

Enzymatisches Reaktionsnetzwerk-gesteuerte polymerisationsinduzierte transiente Koazervation

Surbhi Sharma, Andrea Belluati,* Mohit Kumar, und Shikha Dhiman*

Abstract: Eine lebende Zelle besitzt ein hochkomplexes Mikro-Umfeld, in dem zahlreiche enzymgesteuerte Prozesse gleichzeitig aktiv sind. Diese Prozesse sind äußerst präzise und effizient, obwohl eine vergleichbare Kontrolle *in vitro* noch nicht etabliert wurde. In dieser Arbeit entwerfen wir ein enzymatisches Reaktionsnetzwerk (ERN), das antagonistische und orthogonale enzymatische Netzwerke kombiniert, um anpassbare Dynamiken der ATP-getriebenen transienten Koazervation zu erzeugen. Mithilfe der Meerrettichperoxidase-vermittelten biokatalytischen radikalischen Atomtransferpolymerisation (BioATRP) synthetisierten wir Poly(dimethylaminoethylmethacrylat), das anschließend in Anwesenheit von ATP Koazervate bildete. Wir untersuchten rational die enzymatische Kontrolle über die Koazervation und Auflösung und setzten dabei orthogonale und antagonistische Enzym-Paare ein, wie Phosphatase, Kreatinphosphokinase, Hexokinase, Esterase und Urease. Die ATP-gefüllten Koazervate zeigen zudem eine enzymatische Katalyse und belegen das Potenzial, als zelluläre Mikroreaktoren genutzt zu werden. Zusätzlich entwickelten wir das ERN-Polymerisations-induzierte transiente Koazervation (ERN-PIC), das vollständige Kontrolle über das System, die Polymerisation, die Koazervation und die Auflösung ermöglicht. Besonders bemerkenswert ist, dass der Koazervationsprozess selbst funktionelle Eigenschaften bestimmt, wie zum Beispiel selektive Ladungsaufnahme. Die Strategie bietet hochmoderne biomimetische Anwendungen und Einblicke in die zelluläre Kompartimentalisierung, indem sie die Lücke zwischen synthetischen und biologischen Systemen überbrückt. Die Entwicklung von temporär programmierten Koazervaten ist vielversprechend für die räumliche Anordnung von Multienzym-Kaskaden und bietet neue Ideen zur Architektur künstlicher Zellen.

Einleitung

Die Kompartimentierung ist ein kennzeichnendes Merkmal biologischer Systeme und entscheidend für die Kontrolle einer Vielzahl von Prozessen innerhalb der Zellen.^[1,2] Im Allgemeinen wird die Kompartimentierung mit zellulären Strukturen in Verbindung gebracht, die durch Lipidmembranen abgegrenzt sind, wie etwa der Zellkern, die Mitochondrien und der Golgi-Apparat.^[3,4] Ein wachsendes Interesse gilt jedoch membranfreien Organellen (MLOs), die durch komplexe Koazervation entstehen – ein Prozess, bei dem dynamische, flüssigkeitsähnliche Strukturen durch Wechselwirkungen zwischen geladenen Polyelektrolyten wie Proteinen und Nukleinsäuren entstehen.^[5–7] Diese MLOs unterliegen kontinuierlichen internen Umstrukturierungen und einem Austausch von Komponenten mit ihrer Umgebung. Dieses dynamische Verhalten ermöglicht es ihnen, als Reaktion auf biochemische Signale zu entstehen und sich wieder aufzulösen.

Versuche, lebensähnliche Verhaltensweisen in synthetischen Systemen nachzubilden, schreiten aktiv voran.^[2,4,8,9] Studien haben die enzymatische Steuerung für den reversiblen Koazervations-Auflösungs- Prozess untersucht,^[10–13] beispielsweise wurden Pyruvatkinase und Hexokinase verwendet, um die Konzentrationen von Adenosintri- und -diphosphat (ATP und ADP) zu regulieren, wodurch die Bildung und Auflösung von Peptid-basierten Koazervaten durch die Arbeitsgruppen von Spruijt und Keating gesteuert wurde.^[14–16] Dekker und seine Kollegen nutzten ein Kinasen/Phosphatasen-Enzympaar, um den Phosphorylierungsprozess von Peptiden zu modulieren, was zu reversibler RNA-Peptid- Koazervation führte.^[17] Zusätzlich verwendeten Huck und seine Kollegen oszillierende Trypsin- Konzentrationen, um die Assemblierung und Disassemblierung von Polyglutaminsäure und Lysin- Serin-Koazervaten zu steuern.^[18] Martin und seine Kollegen sowie Bishop, Obermeyer und ihre Kollegen entwarfen unabhängig voneinander Enzym/Polyelektrolyt-Koazervate, bei denen das Enzym so

