

DISSERTATION

Stabilität ausgewählter Flüssig-Flüssig-
Phasentrennungen in biomolekularen Systemen



vorgelegt von
Lena Ostermeier

2023

Stabilität ausgewählter Flüssig-Flüssig- Phasentrennungen in biomolekularen Systemen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Lena Ostermeier

geboren am 01.10.1996 in Schwerte

eingereicht bei der

Technischen Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Dortmund, Mai 2023

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Ostermeier, Lena
Name, Vorname
(Surname, first name)

184965
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 NorthRhine-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, 10.05.2023

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Stabilität ausgewählter Flüssig-Flüssig-Phasentrennungen 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, 10.05.2023

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Diese vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I an der Technischen Universität Dortmund unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter im Zeitraum von April 2020 bis April 2023 durchgeführt.

Dissertation eingereicht am:	10. Mai 2023
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Juni 2023

Prüfungskommission:	
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Norbert Krause
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Roland Winter
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Claus Czeslik

*„Jene, die die Schönheit
der Erde betrachten, finden
Kraftreserven, die so lange be-
stehen bleiben, wie das Leben
andauert.“*

Rachel Carson (1907-1964)

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Roland Winter für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit. Die ständigen Beratungen und Förderungen durch Diskussionen während der gesamten Zeit konnten viele Gedanken und Ergebnisse präzisieren. Des Weiteren bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Forschungsergebnisse im In- und Ausland vorzustellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Andrea Jeworrek für die Unterstützung bei organisatorischen und verwaltungstechnischen Aspekten.

Daneben danke ich Simone Möbitz für die Unterstützung bei der Aufreinigung und Expression mehrerer Proteine.

Für die gute Zusammenarbeit, für interessante sowie lehrreiche Diskussionen und für die erhaltene Unterstützung bedanke ich mich bei Dr. Rosario Oliva, Dr. Sanjib K. Mukherjee und insbesondere bei Dr. Michel Jaworek.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen aktuellen als auch ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physikalische Chemie I für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern für die große Hilfsbereitschaft und den gegebenen Rückhalt während des gesamten Studiums. Ohne eure Unterstützung wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis:

Kurzfassung.....	1
Abstract.....	3
I. Einleitung	5
I.1. Theorie der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung	6
I.2. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Natur	8
I.3. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Industrie.....	9
I.4. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Krankheiten	10
II. Messmethoden.....	12
II.1. UV/Vis-Spektroskopie	12
II.1.1. Theoretische Grundlagen	12
II.1.2. Instrumenteller Aufbau.....	14
II.2. Fluoreszenzspektroskopie	16
II.2.1. Theoretische Grundlagen	16
II.2.2. Instrumenteller Aufbau.....	17
II.3. Lichtmikroskopie.....	20
II.3.1. Theoretische Grundlagen	20
II.3.2. Instrumenteller Aufbau.....	21
II.4. CD-Spektroskopie.....	24
II.4.1. Theoretische Grundlagen	24
II.4.2. Instrumenteller Aufbau.....	25
III. Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α-Synucleins.....	27
III.1. Einleitung	27
III.2. Probenpräparation und Durchführung.....	30
III.3. Ergebnisse und Diskussion	34
III.4. Zusammenfassung	43
IV. Einfluss verschiedener Tröpfchensysteme auf den Fibrillierungsprozess des α-Synucleins.....	45
IV.1. Einleitung	45
IV.2. Probenpräparation und Durchführung.....	48
IV.3. Ergebnisse und Diskussion	50
IV.4. Zusammenfassung	58

V.	Einfluss extremer Salzbedingungen auf die Stabilität des biomolekularen Kondensats ATP/Poly-L-Lysin.....	59
V.1.	Einleitung	59
V.2.	Probenpräparation und Durchführung.....	61
V.3.	Ergebnisse und Diskussion	63
V.4.	Zusammenfassung	78
VI.	Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase.....	79
VI.1.	Einleitung	79
VI.2.	Probenpräparation und Durchführung.....	84
VI.3.	Ergebnisse und Diskussion	86
VI.4.	Zusammenfassung	93
VII.	Fazit und Ausblick.....	95
VIII.	Anhang.....	97
VIII.1.	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	97
VIII.2.	Ergänzende Daten des Projektes „Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α-Synucleins“	99
VIII.3.	Ergänzende Daten des Projektes „Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase“	105
VIII.4.	Abkürzungsverzeichnis	107
VIII.5.	Tabellenverzeichnis	110
VIII.6.	Abbildungsverzeichnis	110
VIII.7.	Literaturverzeichnis	115
IX.	Publikationsliste.....	126
X.	Konferenzbeiträge	127

Kurzfassung

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (englisch: *liquid-liquid phase separation*, LLPS) hat sich als Schlüsselmechanismus für die intrazelluläre Organisation erwiesen, wobei zahlreiche aktuellere Studien wesentliche Erkenntnisse über die Rolle der LLPS im Bereich der Zellbiologie geliefert haben. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die LLPS mit einer Reihe von Erkrankungen, einschließlich neurodegenerativer Krankheiten, in Verbindung gebracht werden kann. Die pathologische Aggregation des α -Synucleins, die in kausalem Zusammenhang mit der PARKINSON-Krankheit steht, kann durch Tröpfchenkondensation erfolgen, welche schließlich schrittweise in den amyloiden Zustand übergeht. Es wurde im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen, dass das antimikrobielle Peptid LL-III in der Lage ist, sowohl mit Monomeren als auch mit Kondensaten des α -Synucleins zu interagieren, was zu einer Stabilisierung des Tröpfchens führte und die Umwandlung in den fibrillären Zustand verhinderte. Dazu wurden hauptsächlich lichtmikroskopische Untersuchungen getätigt, sowie Messungen der *Steady-State*-Fluoreszenzanisotropie und der CD-Spektroskopie durchgeführt. Die Anti-Aggregations-Aktivität des LL-III wurde darüber hinaus in einem zellulären Modell bestätigt. Auf der Grundlage solcher Untersuchungen der Wechselwirkung von antimikrobiellen Peptiden mit flüssigen Kondensaten (wie etwa die des α -Synucleins) ist zu erwarten, dass ein Beitrag zum Verständnis von Krankheitsmechanismen entstehend aus solchen Kondensaten geleistet werden kann. Des Weiteren können so neue Möglichkeiten für medizinische Behandlungen eröffnet werden.

Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung kann darüber hinaus auch zur Bildung von biomolekularen Kondensaten führen, welche als eine der anfänglichen Kompartimentierungsstrategien von Zellen gelten, die auch heute noch bei der Bildung von nicht-membranartigen Kompartimenten in biologischen Zellen vorherrschen. Wenn solche biomolekularen LLPS auf ihre Eigenschaften unter Anwendung hoher Drücke untersucht werden, kann ein Beitrag zur Erforschung der Bildung von Urzellen unter präbiotischen Bedingungen geleistet werden. Solche hohen Drücke herrschen etwa in den unterirdischen Salzseen des Mars oder in den Tiefen des Meeresbodens auf der Erde. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Auswirkungen extremer Umweltbedingungen, insbesondere hochaggressiver Marssalze (Perchlorat und Sulfat) und hohen Drucks, auf die Bildung biomolekularer Proteinkondensate untersucht. Als Messmethode diente neben der UV/Vis-Spektroskopie hauptsächlich

die Lichtmikroskopie. Die Resultate belegen, dass die treibende Kraft für die Phasentrennung von Proteinen nicht nur von ihrer Aminosäuresequenz abhängig ist, sondern auch stark von der Art des Salzes und seiner Konzentration beeinflusst wird. Bei hohem Salzgehalt, wie er im Marsboden und in ähnlichen teils lebensfeindlichen Umgebungen auf der Erde anzutreffen ist, können attraktive kurzreichweitige Wechselwirkungen, Ionenkorrelationseffekte, hydrophobe und π -Elektronen getriebene Wechselwirkungen die LLPS für geeignete Polypeptidsequenzen aufrechterhalten. Ferner zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass Salze in der HOFMEISTER-Reihe eine unterschiedliche Wirkung auf die Verschiebung der Grenze der Unmischbarkeit, welche die Phasentrennung bestimmt, hatten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine räumliche Einschränkung durch molekulare *Crowder*, ähnlich wie in Rissen von Sedimenten und unterirdischen Salzwasserbecken in der Antarktis oder auf dem Mars, Flüssigphasentröpfchen erheblich stabilisieren konnte, was zu einer Erhöhung der Temperatur- und Druckstabilität der Tröpfchenphase führte.

Neben den Eigenschaften solcher biomolekularen Kondensate, diverse Krankheiten zu initiieren, kann eine ähnliche Art der Tröpfchen, die wässrigen Zweiphasensysteme, zudem mit biokatalytischen Reaktionen in Verbindung gebracht werden. Schließlich ist die gezielte Anpassung des Reaktionsmediums eine interessante Alternative zur Modulation der kinetischen Eigenschaften biokatalytischer Reaktionen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die kombinierte Wirkung eines wässrigen Zweiphasensystems und eines hohen hydrostatischen Drucks (englisch: *high hydrostatic pressure*, HHP) auf die Kinetik der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat zu CO₂ untersucht. Hierzu wurde die MICHAELIS-MENTEN-Kinetik an einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Der experimentelle Ansatz wurde durch eine thermodynamische Modellierung mit der *Perturbed-Chain Statistical Associating Fluid Theory* unterstützt, um die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und den Effekt des molekularen *Crowdings* auf die kinetischen Eigenschaften vorherzusagen. Dieser Ansatz ermöglicht bedeutende Fortschritte in der Bioprozesstechnik, einschließlich der Gestaltung von Prozessen mit einer deutlichen Verringerung der Anzahl an experimentellen Versuchen und *Trial-and-Error*-Ansätzen.

Abstract

Liquid-liquid phase separation (LLPS) has emerged as a key mechanism for intracellular organization, with numerous recent studies providing essential insights into the role of LLPS in the field of cell biology. Moreover, there is evidence that LLPS may be associated with a wide range of diseases, including neurodegenerative diseases. The pathological aggregation of α -Synuclein, which is causally related to PARKINSON's disease, may occur through droplet condensation, which eventually progresses gradually to the amyloid state. In the context of this thesis it was demonstrated that the antimicrobial peptide LL-III is able to interact with both monomers and condensates of α -Synuclein, which resulted in stabilization of the droplet and prevented its conversion to the fibrillar state. For this purpose, mainly light microscopy studies were performed, together with steady-state fluorescence anisotropy and CD spectroscopy measurements. The anti-aggregation activity of LL-III was further confirmed in a cellular model. Based on such investigations of the interaction of antimicrobial peptides with liquid condensates (such as those of α -Synuclein), a contribution to the understanding of disease mechanisms arising from such condensates is expected. Furthermore, this may open up new possibilities for medical interventions.

In addition, liquid-liquid phase separation can also lead to the formation of biomolecular condensates, which are considered to be one of the early compartmentalization strategies of cells that are still prevalent in the formation of non-membranous compartments in biological cells today. If such biomolecular LLPS are analyzed in terms of their behavior under the application of high pressures, a contribution to the understanding of the formation of protocells under prebiotic conditions can be made. Such high pressures can be found, for example, in the subsurface salt lakes on Mars or in the depths of the seafloor on Earth. In this thesis, the effects of extreme environmental conditions, particularly highly aggressive Martian salts (perchlorate and sulfate) and high pressure, on the formation of biomolecular protein condensates were investigated. Optical microscopy in combination with UV/Vis spectroscopy was the principal method of measurement used in this study. Based on the results, it was found that the driving force for phase separation of proteins was not only depended on their amino acid sequence, but was also strongly influenced by the type of salt and its concentration. At high salinity, as found in the Martian soil and in similarly harsh environments on Earth, attractive short-range interactions, ion correlation effects,

hydrophobic and π -driven interactions can maintain LLPS for suitable polypeptide sequences. Furthermore, the obtained results showed that salts in the HOFMEISTER series had a differential effect on shifting the immiscibility boundary that determines phase separation. Additionally, it was found that spatial constriction by molecular crowding, similar to that in cracks of sediments and subsurface salt water pools in Antarctica or on Mars, could significantly stabilize liquid phase droplets, leading to an increase in temperature and pressure stability of the droplet phase.

Besides the properties of such droplets to promote various diseases and to form biomolecular condensates, a similar type of droplets, the aqueous two-phase systems, can furthermore be associated with biocatalytic reactions. After all, the specific adaptation of the reaction medium is an interesting alternative to modulate the kinetic properties of biocatalytic reactions. In the current thesis, the combined effect of an aqueous two-phase system and high hydrostatic pressure (HHP) on the kinetics of the FDH-catalyzed oxidation of formate to CO_2 was investigated. For this purpose, the MICHAELIS-MENTEN kinetics was measured on a fluorescence spectroscope. The experimental approach was supported by thermodynamic modeling using perturbed-chain statistical associating fluid theory to predict liquid-liquid phase separation and the effect of molecular crowding on kinetic properties. This approach enables significant advances in bioprocess engineering, including designing processes with a significant reduction in the number of experimental attempts and trial-and-error approaches.

I. Einleitung

Um sich eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zu verdeutlichen, kann das vereinfachte Modell von Wasser und Öl herangezogen werden. Hierbei handelt es sich um eine Emulsion, bei der eine nicht mischbare flüssige Phase als Kügelchen (disperse Phase) in der zweiten Phase aus einer nicht mischbaren Flüssigkeit (kontinuierliche Phase) dispergiert ist.^[1] Bei diesem System sind hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen von großer Bedeutung.^[2] Solche Emulsionen haben ein breites Anwendungsgebiet, beispielsweise in den Bereichen der Lebensmittelindustrie oder in der Pharmazie.^[1,3,4]

Allerdings gibt es bei dem Zusammenspiel von Wasser und Öl auch negative Aspekte. Dazu zählt unter anderem die sogenannte Fettexplosion.^[5] Aufgrund der Eigenschaften des Wassers im flüssigen Aggregatzustand, beispielsweise einer großen Wärmekapazität, können brennende Stoffe in der Regel effizient mit Wasser gelöscht werden.^[5,6] Doch bei einer anderen Art der brennenden Substanz ist dies nicht der Fall. Wenn es zu einem sogenannten Fettbrand kommt, befindet sich das Fett (Speiseöl) an seinem Brennpunkt und kann entzündet werden.^[5,7] Wenn zu diesem Zeitpunkt das brennende Fett mit Wasser gelöscht wird, entsteht eine hohe Stichflamme. Somit ist anzunehmen, dass das Wasser bei einem Fettbrand als brandbeschleunigend wirkt. Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass dies nicht dem vorherrschenden Mechanismus entspricht.^[5] Wenn sich die Temperatur des Fettes oberhalb des Flammpunktes befindet ($> 200\text{ °C}$), dann verdampft das Wasser bei Kontakt mit dem Fett aufgrund der Siedetemperatur von 100 °C schlagartig. Dabei werden zahlreiche kleine Öltröpfchen in die Luft geschleudert.^[5,7] In dieser sauerstoffhaltigen Umgebungsluft kommt es zur Entzündung der Tröpfchen und es bildet sich ein Feuerball. Aus diesem Grund ist ein Fettbrand niemals mit Wasser zu löschen. Eine simple und effektive Methode zur Brandbekämpfung in diesem Fall ist der Sauerstoffentzug durch Ersticken.^[5] Selbst in der verarbeitenden Industrie und bei der Beförderung von Gefahrgut sind Brandunfälle eine häufige Bedrohung: bei einem unfallbedingten Brand brennt häufig ein Kohlenwasserstoff über einer Wasserschicht. Wenn die Brennstoffschicht dünn ist und ihre Siedetemperatur die des Wassers übersteigt, kann die Wärmeübertragung durch die Flamme zu einem Phänomen führen, das als *boilover* bekannt ist. Bei diesem Ereignis verdampft die Wasserschicht eruptiv, wodurch der brennende Stoff herausgeschleudert wird.^[8,9] Die herausgeschleuderten Öltröpfchen vergrößern sofort die Flammengröße und die Strahlung.

Das Überkochen kann zu einer sofortigen Vergrößerung der Flamme führen, wodurch angrenzenden Öltanks entzündet und schwerere Unfälle verursacht werden können.^[8-12]

Neben den Wasser-Öl-Emulsionen sind weitere Systeme bekannt, bei denen eine Vermischung zweier Phasen durch andere Arten von Wechselwirkungen zustande kommt. Dazu zählen unter anderem die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und die wässrigen Zweiphasensysteme.

Im Rahmen dieser Arbeit wird in den diversen Projekten die Verwendung solcher Systeme in unterschiedlichen Kontexten untersucht. Ein positives Zusammenspiel kann beispielsweise eine Beschleunigung von chemischen Reaktionen erzielen, während ein negatives Zusammenspiel etwa zur Initiierung von Krankheiten beiträgt.

I.1. Theorie der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung

Bei einer genaueren Betrachtung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung kann eine Unterteilung in zwei Klassen angestellt werden. In der Abbildung I-1 ist gezeigt, dass die eine Klasse als segregative Phasentrennung bezeichnet wird, während die andere Klasse unter dem Namen der assoziativen Phasentrennung bekannt ist.^[13]

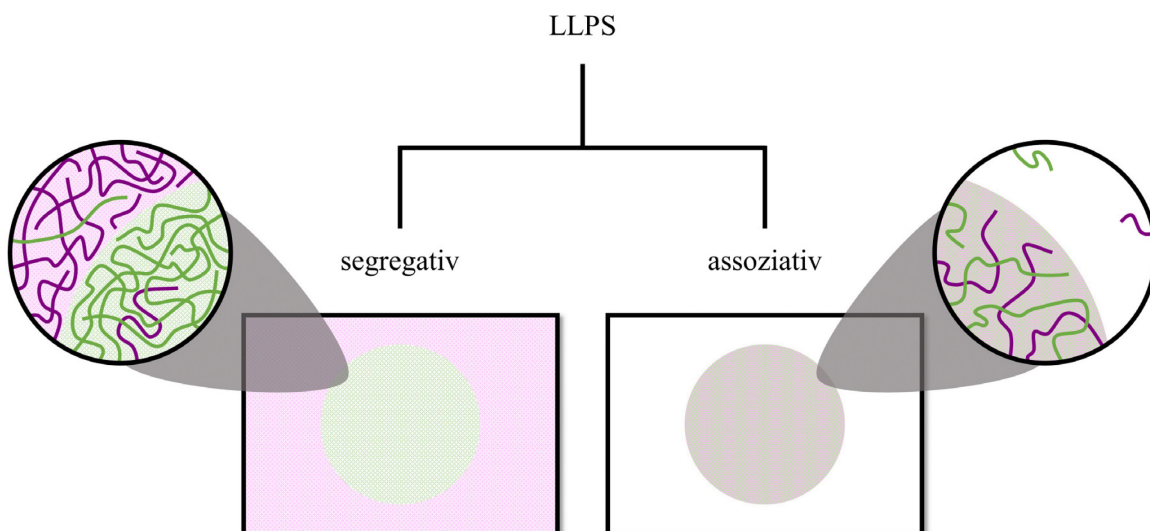


Abbildung I-1: Schematische Darstellung der Unterscheidung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) in segregativ und assoziativ. Bei einer segregativen Trennung dominiert jeweils eine von zwei Komponenten in jeder flüssigen Phase. Als assoziative Phasentrennung wird die Anreicherung beider Komponenten in einer Phase bezeichnet (inspiriert durch ^[14]).

Bei der segregativen Phasentrennung dient eine homogene Lösung als Ausgangspunkt. Dabei besteht diese Lösung aus zwei Komponenten, welche gelöst in einem Lösungsmittel vorliegen.^[13] Somit sind bei dieser Art der Phasentrennung drei Bestandteile anwesend, während bei dem Modell von Wasser und Öl lediglich zwei Bestandteile vorhanden sind.^[15] Durch den Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen kann eine Entmischung stattfinden, sodass es zu einer Anreicherung der einen Komponente in der ersten Phase und der anderen Komponente in der zweiten Phase kommt.^[13] Schließlich wird im Fall der segregativen Phasentrennung ein wässriges Zweiphasensystem (englisch: *aqueous two phase system*, ATPS) ausgebildet.^[14]

Im Vergleich dazu sorgen attraktive Wechselwirkungen bei der assoziativen Phasentrennung für eine Anreicherung beider Komponenten in einer Phase.^[15,16] Dementsprechend wird diese Phase als dichte Phase bezeichnet, während die zweite Phase aufgrund der Abnahme beider Komponenten als verdünnte Phase beschrieben wird.^[13,15,16] Die assoziative Phasentrennung kann auch als Koazervation bezeichnet werden. Folglich wird die mit beiden Komponenten angereicherte Phase als Koazervat beschrieben.^[16] Eine komplexe Koazervation tritt auf, wenn elektrostatisch attraktive Wechselwirkungen zwischen den Komponenten für die Entmischung verantwortlich sind.^[17] Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der einfachen Koazervation um eine Art der Selbstassoziation. Hierbei liegt lediglich eine Komponente in dem Lösungsmittel vor, welche in der Koazervatphase konzentriert wird.^[18]

Des Weiteren besitzen die gebildeten Tröpfchen die Eigenschaft, sich zu größeren Tröpfchen zu entwickeln oder zu kleineren Tröpfchen zu teilen.^[16,19,20] Als Gründe für das Heranreifen größerer Tröpfchen können die Koaleszenz und die Ostwald-Reifung genannt werden.^[21] Für die Aufspaltung in kleinere Tröpfchen können hingegen beispielsweise die Verwendung eines Enzyms oder eine Änderung des pH Wertes der Lösung als Gründe ausgemacht werden.^[22,23]

Um LLPS-Systeme charakterisieren zu können, wird das zentrale Konzept des Phasendiagramms verwendet.^[24–26] Diese Diagramme fassen das Phasenverhalten der Kondensate zusammen, indem die Position des Übergangs zwischen dem entmischten und gemischten Zustand durch die Bestimmung der Position der Phasengrenze im chemischen Raum erfasst wird.^[27] Anhand einer Veränderung der Phasengrenze eines LLPS-Systems, welche durch eine Variation der jeweiligen äußeren Bedingungen zustande kommt, können Erkenntnisse

über thermodynamische Prozesse zur Beeinflussung der Kondensation gewonnen werden.^[28] Wegen der großen Vielfalt an Substanzen, die eine Phasentrennung ermöglichen, sowie an äußeren Bedingungen, welche das LLPS-Verhalten regulieren, besteht ein Bedarf an experimentellen Methoden, um eine schnelle und hochauflösende Charakterisierung zu ermöglichen. Da die Phasendiagramme in der Regel durch zeitintensive Methoden generiert werden, bei denen eine schrittweise Kombination der Reagenzien und der äußeren Bedingungen erfolgt, wird häufig die Mikroskopie als schnelle Möglichkeit der Betrachtung einzelner Bedingungen verwendet.^[29–33]

I.2. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Natur

In den letzten 15 Jahren wurde erkannt, dass die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen und Nukleinsäuren unter normalen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der membranlosen Kompartimentierung von organischen Zellen einnimmt. Die dabei ablaufenden Prozesse zur Bildung biomolekularen Kondensate sind an der subzellulären Organisation mit zahlreichen intrazellulären Körpern beteiligt.^[20,29,34,35] Es ist davon auszugehen, dass die LLPS ein energetisch effizientes Mittel für Zellen darstellt, um bestimmte Proteine und RNAs so zu konzentrieren, dass die Bindungsaffinitäten von Biomolekülen und die Aktivitäten spezifischer biochemischer Reaktionen effizient reguliert werden können.^[36–38] So ist auch ein entscheidender Beitrag der biomolekularen LLPS bei der Entwicklung von Protozellen in der präbiotischen Evolution denkbar.^[39,40]

Es scheint erwiesen, dass sich das Leben unter extremen Umweltbedingungen entwickelt hat und beispielsweise in der Tiefsee, wo hohe hydrostatische Drücke von bis zu 1 kbar herrschen, immer noch existiert.^[41–43] Die Existenz aller Phasenübergänge, einschließlich der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, hängt empfindlich von der Temperatur, dem Druck und den Konzentrationen (Aktivitäten) aller Bestandteile, einschließlich Kosolute wie Salze, ab.^[16,20,27,44–49] Tatsächlich beherbergen tiefe unterirdische Umgebungen oft hohe Konzentrationen gelöster Salze, doch ist nur wenig darüber bekannt, wie diese hoch konzentrierten Salzlösungen die Bedingungen für Leben beeinflussen und noch weniger darüber, wie kombinierte Salz-HHP-Effekte die Chancen für zelluläres Leben einschränken. Zu diesen Ionen zählt unter anderem das Perchlorat (ClO_4^-), welches in extremen Umgebungen auf der Erde und auf dem Mars allgegenwärtig ist.^[42,50–53] In den letzten zehn Jahren

mehrten sich zudem die Hinweise über Wasser auf dem Mars, sodass mittlerweile die Existenz von unterirdischem Wasser in Form von Seen unter der Oberfläche in der Nähe des Südpols des Mars vorstellbar ist.^[54-57] Das dort mögliche Grundwasser auf dem Mars erfährt an der Grenze der Kryosphäre in 10 km Tiefe an den Marspolen Drücke von etwa 1 kbar.^[55] Ähnlich raue Umgebungen finden sich in unterirdischen Seen auf der Erde wieder, die nachweislich erstaunliche Mengen an Leben beherbergen können.^[54] Dementsprechend sind druckabhängige Studien von großem biologischen Interesse, insbesondere für die Tiefseebiologie. Denn, wie zuvor erwähnt, werden die tiefsten Ozeane der Erde von zahlreichen Organismen bevölkert, die ständig einem hohen hydrostatischen Druck ausgesetzt sind, der in den tiefsten Meeresgräben und in Regionen unterhalb des Meeresbodens Werte von über 1 kbar erreicht. Daher ist die Kenntnis der Auswirkungen von HHP auf biologische Systeme auch von grundlegender Bedeutung für unser Verständnis von lebenden Organismen sowie von den druckabhängigen Belastungsgrenzen des Lebens im Allgemeinen.^[41,44,58]

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das Projekt „Einfluss extremer Salzbedingungen auf die Stabilität des biomolekularen Kondensats ATP/Poly-L-Lysin“ durchgeführt. Hierbei wurden die Auswirkungen von hohem hydrostatischem Druck und extremen Salzbedingungen auf das LLPS, welches in dem Fall durch die Kombination des Adenosintri-phosphat-Dinatriumsalz-Hydrats mit dem Homopeptid Poly-L-Lysin-hydrobromid gebildet wird, untersucht.

I.3. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung in der Industrie

In den letzten Jahrzehnten haben sich Wissenschaft und Industrie zunehmend darauf konzentriert, nachhaltige Technologien bei der Herstellung und Verwendung von chemischen Produkten und Bioprozessen mit einzubinden.^[59] Biokatalysatoren bieten mehrere Vorteile gegenüber der herkömmlichen chemischen Katalyse: sie arbeiten unter mildereren Bedingungen, verbrauchen weniger Energie und erzeugen weniger Nebenprodukte, was sie zu einer umweltfreundlichen Option macht.^[59] Darüber hinaus kann die Biokatalyse die Herstellung komplexer Moleküle erleichtern, deren Synthese mit herkömmlichen chemischen Verfahren schwierig wäre.^[60]

Die begrenzte katalytische Aktivität und die Löslichkeit des Substrats in Standardpuffern ist oft ein großes Hindernis bei der enzymatischen Katalyse. Außerdem ist die Wahl eines sicheren und umweltfreundlichen Lösungsmittels für die grüne Chemie von entscheidender Bedeutung, da das Lösungsmittel häufig einen erheblichen Teil der Reaktionsmasse ausmacht. Die Verwendung von wässrigen Zweiphasensystemen ist eine vielversprechende Strategie, da sie eine dynamische Lokalisierung und Kontrolle der kompartimentierten Reaktionen ermöglicht, indem Biomoleküle und Reaktanden in eine Phase lokalisiert und somit auch aufkonzentriert werden können.^[61,62]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das Projekt „Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase“ realisiert. Dabei wurde untersucht, welchen Einfluss, auch unter Druckbeaufschlagung, das LLPS bestehend aus Polyethylenglykol und Dextran auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase besitzt.

I.4. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und Krankheiten

Unter gesunden Bedingungen ist die Kondensation von Proteinen in einen dichten flüssigen Tröpfchenzustand durch LLPS im Allgemeinen reversibel und wird in vielerlei Hinsicht genutzt, um zelluläre Funktionen in einer räumlich-zeitlichen Art und Weise zu regulieren. Zu diesen zellulären Funktionen zählen etwa der RNA-Stoffwechsel, die Ribosomen-Biogenese, die DNA *Damage Response* und die Signaltransduktion.^[20,44,63,64] Bei einer Fehlregulation können flüssige Tröpfchen jedoch zu gelartigen Ablagerungen heranreifen und fibrilläre Strukturen ausbilden, die wesentliche zelluläre Komponenten irreversibel sequestrieren und zu pathologischen Prozessen führen können. Es hat sich gezeigt, dass ein solcher Mechanismus die Selbstorganisation verschiedener krankheitsassoziierter Proteine auf dem Weg zur Bildung fester Aggregate vorantreibt. Dieses Phänomen wurde beispielsweise für FUS und TDP-43 bei amyotropher Lateralsklerose und frontotemporaler Demenz, für Tau bei der ALZHEIMER-Krankheit, für IAPP bei Diabetes mellitus Typ II und für PrP bei Prionenerkrankungen beobachtet.^[29,65–74]

Das α -Synuclein wird mit der Entstehung einer Krankheit, der PARKINSON-Krankheit, in Verbindung gebracht.^[75,76] Um eine mögliche Intervention für die Ausbildung dieser Krankheit zu erkunden, wurden die Projekte „Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III

auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“ und „Einfluss verschiedener Tröpfchensysteme auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“ durchgeführt.

II. Messmethoden

II.1. UV/Vis-Spektroskopie

II.1.1. Theoretische Grundlagen

Bei dieser spektroskopischen Methode wird Licht des ultravioletten (UV) und sichtbaren (englisch: *visible*, Vis) Wellenlängenbereichs verwendet. Als Grundlage für diese quantitative Analyseverfahren dient das LAMBERT-BEERSche Gesetz. Es beschreibt, dass ein Teil der Lichtenergie eines monochromatischen parallelen Lichtstrahls I_0 , welcher die Oberfläche eines zu untersuchenden Mediums bestrahlt, durch dieses Medium mit einer bestimmten Dicke d absorbiert wird. Aus diesem Grund ist die Intensität I des Lichts nach Durchgang durch das Medium abgeschwächt.^[77] Dabei ist die Absorption A des Mediums direkt proportional zu seiner Schichtdicke d :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \propto d \quad (1)$$

Des Weiteren ist diese Absorption in einem homogenen Medium direkt proportional zu der Konzentration c der Probensubstanz, welche der Lichtstrahl durchläuft:

$$A \propto c \quad (2)$$

Durch Kombination dieser beiden Bedingungen wird das LAMBERT-BEERSche Gesetz erhalten:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (3)$$

Somit kann die Absorption A einer Probensubstanz bei einer bestimmten Wellenlänge λ mittels bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten ε ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$), der Schichtdicke des Mediums d (cm) und der molaren Konzentration c (M) bestimmt werden.^[78] Eine schematische Veranschaulichung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes ist in der Abbildung II-1 gezeigt.

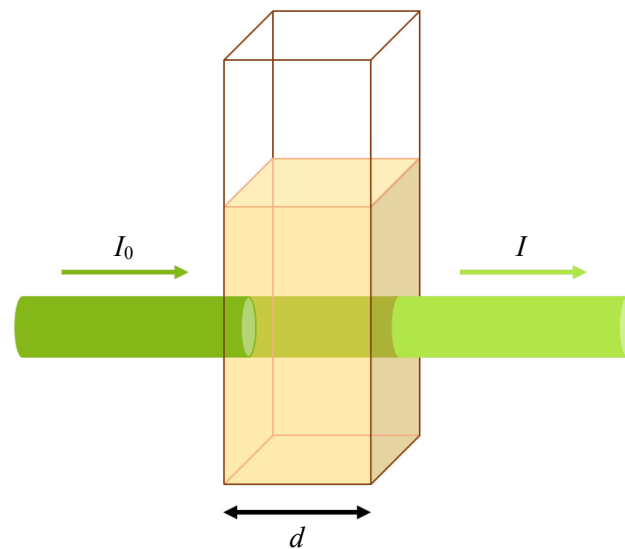


Abbildung II-1: Schematische Veranschaulichung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes. I_0 : Intensität des Lichtstrahls vor Durchgang durch das Medium, I : Intensität des Lichtstrahls nach Durchgang durch das Medium, d : Schichtdicke des Mediums (inspiriert durch ^[78]).

Wenn eine Trübung des Mediums vorliegt, besteht ein Einfluss auf die zu messende Absorption, denn eine Trübung kann die Reflexion des Lichts in dem Medium verursachen und eine scheinbare Absorption des Lichts durch gelöste größere Moleküle hervorrufen.^[77] Somit ist die Intensität I des Lichts nach Durchgang durch das Medium bei stärkerer Trübung geringer. Dieser Zusammenhang kann anhand der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$I = I_0 \cdot e^{-\tau d} \quad (4)$$

Der hier verwendete Faktor τ beschreibt die Trübung, welche auch als Turbidität bezeichnet wird.^[79] Zu den Faktoren, welche die Turbidität beeinflussen können, zählen das Verhältnis der in dem Medium enthaltenen Stoffe, sowie die Form, Größe und der Brechungsindex dieser Stoffe.^[77] Bei einer genaueren Betrachtung wird die Abhängigkeit der Lichtstreuung von der Größe der Teilchen deutlich. Durch das Vorhandensein von Teilchen innerhalb des Mediums mit einem im Vergleich zur eingesetzten Lichtwellenlänge kleineren Durchmesser kommt es zur sogenannten RAYLEIGH-Streuung. Hierbei erfährt das gesamte Teilchen den Einfluss des gleichen elektrischen Feldes. Die Frequenz der Strahlung nach dem Streuvorgang bleibt unverändert. Die Intensität I_s des an dem Teilchen gestreuten Lichts ist von der Intensität I_0 des einfallenden Lichtstrahls, dem Probe-Detektor-Abstand

r , der Richtung der Streustrahlung und der Elektronenpolarisierbarkeit α der Teilchen abhängig. Wegen der Proportionalität $I_s \propto 1/\lambda^4$ wird kurzwelliges Licht stärker gestreut als langwelliges Licht. Bei der Verwendung von unpolarisiertem Licht kann die Intensität einer Lichtwelle wie folgt relativ zur einfallenden Lichtintensität angegeben werden:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{\pi^2 \alpha^2}{\varepsilon_0^2 r^2 \lambda^4} \cdot \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2} \quad (5)$$

In dieser Beziehung gibt 2θ den Streuwinkel an, während die elektrische Feldkonstante als ε_0 bezeichnet wird. Eine von der Streugeometrie unabhängige Vergleichsmöglichkeit bietet das RAYLEIGH-Verhältnis R_θ . In diesem Verhältnis werden die experimentellen Parameter Einfallintensität, Detektorabstand und Beobachtungswinkel verknüpft, sodass bei einem unpolarisierten einfallenden Licht die folgende Gleichung gilt:^[79]

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_0} \cdot \frac{r^2}{1 + \cos^2(2\theta)} = \frac{\pi^2 \alpha^2}{2\varepsilon_0^2 \lambda^4} \quad (6)$$

II.1.2. Instrumenteller Aufbau

Der Grundlegende Aufbau eines UV/Vis Spektrometers kann der Abbildung II-2 entnommen werden. Als Lichtquelle werden meist Deuterium-Lampen für den ultravioletten Bereich und Wolfram-Iod-Lampen für den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums eingesetzt. Eine dieser Lichtquellen sendet den Lichtstrahl durch einen Monochromator, welcher für die spektrale Zerlegung des Lichts verantwortlich ist, auf die Probenlösung. Der resultierende Lichtstrahl fällt nach dem Durchgang durch die Probenlösung auf den Detektor. Innerhalb des Detektors wird die einfallende Intensität als Funktion der Wellenlänge aufgezeichnet.^[79] Dieser Detektor sendet das entstehende Signal zur Analyse an einen angeschlossenen Computer.

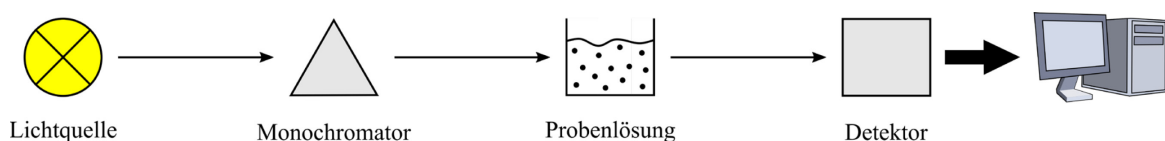


Abbildung II-2: Schematischer Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers (inspiriert durch ^[80]).

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Um Konzentrationsbestimmungen auf Grundlage des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes sowie temperaturabhängige Turbiditätsmessungen durchzuführen, wurde das UV Spektralphotometer UV-1800 der Firma Shimadzu (Kyōto, Japan) in Kombination mit diversen Quarzküvetten eingesetzt. Die Temperatur konnte bei diesem Spektrometer durch ein Umwälzthermostat der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) eingestellt werden.

II.2. Fluoreszenzspektroskopie

II.2.1. Theoretische Grundlagen

Der Vorgang der Fluoreszenz kann anhand des JABLONSKI-Diagramms (Abbildung II-3) beschrieben werden, denn sie beruht auf der Anregung eines Moleküls durch die Absorption von Licht. Ein Molekül kann durch die Absorption (A) eines Photons aus dem Schwingungsgrundzustand $v = 0$ des elektronischen Grundzustandes S_0 in einen angeregten Zustand überführt werden. Dabei erreicht dieses Molekül wegen der FRANK-CONDON-Faktoren verschiedene Schwingungszustände v' des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 . Eine Anregung auf höher liegende Zustände ist ebenfalls möglich. Aufgrund der Anregung besitzt das Molekül einen Energieüberschuss. Durch Zusammenstöße des Moleküls mit umliegenden Lösungsmittelmolekülen gelangt das Molekül in den untersten Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes ($S_1, v' = 0$) (englisch: *internal conversion*, IC). Dabei wird die überschüssige Energie in einem Zeitraum von etwa 10^{-11} s wieder abgegeben. Um nun wieder in den elektronischen Grundzustand zu gelangen, gibt es diverse Möglichkeiten. Bei der Fluoreszenz (F) sendet das Molekül die elektromagnetische Strahlung von einem angeregten Singulettzustand aus. Dabei kann die Lage des Moleküls im Raum verändert werden oder eine Wechselwirkung mit der Umgebung stattfinden. Der Prozess der Fluoreszenz läuft innerhalb von 10^{-8} s ab und ist dementsprechend langsamer als die Zusammenstöße des Moleküls mit umliegenden Lösungsmittelmolekülen. Neben der Fluoreszenz gibt es noch weitere Desaktivierungsprozesse. Darunter fallen die Energieübertragung auf ein benachbartes Molekül ohne Emission von Licht (englisch: *quenching*, Q) erneuten Stöße mit umgebenen Lösungsmittelmolekülen (IC), chemische Reaktionen (Chem), und ein Interkombinationsübergang in höhere Schwingungszustände des elektronischen Triplettzustandes T_1 (englisch: *intersystem crossing*, ISC). Bei dem anschließenden Relaxationsvorgang in den Grundzustand (Singulett), welcher mit einer verbotenen erneuten Spinumkehr verbunden ist, wird Licht emittiert. Dieser als Phosphoreszenz (Ph) bezeichneter Emissionsprozess läuft mit 10^{-2} s bis 10^2 s noch langsamer ab.^[79]

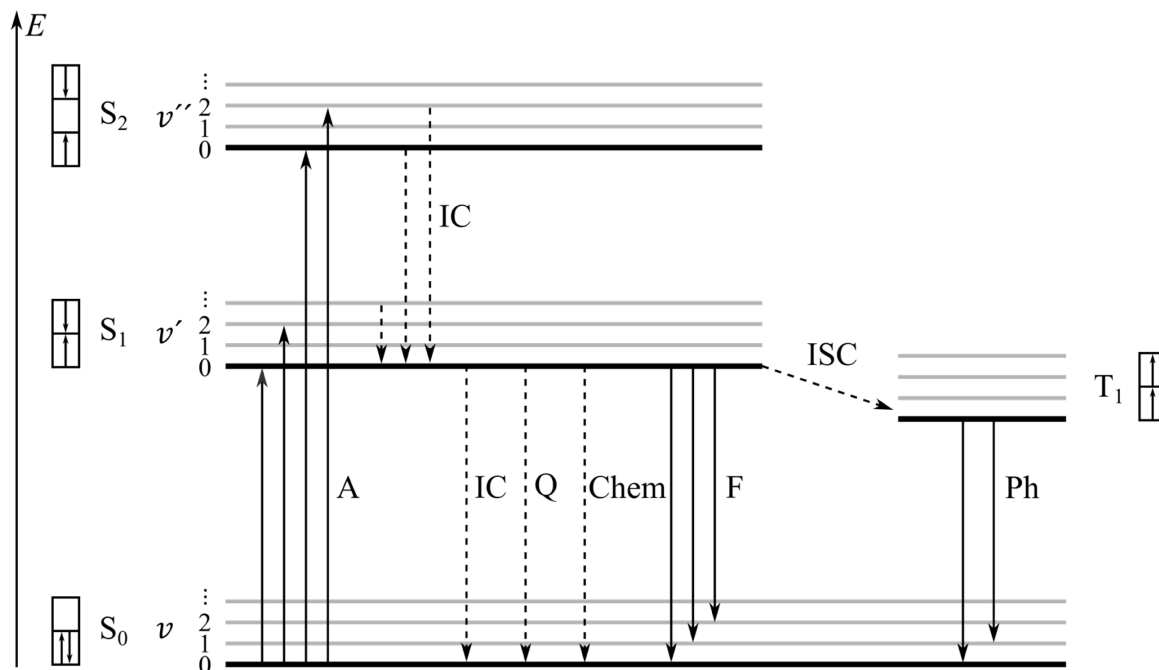


Abbildung II-3: Schematische Veranschaulichung des JABLONSKI-Diagramms. A: Absorption; IC: Stöße mit umgebenen Lösungsmittelmolekülen; Q: Energieübertragung auf ein benachbartes Molekül ohne Lichtemission; Chem: chemische Reaktionen; F: Fluoreszenz; ISC: Interkombinationsübergang in den Triplettzustand T₁; Ph: Phosphoreszenz; S: Singulettzustand; v: Schwingungszustand (inspiriert durch ^[81]).

