

Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge in biomolekularen Systemen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht bei der

Technischen Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

Zamira Fetahaj

geboren in Suhogërllë, Kosovo

Dortmund 2022

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2018 bis Oktober 2022 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Tag der Disputation:

15.03.2023

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Stefan M. Kast

Prüfungskommission

Vorsitzender:

Prof. Dr. Martin Hiersemann
Organische Chemie, CCB, TU Dortmund

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Roland Winter
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Claus Czeslik
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

Meiner Familie gewidmet

„Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment.”

Rosalind Franklin (1920-1958)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Roland Winter** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank, dass Sie mich mit einem spannenden Thema betraut haben und für Gespräche und Diskussionen stets zur Verfügung standen.

Prof. Dr. Claus Czeslik danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats sowie für die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen der PC-Grundpraktika.

Bei **Andrea Jeworrek**, **Simone Möbitz** und **Bertina Schuppan** bedanke ich mich für all ihre Anstrengungen und Bemühungen für unsere Arbeitsgruppe sowie für die freundlichen Gespräche. Simone danke ich zudem herzlichst für die Proteinaufreinigungen und für ihren Rat bei proteinbezogenen Fragen.

During my PhD studies, I met **Dr. Elaine Petronilho** from the Federal University of Rio de Janeiro, who visited our labs two times. Thank you, Elaine, for the good conversations, the laughs and for becoming a dear friend of mine. Next time, we'll definitely meet in Brazil!

Liebe **Magiliny**, die meiste Zeit haben wir in den letzten vier Jahren ein Büro geteilt. Vielen Dank für deine Freundschaft, die vielen guten Gespräche und für Rat und Tat bei all meinen Fragen. Ich wünsche dir alles Gute für die Zukunft!

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Physikalische Chemie I** für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorheben möchte ich dabei: **Nisrine Jahmidi-Azizi**, **Lena Ostermeier**, **Dr. Hasan Cinar** und **Dr. Rosario Oliva**.

Danksagung

Der größte Dank gebührt allerdings meiner Familie, bei der ich mich in meiner Muttersprache bedanken möchte.

Mami, Babi, Tili, Loli dhe **Nini**: Faleminderit për përkrahjen dhe dashurinë juaj gjatë studimeve të mia si edhe gjatë gjithë jetës sime. Ju ma lejconi rrugën dhe pa ju nuk kisha arritë këtë. Ju falënderoj përzemërsisht dhe ju dua pa fund!

Publikationen

- H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. Winter. Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 13049–13069.
- R. Oliva, S. K. Mukherjee, Z. Fetahaj, S. Möbitz, R. Winter. Perturbation of liquid droplets of P-granule protein LAF-1 by the antimicrobial peptide LL-III. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11577–11580.
- 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.
- Z. Fetahaj^{*}, M. Jaworek^{*}, R. Oliva, R. Winter. Suppression of Liquid-Liquid Phase Separation and Aggregation of Antibodies by Modest Pressure Application. *Chem. – Eur. J.* **2022**, *28*, e202201658
- N. Samanta, Y. B. Ruiz-Blanco, Z. Fetahaj, D. Gnutt, C. Lantz, J. A. Loo, E. Sanchez-Garcia, S. Ebbinghaus. Superoxide dismutase 1 folding stability as a target for molecular tweezers in SOD1-related amyotrophic lateral sclerosis. *ChemBioChem* **2022**, e202200396
- J-M. Knop, S. Mukherjee, M. Jaworek, S. Kriegler, M. Manisegaran, Z. Fetahaj, L. Ostermeier, R. Oliva, S. Gault, C. Cockell, R. Winter. Life in Multi-Extreme Environments: Brines, Osmotic and Hydrostatic Pressure – A Physicochemical View. *Chemical Reviews* **2022**

* Geteilte Erstautorschaft

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Publikationen	iii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Flüssig-Flüssig-Phasentrennung	1
1.1.1 Theoretische Grundlagen.....	2
1.1.2 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im zellorganisatorischen und zellfunktionalen Kontext	8
1.1.3 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im pathologischen Kontext	10
1.1.4 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im Kontext einer präbiotischen Welt	12
1.2 Leben unter Extrembedingungen	13
1.3 Osmolyte.....	14
1.4 Makromolekulares Crowding	16
1.5 Zielsetzung.....	18
2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine	19
2.1 Einleitung	21
2.2 Material und Methoden.....	23

2.2.1	Probenpräparation von Ddx4	23
2.2.2	Expression und Aufreinigung von MBP-FUS.....	23
2.2.3	Probenpräparation von MBP-FUS	24
2.2.4	(Temperaturabhängige) Turbiditätsmessungen	24
2.2.5	Druckabhängige Turbiditätsmessungen.....	24
2.2.6	Lichtmikroskopie	25
2.3	Ergebnisse.....	25
2.3.1	Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4	25
2.3.2	Einfluss von TMAO auf die druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4	29
2.3.3	Verdau des MBP-FUS-Konstrukts durch die TEV-Protease.....	31
2.3.4	Zeit- und konzentrationsabhängige Mikroskopie des MBP-FUS-Konstrukts	32
2.3.5	Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS	35
2.3.6	Einfluss von Ficoll auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS	38
2.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	40
3	Biomolekulare Kondensate unter extremen Marssalz-Bedingungen	43
3.1	Einleitung.....	45
3.2	Material und Methoden	46
3.2.1	Expression und Aufreinigung von LAF-1.....	46
3.2.2	Expression und Aufreinigung von γ D-Kristallin.....	47
3.2.3	Chemikalien.....	48
3.2.4	Probenpräparation für mikroskopische Untersuchungen.....	48
3.2.5	Lichtmikroskopie	49
3.2.6	Probenpräparation für FTIR-Spektroskopie	49
3.2.7	FTIR-Spektroskopie.....	49
3.3	Ergebnisse.....	50
3.3.1	Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1	50
3.3.2	Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin.....	53
3.3.3	Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin.....	56

3.3.4	Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur von γ D-Kristallin	58
3.3.5	Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur des Proteins LAF-1	60
3.4	Diskussion.....	62
3.5	Zusammenfassung.....	66
4	Dielektrische Untersuchungen am phasenseparierten Zustand von α-Elastin	67
4.1	Einleitung	68
4.2	Material und Methoden.....	70
4.2.1	Probenpräparation	70
4.2.2	Temperaturabhängige Turbiditätsmessungen	70
4.2.3	Dielektrische Messungen	70
4.3	Ergebnisse und Diskussion	71
4.3.1	Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Wasser	72
4.3.2	Dielektrische Messungen an α -Elastin in Wasser.....	72
5	Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckanwendung	77
5.1	Einleitung	79
5.2	Material und Methoden.....	81
5.2.1	Chemikalien	81
5.2.2	Probenpräparation	81
5.2.3	Turbiditätsmessungen.....	81
5.2.4	Lichtmikroskopie	82
5.2.5	DSC-Messungen.....	82
5.2.6	Fluoreszenzmarkierung von γ -Globulin	82
5.2.7	Fluoreszenzanisotropie-Messungen.....	82
5.2.8	FTIR-Spektroskopie	83
5.3	Ergebnisse und Diskussion	84
5.3.1	Konzentrationsabhängiger Einfluss von TMAO auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin	84
5.3.2	Selbstassoziation von γ -Globulin in An- und Abwesenheit von TMAO .	89
5.3.3	FTIR-spektroskopische Untersuchung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen.....	91
5.4	Zusammenfassung.....	96

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung	99
7	Summary	101
8	Literaturverzeichnis	103
9	Anhang	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Formen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung.	3
Abbildung 1.2:	Mechanismen des Tröpfchenwachstums.	4
Abbildung 1.3:	Phasendiagramm der parameterabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen.	5
Abbildung 1.4:	Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen.	7
Abbildung 1.5:	Struktur ausgewählter Osmolyte und des Denaturans Harnstoff.	15
Abbildung 1.6:	Schematische 2D-Darstellung des Ausschlussvolumens.	16
Abbildung 1.7:	Struktur der synthetischen Crowder Dextran, Ficoll und PEG.	17
Abbildung 2.1:	Domänenaufbau der Proteine Ddx4 und FUS.	22
Abbildung 2.2:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 auf Oberflächen.	26
Abbildung 2.3:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 in Lösung.	27
Abbildung 2.4:	Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4.	28
Abbildung 2.5:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 bei verschiedenen Temperaturen.	29
Abbildung 2.6:	Einfluss des Osmolyten TMAO auf die druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4.	30
Abbildung 2.7:	Ausbleibende Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von MBP-FUS bei Nichtzugabe der TEV-Protease unter ansonsten entmischungsgünstigen Bedingungen.	31
Abbildung 2.8:	Zeitabhängiger TEV-Verdau des MBP-FUS-Konstrukts.	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.9:	Konzentrationsabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS.	33
Abbildung 2.10:	Zeitabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS.	34
Abbildung 2.11:	Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS.	35
Abbildung 2.12:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS bei verschiedenen Temperaturen.	36
Abbildung 2.13:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS bei 15 °C und bei Raumtemperatur.	37
Abbildung 2.14:	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS in gecrowdeter Umgebung.	38
Abbildung 2.15:	Crowding-Effekt auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS.	39
Abbildung 3.1:	Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1.	51
Abbildung 3.2:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1 in Anwesenheit verschiedener Salze.	52
Abbildung 3.3:	Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin.	54
Abbildung 3.4:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Anwesenheit verschiedener Salze.	55
Abbildung 3.5:	Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin.	57
Abbildung 3.6:	Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin in Anwesenheit verschiedener Salze.	58
Abbildung 3.7:	FTIR-Spektroskopie von γ D-Kristallin in Magnesiumperchlorat.	59
Abbildung 3.8:	Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur von γ D-Kristallin.	60
Abbildung 3.9:	FTIR-Spektroskopie von LAF-1 in Magnesiumperchlorat.	61
Abbildung 4.1:	Schematische Abbildung eines dielektrischen Spektrums.	69
Abbildung 4.2:	Dem Projekt zugrundeliegende Überlegungen.	71
Abbildung 4.3:	Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Wasser.	72
Abbildung 4.4:	Nieder- und hochfrequente dielektrische Messungen von α -Elastin in Wasser.	73
Abbildung 4.5:	Maxwell-Wagner-Polarisation in inhomogenen Lösungen.	74
Abbildung 4.6:	Dielektrische Spektroskopie von α -Elastin in Wasser.	75

Abbildung 5.1:	Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin in Lösung sowie unter verschiedenen Lösungsbedingungen.	85
Abbildung 5.2:	Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin auf Oberflächen sowie unter verschiedenen Lösungsbedingungen.	86
Abbildung 5.3:	Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen.	88
Abbildung 5.4:	Temperaturinduzierte Entfaltung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen.	89
Abbildung 5.5:	Druckabhängiger Selbstassoziationsassay von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen.	90
Abbildung 5.6:	Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin in Puffer.	92
Abbildung 5.7:	Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin in TMAO-zugesetztem Puffer.	93
Abbildung 5.8:	Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin im PEG-induzierten Entmischungszustand.	94
Abbildung 5.9:	Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse bei der Phasen.	95
Abbildung 5.10:	Mechanismus der druckabhängigen γ -Globulin-Kondensatauflösung.	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen.	48
Tabelle 5.1:	Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen.	81

Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	weight per volume
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AL	Antibody light-chain
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATPS	Aqueous two-phase system
a.u.	arbitrary units
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	Circulardichroismus(-Spektroskopie)
C-TD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>engl.</i>	<i>englisch</i>
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

Abkürzungsverzeichnis

FSD	Fourier Self-Deconvolution
FTD	Frontotemporale Demenz
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot(-Spektroskopie)
FUS	Fused in sarcoma
Ga	Gigajahr
Gew.-%	Gewichtsprozent
HHP	High hydrostatic pressure
IDP	Intrinsically disordered protein
IDR	Intrinsically disordered region
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap β 2	Karyopherin- β 2
LB	Lysogeny broth
LC	Low complexity
LCST	Lower critical solution temperature
LLPS	Liquid-liquid phase separation
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCT	Mercury Cadmium Telluride
min	Minute
MLO	Membraneless organelle
MW	Molecular weight
NA	Numerische Apertur
NLS	Nuclear localization signal
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriacetic acid
N-TD	N-terminale Domäne

NUP	Nukleoporine
OD	Optische Dichte
PB	Poisson-Boltzmann
PBS	Phosphate-buffered saline
PDB	Protein data bank
PEG	Polyethylenglykol
PFTE	Polytetrafluorethylen
PTM	Posttranslationale Modifikation
RBP	RNA-binding protein
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RRM	RNA recognition motif
SAXS	Small-angle X-ray scattering
ssDNA	single-stranded DNA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEV	Tobacco Etch Virus
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
TNPO1	Transportin-1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCST	Upper critical solution temperature
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
WD	Working distance
ZnF	Zinc finger

Einleitung

1.1 Flüssig-Flüssig-Phasentrennung

Die Entdeckung tröpfchenartiger membranloser Organellen, wie des Nukleolus, datiert zurück auf die erste Hälfte des 19. Jahrhunderts^[1] und bereits 1899 formulierte der US-amerikanische Zellbiologe Edmund Beecher Wilson, das flüssige Zellinnere gleiche einer Emulsion.^[2,3] Erst im Jahre 2009 allerdings stellten Brangwynne et al.^[4] durch die Untersuchung von P-Granula in *C. elegans* die Verbindung zwischen der Entstehung dieser Organellen und dem Phänomen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung her.^[3] In der Kolloid- und Polymerchemie ist das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung gut erforscht, die Bedeutung dieser für die Zellbiologie blieb bis zu jenem Zeitpunkt jedoch weitgehend unerkant.^[5] Die im *Science*-Magazin erschienene Publikation löste einen regelrechten Forschungs- und Publikationsboom aus, welcher ein neues, sehr beliebtes Feld der Biowissenschaften schuf.^[6]

Der Fokus vorliegender Arbeit liegt auf eben dieser biologischen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung. Nachfolgend sollen zunächst die theoretischen physikochemischen Grundlagen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung erläutert und anschließend die biologische Relevanz derselben durch Beispiele aus Natur und Forschung verdeutlicht werden.

1.1.1 Theoretische Grundlagen

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (*engl.* liquid-liquid phase separation, LLPS) bezeichnet, zunächst ganz allgemein gesprochen, die Entmischung einer homogenen Lösung in zwei flüssige Phasen.^[7] Die einfachste und vielfach angeführte Analogie hierfür sind Öltröpfchen in Wasser.^[8–10] Dieses Alltagsbeispiel verhilft zu einer Vorstellung von der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, es greift allerdings noch zu kurz.

Eine dem Öl-Wasser-Beispiel ähnliche Form der Entmischung ist die segregative Phasentrennung, welche einer von zwei Klassen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung entspricht (Abb. 1.1). Startpunkt der segregativen Phasentrennung ist die homogene Lösung zweier in einem Lösungsmittel aufgenommener Komponenten. Unter bestimmten Bedingungen kommt es zur Entmischung und damit verbunden zur Anreicherung einer Komponente in Phase 1 und der anderen Komponente in Phase 2.^[11] Das Resultat der segregativen Phasentrennung ist ein wässriges Zwei-Phasen-System (*engl.* aqueous two-phase system, ATPS).^[12] Ein Beispiel eines in der Forschung oft zum Einsatz kommenden Zwei-Phasen-Systems ist das System aus dem Polysaccharid Dextran und dem Polymer Polyethylenglykol (PEG).^[12] Das PEG/Dextran-System wird in zahlreichen Varianten verwendet, da sowohl die eingesetzte Gewichtskonzentration als auch das Molekulargewicht beider Polymerkomponenten jeweils variiert werden kann.^[13] Im Unterschied zu dem alltäglichen Öl-Wasser-Beispiel existiert bei der segregativen Entmischung mit dem Lösungsmittel noch eine dritte Komponente, die allerdings in beiden entmischten Phasen enthalten ist.^[14]

Die zweite Form der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung ist die assoziative Form. Bei der assoziativen Phasentrennung werden beide Komponenten aufgrund attraktiver Wechselwirkungen in derselben Phase angereichert, welche deshalb auch die dichte Phase genannt wird.^[13,14] Die andere Phase hingegen „verarmt“ bezüglich beider Komponenten und stellt somit die verdünnte Phase dar.^[11,13] Eine weitere Bezeichnung für den Prozess der assoziativen Phasentrennung ist der Begriff „Koazervation“ und die mit beiden Komponenten angereicherte Phase wird entsprechend Koazervat genannt.^[13] Sind elektrostatisch attraktive Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten die Triebkraft der Entmischung, wird diese Bezeichnung zu „komplexe Koazervation“ erweitert.^[15]

Die assoziative Flüssig-Flüssig-Phasentrennung benötigt allerdings nicht zwingend zwei Komponenten, um stattfinden zu können. Wenn auch nur eine einzige Substanz im Lösungsmittel gelöst ist, kann diese unter der Bedingung der Selbstassoziation in der Koazervatphase angereichert werden.^[16] In diesem Fall handelt es sich um einfache Koazervation. Wird die Entmischung der Substanz vor allem durch elektrostatisch attraktive Wechselwirkungen vermittelt, spricht man auch von autokomplexer Koazervation.^[16]

Beiden Formen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung gemein ist die Ausbildung von sphärischen nano- bis mikrometergroßen Tropfen, die eine der beiden Phasen darstellen und unter dem Mikroskop sichtbar sind. Neben dem Koazervatbegriff der assoziativen Phasentrennung werden hierfür auch noch die allgemeineren Begriffe „Tröpfchen“ und „Kondensate“ verwendet. Auch auf spektroskopische Weise kann die Existenz dieser Tröpfchen nachgewiesen werden, da diese das Licht streuen und somit eine Trübung (Turbidität) der Lösung verursachen, welche quantifizierbar ist. Die zeitabhängige Sedimentation der Tröpfchen zieht eine makroskopische Phasentrennung nach sich.

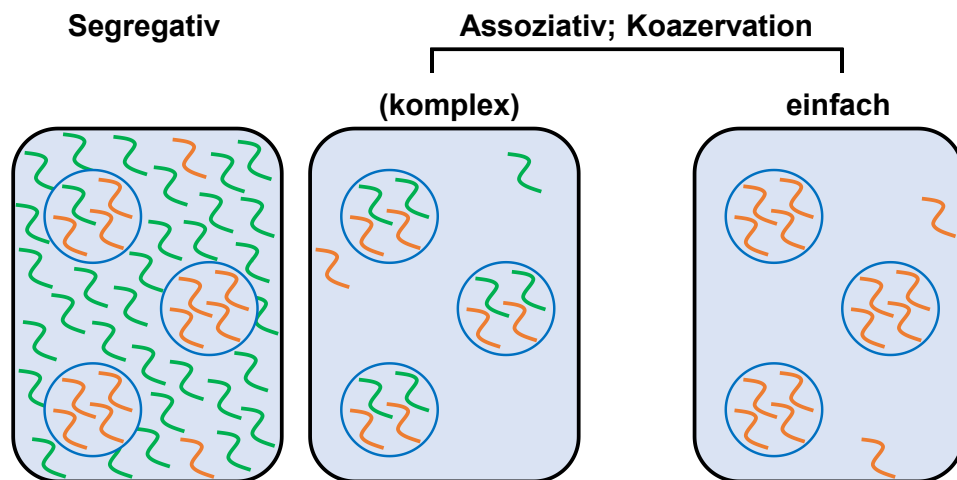


Abbildung 1.1: Formen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung. Bei der segregativen Phasentrennung entstehen zwei flüssige Phasen, in denen jeweils eine von zwei gelösten Komponenten anteilmäßig dominiert, während bei der assoziativen Phasentrennung beide Komponenten in derselben Phase angereichert werden (Koazervation). Die Koazervation beider Komponenten ist nur dann komplex, wenn elektrostatisch attraktive Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten die Ursache der Entmischung darstellen. Die assoziative Phasentrennung kann auch dann erfolgen, wenn nur eine einzige (selbstassoziierende) Komponente gelöst vorliegt. Ausgangszustand beider Entmischungsformen ist der durchmischte einphasige Zustand. Adaptiert aus Referenz.^[14]

Bezüglich der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen, die in dieser Arbeit ausschließlich untersucht wurde, finden sich in der Literatur Beispiele einfacher Koazervation,^[17,18] segregativer Phasentrennung (z. B. mit PEG)^[19,20] und auch Beispiele der Koazervation mit einer weiteren Komponente (z. B. mit DNA).^[21,22] Außerdem kann die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stattfinden.^[23] In den dichten, aber flüssigkeitsähnlichen Kondensaten sind Proteine um das 10-100-fache angereichert.^[23] Kennzeichnend für das flüssigkeitsähnliche Verhalten der Tröpfchen sind unter anderen die folgenden Merkmale: die Deformation der Tröpfchen an Hindernissen und unter dem Einfluss von Scherkräften, die Benetzung von Oberflächen sowie die Ausbildung einer sphärischen Form aufgrund von Oberflächenspannung.^[9,23]

1 Einleitung

Darüber hinaus können die Tröpfchen, immer unter Wiedereinnahme der sphärischen Form, zu größeren Tröpfchen wachsen oder sich in kleinere Tröpfchen aufspalten.^[24,25] Das Wachstum der Tröpfchen kann entweder über den Prozess der Koaleszenz (Fusion) oder durch Ostwald-Reifung erfolgen (Abb. 1.2).^[7] FRAP-Experimente, bei welchen typischerweise Bereiche innerhalb eines durch fluoreszierendes Protein geformten Kondensats mit einem intensiven Laserpuls gebleicht werden, belegen außerdem eine hohe innere Dynamik der Tröpfchen und einen Austausch mit der umgebenden Lösung.^[26]

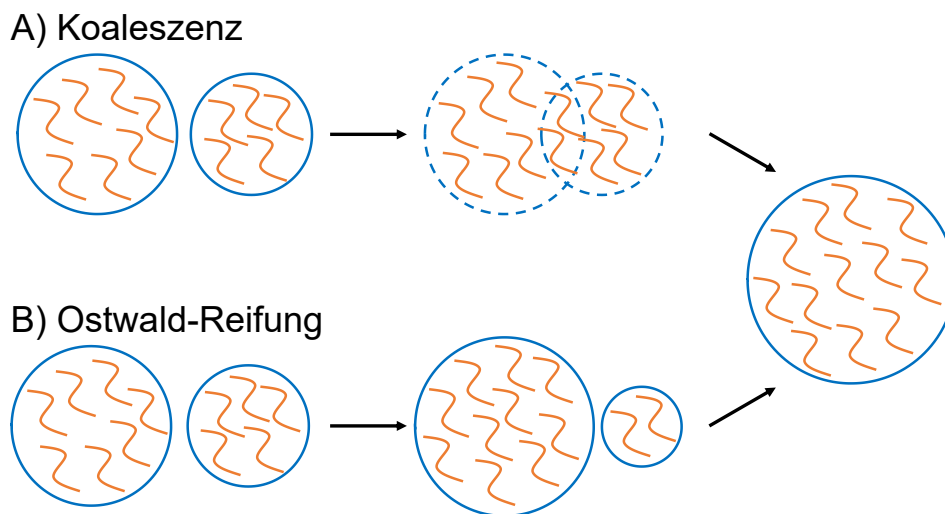


Abbildung 1.2: Mechanismen des Tröpfchenwachstums. (A) Bei der Koaleszenz fusionieren zwei Tröpfchen über eine gemeinsam gebildete Zwischenform zu einem größeren, wieder sphärischen Tröpfchen.^[7] **(B)** Im Falle der Ostwald-Reifung kommt es zum Materialaustausch zwischen zwei Tröpfchen mit der Folge, dass sich eines der Tröpfchen stetig vergrößert, während das andere kleiner wird.^[27] Das Resultat der Ostwald-Reifung von zwei Tröpfchen ist, wie bei der Koaleszenz auch, ein einzelnes größeres Tröpfchen. Adaptiert aus Referenz.^[28]

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen findet nur unter bestimmten Bedingungen statt. Das Phasendiagramm eines Proteinsystems zeigt in Abhängigkeit zweier Parameter Bereiche der Homogenität sowie Bereiche der Entmischung.^[29] Um ein solches Phasendiagramm aufstellen zu können, müssen die zwei gewählten Parameter variiert und anschließend festgestellt werden, in welchem Zustand sich die Lösung befindet.^[1] Stellt einer dieser Parameter die Konzentration dar, ergibt sich ein Phasendiagramm wie in Abbildung 1.3, anhand dessen einige wichtige Begrifflichkeiten erläutert werden können. Ein Proteinsystem geht in den phasenseparierten Zustand über, sobald eine bestimmte Threshold- oder Sättigungskonzentration überschritten wird.^[25] Innerhalb des als zweiphasig gekennzeichneten Bereichs des Diagramms werden wiederum erneut zwei verschiedene Bereiche unterschieden, der Bereich zwischen Binodale und Spinodale und der spinodale Bereich.

Wird die Sättigungskonzentration erreicht, befindet sich das System zunächst in dem Bereich zwischen Binodale und Spinodale. In diesem Bereich ist die Entmischung des Systems zwar thermodynamisch begünstigt, die Tröpfchen entstehen allerdings durch einen oft langsamen Nukleationsmechanismus.^[29,30] Gelangt das System durch ein Erhöhen der Konzentration in den spinodalen Bereich, findet die Phasenseparation spontan statt^[29] und die für diesen Bereich typische, von Tröpfchen verschiedene Morphologie der Phasentrennung ist erkennbar. Üblicherweise erfolgt die Untersuchung von phasenseparierenden Systemen unter Bedingungen, welche das System im Bereich zwischen Binodale und Spinodale lokalisieren. Das Maximum des zweiphasigen Bereichs wird kritischer Punkt genannt^[1] und die ihm entsprechende Konzentration als kritische Konzentration bezeichnet. In einem (T, c) -Phasendiagramm beispielsweise wird der kritische Punkt auch durch den spezifischeren Ausdruck der „kritischen Temperatur“ beschrieben. Die Übergangstemperatur bei jeder anderen als der kritischen Konzentration wird Trübungstemperatur (*engl.* cloud point temperature, T_{cloud}) genannt. Bei In-vitro-Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass phasenseparierende Systeme empfindlich auf Änderungen der Temperatur, der Ionenstärke und des pH-Wertes reagieren.^[31] In vivo jedoch bestehen noch weitere Regulationsparameter, die allerdings erst im Unterkapitel 1.1.2 vorgestellt werden.

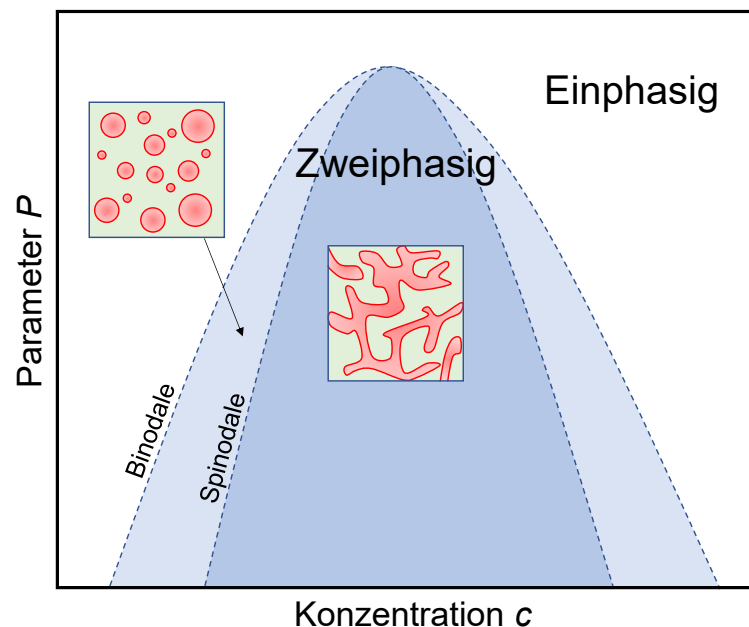


Abbildung 1.3: Phasendiagramm der parameterabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen. Im farblosen Bereich ist das System einphasig, in beiden blaumarkierten Bereichen findet die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins statt. Die eingefügten schematischen Bilder zeigen die Morphologie der Phasentrennung im Bereich zwischen Binodale und Spinodale und im Bereich der spinodalen Entmischung. Der Parameter P stellt z. B. die Temperatur dar. Adaptiert aus Referenzen.^[1,29]

1 Einleitung

Mit den Grundlagen dieses Phänomens vertraut gemacht, stellt sich aus thermodynamischer Sicht jedoch die Frage, wieso die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung überhaupt stattfinden kann. Entsprechend des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik erfolgen Prozesse spontan, wenn ein Entropiegewinn mit diesen einhergeht.^[32] Für eine Lösung bestehend aus Lösungsmittelmolekülen und den darin gelösten (Bio-)Polymermolekülen existieren im homogenen Zustand mehr Anordnungsmöglichkeiten (Freiheitsgrade) als im phasenseparierten Zustand.^[32] Aus diesem Grund verwundert die Existenz dieses Phänomens zunächst. Gemäß dem bekanntesten Modell der Phasenseparation, und im Einklang mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung, müssen enthalpische Beiträge den Entropieverlust aufwiegen, der mit der Entmischung verbunden ist. Bei betreffendem Modell handelt es sich um das Flory-Huggins-Modell, bei dem die (Bio-)Polymermoleküle als lineare Ketten betrachtet werden und der Grund für die Phasentrennung in attraktiven Wechselwirkungen besteht.^[31] Die Wechselwirkungen, die im Modell berücksichtigt werden, sind sowohl homo- als auch heterotypischer Natur und entsprechen Polymer-Polymer-Wechselwirkungen, Polymer-Lösungsmittel-Wechselwirkungen und Lösungsmittel-Lösungsmittel-Wechselwirkungen.^[33] Dem Flory-Huggins-Modell zufolge entstehen entmischte Zustände aufgrund attraktiver Polymer-Polymer-Wechselwirkungen und attraktiver Lösungsmittel-Lösungsmittel-Wechselwirkungen.^[30]

Eine Klasse von Proteinen, die zur Phasentrennung fähig ist und deren Entmischung aufgrund attraktiver Polymer-Polymer-Wechselwirkungen stattfinden kann, sind intrinsisch ungeordnete Proteine (*engl.* intrinsically disordered proteins, IDPs). Diese Proteine sind entweder vollständig ungeordnet oder besitzen eine oder mehrere ungeordnete Domänen, sogenannte intrinsisch ungeordnete Regionen (*engl.* intrinsically disordered region, IDR). Intrinsisch ungeordnete Proteine verfügen über keine definierte 3D-Struktur und ihre Aminosäuresequenz weist einen einseitigen Aminosäuregehalt auf.^[23,24] Die Primärstruktur selbiger ist außerdem oftmals repetitiv und enthält sowohl positiv geladene Aminosäuren (wie Arginin (R) und Lysin (K)) als auch negativ geladene Aminosäuren (wie Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E)), polare Aminosäuren (wie Glycin (G), Glutamin (Q), Asparagin (N) und Serin (S)) sowie aromatische Aminosäuren (wie Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y)).^[34] In ungeordneten Proteinen finden sich daher oft Sequenzmotive wie YG/S, FG, RG, GY, KSPEA, SY und Q/N sowie alternierende Ladungsblöcke.^[34] Aus dem Vorkommen der oben genannten Aminosäuren resultieren schwache multivalente Wechselwirkungen, welche die Triebkraft der Phasentrennung von IDP-Koazervaten darstellen.^[3,35] Bei diesen Wechselwirkungen handelt es sich um Wechselwirkungen zwischen Ladungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Kation- π -Wechselwirkungen zwischen einer positiv geladenen Aminosäure

und einem aromatischen Rest und π - π -Stacking zwischen zwei aromatischen Aminosäureresten.^[34] Für die Entmischung von intrinsisch ungeordneten Proteinen scheint die Verteilung der Ladungen entlang der Proteinsequenz essentiell zu sein, wie Untersuchungen mit einer Variante des IDPs Ddx4 zeigen konnten, bei der die Nettoladungszahl des Konstrukts unverändert blieb, die Reihenfolge der Ladungen selbst allerdings variiert wurde.^[36] Aus Untersuchungen von Schuster et al. mit Proteinkonstrukten, die ein bis drei RGG-Motive aus dem intrinsisch ungeordneten Protein LAF-1 enthielten, ging außerdem hervor, dass die temperaturabhängige Phasentrennung der Konstrukte mit größer werdender Anzahl an RGG-Einheiten zunehmend gegen erhöhte Temperaturen stabilisiert wird.^[37] Die Phasentrennung von Proteinen ist gemäß dem Flory-Huggins-Modell enthalpiegetrieben und eine Temperaturniedrigung begünstigt entsprechend die Entmischung.^[33] In Übereinstimmung mit den Voraussagen des Modells gehen viele der intrinsisch ungeordneten Proteine aufgrund einer Temperaturniedrigung in den phasenseparierten Zustand über. Sie entmischen also mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur (*engl.* upper critical solution temperature, UCST) (Abb. 1.4). Es gibt allerdings auch Proteine, bei welchen eine Temperaturerhöhung die Phasentrennung begünstigt. In der Regel besitzen solche Proteine einen hohen Anteil an hydrophoben Strukturen.^[33] Die Entmischung ist in diesem Fall entropiegetrieben, da gebundene Wassermoleküle durch die Phasentrennung von der Proteinoberfläche freigesetzt werden.^[33] Diese Proteine entmischen also mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur (*engl.* lower critical solution temperature, LCST).

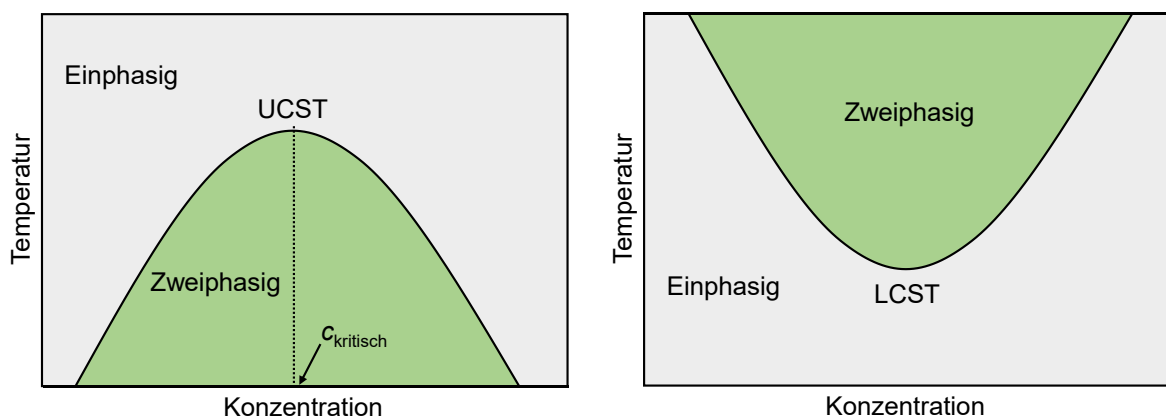


Abbildung 1.4: Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen. Intrinsisch ungeordnete Proteine entmischen oftmals mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST). Die dieser Temperatur entsprechende Proteinkonzentration wird als kritische Konzentration bezeichnet. Proteine mit einem hohen Anteil an hydrophoben Strukturen hingegen phasenseparieren mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST). Adaptiert aus Referenz.^[33]

1.1.2 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im zellorganisatorischen und zellfunktionalen Kontext

Eukaryotische Zellorganellen wie der Golgi-Apparat oder auch das Mitochondrium sind durch eine einfache oder doppelte Lipidmembran vom Zytosol abgegrenzt. In Zellen gibt es aber auch zahlreiche Organellen, die nicht von einer Membran umgeben sind und als membranlose Organellen (*engl.* membraneless organelle, MLO) oder biomolekulare Kondensate bezeichnet werden.^[25] Diese membranlosen Organellen stellen eine weitere Form der zellulären Kompartimentierung dar und es finden sich zunehmend Belege dahingehend, dass diese auf Grundlage der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung entstehen.^[1] Das Vorkommen dieser Organellen ist nicht auf einen Ort in der Zelle beschränkt. Man findet sie im Nukleus, im Zytoplasma und auch an Membranen.^[3] Beispiele für solche membranlosen Organellen sind der Nukleolus, Cajal-Körper und Paraspeckles im Nukleus, P-Granula, Balbiani-Körper und Stressgranula im Zytosol sowie synaptische Dichten und Membrancluster an Zellmembranen.^[25] Viele der *in vivo* entmischenden Proteine existieren womöglich in einer Konzentration, die ähnlich ihrer Sättigungskonzentration ist,^[31] und ihre Kondensate können entweder konstitutiv präsent sein oder nur unter bestimmten Bedingungen^[38], wie zum Beispiel bei Zellstress, ausgelöst durch Hitze.^[39]

Anders als *in vitro* untersuchte Entmischungssysteme bestehen zelluläre Kondensate nur selten aus ein oder zwei Komponenten. In der Regel enthalten biomolekulare Kondensate nämlich zahlreiche Proteine und können zudem auch Nukleinsäuren binden.^[25,40] Diese Komponentenvielfalt hat oftmals die Entstehung sogenannter Multiphasentröpfchen zur Folge. Bei diesen handelt es sich um Tröpfchen, in welchen mehrere hierarchisch angeordnete Phasen koexistieren.^[41] Es wird bei den verschiedenen Komponenten in biomolekularen Kondensaten zwischen Scaffold- und Client-Molekülen unterschieden.^[42] Als Scaffold-Molekül wird diejenige Komponente bezeichnet, die für die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung unentbehrlich ist und die entmischende Komponente darstellt.^[1,29] Bei dem Client-Molekül handelt es sich um diejenige Komponente, welche zwar in das Kondensat aufgenommen wird, nicht aber allein in den phasenseparierten Zustand übergehen kann.^[1,29] Der Begriff „Partitioning“ bezeichnet die Aufnahme von Client-Molekülen in die Kondensate und erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Prozess der Aufnahme auf selektiver Basis erfolgt.^[31] Im Falle des Proteins Ddx4 konnte beispielsweise festgestellt werden, dass Ddx4-Kondensate einzelsträngige DNA aufnehmen und doppelsträngige DNA ausschließen.^[43] Neben den bereits aufgeführten Regulationsfaktoren der Entmischung von Proteinen wie Temperatur, Druck, Konzentration etc. gibt es in der Zelle noch weitere Regulationsmechanismen, die an äußere Umgebungsbedingungen gekoppelt sein können.^[44]

Ein in Zellen sehr wichtiger Regulationsmechanismus der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung sind posttranslationale Modifikationen (PTMs) wie z. B. Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung. Diese Modifikationen verändern die Ladungszahl und damit auch die Ladungsverteilung entlang der Proteinsequenz, welche insbesondere für die Entmischung von intrinsisch ungeordneten Proteinen von Relevanz ist.^[31] Posttranslationale Modifikationen können die Entmischung von Proteinen sowohl begünstigen als auch verhindern. Eine maßgeblich regulatorische Funktion konnte außerdem bereits im Falle der Nukleinsäure RNA festgestellt werden, welche Kondensateigenschaften beeinflussen und die Phasengrenzlinien der Entmischung verschieben kann.^[38] Das Protein FIB-1 zum Beispiel kann auch ohne RNA in den entmischten Zustand übergehen. In Anwesenheit von RNA allerdings findet die Phasentrennung des Proteins auch bei erhöhten Salzkonzentrationen statt.^[45] Bezüglich des bereits erwähnten intrinsisch ungeordneten Proteins LAF-1 wurde beispielsweise auch nachgewiesen, dass RNA die Viskosität der LAF-Tröpfchen verringert.^[46]

Die Funktionen der biomolekularen Kondensate in Zellen sind vielfältig. Im Nukleus vorkommende Kondensate sind oft an Prozessen der Transkription, Genomorganisation, Genexpression und DNA-Reparatur beteiligt.^[3,26] Im Allgemeinen stellt die Art der membranlosen Kompartimentierung außerdem eine weitere Möglichkeit der zeitlichen und räumlichen Regulation von Prozessen und Reaktionen dar.^[44] Mithilfe biomolekularer Kondensate könnte zudem die Konzentration von Proteinen in Zellen reguliert werden. So ist es gut vorstellbar, dass membranlose Organellen überschüssiges Protein aufnehmen und erst dann wieder freisetzen, wenn die Konzentration des entsprechenden Proteins außerhalb des Kondensats zu gering ist.^[1] Membranlose Organellen könnten des Weiteren als Reaktionszentren dienen, indem sie Enzymreaktionen durch Anreicherung von Reaktionspartnern beschleunigen oder auch Reaktionen außerhalb des Kondensats durch Aufnahme eines essentiellen Reaktionspartners hemmen.^[1]

Allerdings sind bezüglich biomolekularer Kondensate in Zellen noch viele Fragen unbeantwortet: Wie zum Beispiel wird die Spezifität der Kondensate gewahrt oder aus welchem Grund kommt es nicht zur Fusion von verschiedenen Kondensaten oder zum Austausch von Molekülen zwischen diesen?^[30] Unverkennbar jedoch ist die Wichtigkeit von sowohl membrangebundenen als auch membranungebundenen Organellen in Zellen, die sich in ihren Funktionen komplementär ergänzen.^[25] Bei veränderten Umwelt- und Zellbedingungen beispielsweise werden im Nukleus Transkriptionsänderungen eingeleitet, welche längerfristig wirken, aber mehr Zeit beanspruchen als die spontane Entstehung von membranlosen Organellen, die eine schnellere Antwort auf sich ändernde Bedingungen bietet^[1] und zunehmend auch mit der zellulären Stressadaptation assoziiert wird.^[39]

1.1.3 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im pathologischen Kontext

Der Wissenschaftszweig, der sich mit der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in Zellen beschäftigt, stellt eine noch sehr junge Disziplin der Biowissenschaften dar und bietet die Chance, viele zelluläre Prozesse besser zu verstehen. Ebenso eröffnet er die Möglichkeit, „humane Krankheiten durch die Linse der Phasentrennung zu untersuchen“ und auf diese Weise noch unerkannte, für die Krankheitsentwicklung verantwortliche Mechanismen zu finden.^[29] Erste Zusammenhänge zwischen neurodegenerativen Erkrankungen, Krebs sowie einigen infektiösen Krankheiten, wie beispielsweise der SARS-CoV-Infektion,^[3] und der aberranten Bildung von biomolekularen Kondensaten konnten bereits gefunden werden.^[29] Neurodegenerative Erkrankungen werden zunehmend vor allem mit veränderten Materialeigenschaften der Tröpfchen in Verbindung gebracht.^[47] Von großer Bedeutung ist hier insbesondere der Flüssig-Fest-Übergang, also die Verfestigung der Kondensate. Grundsätzlich wird die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung als reversibler Prozess beschrieben, da sich die durch Phasentrennung geformten Kondensate in der Regel wieder auflösen können.^[1] In einigen Fällen allerdings nehmen diese Kondensate zunächst gelähnliche und dann feste Strukturen an.^[48] Veränderte Materialeigenschaften von biomolekularen Kondensaten sind jedoch nicht *per se* schlecht. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist der Kernporenkomplex, welcher in der Kernmembran lokalisiert ist. Dieser Komplex stellt eine semipermeable Barriere dar und wird durch Nukleoporine (NUPs) geformt, die Phenylalanin(F)-Glycin(G)-Wiederholungen enthalten und folglich FG-NUPs abgekürzt werden. *In vitro* adaptieren diese FG-NUPs nach der Entmischung einen gelähnlichen Zustand, der durch multivalente Interaktionen zwischen den FG-Motiven in den intrinsisch ungeordneten Bereichen der NUPs vermittelt wird.^[38] Der gelähnliche Zustand erlaubt es den NUPs als molekularer Filter zu fungieren, welcher für Moleküle größer 30 kDa nicht durchlässig ist und daher eine Permeabilität ähnlich zu dem Kernporenkomplex in Zellen besitzt, für welchen ein vergleichbarer Mechanismus vermutet wird.^[38]

Häufig ist die Ausbildung dieser veränderten Materialeigenschaften aber mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. In diesem Zusammenhang wird der Flüssig-Fest-Übergang oft auch als Prozess des „molekularen Alterns“ bezeichnet,^[29] bei dem die Tröpfchen ihre flüssigkeitsähnlichen Eigenschaften verlieren, darunter auch ihre sphärische Form und ihre innere Dynamik, und zuletzt sogar Aggregate oder fibrilläre Strukturen ausbilden können.^[49] Das Hauptmerkmal von neurodegenerativen Erkrankungen stellt nämlich die Bildung eben solcher Aggregate dar, welche als ursächlich für die Pathologie dieser Krankheiten betrachtet werden.^[50]

Eine Vielzahl von Proteinen, die im Zusammenhang zu neurodegenerativen Erkrankungen stehen, sind zur Flüssig-Flüssig-Phasentrennung fähig.^[47] So sind die folgenden Krankheiten primär mit diesen entmischungsfähigen Proteinen assoziiert: Frontotemporale Demenz (FTD) mit dem Protein FUS, amyotrophe Lateralsklerose (ALS) mit TDP-43, die Alzheimer-Krankheit mit Tau und die Parkinson-Krankheit mit α -Synuclein.^[47] Angesichts dieser Tatsache wird die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung oft auch als Treiber der Aggregation diskutiert. Der Grund dafür liegt in der hohen lokalen Proteinkonzentration in den Tröpfchen, welche die Proteinaggregation befördern könnte.^[47] Der entmischte Zustand stellt, dieser Vermutung folgend, die Zwischenstufe zwischen der monomeren und der aggregierten Proteinform dar. Oftmals lösen aber auch Mutationen den Flüssig-Fest-Übergang von entmischten Proteinkondensaten aus.^[29] Für FUS, TDP-43, Tau und α -Synuclein konnte bereits gezeigt werden, dass die Entmischung dieser Proteine zu veränderten Materialeigenschaften führt und krankheitsrelevante Mutationen diesen Prozess beschleunigen.^[49,51–53] Auch bezüglich Krebserkrankungen verdichteten sich in jüngster Zeit die Hinweise darauf, dass Proteinaggregationen für den Pathomechanismus der Krankheit relevant sein könnten, so z. B. für mutante Formen des Tumorsuppressorproteins p53: dieses weist bei mehr als 50 Prozent aller Krebstumore eine Mutation auf und bildet in der Folge Aggregate, die die Ausübung seiner Funktion beeinträchtigen.^[54] Im Falle der DNA-bindenden Domäne des Proteins, in der die meisten Mutationen lokalisiert sind, wurde *in vivo* und *in vitro* eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der p53-Domäne mit anschließender Verfestigung der Kondensate beobachtet.^[54] Darüber hinaus können Mutationen in Krebszellen sowohl die Chromatinstruktur als auch zelluläre Prozesse wie Transkription, proliferatives Signaling etc. beeinflussen, die über biomolekulare Kondensate geregelt werden.^[48] Neben veränderten Materialeigenschaften können sich durch Mutationen auch noch andere Konsequenzen für die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von zellulären Proteinen ergeben. So können Mutationen zum Beispiel ebenso die Sättigungskonzentration, die Lokalisation des Proteins (z. B. Zytoplasma statt Nukleoplasma) sowie Client-Scaffold-Interaktionen beeinflussen.^[29] Die aberrante Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen kann jedoch ebenfalls mit veränderten Regulatoraktivitäten zusammenhängen.^[29] So konnte gezeigt werden, dass eine phosphorylierte Form des Proteins Tau, welche eine krankheitsrelevante Variante darstellt, die Entmischung des Proteins begünstigt und zur sequentiellen Ausbildung von oligomeren und toxischen Tau-Formen führt.^[55] Zuletzt sei angemerkt, dass die aberrante Entmischung von zellulären Proteinen allerdings immer auch durch veränderte Umwelt- und Zellbedingungen induziert werden kann.^[29]

1.1.4 Bedeutung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung im Kontext einer präbiotischen Welt

Bei der Suche nach Protozellen, also Vorläufern der uns heute bekannten Zellen, kommen lipidumhüllte Strukturen als potentielle Kandidaten eher nicht infrage, da Lipidmembranen chemisch komplexe Gebilde darstellen, welche außerdem für die meisten Moleküle impermeabel sind.^[56] Eine interessante Hypothese hierzu stellte A. I. Oparin auf, denn er vermutete, dass Leben in Koazervaten entstanden sei, die sich durch Entmischung in der „Ur-suppe“ formiert haben sollen.^[8] In diesen Koazervaten könnten die molekularen Bausteine des Lebens, welche ansonsten zu verdünnt vorlägen, angereichert und für Reaktionen und Komplexierungen zusammengebracht worden sein.^[14] Darüber hinaus entstehen Koazervate spontan und stellen dynamische Kompartimente dar, die einen Austausch mit der Umgebung ermöglichen.^[14] Aufgrund all dieser Eigenschaften, die Koazervaten zuteilwerden, haben sie das Interesse der präbiotischen Forschung geweckt,^[14] welche den Ursprung des Lebens zu ergründen sucht. Eine in diesem Zusammenhang spannende Studie von Abbas et al.^[57] erfolgte durch die Entwicklung eines Dipeptids, dessen Koazervation über eine Disulfidbrücke mittels Redoxchemie kontrolliert werden konnte. Die Gruppe konnte zum einen zeigen, dass in den Koazervaten des Dipeptids verschiedene Moleküle (ssDNA, RNA-Porphyrine, organische Farbstoffe) angereichert werden konnten, und zum anderen, dass kleine RNA-Hairpins durch die Aufnahme in die Koazervate dehybridisiert wurden. Darüber hinaus fanden in diesen Koazervaten zwei wichtige Additionsreaktionen (Aldolreaktion und Hydrazonbildung) statt, welche in den Koazervaten verglichen zu wässriger Lösung 44- bzw. 13-mal höhere Reaktionsraten aufwiesen.

