Als Voraussetzung für die kinetischen Untersuchungen wurde zunächst die Stabilität des Proteins für alle verwendeten Lösungsmittelbedingungen, Temperaturen und Drücke untersucht. Die Daten ergaben, dass die beiden Kosolventien TMAO und Ficoll zum einen die Phasenübergangstemperatur von

γ D-Kristallin erhöhen und zum anderen eine deutliche Erhöhung der Druckstabilität der kondensierten Phasentröpfchen bewirken. Die stabilisierende Wirkung des Crowding Agens Ficoll lässt sich durch den *excluded-volume* Effekt erklären, wodurch kondensierte Strukturen begünstigt werden. Im Gegensatz dazu bewirkt Harnstoff eine Destabilisierung des phasengetrenten Zustands. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Wechselwirkung von Harnstoff mit dem Proteinrückgrat und den Seitenketten von γ D-Kristallin zurückzuführen, wodurch eine Verringerung der schwachen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen in der Tröpfchenphase bewirkt wird. Aus den Kinetik-Untersuchungen ging hervor, dass der Phasenübergang in den phasenseparierten Zustand über einen diffusionsbegrenzten Keimbildungs- und Wachstumsmechanismus erfolgt, wobei sich die Wachstumsrate wahrscheinlich mit der Zeit ändert. Insgesamt sind die Bildung und die Auflösung des Proteinkondensats ein sehr schneller Prozess, der innerhalb von einigen Sekunden läuft, und somit in einem biologisch relevanten kurzen Zeitraum liegt. Ungeachtet der ausgeprägten Wirkung der Kosolventien auf die Stabilität des LLPS-Bereichs, war ihr Einfluss auf die Phasenübergangskinetik bei biologisch relevanten Konzentrationen quasi vernachlässigbar.

Im dritten Teilprojekt wurde das druckempfindliche Phasenverhalten des SynGAP/PSD95-Systems untersucht, das als Modellsystem für die postsynaptische Dichte (PSD) dienen sollte. Im Gegensatz zu den vorherigen Systemen wurde kein temperaturabhängiger Phasenübergang beobachtet. Nach dem Mischen beider Proteinlösungen bildete sich ein phasenseparierter Zustand, der über den gesamten Temperaturbereich von 5 bis 60 °C erhalten blieb. Jedoch zeigte sich auch bei diesem System ein sehr druckempfindliches Phasenverhalten. Eine Druckerhöhung auf einige hundert bar reichte aus, um die Bildung der LLPS vollständig zu unterbinden. Eine Druckentlastung führte bei allen gezeigten Systemen zu einem erneuten Wiedereintritt in den phasenseparierten Zustand, d.h. der Prozess ist vollständig reversibel.

Das vierte und zugleich letzte Teilprojekt widmete sich der Untersuchung der Phasenstabilität und der Phasenübergangskinetik von SynGAP/PSD95 in Anwesenheit unterschiedlicher Kosolventien. Auch hier zeigte sich erneut der stabilisierende Effekt von TMAO und Ficoll auf die LLPS gegenüber hohem Druck, während Harnstoff den gegenteiligen Effekt bewirkte und den Übergangsdruck in die homogene Phase zu noch geringeren Drücken herabsetzte. Generell lässt sich die beobachtete Druckempfindlichkeit der Phasentröpfchen durch ein Zusammenspiel von großen, für Wassermoleküle unzugängliche, Hohlraumvolumina

und einem Vielteilchen-Interaktionsnetzwerk der Proteinmoleküle erklären, wodurch eine druckinduzierte Dissoziation der Tröpfchenphase zu einer Volumenabnahme im System führen würde.^[257] Wie bei dem globulären gefalteten Protein γ D-Kristallin ist die Bildung der Tröpfchenphase von SynGAP/PSD95 ein zeitlich sehr schneller Prozess, der innerhalb weniger Sekunden abläuft, wobei die Wirkung von TMAO und Ficoll auf die Phasentrennungskinetik, bei biologisch relevanten Konzentrationen, eher gering ist. Unter den untersuchten TMAO-Konzentrationen führt ausschließlich eine hohe Konzentration von 0.3 M zu einer etwa 10-fachen Erhöhung der Phasenübergangszeit. Somit würden hohe Konzentrationen des stark stabilisierenden Osmolyt die Tröpfchenbildung etwas verzögern, was zusammen mit seiner ausgeprägten Wirkung auf die Tröpfchenstabilität die Plastizität der PSDs beeinträchtigen und somit ihre Funktion in Neuronen einschränken könnte.

8 Summary

Liquid-liquid phase separation (LLPS) of proteins and nucleic acids plays an important role in a variety of biological processes within the cell. For example, it has only been recognized in the last 10 years^[10] that in addition to the "classical" lipid bilayer membrane-supported compartmentalization, as by the plasma membrane or in mitochondria and the endoplasmic reticulum, biomolecular condensates are also involved in cellular organization. Examples of such membrane-less organelles include cytoplasmic granules, nucleoli, clusters of proteins involved in signal transduction, and postsynaptic densities, i.e., protein-rich cellular compartments under postsynaptic membranes.^[13,16,28,31,43,150] Here, the existence and location of phase transitions, including complex biomolecular mixtures, undergoing an LLPS are highly dependent on the temperature, pressure, ionic strength and concentration of the components. Because of this high sensitivity of LLPS to changing environmental conditions, biomolecular condensates are often involved in reactions directed against external stressors such as heat shock.^[37] In addition to being involved in biological processes that sustain cellular activity, condensed or aggregated states also play an important role in a variety of diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis and cataract.^[1,7,8] Furthermore, biomolecular LLPS and membrane-less compartmentalization may even have played an important role in the development of protocells in prebiotic evolution, as first proposed in the work of Oparin in 1924.^[26,27] Although more than 60 % of terrestrial organisms exist in the ocean at depths greater than 1000 m and pressures above 100 bar (pressures of up to 1 kbar prevail in the Mariana Trench), which is also considered the potential birthplace of life on Earth,^[38,39] this work also focused on hydrostatic pressure (HHP) as a stressor. In an effort to understand biomolecular LLPS processes, this work focused on the equilibrium thermodynamics of liquid-liquid phase separation of different protein systems as a function of temperature, pressure, and different cosolvent conditions. However, to fully understand the function of such LLPS-driven biological compartmentalization processes, the knowledge of the equilibrium behavior of such LLPS processes is not sufficient. Due to this, the work was extended to the study of the phase transition kinetics of LLPS processes.

Initially, in the first subproject, the phase transition properties and structure of different proteins were studied over a wide range of temperature, pressure and TMAO concentrations. For this purpose, the globular folded protein γ -crystallin and the intrinsically disordered pro-

tein (IDP) α -elastin were selected as protein systems. The intrinsically disordered protein regions DDx4 was selected as a third system. The results of DDx4 were obtained from the publication of Çınar et al.^[53] The investigations showed that, in addition to the temperature-induced phase transition, especially pressure as a thermodynamic variable and the resulting volumetric effects, has a sensitive effect on the phase separation of the systems shown here. Pressure changes of tens to hundreds bar can be sufficient to completely abrogate or induce biomolecular LLPS. This pressure-induced destabilization of the phase droplets could be counteracted by the addition of the natural osmolyte TMAO. The data indicate that even moderate TMAO concentrations (as found in deep-sea fish) are sufficient to stabilize the droplet phase even at pressures of several hundred bars. The reason for this observation is that TMAO is able to interact preferentially with bulk water, while it is excluded from the protein interface. Consequently, proteins in the condensed droplet phase would have a lower protein surface area that may interact energetically unfavorably with TMAO compared to the homogeneous solution state. The FT-IR spectroscopic studies revealed that no secondary structural changes take place during the temperature- and pressure-dependent phase transition.

In the second subproject, the studies focused on the globular folded protein γ D-crystallin. The aim was to investigate the phase transition kinetics of the γ D-crystallin system. Since cosolvents and crowding agents are common components of the cellular environment and are known to affect the relative stability of biomolecular systems, including protein condensates,^[5,6,52,53,117] the influence of urea, trimethylamine-*N*-oxide (TMAO), and the crowding agent Ficoll on the phase stability and phase transition kinetics of the system was additionally investigated. As a prerequisite for the kinetic studies, the stability of the protein was first examined for all solvent, temperature, and pressure conditions used. The data revealed that the cosolvents TMAO and Ficoll increase the phase transition temperature of γ D-crystallin and cause a significant increase in the pressure stability of the condensed phase droplets. The stabilizing effect of the crowding agent Ficoll can be explained by the excluded-volume effect, which favors condensed structures. In contrast, urea causes destabilization of the phase-separated state. This effect is most likely due to the interaction of urea with the protein backbone and side chains of γ D-crystallin, resulting in a reduction of the weak intermolecular interactions between the protein molecules in the droplet phase. The kinetics investigation revealed that the phase transition to the phase-separated state occurs by a diffusion-limited nucleation and growth mechanism, with the growth rate likely changing with time. In summary, the formation and dissolution of the protein condensate is a very rapid process that

occurs within a few seconds, and thus occurs on a biologically relevant short time scale. Notwithstanding the pronounced effect of the cosolute on the stability of the LLPS region, the effect of the cosolute on the phase transition kinetics was quasi-negligible at biologically relevant concentrations.

In the third subproject, the pressure-sensitive phase behavior of the SynGAP/PSD95-system was investigated to serve as a model system for postsynaptic densities (PSD). In contrast to the previous systems, no temperature-dependent phase transition was observed. After mixing the two protein solutions, a phase-separated state was formed which was maintained over the entire temperature range from 5 to 60 °C. However, this system also showed a very pressure sensitive phase behavior. An increase in pressure to several hundred bar was sufficient to completely abolish the LLPs process. Depressurization resulted in re-entry into the phase-separated state for all systems shown, i.e., the LLPS formation is fully reversible.

The fourth and last subproject focused on the investigation of the phase stability and phase transition kinetics of SynGAP/PSD95 in the presence of different cosolvents. Again, the stabilizing effect of TMAO and Ficoll on the LLPS against high pressure was demonstrated, while urea caused the opposite effect and lowered the transition pressure to the homogeneous phase to even lower pressures. In general, the observed pressure sensitivity of the phase droplets can be explained by an interplay of large transient void volumes, which are inaccessible to water molecules, and a multimolecule interaction network, whereby pressure-induced dissociation of the droplet phase would lead to a general decrease in volume in the system. As with the globular folded protein γ D-crystallin, the formation of the droplet phase of SynGAP/PSD95 is a very rapid process, occurring within a few seconds, whereby the effect of TMAO and Ficoll cosolutes on the phase separation kinetics, at biologically relevant concentrations, is rather small. Among the TMAO concentrations studied, solely a high concentration of 0.3 M leads to an approximately 10-fold increase in LLPS time. Thus, high concentrations of the strongly stabilizing osmolyte would delay droplet formation, which, together with its pronounced effect on droplet stability, could impair the plasticity of PSDs and thus limit their function in neurons.

9 Anhang

Humanes γ D-Kristallin

¹H—¹⁰M—¹¹G—²⁰K—²¹I—³⁰T—³¹L—⁴⁰Y—⁴¹E—⁵⁰D—⁵¹R—⁶⁰G—⁶¹F—⁷⁰Q—⁷¹G—⁸⁰R—⁸¹H—⁹⁰Y—⁹¹E—¹⁰⁰C—¹⁰¹S—¹¹⁰S—¹¹¹D—¹²⁰H—¹²¹P—¹³⁰N—¹³¹L—¹⁴⁰Q—¹⁴¹P—¹⁵⁰Y—¹⁵¹L—¹⁶⁰S—¹⁶¹R—¹⁷⁰C—¹⁷¹N—¹⁸⁰S—¹⁸¹A—¹⁹⁰R—¹⁹¹V—²⁰⁰D—²⁰¹S
⁴¹G—⁵⁰C—⁵¹W—⁶⁰M—⁶¹L—⁷⁰Y—⁷¹E—⁸⁰Q—⁸¹P—⁹⁰N—⁹¹Y—¹⁰⁰S—¹⁰¹G—¹¹⁰L—¹¹¹Q—¹²⁰Y—¹²¹F—¹³⁰L—¹³¹R—¹⁴⁰R—¹⁴¹G—¹⁵⁰D—¹⁵¹Y—¹⁶⁰A—¹⁶¹D—¹⁷⁰H—¹⁷¹Q—¹⁸⁰Q—¹⁸¹W—¹⁹⁰M—¹⁹¹G—²⁰⁰L—²⁰¹S—²¹⁰D—²¹¹S—²²⁰V—²²¹R—²³⁰S—²³¹C—²⁴⁰R
⁸¹L—⁹⁰I—⁹¹P—¹⁰⁰H—¹⁰¹S—¹¹⁰G—¹¹¹S—¹²⁰H—¹²¹R—¹³⁰I—¹³¹R—¹⁴⁰L—¹⁴¹Y—¹⁵⁰E—¹⁵¹R—¹⁶⁰E—¹⁶¹D—¹⁷⁰Y—¹⁷¹R—¹⁸⁰G—¹⁸¹Q—¹⁹⁰M—¹⁹¹I—²⁰⁰E—²⁰¹F—²¹⁰T—²¹¹E—²²⁰D—²²¹C—²³⁰S—²³¹C—²⁴⁰L—²⁴¹Q—²⁵⁰D—²⁵¹R—²⁶⁰F—²⁶¹R—²⁷⁰F—²⁷¹N—²⁸⁰E
¹²¹I—¹³⁰H—¹³¹S—¹⁴⁰L—¹⁴¹N—¹⁵⁰V—¹⁵¹L—¹⁶⁰E—¹⁶¹G—¹⁷⁰S—¹⁷¹W—¹⁸⁰V—¹⁸¹L—¹⁹⁰Y—¹⁹¹E—²⁰⁰L—²⁰¹S—²¹⁰N—²¹¹Y—²²⁰R—²²¹G—²³⁰R—²³¹Q—²⁴⁰Y—²⁴¹L—²⁵⁰L—²⁵¹M—²⁶⁰P—²⁶¹G—²⁷⁰D—²⁷¹Y—²⁸⁰R—²⁸¹R—²⁹⁰Y—²⁹¹Q—³⁰⁰D—³⁰¹W—³¹⁰G—³¹¹A—³²⁰T
¹⁶¹N—¹⁷⁰A—¹⁷¹R—¹⁸⁰V—¹⁸¹G—¹⁹⁰S—¹⁹¹L—²⁰⁰R—²⁰¹R—²¹⁰V—²¹¹I—²²⁰D—²²¹F—²³⁰S—²³¹OH