Der Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie liegt in der Empfindlichkeit dieser Methode. Denn die Nachweisgrenze befindet im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie um eine bis drei Größenordnungen niedriger.^[81] Des Weiteren ist durch den Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie eine zerstörungsfreie Probenanalyse möglich.^[82]

II.2.2. Instrumenteller Aufbau

Um die Fluoreszenz einer Probe untersuchen zu können, wird das K2 Multifrequenz Phasen-Fluorometer der Firma ISS Inc. (Illinois, USA) verwendet. In der Abbildung II-4 ist der dazugehörige schematische Aufbau gezeigt. Die Lichtquelle sendet einen Lichtstrahl aus, welcher nach dem Durchgang durch einen Monochromator bei Bedarf zusätzlich durch einen Polarisator geleitet werden kann. Dieser Lichtstrahl trifft im Anschluss auf die Probe. Eine PÖCKELS-Zelle wird bei dynamischen Experimenten als gepulste Lichtquelle in den Strahlengang eingefügt, um schnellere Reaktionen und dynamische Bewegungen untersuchen zu können. Im Vergleich zur UV/Vis-Spektroskopie wird die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts in einem Winkel von 90 ° zur Einstrahlrichtung gemessen. Auch zwi-

schen Probe und Detektor ist die Positionierung eines Monochromators und eines Polarisators möglich.^[79] Als Detektor wird ein sogenannter Photomultiplier (PMT) eingesetzt. Er reagiert selbst auf einzelne Photonen und kann die einzelnen Signale gemittelt erfassen oder als einzelne Photonen zählen. Ein solcher Photomultiplier besteht aus einer Photokathode und einer Reihe von Dynoden, welche die Verstärkungsstufen darstellen.^[83]

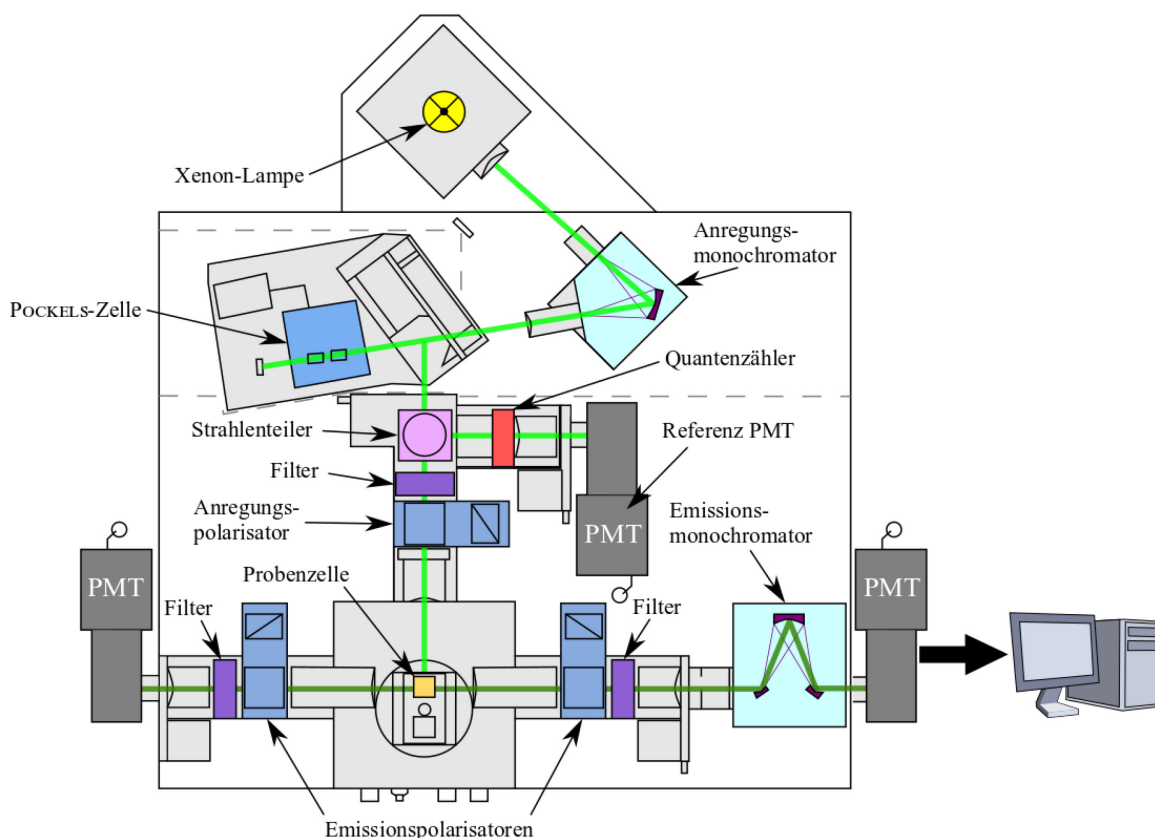


Abbildung II-4: Schematische Darstellung des verwendeten Fluoreszenzspektrometers der Firma ISS Inc. (USA). PMT: Photomultiplier (modifiziert aus ^[84]).

Bei der Fluoreszenzanisotropie wird die Fluoreszenz senkrecht zur Einstrahlrichtung gemessen. Mittels eines Polarisationsfilters können die Anteile I_{\parallel} und I_{\perp} des emittierten Lichts in x , y und z -Richtung polarisiert werden. Um die gesamte Fluoreszenzintensität zu erhalten, wird die Summe der drei Bestandteile gebildet, was wiederum dem Ausdruck $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ entspricht. Die Einzelbeträge der Intensitäten sind messbar durch die Anisotropie r :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7)$$

Hierbei handelt es sich um einen dimensionslosen Parameter, der durch die Lebensdauer und die Rotationsdiffusion des Fluorophors beeinflusst wird.^[79] Einen Spezialfall der Fluoreszenzanisotropie stellt die *Steady-State*-Fluoreszenzanisotropie dar. Es handelt sich hierbei um eine Messung mit einer ständigen Beleuchtung der Probe. In der Folge ist die einfallende Lichtintensität über den gesamten Messzeitraum konstant.^[85]

Um die gewünschte Temperatur der Probe einzustellen und konstant zu halten, wurde ein Umwältzthermostat der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) verwendet. Für die Durchführung von Messungen bei Atmosphärendruck wurden Quarzküvetten mit diversen Schichtdicken verwendet. Im Gegensatz dazu wurde bei den Hochdruckmessungen ausschließlich eine spezielle Küvette mit einer Schichtdicke von etwa 0.9 cm genutzt. Diese wurde mit einer Polyethylenmembran verschlossen und innerhalb einer HHP-Hochdruckzelle von der Firma ISS Inc. (Illinois, USA), welche in der Abbildung II-5 zu sehen ist, in dem Strahlengang positioniert. Die Fenster dieser Hochdruckzelle haben eine Dicke von 9 mm, einen Durchmesser von 19 mm und bestehen aus Quarzglas. Der anliegende Druck war mittels einer externen manuellen Handpumpe der Firma Nova SWISS (Effretikon, Schweiz) in einem Druckbereich von 1 bar bis 2000 bar mit Wasser als Druckmedium variierbar.

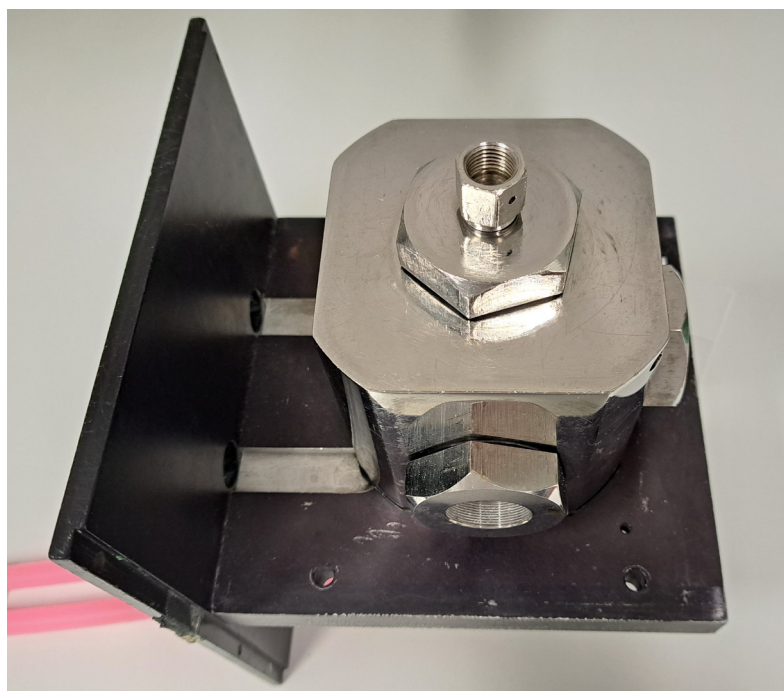


Abbildung II-5: Darstellung der bei der Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Hochdruckzelle. HHP-Hochdruckzelle der Firma ISS Inc. (Illinois, USA). Der Druckanschluss befindet sich oben und an der linken Seite ist die Verbindung (pinke Schläuche) zum Umwältzthermostat zu sehen. Als Fenstermaterial dient Quarzglas.

II.3. Lichtmikroskopie

II.3.1. Theoretische Grundlagen

Durch den Einsatz der Lichtmikroskopie können Proben bis in einen Größenbereich von 10^{-7} m, welcher jenseits des für das menschliche Auge Sichtbaren liegt, zerstörungsfrei betrachtet werden. Die maximal mögliche Vergrößerung ist dabei durch ein natürliches Phänomen begrenzt. Ausschlaggebend ist die Beugung der Lichtwellen, wodurch sogenannte Beugungsscheibchen entstehen. Sobald sich die Beugungsscheibchen von mehreren Objekten zu stark überlappen, ist eine getrennte Abbildung dieser Objekte nicht mehr möglich. Dieser kritische Abstand wird auch als Auflösungsvermögen d des Mikroskops bezeichnet und kann durch die Wellenlänge λ des verwendeten Lichts, den Öffnungswinkel α des Objektivs und den Brechungsindex n des Mediums zwischen dem Objektiv und der Probe dargestellt werden (Gleichung (8)).^[79]

$$d = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad (8)$$

Der hierbei verwendete Nenner wird auch als numerische Apertur des Objektivs bezeichnet. Anhand dieser Gleichung zeigt sich, dass das Auflösungsvermögen auf zwei Arten verbessert werden kann. Eine Möglichkeit ist die Verringerung der Wellenlänge des eingesetzten Lichts. Die zweite Möglichkeit ist darin begründet, dass der Brechungsindex erhöht wird. Dies kann mittels einer Immersionsflüssigkeit, welche zwischen dem Objektiv und der Probe eingesetzt wird und eine hohe Brechzahl besitzt, erreicht werden (siehe Abbildung II-6).

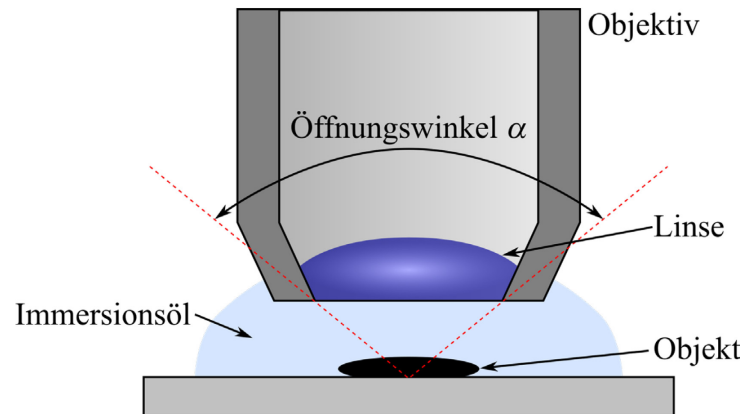


Abbildung II-6: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels α eines Objektivs bei der Lichtmikroskopie (inspiriert durch ^[79]).

Beispielhaft ist hier das Immersionsöl mit einem Brechungsindex von $n \approx 1.5$ zu nennen. Im optimalsten Fall kann der Teil $\sin(\alpha/2)$ in der Gleichung (8) maximal einen Wert von 1 erreichen. Kombiniert mit der Eigenschaft, dass der Brechungsindex generell Werte unter 2 annimmt, lassen sich für die numerische Apertur Werte bis maximal 1.7 realisieren. Dementsprechend sind zwei Objekte mit einem kleineren Abstand als annähernd die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts nicht mehr als zwei getrennte Objekte zu sehen.

Um neben der Durchlicht- oder Auflichtmethode weitere Eigenschaften der untersuchten Proben darzustellen, können unterschiedliche Methoden der Lichtmikroskopie eingesetzt werden.^[79] Darunter zählen unter anderem die Phasenkontrastmikroskopie, die differentielle Interferenz-Kontrastmikroskopie (englisch: *differential interference contrast microscopy*, DIC) und die Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, die bei einer längeren Wellenlänge emittieren als die Anregungswellenlänge. Dazu können der Probe auch extrinsische Fluorophore zugesetzt werden.^[86]

II.3.2. Instrumenteller Aufbau

Bei den licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das optische Mikroskop Eclipse TE2000-U der Firma Nikon Inc. (Tokio, Japan) entweder gekoppelt mit der Industriekamera DMK 23UX249 oder gekoppelt mit der Industriekamera DMK 33UX264 verwendet. Die Industriekameras sind über die Firma The Imaging Source (Bremen,

Deutschland) bezogen worden. Zum Tätigen von Aufnahmen wurde die Software IC Capture 2.4, welche ebenfalls von der Firma The Imaging Source bereitgestellt wurde, eingesetzt. Als Hilfsmittel zum Einfügen von Maßstabsbalken sowie zur Verbesserung des Kontrastes wurde mit der Software ImageJ gearbeitet.^[87] Das eingesetzte Objektiv wurde bei den diversen Projekten variiert.

Für die mikroskopischen Aufnahmen unter dem Einfluss von hydrostatischem Druck wurde eine Hochdruck-Mikroskopiezelle (Abbildung II-7C) verwendet. Hierbei dienen Diamantfenster mit einer Dicke von 0.8 mm und einem Durchmesser von 6 mm als Fenstermaterial. Zur Beeinflussung der Temperatur wurde zusätzlich eine Stahlhalterung an der Mikroskopiezelle befestigt. Als Druckmedium, welches mittels einer manuellen Handpumpe der Firma Nova SWISS (Effretikon, Schweiz) Drücke zwischen 1 bar und 1000 bar aufbauen konnte, diente Wasser.

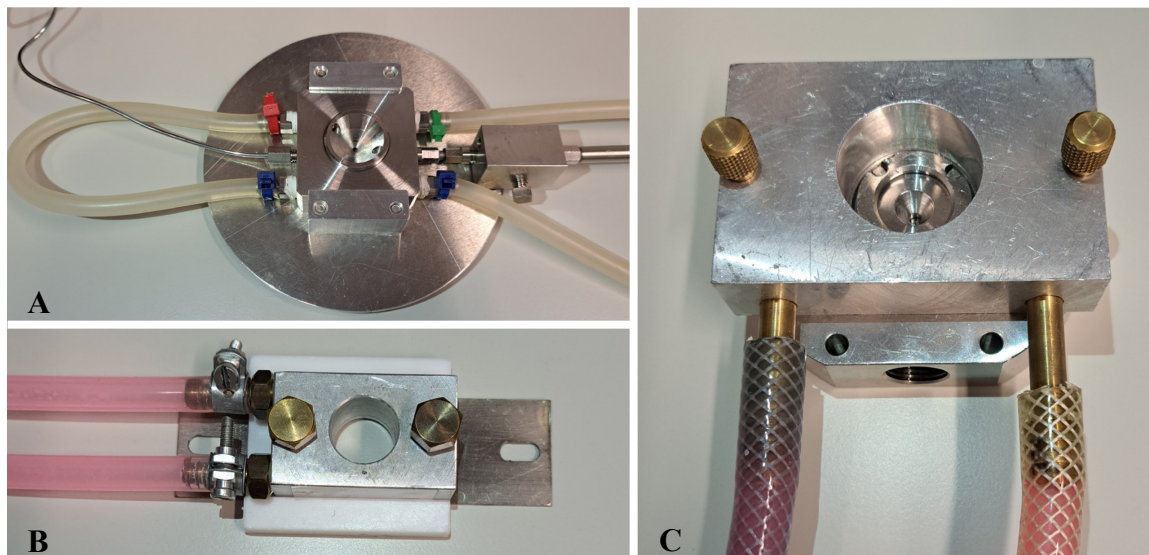


Abbildung II-7: Darstellung der bei den mikroskopischen Aufnahmen verwendeten Mikroskopiezellen. A: Mikroskopiezelle PMC-100-1.5-NAO.6-YAG-SUS630 der Firma Syn Corporation (Kyōto, Japan); B: im Arbeitskreis entworfene temperierbare Mikroskopiezelle bestehend aus einem Teflonblock, zwei Borosilicat-Deckgläschen und einer Stahlhalterung zur Temperierung; C: Hochdruck-Mikroskopiezelle mit Diamantfenstern als Fenstermaterial und einer zur Temperierung genutzten Stahlhalterung.

Bei den temperaturabhängigen Messungen wurde die Mikroskopiezelle PMC-100-1.5-NAO.6-YAG-SUS630 der Firma Syn Corporation (Kyōto, Japan) (Abbildung II-7A) benutzt. Des Weiteren wurde für einige Messreihen die in dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Winter entworfene Mikroskopiezelle, welche aus einem Teflonblock, zwei Borosilicat-Deckgläschen und einer zur Temperierung genutzten Stahlhalterung besteht (Abbildung

II-7B), eingesetzt. Mittels eines Umwältzthermostats der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) konnte bei jeder dieser verwendeten Mikroskopiezellen die benötigte Temperatur eingestellt werden.

II.4. CD-Spektroskopie

II.4.1. Theoretische Grundlagen

Beim Circulardichroismus (CD) besteht das linear polarisierte Licht aus zwei zirkular polarisierten Komponenten L und R gleicher Größe, wobei sich die eine Komponente gegen den Uhrzeigersinn und die andere Komponente im Uhrzeigersinn dreht (Abbildung II-8).

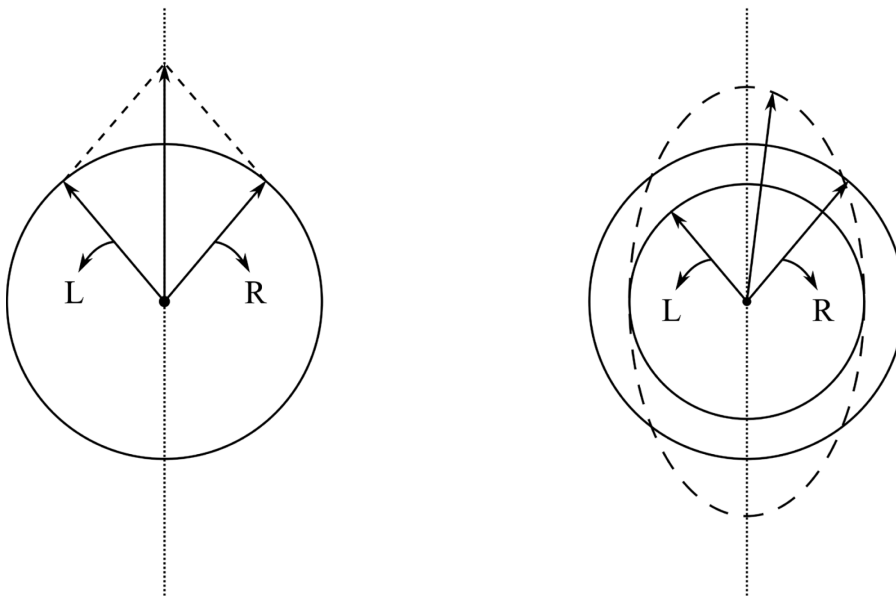


Abbildung II-8: Schematische Veranschaulichung der zirkular polarisierten Komponenten L und R einer linear polarisierten Strahlung. Links: eine linear polarisierte Strahlung wird aufgrund der gleichen Amplitude beider Komponenten erzeugt. Rechts: elliptisch polarisiertes Licht (gestrichelte Linie) entsteht aufgrund unterschiedlich großer Amplituden der Komponenten (inspiriert durch ^[88]).

Eine optisch aktive Probe, welche eine Chiralität aufweist, sorgt im Strahlengang für eine unterschiedlich starke Absorption der beiden Komponenten, wodurch die resultierende Strahlung nach dem Durchgang durch die Probe eine elliptische Polarisation besitzt. Die gemessene Absorptionsdifferenz kann als Elliptizität θ angegeben werden:^[88]

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (9)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die Elliptizität wellenlängenabhängig ist. Die Amplituden der elektrischen Feldkomponenten des rechts oder links zirkular polarisierten Lichts nach dem Absorptionvorgang (R und L in der Abbildung II-8) sind durch E_R und E_L angegeben.^[79]

Um eine Aussage über die charakteristische Sekundärstruktur eines Proteins treffen zu können, müssen elektronische Übergänge angeregt werden. Dabei sind vorwiegend die elektronischen Übergänge vom energetisch höchsten besetzten bindenden oder nicht-bindenden Molekülorbital (HOMO) in das energetisch niedrigste unbesetzte oder anti-bindende Molekülorbital (LUMO) zu finden. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang, dass die Carbonylgruppen der Peptidbindungen, die aromatischen Seitenketten und die Disulfidgruppen als Chromophore innerhalb eines Proteins dienen können. Bei der Anregung einer Carbonylgruppe im fernen UV-Bereich liegt ein $n \rightarrow \pi^*$ oder ein $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang vor.^[79,89] Auf dieser Grundlage können dem Spektrum charakteristische Sekundärstrukturen des Peptidrückgrats zugewiesen werden.^[90] So sind Minima bei Wellenlängen von etwa 209 nm und 222 nm sowie ein ausgeprägtes Maximum bei etwa 192 nm charakteristisch für α -Helices, wohingegen β -Faltblätter ein Minimum zwischen 210 nm und 225 nm in Verbindung mit einem Maximum zwischen 190 nm und 200 nm aufweisen. Eine deutlich negative Bande im Wellenlängenbereich um 200 nm ohne ein ausgeprägtes Signal bei höheren Wellenlängen deutet auf ungeordnete Strukturen hin.^[79] Zudem kann eine Untersuchung des nahen UV-Bereichs (260 nm bis 320 nm) einen Fingerabdruck der Tertiärstruktur eines Proteins liefern.^[88] Des Weiteren können im Protein vorhandene aromatische Aminosäuren, die Art der Umgebung (Lösungsmittel, Salze und Cofaktoren wie etwa Flavine oder Häm-Gruppen) sowie die räumliche Anordnung im Protein einen Einfluss auf das erhaltene CD-Spektrum der zu untersuchenden Probe haben. Dadurch können unter anderem Informationen über Ligand-Protein-Wechselwirkungen erhalten werden.^[88,91]

II.4.2. Instrumenteller Aufbau

In der Abbildung II-9 ist der grundlegende Aufbau eines CD-Spektrometers dargestellt. Dabei ist die Applikation der PÖCKELS-Zelle in der instrumentellen Anordnung der große Unterschied im Vergleich zu einem UV/Vis-Spektrometer. Nach der Lichtquelle und dem Monochromator liegt das wellenlängenselektierte Licht mit der Intensität I_λ vor. Der dann folgende Polarisationsfilter sorgt für die Erzeugung des linear polarisierten Lichts mit der Intensität I_\parallel . In der PÖCKELS-Zelle wird aus dem einfallenden linear polarisierten Licht mittels eines doppelbrechenden Materials zirkular polarisiertes Licht mit der Intensität I_{RL}

erzeugt. Anschließend ist die Lösung der optisch aktiven Probe in dem Strahlengang positioniert, wodurch die Polarisations Ebene gedreht wird. Als Detektor dient ein Photomultiplier, welcher mit dem Computer verbunden ist. Dieser ist durch eine spezielle Software in der Lage, die jeweiligen Intensitätswerte in Elliptizitäten umzurechnen.

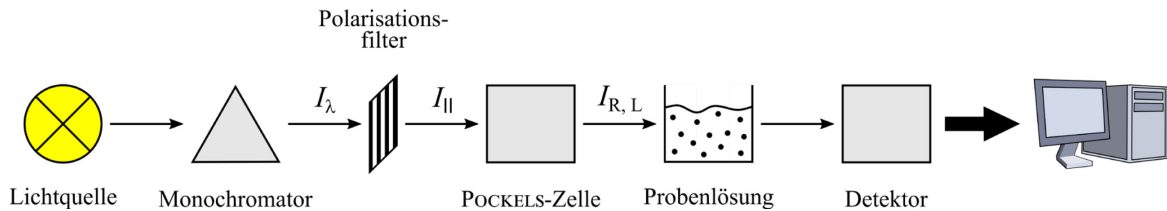


Abbildung II-9: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers (inspiriert durch ¹⁷⁹⁾).

Es wurde für die CD-Spektroskopie das Spectropolarimeter J-715 der Firma Jasco (Pfungst, Deutschland) verwendet. In den Strahlengang wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.01 cm eingesetzt. Für diese Küvette beträgt das Probenvolumen etwa 300 μ L. Auch bei dieser Messmethode wurde die Temperatur der im Spektrometer befindlichen Quarzküvette durch ein Umwältzthermostat der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) eingestellt und konstant gehalten.

III. Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins

III.1. Einleitung

α -Synuclein (α -Syn) ist ein kleines, intrinsisch ungeordnetes präsynaptisches Protein, welches den Kreislauf der Neurotransmitter-Vesikel reguliert. In der Abbildung III-1 ist die Sekundärstruktur des α -Syn, bestehend aus α -Helices und ungeordneten Bereichen, gezeigt. Die Fehlfaltung und Aggregation des α -Syn wird mit der PARKINSON-Krankheit (PD) in Verbindung gebracht, was durch das Vorhandensein von LEWY-Körpern als pathologisches Merkmal der PD belegt wird. Weitere Synucleinopathien mit LEWY-Körpern sind unter anderem die Multisystematrophie und die Demenz.^[75,76,92,93] Das menschliche α -Syn-Protein besitzt 140 Aminosäurereste und ist aus drei unterschiedlichen Regionen aufgebaut, darunter eine amphipathische *N*-terminaler Domäne (AS-Reste 1-60), eine zentrale hydrophobe Domäne, die sogenannte *non-amyloid*- β (NAC) Komponente (AS-Reste 61-95), und eine stark negativ geladene, prolinreiche *C*-terminale Domäne (AS-Reste 96-140). Es ist bekannt, dass die *N*-terminalen und hydrophoben Regionen des α -Syn bei der Bindung an negativ geladene Vesikel eine α -helicale Konformation einnehmen.^[94] Obwohl es zahlreiche Belege dafür gibt, dass α -Syn zu Amyloid-Fibrillen aggregieren kann, ist der Zusammenhang zwischen der Selbstorganisation des α -Syn und der Bildung von LEWY-Körpern noch weitgehend unklar. Mittlerweile wurde gezeigt, dass α -Syn auch eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) vollziehen kann, wobei es einen flüssigen Tröpfchenzustand bildet, der sich mit der Zeit in ein amyloidreiches Hydrogel mit LEWY-Körper-ähnlichen Eigenschaften entwickelt.^[95-98]

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung und des Krankheitsverlaufs in Verbindung mit dem α -Syn sind nach wie vor nur unzureichend erforscht. Diese Wissenslücke über die Ätiologie der Krankheit erschwert die Auswahl eines Ansatzpunktes für die Entdeckung von Arzneimitteln und trägt daher ebenfalls zum derzeitigen Mangel an Therapiemöglichkeiten bei. Ein aussichtsreicher Ansatz besteht darin, die Umwandlung von der flüssigen in die feste (fibrilläre) Phase zu hemmen. Deshalb wurde im Rahmen dieses Projektes die Wirkung eines antimikrobiellen Peptids auf das LLPS und die Fibril-

lenbildung des α -Syn untersucht. Der Einfluss antimikrobieller Peptide auf LLPS-Phänomene und die Fibrillenbildung ist bislang weitgehend unbekannt und steht daher im Mittelpunkt dieses Projektes.

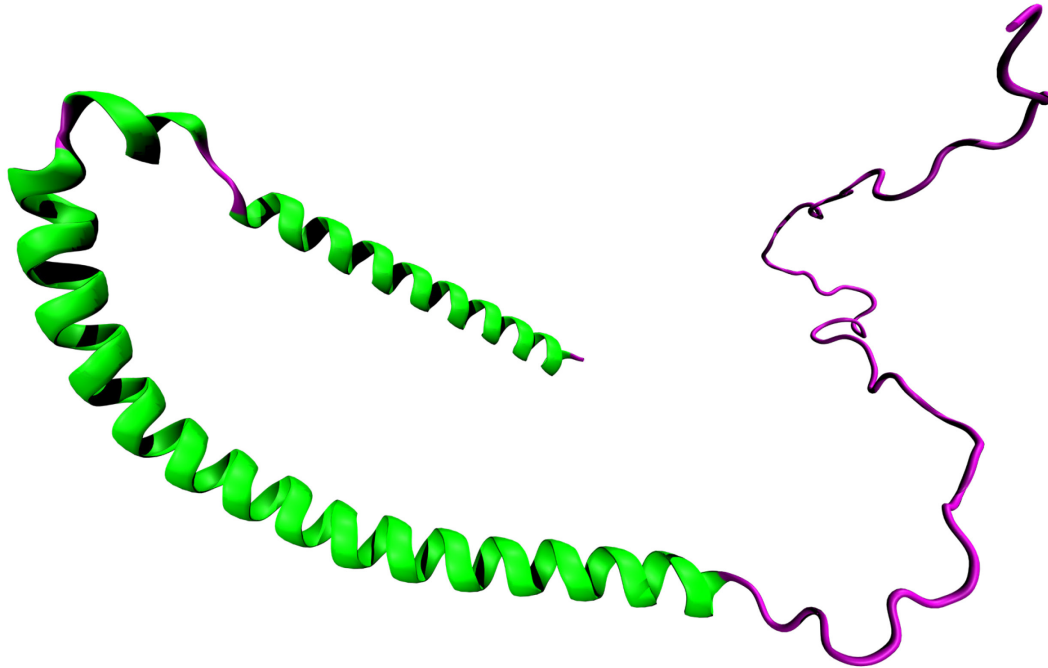


Abbildung III-1: Bändermodell des Proteins α -Synuclein. Sekundärstruktur mit α -Helices (grün) und ungeordneten Bereichen (lila). VMD-Simulation auf Grundlage der PDB-ID: 2KKW.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind eine spezielle Klasse von ungeordneten Proteinen. Sie bilden einen wichtigen Teil des Immunsystems aller lebenden Organismen und gelten als erste Verteidigungslinie gegen Infektionen, die durch Krankheitserreger verursacht werden.^[99–101] Im Rahmen dieses Projektes wurde das AMP LL-III verwendet. Das LL-III wird aus dem Gift der eusozialen Breitkopf-Schmalbiene (lateinisch: *Lasioglossum laticeps*) extrahiert. Eine interessante Eigenschaft dieses LL-III ist die ausgeprägte Aktivität gegen mehrere Bakterienstämme, Pilze und Krebszellen. In Kombination mit einer moderaten Zytotoxizität wird dieses Peptid zu einem vielversprechenden Kandidaten für pharmakologische Anwendungen.^[102] Bei dem Peptid LL-III handelt es sich um ein positiv geladenes (+6 bei pH-Werten von 7.4 und 5.0), unstrukturiertes Peptid, welches aus 15 Aminosäuren aufgebaut ist (siehe Abbildung III-2). Es besteht hauptsächlich aus hydrophoben und polaren Aminosäureresten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das LL-III die Fähigkeit besitzt, die Plasmamembran von Krebszellen zu durchqueren und sich im Nukleolus und

in den Granula, die durch LLPS von Proteinen und Nukleinsäuren gebildet werden, anzureichern.^[72] Motiviert durch diese Beobachtung wurde in diesem Projekt die Wirkung des LL-III auf die Phasentrennung und die Neigung des α -Syn zur Fibrillenbildung mit einer Reihe von biophysikalischen und zellbiologischen Methoden untersucht.

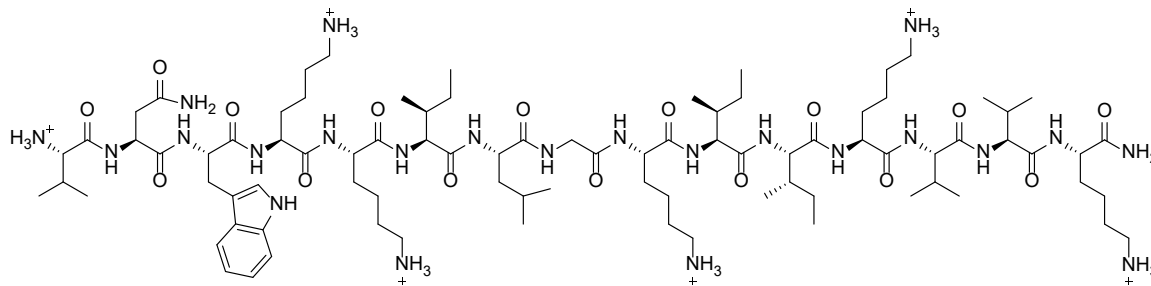


Abbildung III-2: Primärstruktur des Peptids LL-III. Aminosäureseitenketten der Sequenz NH₂-VNWKKILGKIIKVVK-CONH₂ bei einem pH-Wert von 5.0.

III.2. Probenpräparation und Durchführung

Die Sequenz des Peptids LL-III lautet $\text{NH}_2\text{-VNWKKILGKIIKVVK-CONH}_2$. In dem markierten Peptid ist der Fluorophor 6-Carboxyfluorescein kovalent an den *N*-Terminus des Peptids gebunden. Alle Lösungen wurden in einem 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 5.0 angesetzt. Für den Puffer und alle Probenvorbereitungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Das Plasmid pT7-7, welches das humane α -Syn exprimiert, wurde in den *Escherichia coli* Stamm BL21 (DE3) übertragen. Eine Vorkultur von 50 mL LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin wurde angesetzt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (130 U/min) gezüchtet. 7.5 mL der Vorkultur wurden in 750 mL LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin verimpft und bei 37 °C unter Schütteln (130 U/min) gezüchtet, bis die Absorption bei 600 nm einen Wert von 0.8 erreichte. Die Expression erfolgte anschließend durch die Zugabe von 0.4 mM IPTG (Endkonzentration) und die Kultur wurde über Nacht bei 19 °C exprimiert. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, 1 L Pellet in 7.5 mL Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA und 150 mM NaCl) resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Die Röhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden 7 Minuten lang in ein kochendes Wasserbad gestellt und der Überstand wurde nach einer Zentrifugation über Minuten bei maximaler Geschwindigkeit aufgefangen. Streptomycinsulfat (136 $\mu\text{L/mL}$ des Überstandes) und Eisessig (228 $\mu\text{L/mL}$ des Überstandes) wurden hinzugefügt und es wurde 5 Minuten lang bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut aufgefangen und mit Ammoniumsulfat ausgefällt (bei 4 °C wurde gesättigtes Ammoniumsulfat in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit dem Überstand verwendet). Das Protein wurde als Präzipitat durch Zentrifugation gewonnen und einmal mit 1 mL Ammoniumsulfatlösung (4 °C, 1:1 (v/v), gesättigtes Ammoniumsulfat und Wasser) gewaschen. Danach wurde das gewaschene Pellet in 1 mL 100 mM Ammoniumacetat zur Bildung einer trüben Lösung erneut suspendiert und durch Zugabe der gleichen Menge Ethanol bei Raumtemperatur ausgefällt. Die Ausfällung mit Ethanol wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 100 mM Ammoniumacetat und 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) 1:1 resuspendiert und über eine mit 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) gewaschene Gelfiltrationssäule (HiLoad® Superdex® 75 pg) aufgereinigt. Das Protein wurde per 15 % SDS-Gel identifiziert und mit

Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltereinheiten (3000 kDa) einkonzentriert.¹

In den angesetzten Proben besaßen das α -Syn und das LL-III die Konzentrationen 100 μ M respektive 0, 50, 200 oder 500 μ M.

Die fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden in Anwesenheit von 6-Carboxyfluorescein-markiertem LL-III, welches bei 488 nm angeregt wurde, durchgeführt. Hierbei wurde eine 1 μ M-Lösung des markierten LL-III mit dem unmarkierten Peptid gemischt, um die Endkonzentrationen von 50, 200 und 500 μ M zu erreichen.

Bei den AFM-Untersuchungen wurden die Bilder im Tapping-Modus unter Verwendung des 20 mM Natriumacetatpuffers (pH 5.0) mit Silizium-SPM-/Nanosensoren aufgenommen. Einige μ L einer 20 μ M α -Syn-Lösung wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von 200 respektive 500 μ M LL-III vor der Aufnahme der Bilder auf einer Glimmeroberfläche getrocknet. Deshalb ist eine Beeinflussung der Qualität der Fibrillenbilder durch den Trocknungsprozess auf der Glimmeroberfläche des AFM-Tisches möglich. Es wurden Spitzen mit Nennkraftkonstanten von 10-130 Nm^{-1} bei Antriebsfrequenzen von 200-500 kHz und Antriebsamplituden zwischen 50 und 500 mV verwendet. Die Scanfrequenz betrug 1.49 Hz. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 512×512 Pixeln aufgenommen. Sämtliche AFM-Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und mit der Software NanoScope (Version 5) ausgewertet.

Die Untersuchungen der *Steady-State*-Fluoreszenzanisotropie wurden unter Verwendung einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.3 cm und einem Endvolumen von 60 μ L bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen LL-III und α -Syn wurden die Daten einer 4 μ M Lösung des LL-III, welche mit Carboxyfluorescein markiert war, aufgezeichnet. Hierbei wurde die Konzentration des α -Syn im Bereich von 0 bis 100 μ M variiert. Als Anregungswellenlänge wurden 480 nm gewählt, während eine Emissionswellenlänge von 528 nm eingestellt wurde. Jeder angegebene Anisotropiewert ist der Mittelwert von mindestens 10 Aufnahmen. Zur Absicherung wurde das gleiche Experiment mit dem unmarkierten Peptid (52 μ M) wiederholt, wobei die Änderung der Anisotropie des Tryptophan-Restes verfolgt wurde. In dieser Messreihe wurde die Konzentration des α -Syn zwischen 0 und 50 μ M modifiziert und die Anregungswellenlänge wurde auf 295 nm geändert, um die Anregung der Tyrosin-Reste des α -Syn zu

¹ Die Expression und Aufreinigung des Proteins wurde von S. Möbitz (Physikalische Chemie I, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

vermeiden. Wegen des Emissionsmaximums des freien Peptids bei 354 nm wurde die Emissionswellenlänge auf diesen Wert geändert. Anschließend wurden die Bindungsisothermen durch Auftragen von r_0/r als Funktion der gesamten Konzentration des α -Syn ermittelt. Dabei bezeichnen r_0 und r die Anisotropien des Peptids in Ab- respektive in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration des α -Syn. Um den Wert der Bindungskonstante K_b zu ermitteln, wurden die experimentellen Daten mit Hilfe eines 1:1-Bindungsmodells gefittet.

Sämtliche Messungen der CD-Spektroskopie wurden bei einer Temperatur von 25 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.01 cm aufgenommen. Für die Erfassung der Spektren wurden eine Scanrate von 50 nm min⁻¹, eine Ansprechzeit von 2 s und eine Bandbreite von 5 nm verwendet. Es wurden Spektren der Lösungen mit 30 μ M α -Syn, 300 μ M LL-III sowie α -Syn zusammen mit LL-III in den selben Konzentrationen aufgenommen. Von diesen Spektren wurde jeweils ein Spektrum des verwendeten Puffers (20 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0) subtrahiert. Die angegebenen Spektren sind die Ergebnisse von 4 Akkumulationen.

Die Proben für die Negativfärbung wurden, wie in der Literatur beschrieben, hergestellt.^[103] Ein Volumen von 5 μ L der α -Syn-Probe wurde bei 25 °C für 5 min auf ein frisch glühentladenes, kohlenstoffbeschichtetes 400-Mesh-Kupfergitter (G2400C, Plano GmbH, Deutschland) absorbiert. Nach der Vorinkubationszeit wurde die überschüssige Probe durch Berühren eines Whatman-Filterpapiers abgetupft, mit drei Tropfen ddH₂O gewaschen und einer frisch hergestellten 1 %igen Uranylacetat-Lösung (SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland) für etwa 1 Minute ausgesetzt. Die überschüssige negative Färbelösung wurde abgetupft und die Probe an der Luft getrocknet. Ein JEM1400 Mikroskop (Jeol, Tokio, Japan), ausgestattet mit einer LaB6-Kathode und betrieben bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV, diente als Messinstrument. Digitale Mikrofotografien wurden mit Pixelgrößen von 2.8 Å/Pixel und 5.6 Å/Pixel mit einer 4k · 4k CMOS-Kamera F416 (TVIPS, Gauting, Deutschland) aufgenommen.

Bei der Herstellung der stabilen Zellreihe, welche EGFP- α -SynA53T und die Kristallisationskeime exprimiert, wurde eine bereits in der Literatur beschriebene Methode verwendet.^[104] Zur Herstellung von verimpfungsfähigen α -Syn-Einheiten wurden gereinigte α -Syn-Monomere (5 mg/mL) eine Stunde lang bei hoher Geschwindigkeit (100.000 · *g*) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt

und unter ständigem Schütteln (900 U/min) bei 37 °C 24 h lang inkubiert. Die resultierenden Einheiten wurden in einem Verhältnis von 1:20 in dem Medium Opti-MEM (ThermoFischer) verdünnt und 3 Minuten lang mit einem Branson-Schallgerät beschallt. Für das Animpfen wurden die beschallten α -Syn-Einheiten in einer Mischung aus 1 Opti-MEM und 40 μ L Lipofectamine 2000 (ThermoFischer) verdünnt. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden 200 μ L der Suspension zu 1800 μ L der in dem Opti-MEM Medium kultivierten Zellen gegeben. Um den Einfluss des LL-III zu untersuchen, wurde das LL-III eine Stunde vor der PFF-Behandlung mit α -Syn-GFP exprimierenden SH-SY5Y-Zellen in einer Konzentration von 1 μ M vorinkubiert, um die zelluläre Aufnahme des LL-III zu ermöglichen.

