



Effekte des Volumenausschlusses in lebenden Zellen**

David Gnuß, Mimi Gao, Oliver Brylski, Matthias Heyden und Simon Ebbinghaus*

Abstract: Biomoleküle entstehen und funktionieren in einer dicht gepackten und heterogenen zellulären Umgebung. Diese Bedingungen werden im Reagenzglas oft durch Zugabe künstlicher makromolekularer „Crowding“-Reagentien imitiert. Dennoch ist es unklar, ob solche Kosolventien tatsächlich die physikalischen und chemischen Eigenschaften der zellulären Umgebung widerspiegeln, da der zelluläre „Crowding“-Effekt bisher nicht quantifiziert wurde. Wir haben einen makromolekularen „Crowding“-Sensor, der auf einem FRET-markiertem Polymer basiert, entwickelt, um diese Effekte zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Volumenausschlusseffekte zu keiner Kompression des Sensors in der Zelle führen. Die durchschnittliche Konformation des Sensors ist dabei ähnlich zu der im verdünnten Puffer sowie im Zell-Lysat. Ferner ist der zelluläre „Crowding“-Effekt heterogen verteilt und verändert sich signifikant während eines osmotischen Schocks. Mithilfe dieser Methode lässt sich der zelluläre „Crowding“-Effekt als Regulator von biomolekularen Reaktionen systematisch untersuchen.

Das Innere einer Zelle stellt eine dicht gepackte Umgebung („Crowding“) dar, in der Makromoleküle bis zu 40 % des verfügbaren Volumens ausfüllen.^[1] Biochemische Assays und analytische Methoden werden trotzdem zumeist *in vitro*, in verdünnten wässrigen Lösungen, eingesetzt und die Effekte der dicht gepackten zellulären Umgebung dadurch selten berücksichtigt. Der makromolekulare „Crowding“-Effekt wird oft als Volumenausschlusseffekt beschrieben.^[2] Dieser

kann *in vitro* experimentell durch Zugabe synthetischer makromolekularer „Crowding“-Reagentien wie Ficoll 70, Polyethylenglykol (PEG) oder Dextran imitiert werden.^[3] Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass durch Reduktion des molekularen Volumens Proteine stabilisiert,^[4] Proteinaggregation^[5] und Enzymkatalyse^[4] beschleunigt oder eine Kompression von ungeordneten Proteinen herbeigeführt werden kann.^[6]

Das Denkmodell des Volumenausschlusses kann jedoch nicht einfach auf die zelluläre Ebene übertragen werden, wie es widersprüchliche Ergebnisse zu zellulären Proteinstabilitäten zeigen. Zum Beispiel werden Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und die B1-Domäne von Protein G stabilisiert, wohingegen VlsE oder Chymotrypsin-Inhibitor 2 durch zelluläre oder zellähnliche Umgebungen destabilisiert werden.^[7] Eine allgemeine Stabilisierung, wie sie durch die Theorie des Volumenausschlusses vorhergesagt wird, konnte nicht beobachtet werden.^[2,8]

Um den Effekt des Volumenausschlusses in lebenden Zellen mit räumlicher und zeitlicher Auflösung zu charakterisieren, entwickelten und verwendeten wir in dieser Arbeit einen „Crowding“-Sensor. Dafür wurde Polyethylenglykol (PEG, 10 kDa) als gut lösliches, inertes und biokompatibles „Random-Coil“-Polymer eingesetzt (Abbildung S1), das selbst als makromolekulares „Crowding“-Reagens Verwendung findet.^[6] *In vitro* konnte zuvor gezeigt werden, dass PEG besonders empfindlich auf den Volumenausschlusseffekt reagiert.^[9] Neutronenstreuungsexperimente zeigen eine 30 %-ige Kompression des Gyrationradius von PEG in Ficoll 70 (270 mg mL⁻¹).^[9] Die Begrenzung des Konformationsraums führt zur strukturellen Kompression und Kompaktierung des Makromoleküls – ein Markenzeichen des Volumenausschlusseffekts.^[2]