γ D-Kristallin der Ratte (*Rattus norvegicus*)

¹H—¹⁰M—¹¹G—²⁰K—²¹I—³⁰T—³¹F—⁴⁰Y—⁴¹E—⁵⁰D—⁵¹R—⁶⁰G—⁶¹F—⁷⁰Q—⁷¹G—⁸⁰R—⁸¹H—⁹⁰Y—⁹¹E—¹⁰⁰C—¹⁰¹S—¹¹⁰T—¹¹¹D—¹²⁰H—¹²¹S—¹³⁰N—¹³¹L—¹⁴⁰Q—¹⁴¹P—¹⁵⁰Y—¹⁵¹F—¹⁶⁰S—¹⁶¹R—¹⁷⁰C—¹⁷¹N—¹⁸⁰S—¹⁸¹V—¹⁹⁰R—¹⁹¹V—²⁰⁰D—²⁰¹S
⁴¹G—⁵⁰C—⁵¹W—⁶⁰M—⁶¹L—⁷⁰Y—⁷¹E—⁸⁰Q—⁸¹P—⁹⁰N—⁹¹F—¹⁰⁰T—¹⁰¹G—¹¹⁰C—¹¹¹Q—¹²⁰Y—¹²¹F—¹³⁰L—¹³¹R—¹⁴⁰R—¹⁴¹G—¹⁵⁰D—¹⁵¹Y—¹⁶⁰P—¹⁶¹D—¹⁷⁰Y—¹⁷¹Q—¹⁸⁰Q—¹⁸¹W—¹⁹⁰M—¹⁹¹G—²⁰⁰F—²⁰¹S—²¹⁰D—²¹¹S—²²⁰V—²²¹R—²³⁰S—²³¹C—²⁴⁰R
⁸¹L—⁹⁰I—⁹¹P—¹⁰⁰H—¹⁰¹A—¹¹⁰G—¹¹¹S—¹²⁰H—¹²¹R—¹³⁰I—¹³¹R—¹⁴⁰L—¹⁴¹Y—¹⁵⁰E—¹⁵¹R—¹⁶⁰E—¹⁶¹D—¹⁷⁰Y—¹⁷¹R—¹⁸⁰G—¹⁸¹Q—¹⁹⁰M—¹⁹¹V—²⁰⁰E—²⁰¹F—²¹⁰T—²¹¹E—²²⁰D—²²¹C—²³⁰P—²³¹S—²⁴⁰L—²⁴¹Q—²⁵⁰D—²⁵¹R—²⁶⁰F—²⁶¹H—²⁷⁰F—²⁷¹N—²⁸⁰E
¹²¹I—¹³⁰Y—¹³¹S—¹⁴⁰L—¹⁴¹N—¹⁵⁰V—¹⁵¹L—¹⁶⁰E—¹⁶¹G—¹⁷⁰C—¹⁷¹W—¹⁸⁰V—¹⁸¹L—¹⁹⁰Y—¹⁹¹E—²⁰⁰M—²⁰¹T—²¹⁰N—²¹¹Y—²²⁰R—²²¹G—²³⁰R—²³¹Q—²⁴⁰Y—²⁴¹L—²⁵⁰L—²⁵¹R—²⁶⁰P—²⁶¹G—²⁷⁰E—²⁷¹Y—²⁸⁰R—²⁸¹R—²⁹⁰Y—²⁹¹H—³⁰⁰D—³⁰¹W—³¹⁰G—³¹¹A—³²⁰M
¹⁶¹N—¹⁷⁰A—¹⁷¹R—¹⁸⁰V—¹⁸¹G—¹⁹⁰S—¹⁹¹L—²⁰⁰R—²⁰¹R—²¹⁰V—²¹¹M—²²⁰D—²²¹F—²³⁰Y—²³¹OH

Abbildung 9.1: Einbuchstaben-Proteinsequenz von humanem γ D-Kristallin und der Ratte.

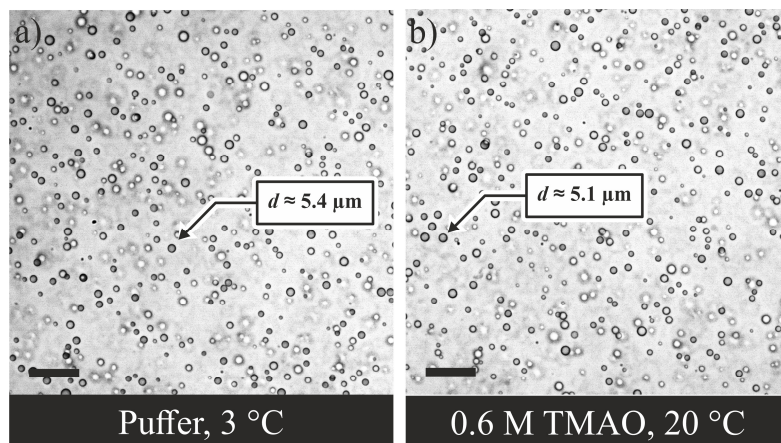


Abbildung 9.2: Temperaturabhängige Lichtmikroskopiebilder einer a) reinen 55 mg mL^{-1} humanem γ D-Kristallin-Lösung bei 3°C und in Gegenwart von 0.6 M TMAO bei 20°C (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$). Die Aufnahme der Mikroskopiebilder erfolgte bei $30\times$ Vergrößerung. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der γ D-Kristallin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $30 \mu\text{m}$.

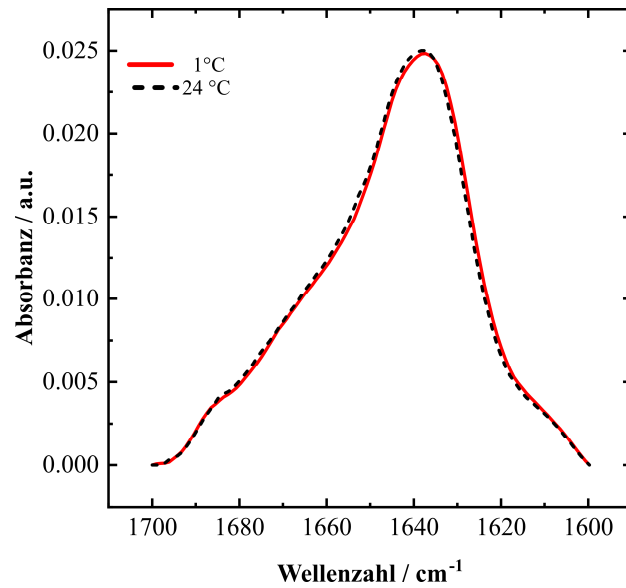


Abbildung 9.3: Flächennormierte Amid-I'-Banden ($1700 - 600\text{ cm}^{-1}$) von einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pD} = 7.4$) bei 24°C (gestrichelte Linie) und bei 1°C (rote Linie). Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

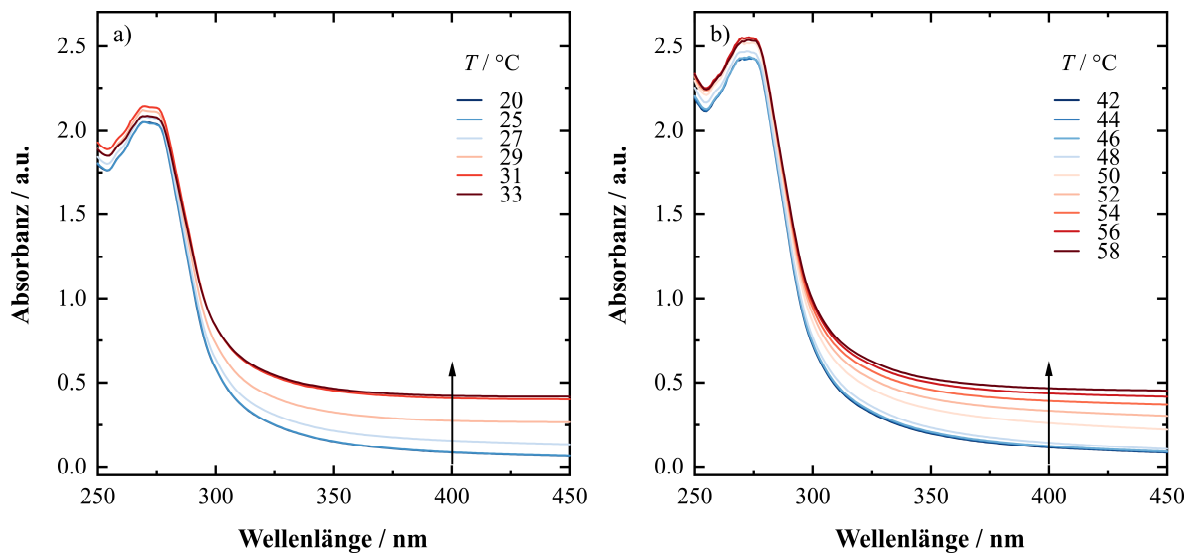


Abbildung 9.4: UV/Vis-Absorptionsspektren ($250 - 450\text{ nm}$) einer a) reinen 20 mg mL^{-1} α -Elastin-Lösung (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$) und b) in Gegenwart von 20 mM TMAO bei ausgewählten Temperaturen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

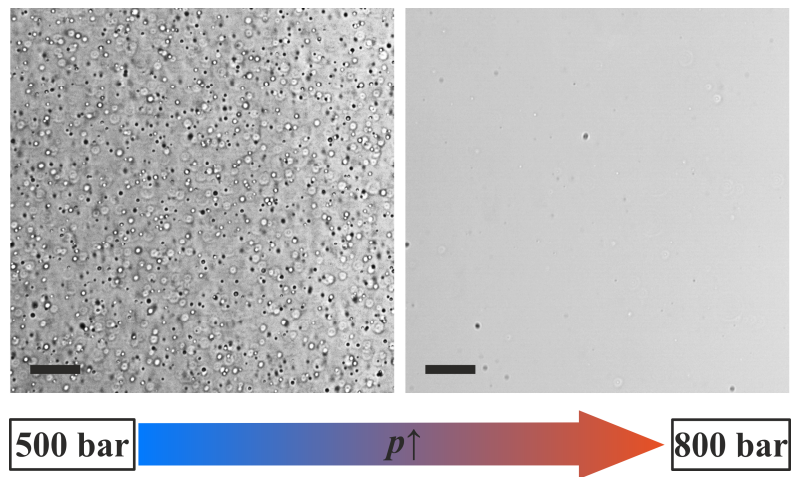


Abbildung 9.5: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder einer 55 mg mL^{-1} humanen γD -Kristallin-Lösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, $\text{pH} = 7.4$) in Gegenwart von 0.6 M TMAO bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Druck-induzierter Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der γD -Kristallin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \text{ }\mu\text{m}$.

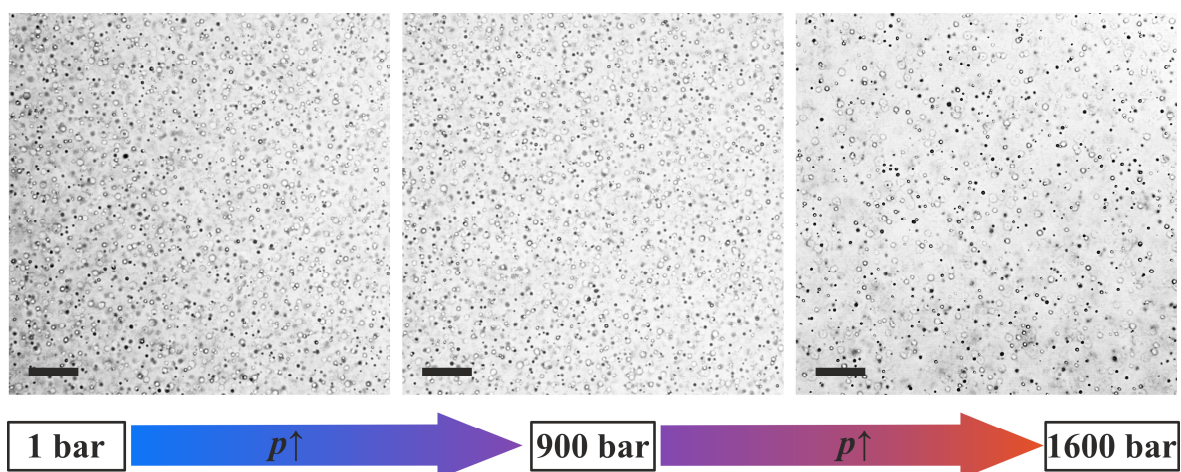


Abbildung 9.6: Druckabhängige LLPS von 20 mg mL^{-1} α -Elastin in einer 10 mM TMAO-Lösung. Gezeigt werden hier lichtmikroskopische Aufnahmen von α -Elastin bei a) $36 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Messungen erfolgten in einem Druckbereich von 1 – 1600 bar. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der α -Elastin-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Abbildung wurde gemäß der Referenz modifiziert.^[53]

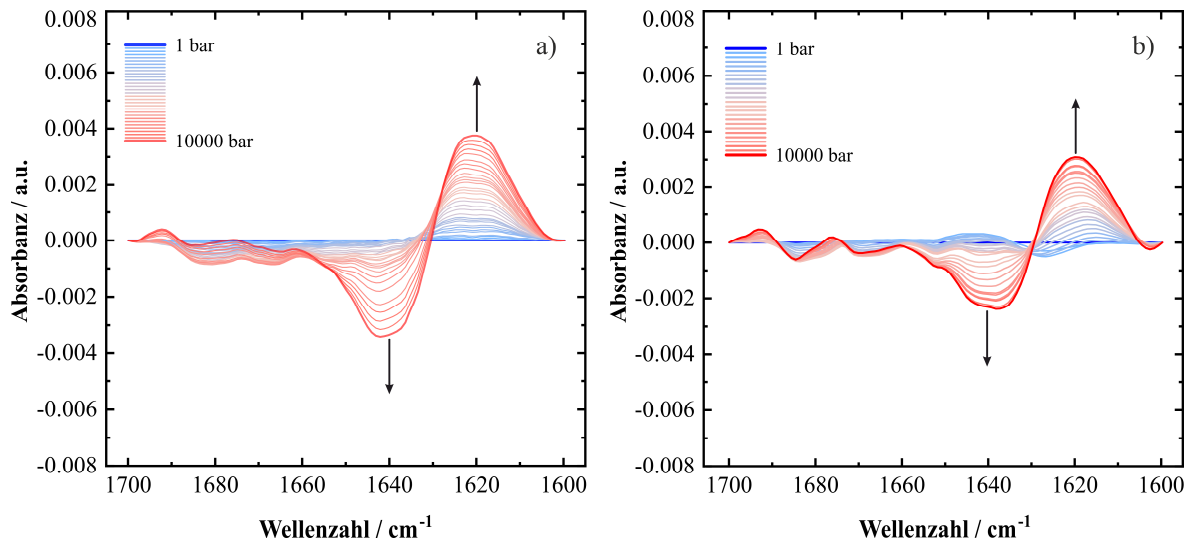


Abbildung 9.7: Differenzspektren der flächennormierten FT-IR Spektren ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) der druckabhängigen Messungen einer 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin-Lösung (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pD} = 7.4$) im Bereich von $1 - 10000 \text{ bar}$ bei a) $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und b) $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Amid-I'-Banden bei 1 bar dienten als Referenzspektren und wurden von allen anderen Amid-I'-Banden abgezogen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