Für die supraauflösende strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SR-SIM) wurden die Zellen 24 oder 48 Stunden nach dem Animpfen mit 4 %igem eiskalten Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit einer Lösung aus DAPI und Fluoromount-GTM Montagemedium auf Deckgläsern befestigt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem ZEISS ELYRA PS.1 Mikroskop mit LSM880 durchgeführt. Bei der Bildaufnahme für die SR-SIM wurden ein 20x und ein 63x Ölimmersionsobjektiv für die Aufnahme von Rohbildern verwendet. Die Software ZEN Black 2.1 SP3 wurde zur Erzeugung von supraaufgelösten-Bildern verwendet.

III.3. Ergebnisse und Diskussion

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass das α -Syn bei einem sauren pH-Wert in der Lage ist, bereits bei einer Konzentration von 10 μ M Tröpfchen mit einer Größe im Submikrometerbereich zu bilden. Wenn ein physiologischer pH-Wert vorliegt, tritt die Phasenseparation erst bei deutlich höheren Konzentrationen auf.^[97]

Zunächst wurde überprüft, dass die Probenlösungen mit 100 μ M und 200 μ M α -Syn effektiv Tröpfchen bilden konnten, wenn ein pH-Wert von 5.0 vorliegt. Die Abbildung III-3 und Abbildung VIII-1 zeigen lichtmikroskopische Phasenkontrastbilder der beiden α -Syn-Probenlösungen, die jeweils 2, 4, 7, 9 und 16 Tage nach der Probenvorbereitung aufgenommen wurden.

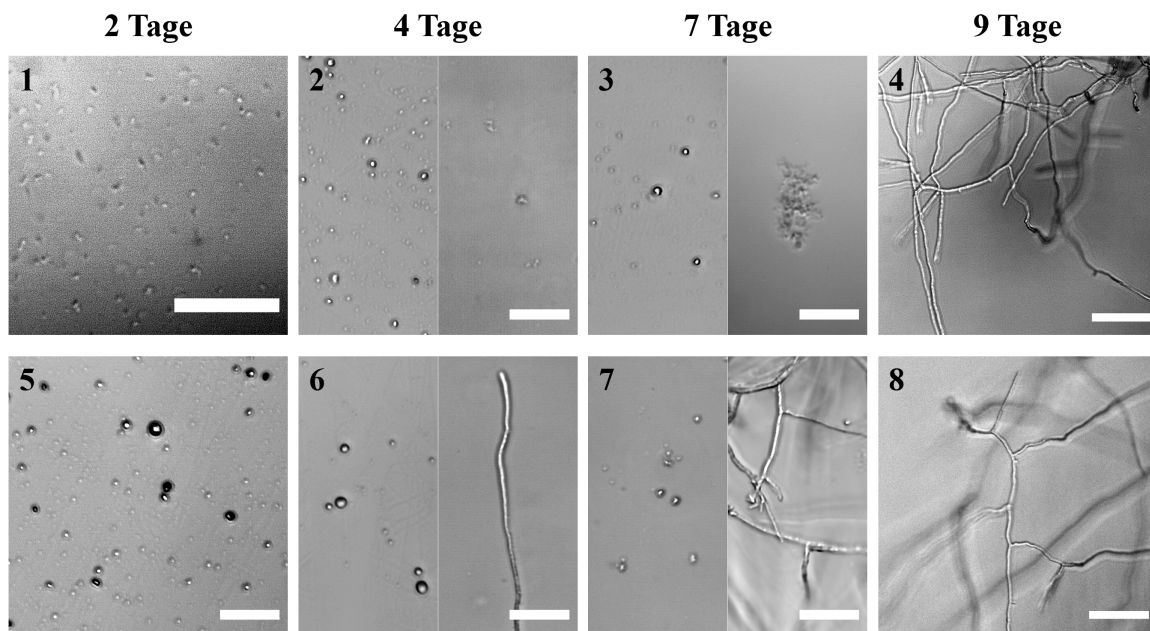


Abbildung III-3: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μ M α -Syn (1-4) und 200 μ M α -Syn (5-8). Die Bilder wurden jeweils 2, 4, 7 und 9 Tage nach der Inkubation des monomeren α -Syn aufgenommen. Bei den Aufnahmen nach 4 und 7 Tagen wurden bei jeder Proteinkonzentration zwei verschiedene Bereiche aufgenommen, die das Vorhandensein von einzelnen Tröpfchen sowie von Tröpfchenclustern oder Fibrillen in Lösung zeigen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 $^{\circ}$ C) in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Nach einer zweitägigen Inkubation des monomeren Polypeptids mit 100 μ M α -Syn wurden runde, etwa 1 μ m große Tröpfchen des α -Syn nachgewiesen, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt.^[97] Vier Tage nach der Probenpräparation waren weiterhin etwas größere Tröpfchen mit einer durchschnittlichen Größe von 2 μ m sichtbar. Darüber hinaus konnten einige kleine Tröpfchencluster dokumentiert werden. Ein ähnliches Szenario

wurde nach 7 Tagen beobachtet, wobei die Tröpfchencluster größer waren ($\sim 4 \mu\text{m}$). Nach 9 Tagen war die Bildung von länglichen Fibrillen deutlich sichtbar und es wurden nahezu keine Tröpfchen mehr festgestellt. Qualitativ betrachtet wurden nach 16 Tagen keine weiteren Veränderungen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Fibrillen zeitlich stabil sind. Es ist davon auszugehen, dass der Prozess der Fibrillenbildung bereits nach etwa 9 Tagen abgeschlossen war.

Bei der Verwendung von $200 \mu\text{M}$ α -Syn wurden nach 2 Tagen im Vergleich zur geringeren konzentrierten Probe größere Tröpfchen beobachtet. Nach 4 Tagen lagen sowohl Tröpfchen als auch Fibrillen vor. In den folgenden Tagen schien die Anzahl der Tröpfchen zu sinken, wohingegen sich nach einer Woche vermehrt fibrilläre Strukturen gebildet haben. Schließlich wurden nach 9 Tagen nur noch Fibrillen beobachtet, welche auch nach 16 Tagen noch stabil waren. Wie erwartet war die Bildung von Tröpfchen demnach bei höheren Konzentrationen des α -Syn schneller.

Zur weiteren Charakterisierung der Fibrillenbildung des α -Syn wurden nach einer 9-tägigen Inkubation des monomeren Proteins transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Experimente durchgeführt (Abbildung VIII-2).² Die Bildung von μm -großen, länglichen Fibrillen konnte eindeutig beobachtet werden, wodurch die Tendenz dieses Proteins zur Bildung länglicher fibrillärer Strukturen unter solchen Lösungsbedingungen bestätigt wurde. Außerdem waren noch einige Tröpfchen sichtbar (Abbildung VIII-2.D), was die frühere Beobachtung unterstützt, dass der Übergang vom monomeren zum fibrillären Zustand durch die Bildung von α -Syn-Kondensaten erfolgt.^[97]

Um zu testen, ob das kurze antimikrobielle Peptid LL-III in der Lage ist, die Fibrillenbildung des α -Syn zu beeinflussen, wurde eine Reihe von Mikroskopieexperimenten durchgeführt, bei denen das α -Syn in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ verwendet und die Konzentration des LL-III zwischen $50 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ variiert wurde. Die Proben wurden durch Ansetzen einer Lösung aus LL-III und α -Syn im monomeren Zustand hergestellt und nach 9 und 16 Tagen mikroskopisch untersucht. In der Abbildung III-4 sind die Resultate zusammengefasst. Auffallend war, dass sich das Protein nicht mehr in den fibrillären Zustand umwandeln konnte, wenn LL-III zu der monomeren α -Syn-Lösung hinzugefügt wurde. Das bedeutet, dass das LL-III die Bildung des amyloidogenen Zustands des Proteins

² Diese Messungen wurden von Dr. D. Prumbaum und Prof. Dr. S. Raunser (Abteilung für Strukturbiochemie, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie Dortmund) durchgeführt.

hemmt. Nach 9 Tagen waren sowohl Tröpfchen als auch Cluster sichtbar. Die Größe der Cluster hing von der LL-III-Konzentration ab. Höhere Peptidkonzentrationen förderten die Assoziation von einer größeren Anzahl an Tröpfchen. Ferner zeigten die nach 16 Tagen aufgenommenen Mikroskopiebilder, dass die Zugabe von LL-III die Bildung des Tröpfchen-Kondensats, vermutlich durch eine weite Verteilung innerhalb der Tröpfchenphase, förderte. Dies deutet darauf hin, dass das LL-III effizient mit dem monomeren α -Syn in der Tröpfchenphase interagiert, wodurch das Kondensat stabilisiert und die Reifung zum fibrillären Zustand verhindert wird. Die Mikroskopiedaten zeigten, dass sich in einem späteren Stadium des Prozesses (nach 16 Tagen) bei hohen Tröpfchenkonzentrationen schließlich große Tröpfchencluster bildeten.

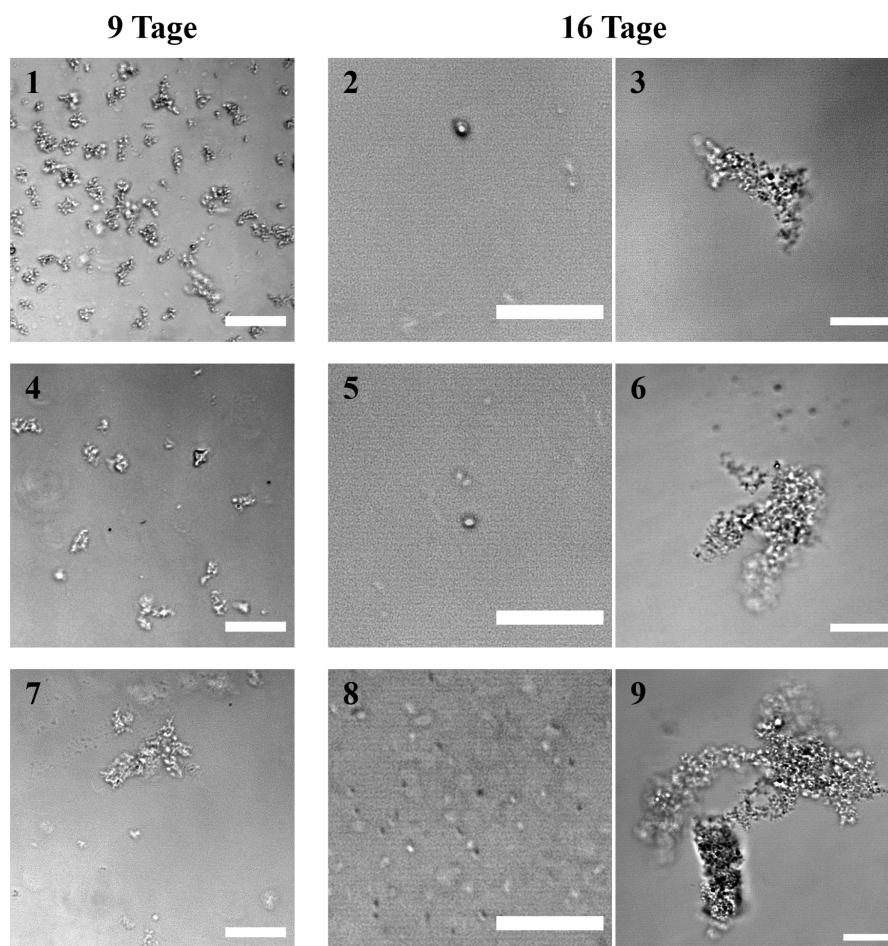


Abbildung III-4: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μM α -Syn in Gegenwart von 50 μM (1-3), 200 μM (4-6) oder 500 μM (7-9) LL-III. Jede Probe wurde durch Mischen der monomeren Form des α -Syn mit dem LL-III angesetzt. Die Bilder wurden jeweils 9 und 16 Tage nach der Inkubation aufgenommen. Bei den Aufnahmen nach 16 Tagen wurden bei jeder Peptidkonzentration zwei verschiedene Bereiche aufgenommen, die das Vorhandensein von einzelnen Tröpfchen sowie von Tröpfchenclustern in Lösung zeigen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 $^{\circ}\text{C}$) in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) durchgeführt. Skalierung: 30 μm .

Um die Verteilung des LL-III in den α -Syn-Tröpfchen zu bestätigen, wurden ergänzende Fluoreszenzmikroskopie-Experimente mit einem Carboxyfluorescein-markierten LL-III durchgeführt. In der Abbildung III-5 ist zu sehen, dass der größte Teil des LL-III in den α -Syn-Tröpfchen lokalisiert wurde, während das restliche LL-III in der Bulk-Lösung nachgewiesen wurde. Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden in Gegenwart von 200 μ M und 500 μ M LL-III erzielt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Phasenkontrastmikroskopie wurde bei diesen Proben die Bildung von LL-III-angereicherten Tröpfchenclustern nach 16 Tagen beobachtet.

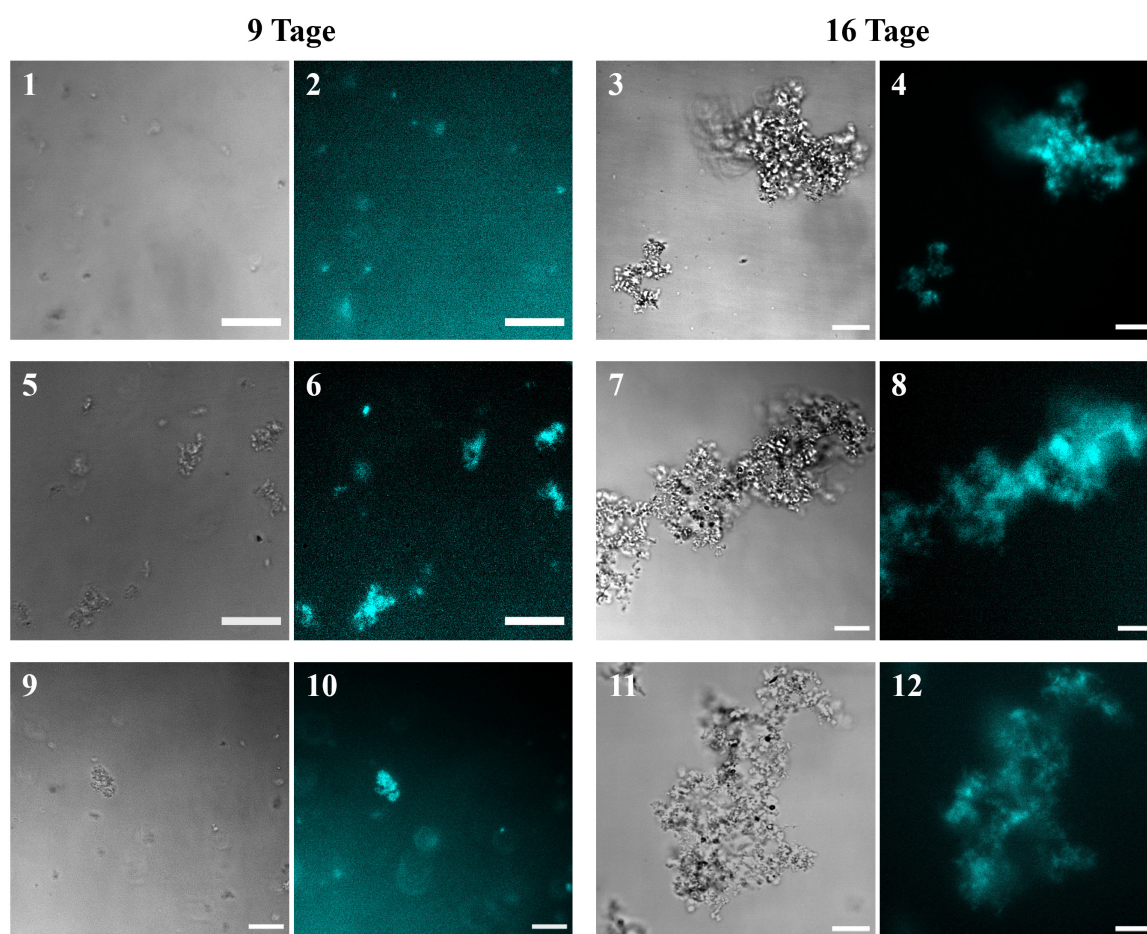


Abbildung III-5: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer 100 μ M α -Syn-Lösung in Gegenwart von 50 μ M (1-4), 200 μ M (5-8) oder 500 μ M (9-12) LL-III (Gesamtpeptidkonzentration). Die Konzentration des Carboxyfluorescein-markierten Peptids betrug 1 μ M. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 $^{\circ}$ C) in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Um die Hemmung der Fibrillenbildung des α -Syn bei der Zugabe von LL-III zu verifizieren, wurden rasterkraftmikroskopische (englisch: *atomic force microscope*, AFM) Experi-

mente durchgeführt.³ Zu diesem Zweck wurde eine 20 μM Lösung des α -Syn in Abwesenheit und in Anwesenheit von LL-III auf einer Glimmeroberfläche getrocknet und AFM-Bilder aufgenommen. Unter diesen Bedingungen konnten keine Tröpfchen nachgewiesen werden. In Abwesenheit von LL-III wurden kurze fibrillenartige Strukturen gemessen (Abbildung VIII-3). In Gegenwart von 200 μM LL-III waren nach dem Trocknen noch einige Fibrillen kleinerer Größe sichtbar. Bei der Verwendung von 500 μM LL-III konnten keine fibrillären Strukturen mehr nachgewiesen werden, womit die Aufnahmen der Phasenkontrastmikroskopie bestätigt wurden.

Aus den bisher genannten Daten geht hervor, dass sich das LL-III in der Tröpfchenphase des α -Syn verteilt. Um herauszufinden, ob sich das Peptid einfach in der Tröpfchenphase verteilt oder ob es effizient mit dem monomeren α -Syn interagiert, wurde die Bindungsaffinität des LL-III zum α -Syn mit Hilfe der stationären Fluoreszenzanisotropie gemessen. Dazu wurde eine Lösung mit Carboxyfluorescein-markiertem LL-III (4 μM) mit einer Lösung von monomeren α -Syn titriert. Die Fluoreszenzanisotropie des markierten Peptids wurde aufgezeichnet, indem die Proben bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt wurden und die Fluoreszenzanisotropie bei dem Emissionsmaximum des freien Peptids (528 nm) ausgewertet wurde. In der Abbildung III-6.A ist r_0/r als Funktion der α -Syn-Gesamtkonzentration dargestellt, wobei r_0 und r die Anisotropien des Peptids in Abwesenheit respektive in Anwesenheit des α -Syn sind. Die Daten konnten gut mit einem 1:1-Bindungsmodell gefittet werden (Herleitung siehe Kapitel VIII.2).^[105] Dabei ergab sich eine Bindungskonstante K_b von $(1.9 \pm 0.3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

³ Diese Messungen wurden von S. Kriegler (Physikalische Chemie I, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

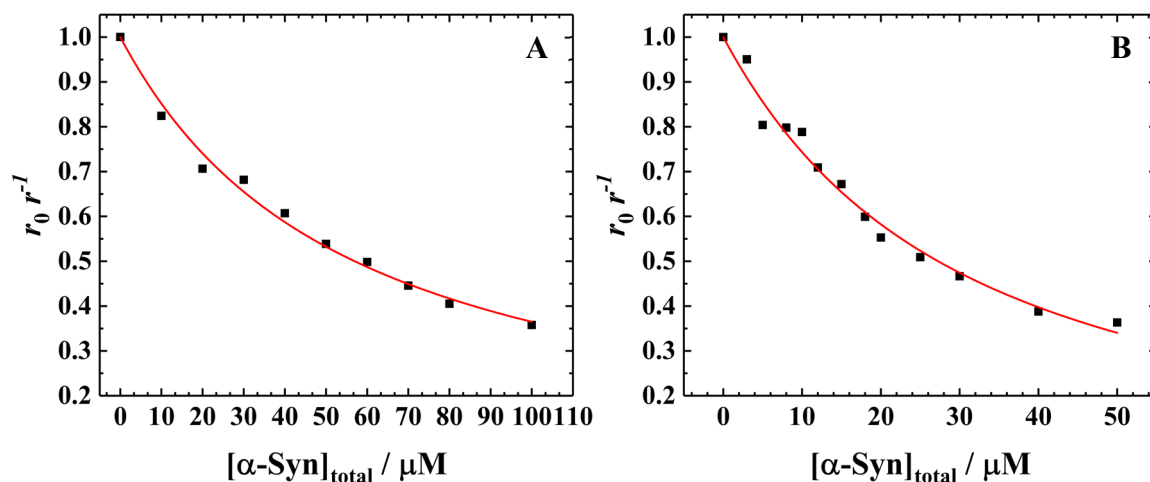


Abbildung III-6: Mittels Steady-State-Fluoreszenzanisotropie ermittelte Bindungsisothermen der Titration von LL-III mit α -Syn. (A) Eine Lösung des mit Carboxyfluorescein-markiertem LL-III (4 μ M) wurde mit einer Lösung des α -Syn im Bereich von 0-100 μ M titriert. Der Fluorophor war kovalent an den N-Terminus des Peptids gebunden. (B) Eine Lösung des LL-III (5 μ M) wurde mit einer Lösung des α -Syn im Bereich von 0-50 μ M zur Messung der Tryptophan-Fluoreszenzanisotropie titriert. Die roten Linien stellen jeweils die beste Anpassung gemäß eines 1:1-Bindungsmodells dar.^[105] Alle Experimente wurden in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) bei 25 °C durchgeführt.

Um einen möglichen Einfluss des extrinsischen Fluorophors auf den Interaktionsprozess auszuschließen, wurde ein ergänzendes Titrationsexperiment durchgeführt, bei dem die Änderungen der Anisotropie des Tryptophan-Restes von LL-III aufgezeichnet wurden (Abbildung III-6.B). Der erhaltene Wert für K_b liegt bei $(3.7 \pm 1.0) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ und stimmt damit mit der Größenordnung aus der Messung mit dem Carboxyfluorescein-markierten Peptid überein. Diese Daten belegen, dass das LL-III in der Lage ist, mit der monomeren Form des α -Syn eine schwache Wechselwirkung einzugehen, was zu dem beobachteten Wachstum der Tröpfchen führt und die Umwandlung in den fibrillären Zustand des α -Syn verhindert.

Aus der Größenordnung der Bindungskonstante konnte der Anteil an komplexiertem α -Syn in den Mikroskopieexperimenten berechnet werden. Für 100 μ M α -Syn liegt dieser Anteil an komplexiertem α -Syn in Gegenwart von 50 μ M LL-III bei etwa 30 %. Mit dieser LL-III-Konzentration wurde die Bildung von Fibrillen bereits gehemmt. Dies ist wahrscheinlich auf die Fähigkeit des Peptids zurückzuführen, mit einem oder zwei α -Syn-Molekülen innerhalb der Tröpfchen zu interagieren. Es wird erwartet, dass die Interaktion hauptsächlich über die Wechselwirkung der positiv geladenen (+6) und hydrophoben Gruppen des LL-III mit dem negativ geladenen C-Terminus (-12) respektive der hydrophoben NAC-Region des α -Syn erfolgt. Tatsächlich konnten diese Schlussfolgerungen durch Da-

ten der Kernspinresonanz (englisch: *nuclear magnetic resonance*, NMR) unterstützt werden. So zeigten NMR-Daten bereits, dass kationische Polyamine in der Lage sind, durch elektrostatische Wechselwirkungen an den C-Terminus des α -Syn zu binden und dass die Stärke der Bindung von der Nettoladung der Polyamine abhängig ist.^[106] In Gegenwart von 200 μ M und 500 μ M LL-III liegen die Anteile an komplexiertem α -Syn bei 70 % und 90 %. Bei diesen Werten wurde die Anzahl der Tröpfchen signifikant erhöht und das Wachstum der Tröpfchen, durch OSTWALD-Reifung oder Tröpfchenfusion, und ihre Assoziation wurden gefördert.

Anschließend wurde mittels CD-Spektroskopie die Wirkung der LLPS-Bildung und der LL-III-Verteilung auf die Konformation des Proteins α -Syn untersucht. Die erhaltenen CD-Spektren der Lösung des α -Syn mit LL-III sowie der einzelnen Proben des monomeren α -Syn und des LL-III sind in der Abbildung III-7.A gezeigt. Bei der Durchführung der CD-Messungen ist zu beachten, dass die Konzentrationen des LL-III und des Proteins in Bezug auf die Amidbindungen ähnlich sind (etwa 3.9 mM), obwohl die Gesamtkonzentrationen unterschiedlich sind. Der Chromophor der Amidbindung ist für das beobachtete CD-Signal verantwortlich, denn durch ihn werden Konformationsänderungen der interagierenden Partner bei der Bindung verdeutlicht. Abbildung III-7.A zeigt, dass sowohl das antimikrobielle Peptid als auch das α -Syn in Lösung eine ungeordnete Konformation annehmen, was auf das charakteristische Minimum des CD-Signals bei einer Wellenlänge um 195 nm zurückzuführen ist und mit früheren Studien übereinstimmt.^[97,107] Wenn sowohl das LL-III als auch das α -Syn in der Probenlösung vorhanden sind, wurden keine Änderungen der Sekundärstruktur festgestellt. Zur Bestätigung dieser Schlussfolgerung diente die Summe der getrennt aufgezeichneten Spektren des LL-III und des α -Syn. Es zeigte sich eine Überlagerung dieser Summe mit dem Spektrum des Gemisches bestehend aus LL-III und α -Syn (Abbildung III-7.B). Außerdem wurde die zeitliche Entwicklung des CD-Spektrums der LL-III/ α -Syn-Mischung nach 5 und 10 Tagen untersucht (Abbildung III-7.A). Selbst nach 10 Tagen, respektive an einem Zeitpunkt, zu dem sich bereits Tröpfchen gebildet haben, zeigte das CD-Spektrum des Gemisches bestehend aus LL-III und α -Syn ausschließlich Merkmale einer ungeordneten Konformation. Dies deutet darauf hin, dass bei der Bildung der Tröpfchenphase keine signifikanten Konformationsänderungen auftraten, wodurch die Stabilität des von α -Syn und LL-III gebildeten Co-Kondensats verdeutlicht wird.

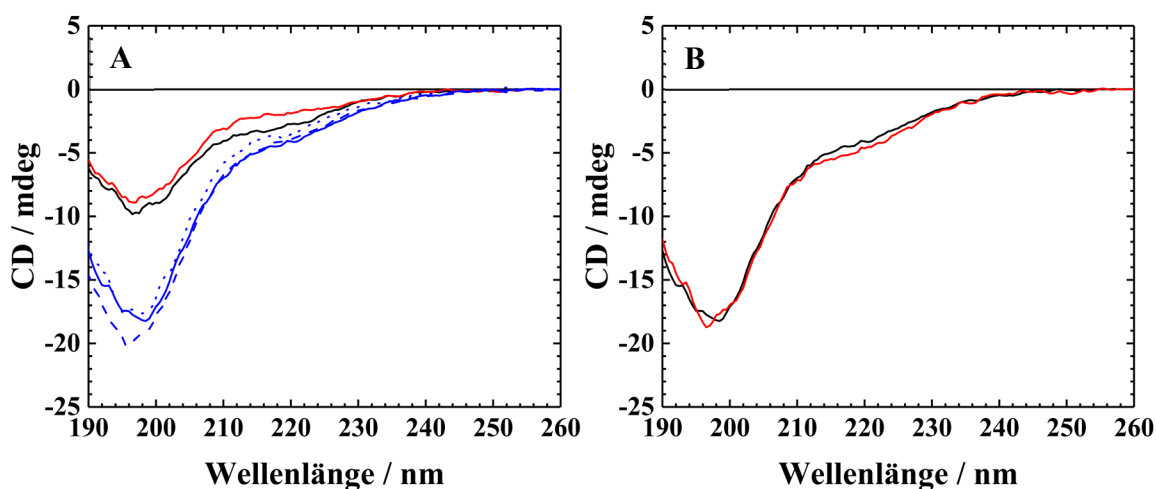


Abbildung III-7: CD-Spektren des LL-III und des α -Syn zu verschiedenen Zeitpunkten. (A) LL-III (schwarze Linie), α -Syn (rote Linie) und Mischung aus LL-III mit α -Syn (blaue Linie) aufgenommen am Tag 0 (durchgezogen), nach 5 Tagen (gestrichelt) und nach 10 Tagen (gepunktet). Die Konzentration des LL-III betrug $300 \mu\text{M}$ und die Konzentration des α -Syn $30 \mu\text{M}$. Alle Experimente wurden in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) bei einer Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. (B) Überlagerung der CD-Spektren der α -Syn /LL-III-Mischung am Tag 0 (schwarze Linie) und des Spektrums, welches durch Addition der CD-Spektren der separat gemessenen LL-III und α -Syn (rote Linie) erhalten wurde.

Um abschließend die Anti-Aggregations-Aktivität von LL-III in einem zellulären Modell zu untersuchen, wurde das α -Syn vorgeformte Fibrillenmodell (englisch: *pre-formed fibril model*, PFF) verwendet.⁴ Hierbei wurde das rekombinante monomere α -Syn-Protein in fibrilläre Kristallisationskeime umgewandelt und neuronalen SH-SY5Y-Zellen zugesetzt. Diese Zellen ermöglichen eine stabile Expressierung des α -Syn-GFP Fusionsproteins.^[104,108] Insgesamt exprimierten die unbehandelten Zellen lösliches α -Syn-GFP, welches relativ homogen in den Zellen verteilt war (Abbildung III-8, links). Die Behandlung der Zellen mit den PFF-Kristallisationskeimen führte zur Aggregation des α -Syn-GFP, was sich in der Bildung von GFP-positiven Zentren widerspiegelte (Abbildung III-8, rechts). Diese α -Syn-GFP-Aggregate konnten bereits 24 Stunden nach der PFF-Behandlung mittels der Fluoreszenzmikroskopie unter Beleuchtung über ein feines, gitterförmiges Muster in Superauflösung sichtbar gemacht werden. Auffällig war, dass die durch PFF induzierten α -Syn-GFP-Aggregate an der Aminosäure Serin 129 phosphoryliert waren, was bei menschlichen Synucleinopathien eine pathologische Signatur von α -Syn-Aggregaten ist.^[109]

⁴ Diese Messungen wurden von L. A. Pazurek (Abteilung für Biochemie und Neurodegenerative Krankheiten, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) und Dr. V. Bader (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

Die Anzahl der Zellen mit α -Syn-GFP-Aggregaten wurde 24 h und 48 h nach der PFF-Behandlung quantifiziert (Abbildung VIII-4). In beiden Fällen war die Anzahl der Zellen mit Aggregaten in den mit LL-III vorbehandelten Zellen deutlich verringert (von 48 % auf 30 % nach 24 Stunden und von 54 % auf 36 % nach 48 Stunden). Um die Kernfärbung der mit LL-III vorbehandelten Zellen nach 48 Stunden noch besser erkennen zu können, ist in der Abbildung VIII-5 ein Mikroskopiebild mit erhöhter DAPI-Intensität gezeigt.

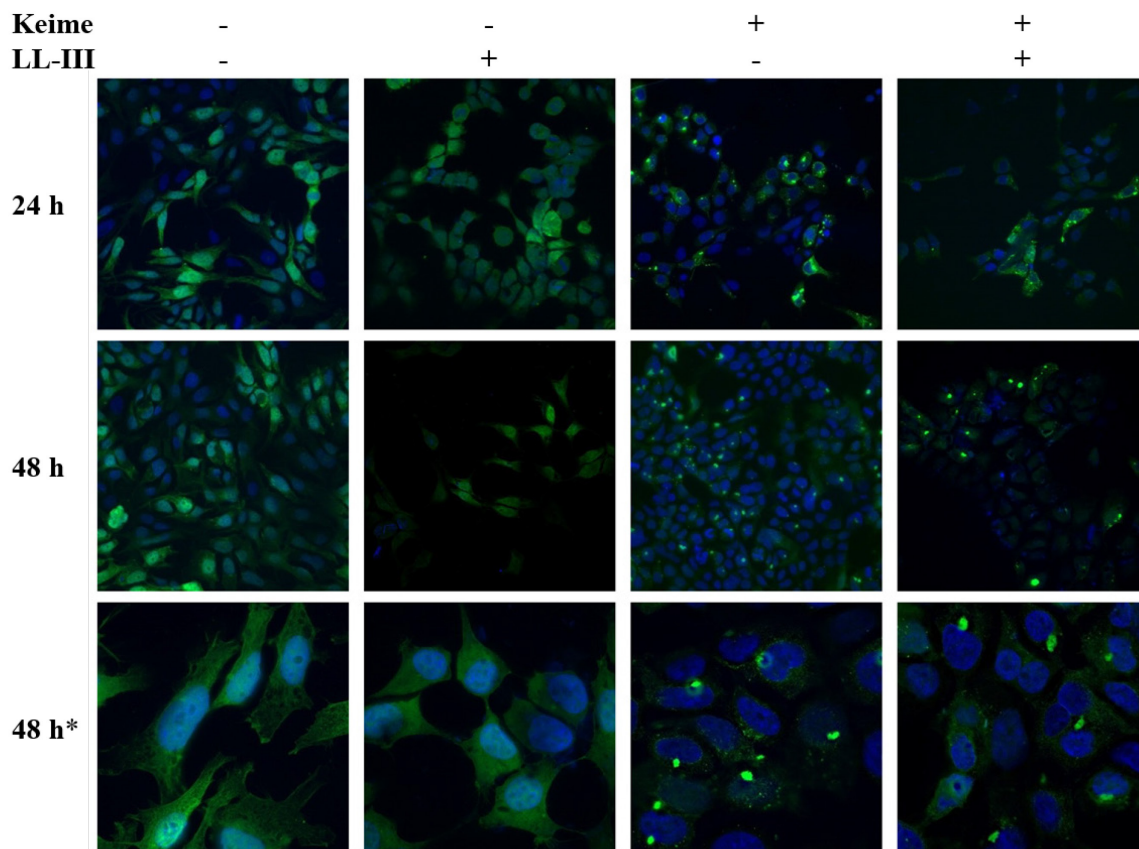


Abbildung III-8: Verminderung der PFF-induzierten α -Syn-Aggregation durch LL-III in neuronalen Zellen. Die SH-SY5Y-Zellen wurden eine Stunde vor der Zugabe der PFF-Kristallisationskeime mit oder ohne LL-III vorbehandelt, um die α -Syn-Aggregation auszulösen. Das α -Syn wurde 24 h und 48 h nach der PFF-Behandlung durch Fluoreszenzmikroskopie mit Beleuchtung über ein feines, gitterförmiges Muster in Superauflösung sichtbar gemacht. Grün: (GFP), blau: Zellkerne (DAPI).⁵ *stärkere Vergrößerung

⁵ Diese Messungen wurden von L. A. Pazurek (Abteilung für Biochemie und Neurodegenerative Krankheiten, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) und Dr. V. Bader (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

III.4. Zusammenfassung

Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass die Umwandlung des α -Syn vom funktionellen monomeren in den krankheitsbedingten amyloiden Zustand über zwei verschiedene Wege erfolgen kann: α -Syn kann zunächst kleine Oligomere bilden, die sich in größere Oligomere umwandeln und dann zu amyloiden Fibrillen wachsen. Bei dem Prozess der Kondensation verläuft die pathologische Proteinaggregation des α -Syn über die Bildung von Tröpfchen, die dann schrittweise in den amyloiden Zustand übergehen, welcher in den pathologischen LEWY-Körpern zu sehen ist. Die Bildung flüssiger Tröpfchen des α -Syn wird hauptsächlich durch ein Zusammenspiel von elektrostatischen Wechselwirkungen in der unstrukturierten *N*-terminalen Domäne und hydrophoben Wechselwirkungen in der NAC-Region vermittelt. Während der Reifung und der geordneten Fibrillenbildung ist auch die C-terminale Domäne des α -Syn beteiligt.^[97] Welcher Weg beschritten wird, hängt vermutlich auch von den Umgebungsbedingungen ab. Dazu zählen die Ionenstärke, der pH-Wert, die Osmolyte, die Metallionenexposition, das *Crowding* und die Bildung der Kristallisationskeime durch das Vorhandensein von Lipidgrenzflächen und Filamenten.^[20,29,44,63,64,110] Der amyloide Zustand wird allgemein als der thermodynamisch stabilste Zustand angesehen, dessen kinetische Zugänglichkeit jedoch durch das Vorhandensein freier Energiebarrieren zwischen dem nativen und dem Tröpfchen-Zustand (ΔG_1^\ddagger) und zwischen dem Tröpfchen- und dem amyloiden Zustand (ΔG_2^\ddagger) eingeschränkt ist (siehe Schema in Abbildung III-9). Die letztgenannte Barriere der freien Enthalpie (ΔG_2^\ddagger) kann durch einen Reifungsprozess überwunden werden, der die Bildung hydrogel-artiger β -Faltblatt-reicher Aggregate beinhaltet, welche schrittweise in den fibrillären amyloiden Zustand übergehen. Im Rahmen dieses Projektes wurde gezeigt, wie das LLPS und die Tröpfchenbildung des α -Syn durch ein antimikrobielles Peptid beeinflusst wird. Das antimikrobielle Peptid LL-III besitzt die Möglichkeit, effizient mit den Flüssigphasentröpfchen des α -Syn zu interagieren. Als schwache Vernetzer zwischen α -Syn-Molekülen stabilisiert das LL-III das Tröpfchenkondensat und verhindert die Umwandlung in den fibrillären amyloiden Zustand, indem es die Tröpfchenstabilität erhöht und die Barriere der freien Aktivierungsenergie, welche zum fibrillären Zustand führt, erhöht. Eine Dekondensation der Tröpfchen findet nicht statt. Die Anti-Aggregationsaktivität von LL-III wurde zudem in einem zellulären Modell beobachtet. Es ist zu erwarten, dass die Untersuchung antimikrobiell wirkender

Peptide, die mit spezifischen Flüssigkondensaten wie dem des α -Syn interagieren, allgemein zum Verständnis komplexer Krankheitsmechanismen, welche von solchen Kondensaten ausgehen, beitragen kann und möglicherweise auch neue Wege für eine Intervention eröffnet.

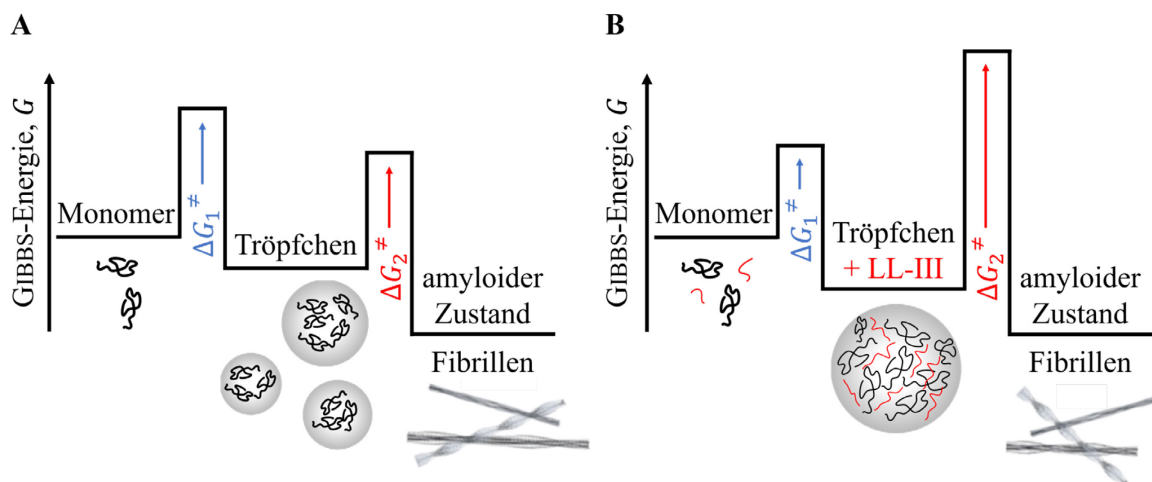


Abbildung III-9: Schematisches Diagramm der GIBBS-Energie des α -Syn bei der Reifung vom monomeren zum tröpfchenförmigen und schließlich zum fibrillären Zustand in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) des antimikrobiellen Peptids LL-III. Der amyloide Zustand ist vermutlich der thermodynamisch stabilste Zustand, aber seine kinetische Zugänglichkeit wird durch das Vorhandensein von Energiebarrieren (ΔG^\ddagger) zwischen dem nativen (Monomer) und dem Tröpfchen-Zustand, sowie zwischen dem Tröpfchen- und dem amyloiden (fibrillären) Zustand verringert. Es wurde angenommen, dass sich die (konzentrationsabhängige) GIBBS-Energie des fibrillären Amyloids in Gegenwart des LL-III nicht ändert.

IV. Einfluss verschiedener Tröpfchensysteme auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins

IV.1. Einleitung

In dem vorangegangenen Projekt „Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“ wurde bereits gezeigt, dass bei dem Fibrillierungsprozess des α -Syn ein Übergang vom flüssigen zum festen Zustand stattfindet, der zur Bildung von Aggregaten und Oligomeren führt.^[97] Im Rahmen dieses Projektes wurde eine weitere Möglichkeit gesucht, um einen Weg zur Vermeidung des Aggregationsprozesses des α -Syn zu finden. Dabei wurde das teilweise ungeordnete RNA-Helikase-Protein LAF-1 (Abbildung IV-1) eingesetzt.