Viele Koazervatuntersuchungen der präbiotischen Chemie widmen sich außerdem der Nukleinsäure RNA, da diese als Träger von genetischen Informationen und aufgrund ihrer katalytischen Aktivität die Grundlagen für die Entstehung von Leben geschaffen haben könnte.^[30] Diese These wird durch aktuelle Studien bestätigt, die die wesentliche Rolle von RNA als Komponente in biomolekularen Kondensaten der Zelle belegen.^[58] Die Aktivität von Hammerhead-Ribozym, ein katalytisch aktives RNA-Molekül, wurde von Drobot et al.^[58] in Polysaccharid/Polypeptid-Koazervaten untersucht. Über ein FRET-Substrat des Ribozyms konnte die Gruppe die Substratspaltung in den Koazervaten nachvollziehen. Aus ihren Ergebnissen ging hervor, dass die Ribozymaktivität in den Koazervaten erhalten bleibt und außerdem höher als in der verdünnten Phase ist. Dies kann wahrscheinlich auf erhöhte Ribozym- und Substratkonzentrationen in den Koazervaten zurückgeführt werden. Des Weiteren konnte die Gruppe feststellen, dass die Länge, Sequenz und Struktur von Ribonukleinsäuren deren Aufnahme in die Koazervate bestimmt.

1.2 Leben unter Extrembedingungen

Die Bausteine des Lebens müssen sich in solchen Koazervaten unter harschen Bedingungen und in kurzer Zeit im geologischen Zeitalter des Hadaikums entwickelt haben, welches 4,6-4,5 Gigajahre (Ga) zurückliegt.^[59] Denn bereits der sich dem Hadaikum anschließende geologische Äon des Archaikums ((4,0±0,2) Ga) markiert den Anfang des Lebens auf der Erde.^[59]

Auch gegenwärtig findet Leben noch immer unter extremen Bedingungen statt. Diese Extrembedingungen beinhalten beispielsweise Habitate 6,7 km unter der Erdkruste, in 10 km Meerestiefe des Marianengrabens, in polaren Regionen, Salzseen, hydrothermalen Spalten und Wüstenregionen.^[60,61] Organismen, die unter solch extremen Bedingungen leben und gedeihen, werden unter dem Begriff „Extremophile“ zusammengefasst.^[62] Im Unterschied zu extremotoleranten Organismen, die eine oder mehrere Extrembedingungen zwar tolerieren, allerdings unter ansonsten „normalen“ Bedingungen wachsen, benötigen Extremophile diese Bedingungen sogar für ihr Wachstum.^[60,63] Den Großteil der Extremophile stellen Mikroorganismen (Archaeen und Bakterien) dar, es finden sich aber auch eukaryotische und multizelluläre Organismen unter diesen.^[60] Entsprechend der jeweiligen Extrembedingung, der die Organismen in ihrem Habitat ausgesetzt sind, werden diese Extremophile unterteilt in Thermophile (wärmeliebend), Psychrophile (kälteliebend), Acidophile (säureliebend), Alkaliphile (laugenliebend), Barophile/Piezophile (druckliebend) etc.^[64] Die meisten Extremophile sind in der Regel jedoch Polyextremophile^[60], wie beispielsweise einige Unterwasserorganismen, die in den großen Meerestiefen sowohl hohen Drücken als auch tiefen Temperaturen ausgesetzt sind.^[64] Rekordhalter unter den thermophilen Organismen ist der *Methanopyrus kandleri* Stamm 116, welcher bei bis zu 122 °C noch wächst,^[60] und unter den Barophilen der Mikroorganismus *Thermococcus piezophilus*, welcher Drücke bis zu 125 MPa aushält.^[61]

Extremophile stellen ausgehend von einem sowohl evolutionären als auch astrobiologischen Standpunkt äußerst interessante Organismen dar, weil ihre Untersuchung zur Beantwortung der Fragen nach der Entstehung von Leben auf der Erde sowie nach der Existenz von Leben anderswo im Universum beitragen kann.^[60]

Wie aber haben es Extremophile geschafft, mit derartigen Bedingungen zurecht zu kommen? Eine Anpassungsstrategie entspricht intrinsischen Adaptionen, welche die Molekularstruktur von Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden betreffen.^[65] Die zweite Strategie besteht in der Akkumulation sogenannter Osmolyte, deren Vorkommen, Funktion und vermutete Wirkungsweise im nächsten Unterkapitel erläutert werden.

1.3 Osmolyte

Viele Proteine adaptieren einen gefalteten Zustand, um ihre Funktion in Zellen ausführen zu können.^[66] Diese native Faltung reagiert empfindlich auf Änderungen der Umwelt und kann durch solche sogar aufgehoben werden,^[67] welches kennzeichnend für den Prozess der Denaturierung ist. Osmolyte sind kleine organische Moleküle, die bei Zellstress (Kälte, Hitze, Druck, veränderte osmotische Bedingungen etc.) in Zellen akkumuliert werden und so Enzyme und andere Makromoleküle vor der Denaturierung infolge solcher Stressbedingungen bewahren.^[68,69] Die zumeist ungeladenen oder zwitterionischen Moleküle werden in die Klassen der Carbohydrate, Polyole, Aminosäuren und Methylamine unterteilt.^[70] Abbildung 1.5 zeigt jeweils einen Vertreter der eben genannten Klassen.

Osmolyte beeinflussen das Faltungsgleichgewicht von Proteinen, ohne dass es dabei zum Bruch bestehender oder zur Bildung neuer kovalenter Bindungen kommt.^[71] Indem sie die freie Energie des ungefalteten Zustands erhöhen, verschieben Osmolyte das Faltungsgleichgewicht eines Proteins zu der gefalteten Proteinform.^[71] Aus diesem Grund werden sie als proteinstabilisierende Kosolute oder auch als chemische Chaperone bezeichnet.^[71,72] Neben der Stabilisierung des gefalteten Zustands von Proteinen verfügen Osmolyte über eine weitere, sehr nützliche Eigenschaft, die mit dem Begriff „Kompatibilität“ benannt wird. Osmolyte stören nämlich, wenn auch in sehr hohen Konzentrationen vorliegend, nicht die Funktion von Proteinen, anders als beispielsweise Ionen.^[73] Gegensätzlich zu proteinstabilisierenden Kosolutes verhalten sich sogenannte Denaturantien, proteindestabilisierende Substanzen, welche das Faltungsgleichgewicht zu der entfalteten Proteinform verschieben.^[71] Beispiele für proteindestabilisierende Moleküle sind Harnstoff und Harnstoffderivate wie Guanidin-Chlorid.^[67]

In marinen Organismen beispielsweise wird der Osmolyt Trimethylamin-*N*-Oxid (TMAO) akkumuliert, welcher die Zellen vor hohen Drücken schützt und bei zunehmender Meerestiefe in ansteigender Konzentration vorliegt.^[74] Auch in Säugetierorganen, wie zum Beispiel den Nieren, die hohen Salz- und Harnstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, kommen diverse Osmolyte angehäuft vor.^[74]

Der Mechanismus, auf dem die stabilisierende bzw. destabilisierende Funktion von Kosolutes basiert, ist in der Theorie derzeit noch nicht eindeutig geklärt.^[67] Die meisten Theorien betreffen allerdings den Mechanismus des Osmolyten TMAO und des Denaturans Harnstoff.^[70] Innerhalb dieser vorgeschlagenen theoretischen Ansätze unterscheidet man zwischen „direkten“ und „indirekten“ Mechanismen, basierend auf der Interaktion des Kosolutes mit dem Protein (direkt) oder auf der kosolutinduzierten Veränderung des proteinumgebenden Wassernetzwerks (indirekt).^[68,70]

Bezüglich TMAO wird ein indirekter Mechanismus vermutet, bei dem TMAO aufgrund ungünstiger Wechselwirkungen von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen wird (osmophobes Modell) und auf diese Weise die präferentielle Hydratation des Proteins durch Wassermoleküle bewirkt, welche mit einer Bevorzugung des kompakteren gefalteten Zustands einhergeht.^[66,68] Für Harnstoff hingegen wird ein direkter Mechanismus angenommen, da das Molekül günstige Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat bildet und so die Entfaltung des Proteins verursacht.^[67,75] Die Wirkung von Harnstoff kann allerdings durch TMAO wieder aufgehoben werden. Diese additive Wirkung ist oftmals bei einem Konzentrationsverhältnis Harnstoff:TMAO von 2:1 beobachtbar.^[74]

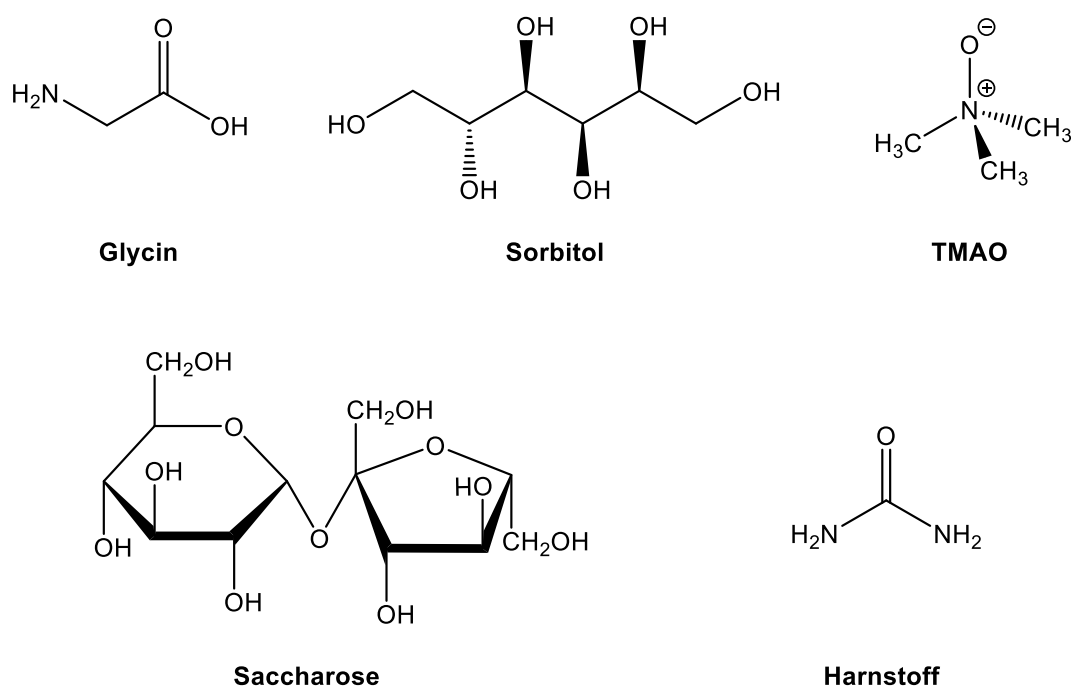


Abbildung 1.5: Struktur ausgewählter Osmolyte und des Denaturans Harnstoff. Die Moleküle Glycin, Sorbitol, TMAO und Saccharose stellen proteinstabilisierende Osmolyte dar. Stellvertretend für die Klasse der Aminosäuren ist Glycin, für die Klasse der Polyole Sorbitol, für die Klasse der Methylamine TMAO und für die Klasse der Carbohydrate Saccharose gezeigt. Harnstoff ist das Beispiel für eine proteindenaturierende Substanz.

1.4 Makromolekulares Crowding

Zellen enthalten eine Vielzahl von biologischen Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide etc.),^[76] die zusammen eine Konzentration von bis zu 400 g/L ergeben und dabei ein nicht unerhebliches Gesamtvolumen von 20 bis 30 % einnehmen.^[77,78] Die Beschreibung dieses dicht gepackten Zustandes erfolgt durch den englischen Begriff „crowded“, der dem Gebrauch des Begriffs „konzentriert“ vorgezogen wird, da die Konzentration der einzelnen Makromoleküle selbst niedrig ist.^[77] Aufgrund der gegenseitigen Undurchdringbarkeit von Molekülen erzeugt die gecrowdete Umgebung ein Ausschlussvolumen, welches verhindert, dass eine bestimmte Stelle in der Zelle gleichzeitig von zwei Makromolekülen besetzt werden kann.^[76] Das Ausschlussvolumen ergibt sich aus der Summe der Radien zweier Makromoleküle, welche, vom Mittelpunkt dieser betrachtet, dem kleinsten einnehmbaren Abstand zwischen zwei Molekülen entspricht.^[76] Da das ausgeschlossene Volumen mit der Größe eines Moleküls wächst, werden in einer gecrowdeten Umgebung kleine kompakte Makromoleküle, wie beispielsweise gefaltete Proteine, gegenüber großen nicht-kompakten Makromolekülen, wie sie etwa ungefaltete Proteine darstellen, bevorzugt.^[79] Dies ist der Effekt des Ausschlussvolumens (*engl.* excluded volume effect), welcher u. a. vermag, Proteine zu stabilisieren, Proteinaggregation zu beschleunigen und Enzymkatalyseraten zu erhöhen.^[80]

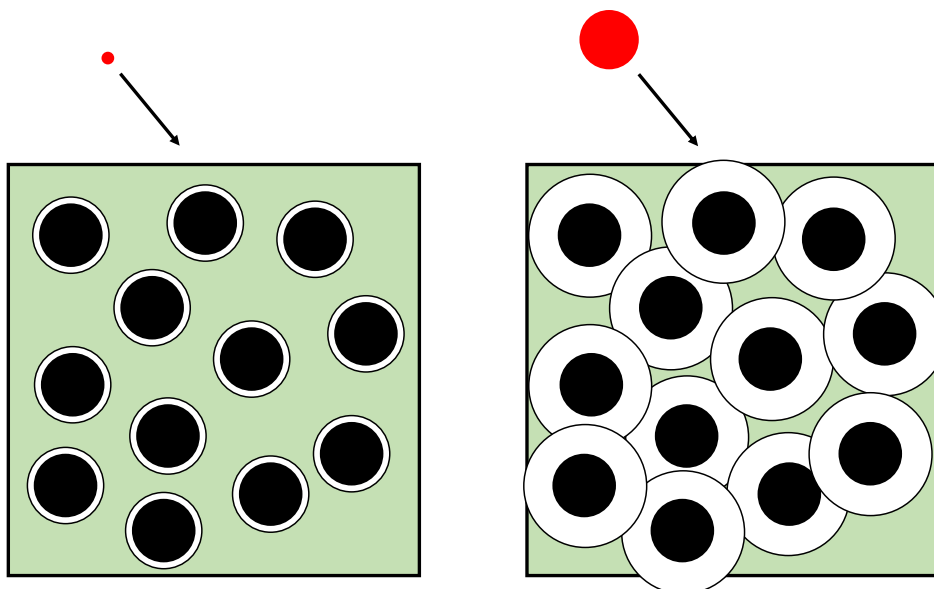


Abbildung 1.6: Schematische 2D-Darstellung des Ausschlussvolumens. Ein hinzuzufügendes Molekül (rot) kann nicht mit Crowder-Molekülen (schwarz) überlappen, weshalb eine Annäherung der Molekülmittelpunkte nur bis zu einem Abstand von $(r_{\text{Crowder}} + r_{\text{Biomolekül}})$ erfolgen kann. Mit der Größe des hinzuzufügenden Moleküls vergrößert sich auch das Ausschlussvolumen (weißer Bereich um die Crowder-Moleküle). Adaptiert aus Referenz.^[77]

Die Einnahme eines kompakteren Zustands ist entropisch begünstigt, da dies gleichbedeutend mit einem Zugewinn an Entropie des Gesamtsystems ist.^[70] Neben dieser sterischen Abstoßung sind noch weitere Wechselwirkungsarten in einer gecrowdeten Umgebung möglich, wie zum Beispiel sogenannte „weiche“ Interaktionen, die den Ausschlussvolumeneffekt sowohl unterstützen als auch hemmen können.^[79] Bei diesen Interaktionen handelt es sich um elektrostatische oder van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Interaktionen.^[79]

Allerdings finden Messungen *in vitro* unter Bedingungen statt, welche die Crowding-Verhältnisse in Zellen nicht widerspiegeln, weil die Proben nur das zu untersuchende Protein enthalten, dessen Konzentration überdies oftmals nicht einmal 10 g/L übersteigt.^[76,77] Um solche gecrowdeten Zustände *in vitro* imitieren zu können, werden üblicherweise synthetische Crowder wie Dextran, Ficoll und PEG (Abb. 1.7) oder Proteine wie Albumin, Lysozym und Hämoglobin verwendet.^[70]

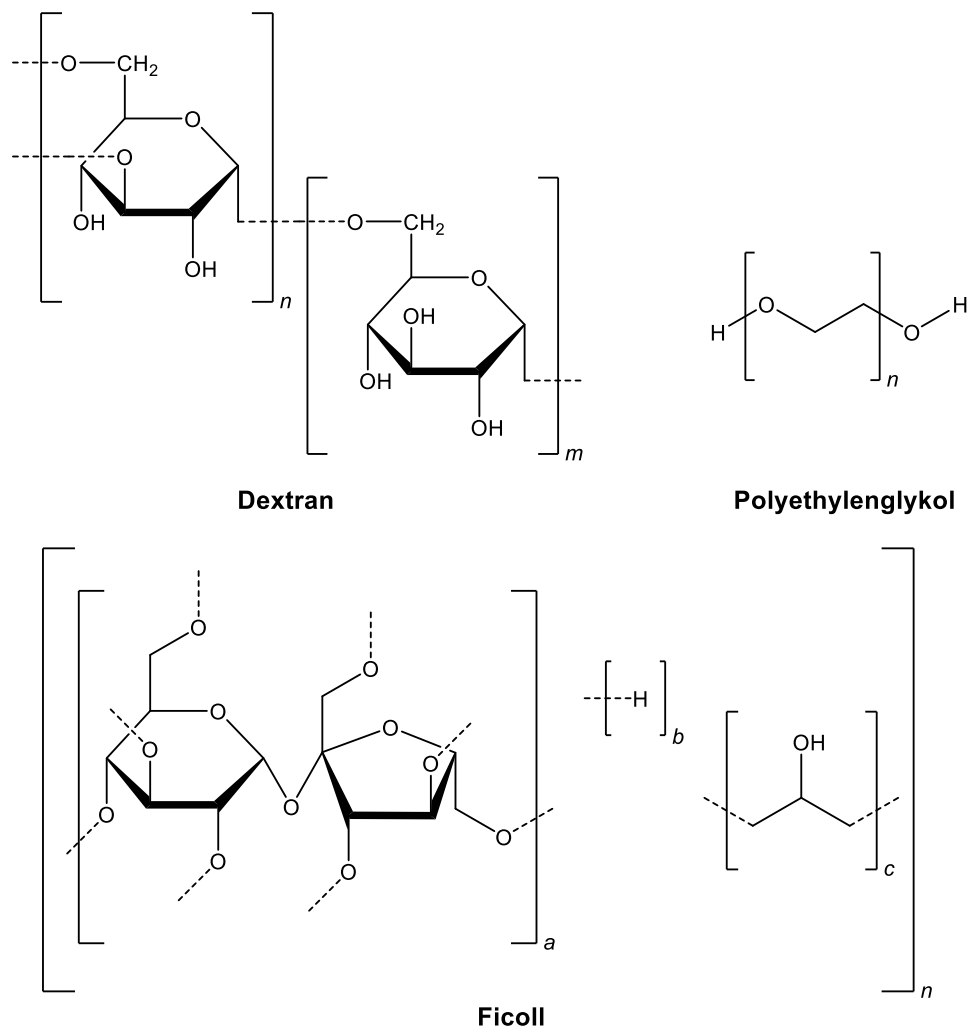


Abbildung 1.7: Struktur der synthetischen Crowder Dextran, Ficoll und PEG.

1.5 Zielsetzung

Die besondere Rolle von biomolekularen Kondensaten bei zellulären Prozessen sowie bei der zellulären Organisation ist offenkundig und die Annahme, dass diese Kondensate auf der Grundlage der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung entstehen, zunehmend akzeptiert. Neben dem großen Allgemeininteresse der Forschung an der membranlosen Art der Kompartimentierung sind auch die Verknüpfungen von Belang, die zwischen diesem Phänomen und anderen Forschungsbereichen hergestellt werden können, wie in der Einleitung bereits für die Bereiche der Krankheitsentwicklung und der präbiotischen Forschung veranschaulicht. Mit Blick auf die zukünftige Entwicklung der Kondensatforschung bleibt es also spannend zu beobachten, welche weiteren Anstöße diese geben wird.

Die vorliegende Arbeit widmet sich dem Phänomen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung unter dem Aspekt von extremen Lebensbedingungen. Die Bildung von Proteinkondensaten in Zellen, die die Grundeinheit aller lebenden Organismen darstellen, attribuiert membranlosen Organellen ein ubiquitäres Vorkommen. Es kann also geschlussfolgert werden, dass auch in Organismen, welche extremen Lebensbedingungen ausgesetzt sind, viele zelluläre Prozesse auf biomolekularen Kondensaten beruhen. Berücksichtigt man zudem die der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beigemessene Rolle bei der Entstehung des Lebens auf der Erde und anderswo im Universum, ergibt sich ein weiterer Anreiz für die Untersuchung von Proteinkondensaten unter Extrembedingungen.

Vor diesem Hintergrund untersucht diese Arbeit die In-vitro-Entmischung von mehreren strukturell und kompositionell verschiedenen Proteinen in Abhängigkeit von extremen Bedingungen, die von erhöhten Temperaturen und Drücken bis hin zu extremen Salinitäten sowie Kombinationen derselben reichen. Welche Abhängigkeiten lassen sich hierbei feststellen und welchen Effekt haben Osmolyte in diesem Zusammenhang, für welche die proteinstabilisierende Funktion gegenüber extremen Bedingungen bereits bekannt ist? Ferner wird untersucht, wie sich eine zellähnliche Umgebung, simuliert durch den Einsatz von synthetischen Crowdern, auf die Entmischung von Proteinen bei hohen Drücken und hohen Temperaturen auswirkt. Auch wird im Rahmen dieser Arbeit festzustellen versucht, wie hoher hydrostatischer Druck zur Untersuchung des oftmals pathologischen Flüssig-Fest-Übergangs von Proteinkondensaten eingesetzt werden kann.

Über dielektrische Messungen sollte letztlich ermittelt werden, welche dielektrische Umgebung innerhalb von Tröpfchen vorliegt und wie sich diese auf die Polarität und Permittivität auswirkt.

KAPITEL 2

Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig- Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

Teile dieses Kapitels wurden bereits in Journalartikeln publiziert:

- Abbildungen 2.3, 2.6 wurden mit Genehmigung von John Wiley & Sons, Inc. Copyright ©2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim aus [H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. Winter. Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 13049–13069] wiederverwendet.
- Abbildung 2.15 wurde mit Genehmigung aus [J-M. Knop, S. Mukherjee, M. Jaworek, S. Kriegler, M. Manisegaran, Z. Fetahaj, L. Ostermeier, R. Oliva, S. Gault, C. Cockell, R. Winter. Life in Multi-Extreme Environments: Brines, Osmotic and Hydrostatic Pressure – A Physicochemical View. *Chemical Reviews* **2022**] wiederverwendet. Copyright ©2022 American Chemical Society. Abbildung 2.11 entspricht einer auf die Pufferdaten reduzierten Darstellung der veröffentlichten Abbildung 2.15.

2.1 Einleitung

Intrinsisch ungeordnete Proteine stellen eine besondere Klasse der phasenseparierenden Proteine dar und ihre Kennzeichen sind bereits eingehend in der Einleitung (1.1.1) beschrieben worden. Zwei bekannte Vertreter dieser Klasse sind die ebenfalls schon erwähnten Proteine Ddx4 und FUS, welche Gegenstand der in diesem Kapitel gezeigten Untersuchungen sind und im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

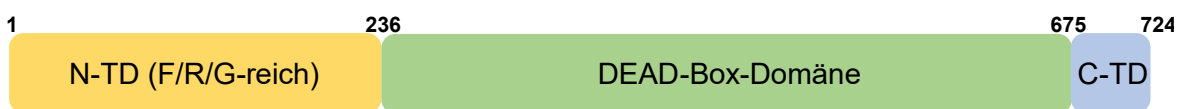
Ddx4 ist ein ca. 79,3 kDa schweres Protein, das als Helikase RNA-Duplexe unter ATP-Verbrauch entwindet.^[43] Das Protein verfügt über zwei intrinsisch ungeordnete Regionen, die der N- und C-terminalen Domäne des Proteins entsprechen, und eine gefaltete Domäne zwischen diesen, welche für die Helikaseaktivität verantwortlich ist (Abb. 2.1).^[43] Die gefaltete Region enthält ein Aminosäuremotiv (D-E-A-D) bestehend aus den Aminosäuren Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E) und Alanin (A) und wird deshalb auch als DEAD-Box-Domäne bezeichnet. In Spermatozyten und Spermatisden stellt das Protein die Hauptkomponente von Keimgranula dar, bei welchen es sich um biomolekulare Kondensate handelt, die an RNA-Interferenzprozessen beteiligt sind.^[36,43] Darüber hinaus findet die Entmischung des Proteins auch *in vitro* statt.^[43] Für die In-vitro-Entmischung genügt bereits die N-terminale Domäne des Proteins.^[43] Dabei ist NMR-spektroskopisch erwiesen worden, dass die N-terminale Domäne ihre ungeordnete Struktur auch in den Tröpfchen beibehält.^[36] Für die Entmischung von intrinsisch ungeordneten Proteinen spielen im Allgemeinen elektrostatische, polare und aromateninvolvierende Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Für Ddx4 im Speziellen sind es insbesondere Wechselwirkungen zwischen Ladungen und Kation- π -Wechselwirkungen. Letztere entstehen vor allem zwischen FG-, GF-, RG-, und GR-Motiven in positiv geladenen Ladungsblöcken.^[43] Die Phasentrennung des Proteins reagiert folglich empfindlich auf Änderungen der Salzkonzentration.^[43] Diese Salzabhängigkeit wird noch erheblich gesteigert, wenn die natürliche Reihenfolge der Ladungen im Protein verändert wird, wie Messungen mit einer ladungsvertauschten Variante der N-terminalen Domäne zeigen konnten.^[36] Eine in Zellen wichtige Form der posttranslationalen Regulation der Ddx4-Entmischung stellt die Methylierung dar, welche die Entstehung von Kondensaten beeinträchtigt.^[43]

Das Protein FUS (fused in sarcoma) ist ein ca. 52 kDa schweres Protein, das RNA bindet (*engl.* RNA-binding protein, RBP) und an Prozessen beteiligt ist, die die Transkription, das Spleißen und den Transport von RNA betreffen.^[81] Intrazellulär kommt FUS vor allem im Nukleus vor und verfügt zur Lokalisation in diesem über eine Kernlokalisierungssequenz (*engl.* nuclear localization sequence, NLS) (Abb. 2.1).^[51] Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS, welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stattfindet, wird zum einen über

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosolutes auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

mehrere RGG-Domänen vermittelt und zum anderen über eine N-terminale Domäne niedriger Komplexität (*engl.* low complexity domain, LC domain), die reich an Serin, Tyrosin, Glycin und Glutamin ist.^[81] Die LC-Domäne ist essentiell und auch ausreichend für die Entmischung des Proteins.^[51,81] Als eine Form der Entmischungsregulation hat sich die Methylierung des Proteins herausgestellt, welche eine Phasentrennung hemmt.^[50,82] In Zellen existiert allerdings noch eine weitere Regulation über die Bindung an den nuklearen Importrezeptor Transportin-1 (TNPO1), der auch unter dem Namen Karyopherin- β 2 (Kap β 2) bekannt ist.^[83] Dieser Rezeptor ermöglicht die Translokation des Proteins entlang der Kernmembran und bindet in einer entmischungshemmenden Art und Weise an das Protein.^[50,82,83] FUS wird mit mehreren Formen von ALS und FTD assoziiert.^[83] Krankheitsrelevante Mutationen, darunter auch Mutationen in der Kernlokalisierungssequenz, sowie die ausbleibende Methylierung des Proteins (Hypomethylierung) begünstigen die Entmischung des Proteins, welche in diesen Fällen von einem Flüssig-Fest-Übergang gefolgt wird.^[50,51,82]

Ddx4:



FUS:



Abbildung 2.1: Domänenaufbau der Proteine Ddx4 und FUS. Schematische Abbildung der Domänenstruktur von Ddx4 und FUS. Abkürzungen: N-TD (N-terminale Domäne), C-TD (C-terminale Domäne), RRM (RNA recognition motif), ZnF (Zinc finger), NLS (Nuclear localization sequence). Bei allen anderen Abkürzungen handelt es sich um den Einbuchstabencode von Aminosäuren. Ddx4-Domänenstruktur entsprechend Referenzen ^[34,43] und FUS-Domänenstruktur gemäß Referenz^[84].

In diesem Kapitel wird die Untersuchung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der beiden intrinsisch ungeordneten Proteine Ddx4 und FUS vorgestellt. Über mikroskopische und lichtstreuende Methoden wurde bei einer fixen Proteinkonzentration die Abhängigkeit der Entmischung beider Proteine bezogen auf zwei Parameter, Temperatur und Druck, erforscht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Entmischung der Proteine empfindlich auf Änderungen der Temperatur und des Drucks reagiert. Ebenso ging aus der Untersuchung hervor, dass diese Empfindlichkeit durch den Einsatz von Kosolutes wie Osmolyte und Crowder erheblich modifiziert werden kann.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Probenpräparation von Ddx4

Das untersuchte Ddx4-Konstrukt war ein Geschenk des Labors Forman-Kay und wurde von Hong Lin erstellt. Die vollständige Primärstruktur des verwendeten Konstrukts ist im Anhang (A.1.4) aufgeführt. Vor dem Versand wurde das Protein gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Um die Entmischung des Konstrukts parameterabhängig zu untersuchen, wurde das lyophilisierte Protein in einer Konzentration von 5 mg/mL in Puffer (20 mM NaPi (pH 7,4), 100 mM NaCl) gelöst. Zur Untersuchung des Osmolyteffekts wurde dem Puffer TMAO der Firma Sigma-Aldrich zugesetzt.

2.2.2 Expression und Aufreinigung von MBP-FUS

Das Plasmid MBP-FUS_FL_WT war ein Geschenk von Nicolas Fawzi (Addgene Plasmid #98651; <http://n2t.net/addgene:98651>; RRID: Addgene_98651).^[85] Die vollständige Proteinsequenz des Konstrukts ist im Anhang (A.1.2) aufgeführt. Zur Expression des Proteins wurde das Plasmid in *E.coli*-Zellen BL21 (DE3) transformiert. Die Bakterienkultur wurde in LB-Medium, das Kanamycin und Chloramphenicol enthielt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 herangezüchtet. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und das Protein über Nacht bei 18 °C exprimiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Puffer (20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), 500 mM NaCl, 5 mM TCEP, 10 mM Imidazol, DNase und Proteasehemmer) aufgenommen. Nach der Zelllyse mittels Ultraschallbehandlung wurde die Zelldebris durch 30-minütige Zentrifugation bei 25000 rpm und 10 °C pelletiert. Der filtrierte Überstand wurde auf eine Ni-Säule gegeben, die mit Waschpuffer (20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), 500 mM NaCl, 5 mM TCEP und 10 mM Imidazol) gewaschen wurde. Zur Elution des Proteins wurde die Säule mit einem Hoch-Imidazol-Puffer (20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), 500 mM NaCl, 5 mM TCEP und 500 mM Imidazol) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mithilfe von Amicon-Filtern einkonzentriert und in Puffer mit der Zusammensetzung 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), 500 mM NaCl, 5 mM TCEP umgepuffert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde ein Extinktionskoeffizient von 139470 1/M·cm genutzt. Das aliquotierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Expression und Aufreinigung des Proteins MBP-FUS erfolgten durch Simone Möbitz (Physikalische Chemie I, TU Dortmund).

2.2.3 Probenpräparation von MBP-FUS

Gefrorene MBP-FUS-Aliquots wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und eine entsprechende Menge des Proteins wurde mit TEV-Protease (New England Biolabs) und Tröpfchenpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 142,2 mM NaCl, 5 mM TCEP) gemischt, sodass sich eine MBP-FUS-Konzentration von 3 μ M und eine NaCl-Konzentration von 150 mM ergab. Die Mischung wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert. Für Crowding-Experimente enthielt der Tröpfchenpuffer zusätzlich Ficoll™ PM70 (GE Healthcare).

2.2.4 (Temperaturabhängige) Turbiditätsmessungen

Jede Turbiditätsmessung, bei der es nicht zur Anwendung von hydrostatischem Druck kam, wurde am UV/Vis-Spektrometer UV-1800 von Shimadzu durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm mit einer spektralen Auflösung von 1 nm. Bei der Auswertung der Daten wurden nur die Absorbanzwerte bei $\lambda = 400$ nm betrachtet. Für Messungen mit dem Protein Ddx4 wurde eine Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke verwendet, für Messungen mit MBP-FUS eine Küvette mit 0,3 cm Schichtdicke. Nach der Befüllung wurde die Küvette in eine Halterung im Inneren des Geräts platziert, welche mit einem externen Wasserbad verbunden war. Über dieses Wasserbad wurde die Temperatur der Probe reguliert. Mit einem in der Probenlösung eintauchenden Fühler wurde die Temperatur direkt in der Lösung gemessen und an einem digitalen Temperaturmessgerät ausgegeben.

2.2.5 Druckabhängige Turbiditätsmessungen

Druckabhängige Turbiditätsmessungen erfolgten am UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 (Perkin-Elmer) bei einer Wellenlänge von 400 nm mit einer selbst gebauten Hochdruckzelle, welche mit Saphirfenstern (Durchmesser 20 mm, Dicke 10 mm) ausgestattet war. Der Druck wurde hydrostatisch mithilfe einer Hochdruck-Handpumpe (Nova Swiss) erzeugt und an einer digitalen Anzeige abgelesen. Durch einen Tropfen Immersionsöl wurde die Probenlösung vom Druckmedium der Druckpumpe getrennt. Die Temperatur der Zelle wurde über ein externes Wasserbad gesteuert. Um Wasserkondensation bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden, wurde der Probenraum mit Stickstoff gespült. Der maximal applizierte Druck betrug 2000 bar. Die Druckänderung erfolgte in definierten Abständen und immer erst, nachdem die Absorbanz konstant wurde.

2.2.6 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Experimente wurden an einem Eclipse TE2000-U Mikroskop (Nikon Inc.) mit einem Nikon Plan Fluor 20x-Objektiv (NA 0,45; WD 7,4) oder einem Nikon 10x-Objektiv (NA 0,25; WD 7,0) durchgeführt. Bei allen Mikroskopieaufnahmen diente eine selbst gebaute Mikroskopie-Hochdruckzelle^[86] als Probenhalter. Für temperaturabhängige Mikroskopieaufnahmen wurde die flache, von beiden Seiten mit einem Diamantfenster verschlossene Hochdruckzelle von einer Seite geöffnet und auf das gegenüberliegende Fenster ein PFTE-Ring ($d_{\text{innen}} = 3 \text{ mm}$, $d_{\text{außen}} = 8 \text{ mm}$) gelegt. In die Bohrung des Rings wurden 20 μL Probenlösung pipettiert und darüber ein rundes Deckgläschen mit einem Durchmesser von 8 mm platziert. Die Zelle wurde daraufhin verschlossen und ein Heizblock daran angeschraubt, der mit einem zirkulierenden Wasserbad verbunden war. Für Druckmessungen wurden die Fenster der Mikroskopie-Hochdruckzelle zunächst fest verschlossen und anschließend ca. 420 μL der Probenlösung mit einer Spritze blasenfrei über den Anschluss der Druckkapillare in die Zelle pipettiert. Die Druckkapillare war an eine Druckpumpe der Firma Nova Swiss angeschlossen, über welche der Druck hydrostatisch aufgebaut wurde. Die Probenlösung wurde durch einen Tropfen Immersionsöl vom Druckmedium getrennt. Der maximal applizierte Druck betrug üblicherweise 1000 bar.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4

Das in diesem Kapitel untersuchte Ddx4-Konstrukt entspricht nur der N-terminalen Domäne des Proteins, die intrinsisch ungeordnet ist. Das Konstrukt ist außerdem noch weiter modifiziert, da alle Cysteine der Wildtypsequenz gegen Serin ausgetauscht wurden (s. Anhang für Primärstruktur). Dessen ungeachtet wird das untersuchte Konstrukt nachfolgend nur kurz Ddx4 genannt. In der eigens gebauten Mikroskopie-Hochdruckzelle wurde die Druckabhängigkeit der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 in einer Konzentration von 5 mg/mL untersucht. Unter ambienten Bedingungen (23 °C, 1 bar) wurde die Entmischung des Proteins durch Lösung in „Tröpfchenpuffer“ (20 mM NaP_i (pH 7,4), 100 mM NaCl) induziert. Es wurde sowohl die Druckabhängigkeit der Ddx4-Tröpfchen in Lösung als auch auf Oberflächen (Diamantfenster der Druckzelle) untersucht. Auf dem Fenster der Mikroskopie-Hochdruckzelle bildet das Protein sphärische, durchschnittlich 10 μm große Tröpf-

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

chen (Abb. 2.2). Die Erhöhung des Drucks ausgehend von Atmosphärendruck in 100 bar-Schritten offenbart, dass ein Druckeffekt auf die Entmischung von Ddx4 wirkt, welcher die vollständige Auflösung der Tröpfchen bei ca. 800 bar induziert.

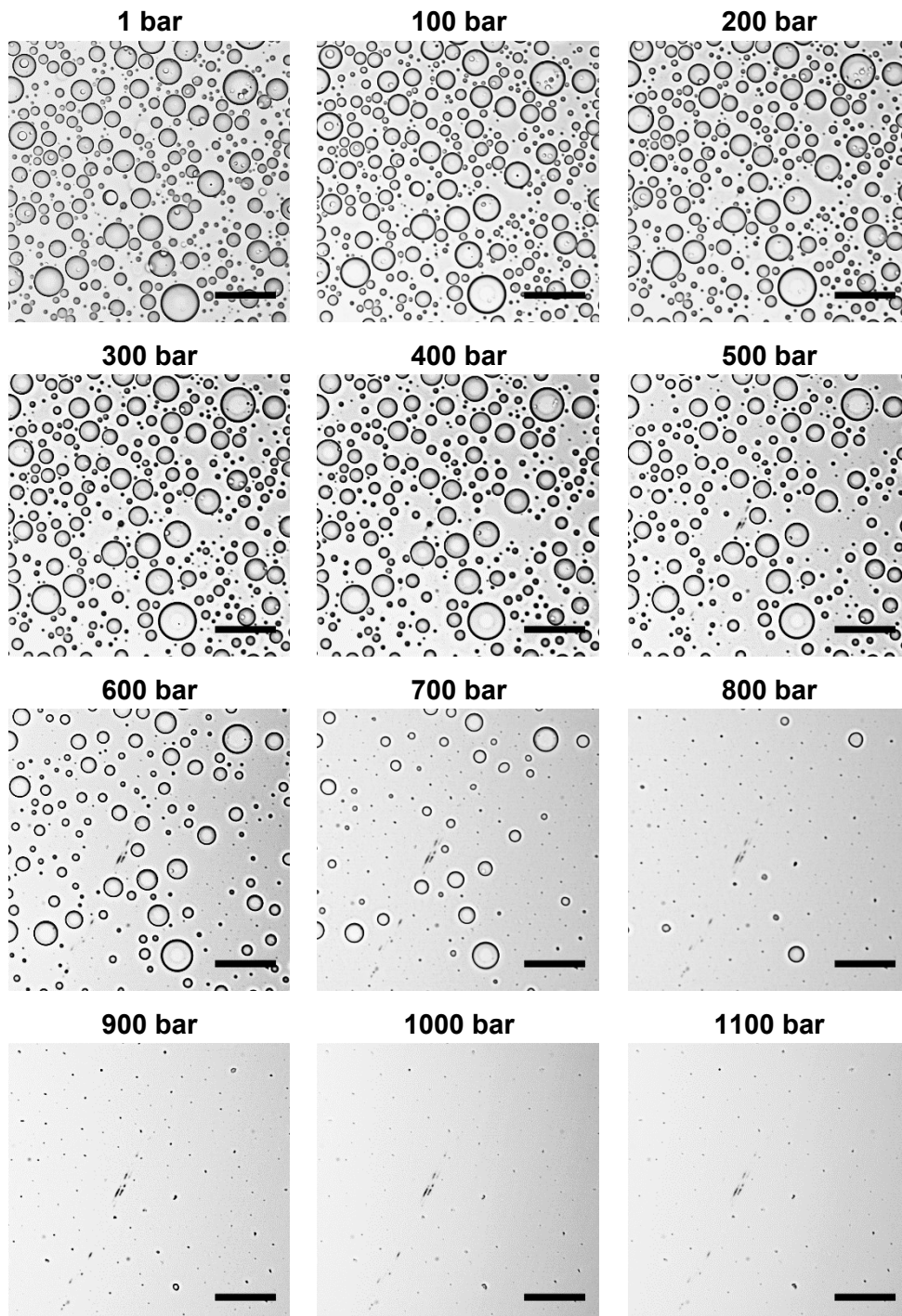


Abbildung 2.2: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 auf Oberflächen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der druckabhängigen Phasentrennung von 5 mg/mL Ddx4 in 20 mM NaPi (pH 7,4), 100 mM NaCl auf dem Fenster der verwendeten Mikroskopie-Hochdruckzelle bei $T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Maßstabbalken entspricht 50 μm in allen Bildern.