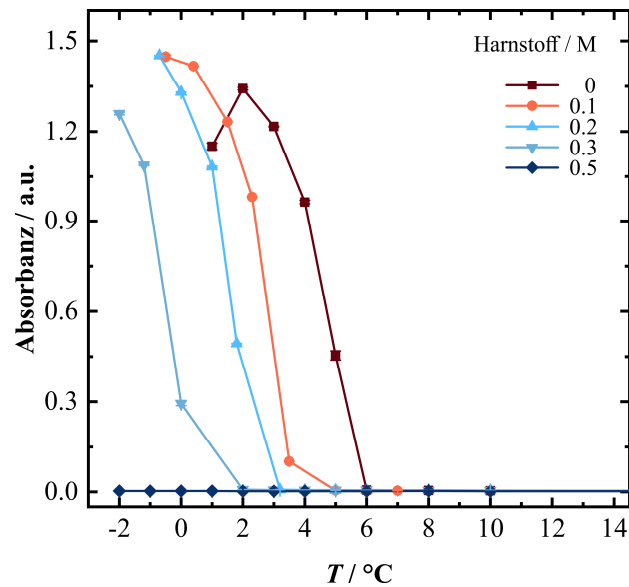


Abbildung 9.8: Temperatur- und Harnstoff-abhängige Turbiditätsmessungen bei 400 nm für eine 50 mg mL^{-1} -Lösung von humanem γ D-Kristallin (50 mM TRIS , 150 mM NaCl , $\text{pH} = 7.4$). Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

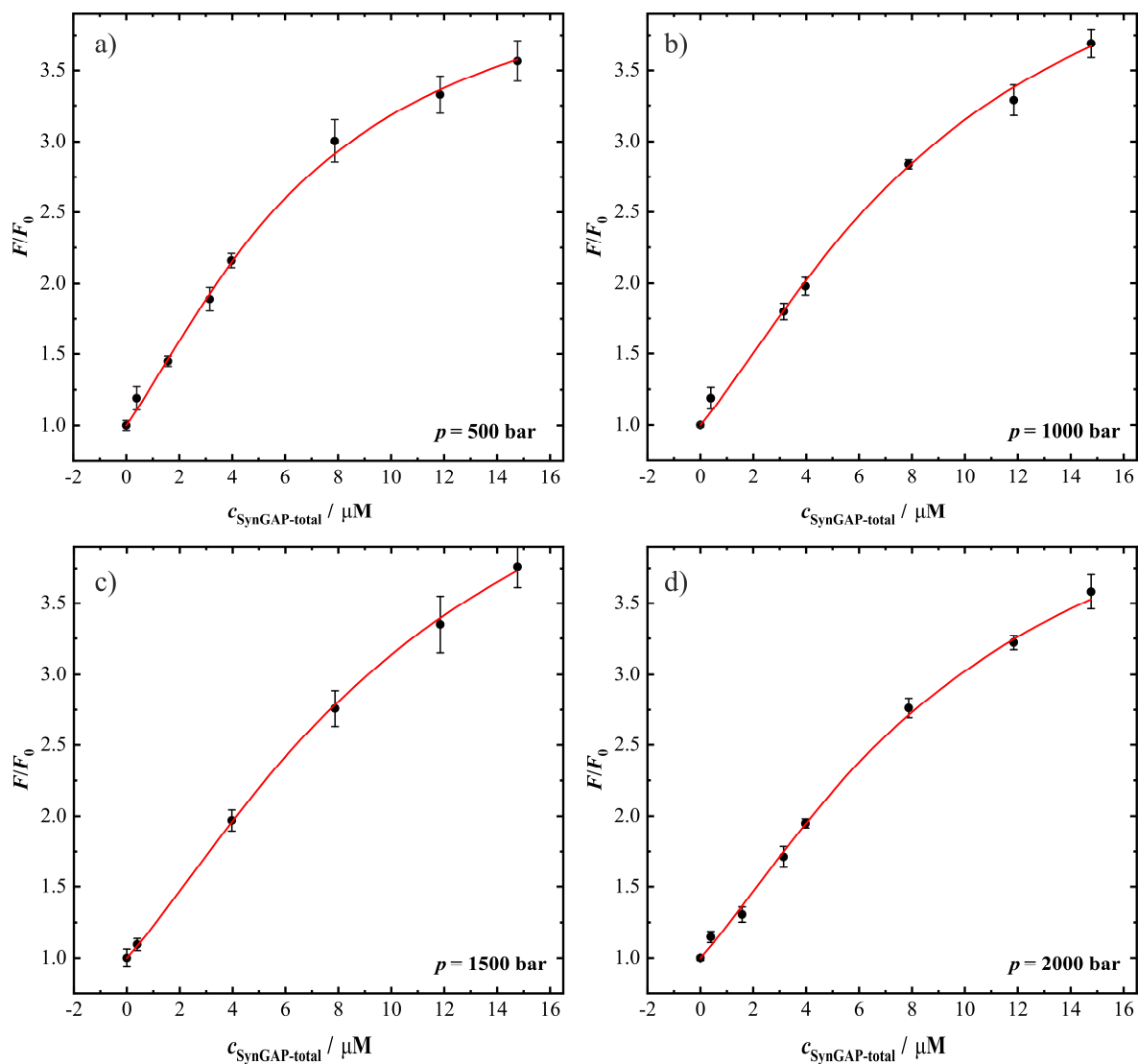


Abbildung 9.9: Druckabhängige Bindungsisothermen aus der Titration von Alexa405-markiertem PSD95 mit Alexa488-markiertem SynGAP bei a) 500 bar, b) 1000 bar, c) 1500 bar und d) 2000 bar. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25 °C. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet.

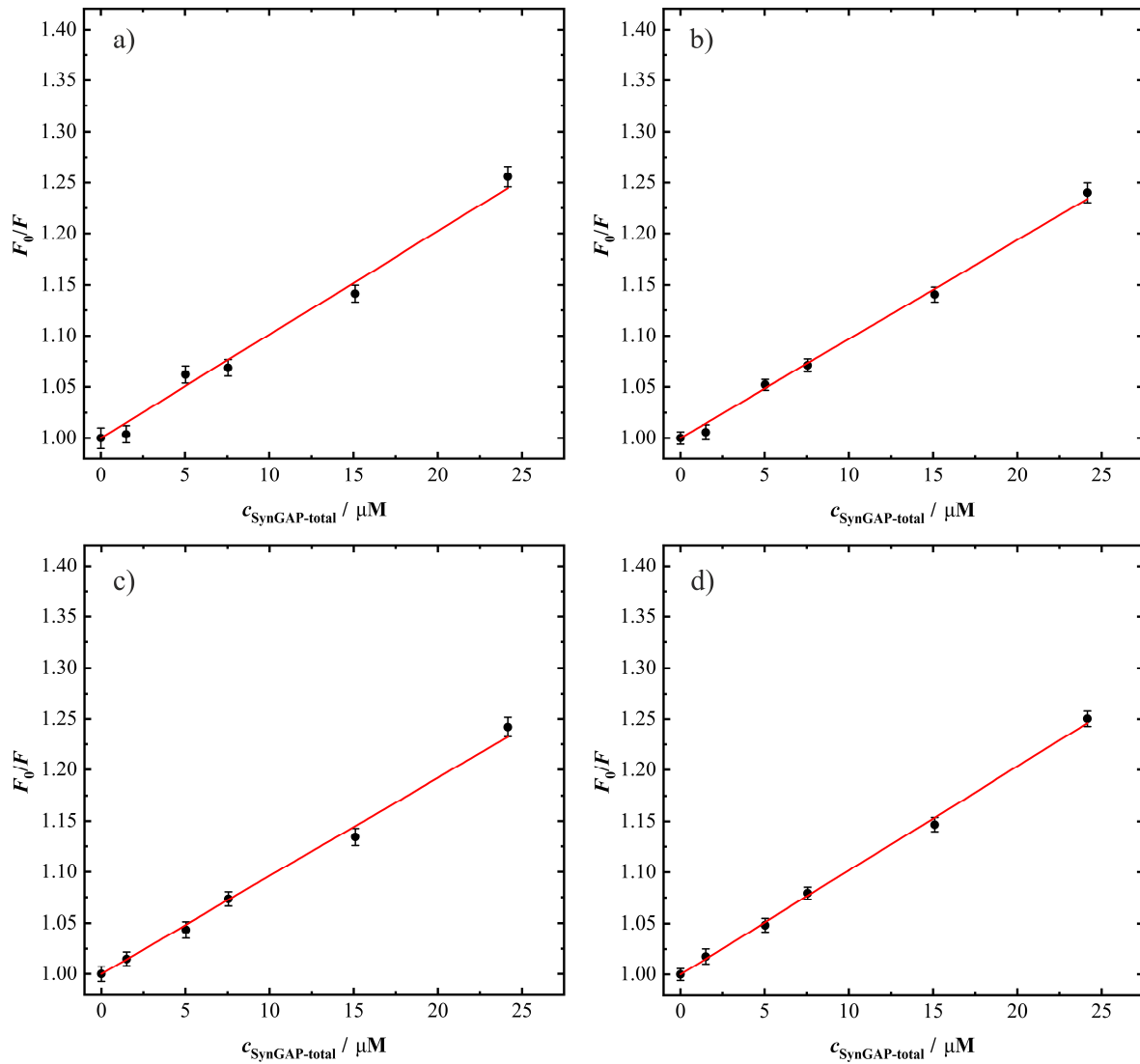


Abbildung 9.10: Druckabhängige Bindungsisothermen der Komplexbildung zwischen SynGAP und PSD95 in einer 0.5 M TMAO-Lösung bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Messungen erfolgten jeweils bei einem Druck von a) 500 bar, b) 1000 bar, c) 1500 bar und d) 2000 bar. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet.

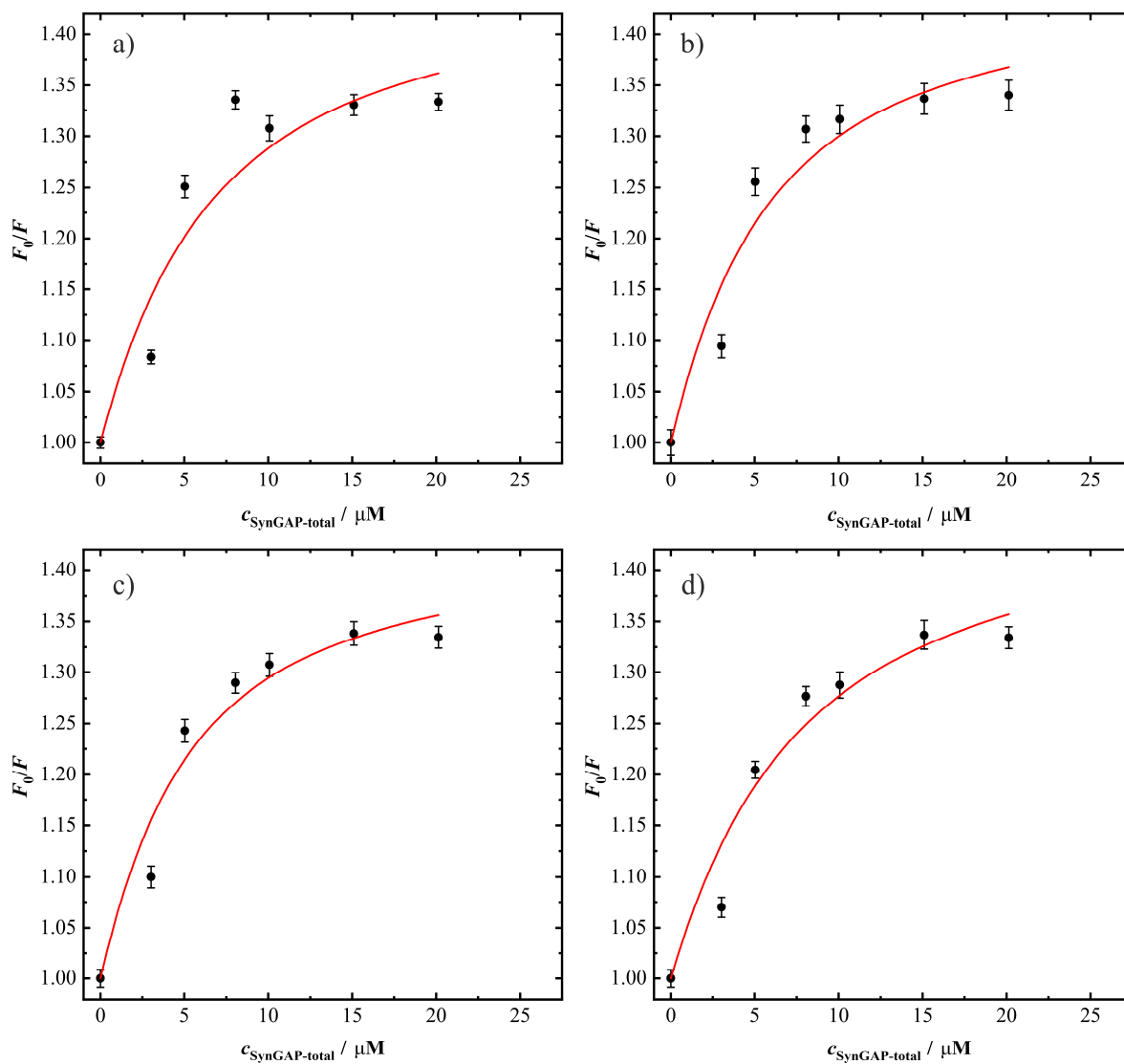


Abbildung 9.11: Druckabhängige Bindungsisothermen der Komplexbildung zwischen SynGAP und PSD95 in einer 7.5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei $T = 25$ °C. Die Messungen erfolgten jeweils bei einem Druck von a) 500 bar, b) 1000 bar, c) 1500 bar und d) 2000 bar. Zum Fitten der aufgetragenen Datenpunkte wurde ein 1:1-Bindungsmodell verwendet.

