

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Schlussbericht

Verbund: 05K2020 - 2019-06075 Protein-Dyn

Zuwendungsempfänger: Universität Siegen
Projektleitung: Prof. Dr. Christian Gutt
E-Mail: christian.gutt@uni-siegen.de
Förderkennzeichen: 05K20PSA
Förderzeitraum: 01.07.2020 - 30.06.2024
Zuwendung: 495.865,21 €
Projektträger: Projektträger DESY

Zusätzlicher Kontakt:
Zusätzlicher Name:

Genutzte Großgeräte:	Labor	Gerät	Experiment
Diplomarbeiten:	0		
Dissertationen:	1		
Habilitationen:	0		
Referierte Publikationen:	13		
Andere Veröffentlichungen:	5		
Patente:	0		
Bachelorarbeiten:	0		
Masterarbeiten:	0		
Staatsexamen:	0		

Dieser Bericht wurde beim Projektträger über einen individuellen Online-Zugang vom Projektleiter eingereicht und am 02.02.2025 12:09 für eine Veröffentlichung freigegeben.

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Universität Siegen

Projektleitung: Prof. Dr. Christian Gutt

Verbund: RAC Universitäten Siegen, Tübingen, Lund, Stockholm

Thema: Verbundprojekt 05K2020 - 2019-06075 Protein-Dyn: Dynamik von Proteinen in Lösungen auf multiplen Längen und Zeitskalen (Teilprojekt 1)

Zusammenfassung

Das Hauptziel des Projekts war die Untersuchung der Dynamik von Proteinen in dicht gepackten Umgebungen, in Kondensaten und während Phasenübergängen auf verschiedenen Längen- und Zeitskalen. Dazu wurden Röntgen-Photonen-Korrelationsspektroskopie (XPCS) an Synchrotron- und XFEL-Quellen sowie ergänzende neutronenspektroskopische Techniken eingesetzt. Die Kombination dieser Methoden ermöglichte ein umfassendes zeitliches und räumliches Verständnis der Dynamik biologischer Makromoleküle, insbesondere Proteine und Antikörper.

Technische und wissenschaftliche Errungenschaften:

- Entwicklung und erfolgreiche Inbetriebnahme eines schnellen Röntgen-Verschlussystems (250 Hz) an der Beamline P10 bei PETRA III zur Durchführung von Low-Dose-XPCS.
- Implementierung moderner Softwarelösungen für die Analyse und Speicherung großer Datenmengen sowie die Integration der Test-Instanz der Sci-cat-Plattform zur Erfassung von XPCS-Metadaten.
- Erste Erfolge im Bereich Machine Learning zur Optimierung der XPCS-Datenanalyse und Modellparameterextraktion.

Experimentelle Ergebnisse:

- Untersuchung der Denaturierung und Aggregation von Proteinen sowie LDL-Molekülen in Modellsystemen wie Eigelb und Eiweiß.
- Identifizierung raumzeitlicher Skalierungsgesetze und dynamischer Regime während Protein-Phasenübergängen und der Bildung biomolekularer Kondensate.
- Untersuchung der Diffusionseigenschaften von Proteinen in makromolekular überfüllten Lösungen und Selbst-Crowding-Effekten.

Herausforderungen und Projektkooperation:

Das Projekt wurde durch die COVID-19-Pandemie erheblich beeinträchtigt, was den experimentellen Betrieb an einigen Forschungsstationen einschränkte. Dennoch konnten durch enge Kooperationen mit den Großforschungsanlagen DESY und EuXFEL wesentliche Ziele erreicht werden. Die Zusammenarbeit mit Partnern in Tübingen, Lund und Stockholm erwies sich als entscheidend für den Projekterfolg. Trotz der Herausforderungen war das Projekt sehr erfolgreich und trug zur Entwicklung neuer Methoden und Technologien für die Untersuchung der Dynamik biologischer Makromoleküle bei. Die erzielten Erkenntnisse bieten potenzielle Anwendungen in der Pharma- und Lebensmittelindustrie sowie der Biotechnologie.

Bericht

1 Aufgabenstellung und Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Hauptziel des RÄC-Konsortiums besteht darin, die Dynamik von Proteinen in dichten Umgebungen, in Kondensaten und während Phasenübergängen auf den relevanten Längen- und Zeitskalen zu untersuchen. Dabei werden Zeiträume von 10^{-7} bis 10^2 Sekunden mittels Röntgen-Photonen-Korrelations-spektroskopie (XPCS) an Synchrotron- und XFEL-Quellen abgedeckt. Neutronenspektroskopische Techniken wie Neutron Spin Echo (NSE) und Neutronen-Rückstreuung (NBS) ergänzen diese Experimente, indem sie kürzere Zeitskalen von 10^{-12} bis 10^{-7} Sekunden erfassen. Durch die Kombination von XPCS und Neutronenspektroskopie wird ein umfassendes zeitliches und räumliches Fenster für die Untersuchung von Protein-Dynamiken in dichten Umgebungen abgedeckt.

Relevanz: Das Verständnis der Dynamik biologischer Makromoleküle wie Proteine oder monoklonaler Antikörper in dichten Umgebungen ist essenziell für zelluläre Prozesse (z. B. Signalübertragung und Proteinreaktionen) und die Entwicklung zukünftiger Protein-basierter Medikamente.

Technisches Ziel:

Im Rahmen dieses Projekts sollen Messaufbauten, Probenumgebungen und Methoden an mehreren Forschungsstationen (CoSAXS bei MAX IV, P10 bei PETRA III, ID10 bei ESRF und MID beim Europäischen XFEL) entwickelt und installiert werden.

Maßnahmen:

- Entwicklung eines schnellen Verschlussmechanismus (Shutter-Box) mit einer kontinuierlichen Wiederholungsrate von mindestens 100 Hz, um die Strahlendosis auf unter 10 kGy zu reduzieren und strahlungsempfindliche Proben zu schützen.
- Aufbau eines transportablen In-Line-Lichtstreu-Systems zur quantitativen Erfassung von Strahlenschäden.
- Entwicklung fortschrittlicher Analysealgorithmen und Software für die Bearbeitung großer Datenmengen (mehrere 100 TB pro Experiment) und für die schnelle Online-Datenauswertung.