Die druckabhängige Untersuchung der Ddx4-Tröpfchen in Lösung allerdings bietet ein ganz anderes Bild. Zum einen sind die in Lösung befindlichen Tröpfchen signifikant kleiner als jene auf dem Fenster der Mikroskopie-Hochdruckzelle und zum anderen auch noch deutlich druckempfindlicher (Abb. 2.3). Die Druckapplikation führt in diesem Fall bereits bei 150 bar zur kompletten Auflösung der Ddx4-Tröpfchen. Die Untersuchung des druckabhängigen Phasenverhaltens auf Oberflächen und in Lösung bildet eine wichtige Fragestellung ab, da sich im dichtgepackten intrazellulären Raum zahlreiche Kontaktflächen für biomolekulare Kondensate ergeben, die, wie hier gezeigt, Einfluss auf die Stabilität der Tröpfchen gegenüber sich ändernden Bedingungen haben können. Bei Untersuchungen der druckabhängigen Entmischung sollten diese Effekte idealerweise mitberücksichtigt werden. Bei parameterabhängigen Turbiditätsmessungen (UV/Vis-Absorbanz im längerwelligen Bereich), wie sie hier durchgeführt wurden, können allerdings nur die Eigenschaften jener Tröpfchen bestimmt werden, die sich in Lösung befinden.

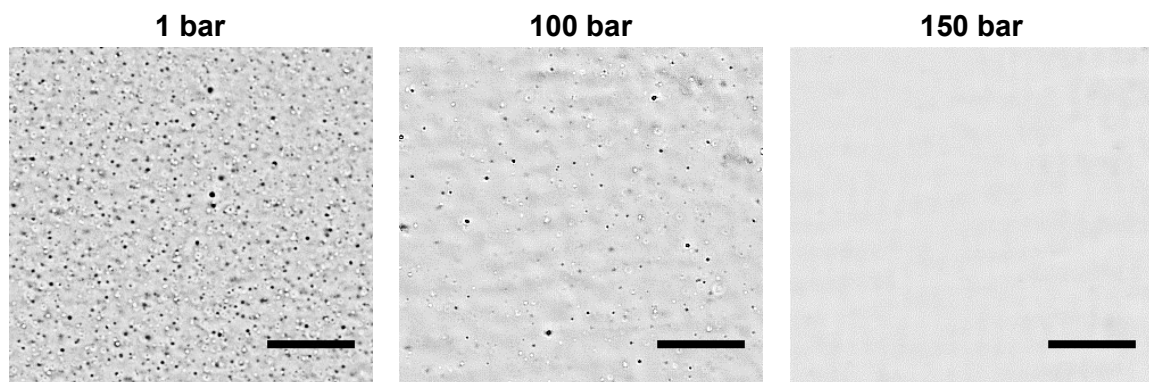


Abbildung 2.3: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 in Lösung. Lichtmikroskopische Aufnahmen der druckabhängigen Phasentrennung von 5 mg/mL Ddx4 in 20 mM NaPi (pH 7,4), 100 mM NaCl in Lösung bei $T = 23\text{ °C}$. Der Maßstabbalken entspricht 30 μm in allen Bildern.

Die Ermittlung der temperaturabhängigen Phasengrenzlinien erfolgte UV/Vis-spektroskopisch durch Messung der Probenabsorbanz bei einer Wellenlänge von 400 nm. Eine Erhöhung der Absorbanz in diesem Wellenlängenbereich ist gleichbedeutend mit der Entstehung von Tröpfchen, die die gemessene Absorbanz verursachen, indem sie das einfallende Licht streuen. Im Allgemeinen wird die Turbidität einer Lösung nicht ausschließlich durch Absorbanzmessung bei 400 nm bestimmt. Turbiditätsmessungen erfolgen üblicherweise auch bei den Wellenlängen 350 oder 600 nm. Für 5 mg/mL Ddx4 in 100 mM NaCl (pH 7,4) zeigt sich, dass eine Temperaturniedrigung die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins begünstigt (Abb. 2.4). Ausgehend vom homogenen Zustand bei hohen Temperaturen wurde die Temperatur in 2 °C-Schritten erniedrigt. Unterhalb von 28 °C kommt

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

es schließlich zur Bildung von Tröpfchen, welche sich in einem sprunghaften Anstieg der Turbidität äußert. Die hier vorgestellten Daten sind in guter Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten hinsichtlich der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der N-terminalen Domäne des Ddx4-Wildtyps.^[36] Diese Daten beinhalten unter anderem ein (T, c) -Phasendiagramm, das die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins als Entmischung mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur kennzeichnet. Die temperaturabhängige Entmischung der hier untersuchten Variante scheint durch die eingeführten Mutationen nicht besonders beeinflusst zu sein.

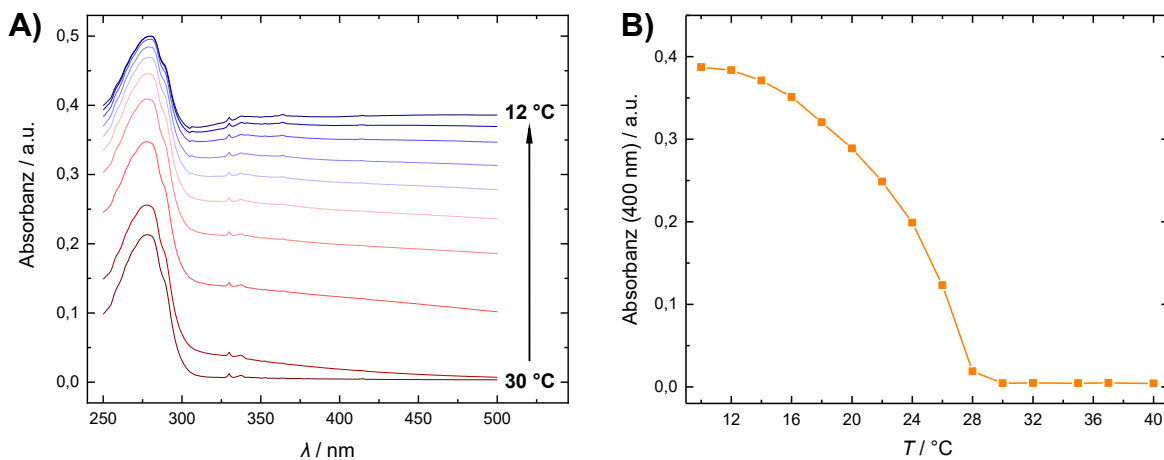


Abbildung 2.4: Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4. (A) Exemplarische UV/Vis-Absorbanzspektren von 5 mg/mL Ddx4 in 20 mM NaPi (pH 7,4), 100 mM NaCl im Wellenlängenbereich von 250-500 nm. Gezeigt sind die Spektren bei den Temperaturen 12-30 °C, welche in 2 °C-Abständen aufgenommen wurden. (B) Aus (A) resultierendes Turbiditätsdiagramm (400 nm-Absorbanz) der temperaturabhängigen Entmischung von Ddx4.

Außerdem untersucht wurde der kombinierte Effekt von Temperatur und Druck auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4. Zu diesem Zweck wurde die Druckabhängigkeit der Ddx4-Tröpfchen bei den Temperaturen 4, 10, 15, 20 und 25 °C ermittelt. Auch bei diesen Messungen wurde die Turbidität (400 nm-Absorbanz) der Probenlösung gemessen. Dabei kam es zum Einsatz einer selbst gebauten UV/Vis-Zelle, welche für die Anwendung bei druckabhängigen UV/Vis-Messungen vorgesehen ist. Die Ergebnisse der Messungen (Abb. 2.5) bestätigen die oben beschriebene Temperaturabhängigkeit der Ddx4-Tröpfchen. Ein Vergleich der Absorbanzwerte bei 1 bar macht deutlich, dass diese mit erniedrigten Temperaturen größer werden. Des Weiteren wird aus den Daten ersichtlich, dass die entmischte Phase von Ddx4 mit sinkender Temperatur zunehmend druckstabiler ist. Bei 4 °C beispielsweise werden die Ddx4-Tröpfchen durch eine Druckapplikation von 350 bar vollständig aufgelöst. Im Vergleich dazu genügt bei 20 °C bereits eine Druckapplikation von 100 bar.

Die durch Turbiditätsmessung bestimmten Druckphasengrenzlinien sind von ähnlicher Größenordnung wie die über die Mikroskopie bestimmten Druckphasengrenzen der in Lösung befindlichen Tröpfchen (Abb. 2.3). Der maximal applizierte Druck bei diesen druckabhängigen Turbiditätsmessungen betrug 2000 bar. Ein wiedereintretender Phasenübergang (*engl.* reentrant phase transition) bei sehr hohen Drücken, wie beispielsweise schon für die Entmischung des Proteins α -Elastin gezeigt,^[18] wurde im Falle von Ddx4 bis 2000 bar nicht beobachtet.

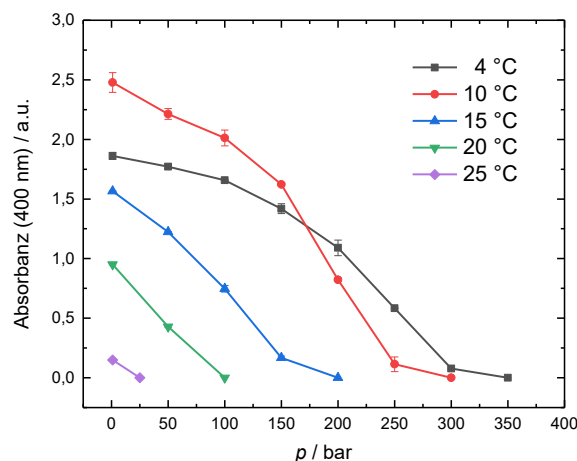


Abbildung 2.5: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 bei verschiedenen Temperaturen. 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 5 mg/mL Ddx4 in 20 mM NaPi (pH 7,4), 100 mM NaCl als Funktion des Drucks bei den Temperaturen 4, 10, 15, 20 und 25 °C.

2.3.2 Einfluss von TMAO auf die druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4

Aus der druckabhängigen Untersuchung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4 lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der kondensierten Tröpfchenphase des Proteins um einen äußerst druckempfindlichen Zustand handelt. Die stabilisierende Wirkung von Osmolyten wie TMAO auf die Sekundärstruktur von Proteinen gegenüber Extrembedingungen ist bereits bekannt und erwiesen. Eine sich nun stellende Frage im Kontext der Proteinentmischung ist, ob Osmolyte auch proteingeformte Kondensate gegen veränderte Umweltbedingungen stabilisieren können. Folglich wurde hier der konzentrationsabhängige Effekt von TMAO auf die druckabhängige Entmischung von Ddx4 bei einer Temperatur von 23 °C untersucht. Hierfür wurde in Tröpfchenpuffer (100 mM NaCl, pH 7,4) gelöstes TMAO dem Protein in den Finalkonzentrationen 200 und 400 mM zugesetzt. Die sowohl mikroskopisch als auch UV/Vis-spektroskopisch durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Zugabe des Osmolyten eine Stabilisierung der Tröpfchen gegen erhöhte Drücke bewirkt

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

(Abb. 2.6). Angemerkt sei dennoch, dass die druckabhängigen Phasengrenzlinien, die durch den Einsatz beider Methoden bestimmt wurden, leicht verschieden sind. Beide Methoden bestätigen insgesamt aber den konzentrationsabhängigen Effekt des Osmolyten TMAO auf die druckabhängige Entmischung von Ddx4. Während Ddx4-Tröpfchen in reinem Puffer (vgl. auch Abb. 2.3) bereits durch eine Druckapplikation von 50 bar (Turbidität) bzw. 150 bar (Mikroskopie) vollständig aufgelöst werden, werden in Anwesenheit von 400 mM TMAO 150 bar (Turbidität) bzw. 300 bar (Mikroskopie) benötigt. Auch nach Zugabe von TMAO wird kein wiedereintretender Phasenübergang bei sehr hohen Drücken bis 2000 bar beobachtet.

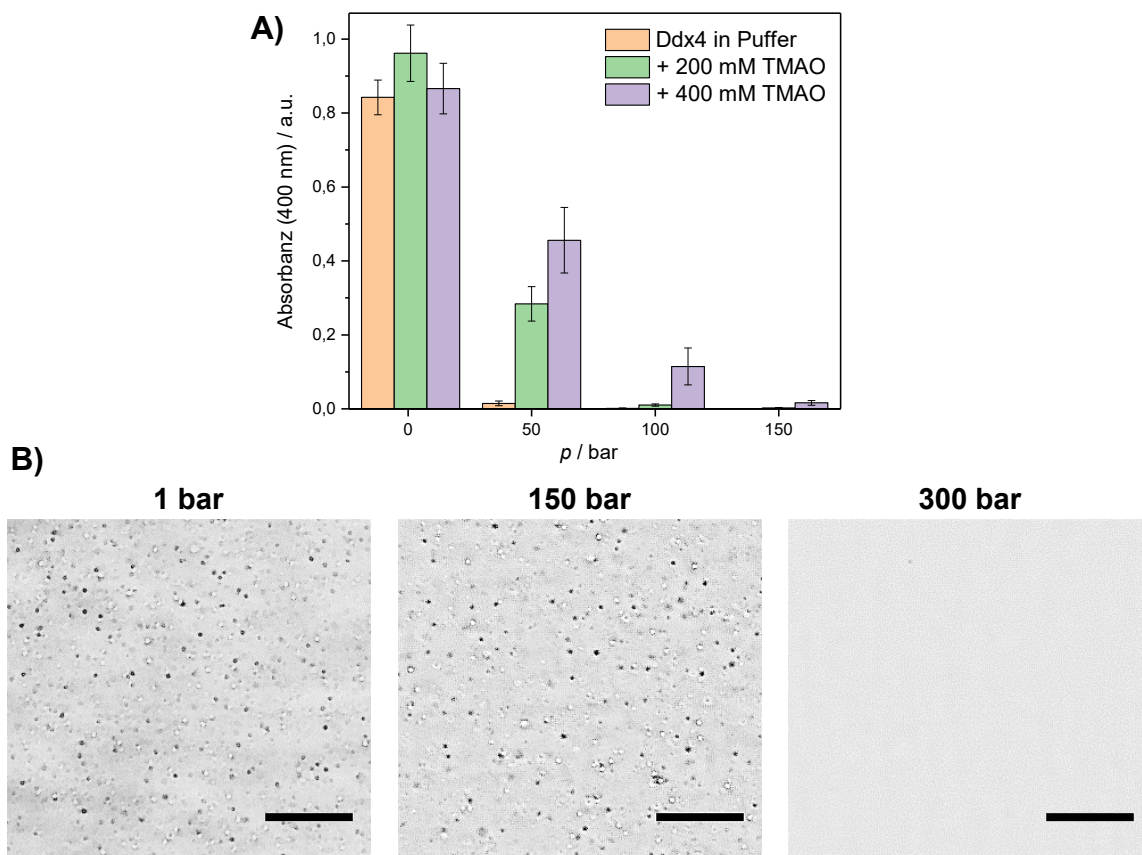


Abbildung 2.6: Einfluss des Osmolyten TMAO auf die druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Ddx4. (A) 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 5 mg/mL Ddx4 in 20 mM NaP_i (pH 7,4), 100 mM NaCl und nach Zugabe von 200 bzw. 400 mM TMAO bei $T = 23$ °C. **(B)** Lichtmikroskopische Aufnahmen von 5 mg/mL Ddx4 in 400 mM TMAO enthaltender Pufferlösung bei ausgewählten Drücken sowie einer Temperatur von 23 °C. Der Maßstabbalken entspricht 30 μ m in allen Bildern.

2.3.3 Verdau des MBP-FUS-Konstrukts durch die TEV-Protease

Nachfolgend soll die parameterabhängige Untersuchung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des intrinsisch ungeordneten Proteins FUS vorgestellt werden. Das für die Untersuchung verwendete FUS-Konstrukt (s. Anhang für Primärstruktur) ist ein Fusionsprotein aus FUS und dem Maltose-bindenden Protein (MBP). Um die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen „an- und auszuschalten“, werden äußere Faktoren wie beispielsweise Temperatur, pH, Ionenstärke etc. variiert. Üblich ist es auch, sogenannte Löslichkeitstags (*engl.* solubility tags) an das entmischende Protein anzuheften, die verhindern, dass das Protein Kondensate bildet, solange das Tag noch daran gebunden ist. Im Falle des hier verwendeten Konstrukts stellt das Maltose-bindende Protein das Löslichkeitstag des entmischenden Proteins FUS dar. MBP ist an den N-Terminus des FUS-Proteins gebunden und nur durch die Schnittstelle der TEV-Protease von diesem getrennt (s. Anhang für Details). Zur Entmischungsregulation des FUS-Konstrukts ist hier eine Kombination aus Tagentfernung und Regulation der NaCl-Konzentration, welche erwiesenermaßen die FUS-Entmischung beeinflusst,^[85] gewählt worden. Um also die Phasentrennung des Proteins zu initiieren, das in 500 mM NaCl gelagert wurde, wurde sowohl die NaCl-Konzentration auf eine entmischungsgünstige Konzentration von 150 mM abgesenkt als auch die TEV-Protease dazugegeben. Wenn einzig die NaCl-Konzentration erniedrigt wird, kommt es ohne TEV-Protease nicht zur Phasentrennung des Proteins (Abb. 2.7). In 150 mM NaCl bewirkt erst die Zugabe der Protease die Spaltung der Schnittsequenz zwischen MBP und FUS und somit die Entfernung des entmischungshemmenden Tags.

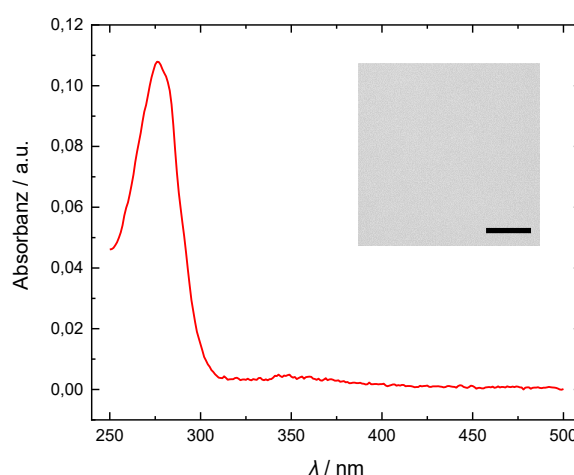


Abbildung 2.7: Ausbleibende Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von MBP-FUS bei Nichtzugabe der TEV-Protease unter ansonsten entmischungsgünstigen Bedingungen. UV/Vis-Absorbanzspektrum und lichtmikroskopische Aufnahme (eingefügtes Bild) von 3 μM MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) ohne Zugabe der TEV-Protease bei $T = 23$ °C. Der Maßstab Balken im eingefügten Bild entspricht 20 μm.

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosolutes auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

Bereits nach 15 Minuten (Abb. 2.8 A) ist ein Großteil der Fusionsproteine geschnitten. Das 400 nm-Absorbanzmaximum (Turbidität) wird allerdings erst nach 45 Minuten erreicht. Sicherheitshalber aber wurde bei allen Messungen ein TEV-Verdau von 60 Minuten eingehalten. In guter Übereinstimmung mit den Turbiditätsdaten sind die in gleichen Zeitabständen gemachten lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2.8 B). Es sei angemerkt, dass sich die Angabe der Proteinkonzentration in den nachfolgenden Abschnitten immer auf die noch ungeschnittene MBP-FUS-Form bezieht.

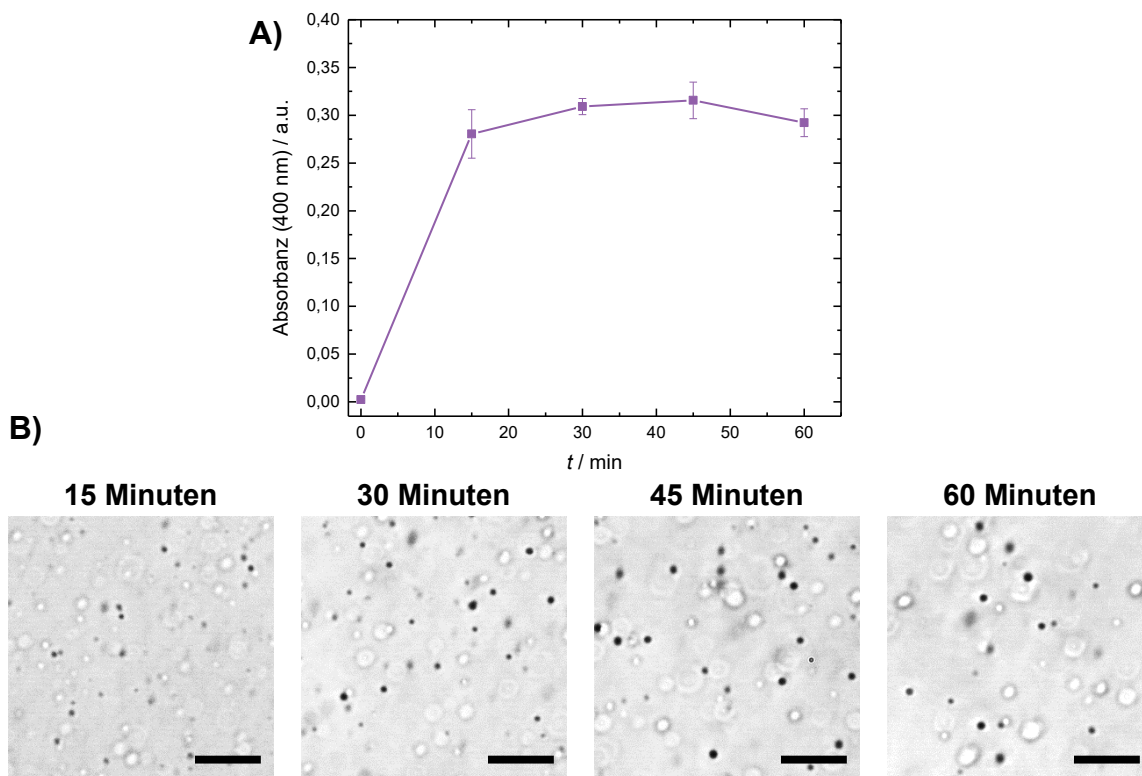


Abbildung 2.8: Zeitabhängiger TEV-Verdau des MBP-FUS-Konstrukts. (A) 400 nm-Absorbanz (Turbidität) und **(B)** lichtmikroskopische Aufnahmen von 3 µM MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) 15, 30, 45 und 60 Minuten nach Zugabe der TEV-Protease bei $T = 23$ °C. Der Maßstabbalken entspricht 20 µm in allen Bildern.

2.3.4 Zeit- und konzentrationsabhängige Mikroskopie des MBP-FUS-Konstrukts

Aufgrund der Instabilität und Anfälligkeit des Proteins bezüglich Aggregation musste zunächst einmal festgestellt werden, bei welcher Konzentration die parameterabhängige Untersuchung der Entmischung stattfinden kann. Das Protein wurde hierfür bei MBP-FUS-Konzentrationen von 3, 6, 9, 12, 15 und 30 µM mikroskopisch untersucht. Bei allen betrach-

teten Konzentrationen wurde darauf geachtet, dass die NaCl-Konzentration bei 150 mM und der pH-Wert bei 7,5 gehalten wurden. Abbildung 2.9 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung und beinhaltet mikroskopische Lichtaufnahmen sowohl in Lösung als auch auf dem Fenster der Mikroskopie-Hochdruckzelle. Alle Bilder wurden 1 Stunde nach Start des TEV-Verdau und bei einer Temperatur von 23 °C aufgenommen. Bei dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration zunehmend mehr Tröpfchencluster und amorphe Aggregate zu beobachten sind. Da diese bei höheren MBP-FUS-Konzentrationen zunehmend größer werden und zu Boden absinken, werden die Unterschiede zwischen den höheren Konzentrationen vor allem bei Vergleich der Mikroskopiebilder des Fensters sichtbar. Mit einer Konzentration von 3 μM MBP-FUS scheint eine Konzentration gefunden zu sein, die keine Aggregate bildet.

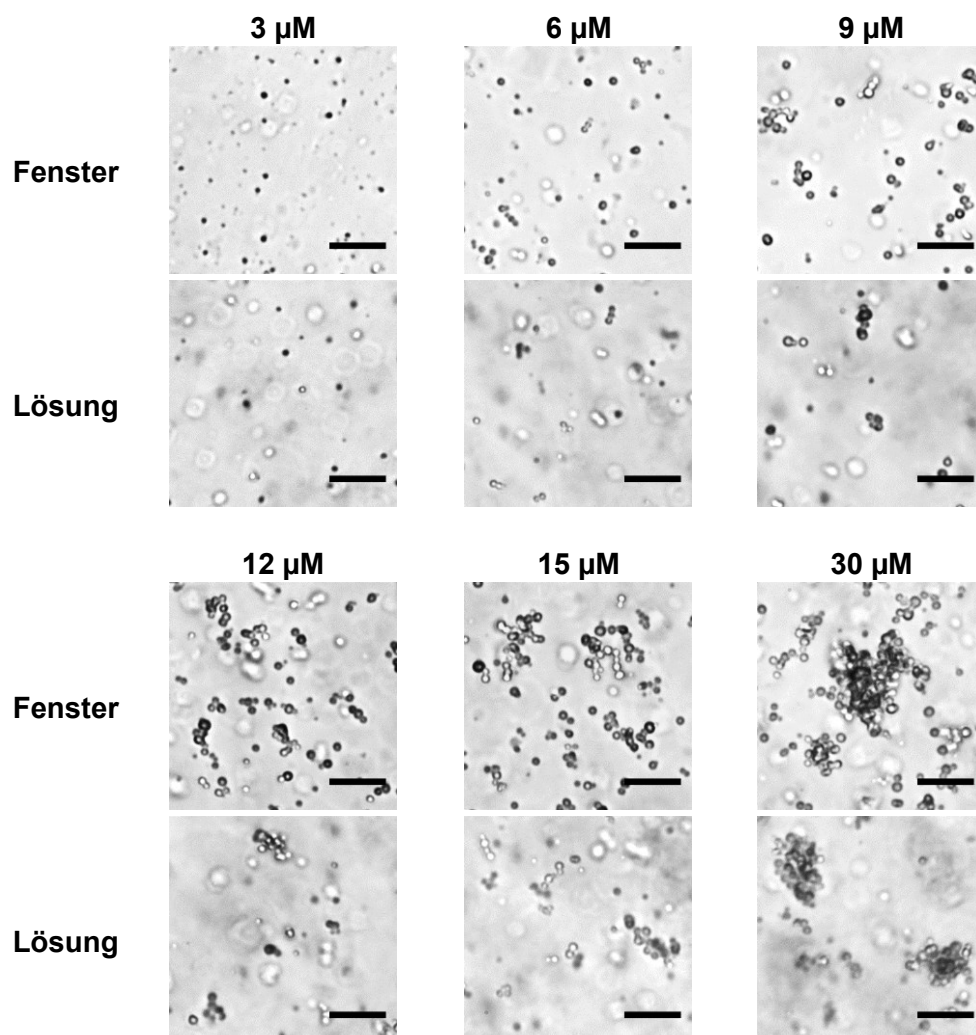


Abbildung 2.9: Konzentrationsabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS. Lichtmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen konzentrierten MBP-FUS-Lösungen in 150 mM NaCl (pH 7,5) in Lösung und auf dem Fenster der verwendeten Mikroskopie-Druckzelle bei $T = 23$ °C. Der Maßstabbalken entspricht 20 μm in allen Bildern.

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

Da die Untersuchung einer Probe inklusive TEV-Verdau durchschnittlich 2 Stunden dauerte, wurde für diese Konzentration (3 μM) außerdem noch überprüft, ob im gleichen Zeitraum keine Aggregate und Cluster gebildet werden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2.10) bestätigen, dass dies nicht der Fall ist, weshalb für die temperatur- und druckabhängigen Untersuchungen eine Proteinkonzentration von 3 μM MBP-FUS gewählt wurde. Unterschiede in der Anzahl der Tröpfchen sind auf die zeitabhängige Sedimentation der Tröpfchen auf das untere Fenster der Mikroskopie-Druckzelle zurückzuführen.

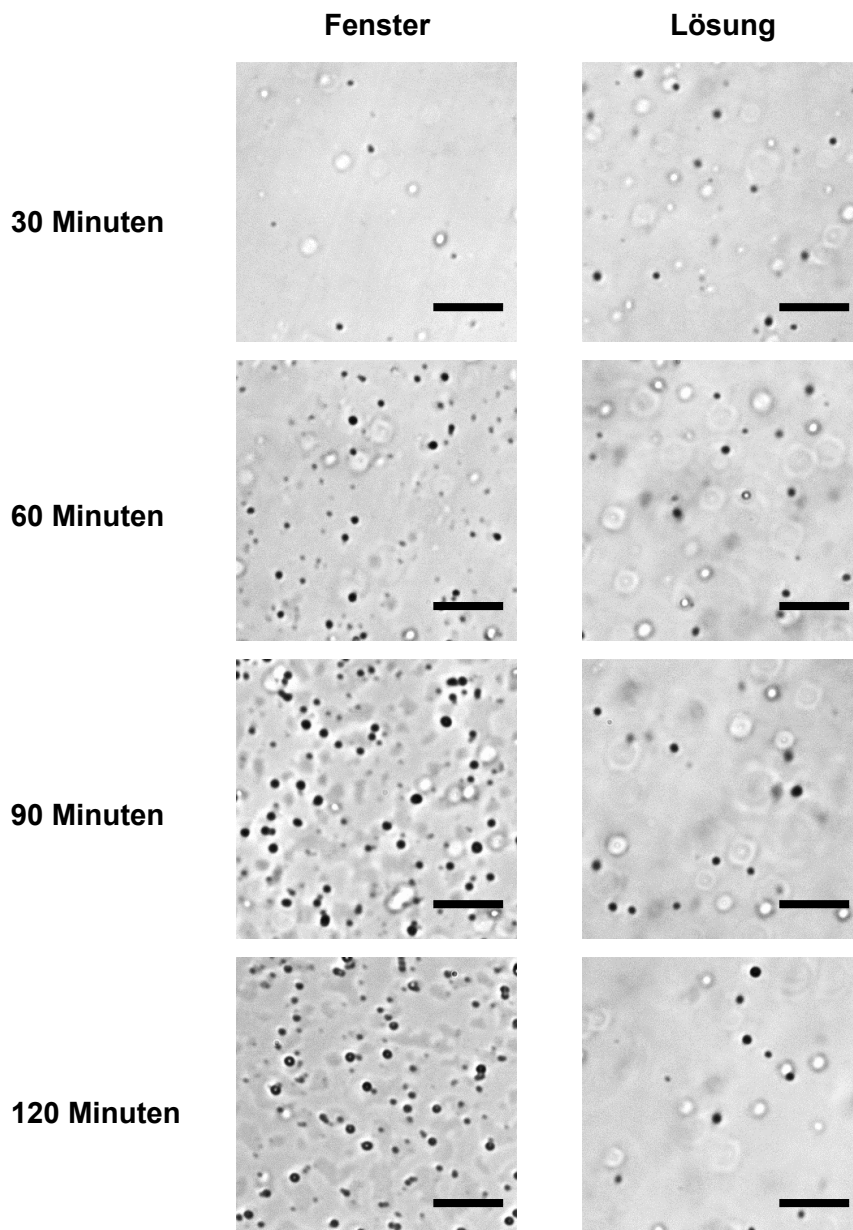


Abbildung 2.10: Zeitabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3 μM MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) in Lösung und auf dem Fenster der verwendeten Mikroskopie-Druckzelle bei $T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Aufnahmen erfolgten 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Zugabe der TEV-Protease. Der Maßstabbalken entspricht 20 μm in allen Bildern.

2.3.5 Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS

Die temperaturabhängige Untersuchung der Entmischung von FUS ergab, dass diese durch eine Temperaturniedrigung begünstigt wird. Für eine MBP-FUS-Konzentration von $3 \mu\text{M}$ in 150 mM NaCl ($\text{pH } 7,5$) wurde über Turbiditätsmessungen eine Trübungstemperatur von ca. $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt (Abb. 2.11 A). Auch die mikroskopischen Aufnahmen der FUS-Proben bei den Temperaturen 10 , 20 , 30 und $40 \text{ }^\circ\text{C}$ belegen die spektroskopisch ermittelte Temperaturabhängigkeit der Entmischung von FUS (Abb. 2.11 B).

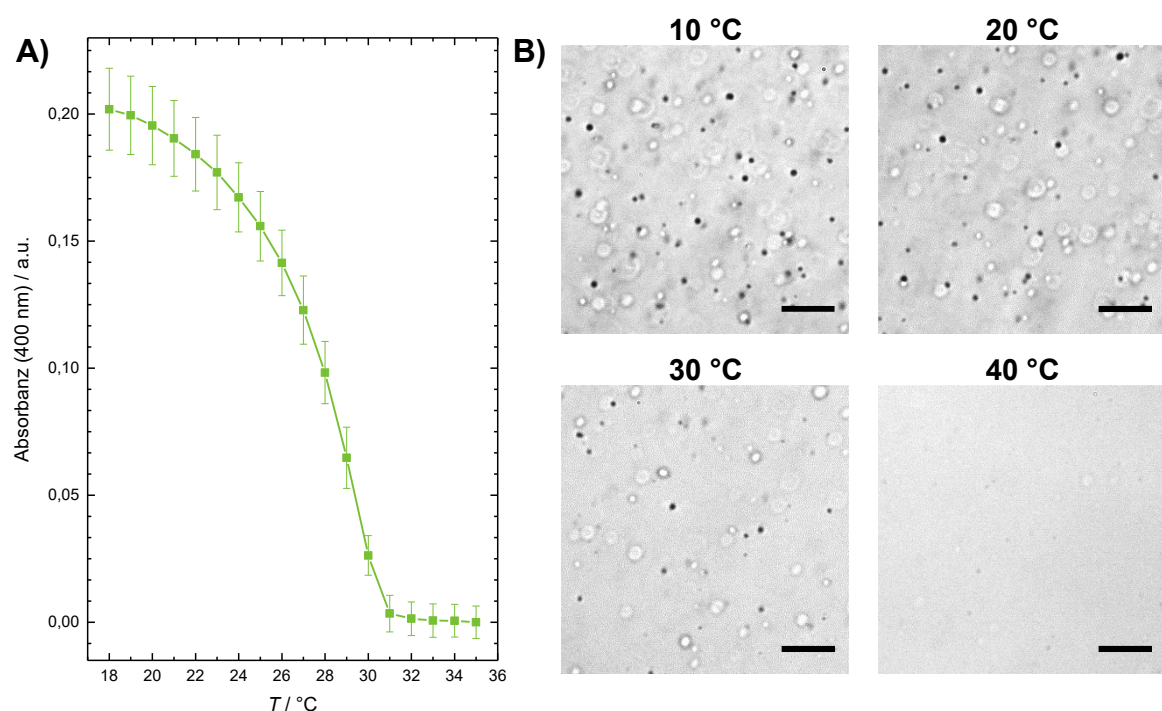


Abbildung 2.11: Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS. (A) 400 nm-Absorbanz (Turbidität) und (B) lichtmikroskopische Aufnahmen von $3 \mu\text{M}$ MBP-FUS in 150 mM NaCl ($\text{pH } 7,5$) als Funktion der Temperatur. Der Maßstabbalken entspricht $20 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

Die druckabhängigen Untersuchungen erfolgten UV/Vis-spektroskopisch bei den Temperaturen 10 , 15 , 20 , 25 und $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Druck wurde ausgehend von Atmosphärendruck in definierten Schritten bis 2000 bar erhöht, welche die maximale Grenze der UV/Vis-Hochdruckzelle darstellt. Bei diesen Messungen konnte festgestellt werden, dass eine Temperaturniedrigung die Druckstabilität des phasenseparierten Systems erhöht (Abb. 2.12 A). Zum Vergleich: die vollständige Auflösung der Kondensate bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgt bei 750 bar und bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ erst bei 1250 bar . Bei den Temperaturen 10 und $15 \text{ }^\circ\text{C}$ kommt es bis zu einer Druckerhöhung von 2000 bar nicht zum Verschwinden der entmischten Phase. Außerdem kann bei diesen beiden Temperaturen auch noch ein wiedereintretender Phasenübergang

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

beobachtet werden, was an einem leichten Anstieg der Absorbanz erkennbar ist. Um die Reversibilität des Prozesses zu untersuchen, wurde der Druck nach Erreichen von 2000 bar in gleichen Schritten erniedrigt und die Absorbanz erneut gemessen (Abb. 2.12 B). Der Vergleich der Werte des Druckaufbaus und des Druckabbaus zeigt, dass die Entmischung reversibel ist und sich in beide Richtungen nur leicht verschiedene Übergänge ergeben. Die Absorbanzwerte nach dem Druckabbau sind nur geringfügig kleiner als jene zu Beginn.

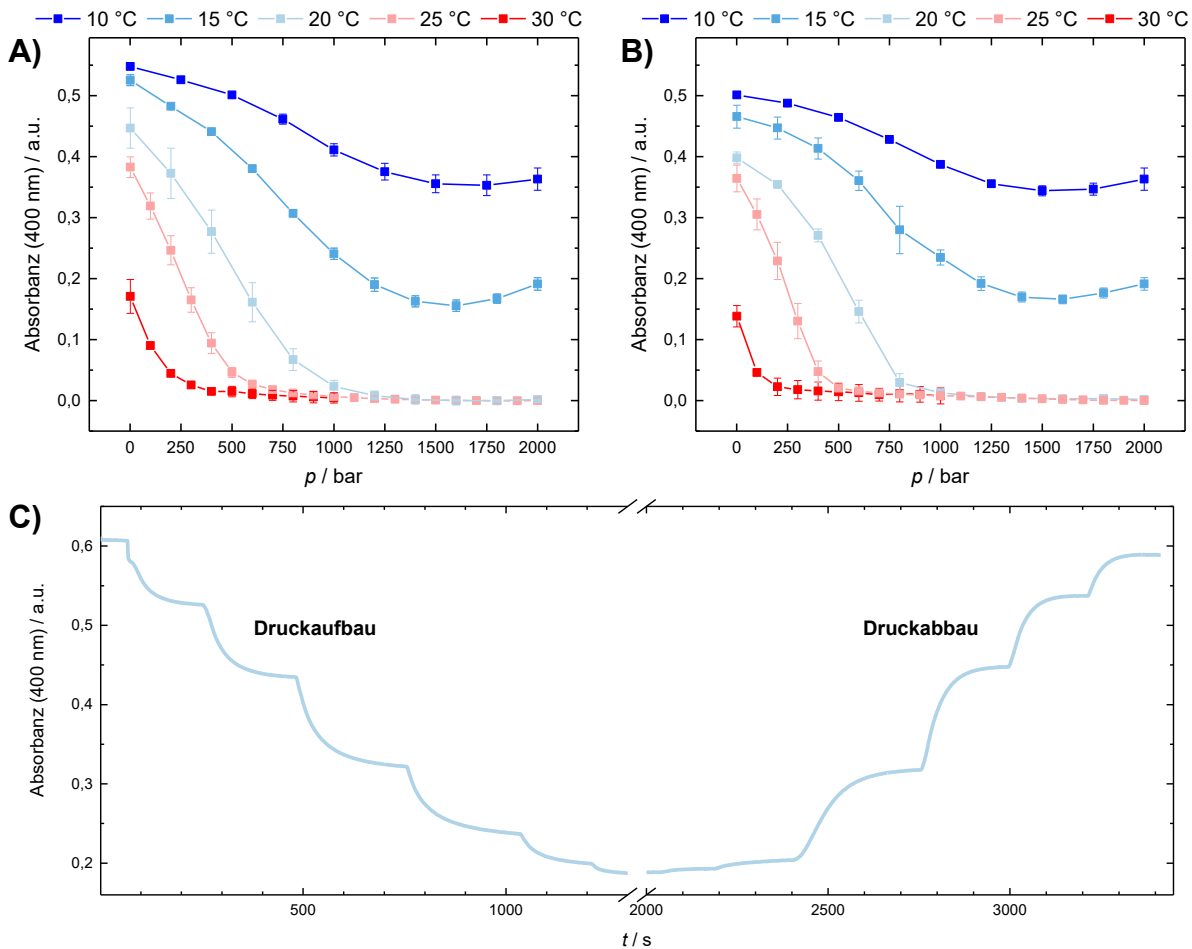


Abbildung 2.12: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS bei verschiedenen Temperaturen. 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 3 μ M MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) bei verschiedenen Temperaturen während des Druckaufbaus (A) und -abbaus (B).

(C) Beispielhafte Rohmessung (zeitabhängige Messung der 400 nm-Absorbanz) einer 3 μ M MBP-FUS-Lösung bei $T = 20$ °C. Abnehmende Absorbanzwerte werden für gewöhnlich während des Druckaufbaus beobachtet, steigende Absorbanzwerte sind typisch für den Druckabbau. Der Druck wurde in 250 bar-Schritten geändert, sobald die Absorbanz einen konstanten Wert annahm. Die dargestellte Rohmessung beinhaltet noch nicht die Subtraktion des Puffer-Absorbanzwertes.

Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mithilfe einer Mikroskopie-Hochdruckzelle bis zu einem Maximaldruck von 1000 bar und exemplarisch bei den Temperaturen 15 und 23 °C erfolgten, bestätigen diesen kombinierten Effekt von Temperatur und Druck (Abb. 2.13).

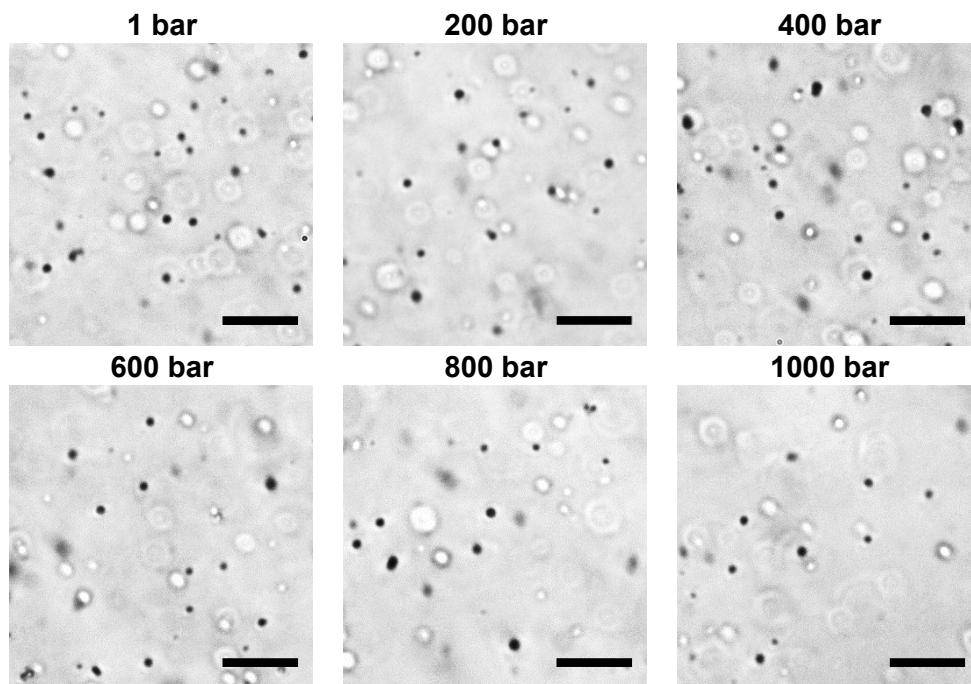
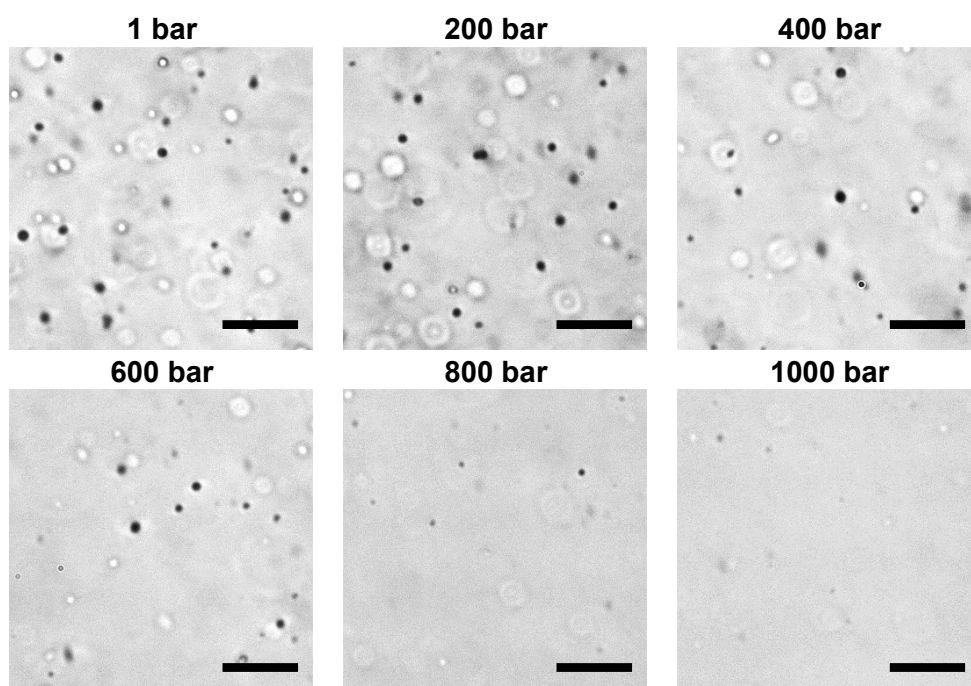
$T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  $T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 

Abbildung 2.13: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei Raumtemperatur. Lichtmikroskopische Aufnahmen der druckabhängigen Phasentrennung von $3\text{ }\mu\text{M}$ MBP-FUS in 150 mM NaCl ($\text{pH } 7,5$) bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei Raumtemperatur ($T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Maßstababaken entspricht $20\text{ }\mu\text{m}$ in allen Bildern.