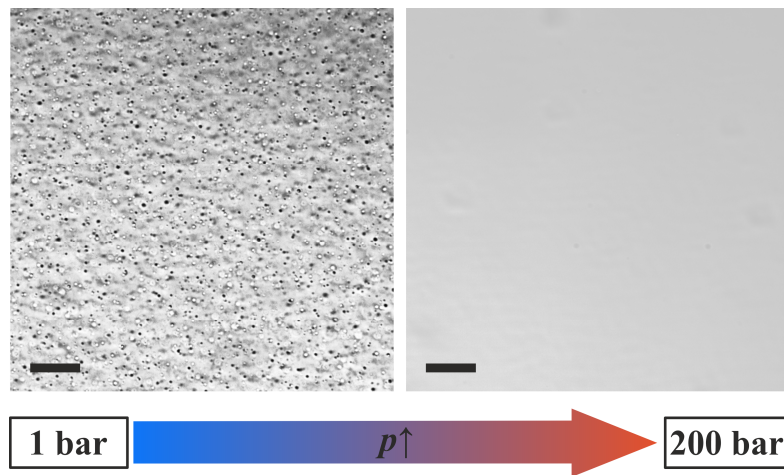


Abbildung 9.12: Druckabhängige Lichtmikroskopiebilder von 50 μM SynGAP/PSD95 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) in einer 0.2 M Harnstoff-Lösung bei 25 °C. Druckinduzierter Phasenübergang von einer phasenseparierten Lösung in eine klare homogene Phase. Der Fokus des Objektivs lag in der Volumenphase der SynGAP/PSD95-Probe. Die Maßstabsskala (schwarzer Balken) entspricht einer Länge von 50 μm .

Kinetikdaten der Drucksprung-Relaxationsstudie von γ D-Kristallin (Kapitel 4.4)

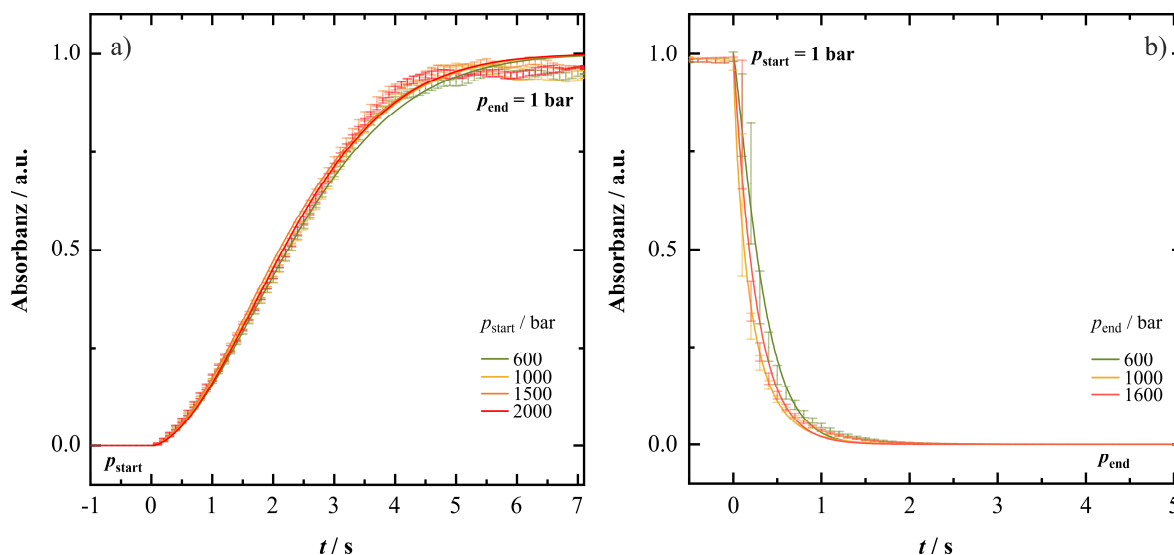


Abbildung 9.13: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption (Turbidität) A von 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 0.3 M TMAO-Lösung (50 mM TRIS, 0.3 M TMAO, 150 mM NaCl, $\text{pH} = 7.4$) bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Druckamplitude von a) hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung) und b) von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

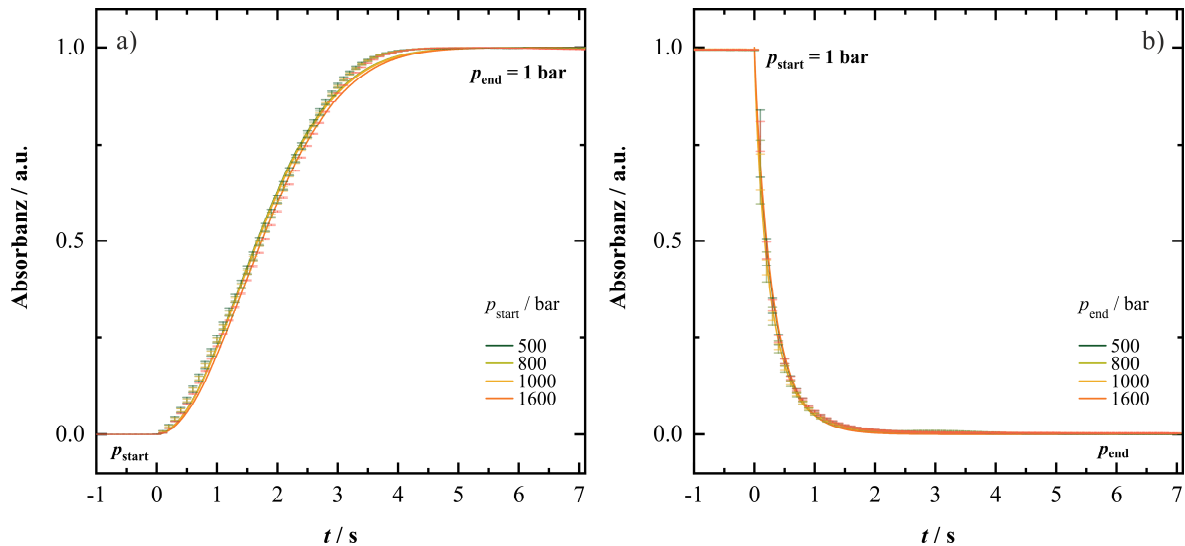


Abbildung 9.14: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption (Turbidität) A von 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 0.2 M Harnstoff-Lösung (50 mM TRIS, 0.2 M Harnstoff, 150 mM NaCl, $\text{pH} = 7.4$) bei $T = 2 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Amplitude von a) hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung) und b) von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

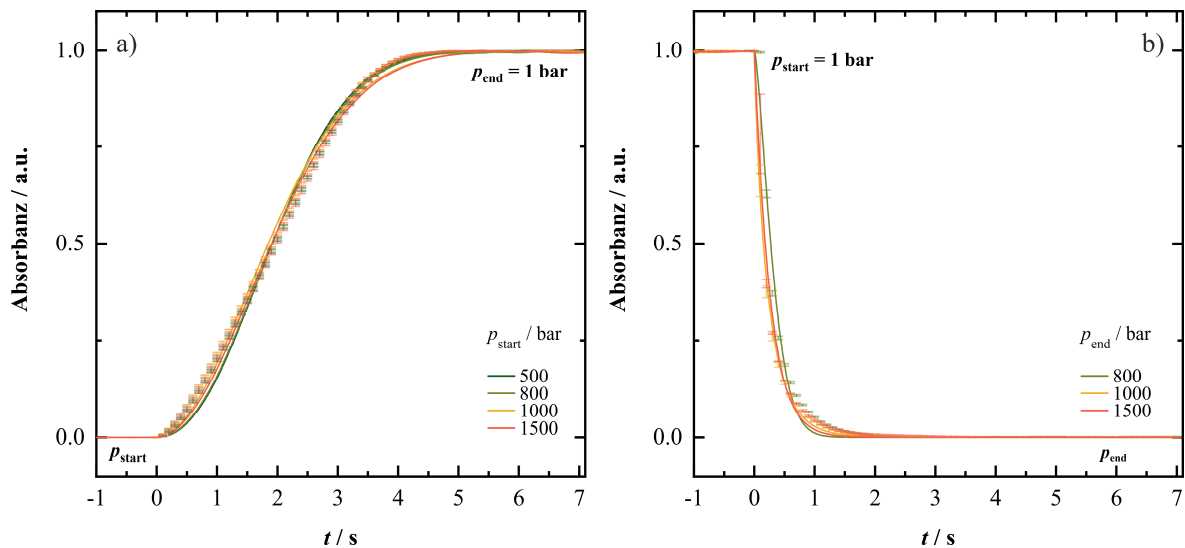


Abbildung 9.15: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Absorption (Turbidität) A von 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer $10 \text{ Gew.}\%$ Ficoll-Lösung (50 mM TRIS, $10 \text{ Gew.}\%$ Ficoll, 150 mM NaCl, $\text{pH} = 7.4$) bei $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ nach einem p -Sprung mit variabler Amplitude von a) hohem Druck in Richtung Umgebungsdruck (Druckentlastung, LLPS-Bildung) und b) von 1 bar in Richtung hohem Druck (Druckanstieg, Auflösung des Zweiphasenbereichs). Die Absorptionsdaten sind auf ihre Maximalwerte ($A = 1.0$) normiert, wobei eine scheinbare Absorption von ~ 1 den Gleichgewichtszustand von γ D-Kristallin im phasenseparierten Zustand bei Atmosphärendruck darstellt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

Tabelle 9.1: Durch das Anfitten der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und in einem Temperaturbereich von $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $3 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden Drucksprungamplituden von 300 – 2000 bar in die druckverringende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

Pufferlösung $T = -2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

$p_{\text{start}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
500	1.99 ± 0.02	0.17 ± 0.00	5.1	2.1
800	1.97 ± 0.02	0.17 ± 0.00	5.3	2.1
1000	2.01 ± 0.03	0.16 ± 0.00	5.5	2.1
1600	1.95 ± 0.03	0.18 ± 0.00	5.3	2.1

Pufferlösung $T = 0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

$p_{\text{start}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
300	2.05 ± 0.06	0.17 ± 0.01	5.4	2.0
500	2.03 ± 0.11	0.16 ± 0.02	5.2	2.0
1000	2.05 ± 0.06	0.16 ± 0.01	5.1	2.0
1500	2.15 ± 0.15	0.15 ± 0.03	4.8	2.0
2000	2.05 ± 0.02	0.16 ± 0.00	4.8	2.1

Pufferlösung $T = 3 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

$p_{\text{start}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
300	1.90 ± 0.03	0.24 ± 0.01	4.4	1.8
500	1.88 ± 0.90	0.24 ± 0.02	4.7	1.8
1000	1.87 ± 0.02	0.24 ± 0.00	4.1	1.8
1500	1.69 ± 0.02	0.27 ± 0.01	4.5	1.8
2000	1.87 ± 0.17	0.22 ± 0.04	4.1	1.8

Tabelle 9.2: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin in reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und in einem Temperaturbereich von -2 °C bis 3 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 300 – 1600 bar in die druckerhöhende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

Pufferlösung $T = -2$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
500	0.97 ± 0.64	3.16 ± 2.27	1.5	0.2
800	0.86 ± 0.60	3.21 ± 2.34	1.5	0.2
1000	0.71 ± 0.61	3.54 ± 2.99	1.4	0.1
1600	0.68 ± 0.58	3.42 ± 2.72	1.4	0.1

Pufferlösung $T = 0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
300	1.85 ± 1.16	3.11 ± 2.54	1.6	0.4
500	1.10 ± 0.07	3.25 ± 0.23	1.4	0.2
1000	1.53 ± 0.10	3.18 ± 0.25	1.6	0.3
1500	1.33 ± 0.84	3.26 ± 2.58	1.4	0.3

Pufferlösung $T = 3$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
300	1.37 ± 0.48	2.56 ± 0.96	1.7	0.3
500	0.87 ± 0.34	2.81 ± 1.03	1.5	0.2
1000	1.00 ± 0.43	3.56 ± 1.84	1.3	0.2
1500	0.66 ± 0.32	3.08 ± 1.24	1.3	0.1

Tabelle 9.3: Durch das Anfitten der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin in einer 0.3 M TMAO-Lösung (50 mM TRIS, 0.3 M TMAO, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und in einem Temperaturbereich von 3 °C bis 11 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 600 – 2000 bar in die druckverringende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

0.3 M TMAO-Lösung $T = 3.0$ °C (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
600	1.75 ± 0.03	0.17 ± 0.00	5.5	2.3
1000	1.75 ± 0.02	0.18 ± 0.01	4.9	2.3
1500	1.73 ± 0.06	0.19 ± 0.01	4.7	2.2
2000	1.79 ± 0.03	0.18 ± 0.00	4.8	2.2

0.3 M TMAO-Lösung $T = 7.0$ °C (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
600	1.81 ± 0.10	0.19 ± 0.02	4.8	2.2
1000	1.73 ± 0.04	0.19 ± 0.01	4.4	2.2
1500	1.90 ± 0.03	0.16 ± 0.01	4.5	2.3
2000	1.76 ± 0.07	0.18 ± 0.01	4.8	2.2

0.3 M TMAO-Lösung $T = 11.0$ °C (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
600	1.83 ± 0.02	0.21 ± 0.00	4.2	1.9
1000	1.84 ± 0.03	0.19 ± 0.01	4.3	2.1
1500	1.93 ± 0.03	0.18 ± 0.00	4.4	2.1
2000	1.76 ± 0.01	0.19 ± 0.00	4.5	2.2