Dieses Projekt zielt darauf ab, durch innovative Technologien ein besseres Verständnis der dynamischen Eigenschaften von Biomolekülen in Lösung zu ermöglichen.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Vor Beginn des Projekts waren Untersuchungen zur Dynamik von Proteinen in dicht gepackten Umgebungen und während Phasenübergängen aufgrund technischer Herausforderungen stark eingeschränkt. Zwar hatte sich die Röntgen-Photonen-Korrelationspektroskopie (XPCS) an Synchrotron-Quellen bereits als leistungsfähige Methode zur Analyse von Struktur und Dynamik in kondensierten Systemen wie Gläsern, Polymeren und Kolloiden etabliert, jedoch war ihre Anwendung auf Biomoleküle problematisch. Die Hauptgründe dafür lagen in den schwachen Streusignalen biologischer Proben sowie strahlungsbedingten Schäden, die durch die hohe Energie der Röntgenstrahlen verursacht wurden.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden verschiedene technische Maßnahmen ergriffen. So kam ein schneller Röntgen-Shutter zum Einsatz, der die Bestrahlungszeit durch eine schnelle Abschaltung des Strahls reduzierte. Zudem wurden XPCS Experimente mit größeren Röntgenstrahlen und erhöhten Probe-Detektor Abständen durchgeführt. Die Zugabe von Kryoprotektoren erprobt, um die Proben gegen strahlungsbedingte Schäden zu stabilisieren.

Das Projekt verfolgte somit das Ziel, durch die Kombination neuartiger Ansätze mit den einzigartigen kohärenten Eigenschaften von Synchrotron- und XFEL-Quellen sowie modernster Neutronenspektroskopie-Techniken eine umfassendere Untersuchung der Dynamik von Proteinen zu ermöglichen.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens sowie Kooperation mit Dritten

Der Ablauf und die Durchführung des Projektes wurde ganz wesentlich von den substanziellen Einschränkungen während der Covid-19 Pandemie beeinflusst. Wir sind den Großforschungsanlagen DESY und Eu-XFEL dankbar, dass sie den Experimentierbetrieb auch während der lock-down Phasen größtenteils aufrechterhalten haben, so dass zumindest Teile des Projektes durchgeführt werden konnten. Die Universität Siegen hatte besonders strenge lock-down Regelungen mit weitestgehender Einstellung des experimentellen Forschungsbetriebes, was das Projekt nachhaltig erschwert hat. Des Weiteren hat sich das XPCS-Programm an der CoSAXS Beamline bei MAX IV nicht realisieren lassen. Das Projekt hat sich deswegen auf die Beamlines P10/DESY und MID/Eu-XFEL konzentriert.

Während des Projektes konnten zwei long-term Proposal an P10 DESY und am MID / Eu-XFEL eingeworben werden, auf denen die wesentlichen Ergebnisse beruhen. Instrumentell haben wir den X-ray shutter realisieren und an der P10 in Betrieb nehmen können. Die komplementäre Anlage zur Detektion von Strahlenschaden mittels Lichtstreuung konnte noch nicht vollständig in Betrieb genommen werden. Wir haben Softwarelösungen für FAIR Daten implementiert.

Trotz der oben genannten Schwierigkeiten ist das Ergebnis des Projektes, dass die Messung von Proteinendynamik mittels XPCS an Synchrotron- und FEL-Strahlungsquellen ermöglicht wurde. Damit ist das Projekt sehr erfolgreich (siehe Publikationsliste) und hat eine neue Experimentiertechnik für die Dynamik biologischer Makromoleküle ermöglicht.

Das Projekt wurde mit den Kooperationspartnern in Tübingen, Lund und Stockholm durchgeführt.

4 Verwendung der Zuwendung (wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises, z. B. Investitionen, Personalmittel)

Personalmittel: Die Personalmittel des Projektes dienten zur Einstellung von Frau Dr. Nimmi Das Ananthurambil.

Investitionen: Die Investitionen dienten hauptsächlich zur Herstellung und Inbetriebnahme des Röntgenshutters.

5 Erzielte Ergebnisse mit Gegenüberstellung der vereinbarten Ziele

WP1

Das technische Ziel dieses RAC-Vorhabens, ein schnelles Verschlussystem zur Durchführung von Low-Dose-XPCS zu entwickeln und zu installieren, wurde erreicht. Ein schnelles Röntgen-Verschlussystem mit einer Frequenz von 250 Hz wurde in enger Zusammenarbeit zwischen der mechanischen und elektrischen Abteilung der Universität Siegen sowie P10, PETRA III und DESY entworfen, gebaut und getestet. Das vollständig entwickelte Verschlussystem ist nun an der P10-Strahllinie bei PETRA III am DESY installiert. Eine Publikation dazu wird demnächst in den SRI Proceedings veröffentlicht.

Wir konnten nachweisen, dass dieser Röntgen-Shutter in der Lage ist, Autokorrelationsfunktionen in verschiedenen nicht-linearen Abtastschemata zu erfassen. Dadurch wird die insgesamt absorbierte Strahlungs-dosis auf den Proben reduziert, was Low-Dose-XPCS auf strahlungsempfindlichen Proben ermöglicht.

Das in-line DLS-System konnte noch nicht vollständig installiert und in Betrieb genommen werden. Dies wird nach dem Projekt an der Beamline P10 erfolgen.