2.3.6 Einfluss von Ficoll auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS

Die vorangegangene Charakterisierung des FUS-Konstruktes in reinem Puffer und bei einer MBP-FUS-Konzentration von 3 μM war notwendig, um abschließend untersuchen zu können, wie sich eine gecrowdete Umgebung auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und auf die Temperatur- und Druckphasengrenzlinien von FUS auswirkt. Zu diesem Zweck wurde der Crowder Ficoll verwendet, der *in vitro* oft zum Einsatz kommt, um die gecrowdeten Verhältnisse in Zellen nachzuahmen. Zunächst wurde überprüft, ob die Phasentrennung in Anwesenheit des Crowders stattfindet oder durch seine Anwesenheit verhindert wird. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Abb. 2.14) zeigen, dass der Crowder die Tröpfchenbildung von FUS nicht hemmt und auch die Morphologie der FUS-Tröpfchen nicht beeinflusst.

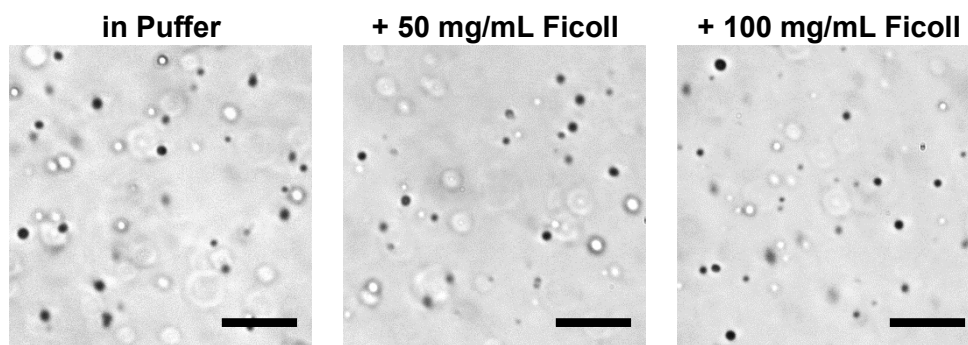


Abbildung 2.14: Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS in gecrowdeter Umgebung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3 μM MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) und nach Zugabe von 50 bzw. 100 mg/mL Ficoll. Der Maßstabbalken entspricht 20 μm in allen Bildern.

Die Ergebnisse der temperatur- und druckabhängigen Entmischung von FUS in einer durch Ficoll gecrowdeten Umgebung sind in Abbildung 2.15 dargestellt und beinhalten sowohl Mikroskopie- als auch Turbiditätsdaten. Die temperaturabhängige Untersuchung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung ergab eine Trübungstemperatur von ca. 30 °C in Puffer. In Anwesenheit von 50 mg/mL Ficoll kommt es zu einer Verschiebung der temperaturabhängigen Phasengrenzlinie zu ~36 °C. Wird die Ficollkonzentration verdoppelt (100 mg/mL), ergibt sich sogar eine Trübungstemperatur von 42 °C, was verglichen zur reinen Pufferlösung einer Differenz von 12 °C entspricht.

Der Crowder beeinflusst allerdings nicht nur die temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS, sondern auch die Druckphasengrenzen. Bei einer Temperatur von 30 °C dissoziieren FUS-Tröpfchen durch eine Druckapplikation von etwa 500 bar.

Bei Zugabe von 50 mg/mL Ficoll müssen zur vollständigen Auflösung der Tröpfchen bereits ~800 bar aufgebracht werden, in Anwesenheit von 100 mg/mL Ficoll sogar ~1200 bar. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Crowder Ficoll auf konzentrationsabhängige Art und Weise die Stabilisierung der entmischten FUS-Tröpfchenphase gegenüber erhöhten Temperaturen und Drücken induziert.

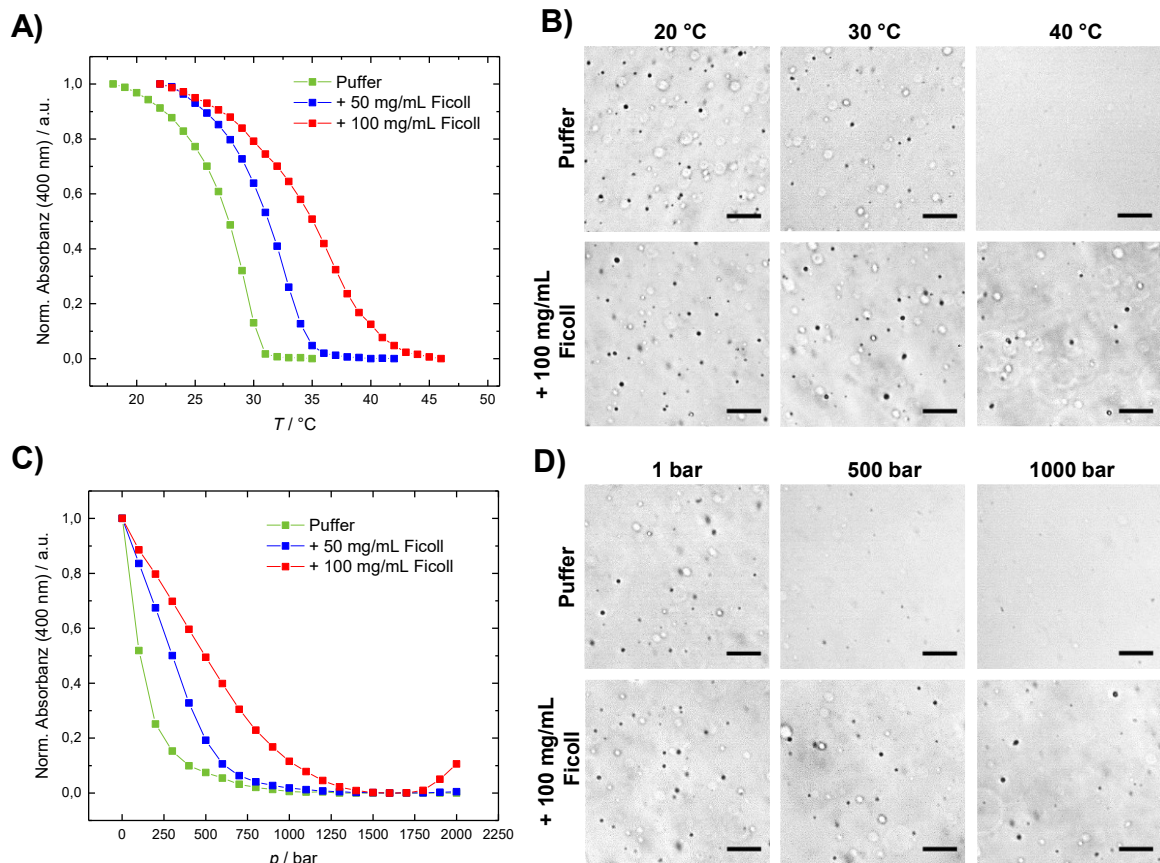


Abbildung 2.15: Crowding-Effekt auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS. 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 3 μM MBP-FUS in 150 mM NaCl (pH 7,5) und nach Zugabe von 50 bzw. 100 mg/mL Ficoll als Funktion der Temperatur (**A**) und als Funktion des Drucks bei $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (**C**). Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3 μM MBP-FUS in Puffer und nach Zugabe von 100 mg/mL Ficoll bei ausgewählten Temperaturen (**B**) und bei ausgewählten Drücken ($T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) (**D**). Der Maßstabbalken entspricht 20 μm in allen Bildern.

2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die parameterabhängigen Untersuchungen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der beiden intrinsisch ungeordneten Proteine Ddx4 und FUS weisen viele Gemeinsamkeiten zueinander auf, welche nachfolgend zusammengefasst und diskutiert werden sollen.

Die temperaturabhängige Untersuchung der Entmischung ergab, dass in Übereinstimmung mit den Voraussagen des Flory-Huggins-Modells eine Temperaturerniedrigung die Entmischung beider intrinsisch ungeordneten Proteine begünstigt. Für die in dieser Untersuchung gewählten Proteinkonzentrationen ($c(\text{Ddx4}) = 5 \text{ mg/mL}$, $c(\text{MBP-FUS}) = 3 \mu\text{M}$) und Pufferbedingungen wurde für Ddx4 eine Trübungstemperatur von $\sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt und für das FUS-Protein eine Trübungstemperatur von $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Entsprechend der Gibbs-Helmholtz-Gleichung können die in den Kondensaten zwischen den einzelnen Proteinketten wirkenden attraktiven Wechselwirkungen den durch die Entmischung auftretenden Entropieverlust ausgleichen.^[17] Da der Entropiebeitrag zur freien Energie mit sinkender Temperatur abnimmt,^[87] begünstigt eine Temperaturerniedrigung die Entmischung der intrinsisch ungeordneten Proteine Ddx4 und FUS.

Bei der druckabhängigen Untersuchung der Entmischung beider Proteine wurde ersichtlich, dass sowohl Ddx4- als auch FUS-Kondensate empfindlich auf Änderungen des Drucks reagieren. Unter ambienten Temperaturbedingungen ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) lösten sich Ddx4-Tröpfchen bereits bei 150 bar auf, FUS-Kondensate bei ca. 600 bar. Die beobachtete Auflösung der Kondensate unter Einwirkung von Druck kann auf in den Kondensaten vorkommende transiente Hohlräume zurückgeführt werden, die durch die Kontakte zwischen den Proteinketten entstehen und unzugänglich für Wasser sind.^[17,87,88] Die Druckempfindlichkeit wird im Falle beider Proteine verringert, wenn die Druckanwendung bei tiefen Temperaturen erfolgt, erklärbar durch die oben beschriebene tröpfchenstabilisierende Wirkung einer Temperaturerniedrigung.

Für das Protein FUS wurde bei tiefen Temperaturen außerdem noch ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet. Diese Art von Verhalten konnte bereits auch bei der Untersuchung von Lysozym-^[89] oder Elastin-Lösungen^[18] festgestellt werden. Der Hochdruck-Phasenübergang von FUS wird durch Kationen- π -, π - π - und (wasservermittelte) hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der dichter gepackten Tröpfchen erklärt.^[90]

Außerdem untersucht wurde der Effekt von Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von FUS und Ddx4. Im Falle des Proteins Ddx4 wurde der konzentrationsabhängige Effekt von TMAO auf die druckabhängige Entmischung der Kondensate untersucht. Dabei konnte ein Stabilisierungseffekt gegenüber erhöhten Drücken festgestellt werden, der mit zunehmender TMAO-Konzentration größer wird. Osmolyte könnten also nicht nur die Pro-

teinstruktur vor extremen Bedingungen bewahren, sondern auch proteingeformte Kondensate. Im Falle von FUS wurde der Einfluss einer zellähnlichen Umgebung auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins durch Zugabe des Crowders Ficoll untersucht. Auch hier zeigte sich ein konzentrationsabhängiger stabilisierender Effekt der gecrowdeten Umgebung gegenüber erhöhten Drücken und Temperaturen. Der hinzugefügte Crowder agiert über den Effekt des Ausschlussvolumens, wodurch die Sättigungskonzentration der Entmischung erhöht sowie die entmischungsvermittelnden Interaktionen zwischen den einzelnen FUS-Molekülen verstärkt werden.^[88] Für die Wirkung von TMAO kann ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden. Aufgrund ungünstiger Osmolyt-Proteinwechselwirkungen relativ zu Osmolyt-Wasser-Wechselwirkungen unterstützt der Osmolyt die Entstehung von biomolekularen Kondensaten, welche verglichen zum entmischten Zustand weniger TMAO-Kontaktflächen aufweisen.^[17,87]

Bezüglich konstitutiv vorhandener Kondensate in Organismen, die konstant unter erhöhten Drücken und Temperaturen existieren, legen diese Ergebnisse nahe, dass sowohl die gecrowdete Zellumgebung als auch akkumulierte Osmolyte eine tröpfchenerhaltende bzw. tröpfchenstabilisierende Wirkung besitzen könnten. Gleichmaßen sollte dieser tröpfchenstabilisierende Effekt auch auf Kondensate wirken, die nur unter bestimmten Bedingungen präsent sind. Zur Regulation ihrer Entstehung bzw. Auflösung bedarf es darüber hinaus allerdings anderer Mechanismen, wie beispielsweise posttranslationale Modifikationen, Client-Moleküle etc.

2 Einfluss von Temperatur, Druck und Kosoluten auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zweier intrinsisch ungeordneter Proteine

KAPITEL 3

Biomolekulare Kondensate unter extremen Marssalz-Bedingungen

Teile dieses Kapitels wurden bereits in einem Journalartikel publiziert:

- Abbildungen und Text wurden mit Genehmigung aus [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] wiederverwendet. Copyright ©2021 American Chemical Society.

3.1 Einleitung

Es scheint erwiesen, dass sich Leben unter extremen Umweltbedingungen entwickelt hat und immer noch existiert, z. B. in der Tiefsee, wo hohe hydrostatische Drücke (*engl.* high hydrostatic pressure, HHP) von bis zu etwa 1 kbar (100 MPa) herrschen.^[59,91,92] Die Existenz aller Phasenübergänge einschließlich der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung hängt auf empfindliche Weise von der Temperatur, dem Druck und den Konzentrationen (Aktivitäten) aller Bestandteile, inklusive Kosolute wie Salze, ab.^[13,17,18,25,27,34,87,93,94] Tatsächlich beherbergen tiefe unterirdische Umgebungen oft hohe Konzentrationen an gelösten Salzen, doch wissen wir nur wenig darüber, wie diese hochkonzentrierten Ionen die Bedingungen für Leben gestalten und noch weniger darüber, wie kombinierte Salz-HHP-Effekte die Chancen für zelluläres Leben einschränken. Ein solches Ion ist das Perchlorat, ClO_4^- , das in extremen Umgebungen auf der Erde und insbesondere auf dem Mars gegenwärtig ist.^[61,91,95-97] In den letzten zehn Jahren mehrten sich auch die Hinweise auf periodisch fließendes Oberflächenwasser auf dem Mars und es ist jetzt bekannt, dass es unterirdisches Wasser in Form von Seen unter der Oberfläche nahe des Mars-Südpols gibt.^[98-101] Das Mars-Grundwasser steht an der Basis der Kryosphäre an den Marspolen unter einem Druck von ~1 kbar, falls diese eine Tiefe von 10 km erreicht.^[99] Ähnlich harsche Umgebungen in unterirdischen Seen gibt es auf der Erde, die nachweislich erstaunliche Mengen an Leben beherbergen können.^[98] Bestimmte Ionen wie Perchlorat wirken bekanntermaßen als Chaotrope, indem sie die Struktur des Wassers und seine Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, stören^[102] und könnten daher die Assoziation biologischer Moleküle und die Bildung biomolekularer Kondensate beeinflussen, welche, wie bereits erwähnt, als Voraussetzung für die Entwicklung zellulären Lebens angenommen werden. Neben den Perchloratsalzen sind auch Sulfate auf der Marsoberfläche weit verbreitet, während auf der Erde Natriumchlorid (NaCl) das vorherrschende Salz ist, das für die Biochemie von Bedeutung ist.^[61,98,103] Um das Potenzial für protozelluläres Leben durch die Bildung flüssiger Kondensate von biomolekularen Systemen in unterirdischen Umgebungen zu bewerten, muss die Kombination aus stark ionischen Effekten dieser Salze und hohen hydrostatischen Drücken untersucht werden.

In dieser Studie wurden daher die kombinierten Auswirkungen von hohem Druck und hohen Salzkonzentrationen, insbesondere von Natrium/Magnesiumperchlorat und -sulfat und zum Vergleich Natriumchlorid, auf die Neigung verschiedener entmischender Systeme zur Bildung flüssigkeitsähnlicher biomolekularer Kondensate untersucht. Die ausgewählten entmischenden Systeme reichen von einem globulären (γ D-Kristallin), über ein teilweise ungeordnetes (LAF-1) bis hin zu einem vollständig ungeordneten Polypeptid (α -Elastin).

3 Biomolekulare Kondensate unter extremen Marssalz-Bedingungen

Um die Phaseneigenschaften dieser Systeme zu untersuchen, wurden lichtmikroskopische Experimente unter Verwendung einer selbst gebauten Hochdruck-Probenzelle mit Diamantfenstern durchgeführt. Außerdem erfolgten FTIR-spektroskopische Messungen zur Bestimmung des Salzeinflusses auf die Sekundärstruktur der Proteine.

Die Untersuchung ergab, dass nicht nur Temperatur und Proteinkonzentration, sondern auch hohe Drücke und hohe Salzkonzentrationen die Bildung von Kondensaten deutlich beeinflussen. Abhängig von den intermolekularen Wechselwirkungen, die die Entmischung steuern, und dem Salztyp wurde eine hohe Stressresistenz und sogar ein Wiedereintreten der Phasenübergang beobachtet, in dem Proteintröpfchen selbst bei extremen Drücken und Salzkonzentrationen bestehen bleiben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall bestimmter biomolekularer Systeme hohe Drücke und ein hoher Salzgehalt die Bildung von Kondensaten ermöglichen können, d.h. die Bewohnbarkeit von Umgebungen unter hohem Salzstress nicht verhindern.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Expression und Aufreinigung von LAF-1

Die für den Wildtyp des Proteins LAF-1 codierende DNA-Sequenz wurde durch die Firma GenScript in den Expressionsvektor pET-28a(+) eingefügt. Hierfür wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten. Am C-Terminus des Proteins wurde ein 6xHis-Tag ergänzt, mit dem das Protein mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Zwischen der LAF-Sequenz und dem 6xHis-Tag wurde außerdem eine Thrombin-Erkennungssequenz (LVPRGS) eingefügt, um das His-Tag gegebenenfalls auch entfernen zu können. Die vollständige Proteinsequenz des Konstrukts ist im Anhang (A.1.1) aufgeführt. Zur Expression des Proteins wurde das Plasmid in *E.coli*-Zellen BL21 (DE3) transformiert. Die Bakterienkultur wurde in LB-Medium, das Kanamycin und Chloramphenicol enthielt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 herangezüchtet. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und das Protein über Nacht bei 18 °C exprimiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Puffer (20 mM Tris (pH 7,4), 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 10 % Glycerin, 5 mM TCEP, DNase und Proteasehemmer) aufgenommen. Nach der Zellyse mittels Ultraschallbehandlung wurde die Zelldebris durch 30-minütige Zentrifugation bei 25000 rpm pelletiert. Der filtrierte Überstand wurde auf eine HisTrap-Säule gegeben, die mit dem oben genannten Puffer gewaschen wurde.

Zur Elution des Proteins wurde die Säule mit einem Hoch-Imidazol-Puffer (20 mM Tris (pH 7,4), 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 10 % Glycerin, 5 mM TCEP) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mithilfe von 10 kDa-Amicon-Filtern bei Raumtemperatur einkonzentriert und in Puffer mit der Zusammensetzung 20 mM Tris (pH 7,4), 1 M NaCl und 5 mM TCEP umgepuffert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde ein Extinktionskoeffizient von 75670 1/M·cm genutzt. Das aliquotierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Expression und Aufreinigung des Proteins LAF-1 erfolgten durch Simone Möbitz (Physikalische Chemie I, TU Dortmund).

3.2.2 Expression und Aufreinigung von γ D-Kristallin

Die für den Wildtyp des Proteins γ D-Kristallin codierende DNA-Sequenz wurde durch die Firma GenScript in den Expressionsvektor pET-30b(+) eingefügt. Hierfür wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Am C-Terminus des Proteins wurde ein 6xHis-Tag ergänzt, mit dem das Protein mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Die vollständige Proteinsequenz des Konstrukts ist im Anhang (A.1.3) aufgeführt. Zur Expression des Proteins wurde das Plasmid in *E.coli*-Zellen BL21 (DE3) transformiert. Die Bakterienkultur wurde in LB-Medium, das Kanamycin und Chloramphenicol enthielt, bis zu einer OD₆₀₀ von ~2,3 herangezüchtet. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und das Protein über Nacht bei 30 °C exprimiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Puffer (50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 1 mM DTT + DNase) aufgenommen. Nach der Zellyse mittels Ultraschallbehandlung wurde die Zelldebris durch 30-minütige Zentrifugation bei 25000 rpm und 10 °C pelletiert. Der filtrierte Überstand wurde auf eine HisTrap-Säule gegeben, die mit dem oben erwähnten Puffer gewaschen wurde. Zur Elution des Proteins wurde die Säule mit Hoch-Imidazol-Puffer (50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mithilfe von 10 kDa-Amicon-Filtern einkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule gegeben, welche mit Puffer der Zusammensetzung 50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl gewaschen wurde. Zuletzt wurde das Protein einkonzentriert und die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, wobei ein Extinktionskoeffizient von 40000 1/M·cm genutzt wurde. Das aliquotierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Expression und Aufreinigung des Proteins γ D-Kristallin erfolgten durch Simone Möbitz (Phy-

sikalische Chemie I, TU Dortmund).

3.2.3 Chemikalien

Die für diese Studie verwendeten Salze sind samt Bezugsquelle in unten stehender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	abcr GmbH
Magnesiumperchlorat (Mg(ClO ₄) ₂)	Alfa Aesar
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Natriumperchlorat (NaClO ₄)	Alfa Aesar

3.2.4 Probenpräparation für mikroskopische Untersuchungen

LAF-1: Stammlösungen des jeweiligen Salzes wurden angesetzt und mit Proteinaliquots von LAF-1 (20 mM Tris (pH 7,4), 5 mM TCEP, 1 M NaCl) gemischt, sodass sich die gewünschte Finalkonzentration des getesteten Salzes und eine LAF-1-Konzentration von 7,8 µM ergab.

γD-Kristallin: Stammlösungen des jeweiligen Salzes wurden angesetzt und mit Proteinaliquots von γD-Kristallin (50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl) gemischt, sodass sich die gewünschte Finalkonzentration des getesteten Salzes und eine γD-Kristallin-Konzentration von 55 mg/mL ergab.

α-Elastin: Lyophilisiertes α-Elastin-Pulver wurde von Elastin Products Co. Inc. erworben und in PBS-Puffer (8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KH₂PO₄, pH 7,4) gelöst. Es wurden Stammlösungen des jeweiligen Salzes angesetzt und mit dem Protein gemischt, sodass sich die gewünschte Finalkonzentration des getesteten Salzes und eine α-Elastin-Konzentration von 20 mg/mL ergab.

Die Entmischung aller Proteine wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl, MgSO₄, Mg(ClO₄)₂, Na₂SO₄ und NaClO₄ untersucht. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Salze konnten nicht alle oben aufgeführten Salze in sehr hohen, multimolaren Konzentrationen getestet werden.

3.2.5 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Bildaufnahmen wurden am Mikroskop Eclipse TE2000-U (Nikon Inc.) mit einem Nikon Plan Fluor 20x-Objektiv (NA 0,45; WD 7,4) erstellt. Bei allen Messungen wurde die in Abschnitt 2.2.6 erwähnte Mikroskopie-Hochdruckzelle genutzt. Für Messungen ohne Anwendung von Druck wurde ein Probenvolumen von 20 μL verwendet, für druckabhängige Messungen wurde der gesamte Innenraum der Druckzelle mit der Probenlösung befüllt. Die zwei Befüllungsweisen sind im oben genannten Abschnitt ausführlicher beschrieben ebenso wie die Temperaturregulation und die Druckapplikation in der Druckzelle. Die Mikroskopieexperimente erfolgten 10 Minuten nach Ansetzen der Probenlösung und bei 25 °C für LAF-1, bei 2,0-2,5 °C für γD -Kristallin und bei 32 °C für α -Elastin.

3.2.6 Probenpräparation für FTIR-Spektroskopie

Für FTIR-Experimente wurden die Proteinlösungen mit Amicon-Filtern der entsprechenden Massenausschlussgrenze gegen deuteriertes Wasser (Sigma-Aldrich) dialysiert und einkonzentriert. Anschließend wurden die Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das lyophilisierte Protein wurde in den unter 3.2.4 genannten Puffern gelöst, die allerdings mit D_2O angesetzt wurden und einen pH-Wert von 7,4 aufwiesen. Bei den Messungen wurde γD -Kristallin in einer Konzentration von 55 mg/mL und LAF-1 in einer Konzentration von 45 mg/mL eingesetzt.

3.2.7 FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-Messungen erfolgten an dem FTIR-Spektrometer Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific), das für den Wellenzahlbereich von 4000-650 cm^{-1} eingesetzt werden kann. Das Gerät enthält einen MCT-Detektor (HgCdTe), welcher mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Für FTIR-Messungen mit γD -Kristallin wurden 20 μL Probe zwischen zwei CaF_2 -Fenstern platziert, die durch einen Mylar-Spacer (50 μm) getrennt waren. Die FTIR-Messungen mit LAF-1 erfolgten aufgrund begrenzter Probenmenge mithilfe einer P-series Diamantstempelzelle (Diacell® VivoDAC, Almax easyLab) mit Typ IIa Diamanten (Almax easyLab). Zwischen den Diamantfenstern wurde ein Messingring mit einer Dicke von 50 μm und zentraler Bohrung gelegt. In diese Bohrung wurden 4 μL der Probe platziert. Für jede Probe wurden 128 Scans mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der FTIR-Spektren erfolgte mit der GRAMS Software. Nach der Puffersubstraktion wurde zunächst eine Basislinienkorrektur und die Flächennormierung der Amid-I'-Bande

auf 1 durchgeführt. Die Bestimmung der Subbandenposition erfolgte sowohl durch Bildung der 2. Ableitung als auch durch Fourier Self-Deconvolution (FSD). Mittels Gauß-Lorentz-Kurven wurden abschließend die verschiedenen Subbanden angepasst.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1

Für das intrinsisch ungeordnete P-Granulum-Protein LAF-1 ist nachweislich bekannt, dass dieses in lebenden Zellen und *in vitro* eine Entmischung in dichte flüssigkeitsähnliche Tröpfchen vollzieht.^[36,46,104] Die Phasentrennung von LAF-1, die zur Bildung dieser Tröpfchen führt, wird weitgehend durch elektrostatische Wechselwirkungen verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Proteinregion von LAF-1, welche eine Arginin(R)/Glycin(G)-reiche Domäne mit geringer Sequenzkomplexität darstellt, für die Phasentrennung des Proteins ausreicht.^[46]

Wie in Abbildung 3.1 veranschaulicht, entmischt LAF-1 bei einer Konzentration von 7,8 μM sowie einer Temperatur von 25 °C in Gegenwart von 125 mM NaCl in eine Tröpfchenphase. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Zugabe von 1-3 M NaCl zur Auflösung des phasengetrenten Zustands führt. Interessanterweise taucht oberhalb von 4 M NaCl die Tröpfchenphase wieder auf. Es wird also ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet.

In den sulfatsalzhaltigen Puffern (MgSO_4 und Na_2SO_4) erfolgt bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Tröpfchenbildung. In Anwesenheit von Perchloratsalzen ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und NaClO_4) allerdings bildet das Protein weiterhin Tröpfchen, die im Falle von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ bis zu einer Konzentration von 1 M und im Falle von NaClO_4 bis zu einer Konzentration von 500 mM bestehen bleiben. Eine Erhöhung der Perchloratkonzentration bis zu diesen Konzentrationsgrenzen fördert jedoch die Aggregation des Proteins, da immer mehr amorphe Strukturen zu beobachten sind. Aufgrund der Zunahme aggregierter Strukturen und der damit verbundenen Abnahme der für die Entmischung verfügbaren LAF-Proteine ist zu erwarten, dass die Anzahl der flüssigen Tröpfchen abnimmt. Oberhalb von 2 M $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ sowie 1 M NaClO_4 werden keine LAF-Tröpfchen mehr beobachtet.

Sowohl die Tröpfchenphase in 125 mM NaCl als auch die wiedereintretende Phase bei 4,5 M NaCl ist bis zu einem Druck von 1000 bar druckstabil (Abb. 3.2). Eine Druckapplikation bis zu 1000 bar in Anwesenheit der Salze MgSO_4 und Na_2SO_4 ($c = 250$ mM) führt außerdem nicht zur Entstehung von Tröpfchen.

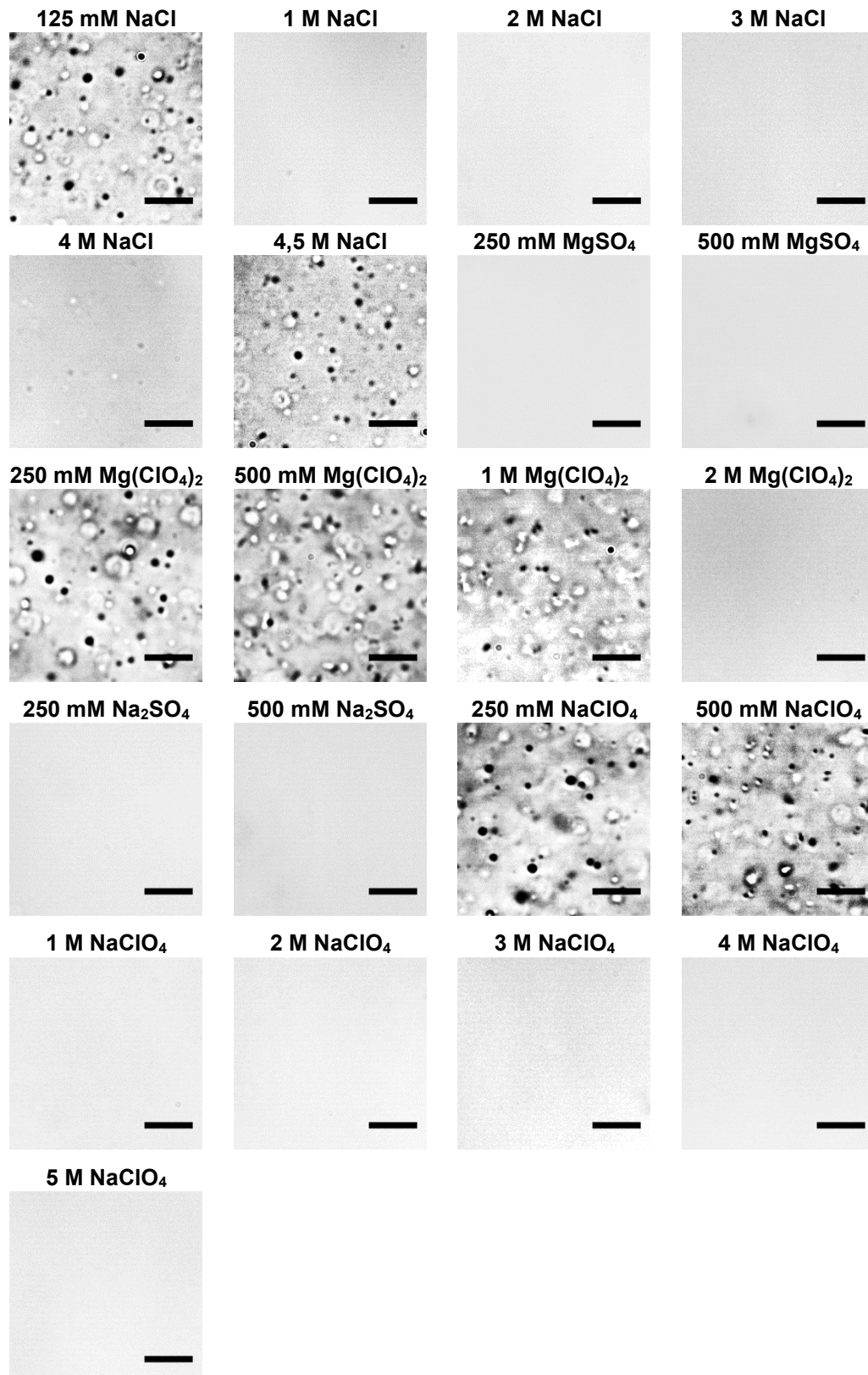


Abbildung 3.1: Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 7,8 µM LAF-1 in 20 mM Tris (pH 7,4) bei einer Temperatur von 25 °C sowie Atmosphärendruck in Anwesenheit verschieden konzentrierter Salze (NaCl, MgSO₄, Mg(ClO₄)₂, Na₂SO₄ und NaClO₄). Der Maßstabbalken entspricht 15 µm in allen Bildern.

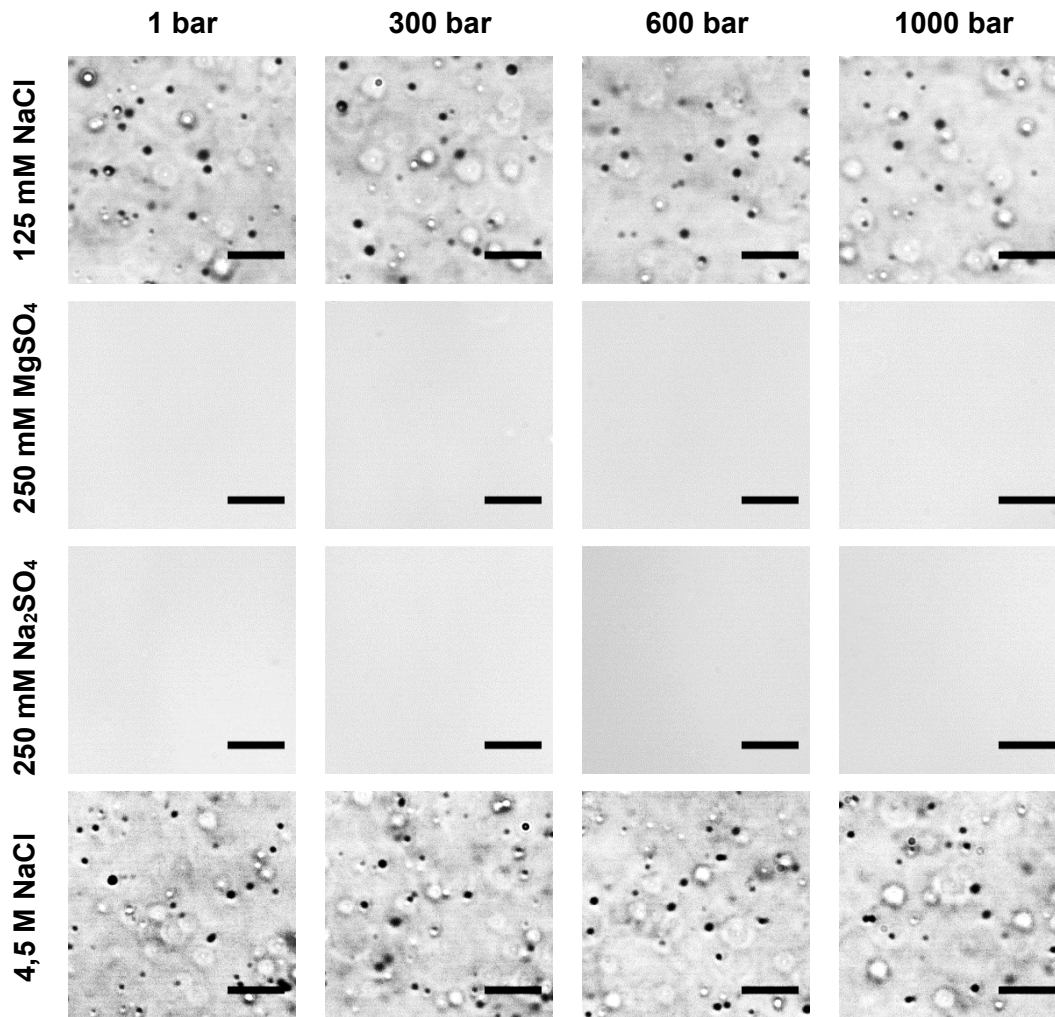


Abbildung 3.2: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von LAF-1 in Anwesenheit verschiedener Salze. Lichtmikroskopische Aufnahmen der druckabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von 7,8 μM LAF-1 in 20 mM Tris (pH 7,4) in Anwesenheit verschiedener Salze bei $T = 25^\circ\text{C}$. Der Maßstabbalken entspricht 15 μm in allen Bildern.

3.3.2 Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin

Als Beispiel für die salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung eines intrinsisch ungeordneten Proteins mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur werden hier die Daten für α -Elastin vorgestellt, das teilweise vernetzt, aber löslich ist und einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix darstellt, welche den Geweben von Wirbeltieren Elastizität verleiht.^[105,106] α -Elastin hat eine alternierend hydrophobe und hydrophile Domänenstruktur. Die hydrophoben Bereiche (~80 %) enthalten unpolare Aminosäurereste mit dem sich wiederholenden Motiv VGVAPG.^[105–109] Die einzelnen Elastinketten sind in der kondensierten Tröpfchenphase immer noch größtenteils ungeordnet. In ihren hochdynamischen Konformationen weisen sie nur transiente β -Turns auf.^[109] Die Konformation von α -Elastin ist bei einem Druck von bis zu 10 kbar ungeordnet.^[18] Der phasentrennte kondensierte Zustand von α -Elastin wird bei Umgebungsdruck weitgehend durch günstige hydrophobe Kontakte zwischen unpolaren Aminosäureresten stabilisiert, und das temperatur- und druckabhängige Phasenverhalten des reinen α -Elastin-IDPs wurde kürzlich untersucht.^[18]

Als repräsentative Beispiele sind in Abbildung 3.3 lichtmikroskopische Aufnahmen von 20 mg/mL α -Elastin unter verschiedenen Lösungsbedingungen bei einer Temperatur $T = 32\text{ °C}$ dargestellt. Bei dieser Proteinkonzentration weist α -Elastin einen temperaturbedingten Trübungspunkt, T_{cloud} , bei $\sim 23\text{ °C}$ auf, d. h. oberhalb dieser Temperatur findet die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins statt.

In Lösungen mit Konzentrationen bis zu 2 M NaCl sind flüssige Phasentröpfchen deutlich sichtbar. Die Anzahl der flüssigkeitsähnlichen Tröpfchen nimmt jedoch mit zunehmender Konzentration des Salzes ab. Jenseits von 3 M NaCl kommt es schließlich zur Präzipitation des Proteins.

Bemerkenswerterweise können auch in der Anwesenheit der anderen untersuchten Salze stets Elastintröpfchen nachgewiesen werden. Bei hohen Perchlorat- und Sulfatsalzkonzentrationen verringert sich die Anzahl der Tröpfchen lediglich. Selbst nach Zugabe von 5 M NaClO_4 sind erstaunlicherweise noch Tröpfchen vorhanden.

Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, haben hohe hydrostatische Drücke bis in den Bereich von 1000 bar auch unter verschiedenen Lösungsbedingungen keinen Einfluss auf die Tröpfchenphase des Systems.

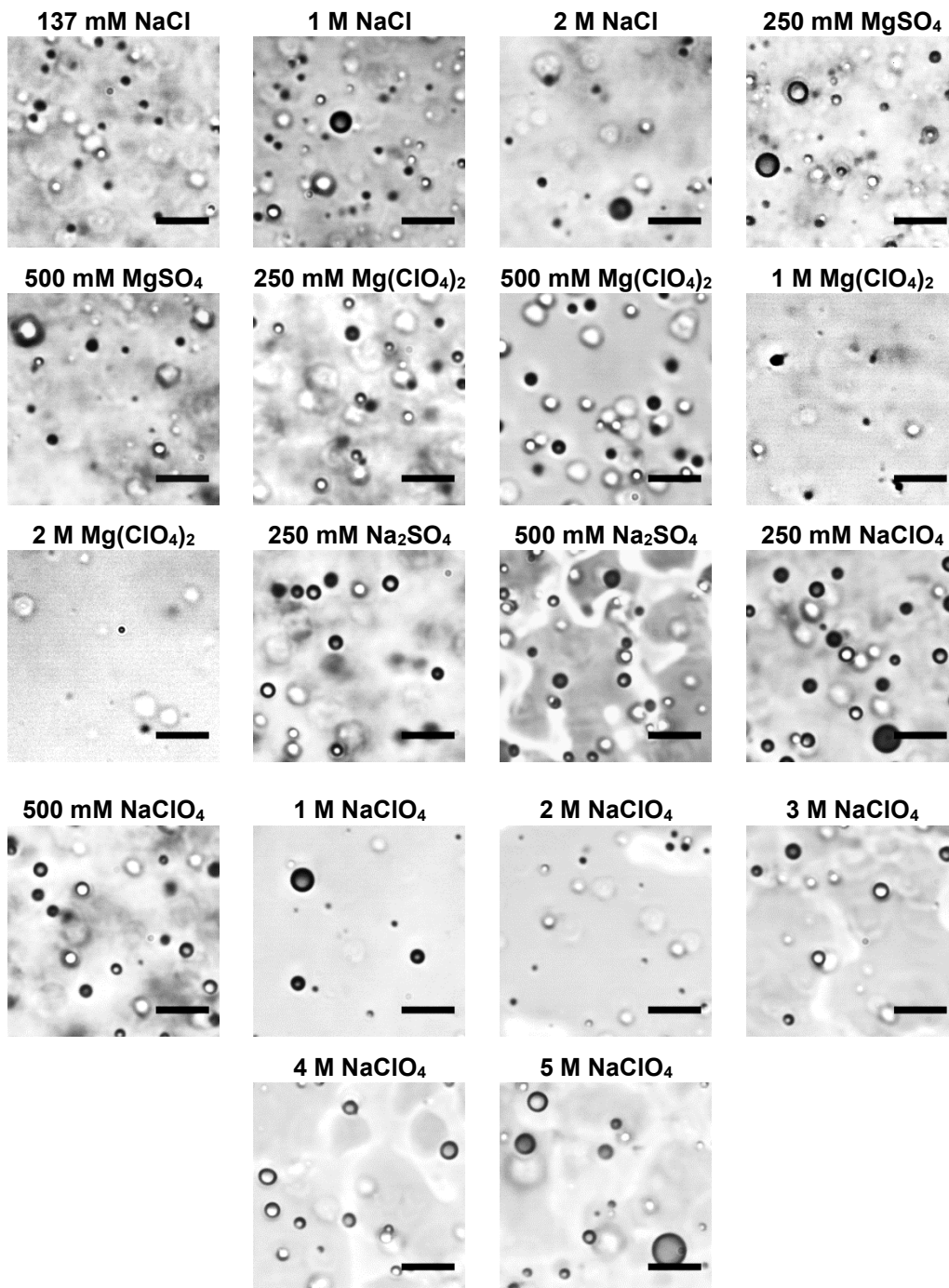


Abbildung 3.3: Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 20 mg/mL α -Elastin in Phosphatpuffer (pH 7,4) bei einer Temperatur von 32 °C sowie Atmosphärendruck in Anwesenheit verschieden konzentrierter Salze (NaCl, MgSO₄, Mg(ClO₄)₂, Na₂SO₄ und NaClO₄). Der Maßstababalken entspricht 15 μ m in allen Bildern.

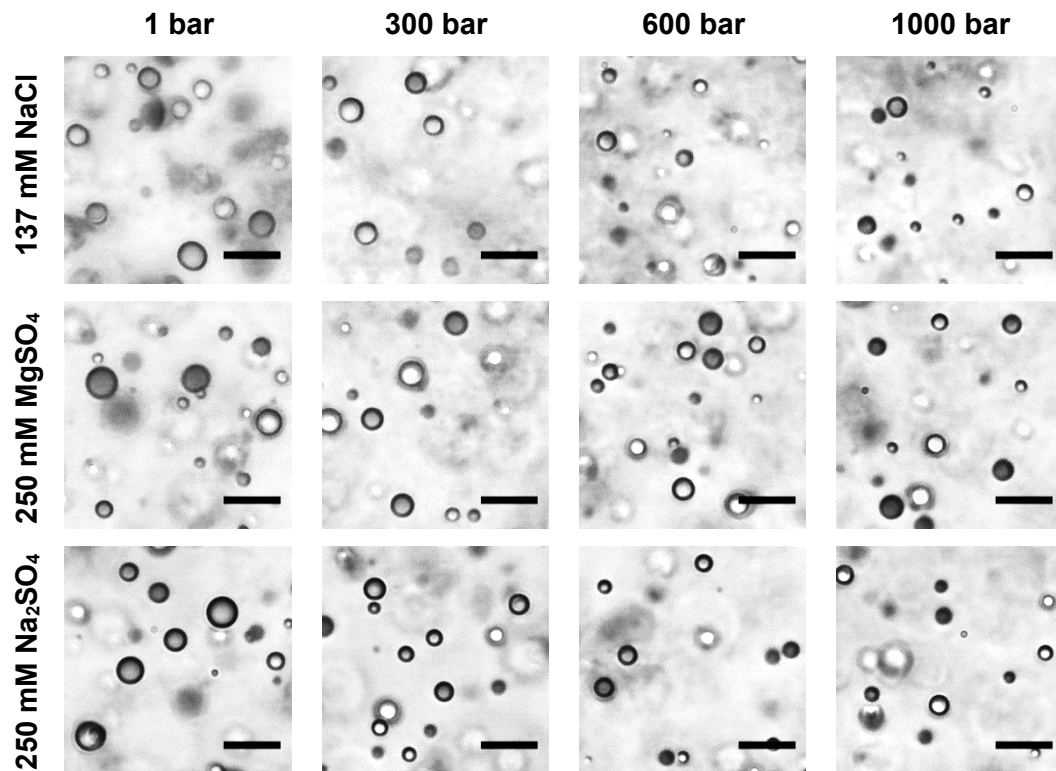


Abbildung 3.4: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Anwesenheit verschiedener Salze. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 20 mg/mL α -Elastin in Phosphatpuffer (pH 7,4) in Anwesenheit verschiedener Salze bei $T = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Maßstabbalken entspricht 15 μm in allen Bildern.