Tabelle 9.4: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin in einer 0.3 M TMAO-Lösung (50 mM TRIS, 0.3 M TMAO, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und in einem Temperaturbereich von 3 °C bis 11 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 600 – 1600 bar in die druckerhöhende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

0.3 M TMAO-Lösung $T = 3.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
600	1.21 ± 0.74	3.53 ± 2.76	1.7	0.3
1000	0.83 ± 0.65	3.89 ± 3.53	1.5	0.1
1600	1.02 ± 0.70	3.95 ± 3.53	1.7	0.2

0.3 M TMAO-Lösung $T = 7.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
600	1.07 ± 0.70	3.31 ± 2.54	1.8	0.2
1000	0.56 ± 0.51	3.19 ± 2.20	1.6	0.1
1600	0.89 ± 0.59	3.03 ± 2.05	1.7	0.2

0.3 M TMAO-Lösung $T = 11.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
600	0.79 ± 0.48	2.56 ± 1.33	1.9	0.2
1000	0.68 ± 0.54	3.20 ± 2.27	1.5	0.1
1600	0.61 ± 0.48	2.97 ± 1.79	1.5	0.1

Tabelle 9.5: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin bei unterschiedlichen TMAO-Konzentrationen (50 mM TRIS, 0 – 0.5 M TMAO, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einer konstanten Temperatur von 3 °C. Es wurde eine konstante Drucksprungamplitude von 1000 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

$T = 3.0 \text{ °C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$, $p_{\text{start}} = 1000 \text{ bar}$)

$c_{\text{TMAO}} / \text{M}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
0	1.87 ± 0.02	0.24 ± 0.00	4.1	1.8
0.3	1.75 ± 0.02	0.18 ± 0.00	4.9	2.3
0.5	2.01 ± 0.02	0.15 ± 0.00	5.4	2.2

$T = 3.0 \text{ °C}$ (Druckerhöhung, $1 \text{ bar} \rightarrow p_{\text{end}}$, $p_{\text{end}} = 1000 \text{ bar}$)

$c_{\text{TMAO}} / \text{M}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
0	1.00 ± 0.43	3.56 ± 1.84	1.3	0.2
0.3	0.83 ± 0.65	3.89 ± 3.53	1.5	0.1
0.5	0.83 ± 0.61	3.37 ± 2.62	1.5	0.2

Tabelle 9.6: Durch das Anfitten der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 0.2 M Harnstoff-Lösung (50 mM TRIS, 0.2 M Harnstoff, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einem Temperaturbereich von $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden Drucksprungamplituden von 500 – 1600 bar in die druckverringende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

0.2 M Harnstoff-Lösung $T = -2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
500	1.98 ± 0.02	0.21 ± 0.00	5.1	1.9
800	1.92 ± 0.02	0.23 ± 0.00	5.5	1.8
1000	1.99 ± 0.02	0.20 ± 0.00	5.2	1.9
1600	1.92 ± 0.02	0.21 ± 0.00	5.2	1.9

0.2 M Harnstoff-Lösung $T = 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
500	1.94 ± 0.02	0.26 ± 0.00	5.0	1.7
800	1.95 ± 0.02	0.26 ± 0.00	4.9	1.7
1000	1.95 ± 0.02	0.25 ± 0.00	4.8	1.7
1600	1.99 ± 0.02	0.23 ± 0.00	4.8	1.8

Tabelle 9.7: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 0.2 M Harnstoff-Lösung (50 mM TRIS, 0.2 M Harnstoff, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einem Temperaturbereich von $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden Drucksprungamplituden von 500 – 1600 bar in die druckerhöhende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

0.2 M Harnstoff-Lösung $T = -2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{\text{end}}$)

$p_{\text{end}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
500	0.92 ± 0.66	3.46 ± 2.82	1.5	0.2
800	0.83 ± 0.62	3.40 ± 2.70	1.5	0.2
1000	0.75 ± 0.56	3.14 ± 2.19	1.6	0.1
1600	0.72 ± 0.55	3.14 ± 2.18	1.5	0.1

0.2 M Harnstoff-Lösung $T = 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{\text{end}}$)

$p_{\text{end}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
500	0.90 ± 0.59	3.02 ± 2.02	1.7	0.2
800	0.83 ± 0.57	3.04 ± 2.04	1.6	0.2
1000	0.83 ± 0.57	3.03 ± 2.01	1.6	0.2
1600	0.92 ± 0.60	3.01 ± 2.01	1.7	0.2

Tabelle 9.8: Durch das Anfitten der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen (50 mM TRIS, 0 – 0.3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einer konstanten Temperatur von -2 °C. Es wurde eine konstante Drucksprungamplitude von 1000 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

$T = -2.0$ °C (Druckverringering, $p_{start} \rightarrow 1$ bar, $p_{start} = 1000$ bar)

$c_{\text{Harnstoff}} / \text{M}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
0	2.01 ± 0.03	0.16 ± 0.00	5.6	2.1
0.2	1.99 ± 0.02	0.20 ± 0.00	5.3	1.9
0.3	2.07 ± 0.02	0.17 ± 0.00	5.4	2.0

$T = -2.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$, $p_{end} = 1000$ bar)

$c_{\text{Harnstoff}} / \text{M}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
0	0.71 ± 0.61	3.54 ± 2.99	1.4	0.1
0.2	0.75 ± 0.56	3.14 ± 2.19	1.6	0.1
0.3	0.73 ± 0.56	3.24 ± 2.36	1.7	0.1

Tabelle 9.9: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL^{-1} γ D-Kristallin in einer 10 Gew.-% Ficoll-Lösung (50 mM TRIS, 10 Gew.-% Ficoll, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einem Temperaturbereich von 3 °C bis 7 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 800 – 1500 bar in die druckverringende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

10 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 3.0 \text{ °C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

$p_{\text{start}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
800	2.14 ± 0.03	0.17 ± 0.01	4.9	2.0
1000	1.92 ± 0.02	0.21 ± 0.00	5.0	1.9
1500	1.97 ± 0.02	0.20 ± 0.00	4.8	2.0

10 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 7.0 \text{ °C}$ (Druckverringering, $p_{\text{start}} \rightarrow 1 \text{ bar}$)

$p_{\text{start}} / \text{bar}$	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A/2} / \text{s}$
800	2.31 ± 0.04	0.15 ± 0.01	4.8	2.0
1000	2.19 ± 0.03	0.16 ± 0.01	4.8	2.0
1500	2.06 ± 0.03	0.20 ± 0.01	5.0	1.9

Tabelle 9.10: Durch das Anfitten der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin in einer 10 Gew.-% Ficoll-Lösung (50 mM TRIS, 10 Gew.-% Ficoll, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einem Temperaturbereich von 3 °C bis 7 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 800 – 1500 bar in die druckerhöhende Richtung verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

10 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 3.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
800	1.44 ± 0.57	4.54 ± 1.76	1.8	0.3
1000	0.87 ± 0.26	3.59 ± 1.07	1.5	0.2
1500	1.02 ± 0.61	3.95 ± 1.86	1.5	0.2

10 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 7.0$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
800	0.94 ± 0.64	2.91 ± 1.92	1.5	0.2
1000	1.03 ± 0.14	3.16 ± 1.57	1.6	0.2
1500	0.97 ± 0.32	3.16 ± 1.62	1.6	0.2

Tabelle 9.11: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 mg mL⁻¹ γ D-Kristallin bei unterschiedlichen Ficoll-Konzentrationen (50 mM TRIS, 0 – 20 Gew.-% Ficoll, 150 mM NaCl, pH = 7.4) und einer konstanten Temperatur von 3 °C. Es wurde eine konstante Drucksprungamplitude von 1000 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

$T = 3.0$ °C (Druckverringern, $p_{start} \rightarrow 1$ bar, $p_{start} = 1000$ bar)

c_{Ficoll} / Gew.-%	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
0	1.93 ± 0.02	0.24 ± 0.00	4.1	1.8
10	1.92 ± 0.02	0.21 ± 0.00	5.0	1.9
20	2.10 ± 0.04	0.17 ± 0.01	5.3	2.0

$T = 3.0$ °C (Druckerhöhung, 1bar $\rightarrow p_{end}$, $p_{end} = 1000$ bar)

c_{Ficoll} / Gew.-%	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
0	0.71 ± 0.61	3.54 ± 2.99	3.0	0.1
10	0.87 ± 0.26	3.59 ± 1.07	1.5	0.2
20	0.98 ± 0.18	3.62 ± 1.83	1.5	0.2

Kinetikdaten der Drucksprung-Relaxationsstudie von SynGAP/PSD95 (Kapitel 6.5)

Tabelle 9.12: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 μ M SynGAP/PSD95 in reiner Pufferlösung (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) bei 25 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 600–1600 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

Pufferlösung $T = 25$ °C (Druckverringern, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)				
p_{start} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
600	2.04 ± 0.01	0.16 ± 0.00	7.1	2.1
800	2.08 ± 0.01	0.16 ± 0.01	6.6	2.1
1000	2.01 ± 0.01	0.19 ± 0.02	6.3	2.0
1400	1.97 ± 0.01	0.22 ± 0.01	5.9	1.9
1600	2.03 ± 0.02	0.20 ± 0.01	6.0	1.9
Pufferlösung $T = 25$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)				
p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
600	1.63 ± 1.04	0.57 ± 0.34	4.2	1.1
800	1.56 ± 1.23	1.29 ± 0.89	3.2	0.6
1000	1.51 ± 1.30	2.08 ± 1.80	2.5	0.5
1400	1.31 ± 1.01	2.81 ± 1.77	2.3	0.3
1600	1.61 ± 1.11	3.11 ± 2.16	2.3	0.4

Tabelle 9.13: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 μ M SynGAP/PSD95 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) in einer 0.2 M und 0.3 M TMAO-Lösung bei 25 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 1000 – 1600 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

0.2 M TMAO-Lösung $T = 25$ °C (Druckverringerung, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
1000	1.47 ± 0.01	0.17 ± 0.00	14.6	2.3
1200	1.47 ± 0.01	0.21 ± 0.00	13.8	2.2
1400	1.61 ± 0.01	0.23 ± 0.00	10.2	2.0
1600	1.63 ± 0.01	0.22 ± 0.00	10.6	2.0

0.2 M TMAO-Lösung $T = 25$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
1000	1.45 ± 1.37	1.33 ± 0.87	3.8	0.6
1400	1.39 ± 1.03	1.58 ± 0.88	3.8	0.5
1600	1.31 ± 1.35	2.12 ± 1.98	3.1	0.4

0.3 M TMAO-Lösung $T = 25$ °C (Druckverringerung, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
1000	0.87 ± 0.00	0.15 ± 0.01	55.8	5.7
1200	0.90 ± 0.00	0.16 ± 0.01	45.6	4.9
1400	0.97 ± 0.00	0.18 ± 0.01	34.7	3.7
1600	1.04 ± 0.01	0.20 ± 0.01	25.0	3.1

0.3 M TMAO-Lösung $T = 25$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s^{-1}	t_{tr} / s	$t_{A_{1/2}} / \text{s}$
1000	1.18 ± 0.50	0.61 ± 0.24	6.9	1.0
1400	1.37 ± 0.90	1.31 ± 0.59	4.0	0.6
1600	1.31 ± 1.08	1.64 ± 1.00	3.3	0.5

Tabelle 9.14: Durch das Anfitzen der Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK)-Funktion an die Kinetikdaten wurden der Avrami-Exponenten n und die Geschwindigkeitskonstante k erhalten. t_{tr} und $t_{1/2}$ wurden direkt aus den normierten Absorptionsdaten bestimmt und beschreiben die Gesamtübergangszeit der Phasenumwandlung bzw. die Halbwertszeit an dem Punkt, bei dem die Trübung sich um 50 % geändert hat. Gemessen wurde 50 μ M SynGAP/PSD95 (50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7.8) in einer 2.5 Gew.-% und 5 Gew.-% Ficoll-Lösung bei 25 °C. Es wurden Drucksprungamplituden von 1000 – 1600 bar in beide Druckrichtungen verwendet. Die Messungen wurden dreimal wiederholt.

2.5 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 25$ °C (Druckverringierung, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
1000	2.06 ± 0.02	0.20 ± 0.01	6.3	1.8
1200	2.02 ± 0.01	0.26 ± 0.01	5.9	1.8
1400	1.96 ± 0.02	0.22 ± 0.01	6.2	1.8
1600	1.98 ± 0.03	0.24 ± 0.01	5.5	1.7

2.5 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 25$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
1000	1.45 ± 1.37	1.33 ± 0.87	4.1	0.6
1400	1.40 ± 1.02	1.59 ± 0.88	3.7	0.5
1600	1.31 ± 1.31	2.12 ± 1.88	3.1	0.4

5.0 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 25$ °C (Druckverringierung, $p_{start} \rightarrow 1$ bar)

p_{start} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
1000	1.50 ± 0.01	0.24 ± 0.01	10.5	2.0
1200	1.57 ± 0.01	0.25 ± 0.01	9.3	1.9
1400	1.62 ± 0.01	0.23 ± 0.01	9.3	1.9
1600	1.62 ± 0.02	0.25 ± 0.01	8.4	1.9

5.0 Gew.-% Ficoll-Lösung $T = 25$ °C (Druckerhöhung, 1 bar $\rightarrow p_{end}$)

p_{end} / bar	n	k / s ⁻¹	t_{tr} / s	$t_{A/2}$ / s
1000	1.26 ± 0.50	0.29 ± 0.18	10.3	2.0
1200	1.41 ± 0.81	0.39 ± 0.28	8.1	1.5
1400	1.48 ± 0.94	0.76 ± 0.39	4.7	0.3
1600	1.44 ± 1.45	1.15 ± 0.78	4.1	0.6

Semenov-Rubinstein-Gel-Modell für die LLPS von SynGAP/PSD95 (Kapitel 5.5)

Wie in Kapitel 5.5 erwähnt, wird aufgrund der strukturellen Eigenschaften der SynGAP/PSD95-Bindung ein Semenov-Rubinstein-Gel-Modell^[260] mit den folgenden Überlegungen erstellt:

- I. Der Einfachheit halber ist im Modell die einzige Polymerspezies ein generischer SynGAP/PSD95-Komplex, der in etwa mit dem experimentell bestimmten Komplex (3:2-Stöchiometrie) gleichgesetzt werden kann.^[16]
- II. Da die einzelnen SynGAP und PSD95 Moleküle im Wesentlichen gefaltet vorliegen, wird davon ausgegangen, dass die Polymere eine begrenzte strukturelle Flexibilität im Modell aufweisen. Dementsprechend besteht jedes Polymer nur aus einer geringen Anzahl N von Monomereinheiten, wobei jede Monomereinheit einen weitgehend starren Bereich eines generischen Komplexes darstellt, der aus vielen Aminosäureresten besteht.
- III. Angenommen, V ist das Volumen einer Monomereinheit im Modell und V_p ist das Polymervolumen, das den generischen SynGAP/PSD95-Komplex darstellt, so ergibt sich für V der Ausdruck $V = V_p/N$.
- IV. Des Weiteren hat jedes Polymer $f = 4$ "Sticker", die ungefähr den beiden PDZ3- und den beiden GK-Domänen^[262] in einem 3:2-SynGAP/PSD95-Komplex entsprechen.
- V. Als weitere Vereinfachung wird nicht zwischen den beiden PDZ3- und den beiden GK-Domänen unterschieden und alle "Sticker" werden identisch behandelt.