WP2

Wir haben zahlreiche Software-tools (Python) und Lösungen an den Beamlines P10 und MID-Eu-XFEL entwickelt und installiert. Darunter auch Pipelines zur Detektorkalibration für den AGIPD-Detektor, automatische Maskenerzeugung, Datenreduktion von TB an Rohdaten am Eu-XFEL auf kB Korrelationsfunktionen. Wir haben erste Resultate im Bereich der pattern recognition und des maschinellen Lernens für XPCS erzielt, indem wir Modellparameter aus XPCS-Daten mittels stochastischer Optimierung im latenten Raum extrahieren. Dabei wird eine Dimensionsreduktion mit Autoencodern durchgeführt, die

auf simulierten Daten trainiert wurden und einen Punktschätzer für ein inverses Problem ermöglichen. Die Simulationen basieren auf der Cahn-Hilliard-Gleichung und modellieren Phasentrennungen in Soft-Matter-Systemen – ein Prozess, der in Bereichen wie Biologie, Materialwissenschaft und Pharmazie von Bedeutung ist. Weitere Software-Tools, insbesondere im Bereich des de-noising, sind aus dem RAC-Projekt hervorgegangen und werden nun weiterentwickelt. Hier ist aufgrund der dynamischen Entwicklung im Bereich AI noch kein finales Stadium erreicht.

Im Rahmen des RAC-Projekts wurde eine erste Test-Instanz der Sci-cat-Plattform an der Beamline P10 bei PETRA III eingerichtet. Sci-cat dient als leistungsfähige Plattform zur Verwaltung und Strukturierung experimenteller Daten und bietet Potenzial für eine effiziente Erfassung und Speicherung von Metadaten für X-ray Photon Correlation Spectroscopy (XPCS) Experimente. Die Test-Implementierung umfasste die Bereitstellung auf einer dedizierten Serverumgebung sowie die Einrichtung einer Schnittstelle zur Beamline P10, um die automatische Übertragung experimenteller Rohdaten und relevanter Metadaten zu ermöglichen. Erste Anpassungen wurden vorgenommen, um spezifische Anforderungen von XPCS-Experimenten zu berücksichtigen, darunter benutzerdefinierte Metadatenfelder und grundlegende Suchfunktionen.

Die bisherige Nutzung der Test-Instanz zeigte bereits Potenzial für eine verbesserte Datenerfassung und Analyse. Strukturierte Datensätze ermöglichten einen effizienteren Vergleich zwischen Experimenten, und die Metadatenverwaltung unterstützte erste Analyseansätze. Dennoch sind weitere Entwicklungsarbeiten erforderlich, um die Plattform vollständig zu integrieren und ihre Funktionen für den routinemäßigen Betrieb an der Beamline auszubauen.

Eine der zentralen Herausforderungen bei der Durchführung von XPCS-Experimenten am MID-Instrument des EuXFEL mit Megahertz-Pulswiederholraten (sogenanntes MHz-XPCS) ist das enorme Datenvolumen (bis zu mehreren Petabyte während einer einzigen Messzeit) sowie die extrem hohen Produktionsraten, die 10 GiB/s übersteigen können. Eine effektive Handhabung solcher Datenmengen und die Sicherstellung einer optimalen Verarbeitungsleistung stellen eine anspruchsvolle rechentechnische Herausforderung dar.

Um die MHz-XPCS-Daten und Metadaten gemäß den FAIR-Prinzipien zugänglich und nutzbar zu machen, wurden folgende Schritte im Datenmanagement umgesetzt: (i) In Zusammenarbeit mit den MID- und DA-Gruppen des EuXFEL wurde die robuste, benutzerfreundliche und offene Software EXtra-speckle (<https://git.xfel.eu/dataAnalysis/extra-speckle>) entwickelt und erfolgreich sowohl auf vorhandenen Datensätzen als auch während der Messzeiten getestet. Diese Software steht sowohl für die lokale als auch für die Remote-Datenverarbeitung während und nach der Messzeit auf der EuXFEL/DESY-Computinginfrastruktur zur Verfügung und bietet anpassbare Einstellungen sowie automatisierte Filterfunktionen. (ii) Zur Durchführung einer nahezu in Echtzeit automatisierten Analyse der experimentellen Daten wurde EXtra-speckle erfolgreich mit DAMNIT, einem generischen Verarbeitungs- und Visualisierungstool von EuXFEL (<https://damnit.readthedocs.io/en/latest/>), integriert. Dieses Tool wird zudem verwendet, um Metadaten zu erfassen und mit dem myMdC-Metadatokatalog des EuXFEL zu verwalten. (iii) Aktuell wird eine sichere Verbindung zwischen DAMNIT und der FAIR-XPCS-Plattform (www.siegenstudycases.com) getestet, um eine Migration der „Top-Level“-Daten und Metadaten auf ein externes Speichersystem zu ermöglichen. Entsprechende Protokolle für die Datenübertragung werden derzeit entwickelt.

Die Kombination von EXtra-speckle und DAMNIT verbessert das Datenmanagement sowie die Effizienz der Analyse und wird voraussichtlich die Zusammenarbeit zwischen MHz-XPCS-Nutzern stärken. Diese Maßnahmen stehen im Einklang mit den FAIR-Prinzipien und sollen die langfristige Nutzbarkeit und Verfügbarkeit der Daten sicherstellen.

Xana – Analyse-Software für X-ray Photon Correlation Spectroscopy-Daten (<https://github.com/reiser/Xana>) ist eine Python-basierte, benutzerfreundliche Analysesoftware, die 2020 von unserer Gruppe zur Analyse von SAXS/XPCS-Datensätzen entwickelt wurde. Im Zusammenhang mit FAIR-Daten haben wir die Aktualisierung dieser Software zu Xana 2.0 initiiert, mit dem Ziel, FAIR-kompatible Dateiformate und Metadaten zu integrieren, um Nachhaltigkeit und Interoperabilität für langfristige Forschungsbedürfnisse zu gewährleisten. Zusätzlich liegt der Fokus darauf, die Dateiverwaltung zu modernisieren und die Kompatibilität mit aktuellen Speicherstandards sicherzustellen. Die Entwicklungsziele umfassen: (i) den Übergang zu standardisierten Dateiformaten wie HDF5 oder NetCDF für Ein- und Ausgabeoperationen, um die Kompatibilität mit den an Beamlines generierten umfangreichen Daten sicherzustellen, (ii) die Implementierung einer robusten Metadatenverarbeitung, um eine einfachere Interpretation und FAIR-Konformität über verschiedene Einrichtungen hinweg zu gewährleisten, und (iii)

die Einführung von parallelisierten Ein-/Ausgabeoperationen, um große Datensätze effizient zu verarbeiten, indem moderne Bibliotheken genutzt werden.

