



Biochemische Reaktionen unter physiologischen und extremen Bedingungen

# Das Innere der Zelle: Ein komplexes Lösungsmittel

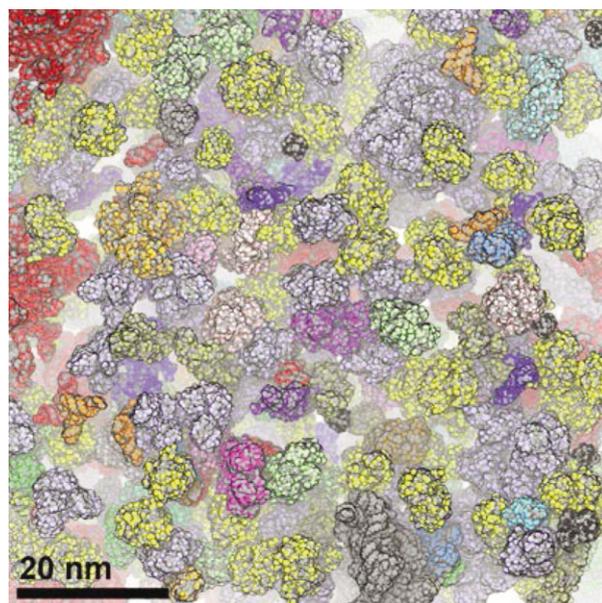
DR. MATTHIAS HEYDEN | PROF. DR. SIMON EBBINGHAUS | PROF. DR. ROLAND WINTER\*

*Obwohl die Entdeckung des Lösungsmiteleinflusses auf chemische Reaktionen mehr als 150 Jahre zurückliegt, ist ein tieferes Verständnis der Ursachen erst in den letzten Jahrzehnten möglich geworden. Bedeutend waren hierbei zunehmende Kenntnisse über die Mechanismen chemischer Reaktionen, über das Wirken lösungsmittelvermittelter zwischenmolekularer Kräfte und über die innere Struktur von Flüssigkeiten. Mitentscheidend war aber auch die Entwicklung einer ganzen Palette hochauflösender experimenteller Techniken, theoretischer Modelle sowie von Methoden zur Simulation chemischer Prozesse auf Computerplattformen mit kontinuierlich steigender Rechenleistung. Gleichwohl ist man von einer quantitativen und prädiktiven Erfassung des Solvensinflusses auf die Geschwindigkeit und die Gleichgewichtslage chemischer Reaktionen meist noch weit entfernt. Noch schwieriger ist es, das komplexe Lösungsmittel im Inneren lebender Zellen zu beschreiben, in denen die essentiellen biochemischen Prozesse des Lebens ablaufen. Grund hierfür ist die außerordentliche Komplexität der Struktur und Dynamik der molekularen Umgebung in biologischen Systemen mit einer Vielzahl von Molekülen mit unterschiedlichsten chemischen und physikalischen Eigenschaften. Erste Ansätze einer Beschreibung des zellulären Milieus und einige seiner Besonderheiten werden im Folgenden erörtert.*

## Lösungsmittel ‚Zelle‘

Das Innere einer biologischen Zelle ist sehr dicht gepackt. Bis zu 40 % des zellulären Volumens wird von hochmolekularen Verbindungen oder Biopolymeren eingenommen, z.B. Proteine, Nukleinsäuren, membranbildende Lipide, Kohlenhydrate oder Metabolite. Das verbleibende Volumen wird von flüssigem Wasser „aufgefüllt“. Das Zellinnere, in der die verschiedensten Gruppen von Biomolekülen ihre molekulare Arbeit verrichten, ist also keineswegs eine verdünnte wässrige Lösung wie oftmals angenommen wird. Dies verdeutlicht schematisch die Abbildung 1, in der 50 der häufigsten Biomoleküle in ihren experimentell gemessenen Konzentration in *Escherichia coli* gezeigt sind. Diese Biomoleküle interagieren miteinander durch eine Vielzahl spezifischer und nichtspezifischer Wechselwirkungen und können die Eigenschaften des Mediums im Vergleich zu wässrigen Lösungen erheblich beeinflussen [1]. Somit ist beispielsweise die intrazelluläre Viskosität im Vergleich zu verdünntem Puffer deutlich erhöht; sie entspricht in etwa der von flüssigem Eiweiß [2].

Diese im Vergleich zu wässrigen Lösungen veränderten Bedingungen im intrazellulären Medium beschreiben die



**Abb. 1** Graphische Darstellung der 50 meist vertretenen Makromoleküle des *E. coli* Zytoplasmas. Nach McGuffee & Elcock (2010) [16].

natürliche Arbeitsumgebung der komplexen biomolekularen Maschinen, welche für die chemischen und biophysikalischen Prozesse des Stoffwechsels verantwortlich sind, insbesondere Proteine und speziell Enzyme. Im Laufe der Evolution haben sich die Struktur, Flexibilität und Funktionsweise von Proteinen sogar optimal an derartige Bedingungen angepasst [3].