[*] Dr. S. Sharma, M. Kumar, Prof. Dr. S. Dhiman
Department of Chemistry, Johannes Gutenberg University Mainz,
Duesbergweg 10–14, Mainz, 55122 Germany
E-mail: shikha.dhiman@uni-mainz.de
Homepage: <https://www.dhimanlab.com>

Dr. A. Belluati
Department of Chemistry and Centre for Synthetic Biology, Technical University of Darmstadt, Peter-Grünberg-Straße 4 Darmstadt,
64287 Germany
E-mail: andrea.belluati@tu-darmstadt.de

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

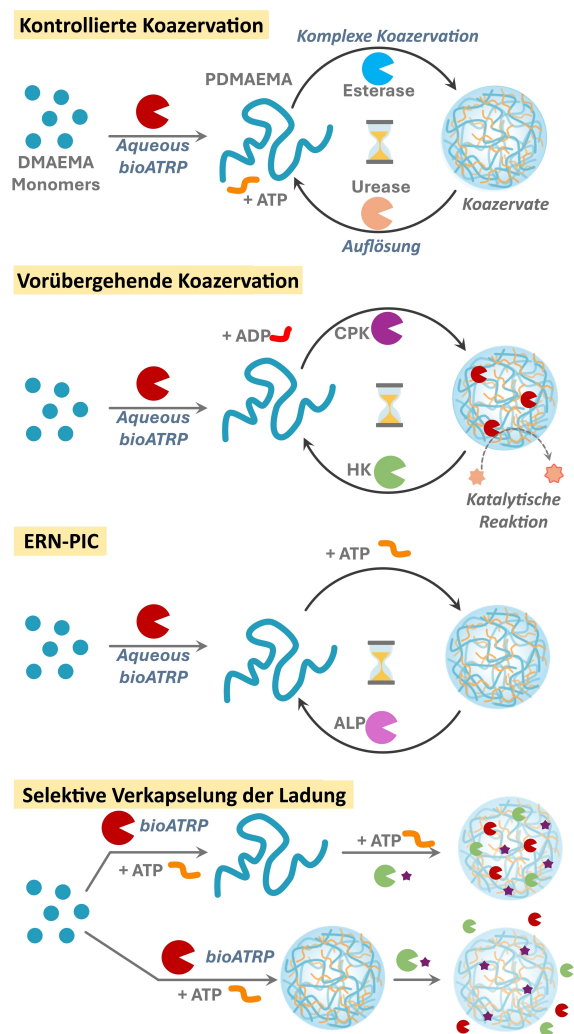
wohl an der Koazervation teilnahm als auch für deren Auflösung verantwortlich war.^[19,20] Dogterom und Reese zeigten, dass RNA/Spermin-basierte Koazervate während enzymatischer Reaktionen vorübergehend nicht-sphärische Formen annehmen.^[21] Walther und seine Kollegen entwickelten programmierbare, ATP-betriebene DNA-Koazervate mithilfe von DNA-basierten enzymatischen Reaktionsnetzwerken (ERN).^[22,23] Maiti und seine Kollegen verwendeten ERN, um die Konformationsänderung eines Proteins in einem Zustand eines Kondensates zeitlich zu steuern.^[24] Die meisten synthetischen Koazervate bestehen aus Polymeren (z. B. Polysacchariden, Nukleotiden), die mit einem Gegenpolymer oder kleinen Molekülen interagieren.^[25–28] Die Koazervation mit kleinen Molekülen bleibt jedoch eine Herausforderung,^[29–35] da ein empfindliches Gleichgewicht zwischen intermolekularen Wechselwirkungen und entropischen Anforderungen erforderlich ist. Daher sind alternative Strategien notwendig, um Koazervate aus kleinen Molekülen in wässrigen Umgebungen zu synthetisieren.