Die aktuelle Version Xana 1.0 verwendet veraltete Bibliotheken, die anfällig für Kompatibilitätsprobleme sind. Dieses Problem wird durch die Entwicklung eines kompatiblen, Python-basierten Moduls überwunden. Die Kombination aus SciCat und Xana 2.0 wird das Datenmanagement, die Analyseeffizienz und die Zusammenarbeit für Nutzer:innen von P10 DESY verbessern, zukunftsweisende Forschung unterstützen und die Einhaltung der FAIR-Datenprinzipien gewährleisten.

WP3 und WP4

In WP3 und 4 wurden im Verbund zahlreiche Experimente an Synchrotron- und FEL-Strahlungsquellen durchgeführt.

Aggregation und Gelbildung von Proteinen

Die Denaturierung und Aggregation von Proteinen sowie Low-Density-Lipoproteinen sind in biologischen Systemen unerwünscht, insbesondere im Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener menschlicher Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Atherosklerose. Zudem stellen die Instabilität und Aggregation von Protein-Medikamenten eine zentrale Herausforderung für die pharmazeutische Industrie dar. Diese wird häufig durch Abweichungen von optimalen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke ausgelöst. Daher ist es essenziell, die Nicht-Gleichgewichtsprozesse, die an der Proteinaggregation beteiligt sind, auf den relevanten Zeit- und Längenskalen zu verstehen. Ein solches Verständnis würde wichtige Anwendungen in der Pharma- und Lebensmittelindustrie sowie in der Bionanotechnologie unterstützen.

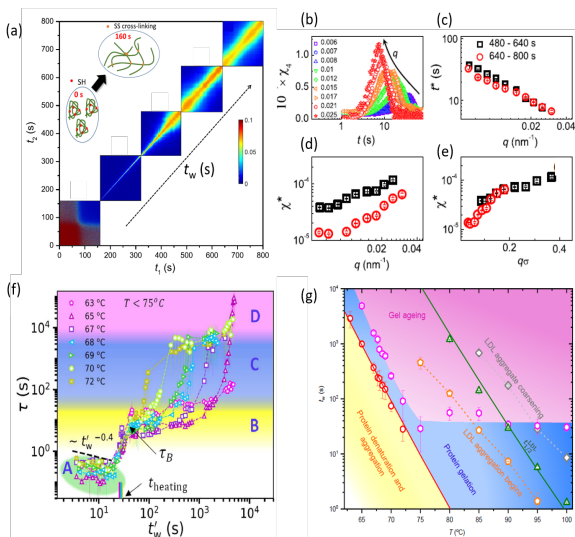


Abbildung. 1: (a) Zwei-Zeit-Korrelationsfunktion (TTC) von Eiweiß bei $T = 80\text{ °C}$ im Zeitintervall von 0–800 s. Der Einschub zeigt den Status der Proteine vor und nach Denaturierung. (b) χ_4 ermittelt durch die TTC. (c) t^* als Funktion von q für zwei verschiedene die keine signifikante Änderung mit dem Alter zeigen, und (c) χ^* zeigt als Funktion von q eine monotone q -Abhängigkeit. (d) χ^* als Funktion von $q\sigma$ zeigt, dass der Grad der Heterogenität als Funktion der Wartezeit auf eine einzige Kurve fällt. (e) Zeitliche Entwicklung der Relaxationszeit von Eigelbproben, die auf Temperaturen von 63-72 °C erhitzt wurden. Es werden vier verschiedene dynamische Regime identifiziert, hier durch unterschiedliche Farben dargestellt. (f) Zeit-Temperatur-Phasendiagramm, das verschiedene Nicht-Gleichgewichtsprozesse zeigt, die in erhitztem Eigelb auftreten.

Zur Untersuchung dieser Prozesse verwenden wir Eiweiß und Eigelb als Modellproben, da sie leicht verfügbar sind und eine hohe Konzentration an Proteinen und Lipiden aufweisen. Beim Erhitzen durchlaufen diese einen Übergang von einer Lösung zu einem Gel. Typische Prozesse während des Erhitzens umfassen Fusion, Denaturierung, Aggregation und Gelbildung, die durch eine komplexe Hierarchie von Längen-, Zeit- und Energieskalen miteinander verbunden sind. Mithilfe von Low-Dose-XPCS haben wir die raumzeitlichen Skalierungsgesetze untersucht, die diesen Prozessen in Eiweiß und Eigelb zugrunde liegen. Im Eiweiß beobachten wir einen reaktionslimitierten Aggregationsprozess mit einer fraktalen Gel-Dimension von ≈ 2 und einer durchschnittlichen Netzmaschenweite von etwa 400 nm. Die Dynamik auf diesen Längenskalen zeigt ein exponentielles Wachstum der charakteristischen Relaxationszeiten, gefolgt von einem stabilen stationären Zustand, wie in Abbildung 1a dargestellt. Die Dynamik des stationären Gels weist einen charakteristischen komprimierten exponentiellen Zerfall sowie eine zeitliche Heterogenität auf, die mit abnehmender Längenskala zunimmt (Abbildung 1b-e). Wir interpretieren diese Dynamik im Kontext einer stressaktivierten ballistischen Dynamik in einem kolloidalen Gel mit niedrigem Volumenanteil. Beim Eigelb zeigen unsere Untersuchungen beim Erhitzen auf Temperaturen unter 75 °C vier dynamische Regime (A-D), wie in Abbildung 1f dargestellt. Wir identifizieren raumzeitliche Skalierungsgesetze und ermitteln die funktionalen Beiträge verschiedener Komponenten zur

Viskosität und Mikrostruktur des Eigelbs. Die Prozesse der Protein-Denaturierung, Aggregation und Gelbildung sowie die LDL-Aggregation folgen einer Arrhenius-ähnlichen Zeit-Temperatur-Superposition (TTS) mit temperaturabhängigen Reaktionsraten. Oberhalb von 75 °C bricht dieses Verhalten jedoch zusammen, und temperaturunabhängige Gelbildungsdynamiken treten auf. Dies deutet darauf hin, dass Temperaturen oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts keine weitere Beschleunigung nichtlinearer Prozesse bewirken können. Der wärmeinduzierte Nichtgleichgewichtsprozess im Eigelb wird abschließend in einem Phasendiagramm zusammengefasst, wie in Abbildung 1g gezeigt.