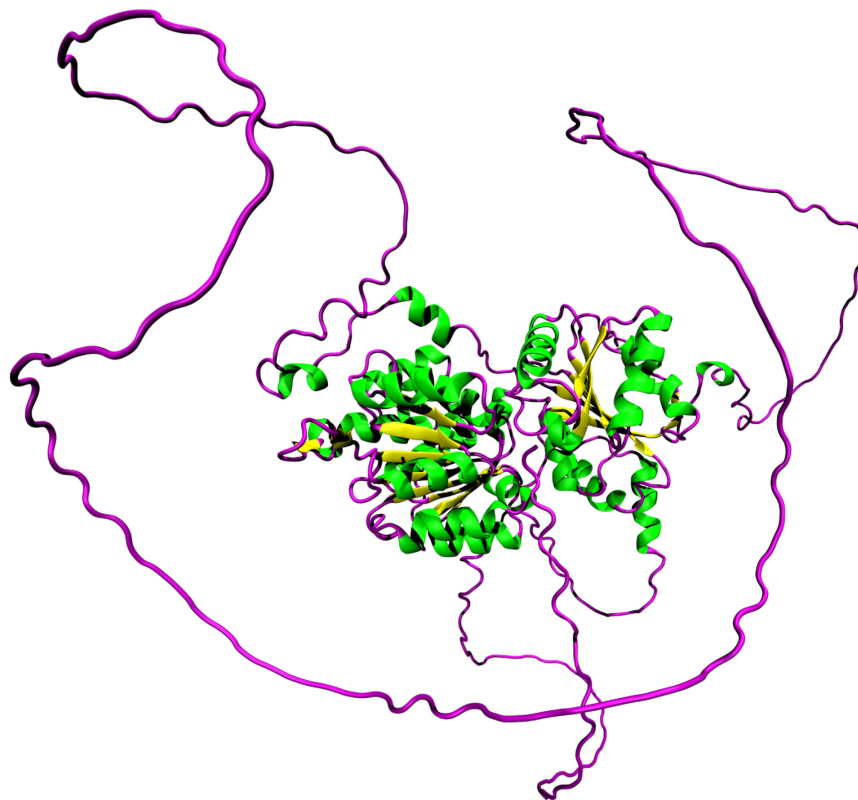


Abbildung IV-1: Bändermodell des RNA-Helikase-Proteins LAF-1. Sekundärstruktur mit α -Helices (grün), β -Faltblättern (gelb) und ungeordneten Bereichen (lila). VMD-Simulation auf Grundlage der AlphaFold-ID: D0PV95.

LAF-1 fördert die Bildung von LLPS und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Bildung von P-Granula in Fadenwürmern (lateinisch: *Caenorhabditis elegans*). Es wurde bereits festgestellt, dass die ungeordnete Arginin/Glycin-reiche Domäne des LAF-1 der Grund für

seine Neigung zur Tröpfchenbildung ist.^[111] Auf der Grundlage dieser Affinität wurde mittels diverser biophysikalischer Methoden der Einfluss des Proteins LAF-1 auf die Phasentrennung und den Fibrillierungsprozess des α -Syn untersucht. Somit wurde geprüft, ob das LAF-1 als Inhibitor der α -Syn-Aggregation wirkt.

Des Weiteren wurde der Einfluss der molekularen *Crowder* PEG und Ficoll® 70 auf dieses System untersucht, da die Bedeutung dieser *Crowder* darin besteht, dass sie das zelluläre Millieu imitieren und die Stabilität sowie die Konformationsdynamik biomolekularer Systeme beeinflussen können.^[112,113]

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieses Projekts ein weiteres LLPS-System hinsichtlich seiner Wirkung auf die α -Syn-Tröpfchen untersucht. Es handelt sich dabei um das LLPS von SynGAP/PSD-95, das bereits in verschiedenen Studien untersucht wurde.^[114,115] Dabei steht das PSD für die postsynaptische Dichte, welche ein proteinreiches Subkompartiment darstellt. Zu den Aufgaben der PSD zählt der Empfang, die Verarbeitung und die Speicherung von Signalen, welche durch die präsynaptischen axonalen Enden übertragen werden.^[116] Innerhalb der PSD sind hunderte dicht gepackter Proteine zu finden.^[117,118]

Für die Organisation der entstehenden PSD-Protein-Netzwerke konnte bereits eine Vielzahl an Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden.^[116,118,119] Unter anderem sind auch die Proteine SynGAP (Abbildung IV-2) und PSD-95 in der postsynaptischen Dichte, also in proteinreichen zellulären Kompartimenten unter der postsynaptischen Membran in einem nahezu stöchiometrischen Verhältnis vorhanden.^[120] SynGAP ist ein GTPase-aktivierendes Protein, welches durch die spezifische Bindung an PSD-95 hauptsächlich in der PSD vorzufinden ist.^[121,122] Es ist anzunehmen, dass Mutationen von SynGAP oder PSD-95 Autismus verursachen können.^[123]

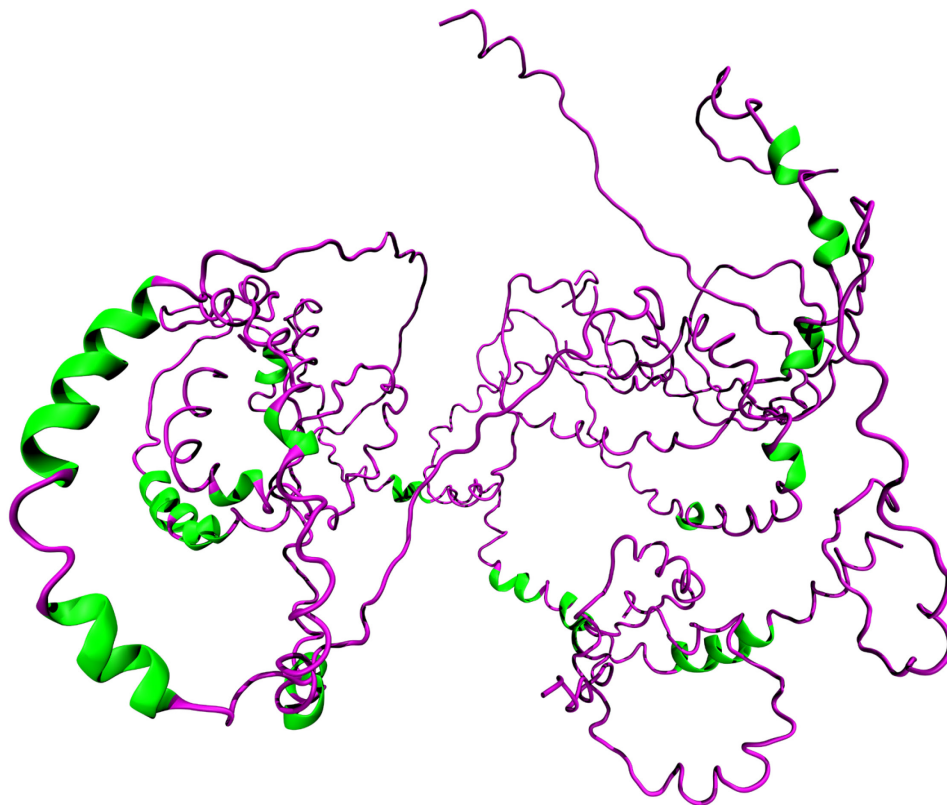


Abbildung IV-2: Bändermodell des Proteins SynGAP. Sekundärstruktur mit α -Helices (grün), β -Faltblättern (gelb) und ungeordneten Bereichen (lila). VMD-Simulation auf Grundlage der AlphaFold-ID: A0A812DFI5.

IV.2. Probenpräparation und Durchführung

Beide *Crowder* (PEG und Ficoll® 70) wurden ohne weitere Reinigung wie erhalten verwendet. Die Bestimmung der Bindungsaffinität von LAF-1 mit einer Lösung der monomeren Form des α -Syn wurde mit einem Puffer bestehend aus 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl und 5 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid) bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Bei allen weiteren Probenvorbereitungen wurde ein Puffer mit 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 5 mM TCEP bei einem pH-Wert von 7.4 verwendet. Für die Herstellung der Puffer und Proben wurde deionisiertes Wasser benutzt.

Die Expression und Aufreinigung des α -Syn wurde so durchgeführt, wie es im Kapitel III.2 beschrieben ist.

Das LAF-1 exprimierende Plasmid wurde in Zellen des *Escherichia coli* Stamms BL21 (DE3) überführt und das Plasmid wurde bis zu einer OD von 0.4 gezüchtet. Mit 500 μ g/mL IPTG wurde die Proteinexpression induziert und über Nacht bei 18 °C exprimiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in einem Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM TCEP, 10 % (v/v) Glycerin), welcher DNase und eine Proteaseinhibitormischung enthält, resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen durch Beschallung in einem Ultraschallbad lysiert und die Zelldebris wurde 30 Minuten lang bei 25.000 rpm zentrifugiert. Der gereinigte Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, mit Ni-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM TCEP, 10 % (v/v) Glycerin und 25 mM Imidazol) gut gewaschen und mit Ni-Elutionspuffer (20 mM Tris, pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM TCEP, 10 % (v/v) Glycerin und 250 mM Imidazol) eluiert. Die Fraktionen wurden mit einem Heparin-Bindungspuffer (20 mM Tris, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 % (v/v) Glycerin und 5 mM TCEP) bei Raumtemperatur verdünnt und auf eine HiTrap®-Säule geladen. Mit dem Heparin-Bindungspuffer wurde diese Säule gewaschen und in 20 mM Tris, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1 % (v/v) Glycerin und 5 mM TCEP eluiert. Glycerin wurde zu 10 % (v/v) zugegeben und die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.⁶

⁶ Die Expression und Aufreinigung des Proteins wurde von S. Möbitz (Physikalische Chemie I, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

Die konzentrierten Stammlösungen der Proteine SynGAP und PSD-95 wurde von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Mingjie Zhang zur Verfügung gestellt.⁷

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden das fluoreszenzmarkierte α -Syn-A53T-mCherry eingesetzt.

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde bei einer Temperatur von 25 °C und unter atmosphärischem Druck (1 bar) durchgeführt. Hierbei wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.3 cm verwendet. Um mittels *Steady-State*-Fluoreszenzanisotropie die Bindungsaffinität des LAF-1 mit dem monomeren α -Syn zu bestimmen, wurden 5.2 μ M LAF-1 gegen eine Lösung des α -Syn in einem Konzentrationsbereich von 0-107 μ M titriert. Die Anregungswellenlänge wurde auf 295 nm und die Emissionswellenlänge auf 344 nm eingestellt. Zur Bestimmung der Bindungsisothermen des α -Syn und SynGAP oder PSD-95 wurden Einzelpunktmessungen aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden eine Anregungswellenlänge von 295 nm und eine Emissionswellenlänge von 346 nm (SynGAP) oder 335 nm (PSD-95) eingestellt. In der SynGAP-Studie wurde die Konzentration dieses Monomers auf 11.56 μ M eingestellt, während die α -Syn-Konzentration von 0-80 μ M variiert wurde. Im Gegensatz dazu wurden für die PSD-95-Messreihe 6.86 μ M gegen 0-60 μ M α -Syn titriert. Um die Bindungskonstante K_b zu erhalten, wurden die normierten Daten mit einem 2:1 (SynGAP) oder einem 1:1 (PSD-95) Bindungsmodell gefittet.

⁷ Die Expression und Aufreinigung der Proteine wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Zhang (Abteilung für Biowissenschaften, Labor für molekulare Neurowissenschaften, Universität für Wissenschaft und Technologie Hongkong) durchgeführt.

IV.3. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um die Bildung von α -Syn-Tröpfchen sowie den Einfluss des Proteins LAF-1 auf diese Tröpfchen sichtbar zu machen. Zu diesem Zweck wurden die Proben zunächst nach zwei Tagen und dann nach sieben Tagen analysiert (Abbildung IV-3). Es hat sich gezeigt, dass das α -Syn, wie bereits bekannt, eine LLPS durchlaufen kann.^[97] Bei einem in der Lösung vorherrschenden physiologischen pH-Wert wurden zwei Tage nach der Probenvorbereitung mit 500 μ M α -Syn mikrometergroße Tröpfchen beobachtet (Abbildung IV-3.1). Bei der Alterung dieser Probe hat sich ein großes Netz von Fibrillen gebildet und auch Tröpfchen waren noch vorhanden (Abbildung IV-3.2 und .3).

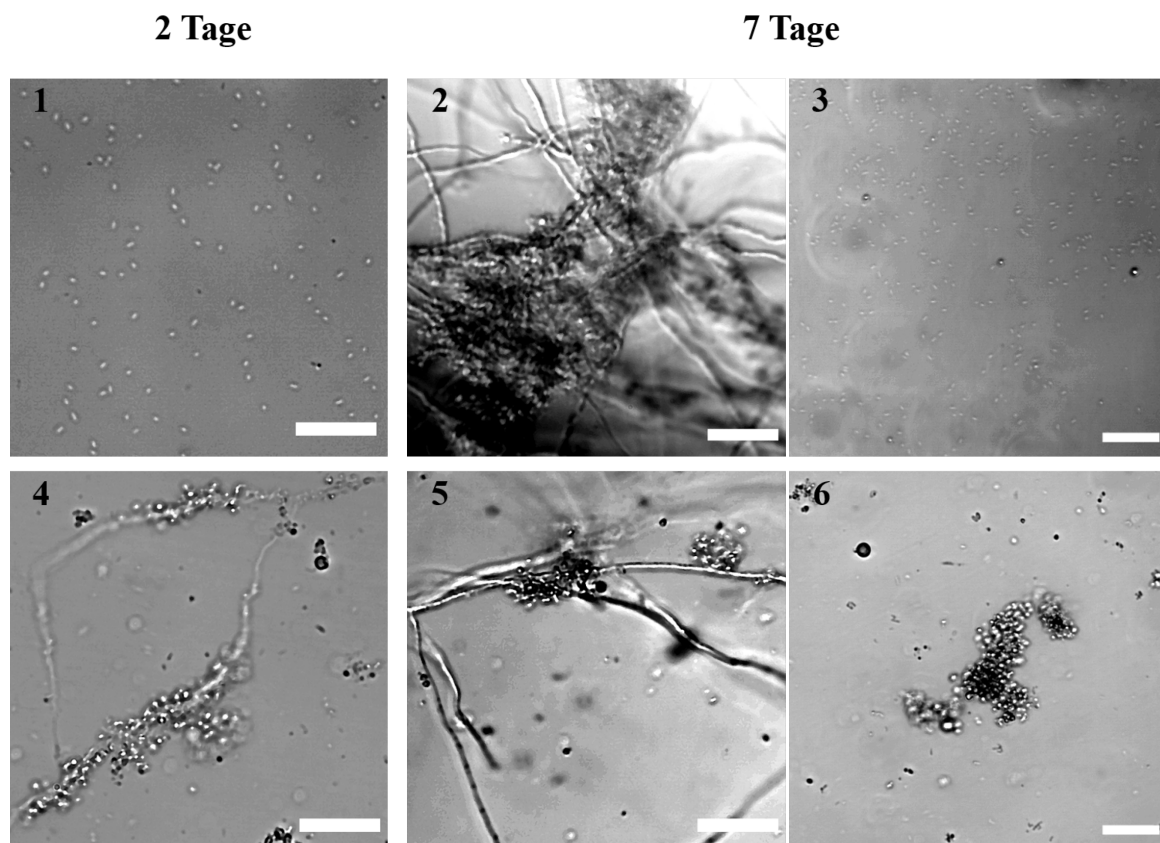


Abbildung IV-3: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μ M LAF-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation. Die Bilder wurden jeweils 2 Tage (1, 4) oder 7 Tage (2, 3, 5, 6) nach der Inkubation des α -Syn aufgenommen. Bei den Aufnahmen nach 7 Tagen wurden jeweils zwei verschiedene Bereiche aufgenommen, die das Vorhandensein von einzelnen Tröpfchen sowie von Tröpfchenclustern oder Fibrillen in Lösung zeigen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 $^{\circ}$ C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

LAF-1 ist in der Lage, die Bildung des amyloidogenen (fibrillären) Zustands des Proteins geringfügig zu hemmen, wie in den Abbildung IV-3.4 bis .6 zu sehen ist. In Gegenwart von 10 μ M LAF-1 wurde das Kondensat stabilisiert und die Reifung zum fibrillären Zustand verlangsamt. Zusätzlich wurden Kontrollmessungen durchgeführt, um die Wirkung von LAF-1 ohne das α -Syn in dem verwendeten Puffer zu bestimmen. Es zeigte sich die bekannte Tröpfchenbildung (Abbildung IV-4).^[111,124]

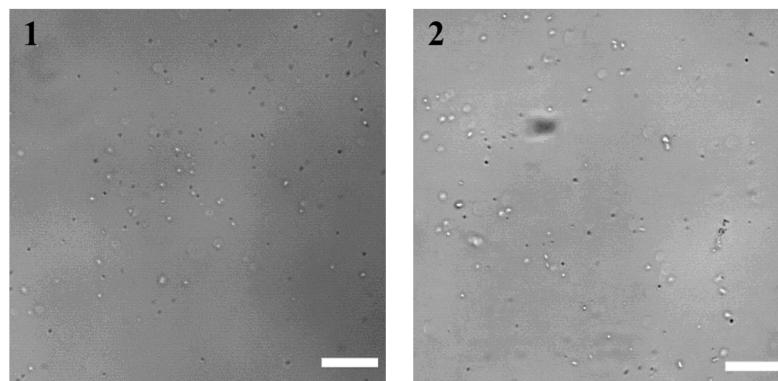


Abbildung IV-4: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen von 10 μ M LAF-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation. Die Bilder wurden 2 Tage (1) oder 7 Tage (2) nach der Probenpräparation aufgenommen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Um zu überprüfen, ob sich das Protein lediglich in der Tröpfchenphase verteilt oder ob es effizient mit dem α -Syn interagiert, wurde die Bindungsaffinität des LAF-1 zum α -Syn untersucht. Messungen der *Steady-State*-Fluoreszenzanisotropie zeigten, dass das LAF-1 nicht mit der monomeren Form des α -Syn (α -Syn_{mono}, Abbildung IV-5) interagiert.

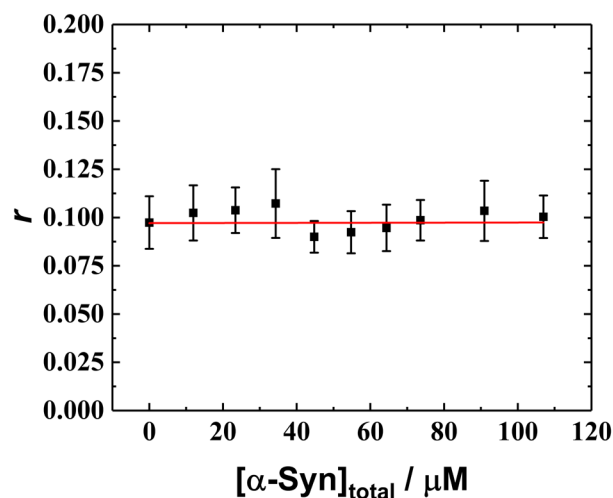


Abbildung IV-5: Bindungsaffinität des LAF-1 und α -Syn_{mono}, ermittelt durch *Steady-State-Fluoreszenzanisotropiemessungen* bei $T = 25$ °C und $p = 1$ bar. $5.2 \mu\text{M}$ LAF-1 wurden gegen eine Lösung des α -Syn_{mono} titriert. Puffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4.

Die Phasentrennung des α -Syn wird weitgehend durch eine Kombination von elektrostatischen Wechselwirkungen in der unstrukturierten N-terminalen Domäne mit hydrophoben Wechselwirkungen in der NAC-Region angetrieben.^[97] Im Gegensatz dazu wird die Phasentrennung des LAF-1 durch die ungeordnete Arginin/Glycin-reiche Domäne im N-Terminus des LAF-1 ausgelöst. Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der C-Terminus von LAF-1 für die Phasentrennung nicht essentiell ist.^[111] Die treibende Kraft für die verstärkte Fibrillenbildung des α -Syn sind die hydrophoben Wechselwirkungen der NAC-Region. In Anwesenheit des LAF-1 werden weniger intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zwischen α -Syn-Molekülen gebildet, da diese hydrophoben Wechselwirkungen dann bevorzugt zwischen LAF-1 und α -Syn gebildet werden.^[107,125] Folglich ist der hydrophobe Kern der NAC-Region des α -Syn in Gegenwart des LAF-1 nicht in der Lage, den Fibrillationsweg zu initiieren.

Da bekannt ist, dass molekulare *Crowder* einen Einfluss auf die Stabilität von LLPS-Systemen haben können, wurden zwei dieser *Crowder* eingesetzt, um eine Möglichkeit zur Beeinflussung der α -Syn-Fibrillenbildung zu finden.^[97,126,127] In Gegenwart von 10 wt% Polyethylenglykol (PEG, 4.6 kDa) bildete das α -Syn in dem untersuchten Zeitraum von sieben Tagen keine Fibrillen (Abbildung IV-6.1 bis .3). Wenn LAF-1 ebenfalls in der Probe vorhanden war, kam es zur Clusterbildung (Abbildung IV-6.4 bis .6). Dies deutet darauf hin, dass das Kondensat stabilisiert wird, die Reifung zum fibrillären Zustand jedoch drastisch abgeschwächt wird.

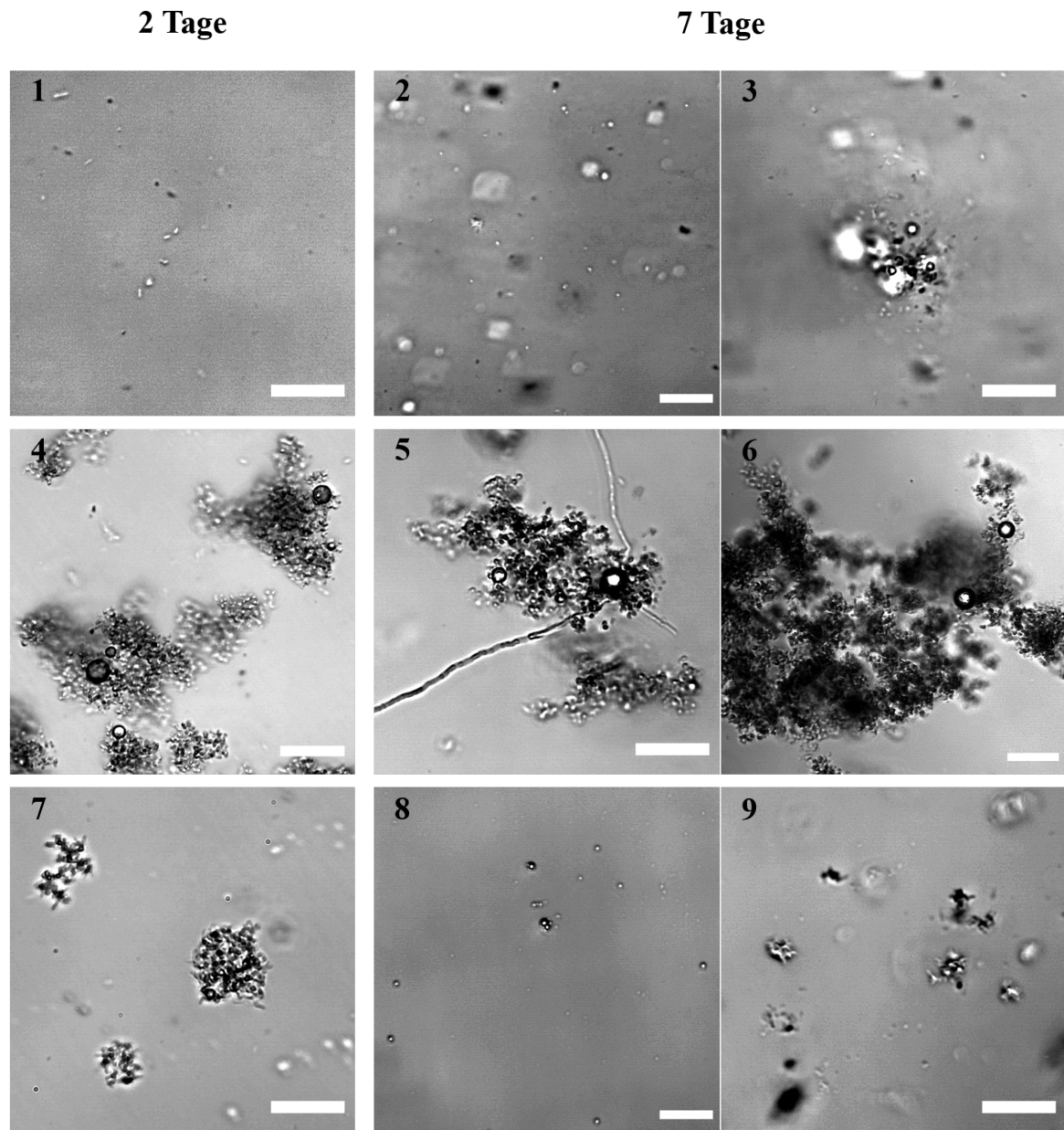


Abbildung IV-6: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn und 10 wt% PEG in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μ M LAF-1 sowie der Kontrolllösung von 10 μ M LAF (7-9) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation. Die Bilder wurden jeweils 2 Tage (1, 4, 7) oder 7 Tage (2, 3, 5, 6, 8, 9) nach der Inkubation des α -Syn aufgenommen. Bei den Aufnahmen nach 7 Tagen wurden jeweils zwei verschiedene Bereiche aufgenommen, die das Vorhandensein von einzelnen Tröpfchen sowie von Tröpfchenclustern oder Fibrillen in Lösung zeigen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

In Anwesenheit von 10 wt% Ficoll® 70 bildete das α -Syn nach sieben Tagen große Cluster. Darüber hinaus waren auch einzelne Tröpfchen vorhanden (Abbildung IV-7.1 bis .3). In der Probe zusammen mit LAF-1 war diese Clusterbildung stärker ausgeprägt und er-

folgte schneller (Abbildung IV-7.4 bis .6). Daher scheint es sich um ein stabilisiertes Kondensat, wahrscheinlich durch den *excluded volume*-Effekt hervorgerufen, zu handeln, wobei die Reifung zum fibrillären Zustand jedoch unterdrückt wird.

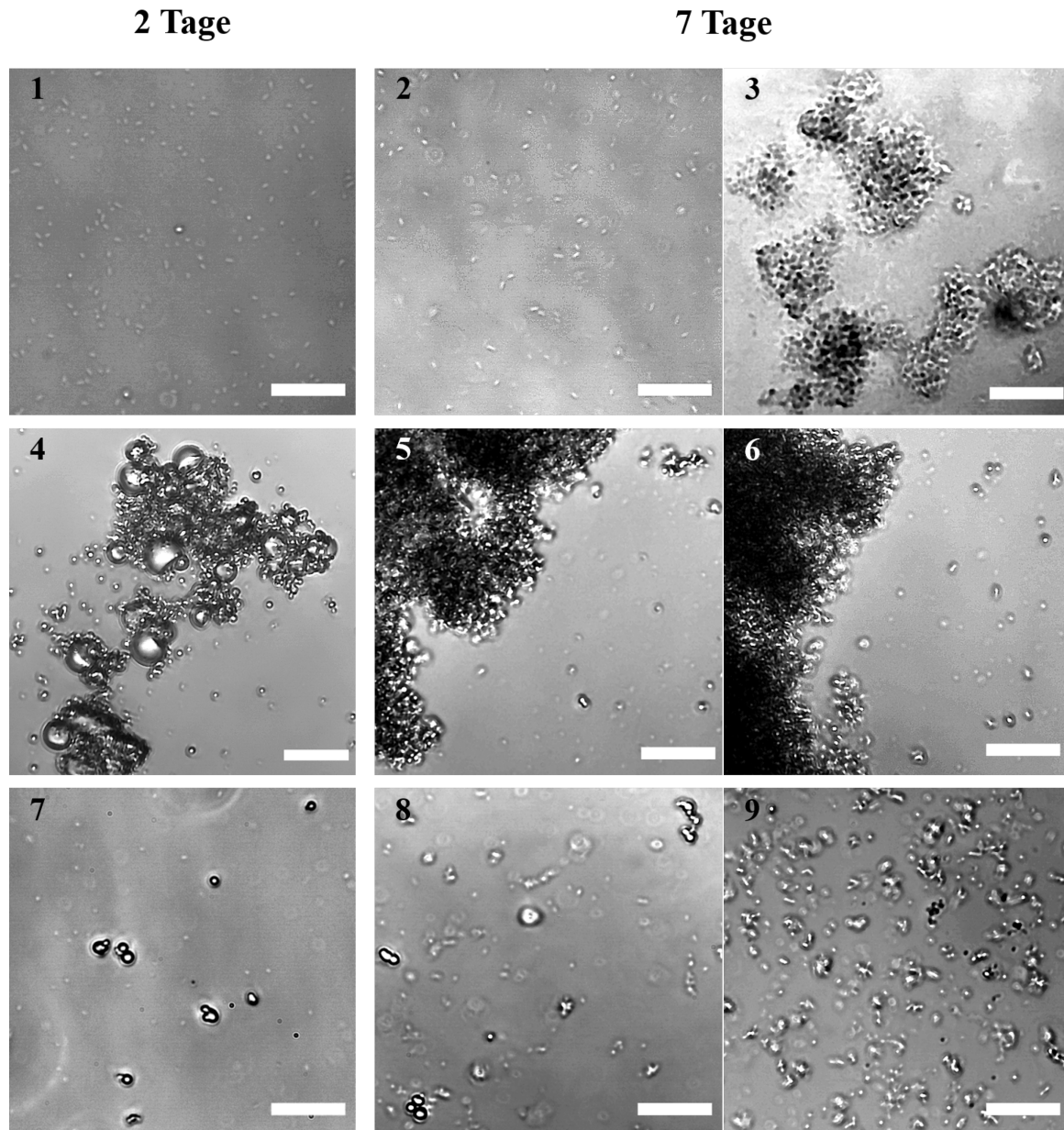


Abbildung IV-7: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn und 10 wt% Ficoll® 70 in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μ M LAF-1 sowie der Kontrolllösung von 10 μ M LAF-1 (7-9) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation. Die Bilder wurden jeweils 2 Tage (1, 4, 7) oder 7 Tage (2, 3, 5, 6, 8, 9) nach der Inkubation des α -Syn aufgenommen. Bei den Aufnahmen nach 7 Tagen wurden jeweils zwei verschiedene Bereiche aufgenommen, die das Vorhandensein von einzelnen Tröpfchen sowie von Tröpfchenclustern oder Fibrillen in Lösung zeigen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Die fibrillenbildenden Eigenschaften des α -Syn können folglich durch die beiden molekularen *Crowder* PEG und Ficoll® 70 beeinflusst werden. Nun stellt sich die Frage, ob sich monomeres und oligomeres α -Syn (α -Syn_{oligo}) in gleicher Weise verhalten. Deshalb wurden auch diese beiden Arten des α -Syn mit dem LAF-1 kombiniert. Zu diesem Zweck wurden die Proben direkt nach der Probenpräparation analysiert. Im Fall des α -Syn_{mono} gab es in Kombination mit dem LAF-1 keine Veränderung gegenüber vorher, das heißt, es bildeten sich Tröpfchen (Abbildung IV-8.1). Bei der Verwendung des α -Syn_{oligo} wurden jedoch mit LAF-1 große Cluster gebildet.

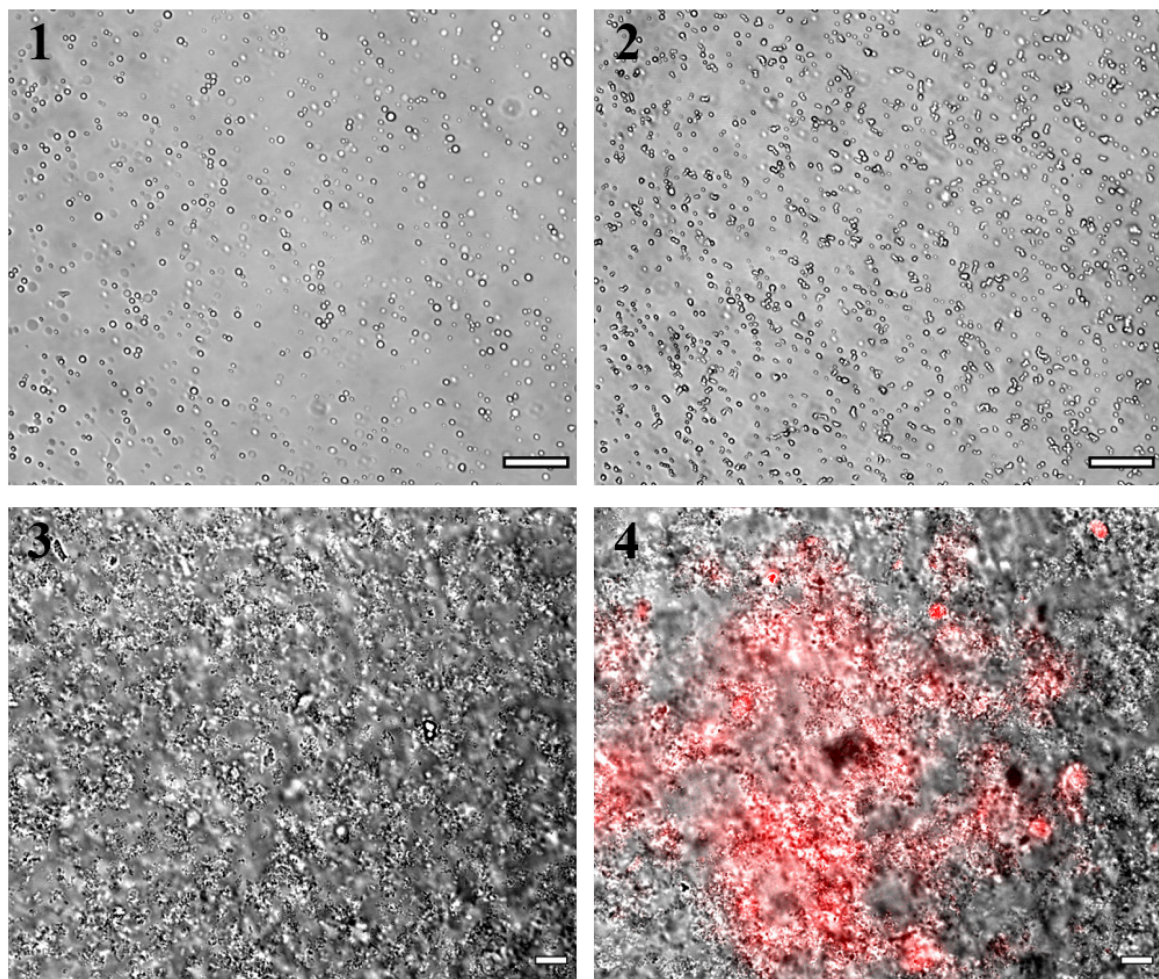


Abbildung IV-8: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit dem monomeren α -Syn (100 μ M) (1) oder dem oligomeren α -Syn (100 μ M) (3, 4) in Gegenwart von 10 μ M LAF sowie der Kontrolllösung von 10 μ M LAF (2) am Tag der Probenpräparation. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Um festzustellen, wo genau sich das α -Syn in den Clustern befindet, wurde dieser Probe zusätzlich markiertes α -Syn-A53T-mCherry zugesetzt. Auf diese Weise konnte die Lokalisation des α -Syn in den Clustern sichtbar gemacht werden (Abbildung IV-8.3 und .4). Außerdem wurde ein weiteres LLPS-System, bestehend aus SynGAP und PSD-95, auf seine Fähigkeit zur Beeinflussung des α -Syn-Fibrillierungsprozesses untersucht. Das α -Syn bildete zusammen mit SynGAP/PSD-95 große Tröpfchen, wie in der zwei Tage alten Probe zu sehen ist (Abbildung IV-9.1). Nach sieben Tagen zeigte sich, dass die Zugabe von SynGAP/PSD-95 die Bildung des amyloidogenen Zustands des Proteins hemmte, das heißt das Kondensat wurde stabilisiert und die Reifung zum fibrillären Zustand wurde verlangsamt (Abbildung IV-9.2).

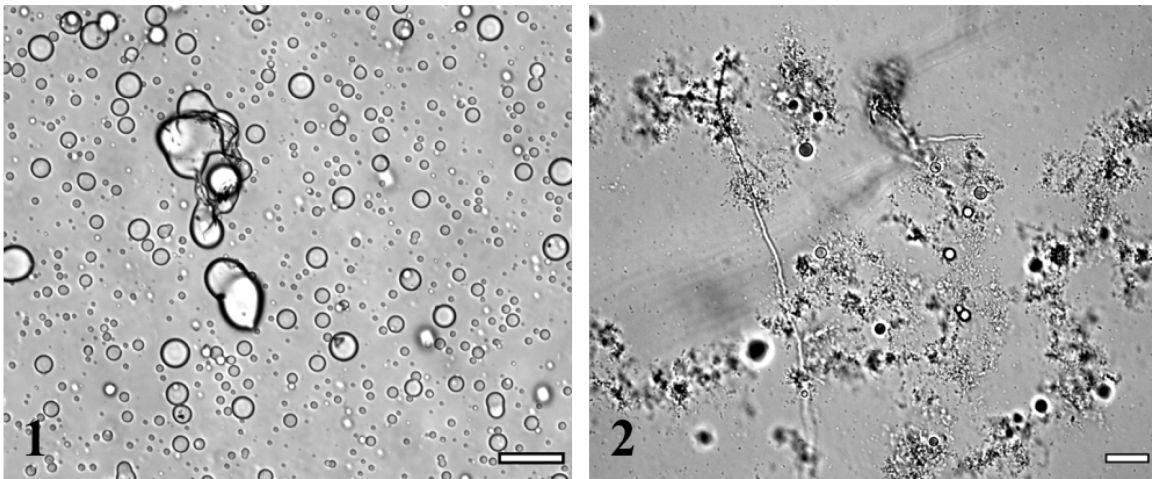


Abbildung IV-9: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn in Gegenwart von 50 μ M SynGAP/PSD-95 (1:1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation. Die Bilder wurden 2 Tage (1) oder 7 Tage (2) nach der Inkubation des α -Syn aufgenommen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Tris-HCl Puffer (150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

Um eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob PSD-95 oder SynGAP einfach in den Tröpfchenzustand übergehen oder ob sie effizient mit dem α -Syn_{mono} interagieren, wurden *Steady-State*-Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Abbildung IV-10).

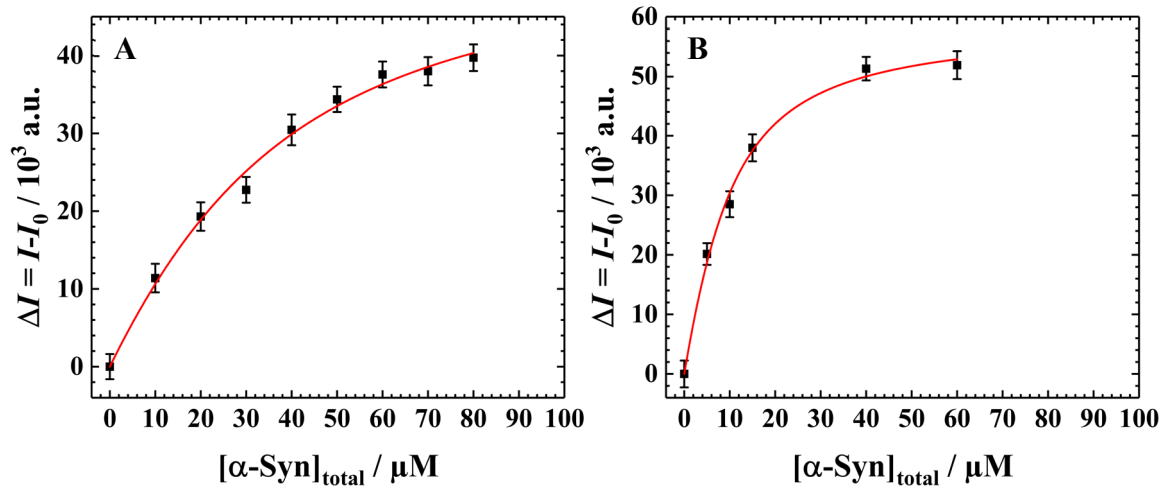


Abbildung IV-10: Normierte Bindungsisothermen für α -Syn_{mono} mit SynGAP (A) oder PSD (B) bei $T = 25$ °C und $p = 1$ bar. 11.56 μM SynGAP (Monomer) oder 6.86 μM PSD wurden jeweils gegen eine Lösung des α -Syn_{mono} titriert. Puffer: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM TCEP, pH 7.4.

Um die Bindungsaffinität des SynGAP zum α -Syn_{mono} zu analysieren, wurde ein 1:2-Bindungsmodell verwendet. Dies entspricht der Interaktion eines SynGAP-Proteins mit zwei α -Syn-Molekülen. Dabei zeigte sich, dass das SynGAP mit einer Bindungskonstante K_b von $(4.3 \pm 0.9) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ nur schwach mit dem α -Syn_{mono} interagieren kann. Die Bindungsaffinität des PSD-95 zum α -Syn_{mono} wurde mit einem 1:1-Bindungsmodell analysiert. Es ergab sich eine Bindungskonstante K_b von $(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Folglich kann auch das PSD-95 schwach mit dem α -Syn_{mono} wechselwirken.

IV.4. Zusammenfassung

Im Zuge dieses Projektes wurde eine weitere Möglichkeit gesucht, um den Fibrillierungsprozess des α -Syn zu beeinflussen. Gegenüber dem vorangegangenen Projekt wurden weitere Typen von LLPS-Systemen eingesetzt. Es zeigte sich, dass das RNA-Helikase-Protein LAF-1 den Fibrillierungsprozess des α -Syn beeinflusst, ohne dabei eine effektive Bindung einzugehen.

Durch den Einsatz der molekularen *Crowder* PEG und Ficoll® 70 wurde eine Clusterbildung induziert. Dadurch scheinen die Tröpfchenkondensate stabilisiert zu werden und eine Umwandlung in den fibrillären Zustand wurde reduziert (PEG) oder sogar verhindert (Ficoll® 70).

Wenn monomeres oder oligomeres α -Syn eingesetzt wird, zeigte sich eine direkte Tröpfchen- (α -Syn_{mono}) oder Clusterbildung (α -Syn_{oligo}), wobei sich das α -Syn_{oligo} innerhalb der Cluster verteilte.

Das LLPS-System mit SynGAP und PSD-95 konnte eine Inhibierung der Ausbildung des amyloidogenen Zustands des α -Syn hervorrufen. In dem untersuchten Zeitraum von sieben Tagen wurde das Kondensat stabilisiert und der Übergang in den fibrillären Zustand wurde drastisch verlangsamt. Bindungsstudien zeigten eine schwache Interaktion des PSD-95 und SynGAP mit der monomeren Form des α -Syn.