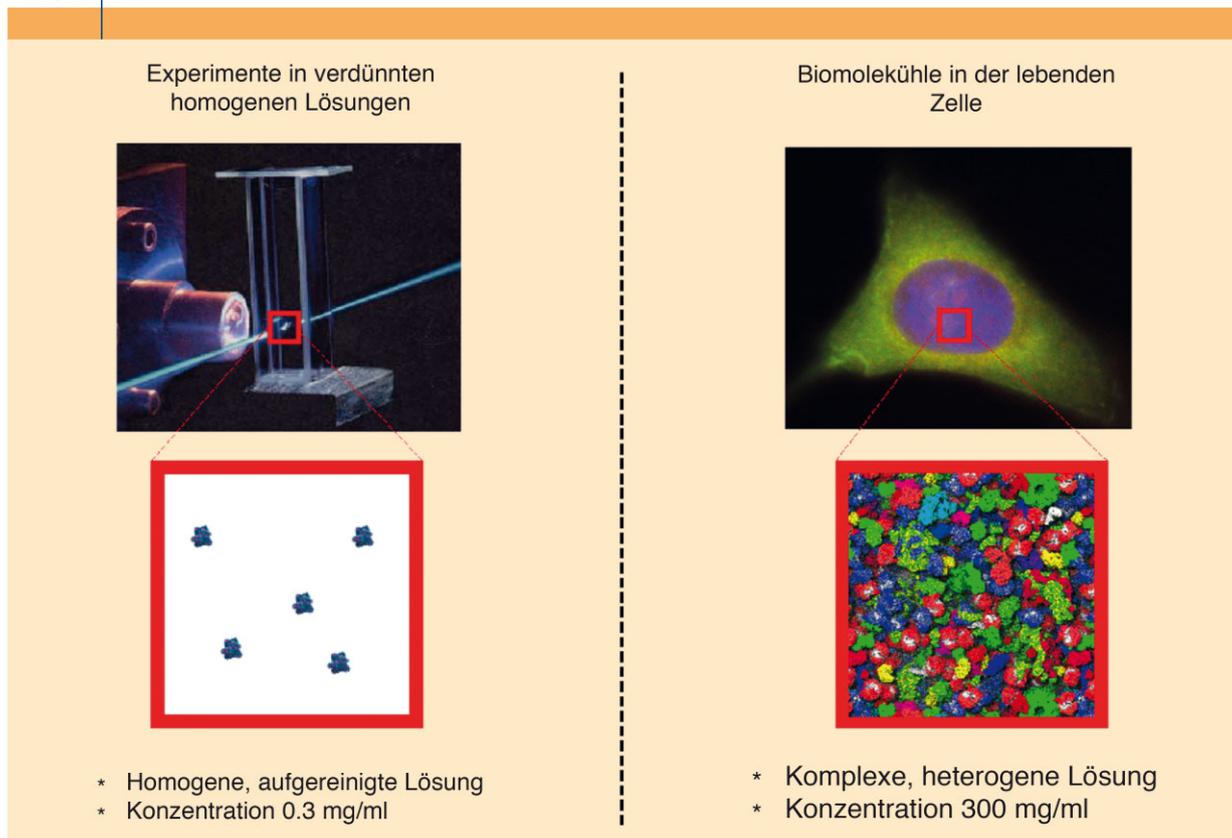
Biochemische Experimente zur Untersuchung der Funktion von Biomolekülen in der Zelle sollten diese daher *möglichst direkt* „vor Ort“ beobachten. Dies ist allerdings häufig mit großen technischen Herausforderungen verbunden. So werden für derartige Experimente Biomoleküle oftmals aus dem zellulären Kontext herausgelöst, indem Sie beispielsweise in Bakterien exprimiert und dann aufgereinigt (isoliert) werden. Die Untersuchung erfolgt dann meist in homogener, stark verdünnter Pufferlösung in einem Reagenzglas oder einer Küvette. Dies hat den Vorteil, dass verschiedene biochemische und biophysikalische Methoden (Röntgenstrukturanalyse, Kalorimetrie, Spektroskopie) angewendet werden können.

Es stellt sich aber die Frage, ob Experimente unter derartigen Bedingungen wirklich das Verhalten von Biomolekülen innerhalb einer Zelle widerspiegeln (Abbildung 2). Nach bisherigen Erkenntnissen gibt es zwei Antworten: „ja“ und „nein“. Zum einen konnte an einzelnen Beispielen ge-

zeigt werden, dass die Enzymkatalyse in Zellen mit ähnlicher Geschwindigkeit abläuft, wie sie auch in verdünnter Lösung gemessen wird [4]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht zwischen nativ gefalteten und entfalteten Proteinkonformationen sowie die in vielen Fällen medizinisch relevante Tendenz zur Bildung von Amyloid-Fibrillen (eine Form der Aggregation von Proteinen), von der Packungsdichte und Zusammensetzung der jeweiligen Umgebung beeinflusst werden können. Dies kann entscheidenden Einfluss auf pathologische Prozesse haben, welche z.B. bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson eine Rolle spielen. Hier stellt die Entfaltung und Aggregation von Proteinen einen entscheidenden Schritt der Pathogenese dar [3,5].

Darüber hinaus passt sich auch das intrazelluläre Medium selbst an äußere Umgebungsbedingungen an. Im Fall niedriger Temperaturen oder hoher Drücke produzieren die Zellen angepasster Lebensformen unterschiedliche Osmolyte und spezielle Proteine, welche die Bildung von Eiskristallen oder die druckabhängige Entfaltung von Proteinen verhindern. Die Biosynthese von Lipiden kann sich ebenfalls den Umweltbedingungen anpassen. Man fand z.B. heraus, dass die Membranen von Tiefseeorganismen einen höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren enthalten, um die Flui-

ABB. 2



**Vergleich eines typischen Experimentes in verdünnter Pufferlösung im Vergleich zu Bedingungen, wie sie in lebenden Zellen vorherrschen [16].**

## VOLUMEN-AUSSCHLUSS EFFEKT

Das verminderte Platzangebot verringert die Anzahl der möglichen Zustände, die von einem Biomolekül eingenommen werden können. Kompaktere Strukturen mit geringerem Volumen-Ausschluss werden bevorzugt. Dieser Effekt kann anschaulich anhand einer Analogie aus dem alltäglichen Leben verdeutlicht werden. Befindet sich eine Person in einem leeren Personenaufzug, kann sie sich problemlos und frei bewegen. Befindet sich diese Person hingegen in einem maximal besetzten Aufzug mit vielen mitfahrenden Personen, wird diese Person versuchen, möglichst wenig Platz einzunehmen und eine „kompakte“ Haltung anzunehmen (z.B. die Arme anzulegen). Dieser Effekt ist vergleichbar zu der kompakten Struktur, die ein Biomolekül in einer dichtgedrängten zellulären Umgebung einnimmt.

dität ihrer Membranen aufrecht zu erhalten [6]. Die genauen Wirkmechanismen, insbesondere bei komplexen Mischungen unterschiedlicher Osmolyte, sind Gegenstand aktueller Forschung.

Wechselwirkungen von Biomolekülen mit ihrer Lösungsumgebung spielen darüber hinaus nicht nur für ihre Struktur und Stabilität eine Rolle. Zur Ausübung ihrer Funktion müssen Proteine und Enzyme in der Regel unterschiedliche Konformationen einnehmen können. Die Dynamik dieser Konformationsänderungen wird hierbei ebenfalls stark vom Lösungsmittel beeinflusst. Spektroskopische Messungen und Computersimulationen zeigen, dass sich Biomoleküle und Moleküle des umgebenden Lösungsmittels nicht unabhängig bewegen, sondern sich über einen gewissen Abstand hinweg gegenseitig beeinflussen. Dieser Abstand entspricht hierbei in etwa dem mittleren Abstand benachbarter Proteine im Inneren einer Zelle, allerdings ist der Einfluss dieser kollektiven Dynamik bisher kaum erforscht.