Phasenübergänge und die Bildung biomolekularer Kondensate

Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Strukturbildung in biologischen Systemen durch Flüssig-Flüssig-Phasenseparation (LLPS) erfolgen kann. In dicht gepackten Umgebungen kann diese Phasenseparation zur Bildung intrazellulärer Strukturen führen, die als biomolekulare Kondensate bezeichnet werden. Diese Kondensate stehen im Fokus intensiver Untersuchungen, insbesondere im Zusammenhang mit ihrer Rolle bei der Regulation von Stoffwechselreaktionen, der Signalwahrnehmung und -übertragung. Mithilfe von Low-Dose-XPCS können wir die Struktur und Dynamik während der LLPS von γ -Globulin (Ig) in einer konzentrierten wässrigen Polyethylenglykol-(PEG)-Lösung verfolgen, wie in Abbildung 2a-b dargestellt. Eine erhaltene Masterkurve (siehe Einsatz von Abbildung 2a) weist auf eine spinodale Entmischung in der frühen Phase der LLPS hin. Wir identifizieren dabei mehrere dynamische Regime mit unterschiedlichen temperaturabhängigen Verläufen. Die Dynamik in der frühen Phase zeigt deutliche Konzentrationsfluktuationen und die Bildung von Grenzflächen, wobei diese Prozesse bei niedrigeren Temperaturen beschleunigt ablaufen. Im Gegensatz dazu verlangsamt sich die spätere Phase der Vergrößerung bei niedrigeren Temperaturen, was auf die reduzierte Mobilität der Proteine in der hochdichten Umgebung zurückzuführen ist.

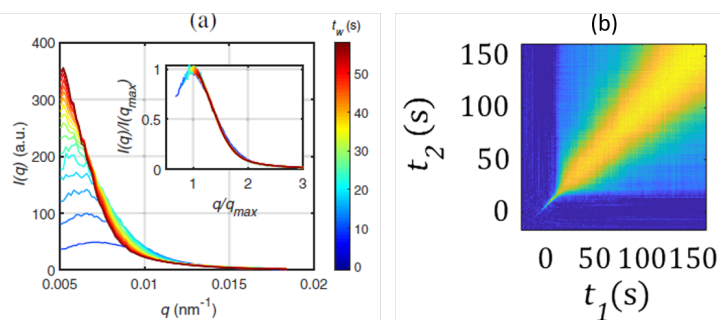


Abbildung 2 (a) Streuintensität als Funktion von q für eine quench Temperatur $T = 10\text{ °C}$; im Einsatz ist die reskalierte Intensität zu sehen. (b) Die TTC für $T = 15\text{ °C}$.

Wissenschaftliche Anwendungen am Eu-XFEL

Dynamik von Ferritin in dichten Umgebungen

In lebenden Zellen treten Makromoleküle typischerweise in hohen Volumenanteilen von bis zu 40% auf, was zu verstärkten Protein-Protein- und hydrodynamischen Wechselwirkungen führt. Diese beeinflussen die dynamischen Eigenschaften der Makromoleküle erheblich. Ziel dieser Studie war es, die Effekte von makromolekularer Überfüllung (Crowding) auf die kollektiven Diffusionseigenschaften sowie auf die Selbstdiffusion des Proteins Ferritin auf molekularen Längenskalen zu untersuchen. Als Crowder-Moleküle wurden die Polysaccharide Dextran und Ficoll sowie das Disaccharid Sucrose verwendet. Durch das Anpassen der gemessenen g_2 -Funktionen mit einer Exponentialfunktion wurde die kollektive Diffusionsfunktion, $D(q)$, extrahiert (Abb. 3 (a),(b)). Unter Verwendung von Sucrose als Crowder ließen sich daraus Rückschlüsse auf dominierende, repulsive Wechselwirkungen innerhalb der Lösung ziehen. Im Fall der Polysaccharide wird mit steigender Crowder-Konzentration ein Minimum bei ca. $Q=0,18\text{ nm}^{-1}$ sichtbar, was auf das Entstehen einer kurzreichweitigen attraktiven Wechselwirkung zurückzuführen ist. Durch die Berechnung des statischen Strukturfaktors $S(q)$ basierend auf einem Single-Yukawa-Potenzial für Sucrose und einem Two-Yukawa-Potenzial für die Polysaccharide konnte die hydrodynamische Funktion $H(q)$ gemäß der $\delta\gamma$ -Theorie berechnet werden (Abb. 3 (c), (e)). Beide reproduzieren den zusätzlichen Streubeitrag bei niedrigen q -Werten, der stark mit dem Auftreten einer mittleren Reichweitenordnung (Intermediate Range Order) der Proteinmoleküle in der Lösung korreliert. Eine Intermediate Range Order ist biologisch sehr relevant, da sie die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von

Partikeln erhöht, was für Prozesse wie beispielsweise die Phasentrennung wichtig ist. Verglichen wurde die aus den XPCS-Daten bei hohen q -Werten extrahierte mikroskopische Selbstdiffusion des Ferritins DSH mit der durch die Stokes-Einstein-Formel berechneten makroskopischen Selbstdiffusion DSE, indem das Verhältnis aus beiden Größen berechnet wurde. In Abhängigkeit von der Polymerkonzentration, normiert auf die entsprechende Überlappungskonzentration c^* , wurde ein nicht-monotones Verhalten festgestellt (Abb. 3 (e)), das ein Minimum bei ca. $2c^*$ zeigt. Dies repräsentiert die Polymerkonzentration, bei der die Proteine in den überfüllten Lösungen die stärkste Verzögerung erfahren. Durch das Abbremsen von Proteinen wird bspw. die Wahrscheinlichkeit von Wechselwirkungen erhöht, was in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt. Daher ist dieses Ergebnis besonders relevant für das Verständnis der Proteindynamik in biologischen Systemen.