3.3.3 Salz- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin

Als Beispiel für ein globuläres entmischendes Protein wurde das gefaltete Monomerprotein γ D-Kristallin gewählt, das zu einer Gruppe von Säugetierproteinen gehört, die im Zytoplasma der Augenlinienszellen in einer Konzentration von bis zu mehreren hundert mg/mL vorkommen.^[110–112] Aufgrund der geladenen und hydrophoben Reste auf der gefalteten γ D-Kristallin-Oberfläche wird die phasengetrennte kondensierte Phase bei niedriger Temperatur durch transiente elektrostatische, hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Proteinmolekülen stabilisiert.^[17]

Abbildung 3.5 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von 55 mg/mL γ D-Kristallin in verschiedenen konzentrierten Lösungen der Salze NaCl, MgSO₄, Mg(ClO₄)₂, Na₂SO₄ und NaClO₄ bei Atmosphärendruck und einer Temperatur $T = 2$ °C. γ D-Kristallin weist in Pufferlösung einen temperaturbedingten Trübungspunkt, T_{cloud} , bei ~ 6 °C auf.^[17] Oberhalb dieser Temperatur bildet sich eine homogene Phase aus. In Anwesenheit von 150 mM NaCl sind flüssige Phasentröpfchen bis zu einer Größe von einigen Mikrometern klar zu erkennen. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen, die oberhalb von 1 M NaCl gemacht wurden, zeigen das Verschwinden des phasengetretenen Zustands. Bei NaCl-Konzentrationen größer als 3 M fällt das Protein aus, da hier die Löslichkeitsgrenze des Proteins erreicht ist.

Bei Zugabe von MgSO₄ zur Pufferlösung von γ D-Kristallin verschwindet die Tröpfchenphase. Der Ersatz von Mg²⁺ durch Na⁺ führt zu einem anderen Szenario: In 250 mM Na₂SO₄ verschwinden die Tröpfchen ebenfalls, sie tauchen jedoch bei 500 mM Na₂SO₄ wieder auf, d. h. der Ersatz von Mg²⁺ durch Na⁺ induziert einen wiedereintretenden Phasenübergang bei hohen Salzkonzentrationen.

In 250 mM Mg(ClO₄)₂ entmischt das Protein nicht in kondensierte Tröpfchen. Eine Erhöhung der Perchloratkonzentration führt aber zur Bildung amorpher Strukturen und schließlich zur Präzipitation des Proteins. Ebenso verhindert die Zugabe von 250 mM und 500 mM NaClO₄ eine Entstehung der Tröpfchen. Bei sehr hohen Salzkonzentrationen, über 4 M NaClO₄, wird jedoch ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet, bei welchem die Tröpfchen mit amorphen Aggregaten koexistieren.

Abbildung 3.6 zeigt die Auswirkungen des Drucks auf die Entmischung von γ D-Kristallin in ausgewählten Lösungsbedingungen. In Übereinstimmung mit Literaturdaten^[17] verschwindet die Tröpfchenphase bei etwa 200 bar und taucht bis 1000 bar nicht wieder auf. Anders als bei Lysozym beispielsweise, wird für γ D-Kristallin innerhalb des untersuchten Druckbereichs kein druckinduzierter wiedereintretender Phasenübergang beobachtet, obwohl es nicht völlig ausgeschlossen ist, dass dieser erst bei viel höheren Drücken auftritt. Auch in

den Proben, die 250 mM Na_2SO_4 und MgSO_4 enthielten, wird im gesamterfassten Druckbereich keine druckinduzierte Phasentrennung beobachtet.

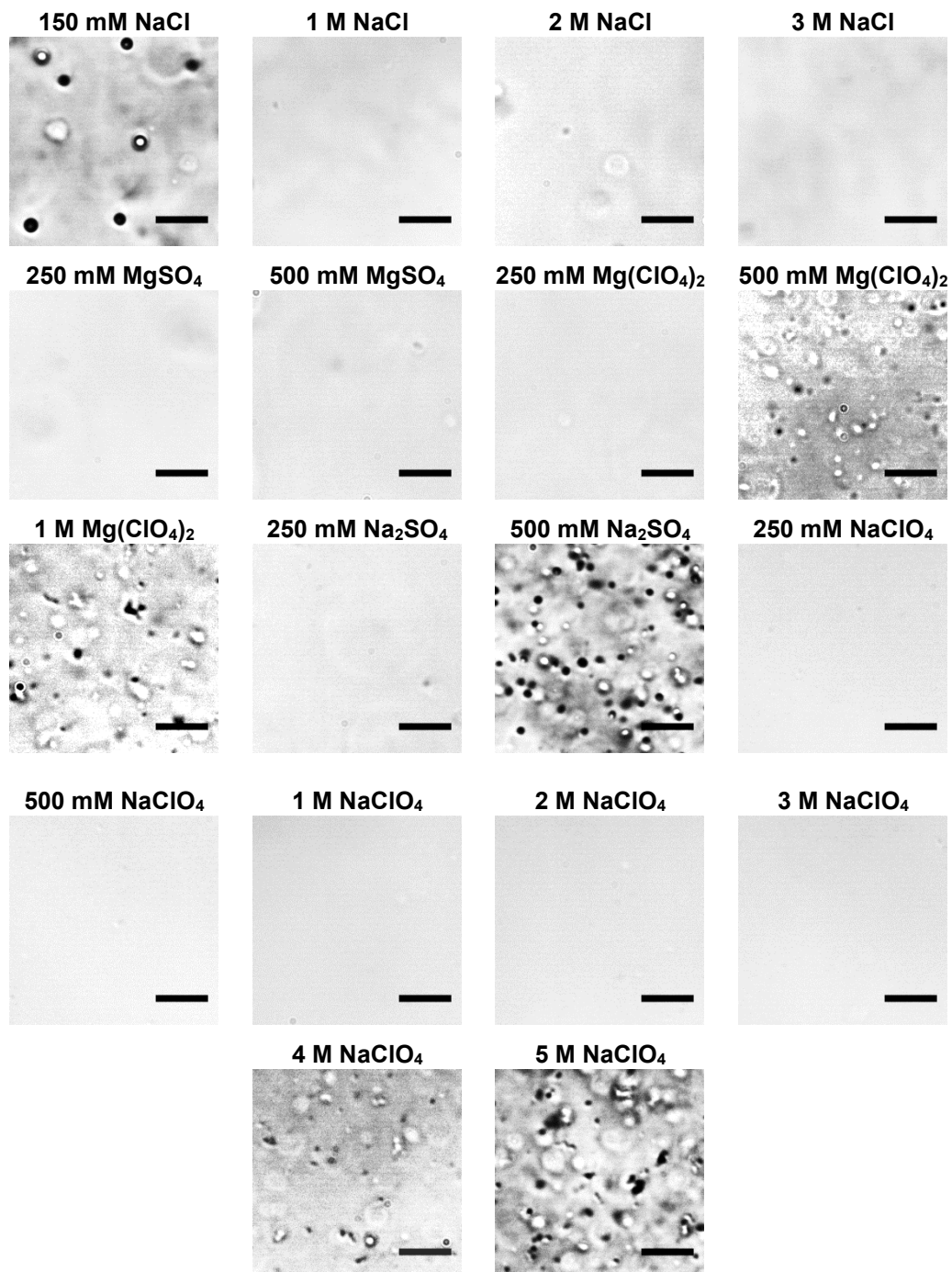


Abbildung 3.5: Salzabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γD -Kristallin. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 55 mg/mL γD -Kristallin in 50 mM Tris (pH 7,4) bei einer Temperatur von 2 °C sowie Atmosphärendruck in Anwesenheit verschieden konzentrierter Salze (NaCl , MgSO_4 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, Na_2SO_4 und NaClO_4). Der Maßstabbalken entspricht 15 μm in allen Bildern.

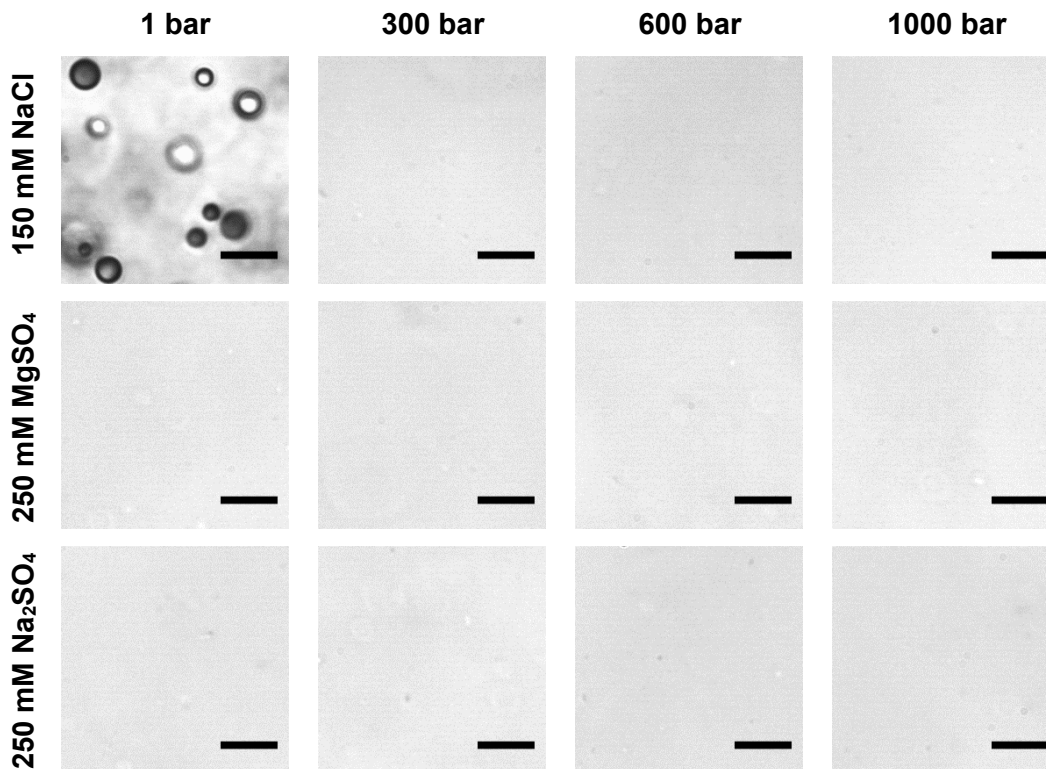


Abbildung 3.6: Druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin in Anwesenheit verschiedener Salze. Lichtmikroskopische Aufnahmen der druckabhängigen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von 55 mg/mL γ D-Kristallin in 50 mM Tris (pH 7,4) in Anwesenheit verschiedener Salze bei $T = 2^\circ\text{C}$. Der Maßstabbalken entspricht 15 μm in allen Bildern.

3.3.4 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur von γ D-Kristallin

Der Effekt der Marssalze auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ D-Kristallin fiel je nach eingesetzter Salzart und -konzentration unterschiedlich aus. Um herauszufinden, ob der Effekt der Salze auf eine Beeinflussung der entmischungsvermittelnden Interaktionen oder auf eine Änderung der Sekundärstruktur zurückgeführt werden kann, wurden FTIR-spektroskopische Messungen beispielhaft in Magnesiumperchlorat durchgeführt. Der Effekt dieses Salzes sei hier noch einmal kurz zusammengefasst: In Puffer bildet γ D-Kristallin Tröpfchen, in 250 mM Magnesiumperchlorat bleibt die Entmischung aus und in 500 mM Magnesiumperchlorat koexistieren Tröpfchen mit amorphen Tröpfchenstrukturen. Die FTIR-Messungen erfolgten, wie die Mikroskopieexperimente auch, bei einer Konzentration von 55 mg/mL γ D-Kristallin in mit deuteriertem Wasser angesetzten Puffer (pD 7,4).

Zur Strukturbestimmung wurde der Wellenzahlbereich zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} betrachtet. Nach Puffersubstraktion und Normierung der Amid-I'-Bande auf eine Fläche von 1 für alle drei Lösungsbedingungen ergibt sich eine Auftragung, wie sie in Abbildung 3.7 gezeigt ist. Die Auftragung der normierten Amid-I'-Banden lässt bereits erahnen, dass das hinzugefügte Magnesiumperchlorat in den Konzentrationen 250 und 500 mM nur minimale Änderungen der Sekundärstruktur bewirkt.

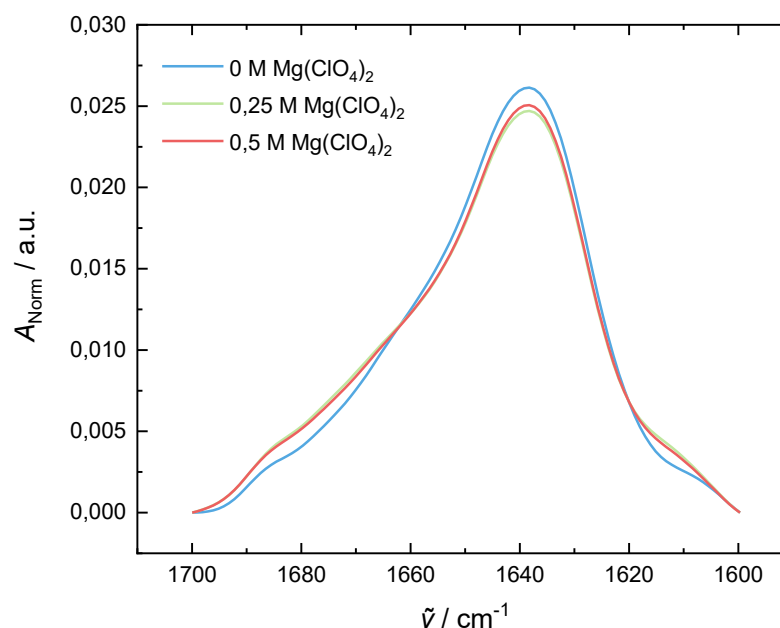


Abbildung 3.7: FTIR-Spektroskopie von γ D-Kristallin in Magnesiumperchlorat. Normierte Amid-I'-Bande der FTIR-spektroskopischen Untersuchung von 55 mg/mL γ D-Kristallin in 50 mM Tris (pD 7,4) und nach Zugabe von 250 bzw. 500 mM Magnesiumperchlorat bei einer Temperatur von $23\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Um die entsprechenden Strukturanteile zu bestimmen, wurden die in der Literatur bereits beschriebenen Subbandpositionen des Proteins verwendet.^[87] Den Literaturdaten zufolge können die Subbandpositionen den folgenden Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden: β -Faltblätter 1685 , 1676 und 1635 cm^{-1} , Schleifen $\sim 1664\text{ cm}^{-1}$, α -Helices $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$, ungeordnete Strukturen $\sim 1644\text{ cm}^{-1}$ und exponierte β -Faltblätter $\sim 1611\text{ cm}^{-1}$. Die damit berechneten Sekundärstrukturanteile sind für die unterschiedlichen Lösungsbedingungen in Abbildung 3.8 gezeigt. Unter diesen Strukturanteilen machen β -Faltblätter in allen drei Lösungsbedingungen den größten Anteil der Sekundärstruktur aus. Durch die Zugabe von sowohl 250 als auch 500 mM Magnesiumperchlorat wird die Sekundärstruktur des Proteins nicht signifikant beeinflusst. Daraus kann abgeleitet werden, dass die mikroskopisch gemachten Beobachtungen vermutlich durch einen Einfluss des Salzes auf die entmischungs-

3 Biomolekulare Kondensate unter extremen Marssalz-Bedingungen

vermittelnden intermolekularen Interaktionen erklärt werden können und weniger durch salzinduzierte Änderungen der Proteinsekundärstruktur.

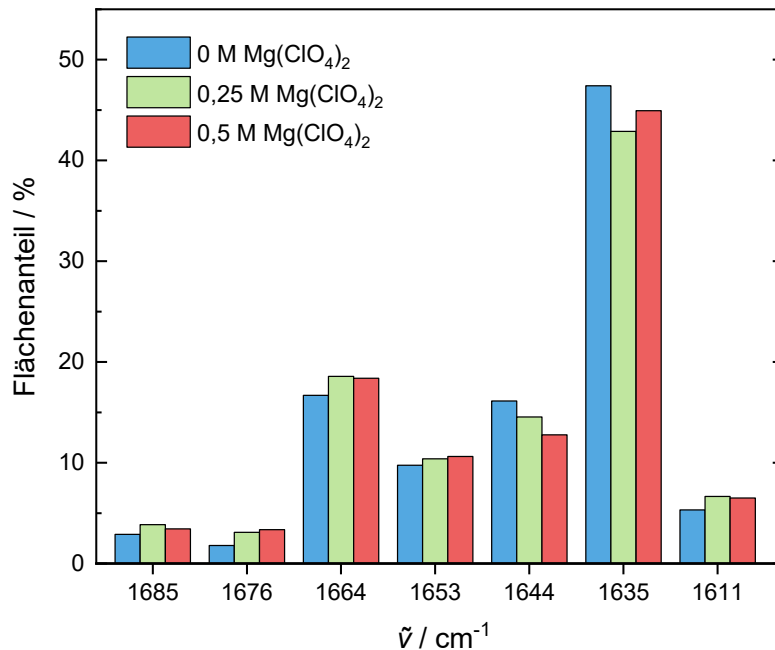


Abbildung 3.8: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur von γ D-Kristallin. Relative Anteile der Sekundärstrukturelemente (in %) von γ D-Kristallin in 50 mM Tris (pD 7,4) sowie nach Zugabe von 250 bzw. 500 mM Magnesiumperchlorat. Die Position der Subbanden wird den folgenden Sekundärstrukturelementen zugeordnet: β -Faltblätter (1685, 1676, 1635 cm^{-1}), β -Schleifen (1664 cm^{-1}), α -Helices (1653 cm^{-1}), ungeordnete Strukturen (1644 cm^{-1}) und exponierte β -Faltblätter (1611 cm^{-1}).

Im Falle des Proteins α -Elastin mit seiner ungeordneten, weitgehend hydrophoben Struktur erfolgte die Strukturuntersuchung nicht. Für das teilweise ungeordnete Protein LAF-1 allerdings wurde die FTIR-spektroskopische Untersuchung in Magnesiumperchlorat ebenfalls durchgeführt, die im nachfolgenden Abschnitt gezeigt ist.

3.3.5 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Magnesiumperchlorat auf die Sekundärstruktur des Proteins LAF-1

Wie bei der Kristallin-Untersuchung erfolgten die FTIR-spektroskopischen Messungen des Proteins LAF-1 in Puffer und zusätzlich in Pufferlösung, welche Magnesiumperchlorat in den Konzentrationen 250 bzw. 500 mM enthielt. Als LAF-1-Konzentration wurde eine Konzentration von 45 mg/mL gewählt. In den FTIR-Rohmessungen (Abb. 3.9 A, C) ist die Amid I'-Bande allerdings nicht sichtbar, stattdessen ist eine deutliche Bande im Bereich zwischen 1600 und 1500 cm^{-1} zu erkennen.

Im üblicherweise betrachteten Bereich der Sekundärstrukturanalyse zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} ist lediglich eine Schulter zu erkennen. Die Normierung der Fläche auf 1 hat entsprechend nicht funktioniert. Vermutlich war die Proteinprobe durch die in den verwendeten Ni-NTA-Aufreinigungssäulen enthaltene Substanz Nitrilotriessigsäure (NTA) verunreinigt, welche in diesem Bereich ebenfalls eine Absorptionsbande aufweist.^[113] Der Ansatz der zusätzlichen Aufreinigung über die Methode der Gelfiltrationschromatographie, wie sie bei der Aufreinigung des Proteins γ D-Kristallin bereits durchgeführt wurde, schuf keine Abhilfe.

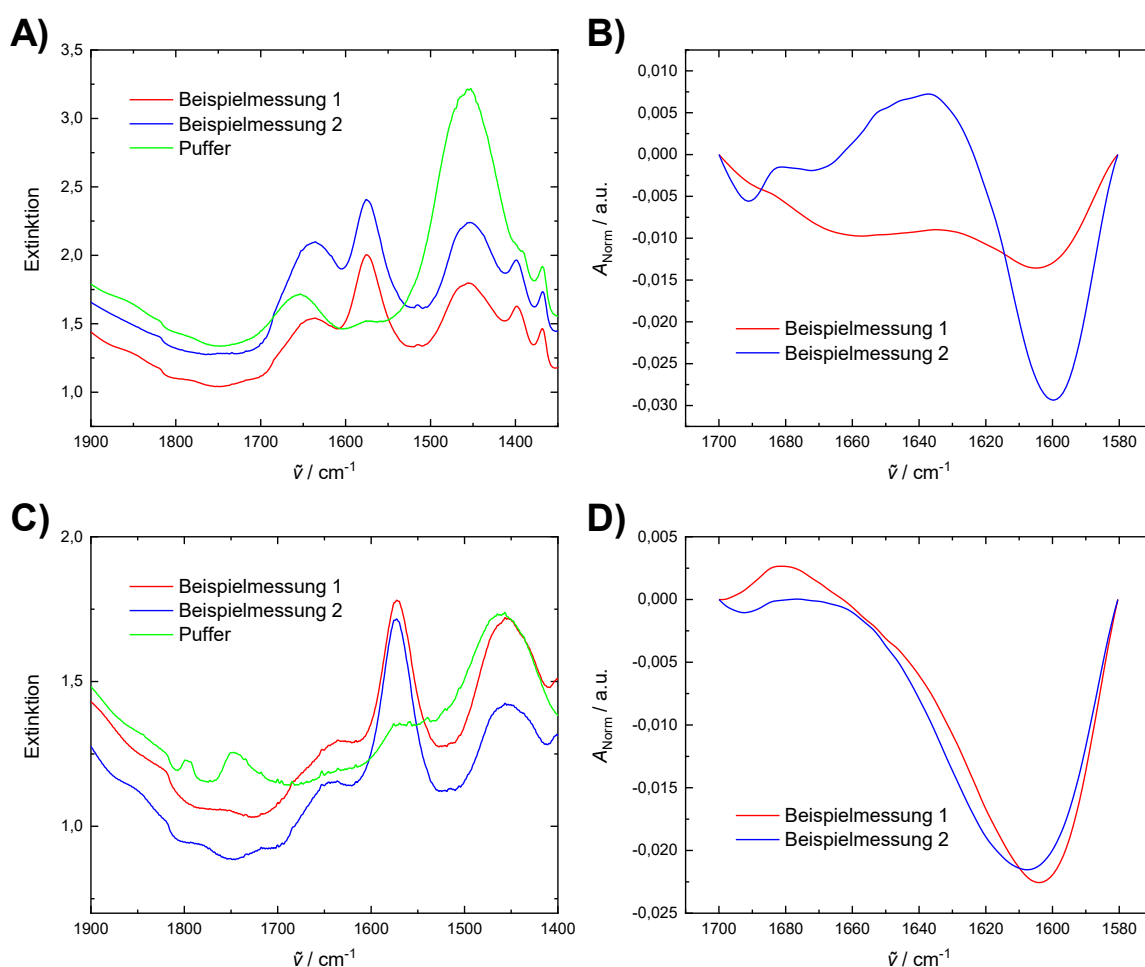


Abbildung 3.9: FTIR-Spektroskopie von LAF-1 in Magnesiumperchlorat. FTIR-spektroskopische Rohmessung von 45 mg/mL LAF-1 in 20 mM Tris (pD 7,4) (A) und nach Zugabe von 500 mM Magnesiumperchlorat (C). Normierte Amid-I'-Bande der FTIR-Messung von LAF-1 in Puffer (B) und nach Zugabe von 500 mM Magnesiumperchlorat (D). In allen Diagrammen sind neben der Puffermessung außerdem noch zwei beispielhafte Proteinmessungen gezeigt. Die Messungen erfolgten bei 23 °C.

3.4 Diskussion

Im Folgenden wird eine mögliche Erklärung der Effekte von hohen Salzkonzentrationen und Druck auf die Entmischungsphänomene vorgestellt. Im Allgemeinen sind neben der hydrophobgetriebenen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische, Kationen- π - und π - π -Wechselwirkungen sowohl für die biomolekulare Kondensatstruktur als auch die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung wichtig und es ist zu erwarten, dass alle diese Wechselwirkungen in unterschiedlichem Maße durch hohe Salzkonzentrationen und hohen hydrostatischen Druck beeinflusst werden. Neben der Druckabhängigkeit dieser verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen werden auch Hohlraumvolumina und Hydratationseffekte für die beobachteten Druckeffekte verantwortlich sein, da sie das Mischungsvolumen des Systems stark beeinflussen. Insbesondere kann eine lockere Packung von Proteinen in den Tröpfchen der kondensierten Phase ein relativ großes fluktuierendes Hohlraumvolumen erzeugen, was zu einer verringerten Stabilität des Kondensats unter hohem hydrostatischem Druck führt. Darüber hinaus könnten Konformationsänderungen der Proteine bei Zugabe von Salz (z. B. Chaotrope) und bei hohen Drücken eine Rolle spielen. Druckeffekte auf monomere Proteine werden in der Regel erst bei viel höheren Drücken beobachtet.^[114–117]

Ein wesentlicher Effekt von Salzen auf die elektrostatisch gesteuerte Flüssig-Flüssig-Phasentrennung dürfte die abschirmende Wirkung von positiv und negativ geladenen Seitenketten der Polypeptide sein. Die klassische Debye-Hückel-Theorie^[118], die auf der Poisson-Boltzmann (PB) Mean-Field-Näherung basiert und die Abschirmung von Ladungen beschreibt, gilt nur für verdünnte Elektrolyte und sagt voraus, dass die Wechselwirkung zwischen zwei geladenen Oberflächen in einem Elektrolyten exponentiell mit ihrem Abstand abnimmt, und zwar mit einer Abschirmlänge, die als Debye-Länge bezeichnet wird und durch^[119–121]

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon k_B T}{4\pi q^2 c_{\text{Ion}}}} \quad (1)$$

beschrieben wird, wobei ϵ die Dielektrizitätskonstante der konzentrationsabhängigen Lösung darstellt, k_B die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, $q = ze$ die Ionenladung (z ihre Wertigkeit, e die Elementarladung) und c_{Ion} die Ionenkonzentration. Der Term $l_B = q^2/(\epsilon k_B T)$ wird auch als Bjerrum-Länge bezeichnet, welche dem Abstand entspricht, bei dem die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Ionen in einem dielektrischen Medium mit

der Dielektrizitätskonstante ϵ gleich der thermischen Energie $k_B T$ ist. In einer Lösung von mehreren Ionen i mit der molaren Konzentration $c_{\text{Ion},i}$ und der Wertigkeit z_i wird die Ionenstärke $I = 0,5 \sum_i c_{\text{Ion},i} z_i^2$ eingeführt. Da I eine Valenzquadrat-gewichtete Konzentration der Ionen darstellt, ergibt sich, dass mehrwertige Ionen einen stärkeren Einfluss auf λ_D haben als einwertige Ionen (z. B. für $c_{\text{Ion}} = 0,1$ M in Wasser bei 25 °C, $\lambda_D \approx 1$ nm für ein 1:1-Salz und $\lambda_D \approx 0,5$ nm für ein 1:2- oder 2:2-Salz).

Die Debye-Länge in wässrigen 1:1-Elektrolytlösungen stimmt mit experimentellen Messungen bis zu Salzkonzentrationen von etwa 1 M überein, wo $\lambda_D \approx 0,3$ nm beträgt.^[119] Bei 4 M Salz würde $\lambda_D \approx 0,15$ nm betragen. Bei solch kurzen Abständen spielen jedoch Wechselwirkungen mit kurzer Reichweite eine Rolle, wie van-der-Waals-Wechselwirkungen, Ionenkorrelationen und Hydratationskräfte.^[118–120] Jüngste Oberflächenkraftmessungen und theoretische Berechnungen haben im Gegensatz zur PB-Mean-Field-Theorie gezeigt, dass die Wechselwirkungskraft zwischen geladenen Oberflächen in einer hochkonzentrierten ionischen Flüssigkeit immer noch exponentiell abklingt, allerdings mit einer Abschirmlänge λ_s , die um Größenordnungen größer sein kann als die Debye-Länge λ_D und sogar mit der Elektrolytkonzentration zunimmt, was in direktem Widerspruch zur Vorhersage der PB-Theorie steht. Es wurde festgestellt, dass die Abschirmlänge λ_s der Skalierungsbeziehung folgt^[119,120]

$$\lambda_s = \frac{q^2}{4\pi\epsilon k_B T} a_{\text{Ion}}^3 c_{\text{Ion}}, \quad (2)$$

wobei a_{Ion} der Ionendurchmesser ist. In solch konzentrierten Elektrolytlösungen sind die Ionen räumlich stark korreliert. Messungen ergaben recht große Abklinglängen von 3-12 nm des elektrischen Potentials in konzentrierten Salzlösungen (2-10 M NaCl/LiCl), wobei λ_s mit steigender Salzkonzentration zunimmt. Diesem Skalierungsgesetz folgend können bei konstantem ϵ , T und c_{Ion} die folgenden Änderungen der Abschirmlängen für die in dieser Studie getesteten Ionen jenseits der molaren Konzentrationen erwartet werden: $\lambda_s(\text{Mg}^{2+})/\lambda_s(\text{Na}^+) = 6,8$, $\lambda_s(\text{SO}_4^{2-})/\lambda_s(\text{Cl}^-) = 6,1$ und $\lambda_s(\text{SO}_4^{2-})/\lambda_s(\text{ClO}_4^-) = 9,9$, wobei die Werte für die Radien der entsprechenden hydratisierten Ionen verwendet wurden.^[119,122]

Neben den allgemeinen elektrostatischen Effekten können auch spezifische Wechselwirkungen von Salzen mit den Proteinen wirksam sein, die typischerweise bei hohen Konzentrationen vorherrschen und häufig im Rahmen der Hofmeister-Reihe diskutiert werden.^[123–126] Die Hofmeister-Reihe für Ionen ist nach der Fähigkeit von Kationen ($\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$) und Anionen ($\text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$) geordnet, bei mittelhohen Konzen-

3 Biomolekulare Kondensate unter extremen Marssalz-Bedingungen

trationen die Löslichkeit von Proteinen in Wasser zu verringern („Salting-out“-Effekt), wobei Anionen eine größere Wirkung zu haben scheinen als Kationen.^[123,124] Es wurde vermutet, dass Salze, die in der Hofmeister-Reihe weiter oben stehen, die Löslichkeit von Proteinen in Lösung erhöhen, indem sie die Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen effektiv schwächen („Salting-in“-Effekt). Daher sollte auch die Bildung von Proteinkondensaten mit Salzen höherer Ordnung in dieser Reihe benachteiligt sein. Darüber hinaus sind stark chaotrope Anionen wie Perchlorate (ClO_4^-), die aufgrund ihrer Fähigkeit, mit der Oberfläche von Biomakromolekülen zu interagieren, nachweislich als Proteindenaturierungsmittel wirken, ebenfalls in der Lage, die Wasserstruktur zu stören, und können daher die Wasserstoffbrückenbindungen, einschließlich der des Wassers selbst, beeinträchtigen.^[103]

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des teilweise ungeordneten Proteins LAF-1 mit seiner N-terminalen RG-reichen Domäne geringer Komplexität wird ebenfalls weitgehend durch elektrostatische Wechselwirkungen angetrieben. Daher ist zu erwarten, dass die Wechselwirkungen in den geladenen Blöcken, welche positiv und negativ geladene Reste enthalten, bei hohen Salzkonzentrationen durch Ladungsabschirmung gestört werden. Tatsächlich zeigten die lichtmikroskopischen Daten, dass 1-3 M NaCl zum Verschwinden des phasentrennten Zustands führt. Bemerkenswert ist, dass oberhalb von 4 M NaCl die Tröpfchenphase wieder auftrat, d. h. es wurde ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet. Die Tröpfchenphase war sowohl bei niedrigen (z. B. 125 mM) als auch bei hohen (z. B. 4,5 M) NaCl-Konzentrationen druckstabil bis zu 1 kbar. Bei diesen hohen Salzkonzentrationen, bei denen ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet wurde und die Ladungsabschirmung immer wichtiger wird, dürften attraktive van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen an Bedeutung gewinnen. Darüber hinaus kann bei diesen hohen Salzkonzentrationen, bei denen der Poisson-Boltzmann-Ansatz nicht mehr gültig ist, eine Vergrößerung der Abschirmungslänge bis in den Bereich von 10 nm zur Stabilisierung der Flüssigkeitströpfchen beitragen, möglicherweise durch Einbezug von π - π -Wechselwirkungen und Wechselwirkungen zwischen kationischen Aminosäuren und aromatischen Resten (Kationen- π -Wechselwirkungen). LAF-1 zeigte in den sulfatsalzhaltigen Puffern (Na_2SO_4 und MgSO_4) bei keiner der getesteten Salzkonzentrationen eine Tröpfchenbildung. In den Perchloratsalzen (NaClO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) hingegen bildete das Protein immer noch Tröpfchen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Abschirmungslänge im Vergleich zu den zweiwertigen Salzen größer ist. Eine Erhöhung der Perchloratkonzentration förderte jedoch die Aggregation des Proteins, da mehr und mehr amorphe Strukturen beobachtet werden konnten. Bei Perchloratkonzentrationen über 2 M wurden keine Tröpfchen

mehr beobachtet. Insgesamt ermöglichen die Mars-Perchloratsalze die Persistenz der Tröpfchenphase von LAF-1 noch bei hundertmillimolaren Konzentrationen.

Die phasengetrennte kondensierte Phase des globulären γ D-Kristallins bei niedrigen Temperaturen wird durch transiente elektrostatische, hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Proteinmolekülen stabilisiert. Die bei 150 mM NaCl noch vorhandenen Flüssigkeitströpfchen lösten sich jenseits von 1 M NaCl auf. Oberhalb von 3 M NaCl ist schließlich die Löslichkeitsgrenze des Proteins erreicht und das Protein fiel aus. Ähnlich wie bei MgSO_4 (und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$), das sowohl bei mittleren als auch bei hohen Salzkonzentrationen zum Verschwinden der Tröpfchen führte, verschwand auch die Tröpfchenphase in 250 mM Na_2SO_4 . In Anwesenheit von 500 mM Na_2SO_4 tauchte die Tröpfchenphase jedoch wieder auf; d. h. der Ersatz von Mg^{2+} durch das weniger „einsalzende“ Kation Na^+ zeigt bei hohen Natriumsulfatkonzentrationen einen wiedereintretenden Phasenübergang. Ein ähnliches Szenario wurde für das Natriumperchloratsalz beobachtet. Eine wiedereintretende 2-Phasenregion wurde bei sehr hohen Salzkonzentrationen oberhalb von 4 M NaClO_4 beobachtet, wo Proteintröpfchen mit amorphen Aggregaten koexistierten. Alle Marssalze führten bei mittelhohen Salzkonzentrationen (250 mM) zum Verschwinden der Tröpfchenphase von γ D-Kristallin, aber die Entmischung (manchmal begleitet von amorphen Ausfällungen) konnte auch bei molaren Konzentrationen der Salze beobachtet werden. Abgesehen von der ausgeprägten Druckwirkung auf die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Proteins in reiner Pufferlösung bei 150 mM NaCl, hatte der Druck keinen Einfluss auf das Phasenverhalten in anderen Salzlösungen.

Das Phasenverhalten des mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur entmischenden Systems α -Elastin wird weitgehend durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt. Die Zugabe der ein- und zweiwertigen Salze hatte selbst bei sehr hohen Konzentrationen keine nennenswerte Auswirkung auf die Tröpfchenbildung des Systems, was zeigt, dass durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierte Flüssigphasentröpfchen eher unempfindlich gegenüber extremer Salinität sind. Bei molaren Salzkonzentrationen nahm die Anzahl der Tröpfchen jedoch ab. Während bei Temperaturen unter 32 °C ein druckinduzierter wiedereintretender Phasenübergang beobachtet wurde, wurde bei 32 °C und darüber kein Verschwinden der Tröpfchenphase beobachtet, was mit Literaturdaten übereinstimmt.^[87] Auch eine Erhöhung des Drucks nach Zugabe der salzhaltigen Lösungen hatte bis zu 1000 bar keinen Einfluss auf die Tröpfchenphase. Interessanterweise ermöglichen NaCl und alle Marssalze in der ungeordneten, hydrophobisch stabilisierten Tröpfchenphase von α -Elastin die Persistenz der Tröpfchenphase sogar bis zu molaren Konzentrationen und Drücken bis in den Kilobarbereich. Für hohe Salzkonzentrationen wurde vorgeschlagen, dass die Tröpf-

chenbildung grundsätzlich möglich ist und hauptsächlich durch hydrophobe und nichtionische Wechselwirkungen (einschließlich π - π - und Kationen- π -Wechselwirkungen) angetrieben wird.^[127] Darüber hinaus ist bei multimolaren Konzentrationen aufgrund von Ionenkorrelationseffekten wahrscheinlich eine Zunahme der Abschirmungslänge zu beobachten, was das Auftreten der wiedereintretenden Tröpfchenbildung unterstützen dürfte.^[119,120]

3.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die treibende Kraft für die Phasentrennung von Proteinen sowohl auf empfindliche Weise von der Aminosäuresequenz, d. h. der Art der Aminosäurereste und ihrer Anordnung, von Temperatur und Druck als auch stark von der Art des Salzes und seiner Konzentration in der Kondensatumgebung abhängt. Es lässt sich vermuten, dass bei diesen hohen Salzkonzentrationen, wie sie im Marsboden und in ähnlich harschen Umgebungen auf der Erde anzutreffen sind, attraktive kurzreichweitige Kräfte sowie hydrophobe und π -gesteuerte Wechselwirkungen die Entmischung für geeignete Polypeptidsequenzen aufrechterhalten können. Die Anionen und Kationen in der Hofmeister-Reihe haben nicht nur auf die Stabilität des Proteins unterschiedliche Auswirkungen, sondern auch auf die Stabilität der Tröpfchenphase, d. h. auf die Lage und Form der Phasengrenzen in der 2-Phasenregion. Auch Gegenioneneffekte könnten von Bedeutung sein, sind aber bisher weniger untersucht worden.^[124] Außerdem konnte mittels FTIR-spektroskopischen Messungen im Falle des Proteins γ D-Kristallin gezeigt werden, dass die in Magnesiumperchlorat gemachten Beobachtungen nicht etwa durch salzinduzierte Änderungen der Proteinsekundärstruktur bewirkt wurden, sondern vielmehr durch einen Effekt des Salzes auf die entmischungsvermittelnden Interaktionen erklärt werden können. Für das Protein LAF-1 hingegen hatte die FTIR-spektroskopische Analyse nicht funktioniert, da vermutlich die in den Aufreinigungssäulen enthaltene Substanz NTA an das Protein gebunden hat und die Spektren deshalb nicht verwertbar waren.

KAPITEL 4

Dielektrische Untersuchungen am phasenseparierten Zustand von α - Elastin

4.1 Einleitung

Mit einem Anteil von mehr als 65 % der Erdoberfläche stellt die Tiefsee, welche 200 bis 11000 m tief reicht, das größte Biotop des Planeten dar.^[128] Auch der menschliche Körper besitzt einen Wasseranteil von ca. 60 %^[129] und so überrascht es nicht, dass das Vorkommen von Wasser die Voraussetzung von Leben bildet.^[130,131]

Das kennzeichnende Merkmal von proteingeformten Kondensaten, die durch die Entmischung einer zunächst homogenen wässrigen Lösung entstehen, stellen das flüssigkeitsähnliche Verhalten und alle damit verbundenen Eigenschaften (Fusion, Fission, Oberflächenbenetzung etc.) dar. Was aber passiert mit Wasser, wenn die Kondensate entstehen? Durchdringt Wasser die Tröpfchen oder wird es zu großen Teilen aus diesen ausgeschlossen? Welcher Wasseranteil lässt sich bestimmen und was ist die Struktur und Dynamik vom Wasser, das in den Tröpfchen verbleibt? All dies sind noch offene, aber äußerst relevante Fragen der Kondensatforschung, da durch den Wassergehalt die chemische Umgebung und die Polarität in den Tröpfchen bestimmt wird, welche wiederum die Geschwindigkeit von Reaktionen und das Partitioning von Molekülen in Tröpfchen beeinflussen.^[16,31] Erste Untersuchungen in diese Richtung konnten für das Protein LAF-1 bereits eine Polarität ähnlich zu Methanol belegen.^[132] Bei diesen Messungen wurde der solvatochromatische Farbstoff Prodan eingesetzt, dessen Emissionswellenlänge in Abhängigkeit der Umgebungspolarität variiert.^[132] Durch einen Vergleich der Prodan-Emissionswellenlänge in den Tröpfchen mit den Emissionswellenlängen des Farbstoffs in verschiedenen Lösungsmitteln wurde die relative Polarität innerhalb der Tröpfchen zu 0,70 (vgl. 1,0 für Wasser) bestimmt. Eine wichtige Methode zur Untersuchung von Wasser- und Proteindynamiken ist die Methode der dielektrischen Spektroskopie, bei der die Permittivität (ϵ') einer Probe gemessen wird. Bei der dielektrischen Spektroskopie wird ausgenutzt, dass Ladungen in einem elektrischen Feld ausgerichtet oder induziert werden, was als Polarisierung bezeichnet wird. Man unterscheidet insgesamt vier verschiedene Polarisationsarten: Raum-Ladungs-Polarisation, Dipol-Polarisation, Ion/Atom-Polarisation und elektronische Polarisation.^[133] Die elektronische Polarisation betrifft Elektronen und Kerne eines Atoms, die Ion/Atom-Polarisation Ionen (zum Beispiel in einem Ionenkristall) und die Dipol-Polarisation Dipole wie das Wassermolekül, aber auch wesentlich größere Moleküle wie zum Beispiel Proteine. Mit der Raum-Ladungs-Polarisation ist die Akkumulation von Ladungen an Elektroden und Grenzflächen gemeint.^[133] All diese Polarisationsbeiträge bilden zusammen die Permittivität (dielektrische Konstante) einer Substanz.^[133] Wird eine Substanz also beispielsweise zwischen zwei Elektrodenplatten positioniert, dann induziert das einwirkende elektrische Feld dessen Polarisierung. Wechselt das elektrische Feld die Richtung, schwingen die Moleküle entspre-

chend mit, was mit dem Begriff „Reorientierung“ beschrieben wird. Eine Frequenzerhöhung der Richtungsänderung hat zur Folge, dass Polarisationsbeiträge verloren gehen (Abb. 4.1), weil die aufgezählten Polarisationsarten der Richtungsänderung unterschiedlich schnell folgen können.^[133] Für die dielektrische Spektroskopie an Proteinen besonders relevant ist die Dipol-Polarisation, dessen Permittivitätsbeitrag sich in diesem Fall in drei Relaxationen auffächert, die β -, δ - und γ -Relaxation.^[134] Bei einer Frequenzerhöhung werden diese Relaxationen in oben genannter Reihenfolge aufgelöst. Die β -Relaxation bezeichnet die Reorientierungsbewegung von Proteinen und die γ -Relaxation die der Bulkwassermoleküle, während man beim δ -Prozess davon ausgeht, dass es sich dabei um die Reorientierung von Hydrationswasser handelt.^[134] Große Moleküle wie Proteine können den Richtungsänderungen des elektrischen Feldes weniger gut folgen als durch die Proteinoberfläche gebundenes Wasser (Hydrationswasser) und dieses wiederum weniger schnell als Bulkwassermoleküle. Die Reorientierung der Proteinmoleküle („rotational tumbling“) mit ihren oftmals großen permanenten Dipolmomenten erfolgt, abhängig von der Molmasse, bei etwa 10^6 - 10^7 Hz. Die δ -Relaxation, welche die dynamische Wechselwirkung zwischen Protein und Hydratwasser beschreibt (Hydrationsbeitrag der Proteine), erfolgt bei etwa 10^7 - 10^8 Hz, während die Reorientierungsdynamik von Bulkwassermolekülen bei 10^9 - 10^{10} Hz liegt.