Zur Messung des End-zu-End-Abstands durch FRET (Abbildung 1a) wurde PEG durch Endgruppenkupplung mit Atto488 und Atto565 funktionalisiert. Der FRET-Wert lag bei (40.3 ± 0.2) % (Mittelwert ± Standardabweichung) *in vitro*. Die Zugabe und Erhöhung der Konzentration des makromolekularen „Crowding“-Reagens Ficoll 70 führte zu einer Kompression des Sensors und somit zu einem Anstieg des FRET-Signals (Abbildung 1b). Die Kontrolle mit dem Osmolyt Sucrose, ein monomeres Äquivalent von Ficoll, zeigte nur eine geringfügige Kompression des Sensors (Abbildung 1b). Ein ähnliches Verhalten wurde für PEG beobachtet. Das makromolekulare „Crowding“-Reagens PEG (10 kDa) verursachte eine starke Kompression des Sensors, die in Anwesenheit der Oligomere mit geringerem Molekulargewicht (200 Da) oder des Monomers Ethylenglykol (EG) weniger ausgeprägt war. Weiterhin untersuchten wir den Effekt des Osmolyts TMAO auf die Konformation des Sensors, da TMAO-Proteine vermutlich durch einen wasservermittelten Mechanismus und weniger durch den Volumen-

[*] D. Gnuß, M. Gao, O. Brylski, Prof. Dr. S. Ebbinghaus
Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)
E-Mail: simon.ebbinghaus@rub.de

Dr. M. Heyden
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (Rückkehrerprogramm) und von dem Exzellenzcluster RESOLV (EXC 1069) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). D.G. wird unterstützt durch die Internationale Graduiertenschule für Neurowissenschaften (Ruhr-Universität Bochum). Wir bedanken uns bei M. Hollmann für die Bereitstellung von *Xenopus*-Oozyten. Weiterhin danken wir M. Senske für die Hilfe bei den DSC-Messungen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409847> zu finden.

 © 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

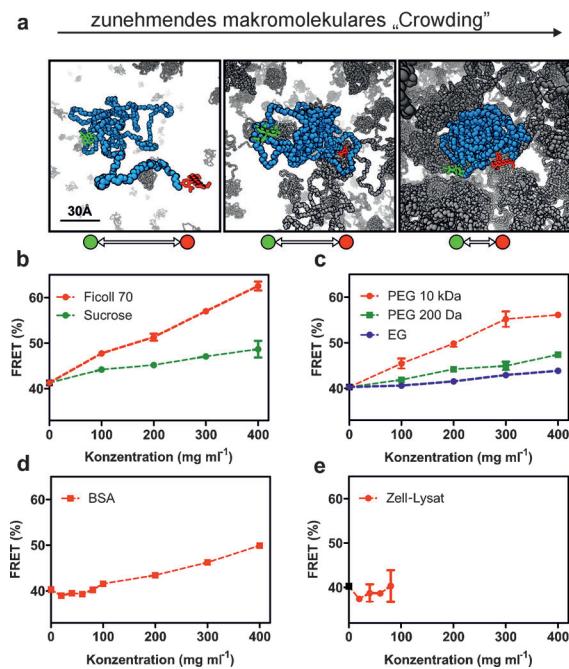


Abbildung 1. a) Illustration des markierten PEG-Sensors in verschiedenen Konzentrationen von „Crowding“-Reagens (PEG, 10 kDa). Maßstab: 30 Å. b–e) FRET-Effizienzen, aufgetragen gegen verschiedene Konzentration an „Crowding“-Reagens in DPBS-Puffer: b) Ficoll 70 und Sucrose, c) Polyethylenglykol (10 kDa), d) BSA und e) *X. laevis*-Oozytenlysat. Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$.

ausschlussseffekt stabilisiert (Abbildung S2).^[10] TMAO führte nur zu geringen Änderungen in der Sensor-Kompaktheit und der FRET-Effizienz. Ferner wies der Sensor keine signifikanten Konformationsänderungen bei pH- oder Salzänderungen in einem physiologischen Bereich auf (Abbildung S3). Somit konnten wir zeigen, dass der Sensor besonders empfindlich auf die makromolekulare Natur der „Crowding“-Reagentien reagiert.