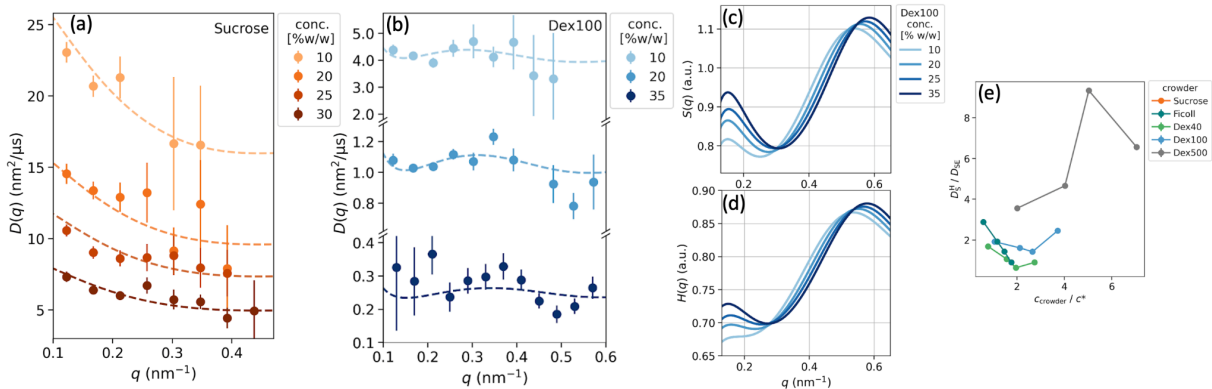


Abbildung 3: $D(q)$ für Ferritin in Lösung mit (a) Saccharose und (b) Dextran100. Berechnetes (c) $S(q)$ und (d) $H(q)$ für Ferritin in Lösung mit Dextran100. (e) Vergleich mikroskopischer und makroskopischer Selbstdiffusion in Abhängigkeit der Konzentration normiert auf die Überlappungskonzentration.

Selbst-crowding von Nano-Carrier Molekülen

Die Diffusion von Makromolekülen in dicht gepackten Umgebungen wird erheblich von der Anwesenheit anderer Proteine und den Wechselwirkungen zwischen ihnen beeinflusst. Um den Effekt des Selbst-crowdings von Nano-Bio-Carrier-Molekülen zu verstehen, verwenden wir Low-Density-Lipoproteine (LDL), die aus Eigelbplasma gewonnen wurden, als Modellsystem. Diese Partikel haben potenzielle Anwendungen im Bereich der Medikamentenfreisetzung. Das Streumuster des Eigelbplasmas zeigt einen ausgeprägten Strukturfaktor-Peak bei $0,22 \text{ nm}^{-1}$, wie in Abb. 4a dargestellt. Interessanterweise weist der Diffusionskoeffizient der LDL-Moleküle ein q -abhängiges Verhalten und eine de-Gennes-Verengung um die Position des Strukturfaktor-Peaks auf (Abb. 4b). Die extrahierte hydrodynamische Funktion deutet auf das Vorhandensein eines hydrodynamischen Widerstands bei der Käfigdiffusion dieser Nano-Carrier hin.

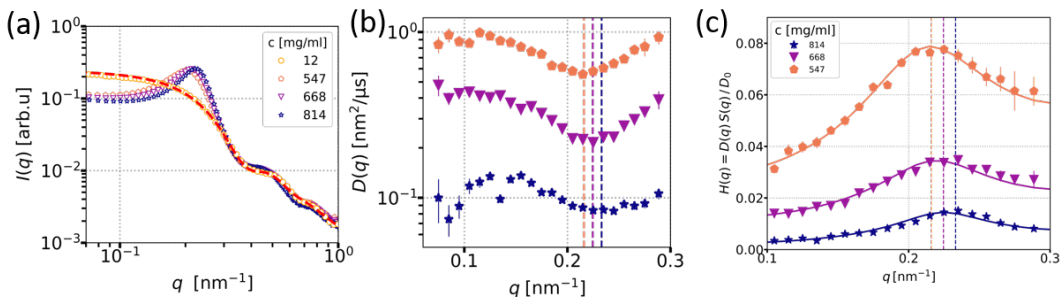


Abbildung 4: (a) Intensität, (b) Diffusionskoeffizient und (c) hydrodynamische Funktion in Abhängigkeit von q für verschiedene LDL-Konzentrationen.

