



23.04.2024

Pressemitteilung: Proteintröpfchen in der Zelle: Sind sie wirklich Kondensate?

Teaser: Eine von MPI-Forschenden entwickelte Strategie zur Bewertung der Rolle der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) bei der Zellteilung zeigt eine geringe Vorhersagekraft etablierter LLPS-Tests

In Zellen wimmelt es von Millionen verschiedener Biomoleküle, die chaotisch durch ihre Unterstrukturen diffundieren. Und doch kann eine exquisite funktionelle und räumliche Genauigkeit ihrer Funktion gewährleistet werden. So interagieren unterschiedliche Biomoleküle spezifisch in zellulären Prozessen, was zu zielgerichteten zellulären Antworten führt. Dies wird häufig dadurch erreicht, dass Biomoleküle in subzelluläre Kompartimente gelenkt werden. Kompartimente wie Mitochondrien sind räumlich durch Membranen getrennt. Andere, wie die Nukleoli, haben überhaupt keine Membran. Wie diese membranlosen Kompartimente entstehen, ist noch immer eines der größten Rätsel der Biologie. In den letzten Jahren wurde ein Phänomen namens Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) als treibende Kraft für die Kompartimentbildung vorgeschlagen. Die Gruppe um Andrea Musacchio, Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, hat nun eine Validierungsstrategie entwickelt, um die Rolle der LLPS bei der Kompartimentbildung und gängige Methoden zum Nachweis von LLPS-Eigenschaften zu bewerten. Mit dieser Strategie konnten die Forschenden zeigen, dass der bekannte LLPS-Treiber CPC, der den Prozess der Zentromerbildung steuern soll, keine LLPS-Eigenschaften hat und die LLPS-Tests nur eine schwache Vorhersagekraft haben. Diese neue Strategie hat das Potenzial, ein wichtiges Instrument zur Validierung der Rolle anderer potenzieller LLPS-Treiber zu werden, die bisher identifiziert wurden.

Proteine erfüllen die meisten Funktionen in unserem Körper durch die Interaktion mit anderen Proteinen. Dabei stehen sie jedoch vor einem Dilemma - sie bewegen sich in der Zelle mit 40 Millionen potenziellen Interaktionspartnern. Den richtigen Partner zu finden, kann daher der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen gleichen. Doch die Zelle hat eine Strategie gefunden, die Wahrscheinlichkeit deutlich zu erhöhen, dass ein Protein zufällig den richtigen Partner zur richtigen Zeit trifft. So wie sich zwei Menschen am Arbeitsplatz, im Café oder im Club begegnen, leiten räumliche Hinweise Proteine zu bestimmten Zellkompartimenten, wie der Plasmamembran oder dem Mitochondrium. Der Prozess der Zellteilung beispielsweise wird durch Signalprozesse an der Zellmembran eingeleitet, die Enzyme aktivieren, deren Signale schließlich im Zellkern gezielt Gene einschalten. Bei der anschließenden Zellteilung führt eine Vielzahl spezifischer Proteininteraktionen zur Bildung eines vielschichtigen Proteinkomplexes an den Zentromeren der Chromosomen, der die fehlerfreie Verteilung der Chromosomen einer Mutterzelle auf ihre beiden Töchter gewährleistet. Die Natur hat eine bestimmte Chemie für interagierende Proteine entwickelt: Proteine, die füreinander bestimmt sind, verfügen über evolutionär konservierte und exponierte Grenzflächen mit detaillierten chemischen Identitäten in ihrer 3D-Struktur, die zueinander passen. Diese Motive finden sich artübergreifend und ermöglichen hochspezifische Proteininteraktionen.

Ein Paradigmenwechsel?

Um die Jahrhundertwende wurden erstmals zelluläre Kompartimente beobachtet, die nicht durch physische Grenzen abgegrenzt sind. Heute wissen wir, dass Nukleoli, P-Körperchen oder Stressgranula Makromoleküle, hauptsächlich Proteine und RNA, konzentrieren und wichtige Funktionen in der Zelle haben. Die Entdeckung



dieser membranlosen Kompartimente hat ein neues Forschungsgebiet voller unbeantworteter Fragen eröffnet. Wie diese Kompartimente gebildet werden und wie sie ihre Struktur beibehalten, ist dabei von größtem Interesse. In den letzten Jahren hat die Idee, dass sich diese Kompartimente durch eine Entmischung von zwei flüssigen Phasen (Flüssig-Flüssig-Phasentrennung) bilden, stark an Bedeutung gewonnen: Ein Prozess vergleichbar mit der spontanen Bildung von Öltröpfchen in Wasser. Nach dieser Annahme sind membranlose Kompartimente "Kondensate", deren Bildung auf vorübergehende, schwache und unspezifische Wechselwirkungen von "Treiber"-Proteinen beruht. So reichern sich diese Proteine in höherer Konzentration als im umgebenden Medium an. Mit Hilfe von Tests, die die Phasentrennungseigenschaften von Proteinen außerhalb der Zelle untersuchen, konnten bisher Dutzende dieser Treiber identifiziert werden, darunter auch der chromosomale Passagierkomplex (CPC). Von CPC wird behauptet, dass es Kondensate am Zentromer bildet, um dessen Organisation und Funktion während der Mitose zu modulieren.