Um die zelluläre Umgebung *in vitro* zu imitieren, testeten wir das Verhalten des Sensors in Lösungen des Proteins Rinderserumalbumin (BSA, Abbildung 1d) sowie in zytoplasmatischem Extrakt (Abbildung 1e), der aus *X. laevis*-Oozyten gewonnen wurde.^[11] Für beide konnten wir zunächst eine geringe Expansion des Sensors bei niedrigen Konzentrationen beobachten. Bei hohen Konzentrationen von BSA wurde eine signifikante Kompression des Sensors im Vergleich zu der expandierten Konformation bei 20 mg mL⁻¹ gefunden. Das Zell-Lysat, das nur bis 80 mg mL⁻¹ konzentrierbar war, verursachte bei seiner höchsten Konzentration keine signifikante Kompression des Sensors.

Als nächstes injizierten wir den Sensor in lebendige HeLa-Zellen (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Mithilfe von Pixel-basierter Auswertung berechneten wir die FRET-Effizienzen mit subzellulärer Auflösung (Abbildung 2a).^[12] Anders als erwartet, führte das Zytoplasma mit einer Makromolekülkonzentration bis 400 mg mL⁻¹ zu keiner signifikanten Kompression des Sensors (Abbildung 2b). Vielmehr beobachteten wir, dass die FRET-Effizienz, gemittelt über das Zytoplasma einer einzelnen Zelle, ähnlich zu jener im verdünnten Puffer ist. Dies zeigt, dass in

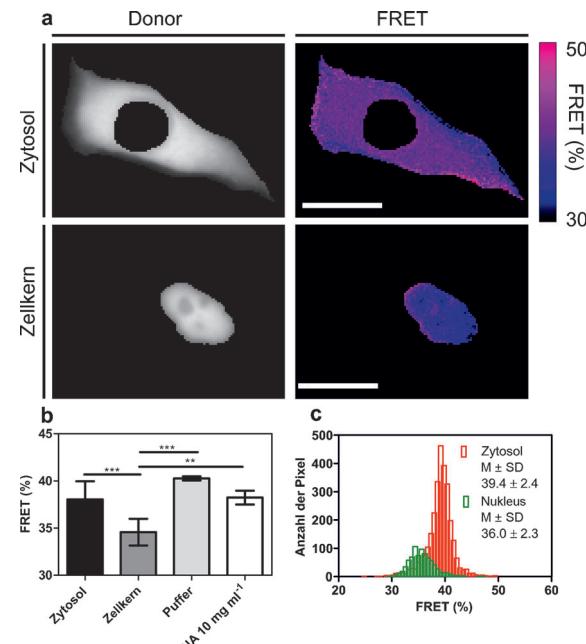


Abbildung 2. a) Repräsentative Donor-Bilder (Atto488) von zytosolisch und nuklear injizierten Zellen. Falschfarbenbilder der berechneten FRET-Effizienzen werden gezeigt. Maßstab: 20 µm. b) Vergleich der mittleren FRET-Effizienzen zwischen HeLa-Zytosol ($n=17$), HeLa-Zellkernen ($n=11$), 10 mg mL⁻¹ DNA-Lösung ($n=3$) und verdünntem Puffer ($n=3$). Einfaktorieller ANOVA und ein Post-Hoc-Tukey-Test wurden durchgeführt, um statistische Unterschiede zu identifizieren. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$. c) FRET-Effizienz-Histogramm des Zytosols und des Zellkerns.