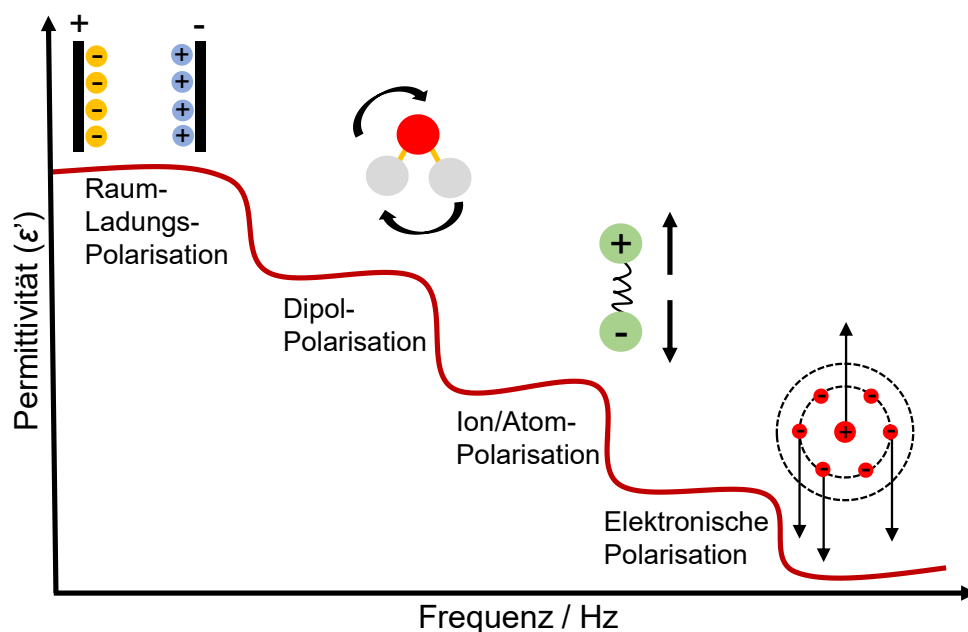


Abbildung 4.1: Schematische Abbildung eines dielektrischen Spektrums. Alle im Diagramm aufgeführten verschiedenen Polarisationsarten tragen zur Permittivität einer Substanz bei. In einem wechselnden elektrischen Feld gehen die langsameren Beiträge mit steigender Frequenz verloren und ihre Relaxation kann spektroskopisch aufgelöst werden. Die Beiträge der verschiedenen Polarisationsarten sind, anders als hier dargestellt, nicht gleich groß. Adaptiert aus Referenz.^[133]

In diesem Kapitel wird die dielektrische Untersuchung am phasenseparierten Zustand des Proteins α -Elastin, das bereits im vorherigen Kapitel vorgestellt wurde, gezeigt. Die Untersuchung erfolgte in einem Frequenzbereich von 1 bis 10^9 Hertz und diente der Bestimmung der Permittivität innerhalb der Tröpfchen.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Probenpräparation

Für die Messungen wurde das lyophilisierte Elastin-Pulver (AE17, Elastin Products. Co. Inc.) in einer Konzentration von 20 mg/mL bzw. 200 mg/mL in Reinstwasser (Reinstwasseranlage PURELAB flex) aufgenommen. Zur Lösung des Proteinpulvers wurde die Probe gevortext und zwischendurch gekühlt. Abschließend wurde die Lösung mithilfe einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

4.2.2 Temperaturabhängige Turbiditätsmessungen

Temperaturabhängige Turbiditätsmessungen wurden am UV/Vis-Spektrometer UV1800 (Shimadzu) mit einer Quarzküvette der Schichtdicke 0,1 cm durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer spektralen Auflösung von 1 nm in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm aufgenommen. Turbiditätsbezogene Aussagen beziehen sich nur auf die Absorbanzwerte bei $\lambda = 400$ nm. Die Temperatur wurde über ein externes Wasserbad reguliert und durch Einsatz eines Temperaturmessgeräts, das mit einem Fühler ausgestattet war, direkt in der Probenlösung gemessen. Von 5 °C ausgehend wurde alle 5 °C-Schritte ein Spektrum aufgenommen, bis eine Temperatur von 45 °C erreicht wurde. Die Probenkammer wurde außerdem mit Stickstoff gespült, um Wasserkondensation zu vermeiden.

4.2.3 Dielektrische Messungen

Die dielektrischen Messungen erfolgten unter Assistenz von Philipp Münzner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Böhmer (Experimentelle Physik 3, TU Dortmund). Sie teilen sich in niederfrequente und hochfrequente Messungen auf und umspannen insgesamt einen Frequenzbereich von 10^0 bis 10^9 Hz. Wenige Tropfen der Probenlösung wurden hierfür zwischen zwei Kondensatorplatten platziert, zwischen denen eine Wechselstromspannung angelegt war. Die niederfrequenten Messungen, welche in einem Frequenzbereich von 10^0

bis 10^6 Hz durchgeführt wurden, erfolgten mit dem Alpha-A Analyser (Novocontrol). Die Hochfrequenzmessungen in einem Frequenzbereich von 10^6 bis 10^9 Hz wurden mit einem Agilent E4991A RF impedance analyzer (Novocontrol) durchgeführt. Mithilfe des Quatro Cryosystem (Novocontrol) wurde die Temperatur im Kondensator auf 5 bzw. 35 °C eingestellt. Die Temperatur-Äquilibrierungszeit betrug dabei 5 Minuten. Neben den Elastin-haltigen Lösungen ($c = 20$ mg/mL und $c = 200$ mg/mL) wurde auch das Reinstwasser als Referenz gemessen. Jede Messung erfolgte dreimal.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Die direkte Bestimmung der Permittivität innerhalb der Tröpfchen ist nicht möglich. Um aber zumindest eine qualitative Aussage über die Permittivität in diesen treffen zu können, wird die zu bestimmende Permittivität definiert als das mit dem Volumenanteil gewichtete arithmetische Mittel aus der Permittivität innerhalb der Kondensate und der sie umgebenden verdünnten Phase. Ausgenutzt wird hierbei, dass sich die Permittivität von Reinstwasser (~ 80 bei Raumtemperatur) signifikant von der von Proteinen ($\sim 2-4$) unterscheidet^[135] und zum anderen, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen bei zwei verschiedenen Konzentrationen c_1 und c_2 ($c_1 \ll c_2$) zwei verschiedene Volumenanteile φ_1 und φ_2 ($\varphi_1 \ll \varphi_2$) hervorbringt. Erfolgt die Kondensatbildung unter großem Wasserausschluss, wird die Permittivität mit steigender Proteinkonzentration drastisch absinken. Ist Wasser zu großen Teilen in den Tröpfchen enthalten, wird die Permittivität einer entmischten Proteinlösung mit zunehmender Konzentration annähernd linear abnehmen.^[135]

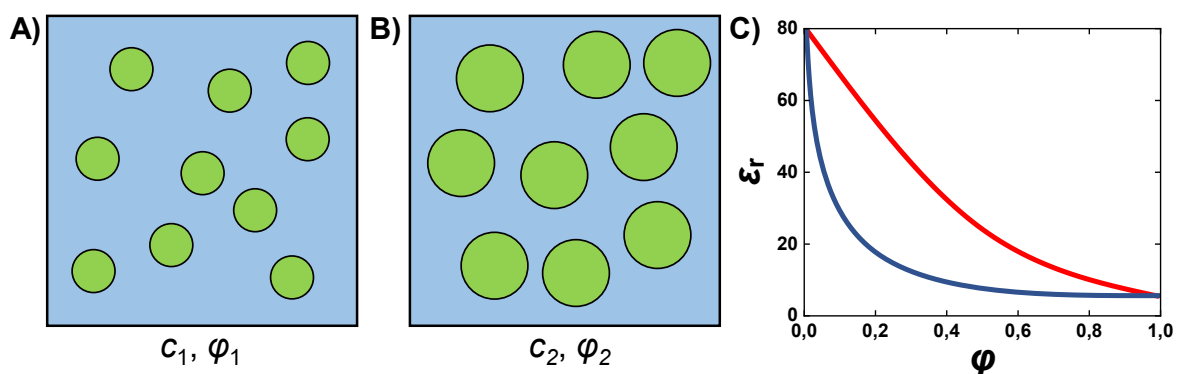


Abbildung 4.2: Dem Projekt zugrundeliegende Überlegungen. (A) und (B) Ein entmischtes System nimmt bei einer Erhöhung der Konzentration ($c_1 < c_2$) ein größeres Volumen ein. (C) Verhalten der Permittivität unter der Annahme zweier verschiedener Szenarien. Die rote Linie zeigt die Permittivität, wenn Wasser in den Kondensaten enthalten ist und die blaue Linie zeigt, wie sich die Permittivität verhält, wenn Wasser ausgeschlossen wird. Adaptiert aus Referenz.^[135]

4.3.1 Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Wasser

Entsprechend der oben dargestellten Projektüberlegungen wurde entschieden, die dielektrischen Messungen bei einer Proteinkonzentration von $c_1 = 20$ mg/mL und $c_2 = 200$ mg/mL α -Elastin durchzuführen. Da freie Ionen bei den dielektrischen Messungen stören, wurde der sonst für das Protein genutzte Puffer (s. Kapitel 3.2) gegen ultrareines Wasser ausgetauscht. Auf diese Weise werden die Beiträge der Raum-Ladungs-Polarisation im Spektrum vermindert und die weitaus interessanteren Relaxationen (β -, δ -, γ -Prozesse) können besser aufgelöst werden. Dielektrische Beiträge, die auf der Relaxation von Gegenionen beruhen (Gegenionendiffusion), erfolgen typischerweise im sub-kHz-Bereich (α -Relaxation). Eine notwendige Bedingung, die sich für die dielektrischen Messungen dieses Projektes ergibt, ist die Durchführung dieser am phasenseparierten Zustand von α -Elastin. Aus diesem Grund wurde UV/Vis-spektroskopisch überprüft, ob die Entmischung des Proteins auch in Reinstwasser stattfindet. Die temperaturabhängigen Turbiditätsmessungen (Abb. 4.3) bestätigen, dass die Phasentrennung von Elastin auch in reinem Wasser erfolgt. Sie wird, wie in Puffer auch, durch erhöhte Proteinkonzentrationen und erhöhte Temperaturen begünstigt.

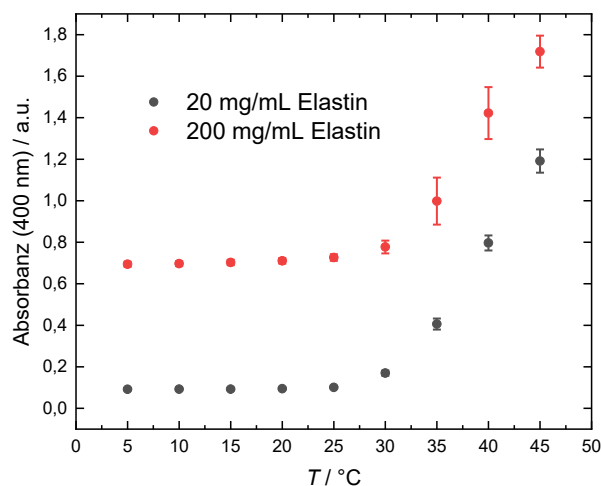


Abbildung 4.3: Temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von α -Elastin in Wasser. 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 20 und 200 mg/mL α -Elastin in Wasser als Funktion der Temperatur.

4.3.2 Dielektrische Messungen an α -Elastin in Wasser

Die dielektrischen Messungen mussten gerätetechnisch in zwei Schritten durchgeführt werden. Die hier als hochfrequent bezeichneten Messungen fanden in einem Frequenzbereich

von 10^6 bis 10^9 Hz statt und die als niederfrequent bezeichneten Messungen umspannten einen Frequenzbereich von 10^0 bis 10^6 Hz. Um ein ganzheitliches dielektrisches Spektrum zu erhalten, wurden die Spektren beider Messungen abschließend zusammengesetzt. Die hochfrequenten Messungen (Abb. 4.4 C, D) werden dabei bezüglich ihrer Absolutwerte als zuverlässiger erachtet und aus diesem Grund unverändert gelassen. Die niederfrequenten Messungen (Abb. 4.4 A, B) hingegen wurden in y-Richtung verschoben, sodass sich eine Überlappung mit den hochfrequenten Messungen ergab. Bei der Reinstwasser-Messung lässt sich bei beiden gemessenen Temperaturen im Bereich von 10^4 bis 10^7 Hz ein Plateau erkennen, das die Permittivität von Wasser darstellt. Für 5 °C ergibt sich ein Wert von ca. 89. Mit steigender Temperatur wird die Ausrichtung der Wassermoleküle durch das elektrische Feld aufgrund der verstärkten Molekularbewegung zunehmend schwieriger. Entsprechend ergibt sich ein kleinerer Wert für Reinstwasser bei 35 °C . Hier wurde ein Wert von ca. 78 bestimmt. Beide Werte sind in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, welche eine Dielektrizitätskonstante von 85 für 5 °C und eine von 74 für 35 °C angeben.^[136]

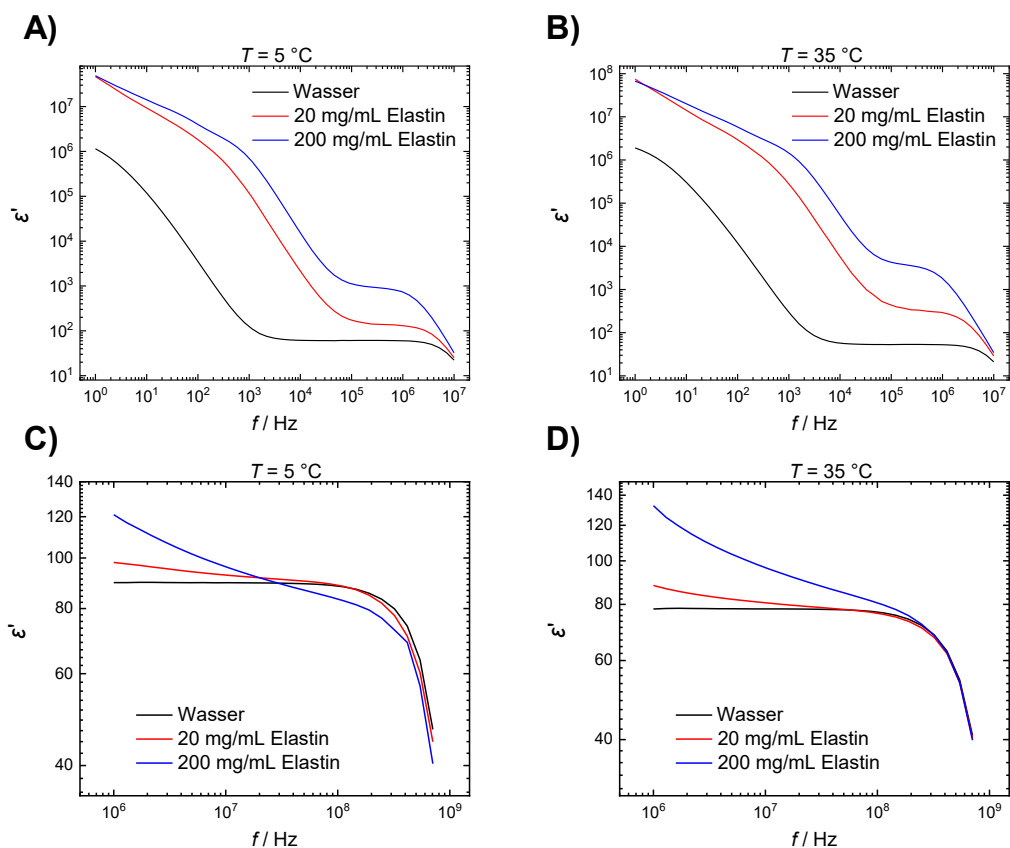


Abbildung 4.4: Nieder- und hochfrequente dielektrische Messungen von α -Elastin in Wasser. Niederfrequente ϵ' -Daten von Wasser sowie von 20 bzw. 200 mg/mL in Wasser gelöstem α -Elastin in einem Frequenzbereich von 10^0 bis 10^7 Hz bei einer Temperatur von 5 °C (A) und bei 35 °C (B). Hochfrequente ϵ' -Daten von Wasser sowie von 20 bzw. 200 mg/mL in Wasser gelöstem α -Elastin in einem Frequenzbereich von 10^6 bis 10^9 Hz bei einer Temperatur von 5 °C (C) und bei 35 °C (D).

4 Dielektrische Untersuchungen am phasenseparierten Zustand von α -Elastin

Anhand der zusammengesetzten Spektren der dielektrischen Messungen (Abb. 4.6) können dann die für das phasenseparierte System wichtigen Zusammenhänge diskutiert werden. Es lässt sich eindeutig erkennen, dass bei den Messungen am phasenseparierten Zustand von Elastin im Vergleich zur Wassermessung noch weitere Relaxationsprozesse stattfinden. Bei diesen Prozessen wird es sich sicherlich um die Relaxation des Proteins und des Hydratationswassers handeln. Aber auch bereits bei niedrigen Frequenzen bis 10^5 Hz können große Beiträge erkannt werden. Diese sind mit großer Wahrscheinlichkeit das Resultat des Maxwell-Wagner-Effekts, der in inhomogenen Lösungen auftritt. Der Maxwell-Wagner-Effekt bezeichnet die Raum-Ladungs-Polarisation von Ladungen an Grenzflächen wie sphärischen Partikeln, welche eine andere Permittivität als das umgebende Medium besitzen.^[137] In der Folge kommt es zur Anlagerung von Ladungen an diesen Grenzflächen.^[138] Maxwell-Wagner-Relaxationsbeiträge liegen meist im Bereich 10^5 - 10^6 Hz, sind jedoch hier wegen der hohen Polydispersität der Kondensattröpfchen (und eventuell auch ihrer zeitlichen Instabilität) nicht zuverlässig berechenbar.

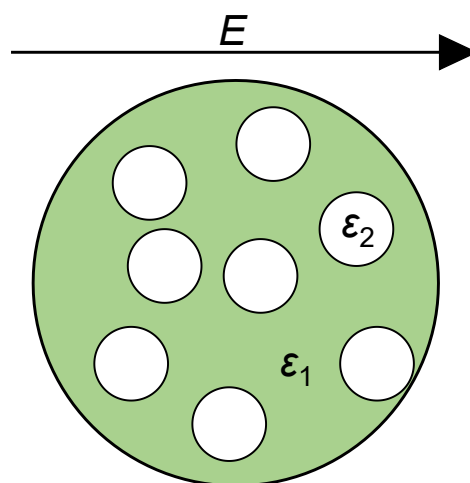


Abbildung 4.5: Maxwell-Wagner-Polarisation in inhomogenen Lösungen. An den Grenzflächen der sphärischen Partikel mit der Permittivität ϵ_2 und der sie umgebenden Lösung mit der Permittivität ϵ_1 kommt es zur Akkumulation von Ladungen. Adaptiert aus Referenz.^[137]

In den zusammengesetzten Spektren dominiert vor allem dieser Prozess, der leider eine Bestimmung der einzelnen anderen Relaxationsbeiträge nicht zulässt. Allerdings weist die starke Ausprägung dieses Effekts im phasenseparierten Zustand von α -Elastin und die Zunahme der Relaxationsbeiträge im Bereich der δ -Relaxationen darauf hin, dass zwischen der proteinreichen Phase und der sie umgebenden verdünnten Phase ein signifikanter Unterschied in den Permittivitäten besteht, welcher bei Berücksichtigung des hohen hydrophoben Anteils des Proteins von ca. 80 % durchaus sinnvoll erscheint. Die Entmischung des

Proteins trägt zu einer vergleichsweise geringeren Wassorexposition dieser hydrophoben Bereiche bei und geht wahrscheinlich mit einem deutlichen Ausschluss von Wasser einher.

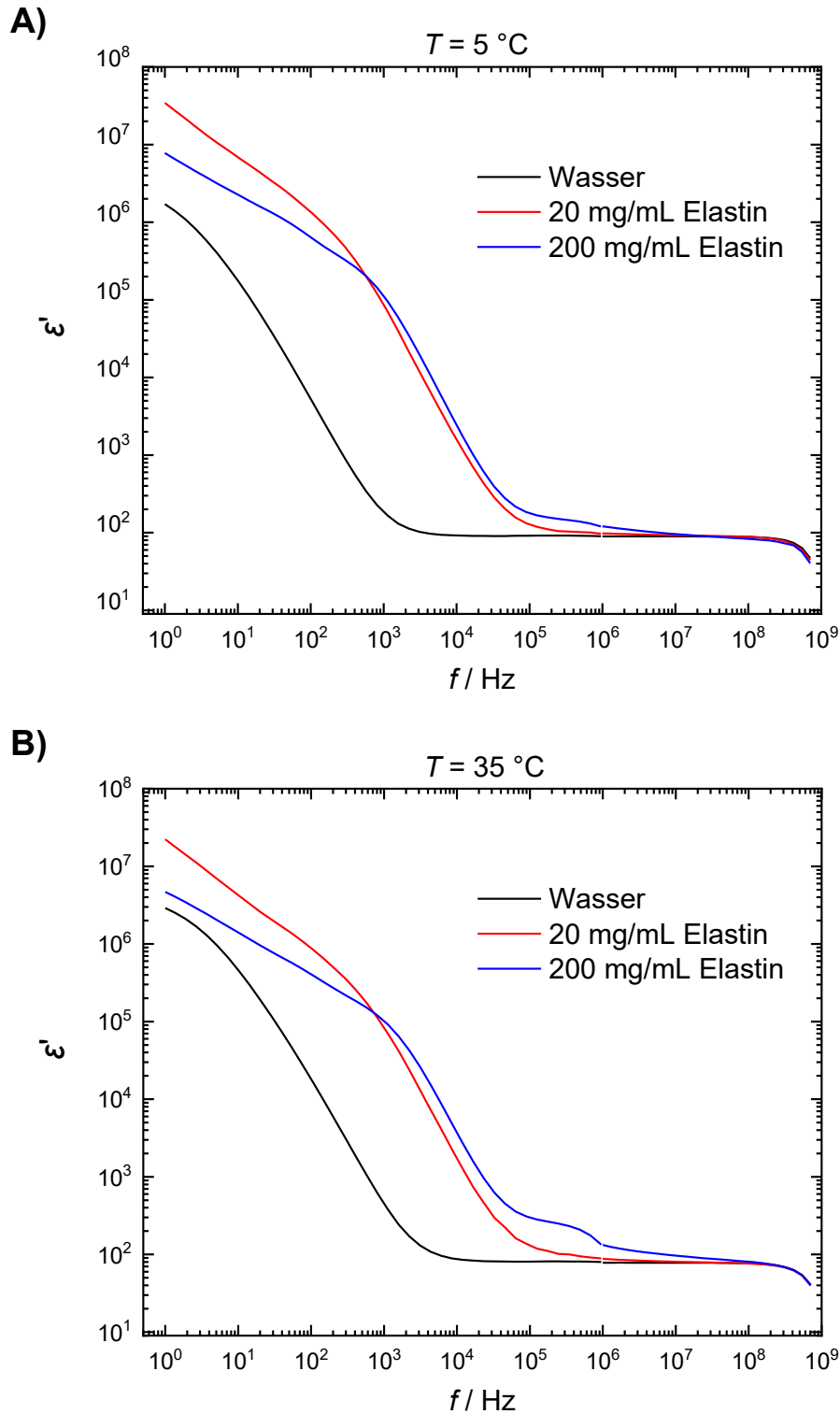


Abbildung 4.6: Dielektrische Spektroskopie von α -Elastin in Wasser. ϵ' -Daten von Wasser sowie von 20 bzw. 200 mg/mL in Wasser gelöstem α -Elastin in einem Frequenzbereich von 10^0 bis 10^9 Hz bei einer Temperatur von 5 °C (**A**) und bei 35 °C (**B**).

KAPITEL 5

Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckerhöhung

Dieses Kapitel wurde bereits in dem folgenden Journalartikel veröffentlicht:

- Z. Fetahaj, M. Jaworek, R. Oliva, R. Winter. Suppression of Liquid-Liquid Phase Separation and Aggregation of Antibodies by Modest Pressure Application. *Chem. – Eur. J.* **2022**, 28, e202201658

Die Inhalte dieser Publikation (Abbildungen und Text) wurden ins Deutsche übertragen und hier nochmals veröffentlicht. Die Wiederverwendung der Publikationsinhalte in dieser Arbeit bedarf keiner gesonderten Genehmigung.

5.1 Einleitung

Antikörper oder auch Immunglobuline (Igs) genannt, insbesondere IgGs, gehören aufgrund ihrer hohen Spezifität und geringen Toxizität zu den wichtigsten Therapeutika. Sie haben die Behandlung zahlreicher menschlicher Krankheiten revolutioniert, darunter Krebs-, Autoimmun-, Entzündungs- und Infektionserkrankungen.^[139,140] In den letzten zwei Jahren wurde auch eine große Anzahl monoklonaler Antikörper zur Bekämpfung von COVID-19 entwickelt.^[141] Leider sind Antikörper thermodynamisch nur geringfügig stabil und müssen oft in hohen Konzentrationen formuliert werden, was sie anfällig für Phasentrennung, Aggregation und Ausfällung macht. Die Gesamt-IgG-Konzentration im Blut liegt normalerweise zwischen 10-25 mg/mL. In pharmazeutischen Anwendungen werden häufig konzentrierte IgG-Lösungen zur Erzielung der gewünschten therapeutischen Wirkung benötigt. In solchen Fällen werden Antikörpermedikamente in Konzentrationen von bis zu etwa 100 mg/mL gelagert und verabreicht.^[139,140] Um die Stabilität und Haltbarkeit von Antikörpern zu bewahren und somit diese teuren proteinbasierten Therapeutika zu erhalten, werden häufig zwei Strategien angewandt. Zum einen kann die Proteinsequenz verändert werden, zum anderen können extrinsische Faktoren wie die Lösungsmittelbedingungen durch die Zugabe pharmazeutischer Hilfsstoffe (*engl.* excipients) verändert werden, die die Protein-Protein-Wechselwirkungen und damit die Stabilität der Proteinformulierung beeinflussen.^[142–144]

Bei hohen Konzentrationen und niedrigen Temperaturen vollziehen Immunglobuline eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, insbesondere, wenn sie bei niedriger Ionenstärke formuliert und bei neutralem pH-Wert in der Nähe ihres isoelektrischen Punkts gepuffert werden.^[19,140,142–147] Häufig wird beobachtet, dass solche flüssigkeitsähnlichen Tröpfchenphasen mit der Zeit gelartige Phasenübergänge von flüssig zu fest durchlaufen, die nach der Reifung (oder beschleunigt durch krankheitsassoziierte Mutationen) zur Fibrillenbildung und zur Entwicklung von pathologischen Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer, Katarakt und Antikörper-Leichtketten-Amyloidose (*engl.* antibody light-chain amyloidosis, AL amyloidosis) führen.^[3,148] Bei der AL-Amyloidose lagern sich Fibrillen in verschiedenen Organen ab, am häufigsten im Herzen und in den Nieren, und beeinträchtigen deren Funktion.^[148] Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen wird im Allgemeinen durch schwache multivalente Wechselwirkungen, wie elektrostatische, hydrophobe, π - π - und Kation- π -Wechselwirkungen^[25,34], angetrieben und stark von äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke sowie Art und Konzentration der Kosolute beeinflusst. Kürzlich wurde aber auch beobachtet, dass Proteinsysteme, die eine Entmischung durchlaufen, sehr empfindlich auf Druck reagieren können,^[17,18,90,93,149–152] was darauf hindeutet, dass eine Druck-

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckerwendung

modulation zur Unterdrückung der Tröpfchenbildung und der anschließenden irreversiblen Aggregation und Fibrillierung eingesetzt werden könnte. Im Allgemeinen ist Druck ein mildes Störmittel, das instantan und räumlich isotrop wirkt und sehr empfindlich auf volumetrische Eigenschaften des Systems reagiert, sodass kein zusätzliches Mischen erforderlich ist. Druckrampen können in beide Richtungen des Phasenübergangs angewandt werden, ohne dass sich die Zusammensetzung der Probe ändert, und die druckinduzierten Veränderungen sind im Allgemeinen vollständig reversibel.^[114–116,153]

In diesem Kapitel wurde die Wirkung von Druck auf das Immunoglobulin-Modellsystem γ -Globulin, ein polyvalentes Antikörpergemisch aus IgG, IgM und IgA, das eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung durchläuft und dessen temperatur-konzentrationsabhängiges Phasenverhalten kürzlich charakterisiert wurde, untersucht.^[19,143,146] Der Hauptbestandteil des γ -Globulins ist IgG (~80 %), ein relativ flexibles, nichtsphärisches, Y-förmiges Protein, das aus vier disulfidverknüpften Peptidketten besteht, zwei schweren Ketten von etwa 55 kDa und zwei leichten Ketten von etwa 20 kDa. Zur Bestimmung des druckabhängigen Phasenverhaltens und der Struktur des Systems wurden Lichtmikroskopie, FTIR-, UV/Vis-Absorbanz- und Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung von Hochdruck-Probenzellen durchgeführt, ergänzt durch kalorimetrische Untersuchungen. In Gegenwart des nichtionischen Crowders PEG, der, wie bereits erwähnt, intrazelluläre Crowding-Effekte nachahmt, nimmt die Anziehungskraft zwischen den Proteinmolekülen durch die Asakura-Oosawa-„Verarmungs“-Wechselwirkung (*engl.* depletion interaction) isotrop zu, was sogar bei Raumtemperatur zu einer Phasentrennung führt. Die „Verarmungs“-Kräfte entstehen durch den sterischen Ausschluss von PEG aus dem Kontaktbereich zwischen den Proteinmolekülen und sind entropischer Natur.^[70,154] Da organische Kosolute häufig als Hilfsstoffe zur Regulierung der kolloidalen Stabilität konzentrierter Antikörperlösungen verwendet werden, wurde auch der Effekt von TMAO auf die Stabilität der Tröpfchenphase von γ -Globulin untersucht. TMAO ist ein sehr wirksamer kompatibler Osmolyt, der in Organismen, die in der Tiefsee bei hohen Drücken von mehreren hundert bar leben, hochreguliert wird, um die Stabilisierung von Proteinen und deren Funktionen unter solch harschen Umweltbedingungen zu unterstützen.^[59,75,155–158]

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Chemikalien

Die in diesem Projekt genutzten Chemikalien sind samt Bezugsquelle in nachfolgender Tabelle aufgelistet. Die Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 5.1: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
γ -Globulin aus Rinderblut (G5009)	Sigma-Aldrich
PEG 1000	Carl Roth
Dansylchlorid	Invitrogen
TMAO	Sigma-Aldrich
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich

5.2.2 Probenpräparation

γ -Globulin aus Rinderblut, das ~80 % IgG, ~10 % IgM und <10 % IgA enthielt, wurde in Puffer mit 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl und 2 mM Natriumazid gelöst. Anschließend wurde die Proteinprobe 10 Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Um eine Phasentrennung zu induzieren, wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:1 mit einer 20 %-igen (w/v) PEG-1000-Lösung gemischt. Die Probe wurde für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert. Zur Konzentrationsbestimmung durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bei 280 nm wurde ein Extinktionskoeffizient von 1,4 mL/mg·cm verwendet.^[159]

5.2.3 Turbiditätsmessungen

Das UV/Vis-Spektrometer UV-1800 von Shimadzu wurde zur Durchführung der temperaturabhängigen Experimente in einer 3 mm-Quarzküvette verwendet. Zur Regulation der Temperatur in der Küvette wurde ein externes Wasserbad verwendet. Die druckabhängigen Turbiditätsmessungen bei 400 nm wurden mit dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 25 (Perkin Elmer) durchgeführt. Dazu wurde eine selbst gebaute Hochdruckzelle mit Saphirfenstern (Durchmesser 20 mm, Dicke 10 mm) verwendet und die flüssige Probe wurde durch einen Polymerfilm vom Druckmedium (flüssiges Wasser) getrennt. Der Druck im Inneren der Zelle wurde hydrostatisch mit einer Hochdruck-Handpumpe geregelt. Um die Temperatur im Inneren der Zelle zu regulieren, wurde ein externes Wasserbad verwendet.

5.2.4 Lichtmikroskopie

Hellfeld-Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Eclipse TE2000-U Mikroskop (Nikon Inc.) mit einem Nikon Plan Fluor 20x Objektiv (NA 0,45; WD 7,4) erstellt. Für die Druckanwendung wurde eine selbst gebaute Hochdruckzelle mit flachen Diamantfenstern verwendet. Der Druck wurde hydrostatisch mithilfe einer Hochdruck-Handpumpe erzeugt.

5.2.5 DSC-Messungen

Die DSC-Messungen wurden mit einem Q20-Differential-Scanning-Kalorimeter von TA Instrument (New Castle, DE) durchgeführt. Hierfür wurde ein Gesamtprobenvolumen von 20 μ L mit einer Proteinkonzentration von 100 mg/mL benötigt. Als Referenz wurde die entsprechende Pufferlösung verwendet. Sowohl die Referenz- als auch die Probenzelle wurde mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}$ C/min von 1 $^{\circ}$ auf 90 $^{\circ}$ C erhitzt.

5.2.6 Fluoreszenzmarkierung von γ -Globulin

10 mg γ -Globulin-Pulver wurden in einem Puffer mit 100 mM NaHCO₃ (pH 8,5), 1 mM CaCl₂ gelöst und 2 mg Dansylchlorid in 200 μ L Aceton. Ein fünffacher Überschuss an Dansylchlorid wurde der Proteinlösung zugesetzt. Die Lösung wurde unter Rotation 2 Stunden lang im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurde eine 5-mL-HiTrap-Entsalzungssäule mit Sephadex G-25-Harz verwendet. Die Fluoreszenzmarkierung von γ -Globulin erfolgte durch Simone Möbitz (Physikalische Chemie I, TU Dortmund).

5.2.7 Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Die Messungen der Fluoreszenzanisotropie wurden mit einem K2-Fluorometer von ISS durchgeführt. Als Anregungswellenlänge wurde 340 nm verwendet und die Emission wurde bei 500 nm erfasst. Der Anregungsmonochromator wurde auf 8 nm und die Emissionsmonochromatoren auf 4 nm eingestellt. Für die druckabhängigen Messungen wurde eine ISS-Hochdruckzelle mit 10 mm dicken Quarzfenstern verwendet. Mithilfe eines externen Wasserbades wurde die Temperatur in der Druckzelle während der Messungen konstant bei 20 $^{\circ}$ C gehalten. Eine kleine Quarzküvette, die mit der Probenlösung befüllt war, wurde mit DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und in die Hochdruckzelle gestellt. Der Druck wurde hydrostatisch mit einer Handpumpe (Druckmedium Wasser) erzeugt. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten γ -Globulins betrug bei jeder Messung 0,43 μ M, während

die Konzentration des unmarkierten γ -Globulins in einem Bereich von 0 bis 250 μM variiert wurde. Die Anwendung von hohem Druck kann zu einer Depolarisierung des Lichts führen, was auf einen Scrambling-Effekt an den Quarzfenstern der Hochdruckzelle zurückzuführen ist. Bei den für diese Messungen verwendeten Drücken sind die Scrambling-Effekte der optischen Fenster jedoch vernachlässigbar. Daher waren keine Anisotropiekorrekturen erforderlich.^[160] Der Datenfit erfolgte durch Dr. Rosario Oliva.

5.2.8 FTIR-Spektroskopie

γ -Globulin und PEG 1000 wurden mithilfe von Amicon Ultra (2 mL) Zentrifugationseinheiten mit 10 kDa Cutoff gegen D_2O dialysiert, anschließend lyophilisiert und durch Dialyse gereinigt, um die Zusatzstoffe zu entfernen. Die Antikörper/PEG-Lösungen wurden in Tris (D_2O)-Puffer (20 mM Tris, 2 mM NaN_3 und 150 mM NaCl) angesetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von DCl auf 7,0 eingestellt. Eine Proteinkonzentration von 8 Gew.-% sowie 10 Gew.-% PEG wurde in der Tris (D_2O)-Pufferlösung verwendet. Die Tröpfchenphase wurde auf die gleiche Weise hergestellt wie bei den Mikroskopiemessungen. Sowohl die temperatur- als auch die druckabhängigen FTIR-Messungen wurden mit einem Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific) Spektrometer durchgeführt, das mit einem in Flüssigstickstoff gekühlten MCT-Detektor (HgCdTe) ausgestattet war, und Daten im Wellenzahlbereich zwischen 4000 und 650 cm^{-1} aufgezeichnet. Die erforderliche Temperatur in der Zelle wurde mithilfe eines externen Wasserthermostats auf 0,1 $^\circ\text{C}$ geregelt. Hohe Drücke (1 bar-10 kbar) konnten mit einer membrangetriebenen Diamantstempelzelle (Diacells VivoDac, Almax easyLab) erreicht werden, die mit Diamanten vom Typ IIa (Almax easyLab) bestückt und an einen automatischen pneumatischen Druckregler (Diacells iGM Controller, Almax easyLab) angeschlossen war. Der Druckausgleich wurde für 5 Minuten und der Temperatureausgleich für 10 Minuten aufrechterhalten, bevor die Spektren aufgenommen wurden. BaSO_4 -Pulver wurde als internes Druckkalibrieremittel zur Bestimmung der Druckwerte verwendet. BaSO_4 zeigt eine charakteristische druckempfindliche symmetrische Streckschwingung um 983,5 cm^{-1} , die linear mit dem Druck zunimmt.^[161] Die Probenkammer des FTIR-Spektrometers wurde kontinuierlich mit CO_2 -freier trockener Luft gespült, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Für jedes Spektrum wurden 128 Scans in einer Reihe aufgenommen. Die Spektren wurden mit Happ-Genzel-Apodisierung unter Verwendung der Spektralverarbeitungssoftware Omnic 7.2 verarbeitet. Die Spektralanalyse wurde mit der Software Thermo Grams 8.0 durchgeführt. Nach der Puffersubtraktion und der Glättung jedes Spektrums wurde die Fläche der Amid-I'-Bande (1700-1600 cm^{-1}) auf 1 normiert.

Die Anzahl und Positionen der Subbanden wurden mithilfe von zwei mathematischen Operationen, der Fourier Self-Deconvolution (FSD) und der zweiten Ableitung des Spektrums, bestimmt, um die Position von Sekundärstrukturelementen zu ermitteln und Konformationsänderungen auswerten zu können. Hierbei wurde der Bereich der Amid-I'-Bande der Antikörper in sieben Subbanden unterteilt.^[162] Die relativen Veränderungen in der Population der Sekundärstrukturelemente wurden durch die Verwendung gemischter Gauß-Lorentz-scher Linienformfunktionen beim Anpassungsverfahren ermittelt.^[163] Die FTIR-Messungen wurden von Dr. Michel Jaworek (Physikalische Chemie I, TU Dortmund) durchgeführt und ausgewertet.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Bevor die Ergebnisse der Untersuchungen gezeigt werden, sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich die Bezeichnung „Puffer“ auf das reine Puffersystem (20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl und 2 mM NaN₃) bezieht, in das das Proteinpulver gelöst wurde. Die Bezeichnung „PEG-Puffer“ kennzeichnet den um PEG 1000 ergänzten Probenpuffer, welcher eingesetzt wurde, um die Entmischung des Proteinsystems zu induzieren.

5.3.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von TMAO auf die temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin

Zur Veranschaulichung des temperatur-, druck- und kosolutabhängigen Phasenverhaltens des γ -Globulin-Systems wurden hellfeldmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 5.1 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von 80 mg/mL γ -Globulin in PEG-Puffer und nach Zugabe von 0,5 M TMAO bei ausgewählten Temperaturen ($p = 1$ bar) sowie bei ausgewählten Drücken für $T = 20$ °C. Unter dem Lichtmikroskop sind bei niedrigen Temperaturen deutlich mikrometergroße Tröpfchen zu sehen, die für den Zustand der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung charakteristisch sind. Diese lösen sich vollständig auf, wenn die Lösungstemperatur über etwa 30 °C erhöht wird. Außerdem wurde unter beiden Lösungsbedingungen auch der Effekt von Druck und Temperatur auf γ -Globulin-Tröpfchen untersucht, die sich direkt auf dem unteren Fenster der Mikroskopiezelle befanden. Die Ergebnisse (Abb. 5.2) zeigen, dass die Grenzflächenbenetzung nur eine gering stabilisierende Wirkung auf die Tröpfchenphase hat. Die allgemeine Empfindlichkeit des entmischten Systems gegenüber erhöhten Temperaturen und Drücken bleibt bestehen.

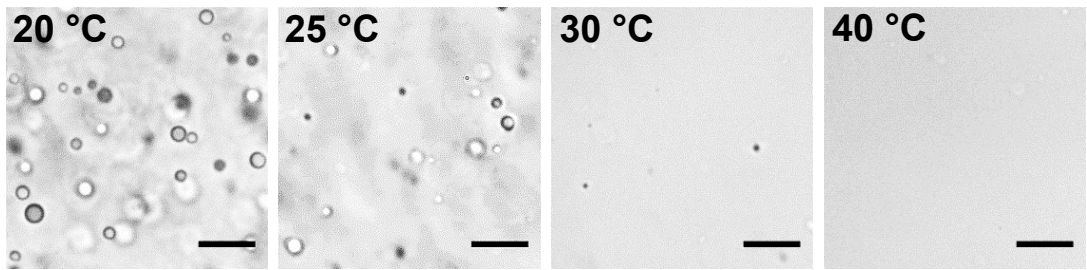
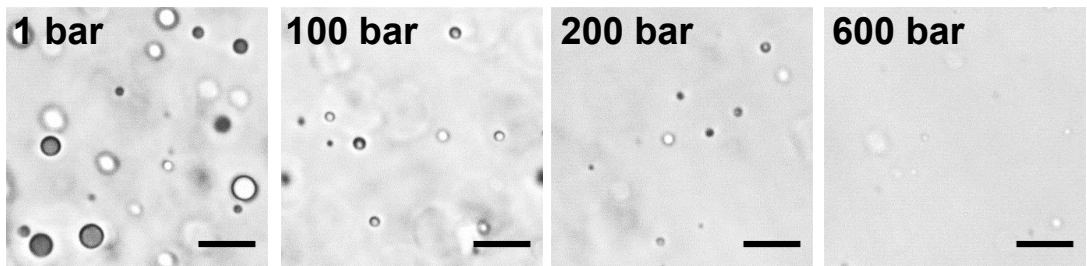
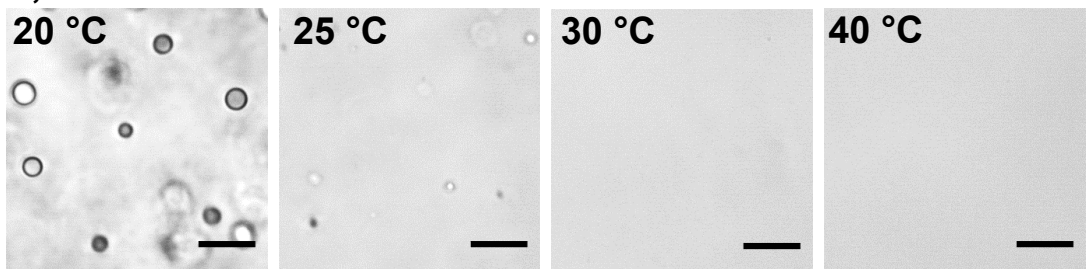
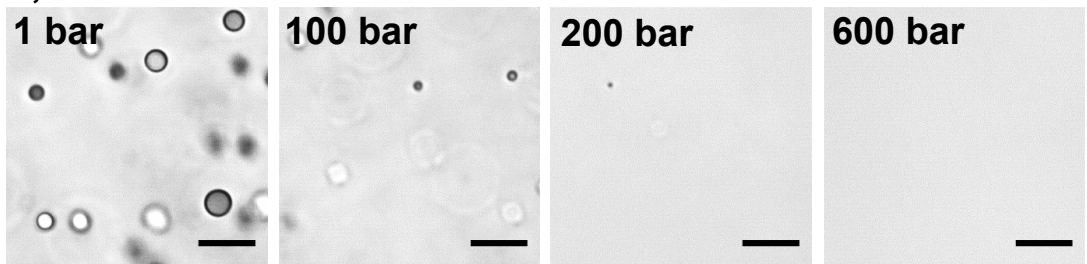
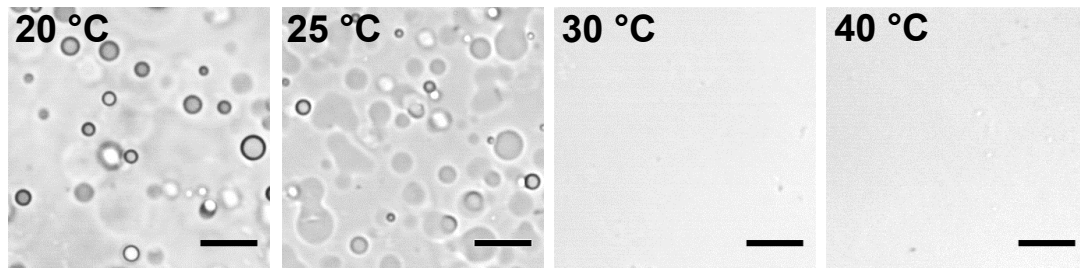
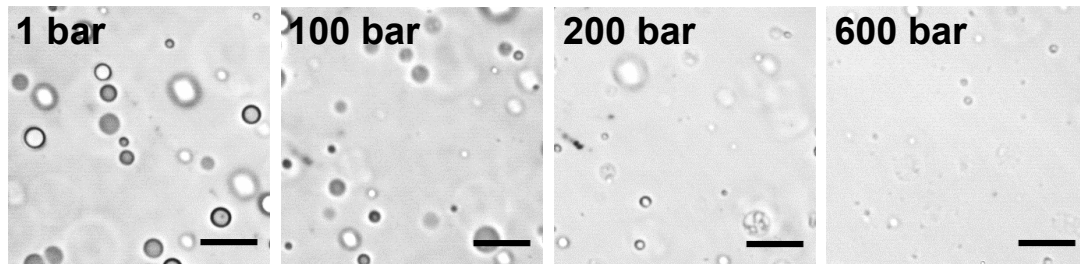
A) PEG-Puffer**B) PEG-Puffer****C) + 0,5 M TMAO****D) + 0,5 M TMAO**

Abbildung 5.1: Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin in Lösung sowie unter verschiedenen Lösungsbedingungen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von 80 mg/mL γ -Globulin in PEG-Puffer als Funktion der Temperatur (**A**) und des Drucks bei $T = 20\text{ °C}$ (**B**) und in Gegenwart von 0,5 M TMAO als Funktion der Temperatur (**C**) und des Drucks bei $T = 20\text{ °C}$ (**D**). Der Fokus des Objektivs befand sich in der Lösung. Maßstab Balken: 20 μm .