In vitro ist nicht *in vivo* - man kann das Zytosol nicht vernachlässigen

"Für viele Forschende ist die Phasentrennung zur Standarderklärung für die Bildung von membranlosen Kompartimenten geworden. Es gibt jedoch kaum Belege dafür, dass *in vitro* durchgeführte LLPS-Tests wirklich einen physiologischen Prozess in der Zellumgebung vorhersagen können", sagt Musacchio. Zusammen mit seinem Team hat er eine Strategie entwickelt, um einen weit verbreiteten LLPS-Test und seine Vorhersagekraft zu bewerten, und diese auf CPC angewendet. "Unserer Meinung nach besteht eine große Schwäche des Tests darin, dass er das Lösungsmittel nicht mit ausreichender Genauigkeit modelliert. Das Lösungsmittel bestimmt die Löslichkeit eines Proteins und damit seine Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren". Um die natürliche Umgebung der Zelle so genau wie möglich nachzubilden, fügten die Forschenden verdünnte Lysate von Bakterien- oder Säugetierzellen zu Standard-LLPS-Puffern hinzu. Selbst bei stark verdünnten Konzentrationen verhinderten die Lysate die Bildung von Kondensaten vollständig. Um auf Nummer sicher zu gehen, wiederholten die Forschenden das gleiche Experiment mit mehreren zusätzlichen Proteinen, die alle im Standardtest LLPS-Eigenschaften zeigten. Und tatsächlich: In allen Fällen löste die Zugabe von Zelllysaten die Kondensate auf. "Diese Ergebnisse bestätigen unsere Annahme, dass die zelluläre Umgebung die unspezifischen schwachen Wechselwirkungen, von denen man annimmt, dass sie LLPS *in vitro* verursachen, wirksam puffert", sagt Musacchio.

Schlechte Vorhersagekraft

Die Interaktion und die Funktion von Proteinen in der Zelle werden stark durch sogenannte posttranslationale Modifikationen reguliert. Das gezielte Hinzufügen oder Entfernen von Phosphatgruppen an kritischen Stellen kann beispielsweise die Interaktion zwischen zwei Proteinen mit sofortiger Wirkung stören. Diese natürlichen Modifikationen können im Labor durch Mutationen imitiert werden. So werden viele natürliche Prozesse untersucht. Durch die Einführung von Mutationen an vier Resten, die an der Erkennung von phosphorylierten Stellen beteiligt sind, erzeugten die Forschenden eine Mutante des CPC, die nicht an Zentromeren rekrutiert werden kann und sich dort nicht anreichert. Dennoch zeigte diese Mutante im *in-vitro*-Assay das volle LLPS-Potenzial. Dies offenbart, dass der Assay nicht in der Lage ist, die Lokalisierung und Funktion des CPC vorherzusagen.

"Unsere Ergebnisse zeigen, dass LLPS einer einzelnen Komponente *in vitro* keine Vorhersage über die Löslichkeit und Lokalisierung in der komplexen und überfüllten Umgebung der Zelle machen kann. Die Liste der mutmaßlichen LLPS-Treiber, die durch die etablierten Assays identifiziert wurden, muss umfassend überprüft werden, und die Validierungsstrategie, die wir hier vorstellen, kann diese Bemühungen anleiten",



sagt Musacchio. „Für die Zukunft planen wir, unsere Experimente mit vielen der mutmaßlichen LLPS-Treiber zu wiederholen, insbesondere mit denen, die sich zu Vorzeigeobjekten in der Entwicklung des LLPS-Feldes entwickelt haben. Unsere Experimente zeigen, dass das Zytosol ein starkes Lösungsmittel ist, dessen Rolle nicht vernachlässigt werden darf. Daher wird es wichtig sein, geeignete zytomimetische Medien als Standards für die Bewertung biochemischer Reaktionen *in vitro* zu entwickeln. Wir werden versuchen, einen Beitrag zu diesem Forschungsbereich zu leisten“.

Teaserbild:



Proteine müssen ihre Partner in der Zelle unter Millionen von potenziellen Interaktionspartnern finden.

Originalpublikation:

Hedtfeld M, Dammers A, Koerner C, Musacchio A (2024). A validation strategy to assess the role of phase separation as a determinant of macromolecular localization. *Mol Cell*

Doi: [10.1016/j.molcel.2024.03.022](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.03.022)

Kontakt:

Korrespondierender Autor:
Prof. Dr. Andrea Musacchio
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Mechanistische Zellbiologie
Tel.: +49 231 133 2101
E-Mail: andrea.musacchio@mpi-dortmund.mpg.de

Pressearbeit:
Johann Jarzombek



Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Tel.: +49 231 133 2522

E-Mail: Johann.Jarzombek@mpi-dortmund.mpg.de