Insgesamt wurden im Verlauf dieses Projektes mehrere Möglichkeiten aufgezeigt, den Fibrillierungsprozess des Proteins α -Syn zu retardieren. Ähnlich wie auf der Grundlage des Projektes „Einfluss des antimikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“ kann so eventuell ein neuer Pfad zur Intervention der PARKINSON-Krankheit respektive anderer komplexer Krankheitsmechanismen gefunden werden, indem die Fibrillenbildung durch Einsatz anderer, inerter Proteinkondensate unterdrückt wird und deren Komponenten die Stabilität und Reaktivität der amyloidogenen Kondensatphase drastisch reduziert.

V. Einfluss extremer Salzbedingungen auf die Stabilität des biomolekularen Kondensats ATP/Poly-L-Lysin

V.1. Einleitung

Bestimmte Ionen wie das Perchlorat wirken bekanntermaßen als Chaotrop, indem sie die Struktur des Wassers und seine Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung stören. Daher ist eine Beeinflussung der Assoziation biologischer Moleküle und die Bildung biomolekularer Kondensate durch diese Ionen denkbar, jedoch scheint deren Bildung auch eine Voraussetzung für die Entwicklung zellulären Lebens zu sein.^[128] Neben den Perchloratsalzen sind auch Sulfate auf der Marsoberfläche weit verbreitet, während auf der Erde Natriumchlorid das vorherrschende und für die Biochemie relevante Salz ist.^[52,54,129] Um das Potenzial für protozelluläres Leben durch die Bildung von flüssigen Kondensaten biomolekularer Systeme in unterirdischen Umgebungen zu beurteilen, muss die Kombination aus starken ionischen Effekten dieser Salze und hohen hydrostatischen Drücken untersucht werden.

Da der für die Entwicklung der frühen Mikroorganismen geeignete Raum wahrscheinlich im Submikrometerbereich liegt, wie etwa im unterirdischen Bereich eisiger Welten oder in mineralischen Rissen im Meeresboden, wurde der Einfluss des *Confinements* auf die LLPS-Bildung ebenfalls in dieses Projekt einbezogen. Interessant ist dieses Projekt zudem wegen der dichten Packung im Inneren von Zellen, was zu einer makromolekularen Verdichtung führt, die alle biomolekularen Prozesse, einschließlich der LLPS-Bildung, beeinflusst.^[112,130,131]

Im Rahmen dieses Projektes wurde daher die kombinierte Wirkung von hohem hydrostatischem Druck und hohen Salzkonzentrationen, einschließlich Natrium- und Magnesiumperchlorat und -sulfat im Vergleich zu Natriumchlorid, auf die Präferenz zur Bildung flüssigkeitsähnlicher biomolekularer Kondensate untersucht.

Das ausgewählte LLPS-System bildet Flüssigphasentröpfchen (ein komplexes Koazervat) aus kleinmolekularen Komponenten wie etwa Nucleobasen und simple Peptide, welche als Grundbausteine für die präbiotische Organisation angesehen werden können. Unter Verwendung des Nucleotids Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat (ATP) in Kombination mit dem Homopeptid Poly-L-Lysin-hydrobromid (pLys), welche in der Abbildung V-1 gezeigt sind, wurden Mikrotröpfchen hergestellt. Das ATP ist eine organische Verbindung, die in allen Formen des Lebens vorkommt und Energie für zahlreiche Stoffwechsel- und

Signalprozesse in lebenden Zellen liefert. Außerdem ist es ein Vorläufer der DNA und RNA und fungiert als Coenzym. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Peptid-Nukleotid-Tröpfchen die Aufnahme kleiner Biomoleküle ermöglichen und somit als Plattformen für katalytische Reaktionen dienen können, an denen Enzyme beteiligt sind.^[132] Darüber hinaus zeigte diese Studie, dass das ATP/pLys-System die Bildung von α -helicalen Sekundärstrukturen fördert. Ein möglicher Mechanismus für die Stabilisierung der α -Helix des Peptids im Inneren des Tröpfchens ist die ATP-vermittelte Ladungsabschirmung der Lysin-Seitenketten, möglicherweise in Kombination mit der lokalen Stapelung von ATP-Anionen um die helicale Sekundärstruktur.^[132] Die Stabilisierung der α -Helix-Struktur kann auch auf den reduzierten Hydratationsgrad innerhalb der Tröpfchen zurückzuführen sein, wodurch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen im pLys begünstigt werden.

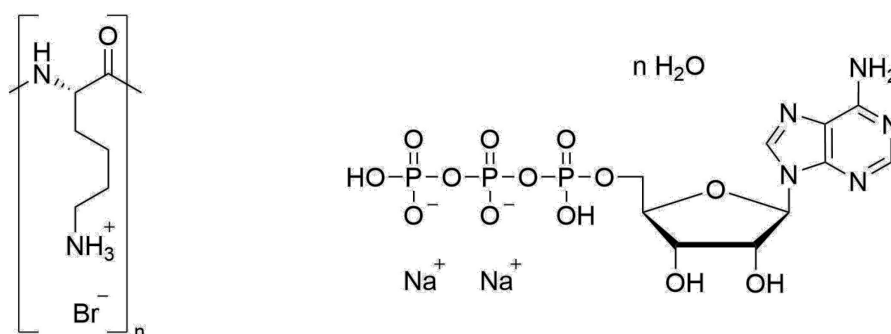


Abbildung V-1: Strukturformeln der eingesetzten Komponenten pLys und ATP zur Bildung des LLPS-Systems. Links: Poly-L-Lysin-hydrobromid, rechts: Adenosinribosephosphat-Dinatriumsalz-Hydrat.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Proteinstabilität, -dynamik und -aktivität neben der Anwendung von HHP auch durch ein drastisches *Confinement* beeinflusst werden, wurden zusätzlich die Auswirkungen der Verringerung des freien Volumens, welches dem LLPS-System zur Verfügung steht, untersucht.^[112,130,131,133–136] Im Zuge dessen wurde die Wirkung des makromolekularen Verdrängungsmittels Ficoll® 70, eines sphärozyklischen Polysaccharids mit einer molaren Masse von 70 kDa und einem hydrodynamischen Radius von etwa 4.7 nm, auf die Temperaturstabilität des ATP/pLys-Systems untersucht.^[137,138] Es wurden lichtmikroskopische Untersuchungen sowie Turbiditätsmessungen durchgeführt, um die Phaseneigenschaften des ATP/pLys-Systems zu analysieren.

V.2. Probenpräparation und Durchführung

Alle eingesetzten Verbindungen, dazu zählen die Salze NaCl, Na₂SO₄, MgSO₄, NaClO₄ und Mg(ClO₄)₂, das Poly-L-Lysin-hydrobromid (15-30 kDa), das Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat und das Ficoll® PM70, wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Zur Herstellung der pLys- (pH 7.4) und Nukleotidlösungen (pH 7.0) wurde ein 30 mM Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7.4 verwendet. Die Stammlösungen des jeweiligen Salzes wurden in dem 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) hergestellt und mit Aliquots des ATP und pLys gemischt, sodass sich die gewünschte Endkonzentration (250 mM oder 500 mM) des getesteten Salzes, eine ATP-Konzentration von 40 mM und eine pLys-Konzentration von 50 mM resultierten. Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C vorgenommen.

Nach der Vorbereitung der Proben vergingen etwa 7 Minuten, bevor das Bild bei 1 bar aufgenommen wurde. Nach etwa 20 Minuten wurde jeweils das Druckniveau von 1000 bar erreicht, die Druckentlastung war nach etwa 30 Minuten abgeschlossen.

Die temperaturabhängigen UV/Vis-Messungen wurden mit einer Auflösung von 1 nm im Wellenlängenbereich von 250-600 nm durchgeführt. Dabei wurde das LLPS durch Messung der Absorption infolge der Lichtstreuung bei 520 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.3 cm untersucht. Durch die Induktion der Phasentrennung erhöht sich die Trübung der Probe, was wiederum die Intensität (oder Absorption) des durch die Probe transmittierten Lichts verringert.^[49] Es wird angenommen, dass die Temperatur, bei der eine Diskontinuität in der Trübung aufgrund von Tröpfchenbildung auftritt, also die Trübungspunkttemperatur, mit der Temperatur der Koexistenzkurve übereinstimmt. Wenn keine Mehrfachstreuung stattfindet, ist die Trübung wegen der Streuung durch Tröpfchen von der Tröpfchenanzahldichte und dem Tröpfchenstreuquerschnitt abhängig. Dieser Querschnitt hängt von der Größe der Tröpfchen ab und kann durch eine Vergrößerung des Tröpfchenradius um mehrere Größenordnungen erhöht werden. Folglich ändert sich das Lichtstreusignal bei der Temperatur der Koexistenzkurve abrupt. Da in dem untersuchten Fall der kritische Punkt und der Bereich der spinodalen Phase weit voneinander entfernt sind, wird die hier aufgezeichnete Trübung oder Absorption lediglich durch die Tröpfchenstreuung gesteuert und hängt weitgehend von der Anzahl der gebildeten Tröpfchen und ihrer Größenverteilung ab, was wiederum ein empfindliches Maß für den Volumenanteil

der gebildeten Tröpfchen ist.^[49] Alle Untersuchungen wurden jeweils dreimal durchgeführt.

V.3. Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung V-2 zeigt das LLPS des ATP/pLys-Systems in Abwesenheit der Salze zu ausgewählten Zeitpunkten nach der Probenvorbereitung. Größtenteils hatten die ATP/pLys-Tröpfchen einen Durchmesser von unter 20 μm . Die Tröpfchen waren über den gesamten Zeitraum des Experiments (~ 30 min) stabil. Lediglich die durchschnittliche Tröpfchengröße nahm mit der Zeit leicht ab, was höchstwahrscheinlich auf die Tröpfchenfusion und OSTWALD-Reifung zurückzuführen ist.

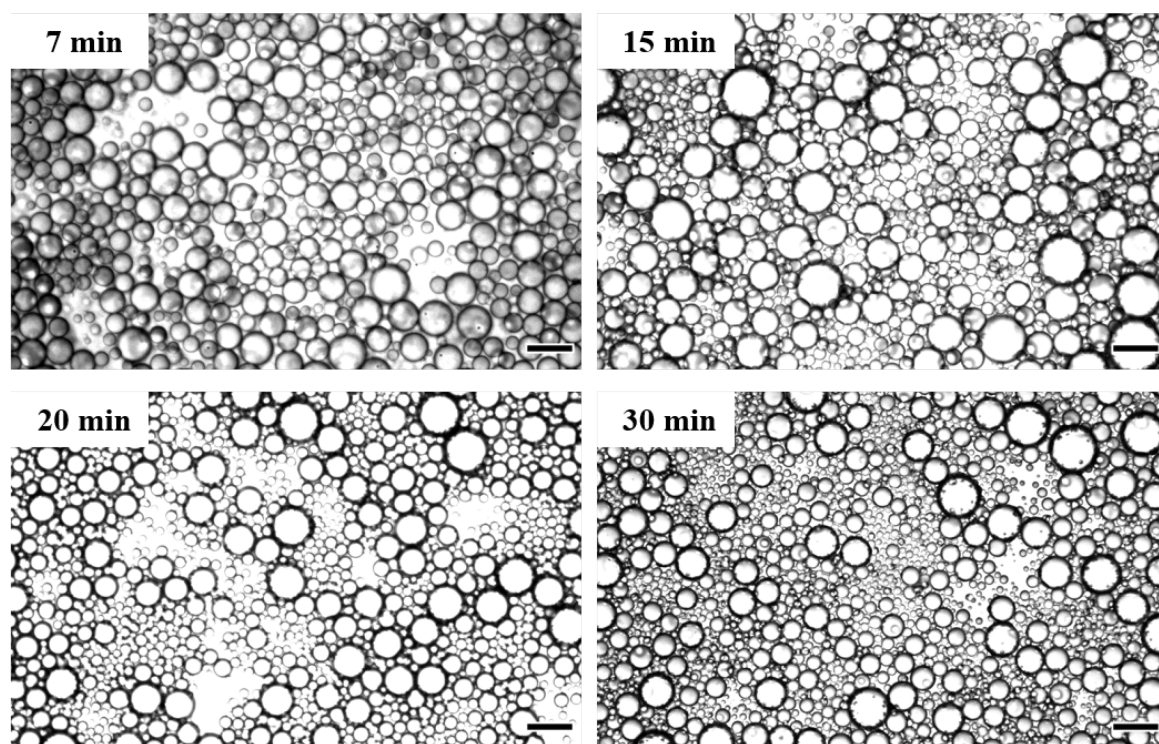


Abbildung V-2: Zeitabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 30 mM Tris-HCl-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys ohne Zugabe von Salzen zu ausgewählten Zeitpunkten nach der Probenvorbereitung (7 min, 15 min, 20 min, 30 min). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25$ °C. Die Untersuchungen wurden jeweils dreimal durchgeführt. Skalierung: 30 μm .

In der Abbildung V-3 sind die druckabhängigen Mikroskopiebilder des ATP/pLys-Systems in 30 mM Tris-HCl-Puffer bis zu einem Druck von 1000 bar zu sehen. Wie deutlich zu erkennen ist, bleibt die Tröpfchenphase auch bei dem höchsten gemessenen Druck erhalten.

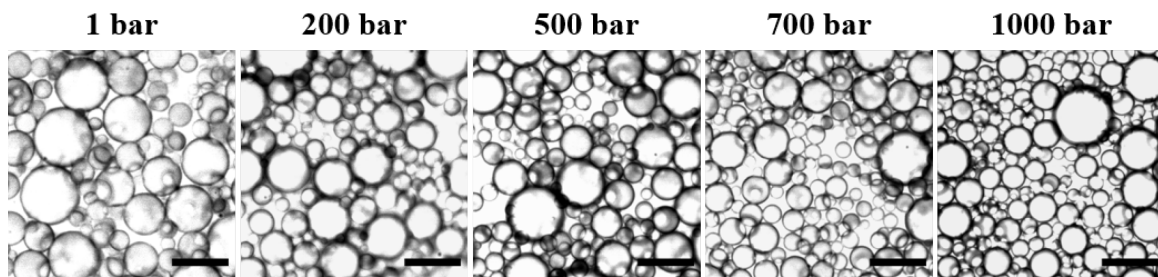


Abbildung V-3: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 30 mM Tris-HCl-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys ohne Zugabe von Salzen bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

Die Abbildung V-4 zeigt entsprechende Daten in Gegenwart des Salzes NaCl in einer Konzentration von 250 mM. In diesem Fall nahmen die Anzahl der Tröpfchen und die Tröpfchengröße bis zu einem Druck von 1000 bar deutlich ab, aber auch beim höchsten gemessenen Druck waren die Tröpfchen weiterhin beobachtbar. Im Vergleich zum Szenario in dem reinen Puffer waren die Tröpfchen generell kleiner.

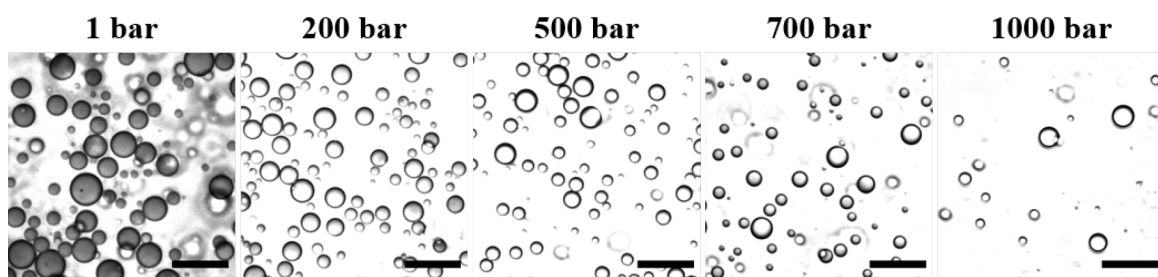


Abbildung V-4: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM NaCl-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 250 mM NaCl bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 250 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

Nach der Zugabe von 500 mM NaCl waren die Flüssigkeitstropfen nur noch bei Atmosphärendruck sichtbar; bei Drücken ≥ 200 bar waren sie nicht mehr erkennbar (Abbildung V-5). Wie diese Abbildung ebenfalls zeigt, ist dieser Prozess vollständig reversibel.

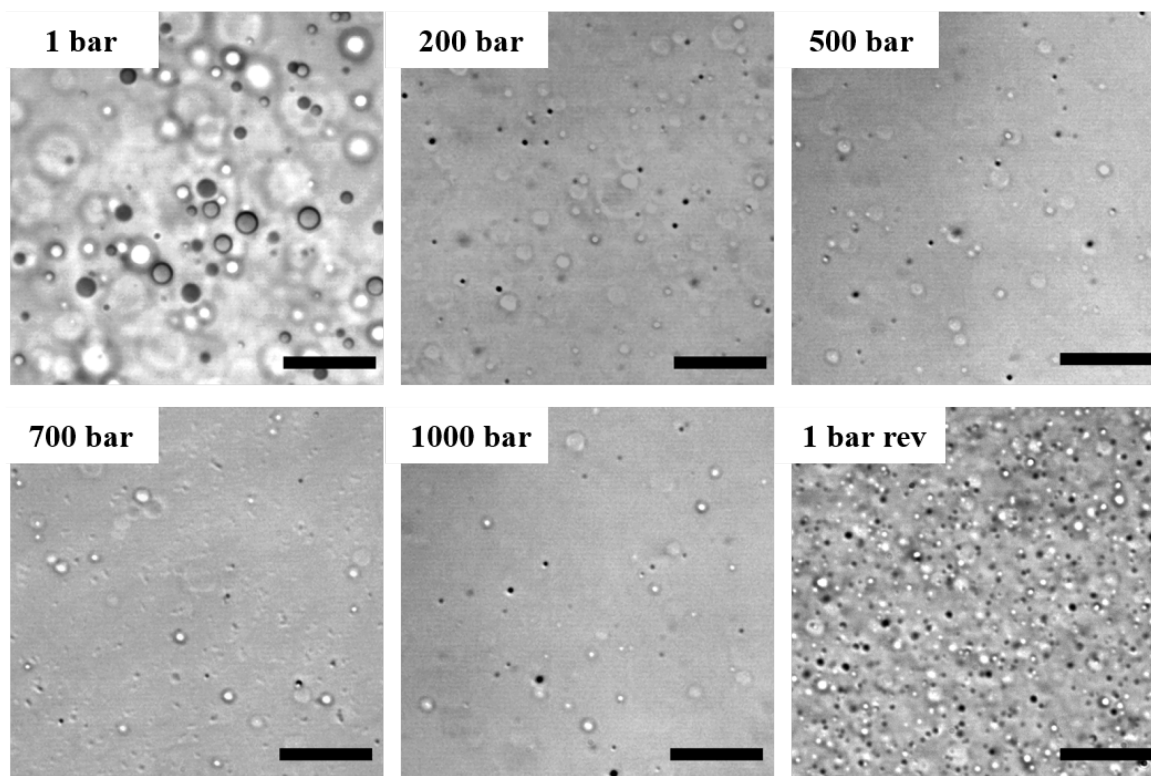


Abbildung V-5: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM NaCl bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

Die Zugabe von Sulfatsalzen (Na_2SO_4 und MgSO_4) zum ATP/pLys-System veränderte das Phasenverhalten der Tröpfchen drastisch (Abbildung V-6 bis Abbildung V-9). In Gegenwart von 250 mM Na_2SO_4 waren bei Atmosphärendruck nur wenige kleine Tröpfchen erkennbar und bei 1000 bar blieben nur einzelne Tröpfchen übrig (Abbildung V-6). Nach Zugabe von 500 mM Na_2SO_4 wurden bei allen Drücken keine Tröpfchen mehr beobachtet (Abbildung V-7). In Gegenwart von 250 und 500 mM MgSO_4 , also bei der Verwendung eines anderen Kations (Mg^{2+} statt Na^+), wurden bei allen Bedingungen keine Tröpfchen beobachtet (Abbildung V-8 und Abbildung V-9). In diesen Proben wurden über den gesamten Druckbereich Präzipitate gefunden.

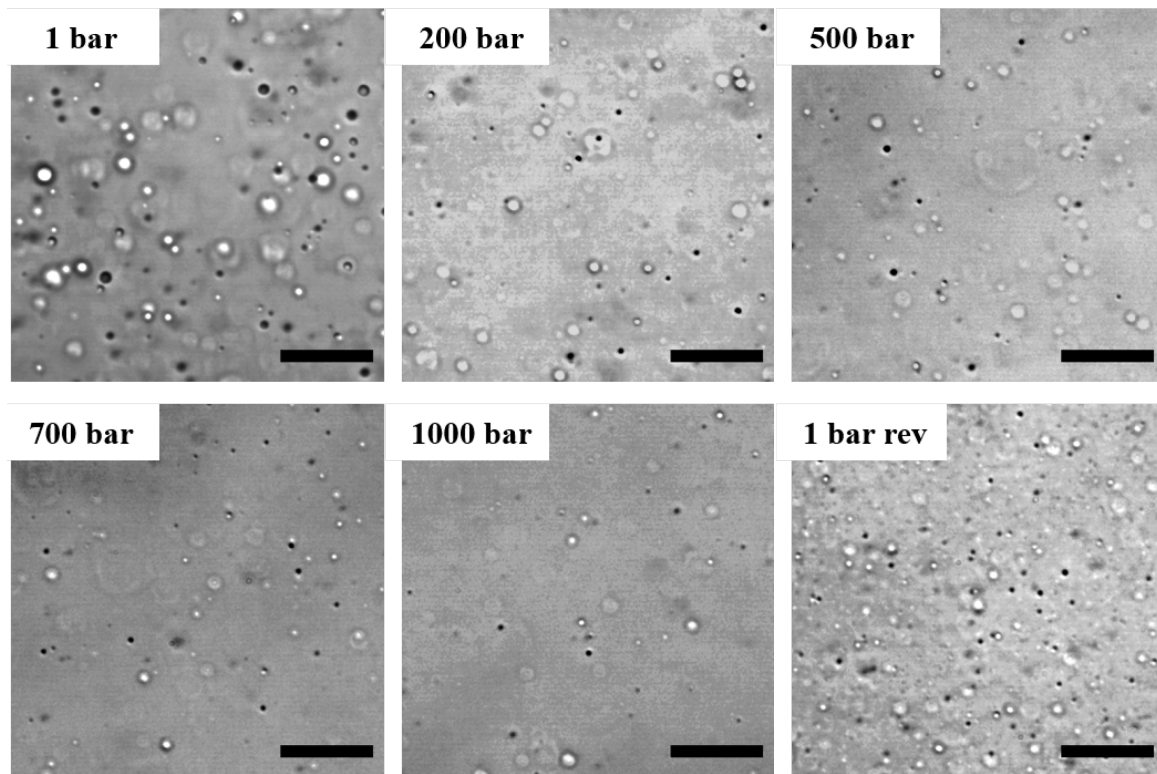


Abbildung V-6: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM Na₂SO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 250 mM Na₂SO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 250 mM Na₂SO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

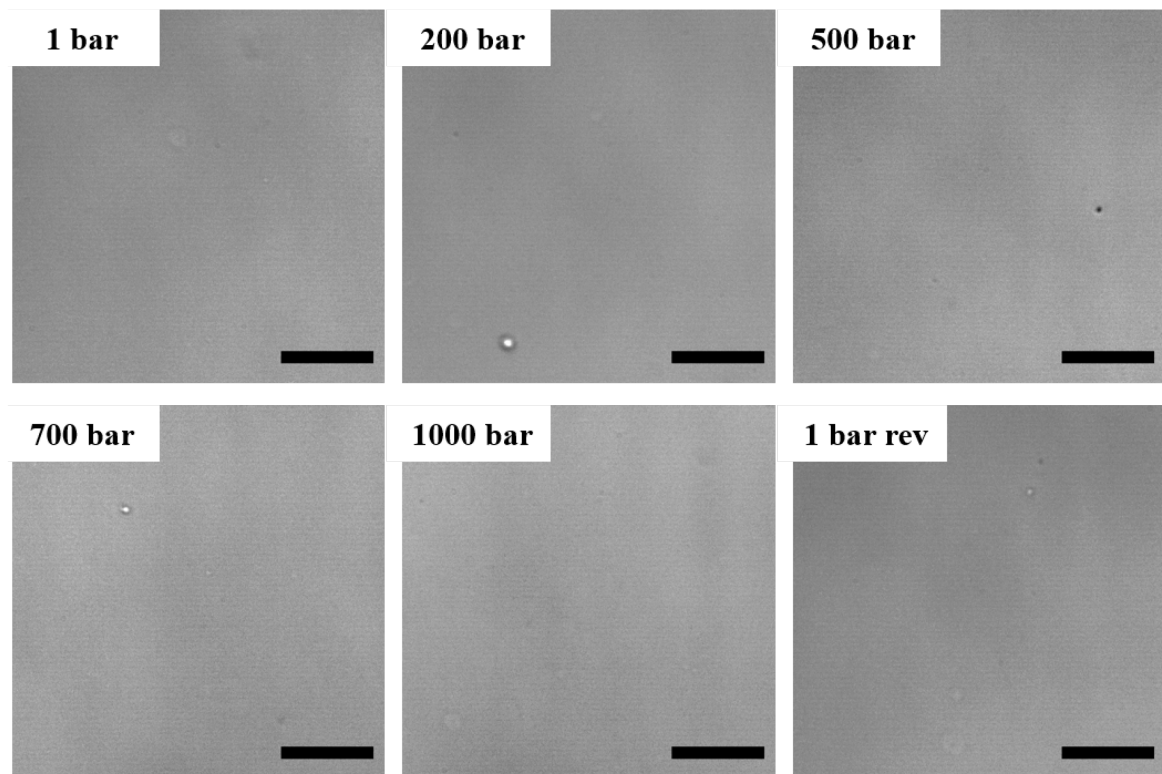


Abbildung V-7: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM Na₂SO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM Na₂SO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM Na₂SO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

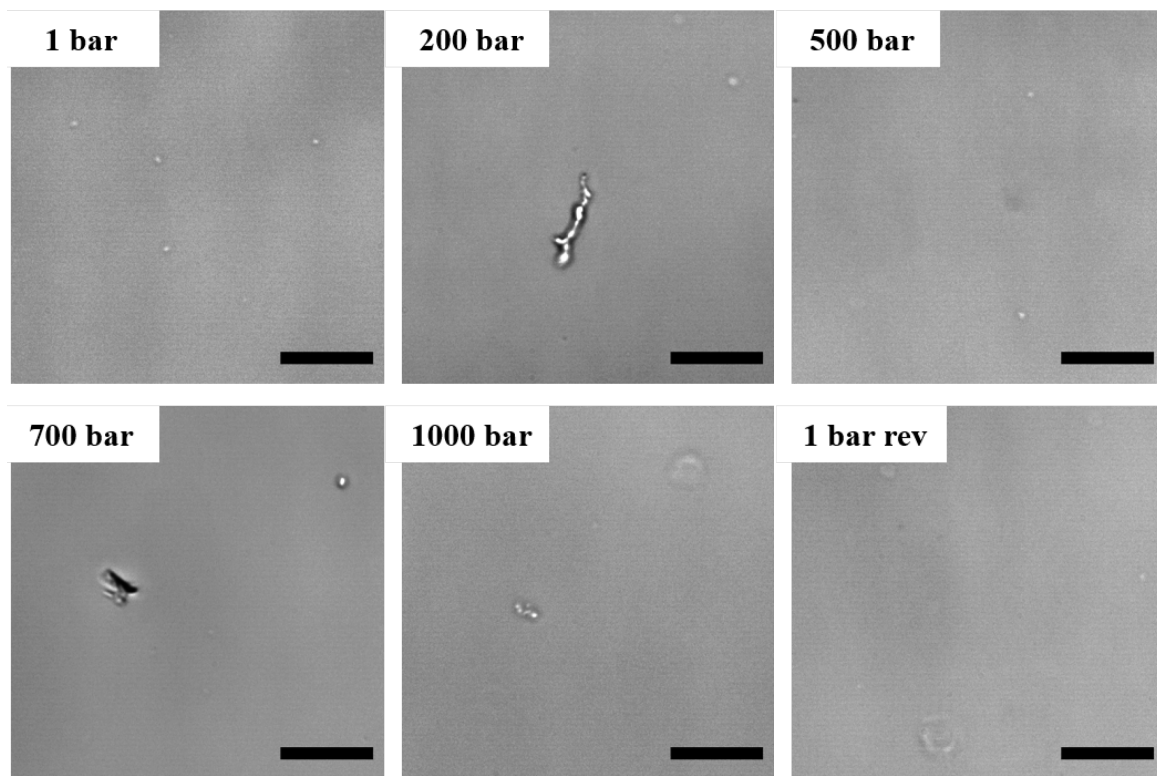


Abbildung V-8: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM MgSO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 250 mM MgSO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 250 mM MgSO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25$ °C. Skalierung: 30 μ m.

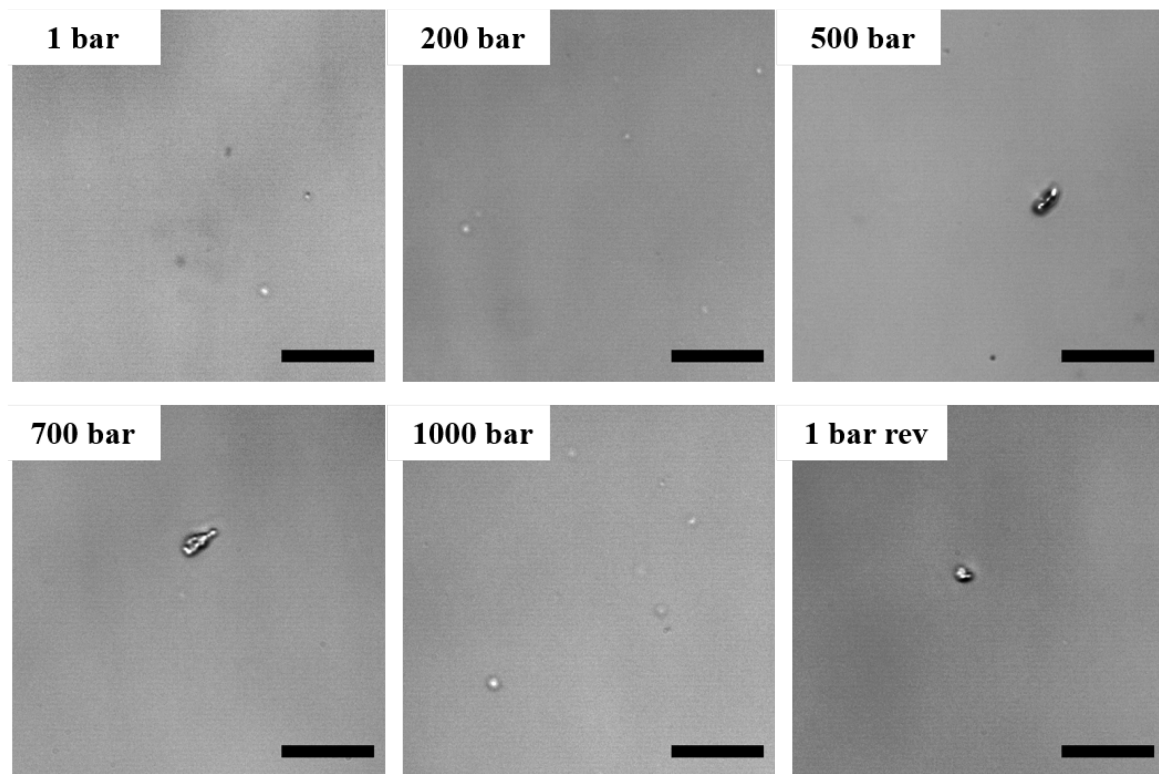


Abbildung V-9: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM MgSO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM MgSO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM MgSO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm

Bei der Verwendung von 250 mM NaClO₄ war die Tröpfchenphase noch deutlich nachweisbar; die Anzahl und Größe der Tröpfchen nahm jedoch bis zu einem Druck von 1000 bar stetig ab (Abbildung V-10). Wie ebenfalls in der Abbildung V-10 gezeigt wird, ist die Koazervatbildung vollständig reversibel. Unter dem Einfluss von 500 mM NaClO₄ nahm die Anzahl der Tröpfchen weiter ab und bei 1000 bar waren nur noch wenige Tröpfchen zu erkennen (Abbildung V-11). Bei Mg(ClO₄)₂ ist die Auswirkung des Salzes auf die LLPS sogar noch drastischer. Denn sowohl bei 250 mM als auch bei 500 mM Mg(ClO₄)₂ und einem Druck von 1 bar war die Tröpfchenphase bereits nicht nachweisbar und tauchte bei Druckbeaufschlagung nicht wieder auf (Abbildung V-12 und Abbildung V-13).

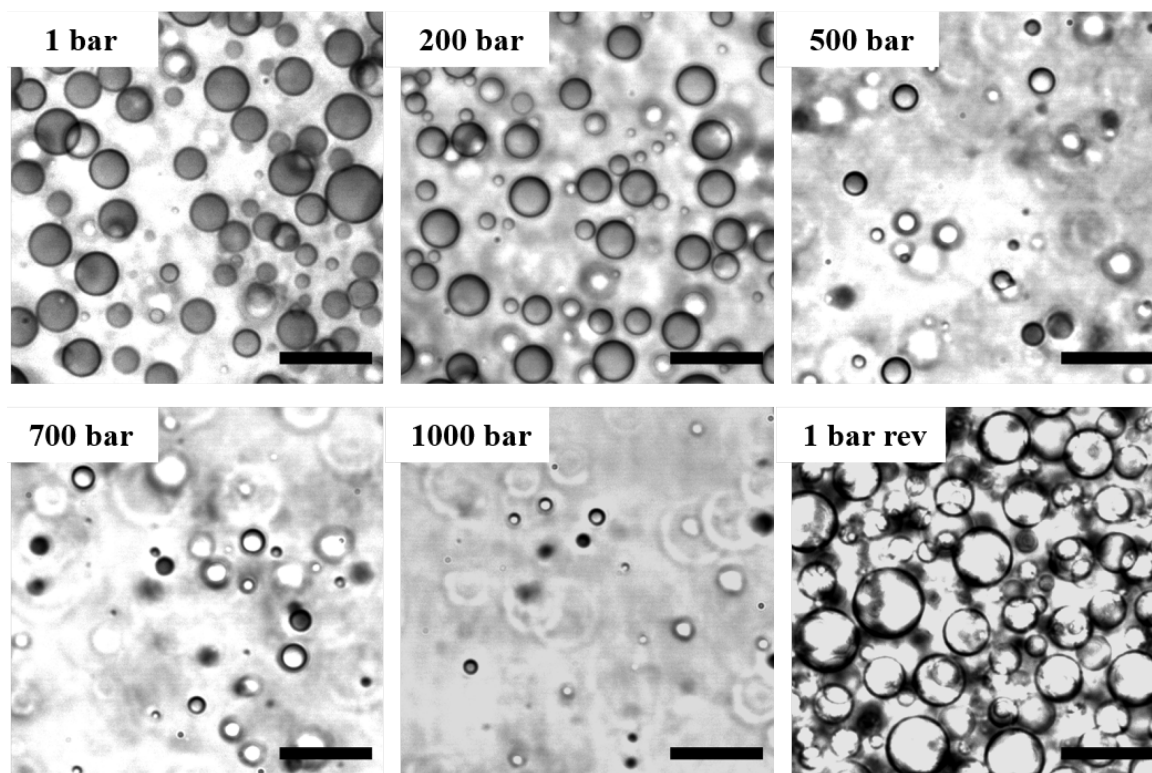


Abbildung V-10: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM NaClO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 250 mM NaClO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 250 mM NaClO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

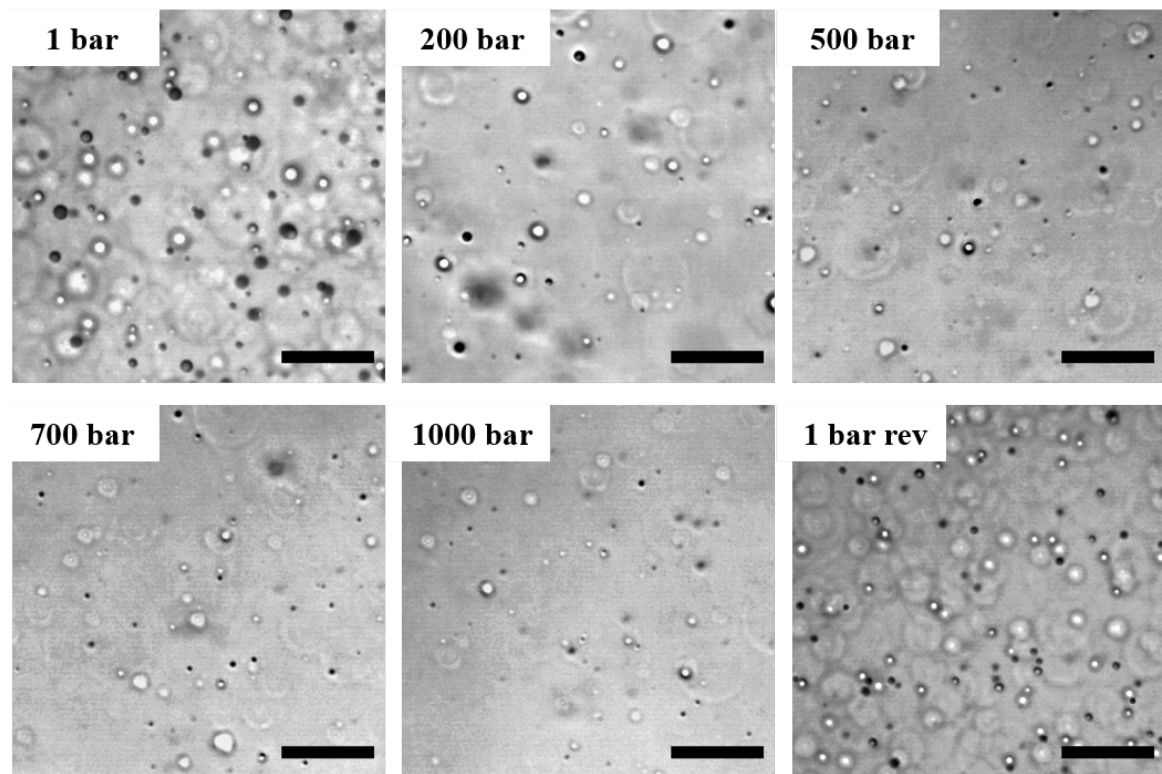


Abbildung V-11: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaClO₄-Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM NaClO₄ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM NaClO₄, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

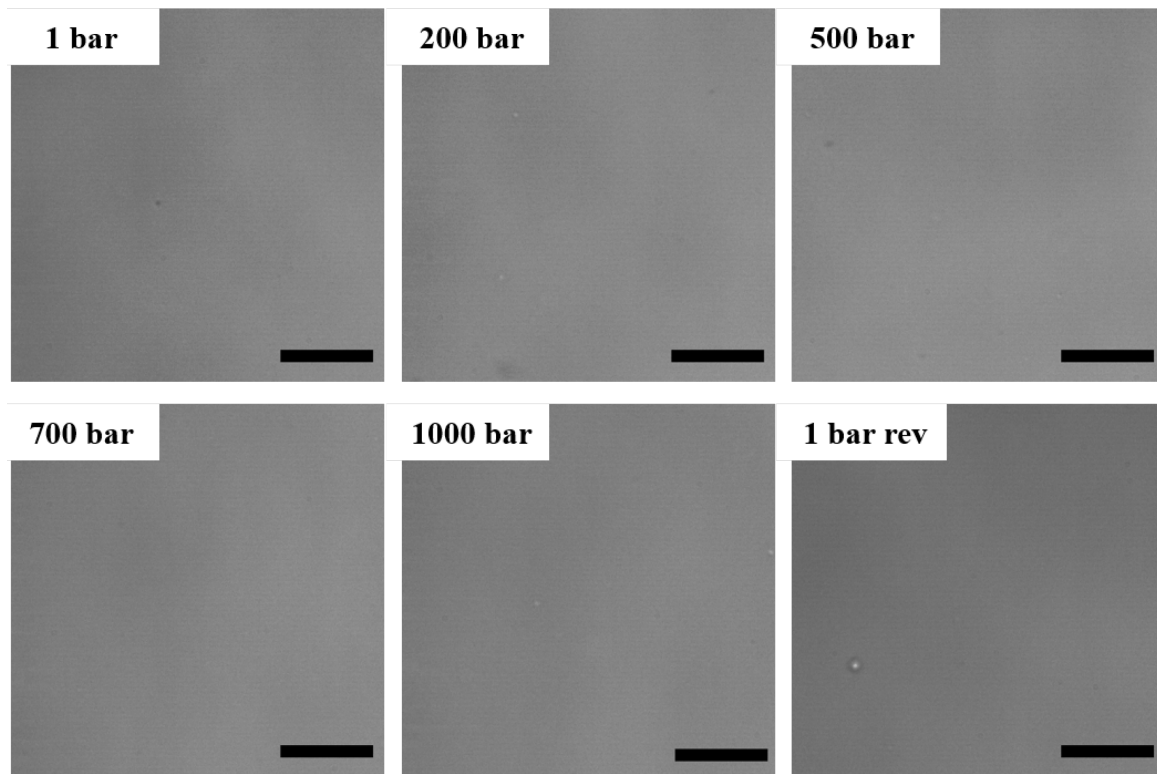


Abbildung V-12: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM $Mg(ClO_4)_2$ -Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 250 mM $Mg(ClO_4)_2$ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 250 mM $Mg(ClO_4)_2$, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25^\circ C$. Skalierung: 30 μm .