Unter diesen Voraussetzungen ist die freie Energie pro Volumeneinheit (in Einheiten von $k_B T$, wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur ist) gegeben durch^[260]

$$F_V(\phi, p) = (\phi/N) \ln(\phi) + (1 - \phi) \ln(1 - \phi) + (\phi f/N) \{r(\phi, p)/2 + \ln[1 - r(\phi, p)]\}, \quad (9.1)$$

wobei ϕ der Volumenanteil des Proteins (Polymers), p der Druck in bar und $r(\phi, p)$ der Anteil der Sticker ist, die Paare bilden. Gemäß der Arbeit von A. N. Semenov und M. Rubinstein^[260] ist

$$r(\phi, p) = 1 - \{[4\phi f\lambda(p)/N + 1]^{1/2} - 1\} / [2\phi f\lambda(p)/N], \quad (9.2)$$

wobei $\lambda(p) = 1/[K_d(p)V]$ der Boltzmann-Faktor für die Bildung eines Sticker-Paares ist und $K_d(p)$ die druckabhängigen Dissoziationskonstanten aus der Tabelle 5.3 sind. Die Phasendiagramme (Koexistenzkurven) in Abbildung 5.9a wurden mit Hilfe von Standardmethoden aus dem Ausdruck $F_V(\phi, p)$ ermittelt.^[47] Per Definition ist die freie Energie F pro Polymer (Proteinkomplex) bei dem Druck p gegeben durch $F(\phi)|_p = Nk_B T F_V(\phi, p)/\phi$. Ergänzend zu den Energieprofilen $F_V(\phi, p) - \phi F_V(1, 1) = F_V(\phi, p) + 8.552\phi$, die in Abbildung 5.9b verwendet wurden (die für alle Drücke die gleiche Subtraktion $\phi F_V(1, 1)$ vornimmt), wurde auch $F_V(\phi)|_p - \phi F_V(1)|_p - (1 - \phi)F_V(0)|_p$ angeschaut (von dem alle druckabhängigen Beiträge der reinen Phase abgezogen werden) und die lokalen Minima bzw. Maxima der alternierenden Energieprofile wurden verwendet, um die leicht abweichenden Werte für $\delta V_{\text{void}}/V_p$ zu erhalten, die in den gestrichelten Linien in Abbildung 5.9c dargestellt sind.

Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Gunton, A. Shiryayev, D. L. Pagan, *Protein Condensation*, Cambridge University Press, Cambridge, **2007**.
- [2] A. C. Dumetz, A. M. Chockla, E. W. Kaler, A. M. Lenhoff, *Biophysical Journal* **2008**, *94*, 570–583.
- [3] A. S. Raut, D. S. Kalonia, *Molecular Pharmaceutics* **2016**, *13*, 1431–1444.
- [4] R. J. Ellis, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2007**, *594*, 1–13.
- [5] H. X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annual Review of Biophysics* **2008**, *37*, 375–397.
- [6] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *Chem. Phys. Chem.* **2017**, *18*, 2951–2972.
- [7] S. Grudzielanek, V. Smirnovas, R. Winter, *Journal of Molecular Biology* **2006**, *356*, 497–509.
- [8] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e69652.
- [9] E. B. Wilson, *Science (1979)* **1899**, *10*, 33–45.
- [10] C. P. Brangwynne, C. R. Eckmann, D. S. Courson, A. Rybarska, C. Hoege, J. Gharakhani, F. Jülicher, A. A. Hyman, *Science* **2009**, *324*, 1729–1732.
- [11] P. A. Chong, J. D. Forman-Kay, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *41*, 180–186.
- [12] Y. Shin, C. P. Brangwynne, *Science* **2017**, *357*.
- [13] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, M. K. Rosen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285–298.
- [14] U. S. Eggert, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2403–2404.
- [15] A. Zilman, *Journal of Molecular Biology* **2018**, *430*, 4730–4740.
- [16] M. Zeng, Y. Shang, Y. Araki, T. Guo, R. L. Haganir, M. Zhang, *Cell* **2016**, *166*, 1163–1175.

-
- [17] M. Zeng, X. Chen, D. Guan, J. Xu, H. Wu, P. Tong, M. Zhang, *Cell* **2018**, *174*, 1172–1187.
- [18] T. J. Nott, E. Petsalaki, P. Farber, D. Jervis, E. Fussner, A. Plochowitz, T. D. Craggs, D. P. Bazett-Jones, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, A. J. Baldwin, *Mol. Cell* **2015**, *57*, 936–947.
- [19] A. Molliex, J. Temirov, J. Lee, M. Coughlin, A. P. Kanagaraj, H. J. Kim, T. Mittag, J. P. Taylor, *Cell* **2015**, *163*, 123–133.
- [20] P. Li, S. Banjade, H. C. Cheng, S. Kim, B. Chen, L. Guo, M. Llaguno, J. v. Hollingsworth, D. S. King, S. F. Banani, P. S. Russo, Q. X. Jiang, B. T. Nixon, M. K. Rosen, *Nature* **2012**, *483*, 336–340.
- [21] W. K. Cho, J. H. Spille, M. Hecht, C. Lee, C. Li, V. Grube, I. I. Cisse, *Science* **2018**, *361*, 412–415.
- [22] B. R. Sabari, A. Dall’Agnese, A. Boija, I. A. Klein, E. L. Coffey, K. Shrinivas, B. J. Abraham, N. M. Hannett, A. v. Zamudio, J. C. Manteiga, C. H. Li, Y. E. Guo, D. S. Day, J. Schuijers, E. Vasile, S. Malik, D. Hnisz, T. I. Lee, I. I. Cisse, R. G. Roeder, P. A. Sharp, A. K. Chakraborty, R. A. Young, *Science (1979)* **2018**, *361*, eaar3958.
- [23] B. Tsang, J. Arsenault, R. M. Vernon, H. Lin, N. Sonenberg, L. Y. Wang, A. Bah, J. D. Forman-Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 4218–4227.
- [24] K. Weise, S. Kapoor, C. Denter, J. Nikolaus, N. Opitz, S. Koch, G. Triola, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 880–887.
- [25] M. Dwivedi, T. Mejuch, H. Waldmann, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10511–10515.
- [26] A. I. Oparin, *The Origin of Life*, Nature Publishing Group, **1938**.
- [27] A. I. Oparin, *Proiskhozhdenie Zhizny*, Moskovhii RabochiI, Moscow, **1924**.
- [28] C. D. Keating, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2114–2124.
- [29] A. A. Hyman, C. A. Weber, F. Jülicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 39–58.
- [30] F. J. Dyson, *J. Mol. Evol.* **1982**, *18*, 344–350.

- [31] D. Zwicker, R. Seyboldt, C. A. Weber, A. A. Hyman, F. Jülicher, *Nature Physics* **2017**, *13*, 408–413.
- [32] R. R. Poudyal, F. Pir Cakmak, C. D. Keating, P. C. Bevilacqua, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2509–2519.
- [33] A. Tardieu, F. Bonneté, S. Finet, D. Vivarès, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2002**, *58*, 1549–1553.
- [34] F. Zhang, F. Roosen-Runge, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, M. Wolf, P. Callow, H. Frielinghaus, V. Pipich, S. Prévost, F. Schreiber, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 2483–2493.
- [35] I. Kwon, M. Kato, S. Xiang, L. Wu, P. Theodoropoulos, H. Mirzaei, T. Han, S. Xie, J. L. Corden, S. L. McKnight, *Cell* **2013**, *155*, 1049–1060.
- [36] Z. Monahan, V. H. Ryan, A. M. Janke, K. A. Burke, S. N. Rhoads, G. H. Zerze, R. O’Meally, G. L. Dignon, A. E. Conicella, W. Zheng, R. B. Best, R. N. Cole, J. Mittal, F. Shewmaker, N. L. Fawzi, *The EMBO Journal* **2017**, *36*, 2951–2967.
- [37] J. A. Riback, C. D. Katanski, J. L. Kear-Scott, E. v. Pilipenko, A. E. Rojek, T. R. Sosnick, D. A. Drummond, *Cell* **2017**, *168*, 1028–1040.
- [38] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 858–875.
- [39] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2013**, *75*, 607–648.
- [40] C. L. Dias, H. S. Chan, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 7488–7509.
- [41] M. S. Moghaddam, H. S. Chan, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 114507.
- [42] K. Akasaka, H. Matsuki, *High Pressure Bioscience. Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Springer Netherlands, Amsterdam, **2015**.
- [43] C. P. Brangwynne, P. Tompa, R. v. Pappu, *Nature Physics* **2015**, *11*, 899–904.
- [44] Y. H. Lin, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2499–2508.
- [45] K. M. Ruff, S. Roberts, A. Chilkoti, R. v. Pappu, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4619–4635.

-
- [46] H. Falahati, A. Haji-Akbari, *Soft Matter* **2019**, *15*, 1135–1154.
- [47] Y. H. Lin, J. Song, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *Journal of Molecular Liquids* **2017**, *228*, 176–193.
- [48] E. W. Martin, T. Mittag, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2478–2487.
- [49] K. M. Dean, C. B. Babayco, D. R. B. Sluss, J. C. Williamson, *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *133*, 074506.
- [50] J. M. Sørensen, T. Magnussen, P. Rasmussen, A. Fredenslund, *Fluid Phase Equilibria* **1979**, *3*, 47–82.
- [51] H. Cinar, R. Winter, *Scientific Reports* **2020**, *10*, 17245.
- [52] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [53] H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. H. A. Winter, *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 13049–13069.
- [54] H. Cinar, S. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 8286–8291.
- [55] J. W. Cahn, *Trans. AIME* **1968**, *166*, 242.
- [56] J. Goldsbrough, *Science Progress Oxford* **1972**, *60*, 281–297.
- [57] J. D. Gunton, M. San Miguel, P. S. SahnI, *Academic Press* **1983**, *8*, 269–446.
- [58] J. Colombani, J. Bert, *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* **2004**, *29*, 389–395.
- [59] H. Z. Cummins, A. P. Levanyuk, *Light Scattering Near Phase Transitions.*, North-Holland Publishing Co, Amsterdam, **1983**.
- [60] G. M. Schneider, *Pure and Applied Chemistry* **1976**, *47*, 277–291.
- [61] J. S. Rowlinson, *Liquids and Liquid Mixtures: Butterworths Monographs in Chemistry*, Butterworth Scientific, London, **1982**.
- [62] G. M. Schneider, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 845–852.
- [63] T. Narayanan, A. Kumar, *Physics Reports* **1994**, *249*, 135–218.

- [64] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erlkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Physical Review Letters* **2014**, *112*, 028101.
- [65] S. Shimizu, H. S. Chan, *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 4683.
- [66] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner Verlag, **2011**.
- [67] J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F. M. Goñi, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, *59*, 23–56.
- [68] H. Susi, D. M. Byler, *Methods in Enzymology* **1986**, *130*, 290–311.
- [69] M. Jackson, P. I. Haris, D. Chapman, *Journal of Molecular Structure* **1989**, *214*, 329–355.
- [70] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95–120.
- [71] A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, *1767*, 1073–1101.
- [72] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, S. Yu, *Nature Protocols* **2015**, *10*, 382–396.
- [73] J. KONG, S. YU, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2007**, *39*, 549–559.
- [74] P. I. Haris, D. Chapman, *Biopolymers* **1995**, *37*, 251–263.
- [75] S. Cinar, *Herstellung Und Charakterisierung Funktionaler Protein-Grenzflächen*, Technische Universität, Dortmund, **2017**.
- [76] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Applied Spectroscopy* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [77] A. S. Raut, D. S. Kalonia, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 774–783.
- [78] S. Ma, *Modern Theory Of Critical Phenomena*, Routledge, New York, **2018**.
- [79] S. C. Greer, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 427–432.
- [80] P. Papon, J. Leblond, P. H. E. Meijer, *The Physics of Phase Transitions : Concepts and Applications*, Springer-Verlag, **2006**.
- [81] Z. Zhang, Z. Wang, S. He, C. Wang, M. Jin, Y. Yin, *Chemical Science* **2015**, *6*, 5197–5203.

-
- [82] W. Ostwald, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1900**, *34*, 495–503.
- [83] J. Berry, C. P. Brangwynne, M. Haataja, *Reports on Progress in Physics* **2018**, *81*, 046601.
- [84] A. A. N. Kolmogorov, *Isz. Akad. Nauk SSR. Ser. Mater.* **1937**, *3*, 355–359.
- [85] M. Avrami, *The Journal of Chemical Physics* **1939**, *7*, 1103–1112.
- [86] M. Avrami, *The Journal of Chemical Physics* **1940**, *8*, 212–224.
- [87] M. Avrami, *The Journal of Chemical Physics* **1941**, *9*, 177–184.
- [88] Y. Shin, J. Berry, N. Pannucci, M. P. Haataja, J. E. Toettcher, C. P. Brangwynne, *Cell* **2017**, *168*, 159-171.e14.
- [89] G. Cox, *Optical Imaging Techniques in Cell Biology*, CRC Press Inc, Bosa Roca, **2012**.
- [90] J. Wichmann, S. W. Hell, *Optics Letters* **1994**, *19*, 780–782.
- [91] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671.
- [92] F. G. Quiroz, A. Chilkoti, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 1164–1171.
- [93] L. W. Chang, T. K. Lytle, M. Radhakrishna, J. J. Madinya, J. Vélez, C. E. Sing, S. L. Perry, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1273.
- [94] J. R. Simon, N. J. Carroll, M. Rubinstein, A. Chilkoti, G. P. López, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 509–515.
- [95] M. Dzuricky, S. Roberts, A. Chilkoti, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2405–2414.
- [96] J. M. Horn, R. A. Kapelner, A. C. Obermeyer, *Polymers (Basel)* **2019**, *11*, 578.
- [97] W. C. K Poon, S. U. Egelhaaf, P. A. Beales, A. Salonen, L. Sawyer, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2000**, *12*, L569–L574.
- [98] D. G. Greene, S. Modla, N. J. Wagner, S. I. Sandler, A. M. Lenhoff, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 1716–1723.
- [99] S. Toepfl, A. Mathys, V. Heinz, D. Knorr, *Food Reviews International* **2006**, *22*, 405–423.
- [100] J. D. Wurtz, C. F. Lee, *New Journal of Physics* **2018**, *20*, 045008.