### Einfluss des Lösungsmittels ‚Zelle‘ auf chemische Reaktionen

Um Unterschiede in der Stabilität von Biomolekülen und der Kinetik biochemischer Prozesse, im Zell-Inneren und in verdünnten Lösungen, sowie die Ursachen dieser Unterschiede genauer zu untersuchen, gibt es unterschiedliche Ansätze: Theoretische Modelle und Computersimulationen versuchen den Einfluss dicht gepackter Umgebungen auf Biomoleküle zu beschreiben, um so die allgemeinen Mechanismen zu verstehen. Darüber hinaus werden neuartige experimentelle Messmethoden entwickelt, welche es erlauben, biomolekulare Prozesse direkt im Inneren lebender Zellen zu untersuchen – ohne die involvierten Proteine und anderen Moleküle herauszulösen und zu isolieren. Alternativ werden Proteine in wässriger Lösung unter Zugabe von weiteren Agenzien untersucht, um deren Einfluss isoliert oder auch in Kombination kontrolliert untersuchen zu können.

### „Crowding“ – drangvolle Enge in der Zelle

Die Entwicklung eines quantitativen Modells, mit dem sich experimentelle Ergebnisse im Reagenzglas verlässlich auf

die zelluläre Ebene übertragen lassen, ist aufgrund der Vielzahl verschiedener physikalisch-chemischer Effekte, die auf eine biochemische Reaktion einwirken, sehr schwierig. Ein oftmals zentraler Aspekt ist das verminderte Platzangebot in der Zelle, das „Makromolekulare Crowding“. Dieses oft auch als Volumen-Ausschluss-Effekt [7] bezeichnete Phänomen betrachtet den Einfluss hoher makromolekularer Konzentrationen in der Zelle auf darin enthaltene Biopolymere unter Berücksichtigung abstoßender Wechselwirkungen. Das verminderte Platzangebot führt hierbei im Mittel zu einer Bevorzugung kompakter Zustände eines Biomoleküls. Weiterhin ändert sich die Aktivität und damit Reaktivität der bei biochemischen Reaktionen und Prozesse beteiligten Partner.

Für die nativ gefaltete dreidimensionale Struktur eines Proteins bedeutet dies in der Regel eine Stabilisierung, da diese meist sehr kompakt ist und eine Entfaltung bzw. Denaturierung des Proteins eine Volumenvergrößerung verursacht. Derselbe Effekt kann jedoch auch eine Aggregation von Proteinen begünstigen.

Die Beschreibung des Volumen-Ausschluss-Effekts berücksichtigt primär abstoßende Wechselwirkungen zwischen den Molekülen. **Anziehende Wechselwirkungen zwischen den Molekülen sowie Interaktionen mit dem Lösungsmittel können das Verhalten realer Systeme jedoch entscheidend beeinflussen.**

Derzeit arbeiten verschiedene Laboratorien an der quantitativen Beschreibung der verschiedenen Effekte. So wurde beispielsweise ein Sensor entwickelt, der den netto-Einfluss der Umgebung auf die Stabilität gefalteter Biopolymere, beispielsweise aufgrund von Volumen-Ausschluss-Effekten, in lebenden Zellen und auch im Reagenzglas messbar macht [8]. Zu diesem Zweck wird ein in verdünnter Lösung als ungeordnetes Polymerknäuel vorliegendes und ungeladenes Polymer, Polyethylenglykol (PEG), an beiden Enden chemisch mit unterschiedlichen Farbstoffmolekülen markiert [8]. Diese können durch Anregung von außen zur Fluoreszenz angeregt werden, wobei die Anregungsenergie durch intramolekularen Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ■ bitte Begriff erklären ■ zwischen den beiden Farbstoffmolekülen übertragen werden kann. Das hierdurch veränderte Fluoreszenzsignal erlaubt eine direkte Messung der Abstände zwischen diesen bzw. des End-zu-End-Abstands des gefalteten Polymers.

Hierdurch wird indirekt eine quantitative Beobachtung von Änderungen des Molekülvolumens in unterschiedlichen Umgebungen möglich. In künstlichen Systemen, beispielsweise wässrigen Lösungen mit hohen Konzentrationen kugelförmiger Makromoleküle unterschiedlicher Größe, kann hiermit der Einfluss des Volumen-Ausschluss-Effektes, also eine Bevorzugung kompakt gefalteter Polymer-Konformationen, direkt beobachtet werden (Abbildung 3).

Interessanterweise wird trotz ähnlicher Packungsdichten dieser Effekt im Inneren lebender Zellen unter physiologischen Bedingungen nicht beobachtet. Erst wenn den Zellen zusätzlich, beispielsweise durch die Zugabe von Sal-

zen, Wasser entzogen wird, ist die Bevorzugung kompakt gefalteter Polymere experimentell eindeutig messbar. Dieses Beispiel zeigt, dass im Zell-Inneren attraktive Wechselwirkungen zwischen den Molekülen eine bedeutende Rolle spielen und reinen Volumen-Ausschluss-Effekten zu einem gewissen Grad entgegenwirken können.

Experimentelle Untersuchungen der Eigenschaften einzelner Biomoleküle in lebenden Zellen, wie sie hier beschrieben werden, sind methodisch sehr anspruchsvoll, da das zu untersuchende Biomolekül nicht isoliert vorliegt, sondern in der heterogenen Umgebung einer Zelle unter vielen anderen identifiziert werden muss. Selbst in einfachsten Modellorganismen wie *Escherichia coli* gibt es mehr als 4000 unterschiedliche Proteine verschiedenster Formen und Größen [9]. Somit beruhen derartige Techniken auf Verfahren, in denen das zu untersuchende Biomolekül zunächst speziell markiert wird, wie im Fall der PEG-Polymere durch die chemisch gebundenen Farbstoffmoleküle. Eine ähnliche Markierungsmethode kann auch bei Proteinen eingesetzt werden. Die Markierung erfolgt hier in der Regel durch die Expression eines Fusionsproteins, wobei der genetische Code des zu untersuchenden Proteins mit dem eines kleinen fluoreszierenden Moleküls kombiniert wird. Eine Anwendungsmöglichkeit hierfür bietet das Fast Relaxation Imaging (FRiI) [10]. Die Methode kombiniert zeitlich aufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (in der nur die fluoreszenz-markierten Proteine sichtbar werden) mit Temperatursprüngen, welche durch Bestrahlung mit einem kurzen Laserimpuls erzeugt werden. Durch diese Kombination können sowohl thermodynamische als auch kinetische Prozesse, an denen die markierten Proteine beteiligt sind, mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung anhand der Fluoreszenz-Änderung direkt in der lebenden Zelle verfolgt werden.