Ein vielversprechender Ansatz ist die biokatalytische radikalische Atomtransferpolymerisation (BioATRP), bei der Metallenzyme wie Meerrettichperoxidase, Katalase, Hämoglobin und Myoglobin (Mb) die Radikal-Polymerisationen initiieren und kontrollieren.^[36–39] In dieser Studie entwickelten wir ein ERN, das nicht nur den transienten Koazervationsprozess kontrolliert, sondern auch die in situ Synthese von Koazervatkomponenten ermöglicht – die Bildung von Polymeren aus kleinen Molekülvorstufen (Schema 1). Dieser Ansatz spiegelt die natürliche Synthese von intrinsisch ungeordneten Proteinen aus einfachen Aminosäuren wider, wobei die Proteine anschließend einer Koazervation durchlaufen. Diese biomimetische Strategie, die die Polymerisation direkt aus kleinen Molekülen ohne die Notwendigkeit komplexer organischer Synthese- oder Reinigungsprozesse ermöglicht, bietet einen vereinfachten Weg zur Koazervatbildung. Mithilfe von BioATRP synthetisierten wir Polymere von 2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat (DMAEMA) mit kontrollierter Länge und Dispersität. Dieses Polymer, PDMAEMA, unterliegt einer polymerisationsinduzierten Koazervation bei pH-Werten unter dem pKa-Wert, in Anwesenheit eines ATP Gegenmoleküls. Die Abhängigkeit der Koazervation von pH-Wert und ATP als Gegenion wird weiter in verschiedenen ERNs genutzt, um die Koazervation zeitlich zu steuern, indem pH-Wert und Phosphorylierung eingesetzt werden. Darüber hinaus zeigen die Koazervate ihre selektive und kontrastierende Einkapselungskapazität für verschiedene Enzyme sowie kleine Moleküle, basierend auf in situ und ex situ Präparationsmethoden, die uns die Möglichkeit gaben, diese Koazervate als Mikroreaktoren zu entwickeln (Schema 1).

Ergebnisse und Diskussion

Designstrategie

Zunächst synthetisierten wir das Polymer 2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat (PDMAEMA) unter Verwendung des



Schema 1. Schematische Darstellung von enzymatischen Reaktionsnetzwerken (ERNs), die die in situ Polymersynthese mittels wässrigem BioATRP, zeitgesteuerte komplexe Koazervation mit ATP und Auflösung vorantreiben. Die Koazervate zeigen auch das Verhalten von Mikroreaktoren und selektiver Cargo-Einkapselung.

BioATRP-Ansatzes mit dem Metallenzym Meerrettichperoxidase (HRP), um die Polymerisation zu kontrollieren (Abb. 1a). Polymere mit einer Masse von 20–40 kDa, einem Polymerisationsgrad von ca. 200 und einer niedrigen Dispersität ($\sim 1,1$) wurden erhalten ($P1 = \text{Charge } 1$, $P2 = \text{Charge } 2$) (Abb. 1b, Tabelle S1). Trotz moderater Monomerumsetzung (57–61 %, Abb. S1) beeinflussen nicht reagierte Monomere die weiteren Studien nicht, da sie nicht in der Lage sind, Koazervation zu induzieren. PDMAEMA wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Trübungsbasierte Titrations des Polymers mit ATP und ADP

Der pKa-Wert der Aminogruppe in PDMAEMA wurde durch eine Säure-Base-Titration auf 7,4 bestimmt (Abb. S2).^[40] Um das Phasen-Trennungverhalten von PDMAEMA in wässrigen Bedingungen zu untersuchen, passten wir