- [101] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, H. Hyman, A. Kaganove, J. J. Katz, N. C. Li, P. Tang, R. Mathur, *Analytical Chemistry* **2002**, *40*, 700–706.
- [102] T. Kuwabara, M. Imaizumi, *Invest Ophthalmol.* **1974**, *12*, 973–981.
- [103] O. Hockwin, *Altern. Entwickl. Aging Dev.* **1971**, *1*, 95–129.
- [104] K. W. Roskamp, C. N. Paulson, W. D. Brubaker, R. W. Martin, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 863–874.
- [105] G. M. Thurston, *The Journal of Chemical Physics* **2006**, *124*, 134909.
- [106] G. Wistow, *Human Genomics* **2012**, *6*, 1–10.
- [107] P. G. Cooper, J. A. Carver, R. J. W. Truscott, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 321–328.
- [108] A. R. Lam, S. D. Moran, N. K. Preketes, T. O. Zhang, M. T. Zanni, S. Mukamel, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 15436–15443.
- [109] P. G. Cooper, J. A. Carver, J. A. Aquilina, G. B. Ralston, R. J. W. Truscott, *Experimental Eye Research* **1994**, *59*, 211–220.
- [110] G. Wistow, B. Turnell, L. Summers, C. Slingsby, D. Moss, L. Miller, P. Lindley, T. Blundell, *Journal of Molecular Biology* **1983**, *170*, 175–202.
- [111] R. Jaenicke, C. Slingsby, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *36*, 435–499.
- [112] A. Basak, O. Bateman, C. Slingsby, A. Pande, N. Asherie, O. Ogun, G. B. Benedek, J. Pande, *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, 1137–1147.
- [113] S. O. Meakin, R. P. Du, L. C. Tsui, M. L. Breitman, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, 2671–2679.
- [114] M. L. Broide, C. R. Berland, J. Pande, O. Ogun, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5660–5664.
- [115] F. Cardinaux, T. Gibaud, A. Stradner, P. Schurtenberger, *Physical Review Letters* **2007**, *99*, 118301.
- [116] J. C. Bierma, K. W. Roskamp, A. P. Ledray, A. J. Kiss, C. H. C. Cheng, R. W. Martin, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 5151–5168.

-
- [117] D. R. Canchi, A. E. García, *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, *64*, 273–293.
- [118] S. Imoto, P. Kibies, C. Rosin, R. Winter, S. M. Kast, D. Marx, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 9534–9538.
- [119] K. Julius, J. Weine, M. Berghaus, N. König, M. Gao, J. Latarius, M. Paulus, M. A. Schroer, M. Tolan, R. Winter, *Physical Review Letters* **2018**, *121*, 038101.
- [120] P. H. Yancey, *Journal of Experimental Biology* **2005**, *208*, 2819–2830.
- [121] K. P. Das, L. P. ing Choo-Smith, J. M. Petrash, W. K. Surewicz, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 33209–33212.
- [122] C. Czeslik, J. Jonas, *Chemical Physics Letters* **1999**, *302*, 633–638.
- [123] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, *1386*, 353–370.
- [124] S. Cozzolino, R. Oliva, G. Graziano, P. del Vecchio, *Physical chemistry chemical physics* **2018**, *20*, 29389–29398.
- [125] J. Hong, S. Xiong, *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1866–1875.
- [126] S. Shimizu, P. E. Smith, *Chem. Phys. Chem.* **2017**, *18*, 2243–2249.
- [127] P. Tompa, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 509–516.
- [128] J. A. Marsh, S. A. Teichmann, J. D. Forman-Kay, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 643–650.
- [129] Y. Shin, C. P. Brangwynne, *Science (1979)* **2017**, *357*, eaaf4382.
- [130] S. Boeynaems, S. Alberti, N. L. Fawzi, T. Mittag, M. Polymenidou, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J. Shorter, B. Wolozin, L. van den Bosch, P. Tompa, M. Fuxreiter, *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 420–435.
- [131] B. Y. Zaslavsky, V. N. Uversky, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2437–2451.
- [132] R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8069–8072.
- [133] K. A. Dill, D. O. V. Alonso, K. Hutchinson, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5439–5449.

- [134] H. S. Chan, K. A. Dill, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **1998**, *30*, 2–33.
- [135] H. Kaya, H. S. Chan, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2003**, *52*, 510–523.
- [136] L. D. Muiznieks, S. Sharpe, R. Pomès, F. W. Keeley, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4741–4753.
- [137] E. Ragnoni, F. Palombo, E. Green, C. P. Winlove, M. di Donato, A. Lapini, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 27981–27990.
- [138] S. G. Wise, G. C. Yeo, M. A. Hiob, J. Rnjak-Kovacina, D. L. Kaplan, M. K. C. Ng, A. S. Weiss, *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 1532–1541.
- [139] B. A. Cox, B. C. Starcher, D. W. Urry, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1973**, *317*, 209–213.
- [140] J. T. Cirulis, F. W. Keeley, *Biochemistry* **2010**, *49*, 5726–5733.
- [141] C. Nicolini, R. Ravindra, B. Ludolph, R. Winter, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1385–1392.
- [142] D. W. Urry, M. M. Long, B. A. Cox, T. Ohnishi, L. W. Mitchell, M. Jacobs, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *371*, 597–602.
- [143] N. Floquet, S. Héry-Huynh, M. Dauchez, P. Derreumaux, A. M. Tamburro, A. J. P. Alix, *Biopolymers* **2004**, *76*, 266–280.
- [144] E. Schreiner, C. Nicolini, B. Ludolph, R. Ravindra, N. Otte, A. Kohlmeyer, R. Rousseau, R. Winter, D. Marx, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 148101.
- [145] S. E. Reichheld, L. D. Muiznieks, F. W. Keeley, S. Sharpe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E4408–E4415.
- [146] S. Rauscher, R. Pomès, *Elife* **2017**, *6*, e.26526.
- [147] G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis, L. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1552–1555.
- [148] E. A. Gustafson, G. M. Wessel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 1–6.
- [149] P. Lasko, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1829*, 810–816.

-
- [150] J. P. Brady, P. J. Farber, A. Sekhar, Y. H. Lin, R. Huang, A. Bah, T. J. Nott, H. S. Chan, A. J. Baldwin, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8194–E8203.
- [151] R. M. Vernon, P. A. Chong, B. Tsang, T. H. Kim, A. Bah, P. Farber, H. Lin, J. D. Forman-Kay, *Elife* **2018**, *7*, e31486.
- [152] S. Qin, H. X. Zhou, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8164–8174.
- [153] S. Rauscher, V. Gapsys, M. J. Gajda, M. Zweckstetter, B. L. de Groot, H. Grubmüller, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5513–5524.
- [154] S. Piana, J. L. Klepeis, D. E. Shaw, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *24*, 98–105.
- [155] R. B. Best, W. Zheng, J. Mittal, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 5113–5124.
- [156] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, A. D. MacKerell, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 71–73.
- [157] P. Robustelli, S. Piana, D. E. Shaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E4758–E4766.
- [158] A. Escobedo, B. Topal, M. B. A. Kunze, J. Aranda, G. Chiesa, D. Mungianu, G. Bernardo-Seisdedos, B. Eftekharzadeh, M. Gairí, R. Pierattelli, I. C. Felli, T. Diercks, O. Millet, J. García, M. Orozco, R. Crehuet, K. Lindorff-Larsen, X. Salvatella, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2034.
- [159] T. Chen, J. Song, H. S. Chan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *30*, 32–42.
- [160] H. Kaya, H. S. Chan, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4823–4826.
- [161] Y. H. Lin, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *Physical Review Letters* **2016**, *117*, 178101.
- [162] Y. H. Lin, J. P. Brady, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *New Journal of Physics* **2017**, *19*, 115003.
- [163] T. K. Lytle, C. E. Sing, *Soft Matter* **2017**, *13*, 7001–7012.
- [164] S. Das, A. Eisen, Y. H. Lin, H. S. Chan, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 8111.

- [165] G. L. Dignon, W. Zheng, Y. C. Kim, R. B. Best, J. Mittal, *PLoS Comput. Biol.* **2018**, *14*, e1005941.
- [166] G. L. Dignon, W. Zheng, R. B. Best, Y. C. Kim, J. Mittal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 9929–9934.
- [167] S. Das, A. N. Amin, Y. H. Lin, H. S. Chan, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 28558–28574.
- [168] G. L. Dignon, W. Zheng, J. Mittal, *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2019**, *23*, 92–98.
- [169] R. K. Das, R. v. Pappu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13392–13397.
- [170] L. Sawle, K. Ghosh, *J. Chem. Phys.* **2015**, *143*, 085101.
- [171] Y. H. Lin, H. S. Chan, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 2043–2046.
- [172] J. Wang, J. M. Choi, A. S. Holehouse, H. O. Lee, X. Zhang, M. Jahnel, S. Maharana, R. Lemaitre, A. Pozniakovsky, D. Drechsel, I. Poser, R. v. Pappu, S. Alberti, A. A. Hyman, *Cell* **2018**, *174*, 688-699.e16.
- [173] P. L. Privalov, S. J. Gill, *Adv. Protein. Chem.* **1988**, *39*, 191–234.
- [174] A. Kim, F. C. Szoka, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 504–514.
- [175] S. Shimizu, H. S. Chan, *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 4683–4700.
- [176] M. S. Moghaddam, S. Shimizu, S. C. Hue, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 303–316.
- [177] E. van Dijk, A. Hoogeveen, S. Abeln, *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004277.
- [178] E. van Dijk, P. Varilly, T. P. J. Knowles, D. Frenkel, S. Abeln, *Phys. Rev. Lett.* **2016**, *116*, 078101.
- [179] G. L. Dignon, W. Zheng, Y. C. Kim, J. Mittal, *ACS Central Science* **2019**, *5*, 821–830.
- [180] Y. Lin, J. McCarty, J. N. Rauch, K. T. Delaney, K. S. Kosik, G. H. Fredrickson, J. E. Shea, S. Han, *Elife* **2019**, *8*, e42571.
- [181] S. Shimizu, H. S. Chan, *Proteins* **2002**, *49*, 560–566.

-
- [182] Z. Liu, S. C. Hue, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 872–889.
- [183] H. S. Chan, Z. Zhang, S. Wallin, Z. Liu, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 301–326.
- [184] J. L. MacCallum, M. S. Moghaddam, S. C. Hue, D. P. Tieleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 6206–6210.
- [185] C. Narayanan, C. L. Dias, *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 115103.
- [186] L. Huynh, C. Neale, R. Pomès, H. S. Chan, *PLOS Computational Biology* **2017**, *13*, e1005909.
- [187] G. Graziano, *Biopolymers* **2015**, *103*, 711–718.
- [188] C. L. Dias, T. Ala-Nissila, M. Karttunen, I. Vattulainen, M. Grant, *Physical Review Letters* **2008**, *100*, 118101.
- [189] C. L. Dias, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 048104.
- [190] S. Neumaier, M. Büttner, A. Bachmann, T. Kiefhaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20988–20993.
- [191] M. B. Prigozhin, Y. Liu, A. J. Wirth, S. Kapoor, R. Winter, K. Schulten, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8087–8092.
- [192] H. Krobath, T. Chen, H. S. Chan, *Biochemistry* **2016**, *55*, 6269–6281.
- [193] C. R. Chen, G. I. Makhatadze, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14561.
- [194] D. Mozhdghi, K. M. Luginbuhl, J. R. Simon, M. Dzuricky, R. Berger, H. S. Varol, F. C. Huang, K. L. Buehne, N. R. Mayne, I. Weitzhandler, M. Bonn, S. H. Parekh, A. Chilkoti, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 496–505.
- [195] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 870–874.
- [196] A. Masunov, T. Lazaridis, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1722–1730.
- [197] K. T. Debiec, A. M. Gronenborn, L. T. Chong, *Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118*, 6561–6569.
- [198] L. M. Salonen, M. Ellermann, F. Diederich, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 4808–4842.

- [199] A. S. Mahadevi, G. N. Sastry, *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 2100–2138.
- [200] J. Song, S. C. Ng, P. Tompa, K. A. W. Lee, H. S. Chan, *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003239.
- [201] G. Desjardins, C. A. Meeker, N. Bhachech, S. L. Currie, M. Okon, B. J. Graves, L. P. McIntosh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11019–11024.
- [202] P. B. Crowley, A. Golovin, *Proteins* **2005**, *59*, 231–239.
- [203] Z. Yang, Z. Wang, X. Tian, P. Xiu, R. Zhou, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 025103.
- [204] K. A. Wilson, J. L. Kellie, S. D. Wetmore, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6726–6741.
- [205] T. Lazaridis, M. Karplus, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **1999**, *35*, 133–152.
- [206] S. Bikkina, A. P. Bhati, S. Padhi, U. D. Priyakumar, *Journal of Chemical Sciences* **2017**, *129*, 405–414.
- [207] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C. R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, M. C. Suarez, D. Foguel, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7239–7267.
- [208] R. Mishra, R. Winter, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 6618–6621.
- [209] J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. E. García-Moreno, C. A. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6945–6950.
- [210] R. Winter, *Annual Review of Biophysics* **2019**, *48*, 441–463.
- [211] M. Auton, D. W. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15065–15068.
- [212] L. Larini, J. E. Shea, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 13268–13277.
- [213] Z. Su, G. Ravindhran, C. L. Dias, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 5557–5566.
- [214] C. Hölzl, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *The Journal of Chemical Physics* **2016**, *144*, 144104.
- [215] Z. Su, F. Mahmoudinobar, C. L. Dias, *Phys. Rev. Lett.* **2017**, *119*, 108102.
- [216] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 67–97.