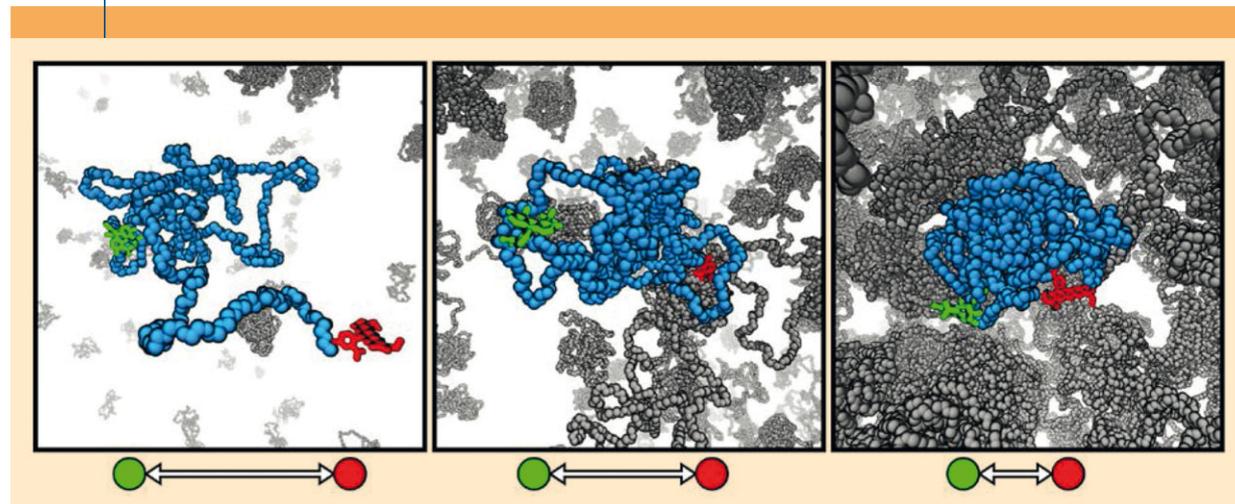
Eine Alternative zur Untersuchung fluoreszenzmarkierter Moleküle bietet die Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance = NMR). Hier werden Biomoleküle vor dem Experiment in der Zelle speziell isoto-penmarkiert [11–13]. Mit dieser Methode war es erstmals möglich, die Struktur eines Proteins im Inneren einer lebenden Zelle, also in seiner natürlichen Umgebung, zu bestimmen. Dieses Experiment kann als Startpunkt einer neuen Forschungsrichtung angesehen werden, der „zellulären Strukturbiologie“ [11,14]. Ein Beispiel für ein wichtiges Experiment, welches durch diese Entwicklung ermöglicht wurde, ist die Untersuchung der Stabilität des Enzyms Superoxid Dismutase 1 (SOD1) in lebenden Zellen. Dieses Enzym, bzw. dessen fehlerhafte Faltung, löst die schwerwiegende neurodegenerative Krankheit Amyotrophe Lateralsklerose aus. Ein detailliertes Verständnis der stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren in seiner intrazellulären Umgebung ist daher von großem medizinischen Interesse.

### Modellierung des Lösungsmittels ‚Zelle‘

Neben neuartigen experimentellen Untersuchungsmethoden gewähren auch Computersimulationen von Modellsystemen einen virtuellen Einblick in das Innere lebender Zellen und tragen zum Verständnis der Einflüsse der zellulären Umgebung auf Struktur und Dynamik darin enthaltener Biomoleküle bei. Eine realistische Beschreibung mit allen atomaren Details ist hierbei noch nicht für ganze Zellen möglich. Simulationen mit dieser Auflösung sind in der Regel darauf beschränkt, die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Biomolekülen zu beschreiben bzw. deren Interaktionen mit der Lösungsmittel-Umgebung, z. B. Wasser, Salze und Osmolyte.

Allerdings kann die Detailauflösung den jeweiligen Fragestellungen angepasst werden. Um beispielsweise Diffu-

ABB. 3 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES CROWDING-SENSORS



**Steigende Konzentrationen an künstlichen Crowding-Substanzen (von links nach rechts) führen zu einer Kompression der random coil Kette. Dadurch befinden sich Donor- und Akzeptor-Fluorophor in einer näheren Umgebung, wodurch das FRET-Signal ansteigt. Damit erlaubt der Sensor Rückschlüsse auf das molekulare Volumen in dicht gedrängten Lösungen zu ziehen.**  
Adaptiert von Gnutt et al. (2015) [8].

sionsprozesse im dichtgepackten Inneren einer Zelle mit verdünnten Lösungen zu vergleichen, genügt in erster Näherung eine stochastische Beschreibung der Brownschen Dynamik von starren Proteinen in einem dielektrischen Kontinuum als Lösungsmittel. Das heißt, Lösungsmittel-Moleküle wie Wasser und unterschiedliche Elektrolyte werden nicht explizit simuliert, sondern nur ihr Einfluss, insbesondere auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen, wird implizit in die Berechnung einbezogen [15]. So ist es möglich, die Diffusionsdynamik von Protein und Biomolekülen in Umgebungen zu simulieren, welche den Bedingungen im Inneren einer Zelle sehr nahe kommen. Abbildung 1 wurde anhand von Daten aus einer solchen Simulation generiert [16].