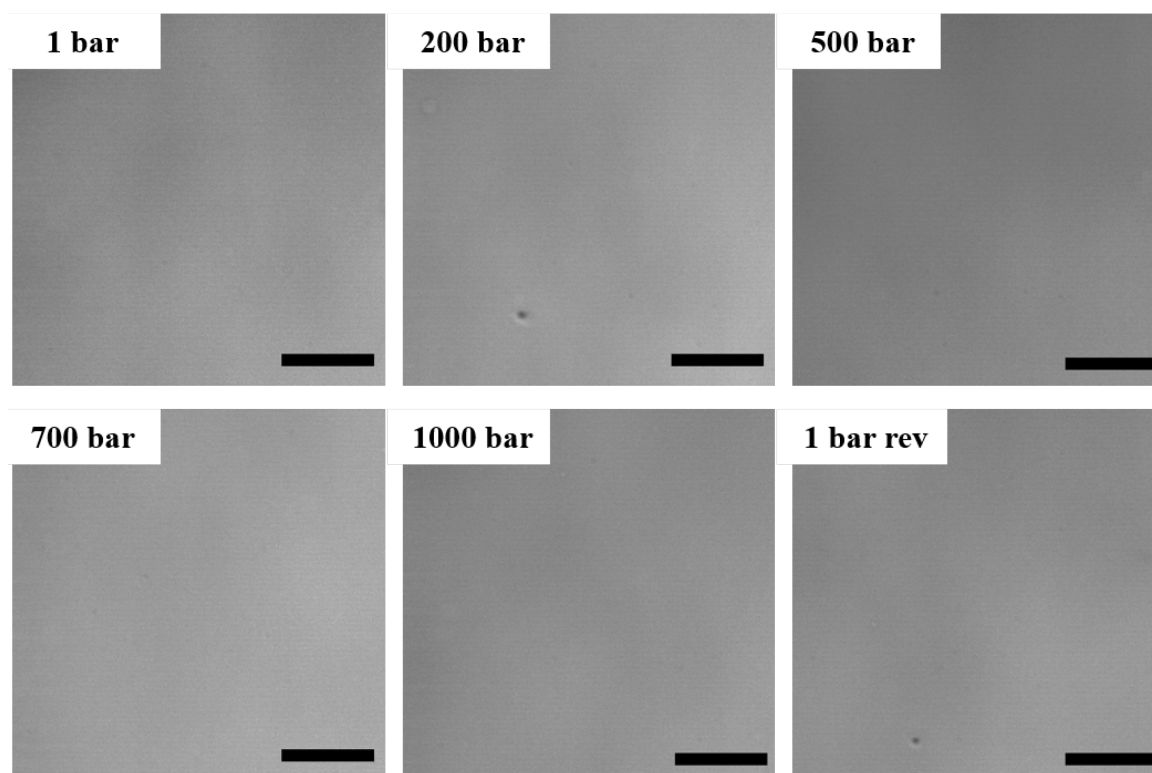


Abbildung V-13: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ -Tris-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25^\circ\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

Im Folgenden wird eine versuchsweise Deutung der Auswirkungen von hohen Salzkonzentrationen und Druck auf die LLPS-Phänomene vorgestellt. Generell gilt, dass neben hydrophobisch bedingten LLPS auch elektrostatische, Wasserstoffbrückenbindungen, Kationen- π - und π - π -Wechselwirkungen für die biomolekulare Struktur und LLPS wichtig sind. Es ist zu erwarten, dass alle diese Wechselwirkungen in unterschiedlichem Maße durch hohe Salzkonzentrationen und HHP beeinflusst werden. Neben der Druckabhängigkeit dieser verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen werden auch Überlegungen zum Porenvolumen und zu Hydratationseffekten für die beobachteten Druckeffekte herangezogen, 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.

Eine wichtige Auswirkung der Salze auf die elektrostatisch gesteuerte LLPS-Bildung dürfte die abschirmende Wirkung der positiv und negativ geladenen Seitenketten der Po-

lypeptide sein. Die klassische DEBYE-HÜCKEL-Theorie, die auf dem POISSON-BOLTZMANN-Ansatz für mittlere Felder 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, wobei die Abklinglänge, die als DEBYE-Länge λ_D bezeichnet wird, wie folgt definiert ist:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon k_B T}{4\pi q^2 c_{\text{Ion}}}} \quad (10)$$

wobei ϵ die Dielektrizitätskonstante der Lösung in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration, k_B die BOLTZMANN-Konstante, T die absolute Temperatur, q die Ionenladung und c_{Ion} die Ionenkonzentration ist. Der Term

$$l_B = \frac{q^2}{\epsilon k_B T} \quad (11)$$

wird auch als BJERRUM-Länge bezeichnet, die dem Abstand entspricht, bei dem die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Ionen in einem dielektrischen Medium mit der Dielektrizitätskonstante ϵ gleich dem Wert der Wärmeenergie $k_B T$ ist. In einer Lösung bestehend aus mehreren Ionen i mit der molaren Konzentration $c_{\text{Ion},i}$ und der Wertigkeit z_i wird die Ionenstärke I eingeführt.

$$I = 0.5 \sum_i c_{\text{Ion},i} z_i^2 \quad (12)$$

Da I eine nach dem Wertigkeitsquadrat gewichtete Ionenkonzentration angibt, ist zu erkennen, dass mehrwertige Ionen einen stärkeren Einfluss auf λ_D haben als einwertige Ionen (beispielsweise ist $\lambda_D \approx 1$ nm für ein 1:1-Salz und $\lambda_D \approx 0.5$ nm für ein 1:2- oder 2:2-Salz bei einer Ionenkonzentration von $c_{\text{Ion}} = 0.1$ M in Wasser und 25 °C).^[139–141]

Neben allgemeinen elektrostatischen Effekten können spezifische Wechselwirkungen von Salzen mit den Proteinen auftreten, die typischerweise bei hohen Konzentrationen vorherrschen und häufig im Rahmen der HOFMEISTER-Reihe diskutiert werden.^[142–145] Es wurde vermutet, dass Salze, welche in der HOFMEISTER-Reihe weiter oben stehen, die Löslichkeit von Proteinen in Lösung erhöhen, indem sie die hydrophoben Wechselwirkungen effektiv schwächen. Daher sollte auch die Bildung von Proteinkondensaten unter dem Einfluss von

Salzen höherer Ordnung aus dieser Reihe benachteiligt sein. Darüber hinaus sind stark chaotrope Anionen wie Perchlorate (ClO_4^-), welche aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der Oberfläche von Biomakromolekülen nachweislich auch als Denaturierungsmittel für Proteine wirken, ebenfalls in der Lage, die Wasserstruktur zu stören, sodass die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, einschließlich der des Wassers selbst, beeinträchtigt wird.^[129]

Die Tröpfchenphase des Zweikomponentensystems ATP/pLys wird im Wesentlichen durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Aufgrund der relativ hohen Packungseffizienz der beiden flexiblen Komponenten, denen es weitgehend an wasserfreiem Hohlraumvolumen fehlt, blieb die Tröpfchenphase sogar bis zum höchsten gemessenen Druck erhalten. Die Anzahl der Tröpfchen und die Tröpfchengröße nehmen jedoch bis zu einem Druck von 1000 bar ab, was wahrscheinlich auf eine erhöhte Anzahl und etwas größere Hohlräume in den größeren Tröpfchen und/oder auf eine Abnahme der elektrostatischen Wechselwirkungen bei Druckbeaufschlagung zurückzuführen ist.^[133–135]

Wie erwartet, verhinderte die Zugabe von Salzen die Bildung komplexer Koazervate des Systems, was höchstwahrscheinlich auf den Ladungsabschirmungseffekten des ATP und pLys durch die kationischen respektive anionischen Salzkomponenten beruht. Bei Salzlösungen, bei denen die Abschirmlänge um einen Faktor von etwa 2 im Vergleich zum NaCl verringert wurde, konnten bei allen Drücken keine Tröpfchen beobachtet werden. Durch das Ersetzen des Na^+ mit Mg^{2+} -Ionen wurde eine noch effizientere Ladungsabschirmung ermöglicht, wodurch unter allen Bedingungen keine Tropfen beobachtet werden konnten. In den Proben mit 250 mM oder 500 mM MgSO_4 wurden über den gesamten Druckbereich Präzipitate gefunden, was sich nach der HOFMEISTER-Reihe durch den starken Aussalzungseffekt des Sulfatanions erklären lässt. Unter dem Einfluss des weniger ladungsabschirmenden NaClO_4 (250 mM) war die Tröpfchenphase noch deutlich sichtbar; die Anzahl und Größe der Tröpfchen nahm jedoch bis zu 1000 bar ab. Ein solches Verhalten lässt sich mit einer Verringerung des nicht-idealen Verhaltens der Lösung und damit einer Abnahme des Exzessvolumens der Vermischung bei hohen Drücken in Verbindung bringen, was vermutlich auf einen ausgeprägten elektrostriktiven Effekt bei der Hydratation der getrennten geladenen Biomoleküle zurückzuführen ist. Ähnlich wie im Sulfatsystem führte der Ersatz des Na^+ durch Mg^{2+} in den Perchloratsalzen zum abrupten Verlust der Tröpfchenphase, welche bei Druckbeaufschlagung nicht wieder auftrat. Die marsianischen Mg^{2+} -Perchlorate und -Sulfate in hundertmillimolaren Konzentrationen verhindern folglich die

Bildung einer Tröpfchenphase für ein solches Koazervat-System, dessen Stabilisierung durch rein elektrostatische Wechselwirkungen erfolgt.

Wie aus der Abbildung V-14 hervorgeht, erhöhte der makromolekulare *Crowder* Ficoll® 70 die Druckstabilität der Tröpfchenphase deutlich. Im Vergleich zu den Daten ohne Ficoll® 70 war über den gesamten erfassten Druckbereich eine deutlich größere Anzahl von Tröpfchen feststellbar. Selbst eine *Crowder*-Konzentration von nur 5 wt% Ficoll® 70 erhöhte die T_{cloud} um etwa 6 °C (Abbildung V-15).

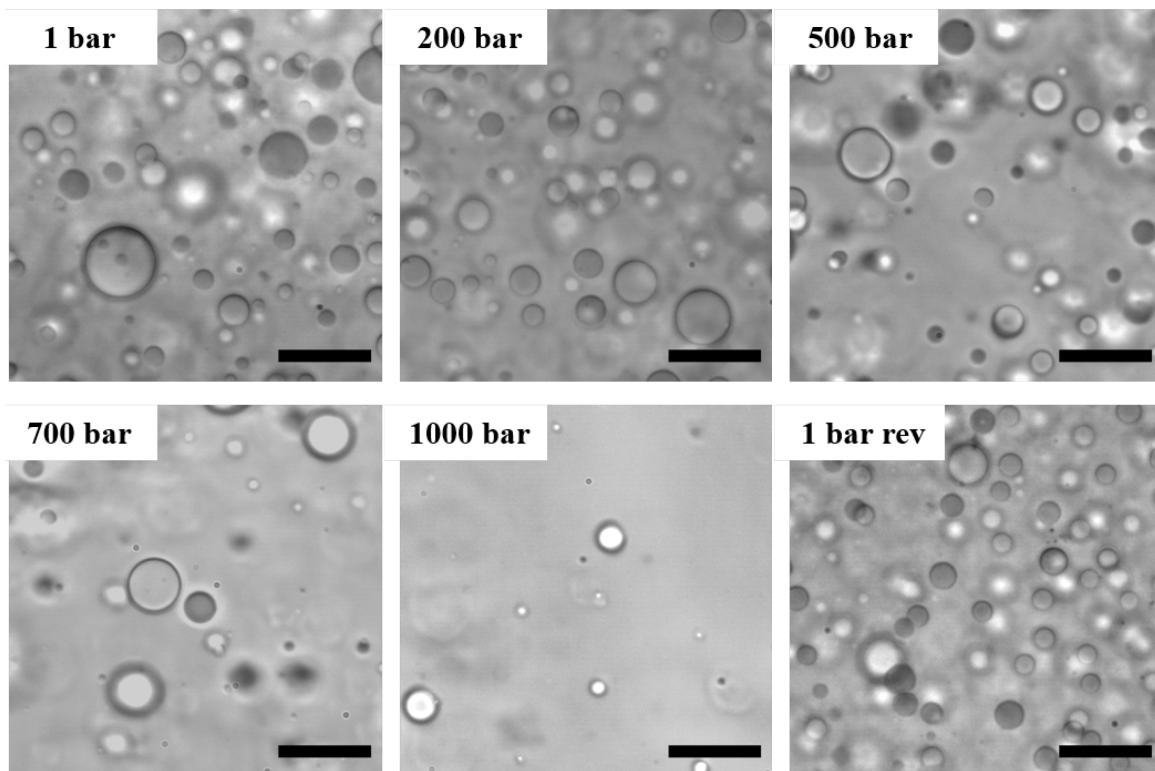


Abbildung V-14: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer mit 10 wt% Ficoll® 70. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des LLPS von ATP und pLys mit 500 mM NaCl und 10 wt% Ficoll® 70 bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 500 bar, 700 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung). Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 10 wt% Ficoll® 70, 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $T = 25$ °C. Skalierung: 30 μm .

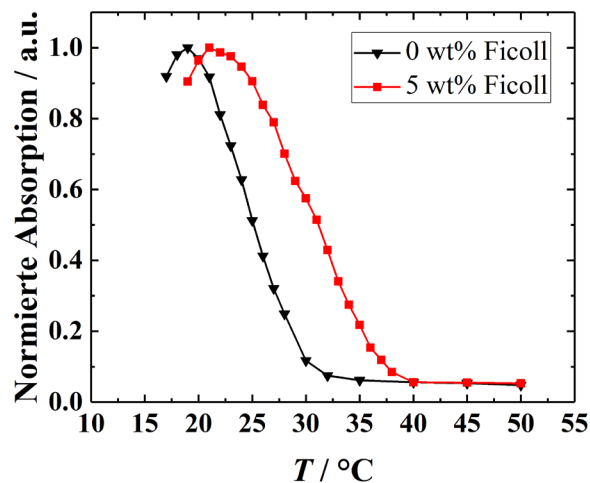


Abbildung V-15: Repräsentative UV/Vis-Absorptionsdaten (Turbidität) bei 520 nm des ATP/pLys Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer in Abwesenheit und Anwesenheit von 5 wt% Ficoll® 70 als Funktion der Temperatur. Probenzusammensetzung: 40 mM ATP, 50 mM pLys (15-30 kDa). Puffer: 500 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4; $p = 1$ bar.

Wie deutlich zu sehen ist, wird der Bereich der Phasentrennung durch den Einschluss der LLPS-bildenden Lösung des Proteins deutlich vergrößert. Kürzlich erweiterten Shimizu *et al.* die thermodynamischen Stabilitätsbedingungen für mesoskalige Bedingungen, indem sie Ideen aus der HILL'schen Beschreibung der Thermodynamik für kleine Systeme aufgriffen.^[146,147] Sie zeigten, dass das *Confinement* die Phaseninstabilität und damit die Phasentrennung selbst bei Lösungsmitteln, die im Makromaßstab perfekt mischbar sind, verstärken kann. Dies ist auf die nicht vernachlässigbare Natur des Systemvolumens zurückzuführen. Ein solches Verhalten stimmt mit den im Rahmen dieses Projektes erhaltenen Ergebnissen überein. Ein anderes Szenario kann gelten, wenn enthalpische Wechselwirkungen zwischen der Grenzfläche des einschließenden Systems und dem Protein stattfinden. In diesem Fall kann der sterische (abstoßende) Effekt des ausgeschlossenen Volumens inerte *Crowding*-Moleküle und des *Confinements* auf die Bildung von Proteinkomplexen durch attraktive Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem molekularen *Crowder* kompensiert werden.

V.4. Zusammenfassung

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die treibende Kraft für die Phasentrennung von Proteinen sowohl sensitiv gegenüber der Temperatur und dem Druck ist, als auch stark von der Art des Salzes und seiner Konzentration in der Kondensat Umgebung abhängig ist. Es ist davon auszugehen, dass bei diesen hohen Salzkonzentrationen, wie sie im Marsboden und in ähnlich rauen Umgebungen auf der Erde anzutreffen sind, attraktive kurzreichweitige Kräfte sowie hydrophobe und π -gesteuerte Wechselwirkungen das LLPS für geeignete Polypeptidsequenzen aufrechterhalten können. Die Anionen und Kationen in der HOFMEISTER-Reihe haben unterschiedliche Auswirkungen nicht nur auf die Stabilität des Proteins, sondern auch auf die Stabilität der Tröpfchenphase, d. h. auf die Lage und Form der Phasengrenze der Entmischungsregion. Auch Gegenioneneffekte können von Bedeutung sein. Diese sind bisher aber nur in geringerem Maße untersucht worden.^[143] Ferner konnte das *Confinement* die Flüssigphasentröpfchen drastisch stabilisieren, was zu einer Erhöhung der Temperatur- und Druckstabilität der Tröpfchenphase des Proteins führt. Aufgrund des abstoßenden ausgeschlossenen Volumeneffekts, der durch die einschließende Umgebung verursacht wird, werden kondensierte Tröpfchenstrukturen in solchen Situationen begünstigt. Dieser Effekt dürfte in noch stärker räumlich eingeschränkten Nischen, wie sie in Rissen in Sedimenten und unterirdischen Salzwasserpools in tiefen Seen in der Antarktis oder auf dem Mars zu finden sind, noch ausgeprägter sein und den Organismen, die solchen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, ein Fenster zur Aufrechterhaltung der Stabilität ihrer Proteinkondensate öffnen.

VI. Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase

VI.1. Einleitung

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass proteinbasierte Kondensate, die aus einer Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) resultieren, auch in der biologischen Zelle ubiquitär vorkommen und zahlreiche biochemische Prozesse, wie die Signaltransduktion, Transkription, Stressregulation und Zellteilung steuern.^[20,44,148] Flüssige Kondensate können sich als Reaktion auf Stimuli schnell bilden und auflösen, wobei die Kondensatbildung einen Mechanismus für eine hocheffiziente Regulierung der Enzymaktivität darstellt.^[22,149–151] Trotz der enormen Menge an Daten bleiben viele Fragen offen, wie unter anderem eine quantitative Beschreibung der Reaktionsbedingungen in solchen heterogenen Systemen. Sowohl bei synthetischen als auch bei natürlichen Systemen hat sich gezeigt, dass sich die kinetischen MICHAELIS-MENTEN-Parameter, genauer gesagt die MICHAELIS-Konstante K_M und die katalytische Geschwindigkeitskonstante k_{cat} , bei der Kompartimentierung in ATPS und biomolekularen Kondensaten ändern können.^[22,149–153] Die effektiven Enzym- und Substratkonzentrationen können sich in flüssigen Kondensaten in Abhängigkeit vom Ausmaß ihrer Aufnahme in das Flüssigkeitströpfchen ändern. Zudem ist die Enzymaktivität sensitiv gegenüber der Umgebung. Das Innere des Kondensats weist eine dicht gepackte Umgebung auf und hat eine dielektrische Konstante, eine Protizität, einen Hydratationsgrad und eine Ionenstärke, die sich von denen der wässrigen Volumenphase unterscheiden. Darüber hinaus hat die Tröpfchenphase eine höhere Viskosität und einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten ihrer Bestandteile, was zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt, insbesondere wenn die Reaktion diffusionsbegrenzt ist.^[112,154] Ferner kann es zu Konformationsänderungen des Enzyms und des Substrats kommen, oder anders ausgedrückt, es kann zu einer Population verschiedener Konformationssubzustände kommen, was zu einer veränderten Aktivität des Enzyms führt. Daher ist die Erforschung der Wechselwirkung zwischen Enzymen und ATPS nicht nur für die Erkundung potenzieller biotechnologischer Anwendungen von hoher Priorität, sondern trägt auch zu einem besseren Verständnis ihrer biologischen Funktionen bei. In erster Linie müssen die Phasenzusam-

mensetzung, die Verteilungskoeffizienten und die Aktivitäten (Aktivitätskoeffizienten) aller Reaktanden bekannt sein, um ein quantitatives Verständnis der gewonnenen Daten zu ermöglichen - ein Ziel, das bisher noch nicht erreicht wurde.

Mit dem Ziel, ein besseres Verständnis der physikalisch-chemischen Faktoren für die enzymatische Reaktion in ATPS zu erlangen, um solche Reaktionskammern rational gestalten zu können, wurde im Rahmen dieses Projektes eine wichtige enzymatische Reaktion in einem prototypischen wässrigen Zweiphasensystem untersucht. Das am besten untersuchte ATPS ist das Polyethylenglykol (PEG)-Dextran-System. Beide Polymere kommen auch bei der Verabreichung von Medikamenten und Genen zum Einsatz.^[153]

Eine signifikante Erhöhung der Temperatur zur Förderung der enzymatischen Aktivität führt häufig zu einer Destabilisierung oder sogar zur Entfaltung des Enzyms und zu einer Abnahme der Affinität von Substraten und Enzym. Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Prozessparameter ist der Einsatz von hohem hydrostatischem Druck (HHP), um Enzyme bei höheren Temperaturen zu stabilisieren und die Reaktionskinetik zu modulieren.^[133–135] Druck kann auch zur Kontrolle intermolekularer Wechselwirkungen eingesetzt werden und ist eine wichtige physikalische Sonde zur Veränderung der Konformationslandschaft von Proteinen, einschließlich der Population produktiver Konformationszustände. Die Konformation, Dynamik und somit die Aktivität von Biomolekülen werden durch druckbedingte Volumenänderungen beeinflusst, die hauptsächlich durch Packungs- und Hydratationsänderungen verursacht werden.^[112,133–135] Wenn sie ein kleineres Partialvolumen haben, können energetisch höherliegende Konformationszustände, deren Bildung unter Umgebungsbedingungen erschwert ist, durch Druck stabilisiert werden.^[133,134,155,156]

Obwohl Lipasen, Hydrolasen und Oxidoreduktasen vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben, besitzen nicht alle Enzyme das Potenzial für eine industrielle Nutzung. Im Rahmen dieses Projektes wurden die kombinierten Auswirkungen des ATPS PEG/Dextran und des hohen hydrostatischen Drucks auf die mittels Formiat-Dehydrogenase katalysierte Oxidation von Formiat zu CO₂ untersucht (Abbildung VI-1).^[157,158]

Die Formiat-Dehydrogenase (FDH), ein Mitglied der Familie der Oxidoreduktasen, ist von besonderem industriellem Interesse. Neben der Fähigkeit der FDH, Kohlenstoffdioxid zu recyceln, können als Substrat kostengünstige Formiatsalze eingesetzt werden. Außerdem kann das produzierte NADH in Kaskadenreaktionen weiterverwendet werden.^[158] Das Enzym, die Formiat-Dehydrogenase, liegt als Homodimer vor und kann zwei Moleküle des NAD⁺ zur selben Zeit katalysieren, da es zwei aktive Zentren besitzt, wie in der Abbildung

VI-2 zu sehen ist. Die Abbildung VI-3 verdeutlicht die Anordnung des Substrats NAD^+ in einem dieser aktiven Zentren der Formiat-Dehydrogenase. Es ist anhand der Oberflächendarstellung festzustellen, dass das Substrat in das aktive Zentrum des Enzyms eintaucht und nur ein geringer Teil des NAD^+ bei der Bindung nicht mit der Oberfläche der Formiat-Dehydrogenase in Kontakt kommt.

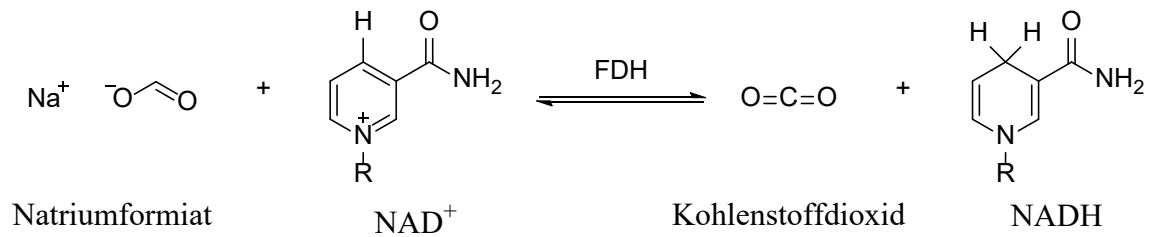


Abbildung VI-1: Reaktionsgleichung der untersuchten Oxidation von Formiat zu CO_2 und gleichzeitige Reduktion des NAD^+ zu NADH mittels Formiat-Dehydrogenase (FDH).

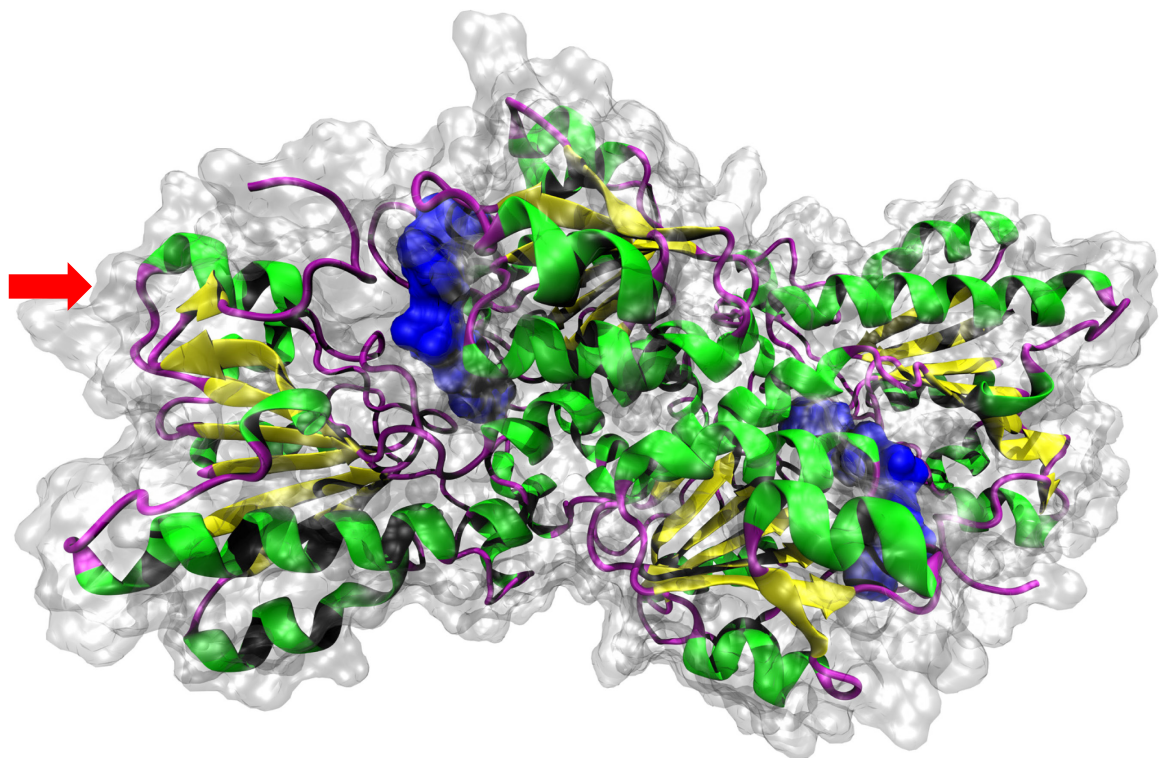


Abbildung VI-2: Bändermodell des Enzyms Formiat-Dehydrogenase (Homodimer). Oberfläche (grau) und Sekundärstruktur mit α -Helices (grün), β -Faltblättern (gelb) und ungeordneten Bereichen (lila). Zwei Moleküle des Substrats NAD^+ sind in blau (Oberfläche) gekennzeichnet. Der rote Pfeil symbolisiert die Blickrichtung auf das Substrat in der folgenden Abbildung. VMD-Simulation auf Grundlage der PDB-ID: 5DN9.

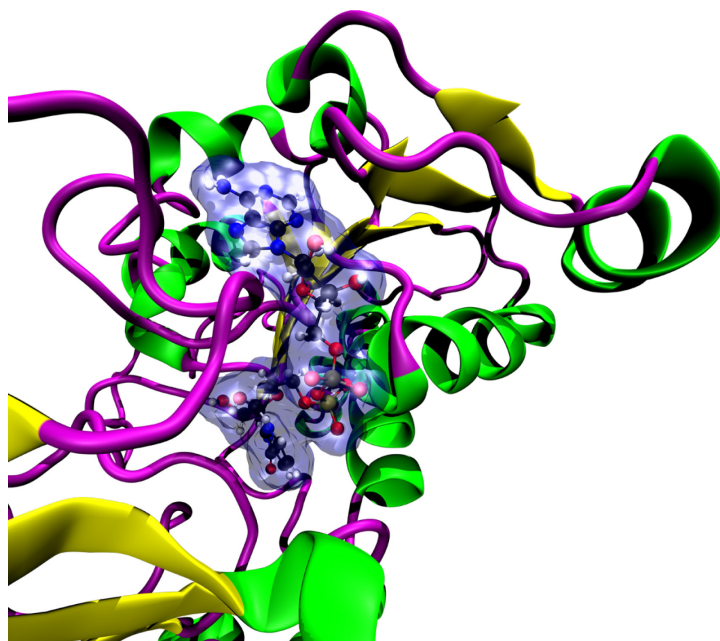


Abbildung VI-3: Anordnung eines NAD⁺-Moleküls im Bändermodell des Enzyms Formiat-Dehydrogenase (Homodimer). Sekundärstruktur des Enzyms mit α -Helices (grün), β -Faltblättern (gelb) und ungeordneten Bereichen (lila). Die Oberfläche eines Moleküls des Substrats NAD⁺ ist in blau gekennzeichnet. Innerhalb des Substrats sind die Kohlenstoffatome in schwarz, Wasserstoffatome in weiß, Stickstoffatome in blau, Sauerstoffatome in rot und Phosphoratome in braun eingefärbt. VMD-Simulation auf Grundlage der PDB-ID: 5DN9.

Die ATPS-Phasengleichgewichte und die Auswirkungen der molekularen *Crowder* Polyethylenglykol (PEG) und Dextran auf die kinetischen Parameter der FDH wurden ebenfalls durch eine thermodynamische Modellierung bewertet. Solche thermodynamischen Werkzeuge können das optimale Arbeitsfenster der katalysierten Reaktion von FDH erweitern und die Effizienz und Stabilität verbessern. Um die Konzentrationen von PEG und Dextran im ATPS zu kontrollieren, wurden die beiden Phasen zunächst mit Hilfe von „ePC-SAFT advanced“ konzipiert. Diese Zustandsgleichung ist die Elektrolytversion der *Perturbed-Chain Statistical Associating Fluid Theory*, welche ursprünglich im Jahr 2001 vorgestellt wurde.^[159] Mit dieser Gleichung werden Fugazitäts- und Aktivitätskoeffizienten vorhergesagt, indem die anziehenden und abstoßenden Beiträge der Moleküle zur HELMHOLTZ-Energie berücksichtigt werden. Anhand der Ableitungen der HELMHOLTZ-Energie ist es möglich, auf die chemischen Potentiale, welche die Berechnung des Flüssig-Flüssig-Gleichgewichts im ATPS ermöglichen, zuzugreifen. Die verwendeten Parameter sind in den Tabelle VIII-4 und Tabelle VIII-3 aufgeführt. Weitere Einzelheiten zum Modellierungsverfahren und zu den Parametern sind in bisherigen Forschungsarbeiten zu finden.^[160] Das ternäre System Wasser-PEG-Dextran wurde bislang erfolgreich für verschiedene Mo-

lekulargewichte von PEG und Dextran modelliert.^[160] Unter Verwendung der gleichen Parametersätze und der Molekulargewichte von PEG und Dextran wurde die Zusammensetzung der beiden koexistierenden Phasen für die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials vorhergesagt. Das erhaltene Phasendiagramm, die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials und die beiden in dieser Arbeit verwendeten koexistierenden Phasenzusammensetzungen sind in der Abbildung VI-4 dargestellt.⁸

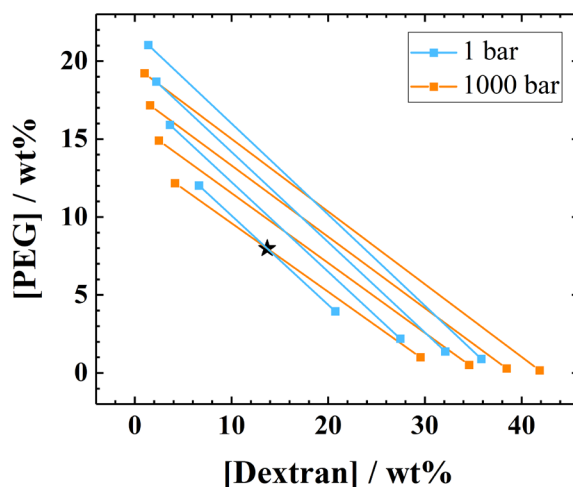


Abbildung VI-4: Mittels ePC-SAFT berechnetes Phasendiagramm des ternären Systems Wasser-PEG-Dextran. Angegeben sind die jeweiligen Gewichtsanteile. Die für die Berechnung verwendeten Parameter sind im Anhang aufgeführt. Blau: 1 bar, orange: 1000 bar, $T = 298.15$ K. Der schwarze Stern markiert die Zusammensetzung des für die ATPS-Herstellung verwendeten Ausgangsmaterials.⁹

⁸ Diese Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

⁹ Diese Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

VI.2. Probenpräparation und Durchführung

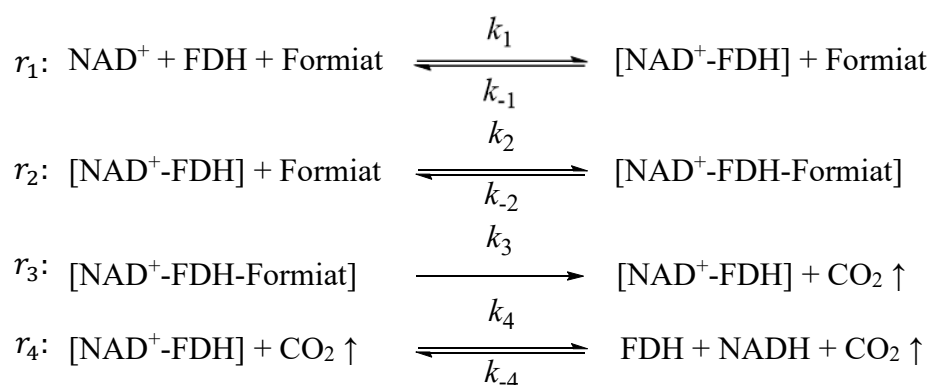
Die FDH-Stammlösung in deionisiertem Wasser wurde durch Zentrifugation (10 °C, 5000 U/min, 6 · 15 min, 10 kDa-Filter) und Lyophilisierung hergestellt. Für die anderen Reagenzien war keine weitere Aufreinigung erforderlich. Der pH-Wert des 100 mM Tris-HCl-Puffers wurde auf 7.4 eingestellt. Für die Herstellung dieses Puffers wurde ebenfalls deionisiertes Wasser verwendet. Mit diesem Puffer wurden die Stammlösungen von NADH, FDH, PEG und Dextran hergestellt. Natriumformiat und NAD⁺ wurden in der zu untersuchenden Phase (PEG-reich oder Dextran-reich) aufgelöst. Der pH-Wert der NAD⁺-Lösung wurde dann auf einen Wert von 7.4 eingestellt. Um die PEG-reiche oder Dextran-reiche Phase zu erhalten, wurde eine Lösung mit 8 wt% PEG und 13.7 wt% Dextran durch Zentrifugation (25 °C, 1500 U/min, 20 min) zur Phasentrennung gebracht. Die genauen Konzentrationen von FDH ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 49170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), NADH ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und NAD⁺ ($\epsilon_{260 \text{ nm}} = 17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.^[161–163]

Für die Messungen der Kinetik wurde ein Fluoreszenzspektrometer verwendet. Die Voraussetzung dafür ist, dass sich die optischen Eigenschaften von NADH und NAD⁺ deutlich unterscheiden. Im Absorptionsspektrum einer NADH-Lösung liegt ein Maximum bei 250 nm und eines bei 340 nm vor, während eine NAD⁺-Lösung nur ein Maximum bei 250 nm besitzt. Außerdem fluoresziert das NADH bei einer Anregung mit UV-Licht im blauen Spektralbereich, wobei eine breitbandige Emission um eine Wellenlänge von 460 nm zentriert ist.^[164] Zu Beginn der Messreihe wurden 1-4 μM NADH in dem Tris-HCl-Puffer, in der Dextran-reichen Phase oder in der PEG-reichen Phase verwendet, um eine Kalibrierung des Messgerätes durchzuführen. Denn so kann ein reproduzierbares Empfindlichkeitsniveau trotz täglich schwankender Gerätevariablen erzielt werden.^[81] Eine beispielhafte Kalibrierungsmessung ist in der Abbildung VIII-6.A zu finden. Mithilfe der dadurch erhaltenen Geradengleichung kann die Konzentration des Reaktionsproduktes NADH aus der Fluoreszenzintensität berechnet werden. Die MICHAELIS-MENTEN-Kinetik wurde unter Verwendung von 20 nM FDH, 10 mM NAD⁺ und einer Formiatkonzentration im Bereich von 1 mM bis 75 mM aufgezeichnet (Abbildung VIII-6.B). Bei allen Messungen wurde die Temperatur konstant auf 25 °C gehalten. Es wurde ein Druckbereich zwischen 1 bar und 1500 bar gewählt. FDH, Natriumformiat, NAD⁺ sowie die PEG- und Dextran-haltigen Lösungen wurden gemischt, verwirbelt und in die Probenküvette gefüllt,

welche mit einer DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und in die Hochdruckkammer gestellt wurde. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden über die Anfangsgeschwindigkeit v_0 , welche aus der Steigung der linearen Anpassung der zeitabhängigen Absorptionsdaten bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm entnommen wurde, bestimmt.

VI.3. Ergebnisse und Diskussion

Eine Lösung mit 8 wt% PEG und 13.7 wt% Dextran wurde durch Zentrifugation zur Phasentrennung gebracht. Jede Phase wurde dann separat gesammelt, um die Enzymkinetik der FDH bei der Reaktion von Formiat und NAD^+ zu CO_2 und NADH in der entsprechenden Phase zu untersuchen. Zur Verfolgung der enzymatischen Aktivität wurde hierbei die Freisetzung des Reaktionsproduktes NADH untersucht.^[165] Dabei ist zu beachten, dass die FDH-katalysierte Oxidation nach einem aus vier elementaren Reaktionsschritten (r_1 - r_4) bestehenden „bi-bi“-Mechanismus verläuft und es sich um eine Zwei-Substrat-Reaktion handelt.^[166]



Das Gleichgewicht liegt aufgrund der über 100-fach höheren Affinität des NAD^+ im Vergleich zum Formiat auf der Seite des Enzym- NAD^+ -Komplexes. Da der erste Enzym-Substrat-Komplex ($[\text{NAD}^+\text{-FDH}]$) rasch gebildet wird, kann der unter Punkt r_2 aufgelistete Reaktionsschritt als erster Schritt im MICHAELIS-MENTEN-Modell betrachtet und die Enzymreaktion mittels der Theorie nach MICHAELIS-MENTEN für eine Pseudo-Ein-Substrat Reaktion untersucht werden.^[165,167,168] Bei der Versuchsdurchführung ist darauf zu achten, dass die im Vergleich zum Enzym im Überschuss eingesetzte Konzentration des einen Substrats (NAD^+) konstant gehalten wird, während die zweite Substratkonzentration, in diesem Fall die des Formiats, variiert wird.^[165,167]

Aufgrund all dieser Vereinfachungen konnte die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung herangezogen werden, um die katalytische Konstante k_{cat} sowie die MICHAELIS-Konstante K_M zu bestimmen.^[165]

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (13)$$

In der Abbildung VI-5 sind die MICHAELIS-MENTEN-Diagramme für die durch die FDH katalysierte Redoxreaktion von NAD^+ und Formiat in reinem Puffer und in den PEG-reichen und Dextran-reichen Phasen (gemessen nach LLPS und Trennung der verschiedenen Phasen) bei unterschiedlichen Drücken und einer Temperatur von 298.15 K dargestellt.

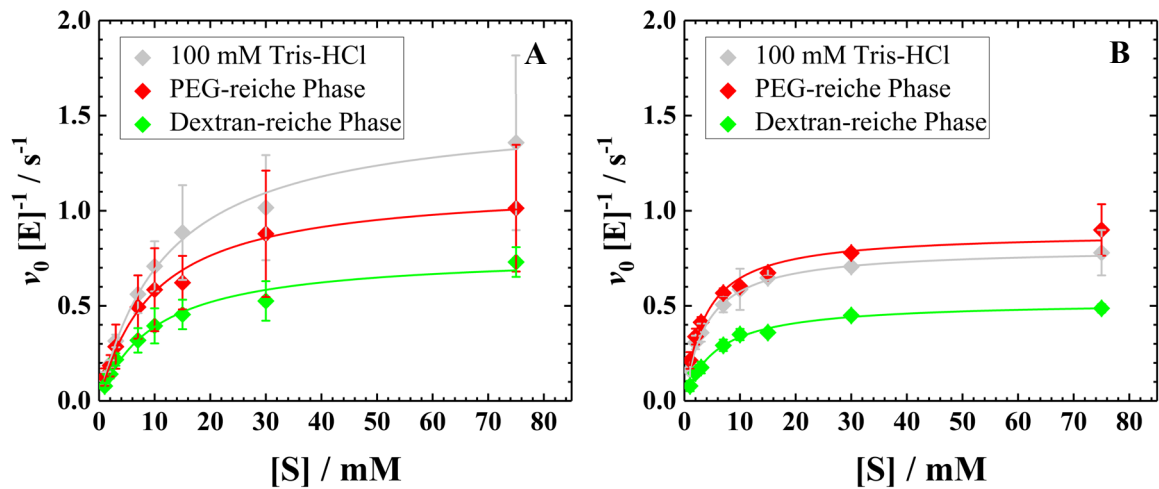


Abbildung VI-5: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat zu CO_2 bei einem Druck von 1 bar (A) oder 1000 bar (B); $T = 298.15$ K. Grau: 100 mM Tris-HCl, rot: PEG-reiche Phase, grün: Dextran-reiche Phase.

Wie aus den Werten der MICHAELIS-Konstante K_M hervorgeht (Abbildung VI-6), verläuft die Reaktion in den Dextran- und PEG-reichen Tröpfchenphasen mit einer niedrigeren K_M , also einer höheren Enzym-Substrat-Affinität und somit günstiger ab als im reinen (*Crowder*-freien) Puffer. Außerdem steigt die ES-Affinität mit zunehmendem Druck (1000 bar) noch weiter an, was ein Anzeichen für ein größeres Partialvolumen der Reaktionspartner im Vergleich zum gebildeten ES-Komplex ist.