-
- [217] H. X. Zhou, V. Nguemaha, K. Mazarakos, S. Qin, *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 499–516.
- [218] S. Bucciarelli, J. S. Myung, B. Farago, S. Das, G. A. Vliegthart, O. Holderer, R. G. Winkler, P. Schurtenberger, G. Gompper, A. Stradner, *Science Advances* **2016**, *2*, e601432.
- [219] M. Kastelic, Y. v. Kalyuzhnyi, V. Vlachy, *Soft Matter* **2016**, *12*, 7289–7298.
- [220] V. Nguemaha, H. X. Zhou, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6728.
- [221] P. H. Yancey, M. E. Gerringer, J. C. Drazen, A. A. Rowden, A. Jamieson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4461–4465.
- [222] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11413–11416.
- [223] H. W. Jannasch, R. E. Marquis, R. M. Zimmerman, *Current Perspectives in High Pressure Biology*, Academic Press, Cambridge, **1987**.
- [224] P. Sébert, *Comparative High Pressure Biology*, Science Publishers, Enfield, **2010**.
- [225] K. B. Zeldovich, I. N. Berezovsky, E. I. Shakhnovich, *PLoS Comput. Biol.* **2007**, *3*, e5.
- [226] T. K. Lytle, L. W. Chang, N. Markiewicz, S. L. Perry, C. E. Sing, *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 709–718.
- [227] I. Oey, M. Lille, A. van Loey, M. Hendrickx, *Trends in Food Science & Technology* **2008**, *19*, 320–328.
- [228] R. L. Crisman, T. W. Randolph, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 663–672.
- [229] K. Visuri, E. Kaipainen, J. Kivimäki, H. Niemi, M. Leisola, S. Palosaari, *Biotechnology* **1990**, *8*, 547–549.
- [230] R. Kitahara, C. Royer, H. Yamada, M. Boyer, J. L. Saldana, K. Akasaka, C. Roumestand, *Journal of Molecular Biology* **2002**, *320*, 609–628.
- [231] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, C. A. Royer, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *275*, 389–402.

- [232] J. Torrent, J. Font, H. Herberhold, S. Marchal, M. Ribó, K. Ruan, R. Winter, M. Vilanova, R. Lange, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2006**, 1764, 489–496.
- [233] H. R. Kalbitzer, *Sub-Cellular Biochemistry* **2015**, 72, 179–197.
- [234] P. H. Yancey, *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* **2020**, <https://doi.org/10.1002/jez.2354>, DOI 10.1002/jez.2354.
- [235] P. Evans, O. A. Bateman, C. Slingsby, B. A. Wallace, *Experimental Eye Research* **2007**, 84, 1001–1008.
- [236] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1595, 201–209.
- [237] J. A. Thomson, P. Schurtenberger, G. M. Thurston, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 7079–7083.
- [238] Z. Su, C. L. Dias, *Journal of Molecular Liquids* **2019**, 293, 111443.
- [239] P. Ganguly, J. Polák, N. F. A. van der Vegt, J. Heyda, J. E. Shea, *Journal of Physical Chemistry B* **2020**, 124, 6181–6197.
- [240] Y. Wang, A. Lomakin, J. J. McManus, O. Ogun, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 13282–13287.
- [241] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *Journal of Molecular Biology* **1991**, 222, 599–620.
- [242] M. L. Whittaker, P. M. Dove, D. Joester, *MRS Bulletin* **2016**, 41, 388–392.
- [243] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, 5, 3157–3173.
- [244] R. Winter, in *High-Pressure Bioscience. Subcellular Biochemistry*, Springer, Amsterdam, **2015**, pp. 345–370.
- [245] A. E. Talpalar, *Rev. Neurol.* **2007**, 45, 631–636.
- [246] A. G. Macdonald, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **1984**, 304, 47–68.
- [247] P. B. Bennett, R. E. Marquis, *Basic and Applied High Pressure Biology*, University Of Rochester Press, Rochester, **1994**.
- [248] Z. Feng, M. Zeng, X. Chen, M. Zhang, *Biochemistry* **2018**, 57, 2530–2539.

-
- [249] K. M. Harris, R. J. Weinberg, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a005587.
- [250] X. Chen, C. Winters, R. Azzam, X. Li, J. A. Galbraith, R. D. Leapman, T. S. Reese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4453–4458.
- [251] D. Cheng, C. C. Hoogenraad, J. Rush, E. Ramm, M. A. Schlager, D. M. Duong, P. Xu, S. R. Wijayawardana, J. Hanfelt, T. Nakagawa, M. Sheng, J. Peng, *Molecular & Cellular Proteomics* **2006**, *5*, 1158–1170.
- [252] M. H. Berryer, F. F. Hamdan, L. L. Klitten, R. S. Møller, L. Carmant, J. Schwartzentruber, L. Patry, S. Dobrzeniecka, D. Rochefort, M. Neugnot-Cerioli, J. C. Lacaille, Z. Niu, C. M. Eng, Y. Yang, S. Palardy, C. Belhumeur, G. A. Rouleau, N. Tommerup, L. Immken, M. H. Beauchamp, G. S. Patel, J. Majewski, M. A. Tarnopolsky, K. Scheffzek, H. Hjalgrim, J. L. Michaud, G. di Cristo, *Human Mutation* **2013**, *34*, 385–394.
- [253] F. F. Hamdan, J. Gauthier, D. Spiegelman, A. Noreau, Y. Yang, S. Pellerin, S. Dobrzeniecka, M. Côté, E. Perreau-Linck, L. Carmant, G. D’Anjou, É. Fombonne, A. M. Addington, J. L. Rapoport, L. E. Delisi, M.-O. Krebs, F. Mouaffak, R. Joober, L. Mottron, P. Drapeau, C. Marineau, R. G. Lafrenière, J. C. Lacaille, G. A. Rouleau, J. L. Michaud, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 605.
- [254] M. J. Parker, A. E. Fryer, D. J. Shears, K. L. Lachlan, S. A. Mckee, A. C. Magee, S. Mohammed, P. C. Vasudevan, S. M. Park, V. Benoit, D. Lederer, I. Maystadt, D. study, D. R. Fitzpatrick, *American Journal of Medical Genetics Part A* **2015**, *167*, 2231–2237.
- [255] H. J. Chen, M. Rojas-Soto, A. Oguni, M. B. Kennedy, *Neuron* **1998**, *20*, 895–904.
- [256] J. H. Kim, D. Liao, L. F. Lau, R. L. Huganir, *Neuron* **1998**, *20*, 683–691.
- [257] H. Cinar, R. Oliva, Y. H. Lin, X. Chen, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26*, 11024–11031.
- [258] H. Y. Fan, Y. L. Shek, A. Amiri, D. N. Dubins, H. Heerklotz, R. B. MacGregor, T. v. Chalikian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4518–4526.

- [259] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. ErIkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 460–465.
- [260] A. N. Semenov, M. Rubinstein, *Macromolecules* **1998**, *31*, 1373–1385.
- [261] L. de Vivo, M. Bellesi, W. Marshall, E. A. Bushong, M. H. Ellisman, G. Tononi, C. Cirelli, *Science (1979)* **2017**, *355*, 507–510.
- [262] M. Zeng, F. Ye, J. Xu, M. Zhang, *Journal of Molecular Biology* **2018**, *430*, 69–86.
- [263] K. Julius, J. Weine, M. Gao, J. Latarius, M. Elbers, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Macromolecules* **2019**, *52*, 1772–1784.
- [264] H. Laurent, D. L. Baker, A. K. Soper, M. E. Ries, L. Dougan, *Journal of Physical Chemistry B* **2020**, *124*, 10983–10993.
- [265] M. Govindarajulu, P. D. Pinky, I. Steinke, J. Bloemer, S. Ramesh, T. Kariharan, R. T. Rella, S. Bhattacharya, M. Dhanasekaran, V. Suppiramaniam, R. H. Amin, *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2020**, *13*, 138.
- [266] L. Chen, Y. Chen, M. Zhao, L. Zheng, D. Fan, *Scientific Reports* **2020**, *10*, 15198.
- [267] D. Li, Y. Ke, R. Zhan, C. Liu, M. Zhao, A. Zeng, X. Shi, L. Ji, S. Cheng, B. Pan, L. Zheng, H. Hong, *Aging Cell* **2018**, *17*, e12768.
- [268] H. Cinar, R. Oliva, H. Wu, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *Journal of Physical Chemistry B* **2022**, *126*, 1734–1741.
- [269] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, D. Thirumalai, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 13401–13407.
- [270] J. Mondal, D. Halverson, I. T. S. Li, G. Stirnemann, G. C. Walker, B. J. Berne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9270–9275.
- [271] Y. T. Liao, A. C. Manson, M. R. DeLyser, W. G. Noid, P. S. Cremer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 2479–2484.
- [272] Y. H. Lin, H. Wu, B. Jia, M. Zhang, H. S. Chan, *Biophys. J.* **2022**, *121*, 157–171.
- [273] V. H. Ryan, N. L. Fawzi, *Trends Neurosci.* **2019**, *42*, 693–708.

-
- [274] S. Takahashi, N. Sugimoto, *Angewandte Chemie* **2013**, *125*, 14019–14023.
- [275] J. M. Knop, S. Patra, B. Harish, C. A. Royer, R. Winter, *Chemistry* **2018**, *24*, 14346–14351.
- [276] A. Macdonald, *Life at High Pressure In the Deep Sea and Other Environments*, Springer Nature, Cham, **2021**.
- [277] J. R. Treberg, W. R. Driedzic, *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 39–45.
- [278] G. H. Diering, R. S. Nirujogi, R. H. Roth, P. F. Worley, A. Pandey, R. L. Haganir, *Science (1979)* **2017**, *355*, 511–515.

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
atm	Atmosphärendruck
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
cm	Kontaktminimum (<i>contact minimum</i>)
db	Desolvationsbarriere (<i>desolvation barrier</i>)
Ddx4	DEAD-Box Helicase 4
d.h.	Das heißt
DLG	Diffusionsbegrenzter Wachstum (<i>diffusion-limited growth</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
FIR	Ferne Infrarot
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FSD	<i>Fourier self-deconvolution</i>
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
GeFi	Gelfiltration
H ₇ D-Crys	Humanes γ D-Kristallin
HHP	Hoher hydrostatischer Druck (<i>high hydrostatic pressure</i>)

HPNS	Neurologisches Hochdruck-Syndrom (<i>high pressure nervous syndrome</i>)
IDP	Intrinsisch ungeordnetes Protein (<i>intrinsically disordered protein</i>)
IDR	Intrinsisch ungeordnete Proteinregion (<i>intrinsically disordered region</i>)
IFE	<i>Inner filter</i> Effekt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
JMAK	Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov-Theorie
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LCST	Untere kritische Lösungstemperatur (<i>lower critical solution</i>)
LLPS	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (<i>liquid-liquid phase separation</i>)
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellur
MIR	Mittlerer Infrarot
mTOR	<i>Mechanistic target of Rapamycin</i>
NA	Numerische Apertur
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NIR	Nahe Infrarot
<i>NPT</i>	Isothermisch-isobar (konstante Temperatur, konstanter Druck und konstante Teilchenzahl)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBM	<i>PDZ binding motif</i>
P-Bodies	<i>Processing bodies</i>
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1
PMF	Potential der mittleren Kraft (<i>potential of mean force</i>)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RPT	Reentranter Phasenübergang (<i>reentrant phase transition</i>)
SASA	Vom Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (<i>solvent accessible surface area</i>)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
ssm	Lösungsmittelgetrenntes Minimum (<i>solvent separated minimum</i>)
STED	<i>Stimulated emission depletion</i>
SynGAP	<i>Synaptic Ras GTPase-activating protein</i>
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCST	Obere kritische Lösungstemperatur (<i>upper critical solution</i>)
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbares Licht (<i>ultraviolet/visible</i>)
WD	Arbeitsabstand (<i>working distance</i>)

Publikationsliste

- [1] H. Cinar, R. Oliva, H. Wu, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, "Effects of Cosolvents and Crowding Agents on the Stability and Phase Transition Kinetics of the SynGAP/PSD-95 Condensate Model of Postsynaptic Densities", *Journal of Physical Chemistry B* **2022**, *126*, 1734–1741.
- [2] H. Cinar, R. Oliva, Y. H. Lin, X. Chen, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, "Pressure Sensitivity of SynGAP/PSD-95 Condensates as a Model for Postsynaptic Densities and its Biophysical and Neurological Ramifications", *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26*, 11024–11031.
- [3] H. Cinar, R. Winter, "The Effects of Cosolutes and Crowding on the Kinetics of Protein Condensate Formation Based on Liquid-Liquid Phase Separation - A Pressure-Jump Relaxation Study", *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17245
- [4] H. Cinar, S. Cinar, H. S. Chan, and R. Winter, "Pressure-induced Dissolution and Reentrant Formation of Condensed, Liquid-Liquid Phase-Separated Elastomeric α -Elastin", *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* 8286-8291.
- [5] H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. H. A. Winter, "Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications", *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 13049–13069.
- [6] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, "Pressure-Sensitive and Osmolyte-Modulated Liquid-Liquid Phase Separation of Eye-Lens Gamma-Crystallins", *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [7] Z. Fetahaj, L. Ostermeier, H. Cinar, R. Oliva, R. Winter, "Biomolecular Condensates under Extreme Martian Salt Conditions", *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5247-5259.
- [8] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, and R. Winter, "Modulation of Enzymatic Activity by Aqueous Two-Phase Systems and Pressure - Rivalry between Kinetic Constants", *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 395-398.

-
- [9] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, C. Ehrt, and R. Winter, "Alteration of Protein Binding Affinities by Aqueous Two-Phase Systems Revealed by Pressure Perturbation", *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8074.

Konferenzbeiträge

- [1] Tagung der deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (30.Mai-01.Juni, 2019), Jena, Deutschland – **Poster**

- [2] Solvation Science Meets High Pressure Bioscience RESOLV – 10th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP) – DFG FOR 1979 (29 September - 03 Oktober, 2019) Dortmund, Deutschland – **Poster**

- [3] Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (8. Februar 2019), Dortmund, Deutschland – **Poster**

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

***Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)