der dicht gepackten Zelle eine Kraft existieren muss, die dem Volumenausschlussseffekt entgegen wirkt. Neuste Simulationen^[13] sowie Kernspinsresonanz-Experimente^[14] zeigen, dass diese Kraft auf schwache, transiente sowie nichtspezifische Wechselwirkungen (z.B. Van-der-Waals- oder hydrophobe Kräfte) zurückzuführen sei. Diese Wechselwirkungen sind proportional zu der exponierten Oberfläche^[13d,15] und stabilisieren somit die expandierte Kettenkonformation von PEG. Dies bildet einen Gegensatz zu den Volumenausschlussseffekten, die kompaktere Konformationen fördern. Dies stimmt mit Beobachtungen aus der Literatur überein, dass PEG durch nichtspezifische Bindung Proteine geringfügig destabilisiert.^[16] Das Ausbleiben eines dominierenden Volumenausschlussseffektes könnte somit erklären, warum nur minimale und widersprüchliche Einflüsse der zellulären Umgebung auf Proteinstabilitäten gefunden wurden im Gegensatz zu den In-vitro-Experimenten in polymeren „Crowding“-Reagentien.^[3,7]

Trotz des geringen Kompressionsunterschieds des Sensors im Zytoplasma und in verdünntem Puffer wies die zelluläre Umgebung ein unterschiedlich starkes „Crowding“ in verschiedenen Regionen auf. Dies zeigt eine Verbreiterung des Histogramms (Abbildung 2c) verglichen zur In-vitro-Referenz, die ein Maß für die experimentelle Ungenauigkeit darstellt (Abbildung S4). Trotz geringer Unterschiede im Volumenausschlussseffekt können diese signifikante Auswirkun-

gen auf die Regulation biomolekularer Funktionen haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass makromolekulares „Crowding“ das Faltungsgleichgewicht eines Proteins um wenige kJ mol^{-1} vom ungefalteten zum gefalteten Zustand hin verschieben kann.^[17] Dadurch könnten verschiedene „Crowding“-Regionen auch die Modulierung der Faltungslandschaft eines Proteins in subzellulären Umgebungen erklären.^[18]

Um subzelluläre „Crowding“-Variationen näher zu untersuchen, injizierten wir den Sensor direkt in den Zellkern. Verglichen mit der Konformation im Zytoplasma sowie in verdünntem Puffer ist der Sensor signifikant expandiert (Abbildung 2b). Wir zeigen, dass eine einfache Wechselwirkung zwischen DNA und PEG nicht in der Lage ist, diesen Effekt zu erklären, indem wir den Sensor in konzentrierter DNA Lösung *in vitro* untersucht haben (Abbildung 2b). Somit deutet die stärkere Expansion im Zellkern auf einen noch weniger ausgeprägten Volumenausschlusseffekt hin, der durch einen insgesamt geringeren Makromolekülanteil oder durch eine andere Zusammensetzung des Zellkerns erklärt werden könnte. Dies korreliert mit einer schnelleren Entfaltung von PGK im Zellkern, die auf eine geringere lokale Viskosität zurückgeführt wurde.^[19] Zusätzlich zeigen wir, dass der Zellkern, ähnlich wie das Zytoplasma, eine höhere „Crowding“-Heterogenität aufweist als verdünnter Puffer. Dies deutet auf eine komplexe „Crowding“-Umgebung in verschiedenen zellulären Kompartimenten hin. Neben der subzellulären Heterogenität beobachten wir eine Variabilität zwischen den gemessenen Zellen (Abbildung S5), sowohl für zytosolisch als auch für in den Zellkern injizierte Zellen. Wir zeigen, dass diese Variabilität nicht durch Konzentrationsunterschiede des Sensors in der Zelle verursacht wird (Abbildung S6). Eine ähnliche Variabilität zwischen individuellen Zellen wurde zuvor in Bezug auf Proteinstabilitäten beschrieben.^[19]