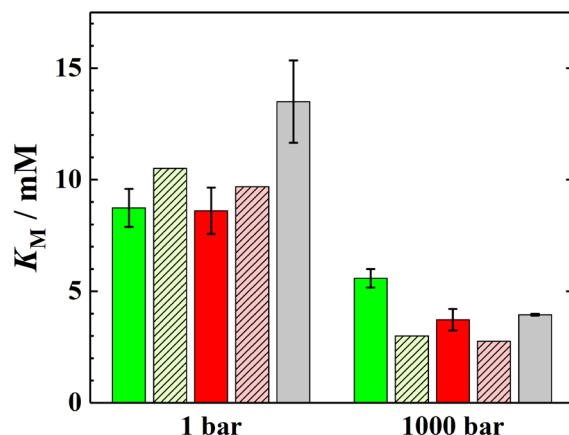


Abbildung VI-6: Vergleich zwischen experimentellen (gefüllte Balken) und mittels ePC-SAFT vorhergesagten (gestreifte Balken) K_M -Werten der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat bei 1 bar und 1000 bar. Die für die ePC-SAFT-Berechnung verwendeten Parameter sind im Anhang zu finden. Grün: Dextran-reiche Phase (19 wt% Dextran, 5 wt% PEG), rot: PEG-reiche Phase (13 wt% PEG, 5 wt% Dextran); grau: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, $T = 298.15$ K.¹⁰

Gemäß der Theorie von EYRING steht das Aktivierungsvolumen ΔV^\ddagger in Relation zur druckabhängigen Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, während die Volumenänderung bei der Bindung des Substrats an das Enzym (ΔV_b) aus der Druckabhängigkeit der MICHAELIS-Konstante bestimmt werden kann:

$$\left(\frac{\partial \ln k_{\text{cat}}}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (14)$$

$$\left(\frac{\partial \ln K_M^{-1}}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V_b}{RT} \quad (15)$$

Das Aktivierungsvolumen ΔV^\ddagger beschreibt den Unterschied zwischen dem Volumen des Übergangszustands (ES^\ddagger) und dem Volumen des Grundzustands des Enzym-Substrat-Komplexes (ES). Im Gegensatz dazu gibt das Bindungsvolumen ΔV_b den Unterschied zwischen dem Volumen des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) im Grundzustand und dem Volumen der Reaktanden im ungebundenen Zustand ($E + S$) an.^[62,165] Für die reine Pufferlösung liegen die ΔV_b -Werte bei etwa $-31 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, für die Dextran-reiche Phase bei $-13 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ und für die PEG-reiche Phase bei $-19 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, was bedeutet, dass die Volumenänderung bei der Bindung in den beiden dicht gepackten kondensierten Phasen geringer ist. Außerdem lässt sich aus den ΔV_b -Werten ableiten, dass die Reaktanden ein größeres Volumen besitzen als der Enzym-Substrat-Komplex, wodurch die Komplexbildung

¹⁰ Die ePC-SAFT Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

favorisiert wird. Ein solches negatives Bindungsvolumen deutet auf eine verdichtete Packung und eine Verringerung des Hohlraumvolumens in der Bindungsstelle des Enzyms nach der Bindung des Liganden hin. Ferner kann es nach der Bindung des Liganden zu einer internen dichteren Packung kommen, wobei das gesamte Proteinvolumen weniger fluktuiert und das partielle molare Volumen des Enzyms verringert wird.^[169] Die Abbildung VI-7.A zeigt eine gleichzeitige Abnahme der Geschwindigkeitskonstante k_{cat} in der PEG- und Dextran-reichen Phase im Vergleich zur reinen Pufferlösung, wobei sich k_{cat} bei Druckbeaufschlagung weiter verringert. Die ermittelten ΔV^\ddagger -Werte sind mit $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ für den reinen Puffer und etwa $4\text{-}8 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ für die PEG- respektive Dextran-reiche Phase leicht positiv. Allerdings ist zu beachten, dass diese Volumenänderungen sehr gering sind. Als Vergleichswert ist hier das Volumen von einem H_2O -Molekül genannt, welches etwa $18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ beträgt.^[165] Das positive Vorzeichen der berechneten Aktivierungsvolumina deutet auf ein größeres Volumen des Übergangszustandes im Vergleich zum Enzym-Substrat-Komplex hin. Dies könnte beispielsweise auf die Zunahme des Volumens im aktiven Zentrum aufgrund von Packungsdefekten oder eine Änderung der Hydratation im Verlaufe der Bindungsbildung zurückzuführen sein.^[170,171]

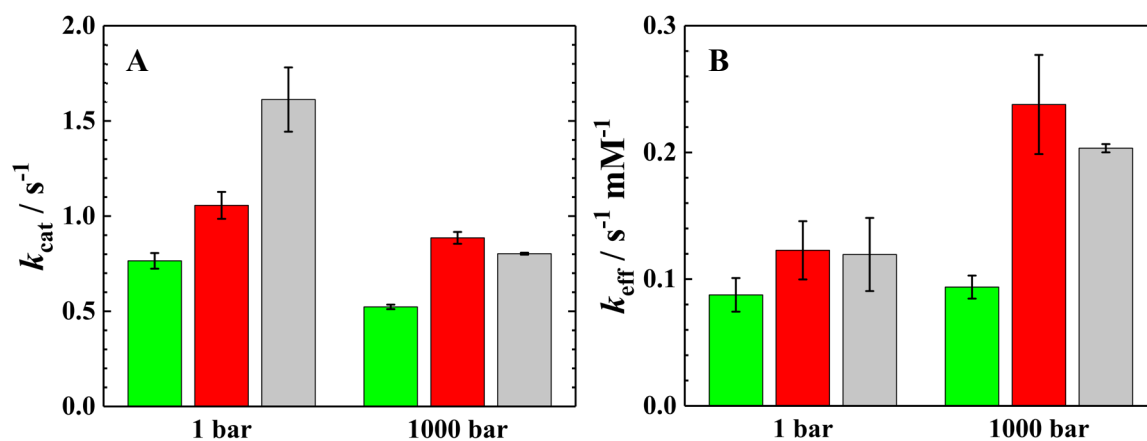


Abbildung VI-7: Vergleich der katalytischen Geschwindigkeitskonstante k_{cat} (A) und der katalytischen Effizienz k_{eff} (B) der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat in den untersuchten Puffern bei 1 bar und 1000 bar. Grün: Dextran-reiche Phase (19 wt% Dextran, 5 wt% PEG), rot: PEG-reiche Phase (13 wt% PEG, 5 wt% Dextran); grau: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, $T = 298.15 \text{ K}$.

In der Abbildung VI-7.B ist die katalytische Effizienz $k_{eff} = k_{cat}/K_M$ gezeigt. Die beste katalytische Leistung wurde für den reinen Puffer und die PEG-reiche Phase bei 1000 bar beobachtet. Die Auswirkung der Dextran- und PEG-reichen Phase auf die MICHAELIS-Kon-

stante K_M kann unter Verwendung von Aktivitätskoeffizienten als thermodynamische Deskriptoren in der aktivitätsbasierten MICHAELIS-MENTEN-Kinetik gemäß Gleichung (16) berechnet werden, wobei die klassische MICHAELIS-MENTEN-Gleichung (Gleichung (13)) in Form der Substrataktivität a_s geschrieben wird, um die Lösungsmittelabhängigkeit der kinetischen Konstanten zu eliminieren.^[160,165,172]

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} \cdot a_s}{K_M^{\text{th}} + a_s} \quad (16)$$

Unter Verwendung der mittels ePC-SAFT berechneten Konzentrationen der beiden koexistierenden Phasen wird der unendlich verdünnte Aktivitätskoeffizient von Formiat anhand der gleichen Parameter für die Gleichgewichtsberechnungen ermittelt.¹¹ Die lösungsmittelunabhängige MICHAELIS-Konstante ermöglicht zusammen mit den Aktivitätskoeffizienten der Substrate unter dem Einfluss der *Crowder*-Moleküle die Vorhersage der K_M als $K_M = K_M^{\text{th}}/\gamma_s$, wobei K_M^{th} aus dem reinen Pufferwert berechnet wird. Unter Verwendung des aktivitätsbasierten Ansatzes sagt ePC-SAFT die Abnahme von K_M , wie sie experimentell in beiden Phasen gemessen wurde, einschließlich der Auswirkung hoher Drücke, korrekt voraus, wie in der Abbildung VI-6 zu sehen ist. Anhand der ePC-SAFT-Berechnungen wird deutlich, dass vor allem PEG stark zum Aktivitätskoeffizienten von Formiat beiträgt, was die Aktivität erhöht und somit die Ligand-Enzym-Bindung fördert. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf den ausgeprägten entropiegetriebenen Volumenausschlusseffekt des PEG zurückzuführen. Das bedeutet, dass die FDH bevorzugt hydratisiert wird und der *Crowder* PEG hauptsächlich von der Oberfläche des Enzyms/Substrats ausgeschlossen wird.^[112] Ein Anstieg der Temperatur- respektive Druckstabilität zahlreicher Proteine ist ebenfalls auf diesen indirekten *Crowding*-Effekt zurückzuführen.^[112,154,173] Die Reduktion von Fluktuationen des Enzymrückgrats und die Bildung eines kompakteren und aktiveren Konformationszustands des Enzyms können mögliche Ursachen eines weiteren positiven Effekts auf die Enzymaktivität sein.^[112,174]

Für die Verringerung von k_{cat} in den dicht gepackten Kondensaten ist wahrscheinlich der Diffusionswiderstand der Reaktanden verantwortlich. Es ist hervorzuheben, dass dieser Ef-

¹¹ Diese Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

fekt durch die Verwendung von Mischungen verschiedener *Crowder* teilweise abgeschwächt werden könnte.^[165,175] Die etwas größere Diskrepanz der Werte zwischen Experiment und Theorie bei hohen Drücken ist wahrscheinlich auf eine entstehende Heterogenität der Lösung zurückzuführen, die oberhalb von etwa 600 bar auftrat, insbesondere für die Dextran-reiche Phase (Abbildung VI-8). Aufgrund dieser (unerwarteten) hohen Druckempfindlichkeit des PEG/Dextran-ATPS konnten bei höheren Drücken keine genauen Messungen durchgeführt werden. Es kam bei höheren Drücken zu einer ausgeprägten Phasentrennung der Dextran- und PEG-reichen Lösungen, woraus sich starke Fluktuationen der Lichtstreuung ergaben, welche die Lichtdurchlässigkeit der Hochdruckzelle bei den Absorptionsmessungen beeinträchtigte. Tatsächlich zeigten Hochdruckturbiditäts- und Mikroskopiedaten, dass eine homogene Dextran- und PEG-reiche Phase bei hohen Drücken nicht mehr zu erkennen ist (Abbildung VI-8 und Abbildung VI-9). Eine Überprüfung des mittels ePC-SAFT berechneten ternären Phasendiagramms bei 1 kbar (Abbildung VI-4) zeigt im Vergleich zum Umgebungsdruck tatsächlich eine Vergrößerung der Mischungslücke.

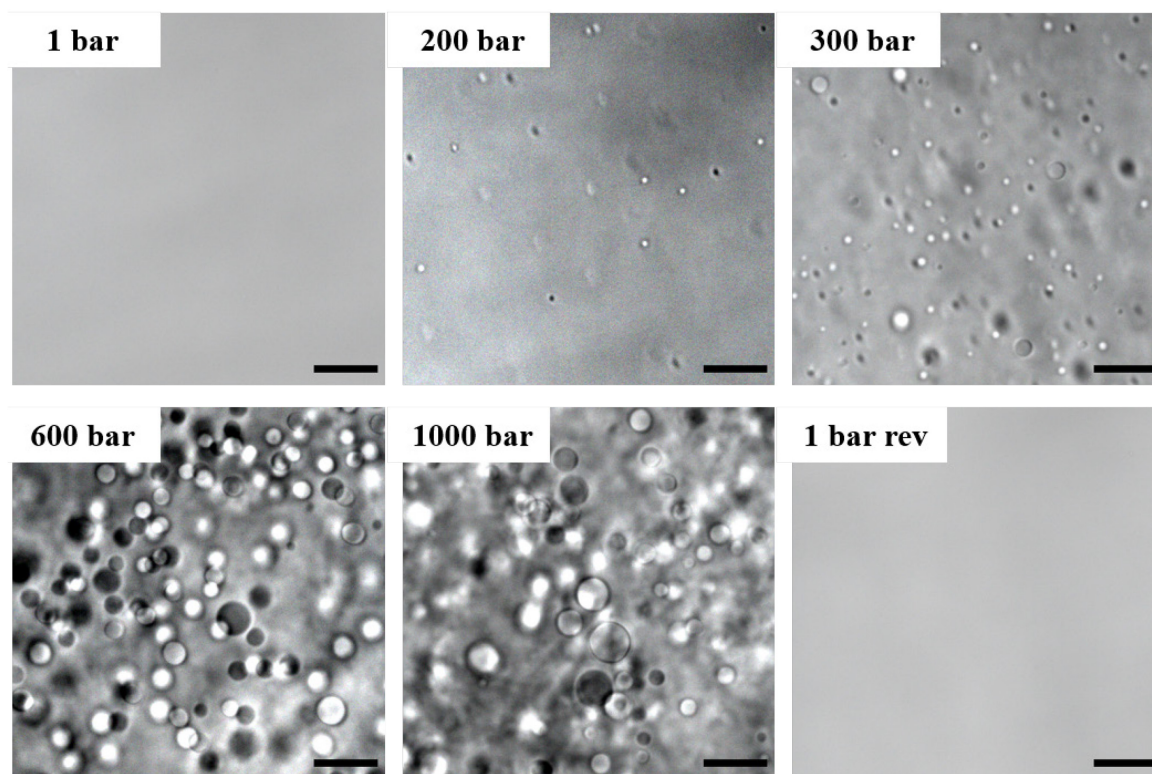


Abbildung VI-8: Druckabhängiges ATPS der Dextran-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des ATPS der Dextran-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) bei ausgewählten Drücken (1 bar, 200 bar, 300 bar, 600 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung); $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

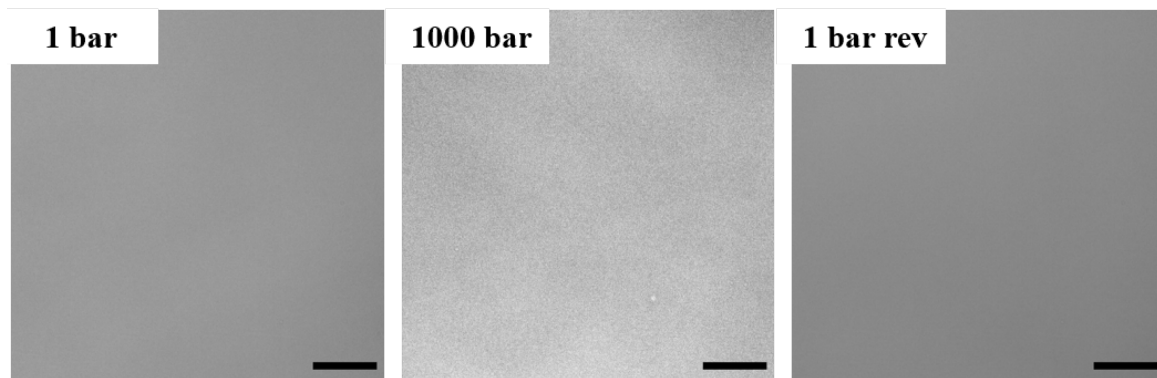


Abbildung VI-9: Druckabhängiges ATPS der PEG-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl-Puffer. Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen des ATPS der PEG-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) bei ausgewählten Drücken (1 bar, 1000 bar, 1 bar nach Druckentlastung); $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skalierung: 30 μm .

VI.4. Zusammenfassung

Alles in allem wurde hier ein aktivitätsbasierter Ansatz verwendet, um den kombinierten Einfluss des PEG/Dextran-ATPS-Systems und des Drucks auf die enzymatische Reaktion der FDH zu berechnen. ePC-SAFT war in der Lage, die K_M -Werte des Substrats in beiden Phasen bei 1 bar sowie bis zu einem Druck von etwa 1000 bar quantitativ vorherzusagen, wobei nur die aus den Phasengleichgewichtsdaten ermittelten Parameter und der in reinem Puffer bestimmte K_M -Wert verwendet wurden.

Die Verwendung von experimentellen Daten in Verbindung mit einer solchen theoretischen Beschreibung ermöglicht die Optimierung enzymatischer Reaktionen. In einem ähnlichen Thermodynamik-basierten Ansatz wurde kürzlich die Wirkung organischer Co-Lösungsmittel erfolgreich zur Berechnung von k_{cat} für homogene, verdünnte Lösungen verwendet.^[165] Die Wirkung des ATPS und Drucks auf k_{cat} , respektive die Bewertung des Aktivitätskoeffizienten des Enzyms in einem solchen dichten und komprimierten ATPS-System ist mit einem thermodynamischen Modell schwieriger zu beschreiben, da die Reaktion entweder diffusionslimitiert oder übergangszustandslimitiert abläuft.^[154,176,177] Darüber hinaus kann es zu einer Änderung der Solvation des aktiven Zentrums sowie zu einer Änderung der Konformationsdynamik des Enzyms kommen, die durch die dichte Tröpfchenphase bedingt ist. Die dicht gepackte Umgebung des ATPS kann eine aktivere Enzymkonformation, beispielsweise durch eine Reorientierung der Reste, begünstigen. Außerdem kann eine solche dicht gepackte Umgebung die Energiebarriere senken, was zu einer höheren Geschwindigkeitskonstante führt. Im Gegensatz dazu sorgt die Überführung des Enzyms in eine inaktivere Form für eine geringere Reaktivität.^[178] Im Allgemeinen werden schnelle interne Bewegungen und Konformationsfluktuationen von Enzymen durch die Umgebung, welche Kosolventien und makromolekulare *Crowder* enthält, also durch einen Prozess vom Typ *enslaving* beeinflusst, wie in der Abbildung VI-10 schematisch dargestellt ist.^[174,178,179] Die Population eines konformationellen Subzustands kann im dicht gepackten ATPS-Zustand auftreten, der unter reinen Pufferbedingungen nicht wesentlich besetzt ist. Außerdem kann die Bildung eines solchen Subzustandes die katalytische Reaktion aufgrund spezifischer geometrischer und dynamischer Merkmale der Enzymreste fördern, wodurch die Reaktion schneller in den Produktzustand übergeht. Je nach Vorzeichen der Bindungs- und Aktivierungsvolumina kann der Druck eine zusätzliche günstige oder ungünstige Wirkung haben.

Im Rahmen dieses Projektes führte die Druckbeaufschlagung zu einem Anstieg der Bindungsaffinität ($\sim 1/K_M$) und einem Rückgang von k_{cat} .

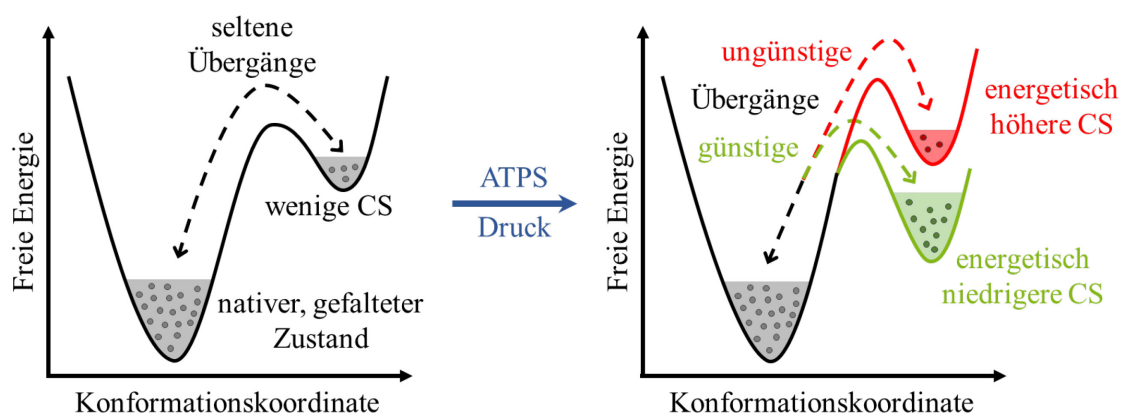


Abbildung VI-10: Schematische Darstellung der freien Energie eines Enzyms in seinem nativen, gefalteten Zustand. Interne Proteinbewegungen und Konformationsfluktuationen, die mit dem umgebenden Lösungsmittel gekoppelt sind, ermöglichen die Erreichung von konformationellen Subzuständen (englisch: *conformational substates*, CS) mit höherer Energie.^[174,176,178,179] Einige dieser Zustände mit höherer Energie können funktionsfördernde strukturelle und dynamische Merkmale enthalten. Alle Faktoren, die die Gesamtheit der konformationellen Zustände mit veränderter Energie beeinflussen, haben einen Einfluss auf den Zugang zu diesen funktionell wichtigen CS, etwa durch Wechselwirkung mit dem umgebenden dicht gepackten Co-Lösungsmittel des ATPS. Die Minima der CS können auch mit dem Druck variieren, je nachdem welches Vorzeichen die Volumenänderung hat.^[178]

Um ein molekulares Bild des eigentlichen katalytischen Schritts zu erhalten, sind theoretische quantenmechanische/molekularmechanische (QM/MM) Berechnungen erforderlich, wie sie für einfachere Enzymsysteme durchgeführt wurden.^[180] Aufgrund der inhärenten Komplexität des ATPS-Systems scheinen solche quantenchemische Berechnungen derzeit nicht möglich zu sein, sie können aber möglicherweise mit *coarse-grained*-Methoden durchgeführt werden. Dennoch ist der hier vorgestellte Rahmen nützlich, um geeignete Lösungsmittelsysteme für biokatalytische Anwendungen zu entwerfen und die Auswirkungen auf einige der Schlüsseleigenschaften vorherzusagen, die für industrielle Anwendungen optimiert werden müssen. Ein solcher Ansatz kann auch zu einem umfassenderen Verständnis des komplexen Gebiets der enzymkatalysierten Reaktionen beitragen, wie sie in einer intrazellulären dicht gepackten biologischen Umgebung ablaufen.

VII. Fazit und Ausblick

Im Rahmen des Projektes "Einfluss extremer Salzbedingungen auf die Stabilität des biomolekularen Kondensats ATP/Poly-L-Lysin" wurde gezeigt, dass eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung biomolekularer Systeme durchaus auf dem Mars angetroffen werden kann. Denn selbst unter dem Einfluss diverser aggressiver Salzlösungen und bei dem Anlegen eines hohen hydrostatischen Druckes zeigten die Tröpfchen des ATP/pLys Systems ihre Stressresistenz gegen diese äußeren Bedingungen. Somit ist davon auszugehen, dass bestimmten biomolekularen Systemen die LLPS-Bildung durch hohe Drücke und einen hohen Salzgehalt ermöglicht werden kann. Dementsprechend ist eine Habitabilität von Umgebungen mit solchen harschen Bedingungen möglich, das heißt ein Leben unter diesen Bedingungen ist denkbar. Hierzu könnte die Frage aufkommen, ob dies wirklich möglich ist. Um eine so grundlegende Frage beantworten zu können, muss im Weiteren ein Bezug zu lebenden Zellen hergestellt werden. Es ist etwa das Ansetzen des ATP/pLys LLPS in einem zellulären Modell und eine anschließende erneute Untersuchung der Druck- und Salzresistenz denkbar, um möglicherweise einen Einblick in die Bedeutung der LLPS für die Entstehung des Lebens, sowohl auf dem Mars als auch auf der Erde, zu gewinnen.

In heutigen zellulären Systemen ist die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, bekanntermaßen, allgegenwärtig. Bei der Betrachtung des α -Synuclein-LLPS wurde ein Weg gefunden, um den Fibrillierungsprozess, welcher vermutlich für die PARKINSON-Krankheit verantwortlich ist, mittels des antimikrobiellen Peptids LL-III zu beeinflussen. Es zeigte sich, dass die Umwandlung des α -Syn-Tröpfchenkondensats in den fibrillären amyloiden Zustand durch das LL-III verhindert wurde. Zusätzlich konnte diese Anti-Aggregationsaktivität des LL-III in einem zellulären Modell nachgewiesen werden. Daher kann diese Studie als Grundlage angesehen werden, um neue Behandlungswege für diese Art der Erkrankungen zu finden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass das LL-III nur "präventiv", also vor dem Fibrillierungsprozess eingesetzt werden kann. Im nächsten Schritt müssen Alternativen gefunden werden, um schon gebildete Fibrillen des α -Syn wieder aufzulösen. Wenn das gelingt, ist ein Schritt in Richtung Heilung der PARKINSON-Krankheit möglich. Ein alternativer Ansatz wurde in dem Projekt „Einfluss verschiedener Tröpfchensysteme auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“ gezeigt. Hier sorgten unter anderem molekulare *Crowder* für einen gehemmten Fibrillierungsprozess.

Im Zuge einer Optimierung der chemischen Produktion wird intensiv geforscht, um nachhaltige Technologien einzubeziehen. Eine denkbare Strategie für die Zukunft ist die Verwendung von wässrigen Zweiphasensystemen. Bei dem Projekt "Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase" wurde ein Ansatz vorgestellt, um geeignete Lösungsmittelsysteme für biokatalytische Anwendungen zu entwerfen. Ferner konnten sogar die Auswirkungen auf diverse Schlüsseleigenschaften vorhergesagt werden, um die industrielle Anwendung zu optimieren. Anhand dieser Ergebnisse kann es möglich werden, biokatalytische Prozesse in die chemische Industrie einzubauen, um unter anderem kostengünstigere und umweltverträglichere Alternativen zu bieten.

VIII. Anhang

VIII.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

In der folgenden Tabelle VIII-1 sind die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien angegeben, während in der Tabelle VIII-2 die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Messgeräte aufgeführt sind.

Tabelle VIII-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien einschließlich deren Bezugsquelle.

Chemikalie	CAS-Nummer	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat (ATP) Dinatriumsalz-Hydrat	34369-07-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
α -Synuclein (Plasmid)		GenScript (Deutschland)
Dextran (10 kDa)	9004-54-0	Carl Roth (Karlsruhe)
Ficoll® PM70	72146-89-5	GE Healthcare Life Science (Illinois, USA)
Formiat-Dehydrogenase (<i>Candida boidinii</i>)	9028-85-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
LAF-1 (Plasmid)		GenScript (Deutschland)
LL-III		GenScript (Deutschland)
LL-III (Carboxyfluorescein- markiert)		GenScript (Deutschland)
Mg(ClO ₄) ₂	10034-81-8	Alfa Aeser (Massachusetts, USA)
MgSO ₄	7487-88-9	abcr (Karlsruhe)
NaCl	7647-14-5	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
NaClO ₄	7601-89-0	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
NaOH	1310-73-2	Merck KGaA (Darmstadt)
Na ₂ SO ₄	7757-82-6	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Natriumformiat	141-53-7	Carl Roth (Karlsruhe)
Nicotinamideninukleotid oxidierte Form, (NAD ⁺)	53-84-9	Carl Roth (Karlsruhe)
Nicotinamideninukleotid reduzierte Form, (NADH), Di- natriumsalz	606-68-8	Carl Roth (Karlsruhe)
PEG (4.6 kDa)	25322-68-3	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Poly-L-Lysin-hydrobromid	25988-63-0	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Salzsäure	7647-01-0	Merck KGaA (Darmstadt)
TCEP	51805-45-9	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Tris(hydroxymethyl)-amino- methan	77-86-1	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

Tabelle VIII-2: Übersicht über die verwendeten Messgeräte einschließlich deren Hersteller.

Methode	Gerät	Hersteller
CD-Spektroskopie	Spectropolarimeter J-715	Jasco (Pfungstadt, Deutschland)
Fluoreszenzspektroskopie	K2 Multifrequency Phase Fluorometer	ISS Inc. (Illinois, USA)
Gefriertrockner	Alpha 1-2 LDplus	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)
Lichtmikroskopie	Eclipse TE2000-U	Nikon Inc. (Tokio, Japan)
UV/Vis-Spektroskopie	UV Spectrophotometer UV-1800	Shimadzu (Kyōto, Japan)
Vakuumentgasung	ThermoVac	Microcal. Inc. (Massachusetts, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

VIII.2. Ergänzende Daten des Projektes „Einfluss des anti-mikrobiellen Peptids LL-III auf den Fibrillierungsprozess des α -Synucleins“

Im Folgenden wird die Herleitung zum Fit eines 1:1-Bindungsmodells beschrieben. Bei der Durchführung der Messung wird die Konzentration des Substrats S (Bindungspartner des Liganden) während der Titration mit dem Liganden L konstant gehalten. Unter der Annahme, dass die Wechselwirkung der Bindungsstellen zwischen Substrat und Ligand als äquivalent und unabhängig beschrieben werden kann, ist die Reaktion, bei der n Liganden L an ein S -Molekül gebunden sind, wie folgt definiert:



Dementsprechend liegen auf dem Substrat n äquivalente und unabhängige Bindungsstellen vor, an die der Ligand gebunden werden kann.^[181] Für dieses Modell kann die Bindungskonstante K_b definiert werden. Sie stellt die Bindungskonstante pro Bindungsstelle dar. Somit gibt K_b das Gleichgewicht an, welches bei einer unabhängigen Betrachtung der Belegung jeder Bindungsstelle gemessen wird:

$$K_b = \frac{[SL_1 \cdots L_n]}{[S][L_1] \cdots [L_n]} \quad (18)$$

Dabei gibt $[SL_1 \cdots L_n]$ die Konzentration des Komplexes an, der durch die Besetzung der einzelnen Bindungsstellen auf dem Substrat gebildet wird. Die Konzentration des freien Substrats ist als $[S]$ angegeben, während $[L_1] \cdots [L_n]$ das Produkt der Konzentrationen der freien Liganden darstellt. In jedem Schritt der Titration kann K_b , sobald das Gleichgewicht erreicht ist, gemäß dem Gesetz der Massenerhaltung folgendermaßen beschrieben werden:

$$K_b = \frac{[x]}{([S_0] - [x])([L_0] - n[x])} \quad (19)$$

$[S_0]$ und $[L_0]$ bezeichnen hier die Gesamtkonzentrationen des Substrats respektive des Liganden, $[x]$ gibt die unbekannte Konzentration des gebildeten Komplexes an und n steht für die Anzahl der pro Mol Substrat gebundenen Mole des Liganden. Nach Umformung dieser Gleichung wird der folgende mathematische Ausdruck erhalten:

$$ax^2 - bx + c = 0 \quad (20)$$

$$a = nK_b \quad b = (1 + n[S_0]K_b + [L_0]K_b) \quad c = [S_0][L_0]K_b \quad (21)$$

Die Lösung der Gleichung (20) ermöglicht die Berechnung der Konzentration des gebildeten Komplexes $[SL_1 \cdots L_n]$ bei jedem Schritt der Titration:

$$x = -\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \quad (22)$$

Der Anteil der gebundenen Substrate, der auch als Sättigungsgrad θ bezeichnet wird, ist durch die folgende Gleichung gegeben und kann zwischen Werten von 0 (kein Ligand ist an das Substrat gebunden) und 1 (alle Bindungsstellen auf dem Substrat sind durch den Liganden besetzt) variieren:

$$\theta = \frac{[SL_1 \cdots L_n]}{[S_0]} \quad (23)$$

Aus den Gleichungen (22) und (23), wobei $x = [SL_1 \cdots L_n]$ ist, kann der Ligandenbindungsprozess folgendermaßen beschrieben werden:^[182]

$$\theta = \frac{1}{[S_0]} \left(-\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \right) \quad (24)$$

Der Sättigungsgrad ist zudem direkt mit den Veränderungen einer gemessenen physikalischen Größe ΔY verknüpft:

$$\theta = \frac{\Delta Y}{(\Delta Y)_{\text{gesamt}}} \quad (25)$$

In diesem Fall kann ΔY die Änderung einer beliebigen physikalischen Messgröße, beispielsweise der UV/Vis-Absorption oder der Fluoreszenzintensität bedeuten. Wichtig zu beachten ist, dass die Gleichung (25) nur dann zutrifft, wenn die Änderung von Y linear mit dem Ausmaß der Bindung, also der Bildung des Komplexes, ist. Es wird davon ausgegangen, dass nur das Substrat eine Änderung des messbaren Y hervorruft, während der Ligand der Lösung zugesetzt wird. Unter dieser Annahme ist $\Delta Y = Y - Y_0$ und $(\Delta Y)_{\text{gesamt}} = Y_{\text{gesättigt}} - Y_0$, wobei Y den Wert der physikalischen Messgröße bei jedem

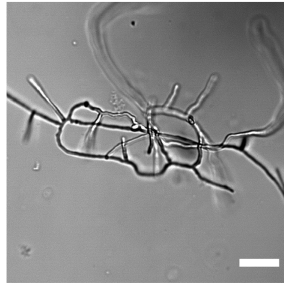
Schritt der Titration, Y_0 den Wert in Abwesenheit des Liganden und $Y_{\text{gesättigt}}$ den Wert von Y am Ende der Titration angibt, wenn das Substrat vollständig mit dem Liganden gesättigt ist. Durch die Kombination der Gleichungen (24) und (25) wird die endgültige Bindungsisotherme erhalten. Hierbei wird außerdem angenommen, dass n Liganden unabhängig voneinander an das Substrat gebunden werden können und dass alle Bindungsstellen gleichwertig sind, also durch dieselbe Bindungskonstante beschrieben werden können:

$$\frac{\Delta Y}{(\Delta Y)_{\text{gesamt}}} = \frac{1}{[S_0]} \left(-\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \right) \quad (26)$$

Um die Gleichung (26) anwenden zu können, muss der gesättigte Zustand erreicht werden. In der Regel wird das Experiment durch die Aufzeichnung der Veränderung von Y des Substrats nach schrittweiser Zugabe des Liganden durchgeführt. Die Bindungsisotherme ähnelt dann einer rechtwinkligen Hyperbel. Zu Beginn der Titration, wenn $[S_0] > [L_0]$ ist, wird eine lineare Veränderung von Y beobachtet. Bei vergleichbaren Konzentrationen von Substrat und Ligand sind die Veränderungen von Y weniger ausgeprägt und die Linearität geht verloren. Wenn $[S_0] < [L_0]$ ist, wird schließlich ein Plateau erreicht. In diesem Bereich führen aufeinanderfolgende Zugaben des Liganden zu keiner Änderung von Y , was bedeutet, dass der gesättigte Zustand erreicht ist.

In manchen Fällen ist es nicht möglich, den vollständigen Sättigungsgrad zu erreichen. Folglich kann θ nicht direkt berechnet werden. Dies könnte im Falle einer schwachen Bindung respektive schwachen Interaktion mit dem Substrat der Fall sein. Folglich muss $(\Delta Y)_{\text{gesamt}}$ ebenfalls als Anpassungsparameter angesehen werden.^[181]

[α -Syn] = 100 μ M



[α -Syn] = 200 μ M

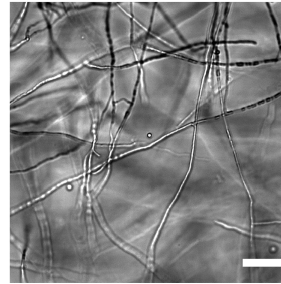


Abbildung VIII-1: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μ M und 200 μ M α -Syn. Die Bilder wurden jeweils 16 Tage nach der Inkubation des monomeren α -Syn aufgenommen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (25 °C) in einem 20 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.0) durchgeführt. Skalierung: 30 μ m.

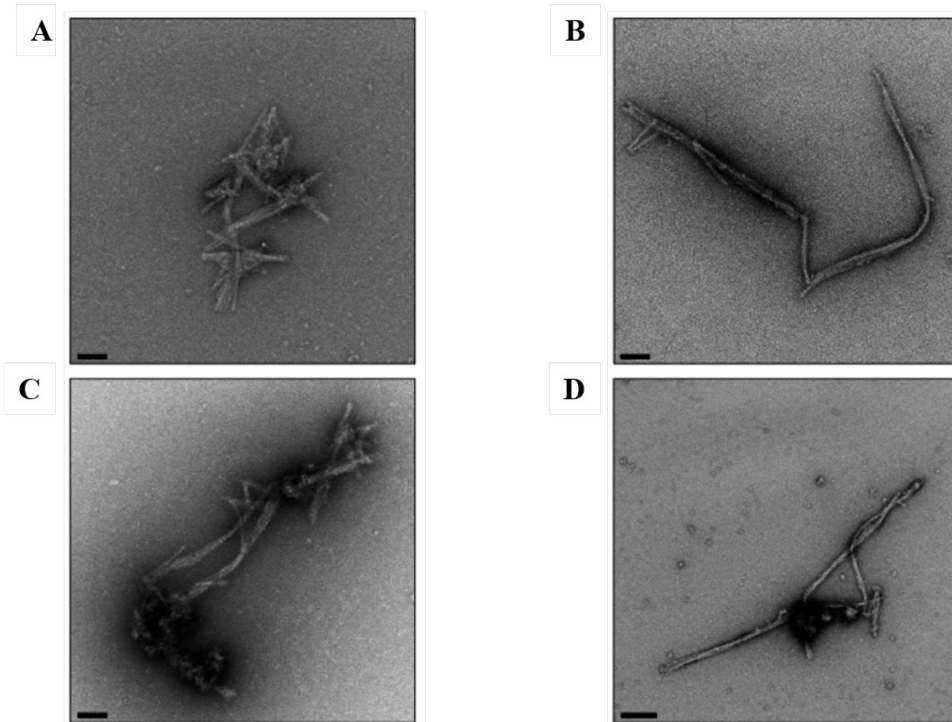


Abbildung VIII-2: TEM-Aufnahmen zeigen Fasern des monomeren α -Syn nach 9-tägiger Inkubationszeit des Proteins. Skalierung: 100 nm (A-C) oder 200 nm (D).¹²

¹² Diese Messungen wurden von Dr. D. Prumbaum und Prof. Dr. S. Raunser (Abteilung für Strukturbiochemie, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie Dortmund) durchgeführt.

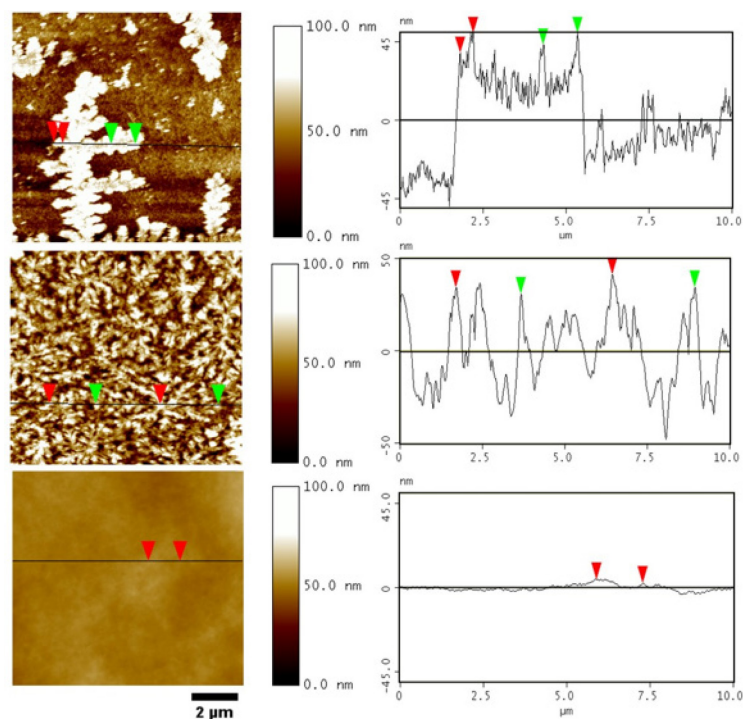


Abbildung VIII-3: AFM-Bilder und Höhenprofile einer getrockneten α -Syn-Lösung in Abwesenheit (oben) sowie in Anwesenheit von 200 μ M (Mitte) und 500 μ M (unten) LL-III. Die breiten Fibrillen setzen sich aus mehreren dünneren Fibrillen zusammen, welche seitlich miteinander verbunden sind.¹³

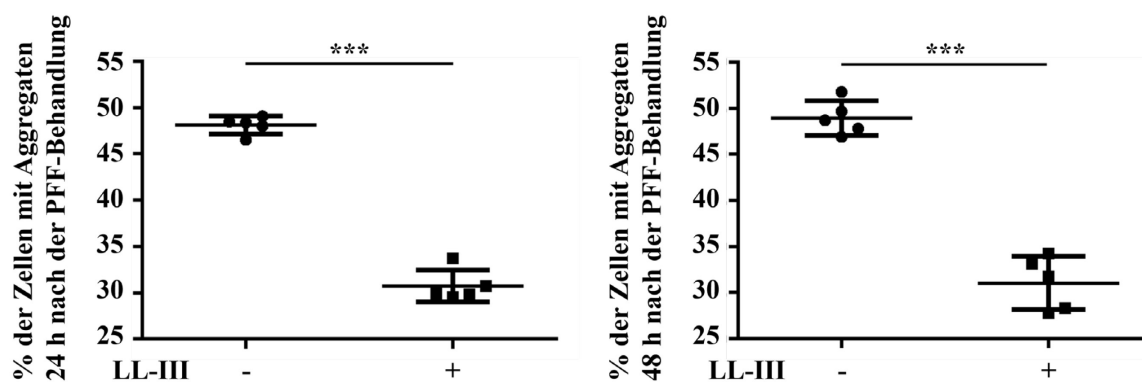


Abbildung VIII-4: Quantifizierung der neuronalen Zellen mit PFF-induzierter α -Syn-Aggregation basierend auf 5 unabhängigen Experimenten. Insgesamt wurden mindestens 150 Zellen pro Bedingung gezählt. Die Daten wurden mit einem KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test auf GAUßsche Verteilung und einem anschließenden ungepaarten Zweistichproben-STUDENTschen-t-Test verarbeitet.¹⁴ *** $p < 0.001$

¹³ Diese Messungen wurden von S. Krieglger (Physikalische Chemie I, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

¹⁴ Diese Messungen wurden von L. A. Pazurek (Abteilung für Biochemie und Neurodegenerative Krankheiten, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) und Dr. V. Bader (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

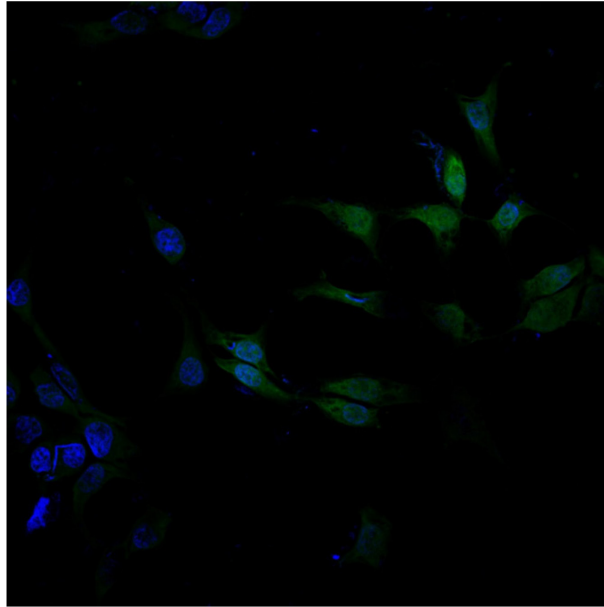


Abbildung VIII-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (strukturierte Beleuchtung) der mit dem Peptid LL-III vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen. Das Bild wurde 48 Stunden nach Zugabe des Peptids aufgenommen. In diesem Bild wurde die DAPI-Intensität erhöht, um die Kernfärbung besser zu erkennen. Grün: (GFP), blau: Zellkerne (DAPI).¹⁵

¹⁵ Diese Messungen wurden von L. A. Pazurek (Abteilung für Biochemie und Neurodegenerative Krankheiten, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) und Dr. V. Bader (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Institut für Biochemie und Pathobiochemie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

VIII.3. Ergänzende Daten des Projektes „Einfluss der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auf die enzymatische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase“

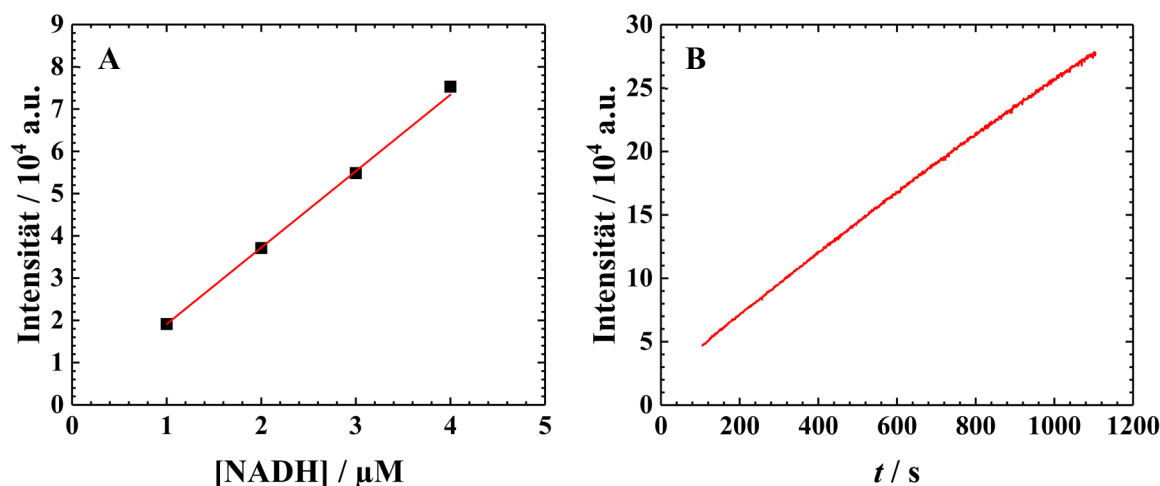


Abbildung VIII-6: Typische Kalibrierung sowie typischer zeitabhängiger Intensitätsverlauf der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen im Rahmen der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der FDH. Gezeigt ist eine Kalibrierungsmessung (A) und ein zeitabhängiger Verlauf (B) der FDH-katalysierten Oxidation von 10 mM Formiat bei 1000 bar in 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.4, $T = 298.15$ K. Mithilfe der durch die Kalibrierung erhaltenen Geradengleichung kann die Konzentration des Reaktionsproduktes NADH aus der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm berechnet werden.