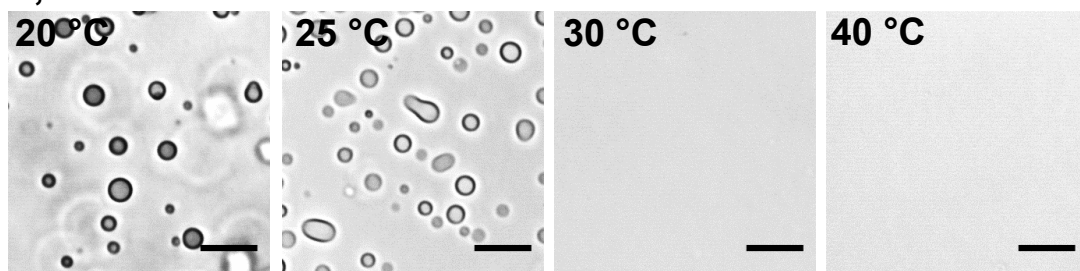
A) PEG-Puffer



B) PEG-Puffer



C) + 0,5 M TMAO



D) + 0,5 M TMAO

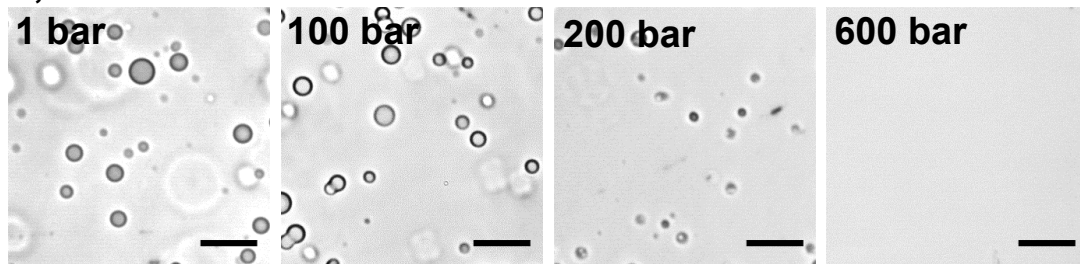


Abbildung 5.2: Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin auf Oberflächen sowie unter verschiedenen Lösungsbedingungen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von 80 mg/mL γ -Globulin in PEG-Puffer als Funktion der Temperatur (**A**) und des Drucks bei $T = 20\text{ °C}$ (**B**) und in Gegenwart von 0,5 M TMAO als Funktion der Temperatur (**C**) und des Drucks bei $T = 20\text{ °C}$ (**D**). Der Fokus des Objektivs befand sich auf dem unteren Diamantfenster der verwendeten Mikroskopiezelle. Maßstabballen: 20 μm .

Ergänzende Absorbanzmessungen (Turbiditätsmessungen) wurden bei 400 nm an einem UV/Vis-Spektrometer durchgeführt, um die Phasenübergangstemperaturen (d. h. die Trübungstemperaturen, T_{cloud}) und -drücke (d. h. die Trübungsdrücke, p_{cloud}) beim Eintritt in und Austritt aus der Zweiphasenregion genauer zu lokalisieren. Die druckabhängigen Absorbanzmessungen wurden mit einer selbst gebauten optischen Hochdruckzelle durchgeführt.^[18,93,149] Hellfeld-Lichtmikroskopie unter Verwendung einer Hochdruck-Diamantzelle wurde angewandt, um die Bildung und Auflösung von Proteintröpfchen auf der μm -Skala zu visualisieren.^[18,93,149] Bei T_{cloud} oder p_{cloud} werden die Proben trübe und die Intensität des durchgelassenen Lichts ändert sich schnell, was auf das Überschreiten der konodalen (Koexistenz-)Kurve hinweist. In Gegenwart von 10 % (w/v) PEG 1000 entmischt die Proteinphase unterhalb einer Temperatur von ~ 30 °C, was mit Literaturdaten (s. eingefügtes Bild in Abb. 5.3 A)^[19] und den Mikroskopieergebnissen übereinstimmt. Die Zugabe von TMAO destabilisiert die Tröpfchenphase des Proteins geringfügig und verschiebt den Beginn der Phasentrennung runter auf ~ 22 °C. Dieser Effekt wird bereits bei TMAO-Konzentrationen von 0,2 M beobachtet.

Die Anwendung von Druck bei 20 °C löst die Proteintröpfchen in PEG-Puffer bei etwa 400 bar vollständig auf, was darauf hindeutet, dass die entmischte Tröpfchenphase des Proteins bei relativ niedrigen Drücken verschwindet. Einige 10 bis 100 bar reichen bereits aus, um die Menge der Tröpfchenphase drastisch zu reduzieren (Abb. 5.3 B). Bezüglich der Stabilitätsregion der entmischten Phase stimmen die Ergebnisse der Turbiditätsmessungen gut mit denen der lichtmikroskopischen Messungen (Abb. 5.1) überein. Auch hier wurde festgestellt, dass die Zugabe von TMAO die phasentrennte Proteinlösung destabilisiert und den Trübungsdruck in einer konzentrationsabhängigen Weise erniedrigt. Ein anderes Szenario wurde bei anderen phasentrennenden Proteinsystemen beobachtet. So hat TMAO beispielsweise eine stabilisierende Wirkung auf die Tröpfchenphase von SynGAP/PSD-95, einem Kondensat-Modellsystem für postsynaptische Dichten, welche wahrscheinlich größtenteils auf den Ausschluss von TMAO von der Proteingrenzfläche zurückzuführen ist und kompakte Strukturen einschließlich proteinreicher Tröpfchen begünstigt.^[151]

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckanwendung

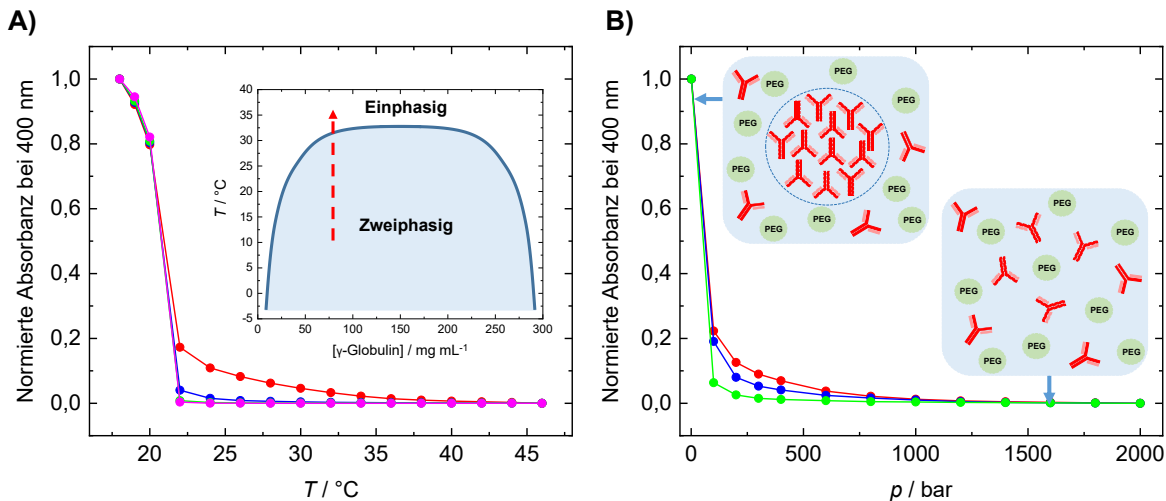


Abbildung 5.3: Temperatur- und druckabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen. (A) 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 80 mg/mL γ -Globulin als Funktion der Temperatur in PEG-Puffer (rot), +0,2 M TMAO (blau), +0,5 M TMAO (grün) und +0,7 M TMAO (magenta). Die Absorbanzdaten wurden auf 1,0 normiert, was ihren Maximalwerten entspricht. Die Datenpunkte sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen. Unterhalb einer bestimmten Temperatur, der „Trübungstemperatur“ (T_{cloud}), wird die Probe sichtbar trübe und die transmittierte Intensität nimmt rasch ab, was zu einem starken Anstieg der Absorbanz führt. Diese Trübung markiert den Beginn der Phasentrennung und ist auf die Bildung kleiner Tröpfchen der proteinreichen Phase in der verdünnten Lösung oder kleiner Tröpfchen der proteinarmen Phase in der konzentrierten Proteinlösung zurückzuführen. Eingefügtes Diagramm: Temperatur-Konzentrations-Phasendiagramm von γ -Globulin/10 % (w/v) PEG 1000^[19] und Richtung der Turbiditätsmessung (roter Pfeil). (B) 400 nm-Absorbanz (Turbidität) von 80 mg/mL γ -Globulin als Funktion des Drucks in PEG-Puffer (rot), +0,2 M TMAO (blau) und +0,5 M TMAO (grün) bei $T = 20$ °C. Eingefügte Abbildungen: Schematische Darstellung der PEG-induzierten Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von γ -Globulin (rot) und der Auflösung der flüssigen Tröpfchenphase bei hohen Drücken.

Um herauszufinden, auf welche Art und Weise erhöhte Temperaturen und TMAO den gefalteten Zustand von γ -Globulin beeinflussen, wurden Differenzkalorimetrie-Messungen (*engl.* differential scanning calorimetry, DSC) durchgeführt, weil jede Veränderung der Proteinestabilität auch die Lage der Koexistenzkurve der 2-Phasenregion beeinflussen könnte. DSC-Messungen in reinem Puffer ergaben eine Entfaltungs-/Denaturierungstemperatur des Proteins von $T_m = (73,9 \pm 0,1)$ °C. Die Zugabe von 0,5 M TMAO hat eine geringfügig stabilisierende Wirkung auf das Protein (in Bezug auf die T_m -Werte) und ergab einen T_m -Wert von $(75,4 \pm 0,1)$ °C (Abb. 5.4). Dieses Verhalten könnte auf den vergrößernden Effekt von TMAO auf die Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerkstruktur von Wasser zurückzuführen sein, was zu einer bevorzugten Hydratation und zur allgemeinen Stabilisierung von Proteinen in TMAO/Wasser-Lösungen führt.^[75,156–158] Umgekehrt bewirkt die Zugabe von TMAO allerdings eine leichte Destabilisierung der Tröpfchenphase des Systems. Eine ähnliche Beobachtung machten Banks und Cordia, die ebenfalls eine destabilisierende Wirkung mehrerer Kosolute auf die temperaturabhängige Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von

monoklonalen Antikörpern feststellten, welche nicht mit der DSC-bestimmten strukturellen Temperaturstabilität der Proteinsysteme korrelierte.^[147]

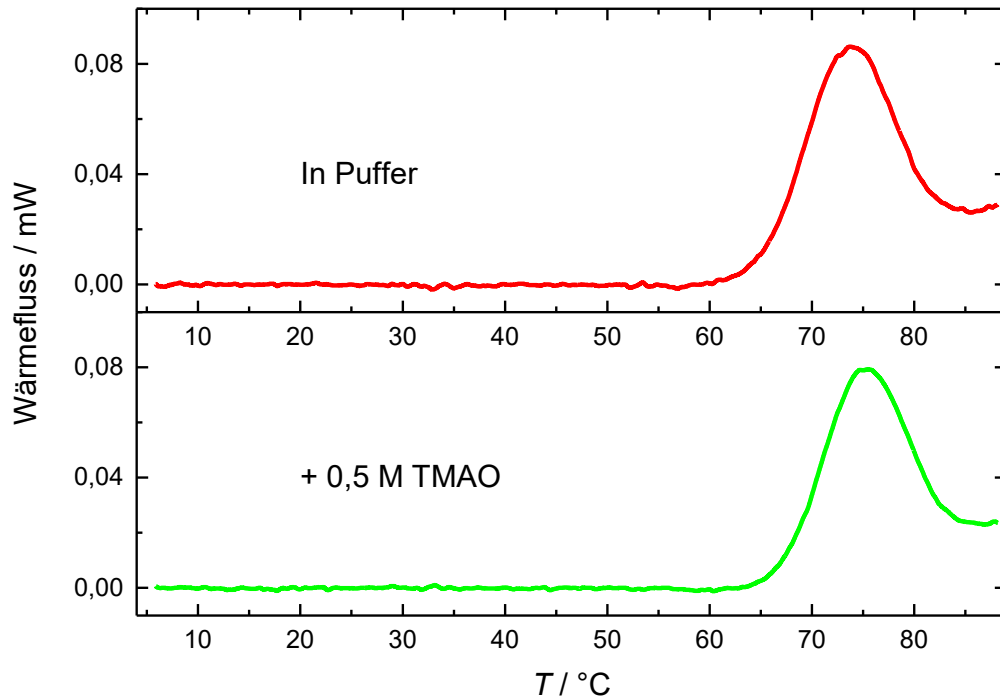


Abbildung 5.4: Temperaturinduzierte Entfaltung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen. DSC-Thermogramme von γ -Globulin in Puffer und in Gegenwart von 0,5 M TMAO. 2 mg des Proteins wurden zu diesem Zweck mit einer Heizrate von 1 °C/min von 1 ° auf 90 °C erhitzt.

5.3.2 Selbstassoziation von γ -Globulin in An- und Abwesenheit von TMAO

Um ein besseres Verständnis des Mechanismus zu erlangen, durch welchen Druck und Kosolute die Auflösung der Tröpfchenphase von γ -Globulin bewirken, wurden stationäre Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchgeführt, mithilfe derer die Bindungskonstante K_b der Komplexbildung von γ -Globulin-Molekülen bestimmt werden konnte. Der druckabhängige Bindungsassay erfolgte durch Messung der Fluoreszenzanisotropie von dansylmarkiertem γ -Globulin in reinem Puffer und in Gegenwart von 0,5 M TMAO. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragung der Fluoreszenzanisotropie-Änderung, $\Delta r = r - r_0$ (wobei r und r_0 die Anisotropien von markiertem γ -Globulin in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von unmarkiertem γ -Globulin sind), gegen die Gesamtkonzentration von γ -Globulin, $[\gamma\text{-Globulin}]_{\text{total}}$, ermittelt. Die experimentellen Daten wurden unter der Annahme angepasst, dass ein γ -Globulin mit einem anderen γ -Globulin interagieren und ein Dimer bilden kann. Dieses

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckanwendung

einfache Bindungsmodell wurde verwendet, weil die Stöchiometrie der Komplexbildung unbekannt ist und die Daten mit diesem Modell gut angepasst werden konnten. Die aus den Bindungsstudien gezogenen Schlussfolgerungen, d. h. der geringe Druckeffekt auf die Bindungskonstante, der höchstwahrscheinlich nicht für die hohe Druckempfindlichkeit des Systems (siehe unten) verantwortlich sein kann, wird nicht beeinflusst, wenn die Bindungsgeometrie eine andere wäre.

Abbildung 5.5 zeigt die Bindungsisothermen, die bei Umgebungstemperatur (20 °C) und ausgewählten Drücken in reinem Puffer bzw. in 0,5 M TMAO erhalten wurden. Wie erwartet, sind die Bindungskonstanten sehr niedrig und es kann kein nennenswerter Unterschied zwischen der Bindungskonstante in Puffer ($K_b = (882 \pm 152) \text{ M}^{-1}$) und der in 0,5 M TMAO ($K_b = (592 \pm 220) \text{ M}^{-1}$) innerhalb der experimentellen Unsicherheit festgestellt werden. Der K_b -Wert in TMAO-Lösung scheint jedoch etwas kleiner zu sein. Außerdem hat die Anwendung von Druck nur einen geringen Einfluss auf die Bindungskonstante unter beiden Lösungsbedingungen (z. B. $K_b = (1530 \pm 350) \text{ M}^{-1}$ in Puffer, $K_b = (997 \pm 235) \text{ M}^{-1}$ in 0,5 M TMAO für $p = 500 \text{ bar}$). Diese Daten zeigen, dass die hohe Druckempfindlichkeit der γ -Globulin-Kondensate wahrscheinlich nicht durch die Stärke der paarweisen γ -Globulin-Wechselwirkungen in der verdünnten Phase widerspiegelt wird.

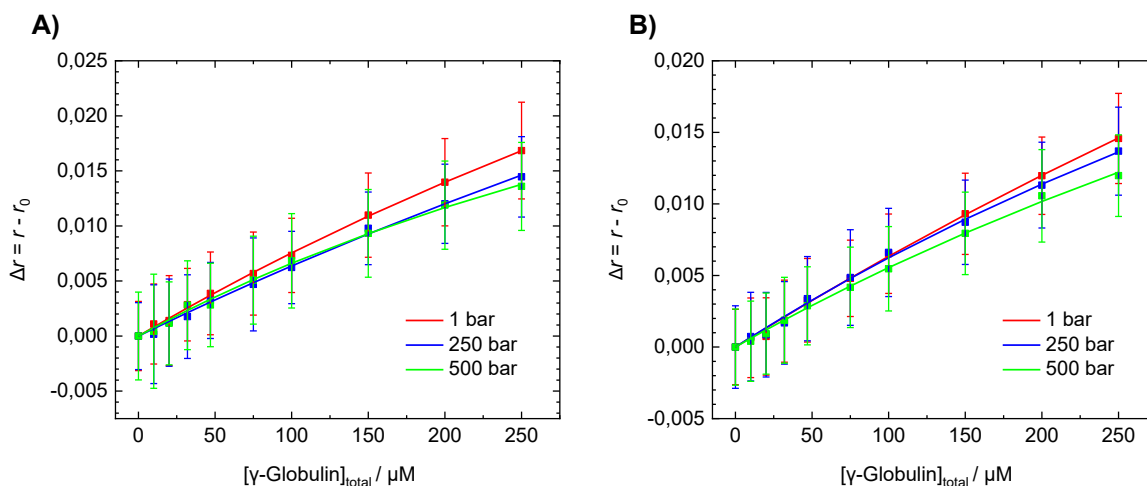


Abbildung 5.5: Druckabhängiger Selbstassoziationsassay von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen. Fluoreszenzanisotropie-Daten der Selbstassoziation von γ -Globulin bei verschiedenen Drücken in Puffer (A) und in Gegenwart von 0,5 M TMAO (B) bei $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Um die Bindungskonstante K_b zu ermitteln, wurden die experimentellen Daten, Δr vs. $[\gamma\text{-Globulin}]_{\text{total}}$, einem 1:1-Bindungsmodell entsprechend gefittet (dargestellt durch die Linien).

5.3.3 FTIR-spektroskopische Untersuchung von γ -Globulin unter verschiedenen Lösungsbedingungen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Konformation des Proteins bei der Tröpfchenbildung ändert und wie die Sekundärstruktur von γ -Globulin durch Temperatur und Druck beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurde die konformationsempfindliche Amid-I'-Infrarotbande mittels FTIR-Spektroskopie unter Verwendung einer Peak-Fitting-Routine analysiert, die quantitative Informationen über die jeweiligen Anteile der Sekundärstrukturelemente des Proteins liefert. Die thermische Stabilität von γ -Globulin wurde bereits durch CD- und DSC-Messungen untersucht. γ -Globulin hat zwei Domänen, zwei Fab- und Fc-Regionen, die, gefolgt von einem irreversiblen Aggregationsschritt bei etwa 70 °C, unabhängig voneinander denaturieren.^[164,165] Abbildung 5.6 A, B zeigt die Daten zur Temperaturabhängigkeit von γ -Globulin bei Umgebungsdruck. Es wurden sieben FTIR-Subbanden identifiziert (bei ~1683, ~1666, ~1654, ~1644, ~1634 & 1622 und 1616 cm^{-1}), die jeweils β -Faltblättern, Turns/Schleifen, α -Helices, Random Coils, intramolekularen β -Faltblättern und intermolekularen β -Faltblättern (von Aggregaten) entsprechen. Bis ~65 °C bleiben die Sekundärstrukturelemente im Wesentlichen unverändert, wobei der Gehalt an intramolekularen β -Faltblättern dominiert, was mit Literaturdaten übereinstimmt.^[162] Oberhalb von 65 °C beginnt der Anteil an intramolekularen β -Faltblättern zu sinken, während gleichzeitig der Gehalt an Schleifen und intermolekularen β -Faltblättern (die für die Proteinaggregation charakteristisch sind) zu steigen beginnt. Das bedeutet, dass sich das Protein bei steigender Temperatur gleichzeitig zu entfalten beginnt und Aggregate bildet. Sigmoidale Anpassungen der Absorptionsverschiebungen ergaben eine Entfaltungstemperatur, T_m , von (70,0 \pm 0,4) °C, in guter Übereinstimmung mit den DSC- und Literaturdaten.^[162,164,165] Zu beachten ist allerdings, dass aufgrund des Aggregationsprozesses nach der Proteinentfaltung die Temperaturdenaturierung teilweise irreversibel ist, was die Verwendung von T_m -Werten (wenn sie proportional zur Änderung der freien Gibbs-Energie sind) als Maß für die wahre thermodynamische Stabilität des Systems verhindert. Umgekehrt sind alle druckabhängigen Untersuchungen im Allgemeinen vollständig reversibel.^[114–116,153]

Abbildung 5.6 C, D zeigt die Druckabhängigkeit der Sekundärstruktur von γ -Globulin in Tris-Puffer bis zu 10 kbar bei $T = 21$ °C. Bis zu ~5000 bar kann keine druckbedingte Veränderung festgestellt werden. Von ~5000 bis ~7000 bar wird bei gleichzeitiger Zunahme der Turn- und Schleifenstrukturen nur ein Verlust von ~4 % des intramolekularen β -Faltblattanteils festgestellt, was auf eine partielle druckinduzierte Entfaltung des Proteins hinweist. Der Mitteldruck dieser partiellen Entfaltung, p_m , wurde zu (6750 \pm 300) bar bestimmt. Im Gegensatz zu den temperaturabhängigen Messungen findet bei der Druckapplikation keine Aggre-

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckanwendung

gation statt und der Verlust der nativen Sekundärstruktur ist viel weniger ausgeprägt. Diese partielle druckinduzierte Denaturierung geht mit einer Volumenänderung, ΔV , von (-28 ± 2) mL/mol einher, die für diesen Konformationsübergang aus der Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante $(\ln K/dp)_T = -\Delta V/(RT)^{[18]}$ ermittelt wurde. Die hohe Druckbeständigkeit der Struktur des menschlichen Antikörpers Immunglobulin G bis zu 5 kbar wurde auch aus neuesten Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten (*engl.* small-angle X-ray scattering, SAXS) abgeleitet; der Gyrationradius zeigte nur eine leichte Zunahme bei höheren Drücken.^[166]

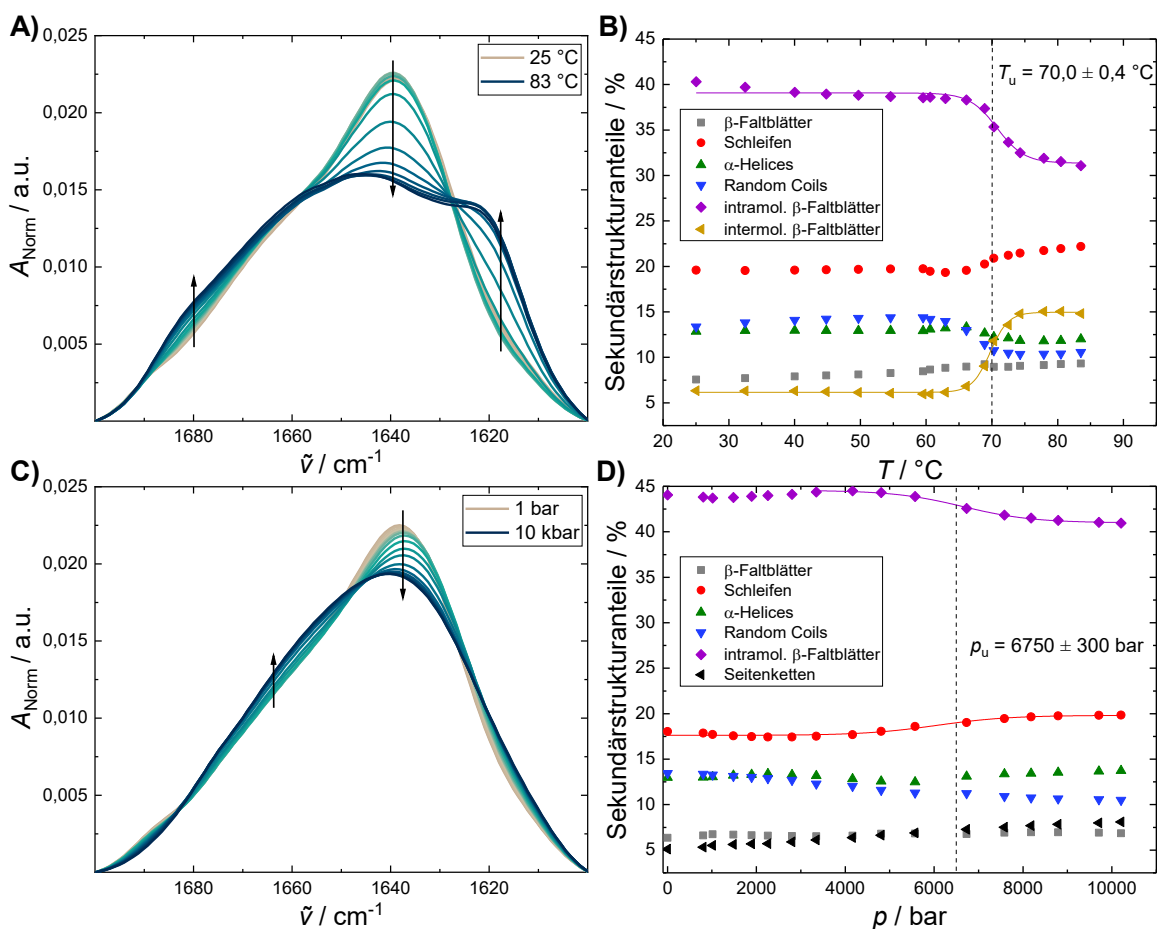


Abbildung 5.6: Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin in Puffer. Temperatur- und druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von 8 Gew.-% γ -Globulin (IgG (~80 %), IgM (~10 %) und IgA (<10 %)) in Puffer. Links: normierte Amid-I'-Bande, rechts: jeweilige Sekundärstrukturelemente der temperatur- und druckinduzierten Veränderungen. Die temperaturabhängigen Messungen wurden bei Umgebungsdruck (1 bar) durchgeführt, die druckabhängigen Messungen bei $T = 21$ °C. Die absoluten Werte der Sekundärstrukturelemente, die für verschiedene Probenpräparate ermittelt wurden, können aufgrund des hohen Hintergrunds der Diamantstempelzelle um einige Prozent abweichen.

In Gegenwart von 0,5 M TMAO (Abb. 5.7) werden keine signifikanten Veränderungen der Temperatur- ($T_m = (71,4 \pm 0,6) \text{ } ^\circ\text{C}$) oder Druckstabilität ($p_m = (6450 \pm 150) \text{ bar}$) von γ -Globulin festgestellt.

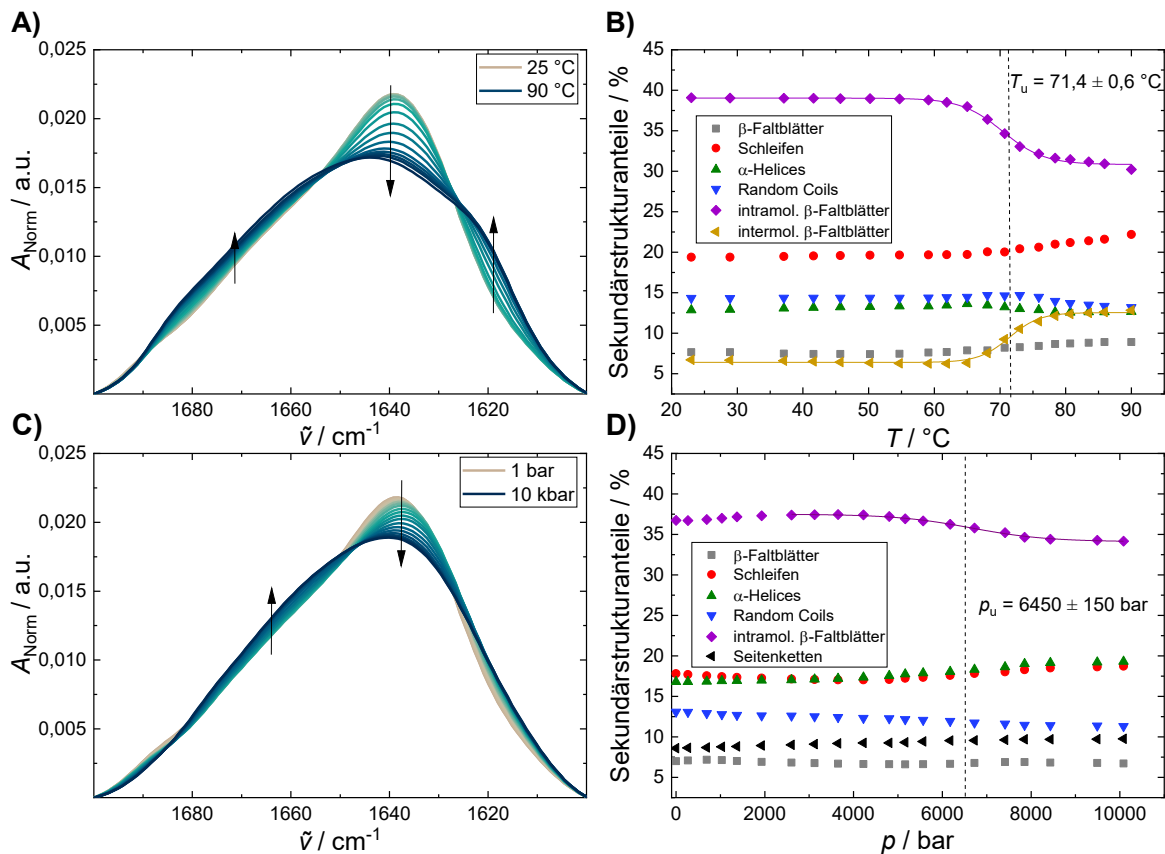


Abbildung 5.7: Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin in TMAO-zugesetztem Puffer. Temperatur- und druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von 8 Gew.-% γ -Globulin (IgG (~80 %), IgM (~10 %) und IgA (<10 %)) in 0,5 M TMAO enthaltender Pufferlösung. Links: normierte Amid-I'-Bande, rechts: jeweilige Sekundärstrukturelemente der temperatur- und druckinduzierten Veränderungen. Die temperaturabhängigen Messungen wurden bei Umgebungsdruck (1 bar) durchgeführt, die druckabhängigen Messungen bei $T = 21 \text{ } ^\circ\text{C}$. Die absoluten Werte der Sekundärstrukturelemente, die für verschiedene Probenpräparate ermittelt wurden, können aufgrund des hohen Hintergrunds der Diamantstempelzelle um einige Prozent abweichen.

Abbildung 5.8 zeigt die FTIR-Spektren des Proteins im entmischten 2-Phasenzustand, d. h. in Gegenwart von 10 Gew.-% PEG 1000, wo die Spektren aufgrund der wesentlich höheren Konzentration von der Sekundärstruktur der in der Tröpfchenphase eingebetteten Proteinmoleküle dominiert werden dürften. Wie deutlich zu erkennen ist, werden keine signifikanten Sekundärstrukturveränderungen verglichen zur Antikörpermessung in reinem Puffer beobachtet. In Gegenwart von 10 Gew.-% PEG 1000 ist das Verhalten bei höheren Drücken und Temperaturen nahezu identisch mit dem des PEG-freien homogenen Systems.

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckanwendung

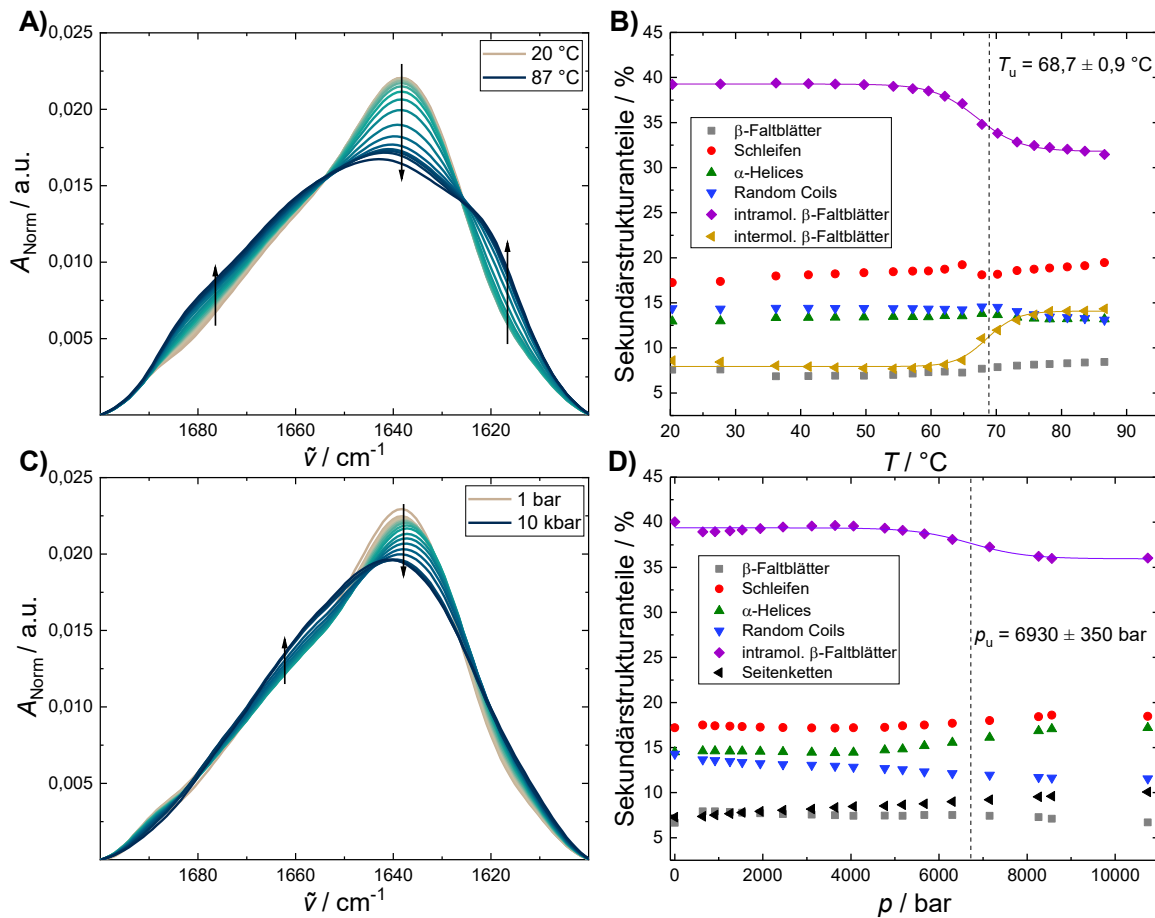


Abbildung 5.8: Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse von γ -Globulin im PEG-induzierten Entmischungszustand. Temperatur- und druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von 8 Gew.-% γ -Globulin (IgG (~80 %), IgM (~10 %) und IgA (<10 %)) in Gegenwart von 10 Gew.-% PEG 1000, welches bei niedrigen Temperaturen und Drücken die Ausbildung des entmischten Zustands induziert. Links: normierte Amid-I'-Bande, rechts: jeweilige Sekundärstrukturelemente der temperatur- und druckinduzierten Veränderungen. Die temperaturabhängigen Messungen wurden bei Umgebungsdruck (1 bar) durchgeführt, die druckabhängigen Messungen bei $T = 21\text{ °C}$. Die absoluten Werte der Sekundärstrukturelemente, die für verschiedene Probenpräparate ermittelt wurden, können aufgrund des hohen Hintergrunds der Diamantstempelzelle um einige Prozent abweichen.

Die sedimentatorische Auftrennung der entmischten Lösung in eine obere und untere Phase bei niedrigen Temperaturen und Drücken erlaubte außerdem auch noch die getrennte Aufnahme von FTIR-Spektren der proteinarmen und proteinreichen Phase des γ -Globulin-Systems. Die Daten und ihre Auswertung sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Auch diese Daten deuten darauf hin, dass sich die Sekundärstrukturelemente des Proteins in der Tröpfchenphase verglichen zur umgebenden verdünnten Phase im Rahmen der Datengenauigkeit nicht wesentlich verändern.

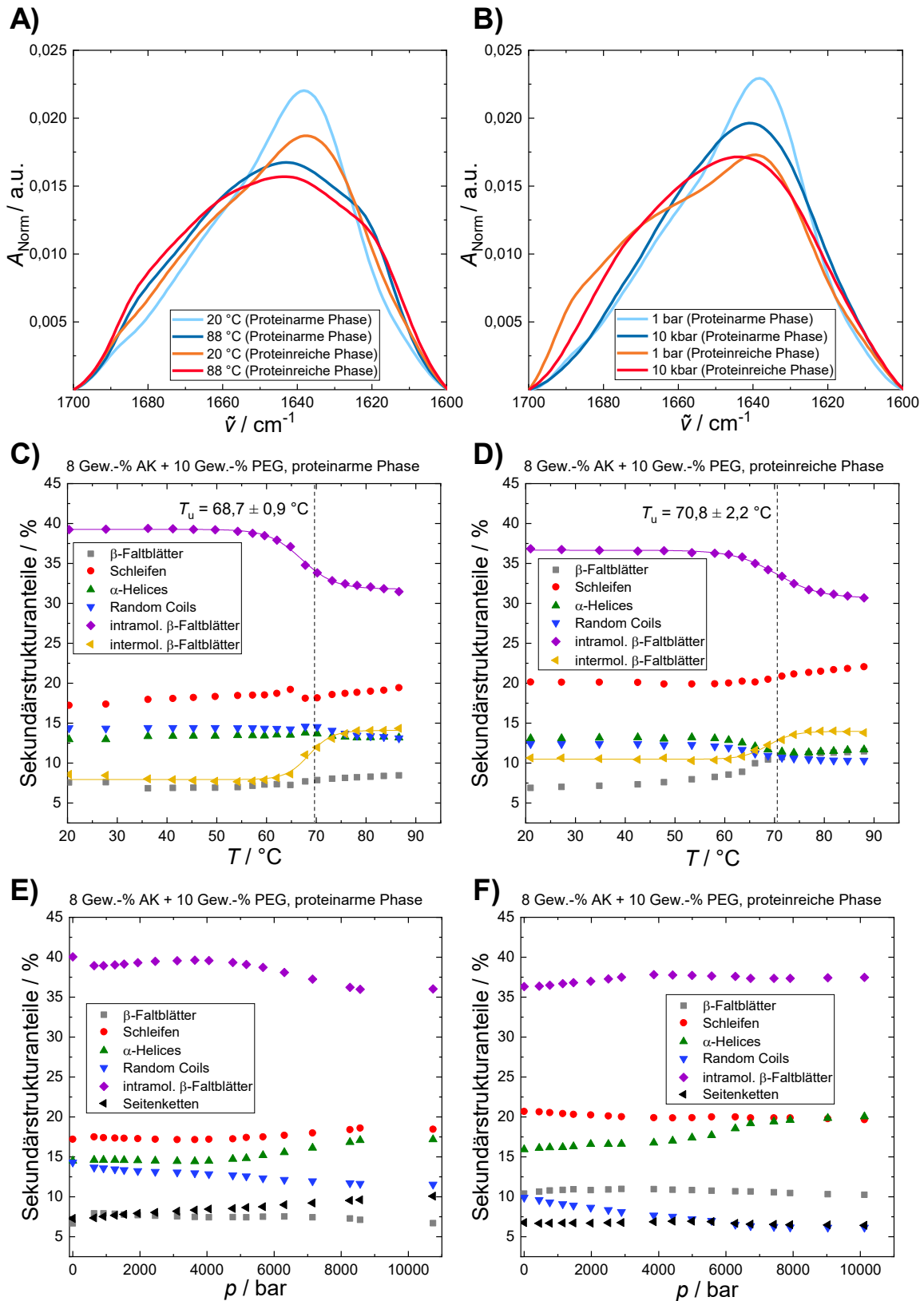


Abbildung 5.9: Temperatur- und druckabhängige Sekundärstrukturanalyse beider Phasen. Temperatur- und druckabhängige FTIR-Absorptionsdaten von γ -Globulin in der proteinarmen und proteinreichen Phase. Temperatur- (A) und druckinduzierte Veränderungen (B) der normierten Amid-I'-Bande und die entsprechenden Veränderungen der Sekundärstrukturelemente (C-F).

5.4 Zusammenfassung

Für Formulierungen werden häufig hochkonzentrierte Antikörperlösungen (~100 mg/mL) benötigt, was bei der Herstellung mehrere Herausforderungen, darunter Langzeitstabilität und Haltbarkeit, mit sich bringt. Bei hohen Konzentrationen können die verstärkten intermolekularen Wechselwirkungen die Tendenz der Lösungen zur Phasentrennung und anschließender Kristallisation oder Aggregation und amyloidartiger Fibrillenbildung erhöhen. Um die kolloidale Stabilität von Lösungen zu verbessern, wurden zahlreiche pharmazeutische Hilfsstoffe mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z. B. Sorbitol, Saccharose und Aminosäuren, verwendet. Die Mechanismen, durch die die Hilfsstoffe die Stabilität von Proteinlösungen beeinflussen, können sehr komplex sein und die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen entweder direkt durch die Wechselwirkungen zwischen Hilfsstoff und Protein oder indirekt durch die Veränderung der Hydratationseigenschaften des Proteins und der Aktivität (Aktivitätskoeffizienten) aller Komponenten verändern, ihre Effekte sind gemeinhin aber schwer vorherzusagen.^[144,147] Gemessene präferentielle Interaktionskoeffizienten von Hilfsstoffen ergaben Interaktionsparameter, die im Allgemeinen auf thermodynamisch ungünstige Protein-Hilfsstoff-Wechselwirkungen hinweisen (negative präferentielle Bindungskoeffizienten, Γ_{PC} , zwischen Protein und Kosolut), obwohl spezifische Wechselwirkungen mit der Protein-Grenzfläche dennoch auftreten können.^[70,144,154] In dieser Studie wurde festgestellt, dass das kompatible Kosolut TMAO selbst bei hohen Konzentrationen von 0,5 M keine drastische Wirkung auf die Temperatur- und Druckstabilität der Tröpfchenphase hatte und nur zu einer leichten Destabilisierung dieser führte. Ein anderes Szenario wurde bei anderen entmischenden Systemen wie γ -Kristallin und SynGAP/PSD-95 beobachtet, bei welchen die Kosolutzugabe die entmischte Kondensatphase stark stabilisierte, von der angenommen wurde, dass sie weitgehend kosolutfrei ist.^[17,93,151] Die leichte Destabilisierung der Tröpfchenphase von γ -Globulin durch TMAO ist wahrscheinlich auf einige spezifische Protein-Hilfsstoff-Wechselwirkungen zurückzuführen, wie die Abnahme des K_b -Wertes in der TMAO-Lösung nahelegt. In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz zur Modulation der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und zur Unterdrückung der anschließenden Aggregation und Ausfällung von Immunglobulinen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Flüssigphasentröpfchen von γ -Globulin sehr druckempfindliche biomolekulare Anordnungen sind. Eine Erhöhung des Drucks um mehrere zehn bis hundert bar führte zu einer drastischen Abnahme der Tröpfchenstabilität in Pufferlösung, wobei die Tröpfchenphase jenseits von etwa 400 bar vollständig verschwand. In Anwesenheit von TMAO waren niedrigere Drücke für die vollständige Kondensatauflösung erforderlich. Die Druckabhängigkeit der paarweisen γ -Globulin-

Assoziation reicht wahrscheinlich nicht aus, um die beobachtete Druckempfindlichkeit der Tröpfchenphase zu erklären. Was ist also der Grund für die ausgeprägte Druckempfindlichkeit der kondensierten γ -Globulin-Phase?