Auch wenn in solchen Simulationen die Moleküle zunächst als starr angenommen werden, kann die Stabilisierung von kompakt gefalteten und entfalteten Zuständen einzelner Moleküle in erster Näherung abgeschätzt werden. Hierzu wird in einem Zufalls-Verfahren die benötigte Änderung der Energie berechnet, um ein kompakt gefaltetes Protein durch ein entfaltetes zu ersetzen. Hieraus kann auf das Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen rückgeschlossen werden. Allerdings ist es auch möglich, die Flexibilität der Moleküle in gewissem Maße direkt in der Simulation zu berücksichtigen. Hierzu können die Moleküle während der Simulation zwischen vielen unterschiedlichen Konformationen hin und her wechseln [17]. Diese Methode kann beispielsweise verwendet werden, um die unterschiedlichen Einflüsse von Volumen-Ausschluss-Effekten und attraktiven Wechselwirkungen zwischen Molekülen anhand hochkonzentrierter Lösungen des PEG-Polymers zu

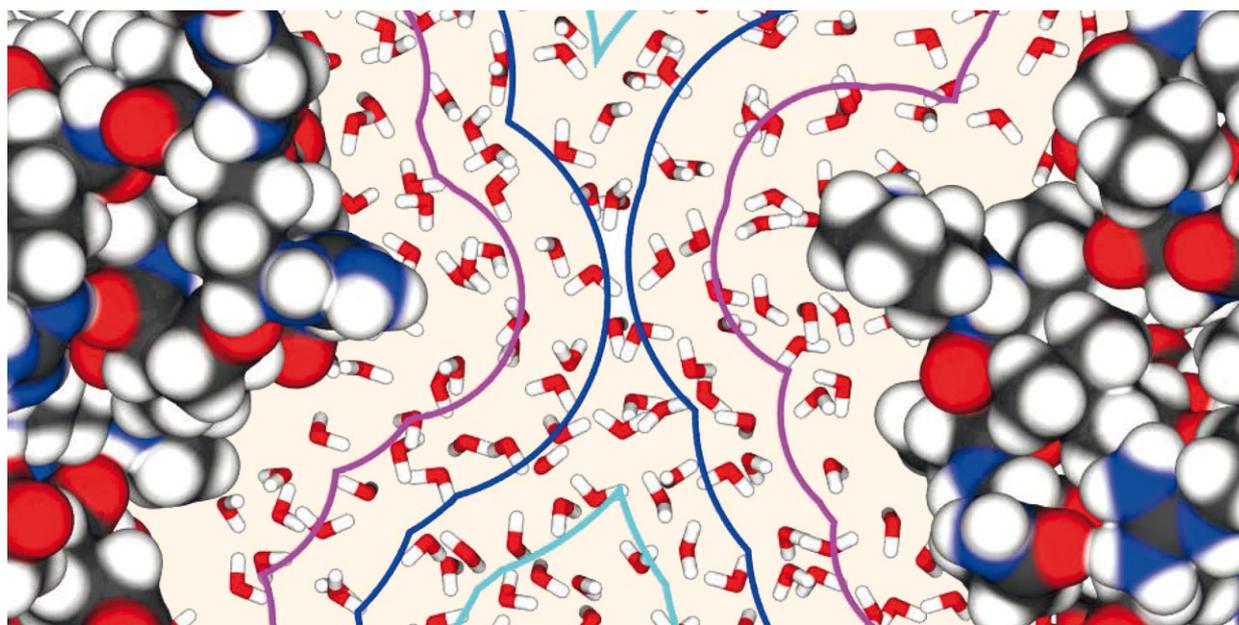
untersuchen, welches experimentell als Sensor für den Einfluss der zellulären Umgebung auf die Stabilität kompakt gefalteter Strukturen eingesetzt wird. Ergebnisse einer solchen Simulation sind in Abbildung 3 dargestellt.

### Wasser – Hauptbestandteil des Lebens

Neben Interaktionen zwischen den Biomolekülen im Zell-Inneren sind auch die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel selbst nicht zu vernachlässigen. Trotz hoher Konzentrationen von Proteinen, Nukleinsäuren, Metaboliten etc. ist der Hauptbestandteil aller lebenden Zellen letztendlich Wasser.

Abgesehen von Membranproteinen, die sich bevorzugt in der Umgebung der Lipid-Doppelschichten befinden, welche die Zellen und darin enthaltenen Organellen voneinander abgrenzen, haben sich Proteine und Enzyme im Zellplasma an die wässrige Lösungsumgebung angepasst. Wasser ist oft sogar integraler Bestandteil einer Proteinstruktur und daher nicht nur ein Lösungsmittel. Darüber hinaus sind dynamische Prozesse gelöster Proteine und des umgebenden Wassers stark aneinander gekoppelt. Dies wird zum Beispiel bei tiefen Temperaturen sichtbar, bei denen Proteinlösungen sich oft wie Gläser verhalten, also wie Flüssigkeiten mit unendlich hoher Viskosität. In Neutronenstreuungs-Experimenten mit partiell deuterierten Proben kann z. B. beobachtet werden, dass die Bewegungen der Proteinatome und des umgebenden Wassers bei der gleichen Temperatur einfrieren bzw. nicht mehr messbar sind.

Auch bei Raumtemperatur treten interessante Phänomene auf. In detaillierten Computersimulationen von Pro-



**Abb. 4** Illustration von Proteinhydrathüllen wie sie anhand kollektiver Protein-Wasser-Schwingungen beobachtet werden [18,19]. Konturlinien in Magenta, Blau und Cyan deuten einzelne Hydratwasserschichten mit einer Dicke von ca. 2,8 Å an. Bei typischen Abständen zwischen Biomolekülen im Inneren einer Zelle können diese Hydrathüllen überlappen und beispielsweise kollektive Schwingungen durch das H-Brückennetzwerk von einem Protein aufs andere übertragen [20].

teinen in ihrer expliziten Lösungsumgebung (alle Atome des Systems werden beschrieben), kann beobachtet werden, wie sich die Dynamik des Wassers in der Nähe eines Proteins verlangsamt. Von besonderem Interesse ist hierbei die Dynamik des Wasserstoffbrücken-Netzwerks des Wassers, welches für die besonderen Eigenschaften des Wassers verantwortlich ist. Die H-Brücken zwischen den Wassermolekülen stellen hierbei eine ungewöhnliche starke nichtkovalente Wechselwirkung dar. Dennoch brechen H-Brücken zwischen Wassermolekülen in der Regel in Bruchteilen einer Milliardstel Sekunde, um sich sofort mit neuen Bindungspartnern neu zu bilden.