Selbst-Crowding von Ferritin

MHz-XPCS ermöglicht den Zugang zu den Interaktionszeitskalen der Protein-Dynamik in dicht gepackten Umgebungen, insbesondere der kollektiven Diffusion über lange Zeiträume. Diese Zeitskalen sind mit anderen Methoden schwer zugänglich und auch mit kolloidaler Theorie oder Simulationen schwer vorherzusagen. Genau auf diesen Zeitskalen spielen Protein-Protein- und hydrodynamische Interaktionen eine entscheidende Rolle für die Transportkoeffizienten. In dieser Studie haben wir die Dynamik von Ferritinlösungen auf Mikrosekunden-Skalen bei Selbst-Crowding mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (von 9 mg/ml bis 730 mg/ml) gemessen. Unsere Experimente zeigen, dass der kollektive Diffusionskoeffizient $D(q)$ die gleiche funktionale Form wie die Kurzzeitdiffusion aufweist. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, angesichts der Komplexität der Memory-Funktionen, die auf die Diffusion über lange Zeitskalen wirken. Mit diesem Ansatz konnten wir die hydrodynamischen Funktionen $H(q)$ und Diffusionskoeffizienten für die Langzeitdynamik in dichten Proteinlösungen extrahieren. Die Modulation von $H(q)$ lässt sich mit der $\delta\gamma$ -Theorie beschreiben, bei der $H(q)$ aus dem Strukturfaktor $S(q)$ bestimmt wird. Der Schnittpunkt $H(q \rightarrow \infty) = D_s/D_0$, die Selbstdiffusion des Proteins normiert auf die Diffusion im verdünnten Grenzfall, folgt nicht der Konzentrationsabhängigkeit, die für die Kurzzeitdiffusion erwartet wird, sondern der für die Langzeitdiffusion. Es ist daher möglich, die Komplexität der Langzeitdiffusion mit der Theorie der Kurzzeitdiffusion zu erfassen, indem eine Korrektur auf die Proteinselbstdiffusion angewendet wird. Diese Erkenntnisse über das komplexe Zusammenspiel von hydrodynamischen Interaktionen mit der molekularen Diffusion in dicht gepackten Ferritinlösungen haben wichtige Implikationen für die Optimierung von Arzneimittelträgersystemen (Details siehe A. Girelli et al. arXiv 2410.008873 – unter Begutachtung bei Nature Communications).

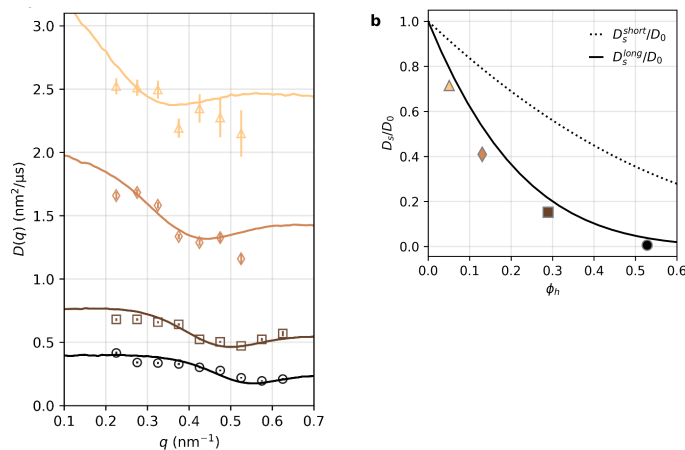


Abbildung 5: (a) Kollektiver Diffusionskoeffizient $D(q)$. (b) Normierter Selbstdiffusionskoeffizient als Funktion der Konzentration.

6 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des Projektes geleistete Arbeit war notwendig, um die Instrumentierung, Software und wissenschaftlichen Erkenntnisse zu erzielen.

7 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Projektes werden zum einen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht (siehe detaillierte Liste unten) zum anderen stehen die instrumentellen Lösungen und die Analysesoftware der allgemeinen Nutzerschaft am Eu-XFEL und an PETRA III zur freien Verfügung. Mit den hier erzielten Resultaten erwarten wir, die Nutzerschaft der Beamlines P10 und MID/Eu-XFEL zu erweitern.

8 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

k.A.

9 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Publikationen unter Begutachtung

N.D. Anthuparambil et al. A 250 Hz fast shutter with flexible sampling schemes for low-dose XPCS experiments at beamline P10 at PETRA III

Publikationen, die noch geplant sind

A. Girelli et al. Coherent X-rays reveal anomalous molecular diffusion and cage effects in crowded protein solutions (arXiv 2410.008873)

M. Dargsaz et al. Protein Dynamics and Intermediate Range Order: Influence of Crowding and Depletion Interaction Revealed by MHz-XPCS

N.D. Anthuparambil et al. Long-range hydrodynamic interactions and particle softness affect the diffusion of lipoproteins under crowded conditions

A. Leonau et al. MHz XPCS Data-Pipeline

Referierte Publikationen (z. B. in Fachzeitschriften oder -büchern und referierte Konferenzproceedings)

1. N. D. Anthuparambil et al., J. Chem. Phys. 161, no. 5 (2024).
2. A. Ragulskaya et al., J. Appl. Crystallogr. 57, 1098–1106 (2024).
3. N. D. Anthuparambil et al., Nat. Commun. 14, no. 1 5580 (2023).
4. S. Timmermann, Sci. Rep. 13, no. 1 11048 (2023).
5. N. Begam et al. J. Chem. Phys. 158, 074903 (2023).
6. M. Reiser et al., Nat. Commun. 13, no. 1 5528 (2022).
7. S. Timmermann, J. Appl. Crystallogr. 55, no. 4 751-757 (2022).
8. M. Moron et al. J. Phys. Chem. B 126, no. 22 4160-4167 (2022).
9. A. Ragulskaya, IUCrJ 9, no. 4 439-448 (2022).
10. N. Begam et al. Phys. Rev. Lett. 126 098001 (2021).
11. A. Girelli et al, Phys. Rev. Lett. 126 138004 (2021).
12. A. Ragulskaya et al. J. Phys. Chem. Lett. 12 (2021) 7085 (2021).
13. S. Da Vela et al., J. Phys. Chem. Lett. 11, no. 17 7273-7278 (2020).