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Antikörpern impliziert stark attraktive enthalpische Protein-Protein-Wechselwirkungen durch mehrfache Ladungs-Patch-Wechselwirkungen mit komplementärer Oberflächenladung, die eine höhere Temperatur als die Raumtemperatur (hier $T > 30$ °C) erfordern, damit der entropische Beitrag zur freien Gibbs-Energie der Mischung dominiert und eine homogene Lösung begünstigt.^[142,143,147] Antikörper haben eine verzweigtere und flexiblere Struktur als viele andere Proteine, wie beispielsweise das globuläre Lysozym-Molekül. Infolgedessen hat die binodale Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Antikörpern aufgrund ihrer nicht-sphärischen und anisotropen Natur einen viel geringeren kritischen Volumenanteil als bei globulären Proteinen. Der beobachtete niedrige kritische Volumenanteil, ϕ_{crit} , ist wahrscheinlich das Ergebnis eines großen effektiven Ausschlussvolumens von Antikörpermolekülen ($\phi_{\text{crit}}(\text{Antikörper}) \approx 7$ %, $\phi_{\text{crit}}(\text{Lysozym}) \approx 17$ %). Mithilfe der quasi-elastischen Neutronenstreuung beobachteten Girelli et al. eine starke Abnahme der Antikörperdiffusion im Tröpfchenzustand, obwohl die interne Flexibilität, die durch die Diffusion der Lappen bei niedrigen Temperaturen dominiert wird, in erheblichem Maße erhalten bleibt.^[146] Da es sich bei Antikörpern um große, verzweigte und flexible Proteinmoleküle handelt, kann davon ausgegangen werden, dass sie eine erhebliche Menge an wasserfreiem Hohlraumvolumen erzeugen, wenn sie in der dichten Tröpfchenphase gepackt sind. Eine plausible Erklärung ist daher, dass es im Vergleich zur dispersen Phase von γ -Globulin ein beträchtliches (transientes) Hohlraumvolumen gibt, welches durch das Interaktionsnetzwerk von mehreren Proteinmolekülen im Kondensat entsteht und für Wassermoleküle unzugänglich ist. Nach dem Prinzip von Le Châtelier führt die Druckapplikation zur Begünstigung des homogenen Zustands, da dieser mit einer allgemeinen Volumenabnahme des Systems einhergeht (Abb. 5.10) und außerdem auch noch eine höhere Mischungsentropie besitzt. Veränderungen der Hydratation der Proteinoberfläche könnten einen zusätzlichen Beitrag leisten,^[167] der hier wahrscheinlich von geringer Bedeutung ist. Es sei darauf hingewiesen, dass Hohlraumvolumina auch durch unvollkommene Packung in gefalteten Strukturen globulärer Proteine entstehen, die aber bei viel höheren Drücken, typischerweise zwischen ~ 4 und ~ 8 kbar, entfalten.^[168]

5 Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Aggregation von Antikörpern durch geringe Druckerhöhung

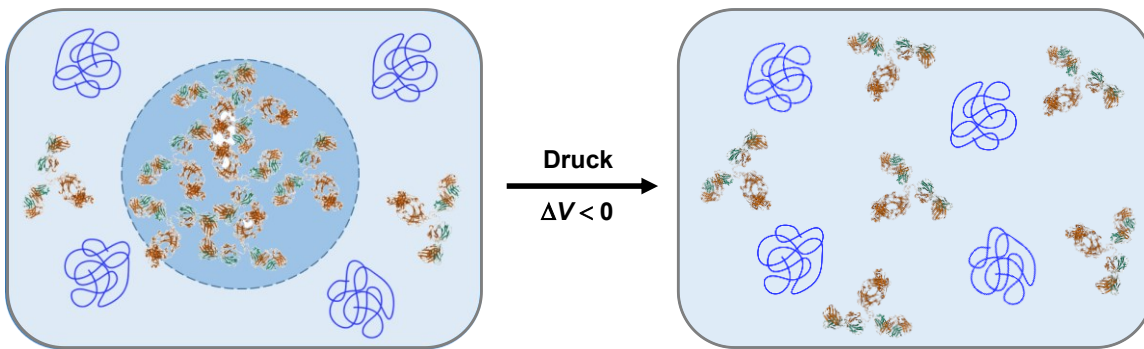


Abbildung 5.10: Mechanismus der druckabhängigen γ -Globulin-Kondensatauflösung. Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Mechanismus der druckinduzierten Auflösung von γ -Globulin-Tröpfchen (PDB ID 1IGT wurde für die Struktur von IgG verwendet). Die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline sind grün bzw. braun gefärbt. Der Crowder PEG 1000 ist als blaue Knäuel dargestellt und die (transienten) Hohlräume in der Tröpfchenphase sind in weiß abgebildet.

In dieser Studie wurde die praktische Anwendbarkeit von Hochdruck als Technik zur Unterdrückung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und der Aggregation konzentrierter Antikörperlösungen untersucht. Einige andere praktische Anwendungen der Hochdrucktechnik haben sich bereits als erfolgreich erwiesen. Die Druckbehandlung bei kbar-Druck (4-6 kbar) hat eine lange Tradition in der Hochdruck-Lebensmittelverarbeitung, die ein Beispiel für eine gut etablierte biotechnologische Anwendung ist. Hoher hydrostatischer Druck hat das Potenzial Mikroorganismen, Viren und Enzyme zu inaktivieren, während die Auswirkungen auf den Geschmack und den Nährstoffgehalt von Lebensmitteln im Vergleich zu den Auswirkungen thermischer Behandlungen nur gering sind.^[116,153,169,170] Zu den hochdruckbehandelten Produkten gehören Säfte und Milch. Milch hat von Natur aus einen hohen Gehalt an Antikörpern, der bei der Verarbeitung erhalten werden sollte. Tatsächlich bilden Immunglobuline einen wichtigen Bestandteil der immunologischen Aktivität in Milch und Kolostrum.^[171] Sie sind auch von zentraler Bedeutung für die immunologische Verbindung, die entsteht, wenn die Mutter passive Immunität auf den Nachwuchs überträgt. Auch im Rinderkolostrum verleiht das Antikörpersystem passive Immunität, bis das eigene Immunsystem des Kalbes ausgereift ist. Das erste Kolostrum enthält sehr hohe Konzentrationen an Immunglobulinen (40-200 mg/mL), welche nach einigen Tagen abnehmen. Hier wurde gezeigt, dass Immunglobulinmoleküle selbst sehr widerstandsfähig gegen die Entfaltung unter hohem Druck, sogar bis zu etwa 6 kbar, sind, d. h. sie dürften gegen die Druckbehandlung von Milch resistent sein.

Zusammenfassung

Lipidmembranen ermöglichen als Abgrenzungen von Zellen und Organellen eine Myriade von Prozessen und Funktionen. Neben membranumhüllten Organellen existieren in Zellen auch membranlose Organellen, welche in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt sind und gleichermaßen wichtige zelluläre Funktionen erfüllen. Diese membranlosen Organellen werden in der Regel durch mehrere Proteine sowie RNA und DNA gebildet und entstehen durch den Prozess der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, bei dem eine homogene Proteinlösung in eine proteinreiche und eine proteinarme Phase entmischt. Da es sich bei diesen Proteinkondensaten um intrazelluläre Körper handelt, entstehen diese folglich auch in Lebewesen und Organismen, welche unter extremen Bedingungen leben. Berücksichtigt man zudem die der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beigemessene Rolle bei der Entstehung des Lebens auf der Erde und anderswo im Universum, ergibt sich ein weiterer Anreiz für die Untersuchung von Proteinkondensaten unter Extrembedingungen. Vor diesem Hintergrund untersuchte diese Arbeit die In-vitro-Entmischung von mehreren strukturell und kompositionell verschiedenen Proteinen in Abhängigkeit von extremen Bedingungen, welche von erhöhten Temperaturen und Drücken bis hin zu extremen Salinitäten sowie Kombinationen derselben reichen.

Im ersten Projekt dieser Arbeit wurde die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der beiden intrinsisch ungeordneten Proteine Ddx4 und FUS untersucht und dabei die temperatur- und druckabhängigen Phasengrenzlinien der Entmischung bestimmt. Die Ergebnisse der parameterabhängigen Entmischungsuntersuchung beider Proteine weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Zum einen entmischen die Proteine unterhalb einer kritischen Lösungstemperatur (Ddx4: 28 °C, FUS: 30 °C), zum anderen lösen sich ihre Proteinkondensate bei Druckapplikation auf. Diese Druckempfindlichkeit kann im Fall beider Proteine durch eine Temperaturerniedrigung minimiert werden. Darüber hinaus konnte durch den Osmolyt TMAO ein stabilisierender Effekt auf die druckabhängige Entmischung von Ddx4 bewirkt werden. Bezüglich des Proteins FUS wurde gezeigt, dass der Crowder Ficoll sowohl die Temperatur- als auch die Druckphasengrenzlinien zu signifikant höheren Werten verschiebt. Der beobachtete Effekt von TMAO sowie von Ficoll äußert sich in einer konzentrationsabhängi-

gen Art und Weise.

In einem zweiten Projekt wurde der Einfluss einer marsähnlichen Umgebung auf die Entmischung von Proteinen untersucht, da die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung eine besondere Rolle bei der Entstehung von Leben in einer präbiotischen Welt gespielt haben könnte. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von marstypischen Salzen in verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit Hochdruck auf die Entmischung von drei verschiedenen Proteinen (LAF-1, α -Elastin, γ D-Kristallin) analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Phasentrennung dieser von der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins, der Salzkonzentration und Ionenart sowie vom Druck abhängig ist. In einigen Fällen wurde bei sehr hohen, multimolaren Salzkonzentrationen sogar ein wiedereintretender Phasenübergang beobachtet. FTIR-spektroskopische Untersuchungen am Protein γ D-Kristallin legen nahe, dass die Effekte der Salze auf eine Beeinflussung der entmischungsvermittelnden Interaktionen zurückzuführen sind und nicht auf salzinduzierte Änderungen der Proteinsekundärstruktur. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass Proteinkondensate selbst unter harschen Umweltbedingungen bestehen bleiben können.

Im dritten Projekt war es das Ziel, mehr über die dielektrische Umgebung in den Tröpfchen in Erfahrung zu bringen, da diese auch beeinflusst, welche Client-Moleküle in die Tröpfchen aufgenommen werden und wie schnell Reaktionen in Tröpfchen ablaufen. Zu diesem Zweck wurde die dielektrische Konstante als Maß der Polarität am phasenseparierten Zustand des Proteins α -Elastin bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass sich die Bestimmung der dielektrischen Konstante durch die Methode der dielektrischen Spektroskopie als schwierig erweist, weil der Maxwell-Wagner-Effekt in phasenseparierten Systemen stark ausfällt und alle weiteren dielektrischen Relaxationsprozesse dominiert.

Im vierten Projekt wurde die Entmischung von Antikörpern, welche für die Therapie zahlreicher Humankrankheiten von besonderer Wichtigkeit sind, untersucht. Typischerweise werden pharmazeutische Formulierungen durch die Zugabe von Kosolutes vor Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, Aggregation und Präzipitation geschützt. Hier konnte am Beispiel des Proteins γ -Globulin gezeigt werden, dass auch Druck ein geeigneter Parameter ist, um diese Übergänge in Antikörperlösungen zu verhindern. Die große Druckempfindlichkeit der Globulinkondensate kann auf transiente wasserfreie Hohlräume in den Proteinkondensaten zurückgeführt werden, welche aufgrund der Y-förmigen Struktur des Proteins entstehen. Ein Zusatz von Kosolutes wie TMAO hat kaum einen Effekt auf die Stabilität von γ -Globulinkondensaten. FTIR-spektroskopisch demonstriert wurde außerdem, dass die Druckapplikation bis zu Drücken von ca. 7000 bar keine Änderungen der Sekundärstruktur von γ -Globulin verursacht.

Summary

As boundaries of both cells and organelles lipid membranes enable a myriad of processes and functions. In addition to membrane-bound organelles, cells also contain membraneless organelles, which in recent years have increasingly become the focus of research and perform equally important cellular functions. These membraneless organelles usually contain several proteins as well as RNA and DNA and are formed by the process of liquid-liquid phase separation, by which a homogeneous protein solution demixes into a protein-rich and a protein-poor phase. As these protein condensates are intracellular bodies, they are also formed in organisms living under extreme conditions. Considering the proposed role of liquid-liquid phase separation in the origin of life on Earth and elsewhere in the universe, there is a further incentive to study protein condensates under extreme conditions. In this context, the present work investigated the *in vitro* liquid-liquid phase separation of several structurally and compositionally distinct proteins in response to extreme conditions, ranging from elevated temperatures and pressures to extreme salinities as well as combinations thereof. In the first project of this work, the liquid-liquid phase separation of two intrinsically disordered proteins (Ddx4 and FUS) was investigated, determining the temperature- and pressure-dependent phase boundaries of their demixing. The results of this parameter-dependent phase separation study of both proteins show several similarities. First, the proteins undergo phase separation below a critical solution temperature (Ddx4: 28 °C, FUS: 30 °C) and secondly, their protein condensates dissolve upon pressure application. This pressure sensitivity can be minimized in both cases by lowering the temperature. Furthermore, a stabilizing effect on the pressure-dependent phase separation of Ddx4 could be achieved by the addition of the osmolyte TMAO. Regarding the protein FUS, the crowding agent Ficoll was shown to shift the temperature as well as the pressure phase boundaries towards significant higher values. The observed effect of both TMAO and Ficoll manifests itself in a concentration-dependent manner.

In a second project, the influence of a Mars-like environment on the proteaceous phase separation was investigated as liquid-liquid phase separation may have played an important role in the origin of life in a prebiotic world. In this context, the influence of several Martian

Summary

salts at different concentrations and in combination with high pressure was studied on the demixing of three different proteins (LAF-1, α -elastin, γ D-crystallin). It was found that the phase separation of these proteins is dependent on the amino acid sequence of the respective protein, the salt concentration and ion type as well as pressure. In some cases, a reentrant phase transition was observed even at very high, multimolar salt concentrations. FTIR spectroscopic studies using the protein γ D-crystallin suggest that the salt effects are due to an influence on the separation-mediating interactions rather than salt-induced changes in the protein's secondary structure. Taken together, the results of this study indicate that protein condensates can persist even under harsh environmental conditions.

In the third project, the goal was to learn more about the dielectric environment in the droplets as this also affects which client molecules are taken up into the droplets and how fast reactions occur in droplets. For this purpose, the dielectric constant of the phase-separated protein α -elastin was determined as a measure of polarity. Here it became apparent that the determination of the dielectric constant by the method of dielectric spectroscopy proves to be difficult, since the Maxwell-Wagner effect is very strong in phase-separated systems and dominates all other dielectric relaxation processes.

The fourth project investigated the phase separation of antibodies, which are of particular importance in the therapy of numerous human diseases. Typically, pharmaceutical formulations are protected from liquid-liquid phase separation, aggregation and precipitation by the addition of cosolutes. Here, it was shown that pressure is also a suitable parameter to prevent these transitions in solutions of the protein γ -globulin. The high-pressure sensitivity of the globulin condensates can be attributed to transient anhydrous void volumes in the protein condensates, which are formed due to the Y-shaped structure of the protein. The addition of cosolutes such as TMAO has little effect on the stability of γ -globulin condensates. By means of FTIR spectroscopy it was also demonstrated that pressure application up to pressures of about 7000 bar does not cause any changes in the secondary structure of γ -globulin.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag, *Cell* **2019**, *176*, 419–434.
- [2] E. Dolgin, *Nature* **2018**, *555*, 300–302.
- [3] B. Wang, L. Zhang, T. Dai, Z. Qin, H. Lu, L. Zhang, F. Zhou, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 290.
- [4] C. P. Brangwynne, C. R. Eckmann, D. S. Courson, A. Rybarska, C. Hoegel, J. Gharrakhani, F. Jülicher, A. A. Hyman, *Science* **2009**, *324*, 1729–1732.
- [5] Y. Hayashi, L. K. Ford, L. Fioriti, L. McGurk, M. Zhang, *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 834–844.
- [6] B. Y. Zaslavsky, L. A. Ferreira, V. N. Uversky, *Biomolecules* **2019**, *9*, 473.
- [7] S. Alberti, *Curr. Biol.* **2017**, *27*, R1097–R1102.
- [8] E. Astoricchio, C. Alfano, L. Rajendran, P. A. Temussi, A. Pastore, *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45*, 706–717.
- [9] Y. Shin, C. P. Brangwynne, *Science* **2017**, *357*, eaaf4382.
- [10] H. Yoo, C. Triandafillou, D. A. Drummond, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 7151–7159.
- [11] A. P. Minton, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 2363–2370.
- [12] N. Martin, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2553–2568.
- [13] C. D. Crowe, C. D. Keating, *Interface Focus* **2018**, *8*, 20180032.
- [14] M. Abbas, W. P. Lipiński, J. Wang, E. Spruijt, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3690–3705.
- [15] R. R. Poudyal, F. Pir Cakmak, C. D. Keating, P. C. Bevilacqua, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2509–2519.
- [16] N. A. Yewdall, A. A. M. André, T. Lu, E. Spruijt, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2021**, *52*, 101416.
- [17] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [18] H. Cinar, S. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 8286–8291.
- [19] S. Da Vela, C. Exner, R. S. Schäuferle, J. Möller, Z. Fu, F. Zhang, F. Schreiber, *Soft Matter* **2017**, *13*, 8756–8765.
- [20] A. Testa, M. Dindo, A. A. Rebane, B. Nasouri, R. W. Style, R. Golestanian, E. R. Dufresne, P. Laurino, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6293.
- [21] X. Liu, Y. Xiong, C. Zhang, R. Lai, H. Liu, R. Peng, T. Fu, Q. Liu, X. Fang, S. Mann, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11036–11043.
- [22] M. Mimura, S. Tomita, H. Sugai, Y. Shinkai, S. Ishihara, R. Kurita, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.

- [23] C. L. Cuevas-Velazquez, J. R. Dinneny, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *45*, 68–74.
- [24] 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.
- [25] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, M. K. Rosen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285–298.
- [26] G. Laflamme, K. Mekhail, *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 773.
- [27] D. Zwicker, R. Seyboldt, C. A. Weber, A. A. Hyman, F. Jülicher, *Nat. Phys.* **2017**, *13*, 408–413.
- [28] M. Bowker, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 205–206.
- [29] S. Alberti, D. Dormann, *Annu. Rev. Genet.* **2019**, *53*, 171–194.
- [30] Z. Feng, X. Chen, X. Wu, M. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 14823–14835.
- [31] K. K. Nakashima, M. A. Vibhute, E. Spruijt, *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*.
- [32] A. A. Hyman, C. A. Weber, F. Jülicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 39–58.
- [33] S. Botterbusch, T. Baumgart, *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1288.
- [34] C. P. Brangwynne, P. Tompa, R. V. Pappu, *Nat. Phys.* **2015**, *11*, 899–904.
- [35] P. Bhat, D. Honson, M. Guttman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 653–670.
- [36] 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.* **2017**, *114*, E8194–E8203.
- [37] B. S. Schuster, E. H. Reed, R. Parthasarathy, C. N. Jahnke, R. M. Caldwell, J. G. Bermudez, H. Ramage, M. C. Good, D. A. Hammer, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2985.
- [38] S. Spann, M. Tereshchenko, G. J. Mastromarco, S. J. Ihn, H. O. Lee, *Traffic* **2019**, *20*, 890–911.
- [39] C. Rabouille, S. Alberti, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *47*, 34–42.
- [40] J. Lu, J. Qian, Z. Xu, S. Yin, L. Zhou, S. Zheng, W. Zhang, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 631486.
- [41] T. Lu, E. Spruijt, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 2905–2914.
- [42] S. F. Banani, A. M. Rice, W. B. Peeples, Y. Lin, S. Jain, R. Parker, M. K. Rosen, *Cell* **2016**, *166*, 651–663.
- [43] T. J. Nott, E. Petsalaki, P. Farber, D. Jervis, E. Fussner, A. Plochowietz, T. D. Craggs, D. P. Bazett-Jones, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, A. J. Baldwin, *Mol. Cell* **2015**, *57*, 936–947.
- [44] A. K. Itakura, R. A. Futia, D. F. Jarosz, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2520–2529.
- [45] J. Berry, S. C. Weber, N. Vaidya, M. Haataja, C. P. Brangwynne, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E5237–E5245.
- [46] S. Elbaum-Garfinkle, Y. Kim, K. Szczepaniak, C. C.-H. Chen, C. R. Eckmann, S. Myong, C. P. Brangwynne, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 7189–7194.
- [47] A. Zbinden, M. Pérez-Berlanga, P. De Rossi, M. Polymenidou, *Dev. Cell* **2020**, *55*, 45–68.
- [48] A. Boija, I. A. Klein, R. A. Young, *Cancer Cell* **2021**, *39*, 174–192.
- [49] S. Ray, N. Singh, R. Kumar, K. Patel, S. Pandey, D. Datta, J. Mahato, R. Panigrahi, A. Navalkar, S. Mehra, L. Gadhe, D. Chatterjee, A. S. Sawner, S. Maiti, S. Bhatia, J. A. Gerez, A. Chowdhury, A. Kumar, R. Padinhateeri, R. Riek, G. Krishnamoorthy, S. K. Maji, *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 705–716.
- [50] M. Hofweber, S. Hutten, B. Bourgeois, E. Spreitzer, A. Niedner-Boblentz, M. Schifferer, M.-D. Ruepp, M. Simons, D. Niessing, T. Madl, D. Dormann, *Cell* **2018**, *173*, 706-719.e13.

- [51] A. Patel, H. O. Lee, L. Jawerth, S. Maharana, M. Jahnel, M. Y. Hein, S. Stoykov, J. Mahamid, S. Saha, T. M. Franzmann, A. Pozniakovski, I. Poser, N. Maghelli, L. A. Royer, M. Weigert, E. W. Myers, S. Grill, D. Drechsel, A. A. Hyman, S. Alberti, *Cell* **2015**, *162*, 1066–1077.
- [52] W. M. Babinchak, R. Haider, B. K. Dumm, P. Sarkar, K. Surewicz, J.-K. Choi, W. K. Surewicz, *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 6306–6317.
- [53] S. Wegmann, B. Eftekhazadeh, K. Tepper, K. M. Zoltowska, R. E. Bennett, S. Dujardin, P. R. Laskowski, D. MacKenzie, T. Kamath, C. Commins, C. Vanderburg, A. D. Roe, Z. Fan, A. M. Molliex, A. Hernandez-Vega, D. Muller, A. A. Hyman, E. Mandelkow, J. P. Taylor, B. T. Hyman, *EMBO J.* **2018**, *37*, DOI 10.15252/embj.201798049.
- [54] E. C. Petronilho, M. M. Pedrote, M. A. Marques, Y. M. Passos, M. F. Mota, B. Jakubus, G. dos S. de Sousa, F. Pereira da Costa, A. L. Felix, G. D. S. Ferretti, F. P. Almeida, Y. Cordeiro, T. C. R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, J. L. Silva, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 7334–7349.
- [55] N. M. Kanaan, C. Hamel, T. Grabinski, B. Combs, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2809.
- [56] S. Koga, D. S. Williams, A. W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 720–724.
- [57] M. Abbas, W. P. Lipiński, K. K. Nakashima, W. T. S. Huck, E. Spruijt, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 1046–1054.
- [58] B. Drobot, J. M. Iglesias-Artola, K. Le Vay, V. Mayr, M. Kar, M. Kreysing, H. Mutschler, T.-Y. D. Tang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3643.
- [59] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858–875.
- [60] P. Rampelotto, *Life* **2013**, *3*, 482–485.
- [61] N. Merino, H. S. Aronson, D. P. Bojanova, J. Feyhl-Buska, M. L. Wong, S. Zhang, D. Giovannelli, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
- [62] I. von Hegner, *Extremophiles* **2020**, *24*, 167–175.
- [63] R. Cavicchioli, *Astrobiology* **2002**, *2*, 281–292.
- [64] E. V. Pikuta, R. B. Hoover, J. Tang, *Crit. Rev. Microbiol.* **2007**, *33*, 183–209.
- [65] A. Ahmad, Rahamtullah, R. Mishra, *Biophys. Rev.* **2022**, *14*, 499–515.
- [66] M. Hishida, R. Anjum, T. Anada, D. Murakami, M. Tanaka, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 2466–2475.
- [67] A. Panuszko, P. Bruździak, E. Kaczkowska, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 11159–11169.
- [68] M. Mukherjee, J. Mondal, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 11316–11323.
- [69] M. M. Santoro, Y. Liu, S. M. Khan, L. X. Hou, D. W. Bolen, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5278–5283.
- [70] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2951–2972.
- [71] T. O. Street, D. W. Bolen, G. D. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 13997–14002.
- [72] R. Kumar, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *491*, 1–6.
- [73] M. B. Burg, J. D. Ferraris, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 7309–7313.
- [74] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819–2830.
- [75] D. R. Canchi, A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 273–293.
- [76] I. M. Kuznetsova, B. Y. Zaslavsky, L. Breydo, K. K. Turoverov, V. N. Uversky, *Molecules* **2015**, *20*, 1377–1409.
- [77] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 597–604.
- [78] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599–620.

- [79] J. van den Berg, A. J. Boersma, B. Poolman, *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 309–318.
- [80] D. Gnutt, M. Gao, O. Brylski, M. Heyden, S. Ebbinghaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2548–2551.
- [81] A. C. Murthy, G. L. Dignon, Y. Kan, G. H. Zerze, S. H. Parekh, J. Mittal, N. L. Fawzi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 637–648.
- [82] S. Qamar, G. Wang, S. J. Randle, F. S. Ruggeri, J. A. Varela, J. Q. Lin, E. C. Phillips, A. Miyashita, D. Williams, F. Ströhl, W. Meadows, R. Ferry, V. J. Dardov, G. G. Tartaglia, L. A. Farrer, G. S. Kaminski Schierle, C. F. Kaminski, C. E. Holt, P. E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, D. Klenerman, T. Knowles, M. Vendruscolo, P. St George-Hyslop, *Cell* **2018**, *173*, 720–734.e15.
- [83] T. Yoshizawa, R. Ali, J. Jiou, H. Y. J. Fung, K. A. Burke, S. J. Kim, Y. Lin, W. B. Peeples, D. Saltzberg, M. Soniat, J. M. Baumhardt, R. Oldenbourg, A. Sali, N. L. Fawzi, M. K. Rosen, Y. M. Chook, *Cell* **2018**, *173*, 693–705.e22.
- [84] A. Bonucci, M. G. Murralli, L. Banci, R. Pierattelli, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20956.
- [85] K. A. Burke, A. M. Janke, C. L. Rhine, N. L. Fawzi, *Mol. Cell* **2015**, *60*, 231–241.
- [86] N. Erwin, *Biophysikalische Einblicke in Die Wechselwirkungen von Lipidierten Signalproteinen Mit Membranen Und Regulatorproteinen*, TU Dortmund, **2018**.
- [87] H. Cinar, R. Winter, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17245.
- [88] J.-M. Knop, S. Mukherjee, M. W. Jaworek, S. Kriegler, M. Manisegaran, Z. Fetahaj, L. Ostermeier, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Chem. Rev.* **2022**, DOI 10.1021/acs.chemrev.2c00491.
- [89] J. Schulze, J. Möller, J. Weine, K. Julius, N. König, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 14252–14256.
- [90] S. Li, T. Yoshizawa, R. Yamazaki, A. Fujiwara, T. Kameda, R. Kitahara, *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 6821–6829.
- [91] J. P. Harrison, N. Gheeraert, D. Tsigelnitskiy, C. S. Cockell, *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 204–212.
- [92] F. Inagaki, K.-U. Hinrichs, Y. Kubo, M. W. Bowles, V. B. Heuer, W.-L. Hong, T. Hoshino, A. Ijiri, H. Imachi, M. Ito, M. Kaneko, M. A. Lever, Y.-S. Lin, B. A. Methé, S. Morita, Y. Morono, W. Tanikawa, M. Bihan, S. A. Bowden, M. Elvert, C. Glombitza, D. Gross, G. J. Harrington, T. Hori, K. Li, D. Limmer, C.-H. Liu, M. Murayama, N. Ohkouchi, S. Ono, Y.-S. Park, S. C. Phillips, X. Prieto-Mollar, M. Purkey, N. Riedinger, Y. Sanada, J. Sauvage, G. Snyder, R. Susilawati, Y. Takano, E. Tasumi, T. Terada, H. Tomaru, E. Trembath-Reichert, D. T. Wang, Y. Yamada, *Science* **2015**, *349*, 420–424.
- [93] H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. H. A. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 13049–13069.
- [94] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erkkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 028101.
- [95] M. H. Hecht, S. P. Kounaves, R. C. Quinn, S. J. West, S. M. M. Young, D. W. Ming, D. C. Catling, B. C. Clark, W. V. Boynton, J. Hoffman, L. P. DeFlores, K. Gospodinova, J. Kapit, P. H. Smith, *Science* **2009**, *325*, 64–67.
- [96] V. J. Laye, S. DasSarma, *Astrobiology* **2018**, *18*, 412–418.
- [97] S. Gault, M. W. Jaworek, R. Winter, C. S. Cockell, *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 1–9.
- [98] C. S. Cockell, *Astrobiology: Understanding Life in the Universe*, Wiley-Blackwell, **2020**.

- [99] S. M. Clifford, J. Lasue, E. Heggy, J. Boisson, P. McGovern, M. D. Max, *J. Geophys. Res. Planets* **2010**, *115*, DOI 10.1029/2009JE003462.
- [100] R. Orosei, S. E. Lauro, E. Pettinelli, A. Cicchetti, M. Coradini, B. Cosciotti, F. Di Paolo, E. Flamini, E. Mattei, M. Pajola, F. Soldovieri, M. Cartacci, F. Cassenti, A. Frigeri, S. Giuppi, R. Martufi, A. Masdea, G. Mitri, C. Nenna, R. Noschese, M. Restano, R. Seu, *Science* **2018**, *361*, 490–493.
- [101] S. E. Lauro, E. Pettinelli, G. Caprarelli, L. Guallini, A. P. Rossi, E. Mattei, B. Cosciotti, A. Cicchetti, F. Soldovieri, M. Cartacci, F. Di Paolo, R. Noschese, R. Orosei, *Nat. Astron.* **2021**, *5*, 63–70.
- [102] S. Lenton, N. H. Rhys, J. J. Towey, A. K. Soper, L. Dougan, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 919.
- [103] A. Gendrin, N. Mangold, J.-P. Bibring, Y. Langevin, B. Gondet, F. Poulet, G. Bonello, C. Quantin, J. Mustard, R. Arvidson, S. LeMouélic, *Science* **2005**, *307*, 1587–1591.
- [104] R. Oliva, S. K. Mukherjee, Z. Fetahaj, S. Möbitz, R. Winter, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11577–11580.
- [105] L. D. Muiznieks, S. Sharpe, R. Pomès, F. W. Keeley, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4741–4753.
- [106] B. A. Cox, B. C. Starcher, D. W. Urry, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 997–998.
- [107] E. Schreiner, C. Nicolini, B. Ludolph, R. Ravindra, N. Otte, A. Kohlmeyer, R. Rousseau, R. Winter, D. Marx, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 148101.
- [108] C. Nicolini, R. Ravindra, B. Ludolph, R. Winter, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1385–1392.
- [109] S. Rauscher, R. Pomès, *eLife* **2017**, *6*, e26526.
- [110] G. B. Benedek, *Appl. Opt.* **1971**, *10*, 459–473.
- [111] G. M. Thurston, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 134909.
- [112] S. Qin, H.-X. Zhou, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8164–8174.
- [113] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C139139&Units=SI&Type=IR-SPEC&Index=1#IR-SPEC>, **2022**
- [114] K. Akasaka, H. Matsuki, *High Pressure Bioscience. Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Springer Dordrecht, **2015**.
- [115] 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.
- [116] R. Winter, *Annu. Rev. Biophys.* **2019**, *48*, 441–463.
- [117] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, *1595*, 201–209.
- [118] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, Amsterdam, **2011**.
- [119] A. A. Lee, C. S. Perez-Martinez, A. M. Smith, S. Perkin, *Phys. Rev. Lett.* **2017**, *119*, 026002.
- [120] P. Gaddam, W. Ducker, *Langmuir* **2019**, *35*, 5719–5727.
- [121] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1475–1498.
- [122] S. Shimizu, N. Matubayasi, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **2021**, *563*, 125385.
- [123] M. R. Fries, N. F. Conzelmann, L. Günter, O. Matsarskaia, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, F. Zhang, F. Schreiber, *Langmuir* **2021**, *37*, 139–150.
- [124] S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6155–6158.
- [125] M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 241–277.
- [126] O. Matsarskaia, F. Roosen-Runge, F. Schreiber, *ChemPhysChem* **2020**, *21*, 1742–1767.

- [127] G. Krainer, T. J. Welsh, J. A. Joseph, J. R. Espinosa, S. Wittmann, E. de Csilléry, A. Sridhar, Z. Toprakcioglu, G. Gudiškytė, M. A. Czekalska, W. E. Arter, J. Guillén-Boixet, T. M. Franzmann, S. Qamar, P. S. George-Hyslop, A. A. Hyman, R. Collepardo-Guevara, S. Alberti, T. P. J. Knowles, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1085.
- [128] M. Bolgan, E. Parmentier, *Fish Fish.* **2020**, *21*, 1238–1252.
- [129] E. Jéquier, F. Constant, *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 115–123.
- [130] F. Westall, A. Brack, *Space Sci. Rev.* **2018**, *214*, 50.
- [131] C. P. McKay, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 12628–12633.
- [132] A. M. Küffner, M. Prodan, R. Zuccarini, U. Capasso Palmiero, L. Faltova, P. Arosio, *ChemSystemsChem* **2020**, *2*, DOI 10.1002/syst.202000001.
- [133] F. Bibi, M. Villain, C. Guillaume, B. Sorli, N. Gontard, *Sensors* **2016**, *16*, 1232.
- [134] M. Wolf, R. Gulich, P. Lunkenheimer, A. Loidl, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2012**, *1824*, 723–730.
- [135] Y.-H. Lin, J. P. Brady, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *New J. Phys.* **2017**, *19*, 115003.
- [136] C. G. Malmberg, A. A. Maryott, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1956**, *56*.
- [137] J. Qian, S. Yan, Z. Li, L. Yu, X. Wang, Z. Zhang, J. Sun, X. Han, *Polymers* **2022**, *14*, 2743.
- [138] A. Song, Y. Liu, T. Feng, H. Li, Y. Zhang, X. Wang, L. Liu, B.-P. Zhang, J.-F. Li, *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32*, 2204385.
- [139] R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu, C.-C. Lee, H.-Z. Tsai, H.-J. Li, H.-C. Wu, *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 1.
- [140] Y. Wang, A. Lomakin, R. F. Latypov, J. P. Laubach, T. Hideshima, P. G. Richardson, N. C. Munshi, K. C. Anderson, G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 121904.
- [141] D. Corti, L. A. Purcell, G. Snell, D. Veessler, *Cell* **2021**, *184*, 3086–3108.
- [142] R. W. Thompson, R. F. Latypov, Y. Wang, A. Lomakin, J. A. Meyer, S. Vunnum, G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 185101.
- [143] S. Da Vela, F. Roosen-Runge, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, T. Seydel, H. Frielinghaus, M. Sztucki, R. Schweins, F. Zhang, F. Schreiber, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5759–5769.
- [144] K. Reiche, J. Hartl, A. Blume, P. Garidel, *Biophys. Chem.* **2017**, *220*, 7–19.
- [145] A. S. Raut, D. S. Kalonia, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 774–783.
- [146] A. Girelli, C. Beck, F. Bäuerle, O. Matsarskaia, R. Maier, F. Zhang, B. Wu, C. Lang, O. Czakkel, T. Seydel, F. Schreiber, F. Roosen-Runge, *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 4162–4169.
- [147] D. D. Banks, J. F. Cordia, *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 1285–1292.
- [148] R. M. Absmeier, G. J. Rottenaicher, H. L. Svilenov, P. Kazman, J. Buchner, *FEBS J.* **2022**, DOI: 10.1111/febs.16390, DOI 10.1111/febs.16390.
- [149] H. Cinar, R. Oliva, Y.-H. Lin, X. Chen, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26*, 11024–11031.
- [150] K. Julius, J. Weine, M. Berghaus, N. König, M. Gao, J. Latarius, M. Paulus, M. A. Schroer, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2018**, *121*, 038101.
- [151] H. Cinar, R. Oliva, H. Wu, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 1734–1741.
- [152] R. Kitahara, R. Yamazaki, F. Ide, S. Li, Y. Shiramasa, N. Sasahara, T. Yoshizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 19697–19702.
- [153] R. Mishra, R. Winter, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6618–6621.

- [154] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [155] P. H. Yancey, *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **2020**, *333*, 398–420.
- [156] K. Julius, J. Weine, M. Gao, J. Latarius, M. Elbers, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Macromolecules* **2019**, *52*, 1772–1784.
- [157] H. Laurent, D. L. Baker, A. K. Soper, M. E. Ries, L. Dougan, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 10983–10993.
- [158] C. Hölzl, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 144104.
- [159] F. C. Hay, O. M. Westwood, *Practical Immunology*, Wiley, **2002**.
- [160] A. A. Paladini, G. Weber, *Rev. Sci. Instrum.* **1981**, *52*, 419–427.
- [161] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [162] J. Buijs, W. Norde, J. W. Th. Lichtenbelt, *Langmuir* **1996**, *12*, 1605–1613.
- [163] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1862–1869.
- [164] A. W. P. Vermeer, W. Norde, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 394–404.
- [165] J.-J. Luo, F.-G. Wu, J.-S. Yu, R. Wang, Z.-W. Yu, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8901–8909.
- [166] N. König, M. Paulus, K. Julius, J. Schulze, M. Voetz, M. Tolan, *Biophys. Chem.* **2017**, *231*, 45–49.
- [167] T. V. Chalikian, *Subcell. Biochem.* **2015**, *72*, 41–58.
- [168] J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. García-Moreno E., C. A. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 6945–6950.
- [169] D. Knorr, A. Froehling, H. Jaeger, K. Reineke, O. Schlueter, K. Schoessler, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 203–235.
- [170] N. K. Rastogi, *Recent Developments in High Pressure Processing of Foods*, Springer, New York, **2013**.
- [171] W. L. Hurley, P. K. Theil, *Nutrients* **2011**, *3*, 442–474.

Anhang

- Aminosäuresequenzen von LAF-1, MBP-FUS, γ D-Kristallin und Ddx4
- Eidesstattliche Versicherung
- Permissions

A.1 Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine

A.1.1 LAF-1

MESNQSNNGGSGNAALNRGGRYVPPHLRGGDGGAAAAASAGGDDRRGGAGGGGYRRGGGN
SGGGGGGGYDRGYNDNRDDRDNRRGGSSGGYGRDRNYEDRGYNGGGGGGGNRYNNNRGGGG
GGYNRQDRGDGSSNFSRGGYNNRDEGSDNRGSGRSYNNDRRDNGGDGQNTRWNNLDAPP
SRGTSKWENRGARDERIEQELFSGQLSGINFDKYEEIPVEATGDDVPQPISLFSDLSLHE
WIEENIKTAGYDRPTPVQKYSIPALQGGRDLMSCAQTGSGKTA AFLVPLVNAILQDGPDA
VHRSVTSSGGRKKQYPSALVLSPTRELSLQIFNESRKFA YRTPITSALLYGGRENYKDQI
HKLRLGCHIL IATPGRLIDVMDQGLIGMEGCRYLVLDEADRMLDMGFEPQIRQIVECNRM
PSKEERITAMFSATFPKEIQLLAQDFLKENYVFLAVGRVGSTSENIMQKIVWVEEDEKRS
YLMDLLDATGDSSLTLVFVETKRGASDLAYLNRQNYEVVTIHGDLKQFEREKHLDFRT
GTAPILVATAVAARGLDIPNVKHVINYDLPSDVDEYVHRIGRTGRVGNVGLATSFNDKN
RNIARELMDLIVEANQELPDWLEGMSGDMRSGGGYRGRGGRGNGQRFGGRDHRYQGGSGN
GGGGNGGGGGFGGGGQRSGGGGGFQSGGGGGRQQQQQRAQPQQDWWSLVPR|GSLHHHH
HH

Legende:

LAF-1, Thrombin-Erkennungssequenz (inklusive Schnittstelle), 6xHis-Tag

722 Aminosäuren, MW: 78,0 kDa

A.1.2 MBP-FUS (Addgene: Plasmidnummer 98651)

MGSDKI HHHHHHSSGT KIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLE
 EKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLI
 AYP IAVEALS LIYNKDLLPNPPKTWEEI PALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAAD
 GGYAFKYENKDYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKKNHMNADTDYSIAEAAFNKGETAM
 TINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYL
 LTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVR
 TAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSGSDITSLYKKAEGGTENLYFQGHMASNDYTQQATQS
 YGAYPTQPGQGYSSQSSQPYGQSSYSGYSQSTDTSGYGQSSYSSYGQSQNTGYGTQSTPQ
 GYGSTGGYGSSQSSQSSYGGQSSYPGYGQQPAPSSTSGSYGSSSQSSSYGQPQSGSYSQQ
 PSYGGQQQSYGQQQSYNPPQGYGQQNQYNSSSGGGGGGGGGNYGQDQSSMSGGGGSGGG
 YGNQDQSGGGGSGGYGQQDRGGRGRGGSGGGGGGGGGYNRSSGGYEPRGRGGGRGGRGG
 MGGSDRGGFNKFGGPRDQGSRHDSQDNSDNNTIFVQGLGENVTIESVADYFKQIGI IKT
 NKKTGQPMINLYTDRETGKLGKGEATVSFDDPPSAKAAIDWFDGKEFSGNPIKVSFATRA
 DFNRRGGNGRGGRRGGPMGRGGYGGGGSGGGRRGGFPSSGGGGGGQQRAGDWKCPNPTC
 ENMNF SWRNECNQCKAPKPDGPGGGPGGSHMGGNYGDDRRGGRRGGYDRGGYRGRGGDRGG
 FRGGRRGGDRGGFGPGKMDSRGEHRQDRRERP Y

Legende:

6xHis-Tag, MBP, TEV-Erkennungssequenz (inklusive Schnittstelle), FUS

933 Aminosäuren, MW: 98,1 kDa

A.1.3 γ D-Kristallin

MGKITLYEDRGFQGRHYECSSDHPNLQPYLSRCNSARVDSGCWMLYEQPNYSGLQYFLRR
GDYADHQQWMGLSDSVRSCRLIPHSGSHRIRLYEREDYRGQMIEFTEDCSCLQDRFRFNE
IHSLNVLEGSWVLYELSNYRGRQYLLMPGDYRRYQDWGATNARVGSLRRVIDFSLEHHHH
HH

Legende:

γ D-Kristallin, 6xHis-Tag

182 Aminosäuren, MW: 21,8 kDa

A.1.4 Ddx4 (N-terminale Domäne)

GAMGSMGDEDWEAEINPHMSSYVPIFEKDRYSGENGNFNRTPASSEMDDGPSRRDHFM
KSGFASGRNFGNRDAGESNKRDNSTMGFGVVGKSFGNRGFSNSRFEDGDSSGFWRESSN
DSEDNPTNRNRFSGKRGGYRDGNNSEASGPYRRGGRGSFRGSRGGFGLGSPNNDLDPDESM
QRTGGLFGSRRPVLSGTGNGDTSQSRSGSGSERGGYKGLNEEVITGSGKNSWKSEAEGGE
S

Legende:

Ddx4 (Nicht-Wildtyp, Cystein gegen Serin ausgetauscht)

241 Aminosäuren, MW: 25,8 kDa

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Fetahaj, Zamira
Name, Vorname
(Surname, first name)

215987
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.

Dortmund,
Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge in biomolekularen Systemen

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.**

Dortmund,
Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

License Number	5461880024997
License date	Jan 04, 2023
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemistry - A European Journal
Licensed Content Title	Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications
Licensed Content Author	Roland H. A. Winter, Hue Sun Chan, Robert M. Vernon, et al
Licensed Content Date	Aug 22, 2019
Licensed Content Volume	25
Licensed Content Issue	57
Licensed Content Pages	21
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Flüssig-Flüssig-Phasenübergänge in biomolekularen Systemen
Institution name	Technische Universität Dortmund
Expected presentation date	Mar 2023
Portions	Figure 9
Specific Languages	German

Life in Multi-Extreme Environments: Brines, Osmotic and Hydrostatic Pressure—A Physicochemical View

Author: Jim-Marcel Knop, Sanjib Mukherjee, Michel W. Jaworek, et al

Publication: Chemical Reviews

Publisher: American Chemical Society

Date: Oct 1, 2022

Copyright © 2022, American Chemical Society



PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Biomolecular Condensates under Extreme Martian Salt Conditions

Author: Zamira Fetahaj, Lena Ostermeier, Hasan Cinar, et al

Publication: Journal of the American Chemical Society

Publisher: American Chemical Society

Date: Apr 1, 2021

Copyright © 2021, American Chemical Society



PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

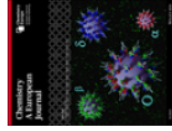
This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW



Suppression of Liquid-Liquid Phase Separation and Aggregation of Antibodies by Modest Pressure Application

Author: Zamira Felahaj, Michel W. Jaworek, Rosario Oliva, et al

Publication: Chemistry - A European Journal

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Jul 18, 2022

© 2022 The Authors. *Chemistry - A European Journal* published by Wiley-VCH GmbH

Open Access Article

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

For an understanding of what is meant by the terms of the Creative Commons License, please refer to [Wiley's Open Access Terms and Conditions](#).

Permission is not required for this type of reuse.

Wiley offers a professional reprint service for high quality reproduction of articles from over 1400 scientific and medical journals. Wiley's reprint service offers:

- Peer reviewed research or reviews
- Tailored collections of articles
- A professional high quality finish
- Glossy journal style color covers
- Company or brand customisation
- Language translations
- Prompt turnaround times and delivery directly to your office, warehouse or congress.

Please contact our Reprints department for a quotation. Email corporatesalesusa@wiley.com or corporatesalesDE@wiley.com.