Mithilfe von Licht im fern-infraroten Frequenzbereich (Terahertz =  $10^{12}$  Hertz) lassen sich die Schwingungen zwischen Wassermolekülen des H-Brücken-Netzwerks direkt beobachten. Messungen der konzentrationsabhängigen Absorption von Proteinlösungen deuten hierbei darauf hin, dass die Schwingungen des H-Brücken-Netzwerks in der Umgebung gelöster Proteine verändert sind [18]. Die Reichweite dieser Effekte beträgt hierbei mit 1–2 Nanometern etwa dem Abstand zwischen Biomolekülen im zellulären Medium (Abbildung 4). Detaillierte Computersimulationen der dynamischen Bewegungen von Atomen der Proteine und des umgebenden Wassers zeigen, dass deren Schwingungsbewegungen korreliert sind [19]. Hierbei breiten sich die Schwingungen benachbarter, direkt interagierender Moleküle durch das H-Brücken-Netzwerk des Wassers mit großer Geschwindigkeit aus, wobei der Mechanismus in etwa der Weiterleitung von Schall in Flüssigkeiten entspricht.

In speziellen Simulationen konnte sogar gezeigt werden, dass sich Schwingungsbewegungen durch diesen Mechanismus durch das Wasser von einem Protein auf ein anderes übertragen können, ohne dass die beiden Proteine sich direkt berühren [20]. Welchen Einfluss diese Form der Informationsübertragung in lebenden Systemen haben kann, ist aber bisher nicht bekannt.

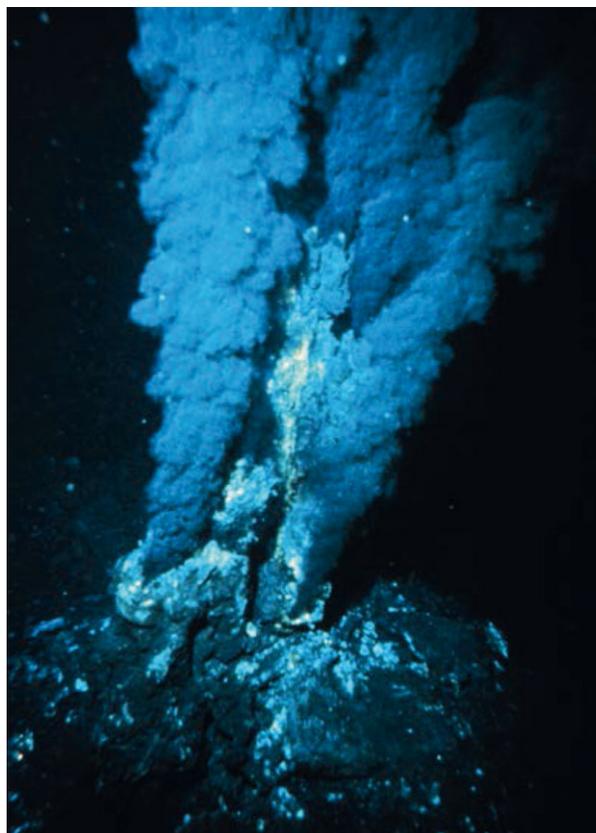
### Das Lösungsmittel ‚Zelle‘ unter extremen Bedingungen

Das zunehmende Interesse an der Erforschung neuartiger Lebensräume, die vorher oftmals als unbewohnbar galten – von den heißen Quellen im Yellowstone-Park, den Permafrostregionen in der Antarktis bis zu Meerestiefen von 10 km Tiefe – haben auch die besondere Rolle des zellulären Lösungsmittels „Zytoplasma“ in den Fokus des Interesses gerückt (Abbildung 5).

Im Gegensatz zum Menschen tolerieren viele Tiefseefische und Mikroorganismen sogar Drücke von mehreren 100 bis 1000 bar. Wahrscheinlich kommt unser erster Vorfahre LUCA (Last Universal Common Ancestor) sogar aus der Tiefsee, wo unter erhöhtem Druck, abgeschirmt von der extremen Strahlung auf der frühen Erdoberfläche, möglicherweise unter Zuhilfenahme katalytischer RNA, erste Lebensformen entstanden. Vieles scheint dafür zu sprechen, z.B. eine erhöhte Toleranz gegenüber erhöhten Drücken, die in allen Domänen des Lebens gefunden wurden [6].

Bislang gibt es nur vage Vorstellungen darüber, wie sich die Anpassung dieser Organismen an Bedingungen erhöhten Drucks vollzieht. Bekannt ist z.B., dass Tiefseeorganismen gerne Osmolyte im Zellinneren nutzen. Als Osmolyte werden Substanzen bezeichnet, die von einer Zelle gebildet werden, um den osmotischen Druck des Zytoplasmas an die Umgebung anzugleichen. Zu den Mechanismen, die zu einer Anreicherung von Osmolyten in der Zelle führen, gehören intrazelluläre Synthesesteigerung, verzögerter Abbau oder Import in die Zelle. Ein bemerkenswerter Osmolyt ist das Trimethyl-N-Oxid, das sogar als „Piezolyt“ bezeichnet wird, da es nicht nur Proteine gegen Temperaturstress zu stabilisieren vermag, sondern auch dem destabilisierenden Effekt von Druck auf biomolekulare Systeme in der Tiefsee entgegenwirkt [21]. Wie genau es arbeitet, ist bislang allerdings noch weitgehend Spekulation. Es scheint der druckinduzierten Änderung der Wasserstruktur entgegenzuwirken und Biomoleküle und biomolekulare Prozesse, wie die drucksensitive Polymerisation von Aktin zum Aktinzytoskelett, durch den Volumenausschluss-Mechanismus zu stabilisieren (Abbildung 6) [21–23].