Ein physiologisch relevanter Prozess, in dem makromolekulares „Crowding“ eine wichtige Rolle spielen soll, ist die zelluläre Antwort auf osmotischen Stress.^[20] Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die mikroinjizierten Zellen hohen Salzkonzentrationen (500 mM NaCl) ausgesetzt, um somit die intrazelluläre Makromolekulkonzentration durch eine Reduzierung des Zellvolumens zu erhöhen. Wir zeigen, dass unmittelbar nach dem osmotischen Schock der Sensor stark komprimiert wurde (Abbildung 3, Video in den Hintergrundinformationen). Das beobachtete FRET-Signal entspricht einer linear extrapolierten Ficoll-70-Konzentration von 650 mg mL⁻¹. Folglich sind Biomoleküle in gestressten Zellen starken Kompressionskräften ausgesetzt, die aus Volumenausschlusseffekten resultieren. Diese Kräfte könnten insbesondere ungeordnete Proteine beeinflussen, die in Umgebungen mit hohem „Crowding“ kollabieren.^[6] Solche Bedingungen führen außerdem zu einer Beschleunigung der Proteinaggregation *in vitro*.^[5] Weiterhin könnte „Crowding“ eine Rolle bei der Entstehung von strukturell unterschiedlichen Proteinaggregaten spielen, die unter osmotischem Stress beobachtet wurden.^[21]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, trotz eines hohen „Crowding“-Anteils der zellulären Umgebung, der Volumenausschlusseffekt keine signifikante Kompression von Biomolekülen herbeiführt. Unsere Beobachtung kann da-

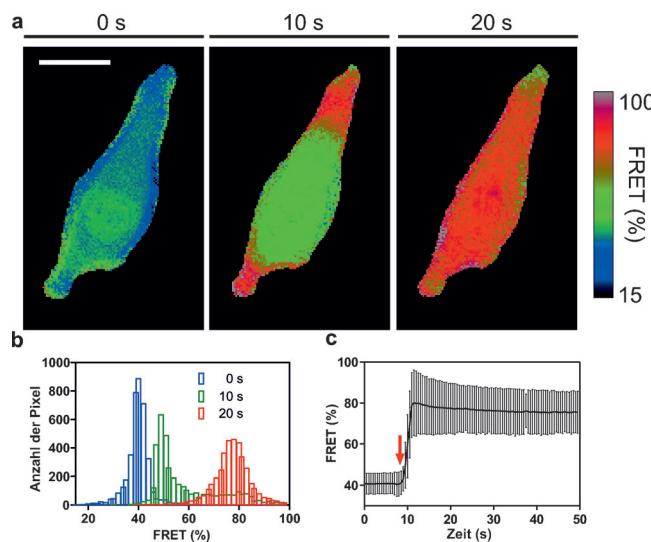


Abbildung 3. a) Falschfarbenbilder der berechneten FRET-Effizienzen zu drei verschiedenen Zeitpunkten des hypertonischen Schocks: vorher (0 s), unmittelbar nach Zugabe von 500 mM NaCl (10 s) und nach dem Schock (20 s). Maßstab: 20 μm . b) Histogramme der FRET-Effizienzen zu den verschiedenen Zeitpunkten. c) Gemittelte FRET-Effizienzen aufgetragen gegen die Zeit. Der Zeitpunkt der NaCl-Zugabe ist durch einen roten Pfeil markiert. Daten mit Fehlerbalken repräsentieren $M \pm SD$.