Tabelle VIII-3: Die im Rahmen des dritten Projektes verwendeten binären ePC-SAFT Interaktionsparameter.¹⁶

Binäres System	$k_{ij, 298.15 \text{ K}}$	$k_{ij, T}$	$\kappa_{A_i B_j}^{hb}$
Wasser – PEG4600*	-0.1584	0.00022	-
Wasser – Dextran10000	-0.0503	0.00022	-
PEG4600 – Dextran10000*	-0.0220	-	0.09
Wasser – Na^+	0.000455	-0.00791	-
Wasser – For^-	-0.23	-	-
Wasser – NAD^+	-0.074	-	-

*Für beide Domänen des PEG4600 wurde der gleiche binäre Interaktionsparameter k_{ij} verwendet. Der binäre Assoziationsparameter $\kappa_{A_i B_j}^{hb}$ korrigiert die Assoziationsenergie mit den Stellen in den Kopfgruppen.

¹⁶ Die ePC-SAFT-Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

Tabelle VIII-4: Die im Rahmen des dritten Projektes verwendeten ePC-SAFT-Parameter.¹⁷

Komponente	m_i^{seg}	$\sigma_i / \text{\AA}$	$u_i k_B^{-1} / \text{K}$	$N_{i,\text{assoc}}$	$\varepsilon^{A_i B_j} k_B^{-1} / \text{K}$	$\kappa^{A_i B_j}$	z
Wasser	1.205	*	353.945	1:1	2425.7	0.045	0
Dextran10000	287.99	3.178	269.40	183:183	5000.0	0.1	0
PEG4600 (Kopfgruppen)**	1.599	2.851	115.62	1:1	2109.8	0.02	0
PEG4600 (Kette)**	233.738	2.851	185.37	-	-	-	0
NAD ⁺	27.395	2.756	380.52	8:8	3711.9	0.001	-1
For ⁻	1	3.308	190	-	-	-	-1
Na ⁺	1	2.823	230	-	-	-	-1

*Für Wasser wurde ein temperaturabhängiger Segmentdurchmesser verwendet:
 $\sigma_i = 2.7927 + 10.11 \cdot \exp(-0.01775 \cdot T) - 1.417 \cdot \exp(0.01146 \cdot T)$

**PEG4600 wurde mit einem heterosegmentalen Ansatz modelliert. Die gesamte Kette wurde in drei Domänen unterteilt: eine Kettendomäne mit zwei Kopfdomänen, die an beiden Enden verbunden sind. Die Parameter der drei Domänen sind oben angegeben.

Tabelle VIII-5: Die im Rahmen des dritten Projektes ermittelten kinetischen Parameter.

Puffer	p / bar	K_M / mM	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{eff}} / \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$
100 mM Tris-HCl	1	13.50 ± 1.85	1.61 ± 0.17	0.12 ± 0.03
	1000	3.95 ± 0.04	0.80 ± 0.01	0.203 ± 0.003
Dextran-reiche Phase	1	8.73 ± 0.85	0.77 ± 0.04	0.09 ± 0.01
	1000	5.58 ± 0.42	0.52 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Dextran-reiche Phase (ePC-SAFT)	1	10.51	-	-
	1000	2.99	-	-
PEG-reiche Phase	1	8.61 ± 1.04	1.06 ± 0.07	0.12 ± 0.02
	1000	3.72 ± 0.48	0.89 ± 0.03	0.24 ± 0.04
PEG-reiche Phase (ePC-SAFT)	1	9.69	-	-
	1000	2.76	-	-

¹⁷ Die ePC-SAFT-Messungen wurden von A. Moreno und N. Gajardo-Parra (Thermodynamik, Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund) durchgeführt.

VIII.4. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AFM	Rasterkraftmikroskop, englisch: <i>atomic force microscope</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
ATP	Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat
ATPS	wässriges Zweiphasensystem, englisch: <i>aqueous two phase system</i>
α -Syn	α -Synuclein
°C	Grad Celsius
CD	Circular-Dichroismus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	konformationelle Subzustände, englisch: <i>conformational substates</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ES [‡]	Übergangszustand des ES
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FUS	<i>Fused in Sarcoma</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HHP	hoher hydrostatischer Druck
Hz	Hertz
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LLPS	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung

mV	Millivolt
Mg(ClO ₄) ₂	Magnesiumperchlorat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
NAC	<i>non-amyloid-β</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaClO ₄	Natriumperchlorat
NAD ⁺	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
Nm	Newtonmeter
NMR	Kernspinresonanz
PC-SAFT	<i>Perturbed-Chain Statistical Associating Fluid Theory</i>
PDB-ID	Proteindatenbank-Identifikationsnummer
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PFF	vorgeformtes Fibrillenmodell, englisch: <i>pre-formed fibril model</i>
pLys	Poly-L-Lysin-hydrobromid
PrP	Prion-Protein
QM/MM	Quantenmechanik/Molekularmechanik
RNA	Ribonukleinsäure, englisch: <i>ribonucleic acid</i>
s	Sekunde
SR-SIM	superauflösende strukturierte Beleuchtungsmikroskopie
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid
TDP-43	Transaktives DNA-Bindungsprotein mit 43 kDa
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TK	Teilchenkonformationen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vis	<i>visible</i>

VMD	visuelle Molekulardynamik
v/v	Volumenkonzentration
wt%	Gewichtsprozent

VIII.5. Tabellenverzeichnis

Tabelle VIII-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien einschließlich deren Bezugsquelle.	97
Tabelle VIII-2: Übersicht über die verwendeten Messgeräte einschließlich deren Hersteller.	98
Tabelle VIII-3: Die im Rahmen des dritten Projektes verwendeten binären ePC-SAFT Interaktionsparameter.	105
Tabelle VIII-4: Die im Rahmen des dritten Projektes verwendeten ePC-SAFT-Parameter.	106
Tabelle VIII-5: Die im Rahmen des dritten Projektes ermittelten kinetischen Parameter.	106

VIII.6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1: Schematische Darstellung der Unterscheidung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) in segregativ und assoziativ.	6
Abbildung II-1: Schematische Veranschaulichung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes.	13
Abbildung II-2: Schematischer Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers (inspiriert durch ^[80]).	14
Abbildung II-3: Schematische Veranschaulichung des JABLONSKI-Diagramms.	17
Abbildung II-4: Schematische Darstellung des verwendeten Fluoreszenzspektrometers der Firma ISS Inc. (USA).	18
Abbildung II-5: Darstellung der bei der Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Hochdruckzelle.	19
Abbildung II-6: Schematische Darstellung des Öffnungswinkels α eines Objektivs bei der Lichtmikroskopie (inspiriert durch ^[79]).	21
Abbildung II-7: Darstellung der bei den mikroskopischen Aufnahmen verwendeten Mikroskopiezellen.	22
Abbildung II-8: Schematische Veranschaulichung der zirkular polarisierten Komponenten L und R einer linear polarisierten Strahlung.	24
Abbildung II-9: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers (inspiriert durch ^[79]).	26

Abbildung III-1: Bändermodell des Proteins α -Synuclein.	28
Abbildung III-2: Primärstruktur des Peptids LL-III.	29
Abbildung III-3: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μ M α -Syn (1-4) und 200 μ M α -Syn (5-8).	34
Abbildung III-4: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μ M α -Syn in Gegenwart von 50 μ M (1-3), 200 μ M (4-6) oder 500 μ M (7-9) LL-III.	36
Abbildung III-5: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen einer 100 μ M α -Syn-Lösung in Gegenwart von 50 μ M (1-4), 200 μ M (5-8) oder 500 μ M (9-12) LL-III (Gesamtpeptidkonzentration).	37
Abbildung III-6: Mittels Steady-State-Fluoreszenzanisotropie ermittelte Bindungsisothermen der Titration von LL-III mit α -Syn.	39
Abbildung III-7: CD-Spektren des LL-III und des α -Syn zu verschiedenen Zeitpunkten.	41
Abbildung III-8: Verminderung der PFF-induzierten α -Syn-Aggregation durch LL-III in neuronalen Zellen.	42
Abbildung III-9: Schematisches Diagramm der GIBBS-Energie des α -Syn bei der Reifung vom monomeren zum tröpfchenförmigen und schließlich zum fibrillären Zustand in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) des antimikrobiellen Peptids LL-III.	44
Abbildung IV-1: Bändermodell des RNA-Helikase-Proteins LAF-1.	45
Abbildung IV-2: Bändermodell des Proteins SynGAP.	47
Abbildung IV-3: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μ M LAF-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation.	50
Abbildung IV-4: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen von 10 μ M LAF-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation.	51
Abbildung IV-5: Bindungsaffinität des LAF-1 und α -Syn _{mono} , ermittelt durch Steady-State-Fluoreszenzanisotropiemessungen bei $T = 25$ °C und $p = 1$ bar.	52
Abbildung IV-6: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μ M α -Syn und 10 wt% PEG in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μ M LAF-1 sowie der Kontrolllösung von 10 μ M LAF (7-9) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation.	53

Abbildung IV-7: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μM $\alpha\text{-Syn}$ und 10 wt% Ficoll® 70 in Abwesenheit (1-3) und Anwesenheit (4-6) von 10 μM LAF-1 sowie der Kontrolllösung von 10 μM LAF (7-9) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation.	54
Abbildung IV-8: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit dem monomeren $\alpha\text{-Syn}$ (100 μM) (1) oder dem oligomeren $\alpha\text{-Syn}$ (100 μM) (3, 4) in Gegenwart von 10 μM LAF sowie der Kontrolllösung von 10 μM LAF (2) am Tag der Probenpräparation.	55
Abbildung IV-9: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 500 μM $\alpha\text{-Syn}$ in Gegenwart von 50 μM SynGAP/PSD-95 (1:1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Probenpräparation.	56
Abbildung IV-10: Normierte Bindungsisothermen für $\alpha\text{-Syn}_{\text{mono}}$ mit SynGAP (A) oder PSD (B) bei $T = 25$ °C und $p = 1$ bar.	57
Abbildung V-1: Strukturformeln der eingesetzten Komponenten pLys und ATP zur Bildung des LLPS-Systems.	60
Abbildung V-2: Zeitabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 30 mM Tris-HCl-Puffer.	63
Abbildung V-3: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 30 mM Tris-HCl-Puffer.	64
Abbildung V-4: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM NaCl-Tris-Puffer.	64
Abbildung V-5: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer.	65
Abbildung V-6: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM Na_2SO_4 -Tris-Puffer.	66
Abbildung V-7: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM Na_2SO_4 -Tris-Puffer.	67
Abbildung V-8: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM MgSO_4 -Tris-Puffer.	68
Abbildung V-9: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM MgSO_4 -Tris-Puffer.	69

Abbildung V-10: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM NaClO ₄ -Tris-Puffer.....	70
Abbildung V-11: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaClO ₄ -Tris-Puffer.....	71
Abbildung V-12: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 250 mM Mg(ClO ₄) ₂ -Tris-Puffer.....	72
Abbildung V-13: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM Mg(ClO ₄) ₂ -Tris-Puffer.....	73
Abbildung V-14: Druckabhängiges LLPS des ATP/pLys-Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer mit 10 wt% Ficoll® 70.....	76
Abbildung V-15: Repräsentative UV/Vis-Absorptionsdaten (Turbidität) bei 520 nm des ATP/pLys Systems in 500 mM NaCl-Tris-Puffer in Abwesenheit und Anwesenheit von 5 wt% Ficoll® 70 als Funktion der Temperatur.....	77
Abbildung VI-1: Reaktionsgleichung der untersuchten Oxidation von Formiat zu CO ₂ und gleichzeitige Reduktion des NAD ⁺ zu NADH mittels Formiat-Dehydrogenase (FDH).	81
Abbildung VI-2: Bändermodell des Enzyms Formiat-Dehydrogenase (Homodimer).....	81
Abbildung VI-3: Anordnung eines NAD ⁺ -Moleküls im Bändermodell des Enzyms Formiat-Dehydrogenase (Homodimer).....	82
Abbildung VI-4: Mittels ePC-SAFT berechnetes Phasendiagramm des ternären Systems Wasser-PEG-Dextran.....	83
Abbildung VI-5: MICHAELIS-MENTEN-Diagramme der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat zu CO ₂ bei einem Druck von 1 bar (A) oder 1000 bar (B); $T = 298.15$ K.....	87
Abbildung VI-6: Vergleich zwischen experimentellen (gefüllte Balken) und mittels ePC-SAFT vorhergesagten (gestreifte Balken) K_M -Werten der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat bei 1 bar und 1000 bar.....	88
Abbildung VI-7: Vergleich der katalytischen Geschwindigkeitskonstante k_{cat} (A) und der katalytischen Effizienz k_{eff} (B) der FDH-katalysierten Oxidation von Formiat in den untersuchten Puffern bei 1 bar und 1000 bar.....	89
Abbildung VI-8: Druckabhängiges ATPS der Dextran-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl-Puffer.....	91

Abbildung VI-9: Druckabhängiges ATPS der PEG-reichen Phase in 100 mM Tris-HCl-Puffer.....	92
Abbildung VI-10: Schematische Darstellung der freien Energie eines Enzyms in seinem nativen, gefalteten Zustand.	94
Abbildung VIII-1: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Lösungen mit 100 μ M und 200 μ M α -Syn.....	102
Abbildung VIII-2: TEM-Aufnahmen zeigen Fasern des monomeren α -Syn nach 9-tägiger Inkubationszeit des Proteins..	102
Abbildung VIII-3: AFM-Bilder und Höhenprofile einer getrockneten α -Syn-Lösung in Abwesenheit (oben) sowie in Anwesenheit von 200 μ M (Mitte) und 500 μ M (unten) LL-III.	103
Abbildung VIII-4: Quantifizierung der neuronalen Zellen mit PFF-induzierter α -Syn-Aggregation basierend auf 5 unabhängigen Experimenten.	103
Abbildung VIII-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (strukturierte Beleuchtung) der mit dem Peptid LL-III vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen.	104
Abbildung VIII-6: Typische Kalibrierung sowie typischer zeitabhängiger Intensitätsverlauf der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen im Rahmen der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der FDH.....	105

VIII.7. Literaturverzeichnis

- [1] J. S. Lim, S. F. Wong, M. C. Law, Y. Samyudia, S. S. Dol, *J. Appl. Sci.* **2015**, *15*, 167–172.
- [2] S. F. Wong, J. S. Lim, S. S. Dol, *J. Pet. Sci. Eng.* **2015**, *135*, 498–504.
- [3] N. Garti, *LWT - Food Sci. Technol.* **1997**, *30*, 222–235.
- [4] H. Okochi, M. Nakano, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *45*, 5–26.
- [5] B. Luerßen, H. Barth, M. Ries, G. Hamscher, H. Over, *Chem. Unserer Zeit* **2021**, *55*, 170–184.
- [6] T. Arunkumar, R. Jayaprakash, A. Ahsan, D. Denkenberger, M. S. Okundamiya, *Appl. Energy* **2013**, *103*, 109–115.
- [7] W. B. Fu, L. Y. Hou, L. Wang, F. H. Ma, *Fuel Process. Technol.* **2002**, *79*, 107–119.
- [8] F. Ferrero, M. Muñoz, B. Kozanoglu, J. Casal, J. Arnaldos, *J. Hazard. Mater.* **2006**, *137*, 1293–1302.
- [9] D. W. Yang, P. H. Zhang, B. Z. Chen, *Appl. Mech. Mater.* **2013**, *295–298*, 564–567.
- [10] I. M. Shaluf, S. A. Abdullah, *J. Loss Prev. Process Ind.* **2011**, *24*, 1–7.
- [11] P. Ping, J. Zhang, D. Kong, Z. Xu, H. Yang, *J. Loss Prev. Process Ind.* **2018**, *55*, 500–511.
- [12] F. Ferrero, M. Muñoz, J. Arnaldos, *Fuel Process. Technol.* **2007**, *88*, 227–235.
- [13] A. P. Minton, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 2363–2370.
- [14] N. Martin, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2553–2568.
- [15] M. Abbas, W. P. Lipiński, J. Wang, E. Spruijt, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3690–3705.
- [16] C. D. Crowe, C. D. Keating, *Interface Focus* **2018**, *8*, 20180032.
- [17] R. R. Poudyal, F. Pir Cakmak, C. D. Keating, P. C. Bevilacqua, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2509–2519.
- [18] N. A. Yewdall, A. A. M. André, T. Lu, E. Spruijt, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2021**, *52*, 101416.
- [19] 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.
- [20] S. F. Banani, H. O. Lee, A. A. Hyman, M. K. Rosen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285–298.

- [21] S. Alberti, *Curr. Biol.* **2017**, *27*, R1097–R1102.
- [22] K. K. Nakashima, J. F. Baaij, E. Spruijt, *Soft Matter* **2018**, *14*, 361–367.
- [23] 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.
- [24] S. Alberti, D. Dormann, *Annu. Rev. Genet.* **2019**, *53*, 171–194.
- [25] J. U. Klamsner, S. C. Kapfer, W. Krauth, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5045.
- [26] D. Bracha, M. T. Walls, M.-T. Wei, L. Zhu, M. Kurian, J. L. Avalos, J. E. Toettcher, C. P. Brangwynne, *Cell* **2018**, *175*, 1467–1480.e13.
- [27] C. P. Brangwynne, P. Tompa, R. V. Pappu, *Nat. Phys.* **2015**, *11*, 899–904.
- [28] J. A. Riback, L. Zhu, M. C. Ferrolino, M. Tolbert, D. M. Mitrea, D. W. Sanders, M.-T. Wei, R. W. Kriwacki, C. P. Brangwynne, *Nature* **2020**, *581*, 209–214.
- [29] Y. Shin, C. P. Brangwynne, *Science* **2017**, *357*, eaaf4382.
- [30] C. L. Cuevas-Velazquez, J. R. Dinneny, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *45*, 68–74.
- [31] W. E. Arter, R. Qi, N. A. Erkamp, G. Krainer, K. Didi, T. J. Welsh, J. Acker, J. Nixon-Abell, S. Qamar, J. Guillén-Boixet, T. M. Franzmann, D. Kuster, A. A. Hyman, A. Borodavka, P. S. George-Hyslop, S. Alberti, T. P. J. Knowles, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7845.
- [32] Y. Wang, A. Lomakin, S. Kanai, R. Alex, G. B. Benedek, *Langmuir* **2017**, *33*, 7715–7721.
- [33] Y.-H. Lin, J. D. Forman-Kay, H. S. Chan, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2499–2508.
- [34] P. A. Chong, J. D. Forman-Kay, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *41*, 180–186.
- [35] U. S. Eggert, *Biochemistry* **2018**, *57*, 2403–2404.
- [36] W.-K. Cho, J.-H. Spille, M. Hecht, C. Lee, C. Li, V. Grube, I. I. Cisse, *Science* **2018**, *361*, 412–415.
- [37] B. R. Sabari, A. Dall’Agnese, A. Boija, I. A. Klein, E. L. Coffey, K. Shrinivas, B. J. Abraham, N. M. Hannett, A. V. Zamudio, J. C. Manteiga, C. H. Li, Y. E. Guo, D. S. Day, J. Schuijers, E. Vasile, S. Malik, D. Hnisz, T. I. Lee, I. I. Cisse, R. G. Roeder, P. A. Sharp, A. K. Chakraborty, R. A. Young, *Science* **2018**, *361*, eaar3958.
- [38] B. Tsang, J. Arsenault, R. M. Vernon, H. Lin, N. Sonenberg, L.-Y. Wang, A. Bah, J. D. Forman-Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 4218–4227.
- [39] C. D. Keating, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2114–2124.
- [40] A. A. Hyman, C. A. Weber, F. Jülicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 39–58.
- [41] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858–875.
-

- [42] J. P. Harrison, N. Gheeraert, D. Tsigelnitskiy, C. S. Cockell, *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 204–212.
- [43] 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. Méthé, 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.
- [44] H. Cinar, Z. Fetahaj, S. Cinar, R. M. Vernon, H. S. Chan, R. H. A. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 13049–13069.
- [45] D. Zwicker, R. Seyboldt, C. A. Weber, A. A. Hyman, F. Jülicher, *Nat. Phys.* **2017**, *13*, 408–413.
- [46] H. Cinar, S. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 8286–8291.
- [47] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erlkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 028101.
- [48] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [49] H. Cinar, R. Winter, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17245.
- [50] 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. Gospodnova, J. Kapit, P. H. Smith, *Science* **2009**, *325*, 64–67.
- [51] V. J. Laye, S. DasSarma, *Astrobiology* **2018**, *18*, 412–418.
- [52] N. Merino, H. S. Aronson, D. P. Bojanova, J. Feyhl-Buska, M. L. Wong, S. Zhang, D. Giovannelli, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 780.
- [53] S. Gault, M. W. Jaworek, R. Winter, C. S. Cockell, *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 550.
- [54] C. Cockell, *Astrobiology: Understanding Life in the Universe*, Wiley-Blackwell, Hoboken, **2020**.
- [55] S. M. Clifford, J. Lasue, E. Heggy, J. Boisson, P. McGovern, M. D. Max, *J. Geophys. Res.* **2010**, *115*, E07001.
- [56] 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.
- [57] 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.* **2020**, *5*, 63–70.
- [58] 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.* **2023**, *123*, 73–104.
- [59] A. R. Alcántara, P. Domínguez de María, J. A. Littlechild, M. Schürmann, R. A. Sheldon, R. Wohlgemuth, *ChemSusChem* **2022**, *15*, e2021027.
- [60] R. A. Sheldon, D. Brady, *ChemSusChem* **2022**, *15*, e202102628.
- [61] W. M. Aumiller, C. D. Keating, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *239*, 75–87.
- [62] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, R. Winter, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 395–398.
- [63] T. Lu, E. Spruijt, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 2905–2914.
- [64] S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag, *Cell* **2019**, *176*, 419–434.
- [65] A. Patel, H. O. Lee, L. Jawerth, S. Maharana, M. Jahnel, M. Y. Hein, S. Stoynov, 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.
- [66] T. Murakami, S. Qamar, J. Q. Lin, G. S. K. Schierle, E. Rees, A. Miyashita, A. R. Costa, R. B. Dodd, F. T. S. Chan, C. H. Michel, D. Kronenberg-Versteeg, Y. Li, S.-P. Yang, Y. Wakutani, W. Meadows, R. R. Ferry, L. Dong, G. G. Tartaglia, G. Favrin, W.-L. Lin, D. W. Dickson, M. Zhen, D. Ron, G. Schmitt-Ulms, P. E. Fraser, N. A. Shneider, C. Holt, M. Vendruscolo, C. F. Kaminski, P. St George-Hyslop, *Neuron* **2015**, *88*, 678–690.
- [67] S. Ambadipudi, J. Biernat, D. Riedel, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 275.
- [68] C. O. Matos, Y. M. Passos, M. J. Amaral, B. Macedo, M. H. Tempone, O. C. L. Bezerra, M. O. Moraes, M. S. Almeida, G. Weber, S. Missailidis, J. L. Silva, V. N. Uversky, A. S. Pinheiro, Y. Cordeiro, *FASEB J.* **2020**, *34*, 365–385.
- [69] L. Pytowski, C. F. Lee, A. C. Foley, D. J. Vaux, L. Jean, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 12050–12061.
-

- [70] S. Wegmann, B. Eftekharzadeh, 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*, e98049.
- [71] A. E. Conicella, G. L. Dignon, G. H. Zerze, H. B. Schmidt, A. M. D'Ordine, Y. C. Kim, R. Rohatgi, Y. M. Ayala, J. Mittal, N. L. Fawzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 5883–5894.
- [72] S. Boyko, K. Surewicz, W. K. Surewicz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 31882–31890.
- [73] Y. Lin, Y. Fichou, A. P. Longhini, L. C. Llanes, P. Yin, G. C. Bazan, K. S. Kosik, S. Han, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166731.
- [74] L. Lei, Z. Wu, K. F. Winklhofer, *Matrix Biol.* **2021**, *100–101*, 9–22.
- [75] I. Jahan, S. M. Nayeem, *Biophys. J.* **2019**, *117*, 1922–1934.
- [76] M. C. Owen, D. Gnutt, M. Gao, S. K. T. S. Wärmländer, J. Jarvet, A. Gräslund, R. Winter, S. Ebbinghaus, B. Strodel, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3946–3996.
- [77] Y. Guo, C. Liu, R. Ye, Q. Duan, *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 6874.
- [78] I. Oshina, J. Spigulis, *J. Biomed. Opt.* **2021**, *26*, 100901.
- [79] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, Vieweg + Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [80] F. Hinderer, *UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie: Einführung in die spektroskopische Analyse mit UV- und sichtbarer Strahlung*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, **2020**.
- [81] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, **2013**.
- [82] M. E. Khosroshahi, Y. Patel, V. Woll-Morison, *Laser Phys. Lett.* **2022**, *19*, 075602.
- [83] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
- [84] “ISS k2 Steady-State and Time-Resolved Spectrofluorometer,” can be found under <https://www.artisan-tg.com/Scientific/72998-2/ISS-k2-001-Steady-State-and-Time-Resolved-Spectrofluorometer>, **2023**.
- [85] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **2012**.
- [86] K. Thorn, *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 219–222.
-

- [87] T. J. Collins, *BioTechniques* **2007**, *43*, 25–30.
- [88] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1751*, 119–139.
- [89] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer, New York, **2013**.
- [90] A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E3095–E3103.
- [91] A. J. Miles, B. A. Wallace, *Chem Soc Rev* **2006**, *35*, 39–51.
- [92] C. A. Ross, M. A. Poirier, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S10–S17.
- [93] H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 38–48.
- [94] C. R. Bodner, C. M. Dobson, A. Bax, *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 775–790.
- [95] R. Kumar, S. Das, G. M. Mohite, S. K. Rout, S. Halder, N. N. Jha, S. Ray, S. Mehra, V. Agarwal, S. K. Maji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5262–5266.
- [96] B. H. Pogostin, S. Linse, U. Olsson, *Langmuir* **2019**, *35*, 16536–16544.
- [97] 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.
- [98] M. C. Hardenberg, T. Sinnige, S. Casford, S. Dada, C. Poudel, E. A. Robinson, M. Fuxreiter, C. Kaminski, G. S. Kaminski-Schierle, E. A. A. Nollen, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, *J. Mol. Cell Biol.* **2021**, mjaa075.
- [99] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250.
- [100] J. Slaninová, H. Putnová, L. Borovičková, P. Šácha, V. Čěřovský, L. Monincová, V. Fučík, *Cent. Eur. J. Biol.* **2011**, *6*, 150–159.
- [101] B. Mishra, A. Basu, R. Saravanan, L. Xiang, L. K. Yang, S. S. J. Leong, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9534.
- [102] R. Oliva, P. Del Vecchio, A. Grimaldi, E. Notomista, V. Cafaro, K. Pane, V. Schuabb, R. Winter, L. Petraccone, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 3989–3998.
- [103] C. Bröcker, A. Kuhlee, C. Gatsogiannis, H. J. kleine Balderhaar, C. Hönscher, S. Engelbrecht-Vandré, C. Ungermann, S. Raunser, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 1991–1996.
-

- [104] V. A. Trinkaus, I. Riera-Tur, A. Martínez-Sánchez, F. J. B. Bäuerlein, Q. Guo, T. Arzberger, W. Baumeister, I. Dudanova, M. S. Hipp, F. U. Hartl, R. Fernández-Busnadiego, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2110.
- [105] K. A. Connors, *Binding Constants - The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **1987**.
- [106] C. O. Fernández, W. Hoyer, M. Zweckstetter, E. A. Jares-Erijman, V. Subramaniam, C. Griesinger, T. M. Jovin, *EMBO J.* **2004**, *23*, 2039–2046.
- [107] R. Oliva, S. K. Mukherjee, Z. Fetahaj, S. Möbitz, R. Winter, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11577–11580.
- [108] N. K. Polinski, L. A. Volpicelli-Daley, C. E. Sortwell, K. C. Luk, N. Cremades, L. M. Gottler, J. Froula, M. F. Duffy, V. M. Y. Lee, T. N. Martinez, K. D. Dave, *J. Park. Dis.* **2018**, *8*, 303–322.
- [109] H. Fujiwara, M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M. S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, T. Iwatsubo, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 160–164.
- [110] Z. Fetahaj, L. Ostermeier, H. Cinar, R. Oliva, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5247–5259.
- [111] 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.
- [112] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2951–2972.
- [113] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [114] H. Cinar, R. Oliva, Y. Lin, X. Chen, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26*, 11024–11031.
- [115] H. Cinar, R. Oliva, H. Wu, M. Zhang, H. S. Chan, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 1734–1741.
- [116] M. Zeng, Y. Shang, Y. Araki, T. Guo, R. L. Haganir, M. Zhang, *Cell* **2016**, *166*, 1163–1175.e12.
- [117] X. Chen, C. Winters, R. Azzam, X. Li, J. A. Galbraith, R. D. Leapman, T. S. Reese, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 4453–4458.
- [118] K. M. Harris, R. J. Weinberg, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a005587–a005587.
- [119] M. Zeng, X. Chen, D. Guan, J. Xu, H. Wu, P. Tong, M. Zhang, *Cell* **2018**, *174*, 1172–1187.e16.

- [120] D. Cheng, C. C. Hoogenraad, J. Rush, E. Ramm, M. A. Schlager, D. M. Duong, P. Xu, S. R. Wijayawardana, J. Hanfelt, T. Nakagawa, M. Sheng, J. Peng, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1158–1170.
- [121] H.-J. Chen, M. Rojas-Soto, A. Oguni, M. B. Kennedy, *Neuron* **1998**, *20*, 895–904.
- [122] J. H. Kim, D. Liao, L.-F. Lau, R. L. Haganir, *Neuron* **1998**, *20*, 683–691.
- [123] M. H. Berryer, F. F. Hamdan, L. L. Klitten, R. S. Møller, L. Carmant, J. Schwartzentruber, L. Patry, S. Dobrzeniecka, D. Rochefort, M. Neugnot-Cerioli, J.-C. Lacaille, Z. Niu, C. M. Eng, Y. Yang, S. Palardy, C. Belhumeur, G. A. Rouleau, N. Tommerup, L. Immken, M. H. Beauchamp, G. S. Patel, J. Majewski, M. A. Tarnopolsky, K. Scheffzek, H. Hjalgrim, J. L. Michaud, G. Di Cristo, *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 385–394.
- [124] 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*, DOI 10.1073/pnas.1706197114.
- [125] R. Oliva, S. K. Mukherjee, L. Ostermeier, L. A. Pazurek, S. Kriegler, V. Bader, D. Prumbaum, S. Raunser, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, R. Winter, *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27*, 11845–11851.
- [126] A.-O. Vweza, C.-G. Song, K.-T. Chong, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6675.
- [127] S. Park, R. Barnes, Y. Lin, B. Jeon, S. Najafi, K. T. Delaney, G. H. Fredrickson, J.-E. Shea, D. S. Hwang, S. Han, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 83.
- [128] S. Lenton, N. H. Rhys, J. J. Towey, A. K. Soper, L. Dougan, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 919.
- [129] 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.
- [130] G. Rivas, A. P. Minton, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 241–253.
- [131] D. Guin, M. Gruebele, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10691–10717.
- [132] S. Koga, D. S. Williams, A. W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 720–724.
- [133] K. Akasaka, H. Matsuki, Eds., *High Pressure Bioscience: Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2015**.
- [134] 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.
- [135] R. Winter, *Annu. Rev. Biophys.* **2019**, *48*, 441–463.
-

- [136] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, 1595, 201–209.
- [137] A. A. Fodeke, A. P. Minton, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10876–10880.
- [138] Y. Georgalis, M. Philipp, R. Aleksandrova, J. K. Krüger, *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 386, 141–147.
- [139] A. A. Lee, C. S. Perez-Martinez, A. M. Smith, S. Perkin, *Phys. Rev. Lett.* **2017**, 119, 026002.
- [140] P. Gaddam, W. Ducker, *Langmuir* **2019**, 35, 5719–5727.
- [141] Y. Marcus, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 1475–1498.
- [142] 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.
- [143] S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 6155–6158.
- [144] M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 241–277.
- [145] O. Matsarskaia, F. Roosen-Runge, F. Schreiber, *ChemPhysChem* **2020**, 21, 1742–1767.
- [146] S. Shimizu, N. Matubayasi, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **2021**, 563, 125385.
- [147] T. L. Hill, *Thermodynamics of Small Systems*, Dover Publications Inc, New York, **2013**.
- [148] G. L. Dignon, R. B. Best, J. Mittal, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2020**, 71, 53–75.
- [149] B. G. O’Flynn, T. Mittag, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2021**, 69, 70–79.
- [150] B. Saini, T. K. Mukherjee, *J. Phys. Chem. B* **2023**, 127, 180–193.
- [151] 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.
- [152] Q. Zhang, J. Chen, Z. Zhong, B. Li, H. Gai, *Anal. Chim. Acta* **2022**, 1197, 339540.
- [153] J.-P. Chen, M.-S. Lee, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 1021–1027.
- [154] A. P. Minton, *Methods Enzymol.* **1998**, 295, 127–149.
- [155] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erilkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 460–465.
- [156] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, 16, 3555–3571.
- [157] J. M. Bolivar, L. Wilson, S. A. Ferrarotti, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, C. Mateo, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 540–546.
- [158] S. Alpdagtas, B. Binay, *Biocatal. Biotransformation* **2021**, 39, 260–268.
- [159] J. Gross, G. Sadowski, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, 40, 1244–1260.
-

- [160] M. Ascani, G. Sadowski, C. Held, *J. Chem. Eng. Data* **2022**, *67*, 1972–1984.
- [161] E. B. Ordu, R. B. Sessions, A. R. Clarke, N. G. Karagüler, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *95*, 23–28.
- [162] H. Schütte, J. Flossdorf, H. Sahm, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *62*, 151–160.
- [163] J.-P. Samama, K. M. Lee, J.-F. Biellmann, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *163*, 609–617.
- [164] C. Ince, J. M. C. C. Coremans, H. A. Bruining, in *Oxyg. Transp. Tissue XIV* (Eds.: W. Erdmann, D.F. Bruley), Springer US, Boston, **1992**, pp. 277–296.
- [165] M. W. Jaworek, N. F. Gajardo-Parra, G. Sadowski, R. Winter, C. Held, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *208*, 112127.
- [166] T. Schmidt, C. Michalik, M. Zavrel, A. Spieß, W. Marquardt, M. B. Ansorge-Schumacher, *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 73–78.
- [167] Q. Guo, L. Gakhar, K. Wickersham, K. Francis, A. Vardi-Kilshntain, D. T. Major, C. M. Cheatum, A. Kohen, *Biochemistry* **2016**, *55*, 2760–2771.
- [168] K. Schirwitz, A. Schmidt, V. S. Lamzin, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1146–1156.
- [169] N. Jahmidi-Azizi, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Biology* **2021**, *10*, 687.
- [170] C. Held, T. Stolzke, M. Knierbein, M. W. Jaworek, T. Q. Luong, R. Winter, G. Sadowski, *Biophys. Chem.* **2019**, *252*, 106209.
- [171] T. Q. Luong, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 23273–23278.
- [172] N. F. Gajardo-Parra, H. Akrofi-Mantey, M. Ascani, E. Cea-Klapp, J. M. Garrido, G. Sadowski, C. Held, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 27930–27939.
- [173] G. Rivas, A. P. Minton, *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 970–981.
- [174] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14230–14237.
- [175] N. F. Gajardo-Parra, L. Meneses, A. R. C. Duarte, A. Paiva, C. Held, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 12873–12881.
- [176] K. K. Nakashima, M. A. Vibhute, E. Spruijt, *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 21.
- [177] G. C. Sandoval, A. Marty, J.-S. Condoret, *AIChE J.* **2001**, *47*, 718–726.
- [178] T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12412–12416.
- [179] P. K. Agarwal, *Biochemistry* **2019**, *58*, 438–449.

- [180] A. Ganguly, T. Q. Luong, O. Brylski, M. Dirkmann, D. Möller, S. Ebbinghaus, F. Schulz, R. Winter, E. Sanchez-Garcia, W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 6390–6398.
- [181] K. E. Van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, Pearson/Prentice Hall, New Jersey, **2006**.
- [182] J. Haiech, Y. Gendrault, M.-C. Kilhoffer, R. Ranjeva, M. Madec, C. Lallement, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2348–2355.

IX. Publikationsliste

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Inhalte aus den folgenden Publikationen verwendet. Diese Inhalte wurden im Verlauf der Publikation erarbeitet und es wurde jeweils eine Genehmigung zur Verwendung der Daten vom Herausgeber eingeholt.

- [1] R. Oliva, S. K. Mukherjee, **L. Ostermeier**, L. A. Pazurek, S. Kriegler, V. Bader, D. Prumbaum, S. Raunser, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, R. Winter, „Remodeling of the Fibrillation Pathway of α -Synuclein by Interaction with Antimicrobial Peptide LL-III“, *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27*, 11845–11851.
- [2] 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.
- [3] **L. Ostermeier**, M. Ascani, N. Gajardo-Parra, G. Sadowski, C. Held, R. Winter, „Leveraging Liquid-Liquid Phase Separation and Volume Modulation to Control the Enzymatic Activity of Formate Dehydrogenase“, *React. Chem. Eng.* (eingereicht).

Des Weiteren wurden während der Promotion die folgenden Publikationen veröffentlicht.

- [1] **L. Ostermeier**, R. Oliva, R. Winter, „The multifaceted effects of DMSO and high hydrostatic pressure on the kinetic constants of hydrolysis reactions catalyzed by α -chymotrypsin“, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 16325–16333.
- [2] **L. Ostermeier**, G. A. P. de Oliveira, W. Dzwolak, J. L. Silva, R. Winter, „Exploring the polymorphism, conformational dynamics and function of amyloidogenic peptides and proteins by temperature and pressure modulation“, *Biophys. Chem.* **2021**, *268*, 106506.
- [3] 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, „Life in Multi-Extreme Environments: Brines, Osmotic and Hydrostatic Pressure — A Physicochemical View“, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 73–104.

X. Konferenzbeiträge

- [1] **L. Ostermeier**, Z. Fetahaj, H. Cinar, R. Oliva, R. Winter, „Biomolecular Condensates under Extreme Martian Salt Conditions“, 67th Biophysical Society Annual Meeting (18. Februar - 22. Februar 2023), San Diego, USA – **Poster**
- [2] **L. Ostermeier**, R. Oliva, S. K. Mukherjee, L. A. Pazurek, S. Kriegler, V. Bader, D. Prumbaum, S. Raunser, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, R. Winter, „Remodeling of the Fibrillation Pathway of α -Synuclein by Interaction with Antimicrobial Peptide LL-III“, Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (10. Juni 2022), Dortmund, Deutschland – **Vortrag**