Wie sich die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und TMAO bei hohem Druck verändern, wurde kürzlich mit Infrarotspektroskopie und Computersimulationen

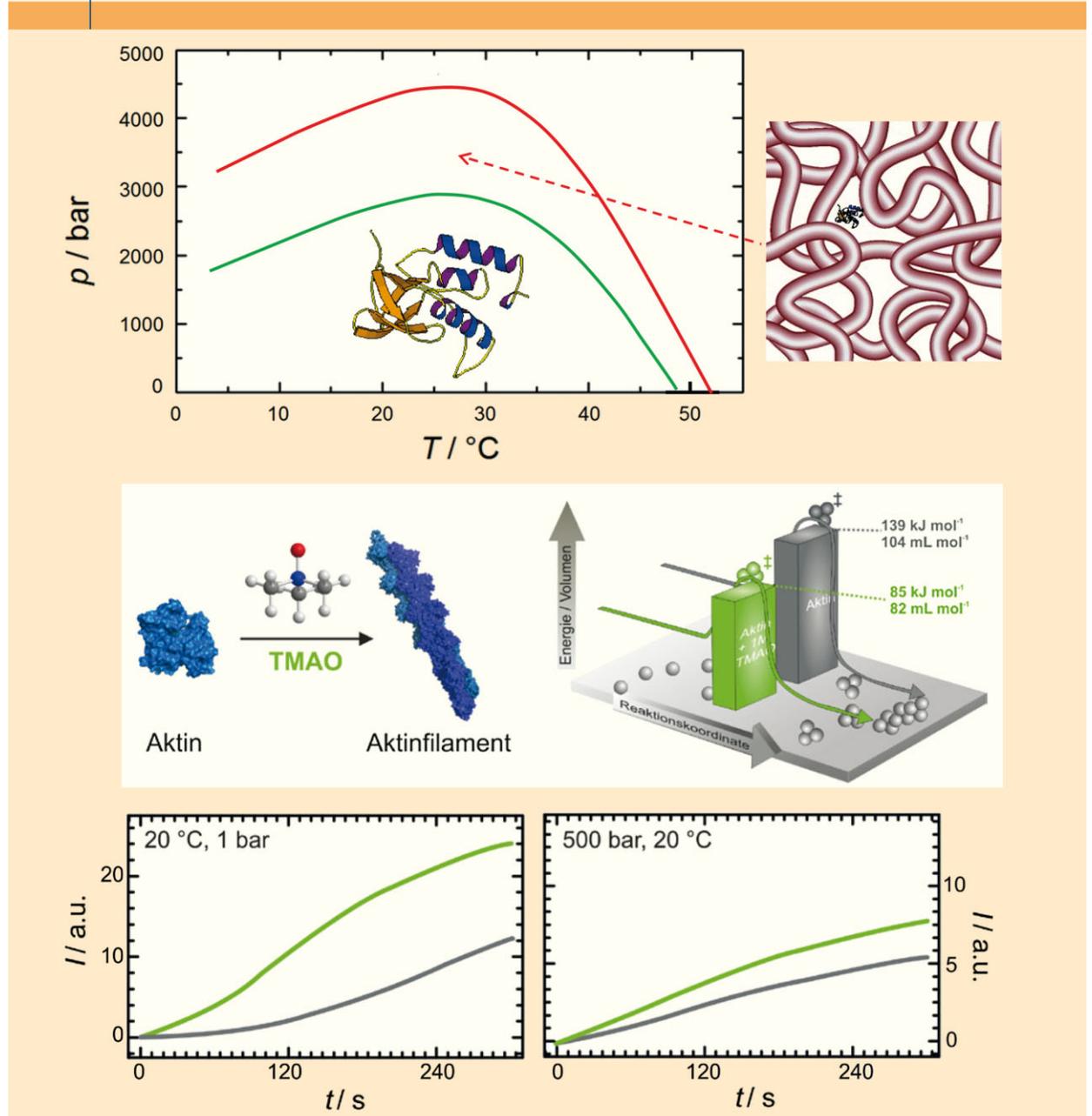


**Abb. 5** Einige Lebewesen lieben extreme Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen oder hohe Drücke, die beispielsweise in der Nähe von Hydrothermalquellen in der Tiefsee herrschen. Quelle: P. Rona, OAR/National Undersea Research Program (NURP); NOAA.

analysiert. Aus der Form und druckabhängigen Frequenzverschiebung der Schwingungsmoden des TMAO konnte geschlossen werden, dass die NO-Gruppe des TMAO bei hohen Drücken neben drei auch vier H-Brücken auszubilden vermag und damit seine Solvationsseigenschaften drastisch verändert [24].

Aber nicht nur bestimmte Osmolyte, auch der oben angesprochene *Crowding*-Effekt führt zu einer Stabilisierung von Proteinen gegenüber hohen Drücken (Abbildung 6). Neben der Adaption ihres zellulären Milieus besitzen Extremophile jedoch noch weitere Strategien, die sie gegenüber äußeren Stressbedingungen unempfindlicher machen,

ABB. 6 ■



**a)** Einfluss eines makromolekularen Crowders (30 % des Polysaccharids Ficoll, Radius ca. 5 nm) auf das Druck-Temperatur-Stabilitätsdiagramm eines monomeren Proteins, der Staphylokokken-Nuklease, SNaSe (rot: mit Crowder, grün: ohne Crowder-Zusatz). Nicht nur die Temperatur-, auch die Druckstabilität des Proteins wird durch den Crowder drastisch erhöht [25]. **b)** Einfluss des Osmolyten TMAO auf die Temperatur- und Druckabhängigkeit der Polymerisation von Aktin, einem zentralen Bestandteil des Zytoskeletts (rote Kurven: ohne TMAO, grüne Kurven: mit 1 M TMAO). Druckeinwirkung führt zur Depolymerisation der Aktinfilamente. Der Osmolyt TMAO beschleunigt nicht nur die Polymerisationsreaktion des Aktins (die Aktivierungsenergie sinkt von 139 auf 85 kJ/mol), es ist auch in der Lage, den druckinduzierten Depolymerisationsprozess signifikant zu reduzieren (das Aktivierungsvolumen sinkt von 104 auf 82 mL/mol). Adaptiert von Rosin et al. (2015) [23].

etwa die oben erwähnte Änderung der Membranzusammensetzung oder die Hochregulierung von Chaperonen, Proteine, die die Proteinfaltung erleichtern und deren Missfaltung unterbinden helfen [6].