durch verstanden werden, dass nichtspezifische anziehende Wechselwirkungen dem Volumenausschlusseffekt entgegenwirken. Nichtsdestotrotz zeigen unsere Experimente mit osmotischem Stress, dass unter spezifischen Bedingungen der Volumenausschlusseffekt eine entscheidende Rolle in der zellulären Antwort auf Stress spielen könnte. Die beobachtete Zell-zu-Zell- sowie subzelluläre Heterogenität könnte weiterhin zu einer räumlichen Regulierung biomolekularer Funktion in der Zelle beitragen. Daher sind weitere Studien notwendig, um die physikochemischen Eigenschaften der zellulären Umgebung sowohl räumlich als auch zeitlich mit einem Biomolekülsensor zu korrelieren. Solche Studien werden zeigen, ob die zelluläre Umgebung eine inerte und native Matrix ist, in der Biomoleküle funktionieren, oder ob sie eine aktive Rolle in der Kontrolle biomolekularer Prozesse spielt.

Eingegangen am 7. Oktober 2014
Online veröffentlicht am 29. Dezember 2014

Stichwörter: Biophysik · Biosensoren · FRET · Makromolekulares „Crowding“ · Volumenausschlusseffekt

- [1] a) S. Zimmerman, S. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599–620;
- b) R. Ellis, A. Minton, *Nature* **2003**, *425*, 27–28.
- [2] A. Minton, *Biopolymers* **1981**, *20*, 2093–2120.
- [3] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [4] A. Dhar, A. Samiotakis, S. Ebbinghaus, L. Nienhaus, D. Homouz, M. Gruebele, M. Cheung, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17586–17591.

[5] D. Hatters, A. Minton, G. Howlett, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7824–7830.

[6] A. Soranno, I. Koenig, M. B. Borgia, H. Hofmann, F. Zosel, D. Nettels, B. Schuler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4874–4879.

[7] a) S. Ebbinghaus, A. Dhar, J. McDonald, M. Gruebele, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 319–323; b) W. B. Monteith, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11335–11340; c) I. Guzman, H. Gelman, J. Tai, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 11–20; d) M. Sarkar, A. Smith, G. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19342–19347.

[8] a) A. P. Minton, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 971–985; b) M. Cheung, D. Klimov, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4753–4758.

[9] C. L. Coeur, B. Demé, S. Longeville, *Phys. Rev. E* **2009**, *79*, 031910.

[10] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, K. P. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1192–1202.

[11] a) G. Matthews, A. Colman, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6405–6412; b) J. Martin, F. Hartl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1107–1112.

[12] J. Feige, D. Sage, W. Wahli, B. Desvergne, L. Gelman, *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *68*, 51–58.

[13] a) Y. C. Kim, J. Mittal, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 208102; b) R. Harada, N. Tochio, T. Kigawa, Y. Sugita, M. Feig, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3696–3701; c) A. Minton, *Biopolymers* **2013**, *99*, 239–244; d) S. R. McGuffee, A. H. Elcock, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000694.

[14] a) Y. Wang, C. Li, G. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9392–9397; b) M. Sarkar, J. Lu, G. Pielak, *Biochemistry* **2014**, *53*, 1601–1606; c) Q. Wang, A. Zhuravleva, L. M. Giersch, *Biochemistry* **2011**, *50*, 9225–9236.

[15] R. R. Gabdoulline, R. C. Wade, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9230–9238.

[16] a) M. Senske, L. Törk, B. Born, M. Havenith, C. Herrmann, S. Ebbinghaus, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9036; b) L. L. Lee, J. C. Lee, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7813–7819.

[17] J. Adén, P. Wittung-Stafshede, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2271–2277.

[18] S. Ebbinghaus, M. Gruebele, *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 314–319.

[19] A. Dhar, K. Girdhar, D. Singh, H. Gelman, S. Ebbinghaus, M. Gruebele, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 421–430.

[20] M. B. Burg, *Cell. Physiol. Biochem.* **2001**, *10*, 251–256.

[21] L. Moronetti Mazzeo, D. Dersh, M. Boccitto, R. Kalb, T. Lamitina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10587–10592.