Andere Veröffentlichungen (z. B. Konferenzbeiträge wie Vorträge und Poster, unreferierte Proceedings, Conference Notes)

Abschlussarbeiten (Bachelor, Master, Diplom, Staatsexamen, Promotion, Habilitation)

Promotionen: laufend (Michelle Dargsaz, Randeer Gautam)

Kurzbericht

- öffentlich -

Zuwendungsempfänger: Universität Siegen

Projektleitung: Prof. Dr. Christian Gutt

Verbund: RAC Universitäten Siegen, Tübingen, Lund, Stockholm

Thema: Verbundprojekt 05K2020 - 2019-06075 Protein-Dyn: Dynamik von Proteinen in Lösungen auf multiplen Längen und Zeitskalen (Teilprojekt 1)

1. Ziel und Inhalt des Projektes

Das Hauptziel des RÅC-Konsortiums besteht darin, die Dynamik von Proteinen in dichten Umgebungen, in Kondensaten und während Phasenübergängen auf den relevanten Längen- und Zeitskalen zu untersuchen. Dabei werden Zeiträume von 10^{-7} bis 10^2 Sekunden mittels Röntgen-Photonen-Korrelationsspektroskopie (XPCS) an Synchrotron- und XFEL-Quellen abgedeckt. Neutronenspektroskopische Techniken wie Neutron Spin Echo (NSE) und Neutronen-Rückstreuung (NBS) ergänzen diese Experimente, indem sie kürzere Zeitskalen von 10^{-12} bis 10^{-7} Sekunden erfassen. Durch die Kombination von XPCS und Neutronenspektroskopie wird ein umfassendes zeitliches und räumliches Fenster für die Untersuchung von Protein-Dynamiken in dichten Umgebungen abgedeckt.

Relevanz: Das Verständnis der Dynamik biologischer Makromoleküle wie Proteine oder monoklonaler Antikörper in dichten Umgebungen ist essenziell für zelluläre Prozesse (z. B. Signalübertragung und Proteinreaktionen) und die Entwicklung zukünftiger Protein-basierter Medikamente.

Technisches Ziel:

Im Rahmen dieses Projekts sollen Messaufbauten, Probenumgebungen und Methoden an mehreren Forschungsstationen (CoSAXS bei MAX IV, P10 bei PETRA III, ID10 bei ESRF und MID beim Europäischen XFEL) entwickelt und installiert werden.

Maßnahmen:

- Entwicklung eines schnellen Verschlussmechanismus (Shutter-Box) mit einer kontinuierlichen Wiederholungsrate von mindestens 100 Hz, um die Strahlendosis auf unter 10 kGy zu reduzieren und strahlungsempfindliche Proben zu schützen.
- Aufbau eines transportablen In-Line-Lichtstreu-Systems zur quantitativen Erfassung von Strahlenschäden.
- Entwicklung fortschrittlicher Analysealgorithmen und Software für die Bearbeitung großer Datenmengen (mehrere 100 TB pro Experiment) und für die schnelle Online-Datenauswertung.

Dieses Projekt zielt darauf ab, durch innovative Technologien ein besseres Verständnis der dynamischen Eigenschaften von Biomolekülen in Lösung zu ermöglichen.

2. Ablauf und Ergebnisse des Vorhabens

Der Ablauf und die Durchführung des Projektes wurde ganz wesentlich von den substanziellen Einschränkungen während der Covid-19 Pandemie beeinflusst. Wir sind den Großforschungsanlagen DESY und Eu-XFEL dankbar, dass sie den Experimentierbetrieb auch während der lock-down Phasen großenteils aufrechterhalten haben, so dass zumindest Teile des Projektes durchgeführt werden konnten. Die Universität Siegen hatte besonders strenge lock-down Regelungen mit weitestgehender Einstellung des experimentellen Forschungsbetriebes. Des weiteren hat sich das XPCS-Programm an der CoSAXS Beamline bei MAX IV nicht realisieren lassen. Das Projekt hat sich deswegen auf die Beamlines P10/DESY und MID/Eu-XFEL konzentriert.

Während des Projektes konnten zwei long-term Proposal an P10 DESY und am MID / Eu-XFEL eingeworben werden, auf denen die wesentlichen Ergebnisse beruhen. Instrumentell haben wir den X-ray shutter realisieren und an der P10 in Betrieb nehmen können. Die komplementäre Anlage zur Detektion von Strahlenschaden mittels Lichtstreuung konnte noch nicht vollständig in Betrieb genommen werden. Wir haben Softwarelösungen für FAIR Daten implementiert.

Trotz der oben genannten Schwierigkeiten ist das Ergebnis des Projektes, dass die Messung von Proteindynamik mittels XPCS an Synchrotron- und FEL-Strahlungsquellen ermöglicht wurde. Damit ist das Projekt sehr erfolgreich (siehe Publikationsliste) und hat eine neue Experimentiertechnik für die Dynamik biologischer Makromoleküle ermöglicht.

3. Darstellung der wesentlichen Ergebnisse und deren konkreter Nutzen sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Am Synchrotron konnte im Laufe des Projektes die Aggregation und Gelbildung von Proteinen in Eiweiß und Eigelb, sowie die Dynamik von Proteinen während der Bildung von biomolekularen Kondensaten untersucht werden. Am XFEL haben wir die Dynamik von Ferritin-Proteinen in hochdichten Lösungen untersucht und in Lösungen aus Polysacchariden und anderen Crowdern, die die Zellumgebung simulieren. Ebenfalls haben wir die Dynamik von Ferritin in Lösungen aus Tau-Proteinen studiert und Dynamik von LDL-Teilchen in Plasma von Eigelb. Die Experimente führten bisher zu 12 Publikationen.

Ebenfalls haben wir die Software Lösung Xana (P10, PETRA III) entwickelt und bei der Software DAMNIT (Eu-XFEL) an der Entwicklung mitgewirkt. Die Software-Lösungen stehen allen Nutzern an den Beamlines zur Verfügung. An P10 haben wir die ersten Schritte zu Einbettung der SciCat -Umgebung initiiert, um Datenkataloge zu etablieren und damit XPCS Daten FAIR zu gestalten.

Aus dem RAC-Projekt hat sich eine feste Zusammenarbeit mit der Beamline P10 und dem Eu-XFEL und den schwedischen Partnern in Lund und Stockholm etabliert. Insbesondere die Aktivitäten am Eu-XFEL haben zu einer erweiterten Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen aus der Biologie geführt. Trotz der Schwierigkeiten durch die Covid-Pandemie ist das Projekt sehr erfolgreich gewesen und hat die Deutsch-Schwedischer Zusammenarbeit nachhaltig gestärkt.