Die Kenntnis, welche zelluläre biochemische Anpassungen Organismen entwickelt haben, um extreme Lebensräume zu erobern, Lebensräume, in denen Lebewesen wie wir nicht lebensfähig sind, ist nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung, sondern auch für die Biotechnologie relevant. Sie hilft nicht nur, die Lebensvorgänge unter Extrembedingungen zu verstehen, sondern auch diese „Erfindungen der Natur“ für den Menschen nutzbar zu machen, z.B. für die Optimierung biotechnologischer Prozesse, wie die Steuerung mikrobieller Fermentationsprozesse und enzymatischer Reaktionen.

### Zusammenfassung

*Bisher erlauben nur wenige, meist komplexe Techniken, Biomoleküle in zellulärer Umgebung zu untersuchen. Doch es ist klar, dass es in einigen Fällen deutliche Unterschiede zwischen einem verdünnten Puffer und dem komplexen zellulären Milieu geben kann. Diese Unterschiede zu verstehen und sie im biologischen Kontext zu bewerten, wird Aufgabe zukünftiger Studien und Modelle sein. Dabei können neue Techniken wie In-Zell-NMR oder FRET helfen, krankheitsrelevante Mechanismen aufzudecken und neue Therapeutika bzw. Therapie-Ansätze zu entwerfen und zu testen. Es wird deutlich, dass die Zelle als komplexes Lösungsmittel nicht nur eine passive Umgebung darstellt, sondern wichtiger Bestandteil biomolekularer Prozesse ist. Die Kenntnis der biochemischen Anpassungen des zellulären Milieus, die Organismen entwickeln, um extreme Lebensräume zu erobern, hilft, die Lebensvorgänge unter Extrembedingungen besser zu verstehen sowie für biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen.*

### Summary

*The interior of a living cell is very distinct from dilute aqueous solutions that are often used to study the function of proteins and enzymes experimentally. Here, we discuss novel experimental techniques and modeling approaches that provide a deeper understanding of the effects of crowding, intermolecular interactions, and the influence of osmolytes in realistic biological environments, including cells. Further, we discuss adaptation mechanisms involving in-cell solvation environments to extreme conditions, such as high pressure in the deep sea, and their relevance to biotechnology.*

### Schlagwörter

Proteinfaltung, makromolekulares ‚Crowding‘, Osmolyte, Extremophile, Volumen-Ausschluss-Effekt

### Literatur

- [1] E. H. McConkey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 3236–3240.
- [2] J. A. Dix und A. S. Verkman, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 247–263.
- [3] M. A. DePristo, D. M. Weinreich und D. L. Hartl, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 678–687.

- [4] Y. Phillip V. Kiss und G. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 1461–1466.
- [5] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, 884–890.
- [6] I. Daniel, P. Oger und R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 858–875.
- [7] A. P. Minton, *Biopolymers* **1981**, 20, 2093–2120.
- [8] D. Gnutt, M. Gao, O. Brylski, M. Heyden und S. Ebbinghaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 2548–2551; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 2578–2581.
- [9] F. R. Blattner, G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao, *Science* **1997**, 277, 1453–62.
- [10] S. Ebbinghaus, A. Dhar, D. McDonald und M. Gruebele, *Nat. Methods* **2010**, 7, 319–323.
- [11] Y. Ito und P. Selenko, *Curr Opin Struc Biol* **2010**, 20, 640–648.
- [12] D. I. Freedberg und P. Selenko, *Annu. Rev. Biophys.* **2014**, 43, 171–192.
- [13] R. Hänsel, L. M. Luh, I. Corbeski, L. Trantirek und V. Dötsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10300–10314; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 10466–10480.
- [14] D. Sakakibara, *Nature* **2009**, 458, 102–U110.
- [15] P. Mereghetti, R. R. Gabdoulina und R. C. Wade, *Biophys. J.* **2010**, 99, 3782–3791.
- [16] S. R. McGuffee und A. H. Elcock, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, 6, e1000694.
- [17] V. Prytkova, et al., *J. Phys. Chem. B* **2016**, in press.
- [18] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner und M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20749–20752.
- [19] M. Heyden und D. J. Tobias, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, 111, 218101.
- [20] A. Kuffel und J. Zielkiewicz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 6728–6733.
- [21] P. H. Yancey, M. E. Geringer, J. C. Drazen, A. A. Rowden und A. Jamieson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 4461–4465.
- [22] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan und R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11413–11416; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 11615–11618.
- [23] C. Rosin, K. Estel, J. Hälker und R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, 16, 1379–1385.
- [24] S. Imoto, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, in press.
- [25] M. Erlkamp, S. Grobelny und R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 5965–5976.

### Die Autoren



Matthias Heyden hat an der Ruhr-Universität Bochum Biochemie studiert und 2010 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II bei Martina Havenith promoviert. Anschließend arbeitete er als Postdoktorand mit Douglas J. Tobias an der University of California, Irvine. Seit 2013 ist er RESOLV-Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr. In seiner Forschung verwendet er Molekulardynamik und Monte-Carlo-Simulationen zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und ihrer solvatisierenden Umgebung.



Simon Ebbinghaus hat an der Ruhr-Universität Bochum und der Universität Oxford Chemie und Biochemie studiert und 2007 im Lehrstuhl für Physikalische Chemie II bei Martina Havenith promoviert. Von 2008 bis 2010 arbeitete er als Feodor-Lynen-Forschungsstipendiat mit Martin Gruebele an der University of Illinois in Urbana-Champaign (USA). Im Rahmen des NRW-Rückkehrprogramms kam er als Junior-Professor an die Ruhr-Universität Bochum zurück. Mittels eigens entwickelter In-Zell-Methoden untersucht er die Einflüsse von zellulären Umgebungen auf biomolekulare Funktion und Fehlfunktion.



Roland Winter studierte Chemie an der Universität (TH) Karlsruhe und wurde 1982 in Physikalischer Chemie promoviert. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der School of Chemical Sciences in Urbana-Champaign (USA) habilitierte er sich 1991 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg. Seit 1993 hat er den Lehrstuhl für Physikalische Chemie I an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der TU Dortmund inne. Seine Forschungsschwerpunkte liegen im Bereich der Biophysikalischen Chemie mit Fokus auf Membranbiophysik, Proteinfaltung, Amyloidbildung von Proteinen, Signaltransduktion sowie Hochdruckeffekten in der molekularen Biophysik.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Roland Winter  
Physikalische Chemie I,  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie,  
Technische Universität Dortmund  
E-Mail:roland.winter@tu-dortmund.de