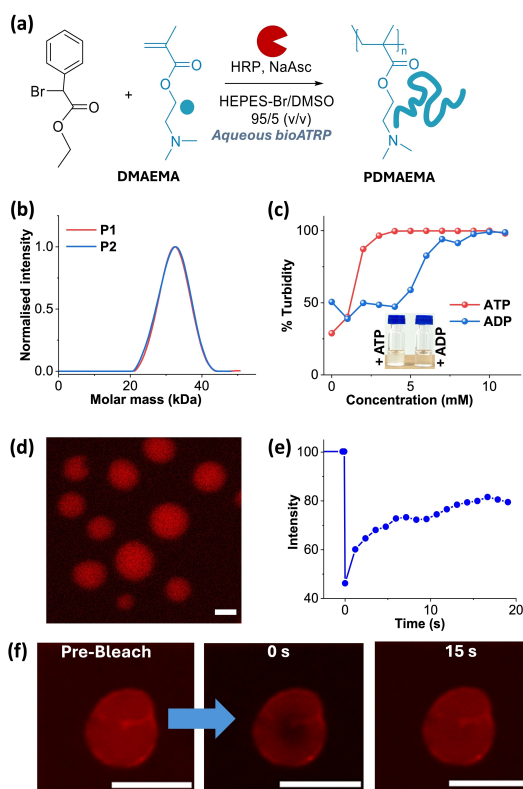


Abbildung 1. (a) Schema zur PDMAEMA-Synthese durch BioATRP. (b) Molekularmassenverteilung der Polymere P1 und P2, die in zwei verschiedenen Chargen synthetisiert wurden. (c) Trübungsmessungen zur Titration von PDMAEMA mit ATP und ADP. (d) CLSM-Bilder von komplexen Koazervaten von PDMAEMA mit ATP, [Resorufin] = 0,5 mol%, Skalierbalken = 2 μm . (e) FRAP-Kinetik. (f) Entsprechende CLSM-Bilder während des FRAP von PDMAEMA mit einem 5 mM ATP-Koazervat, [Nile Red] = 0,5 mol%, Skalierbalken = 5 μm . [PDMAEMA] = 0,5 mM, 50 mM HEPES, pH 7,3.

den pH-Wert der PDMAEMA-Lösung auf 7,3 an, indem wir einen 50 mM HEPES-Puffer verwendeten. Dieser pH-Wert, der nahe den physiologischen Bedingungen liegt, wurde gewählt, um die Enzymaktivität zu optimieren und die biologische Relevanz dieser Koazervate für potenzielle Anwendungen zu verbessern. Bei diesem pH-Wert bleibt PDMAEMA partiell protoniert, jedoch bietet sein multivalenter Charakter ausreichend kationische Ladung, um effektiv mit negativ geladenen multivalenten Gastmolekülen zu interagieren. Um die Koazervationsfähigkeit des resultierenden kationischen Polymers zu untersuchen, wählten wir Adenosintriphosphat (ATP) als Gast für die komplexe Koazervation mit PDMAEMA aufgrund seiner multivalenten Natur,^[41] wobei es bei pH-Werten über 6,5 eine -4 -Ladung trägt und unterhalb dieses pH-Werts eine -3 -Ladung trägt.⁴² Darüber hinaus kann ATP aufgrund seiner biorelevanten Eigenschaften von verschiedenen Enzymen synthetisiert oder verbraucht werden,^[43,44] was uns zusätzliche Kontrolle über den Koazervationsprozess verschafft.^[43,44] Im Allgemeinen beinhalten enzymatische Reaktionen von ATP dessen Umwandlung oder Synthese zu Adenosindi-

phosphat (ADP) durch Phosphorylierung-Dephosphorylierungs-Reaktionen.

Da ADP ebenfalls ein multivalenter Gast ist und möglicherweise die Fähigkeit besitzt, mit PDMAEMA eine komplexe Koazervation einzugehen, war es notwendig, die Koazervation von PDMAEMA sowohl mit ATP als auch mit ADP zu vergleichen. Zu diesem Zweck führten wir trübungsbasierte Titrations durch, indem wir ATP und ADP schrittweise (von 0 bis 10 mM) zu einer 0,5 mM PDMAEMA-Lösung hinzufügten (Abb. 1c). Die Änderungen wurden durch Messung der Absorbanz bei 600 nm überwacht, wobei weder die Komponenten der Lösung noch das Polymer absorbieren, was in % Trübung umgerechnet wurde. Der Beginn der Trübung und die Sättigung traten bei niedrigeren Konzentrationen für ATP im Vergleich zu ADP auf, was auf die höhere Ladungsdichte von ATP zurückzuführen ist. Um den Ursprung der Trübung zu untersuchen, verwendeten wir konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM), um die Strukturen von PDMAEMA allein sowie in Anwesenheit von 5 mM ATP und 5 mM ADP getrennt zu visualisieren (Abb. 1d, S3). Die Proben wurden im Lösungszustand durch die konventionelle Farbstoffverkapselung mit einem externen fluoreszierenden Sondenmolekül (0,5 mol% Nile Red oder Resorufin) visualisiert. Die Verkapselungsfähigkeit von PDMAEMA-ATP wurde durch den Einsatz zweier verschiedener Farbstoffe und die entsprechenden CLSM-Bilder bestätigt (Abb. 1d,f). Wir beobachteten kleine unregelmäßige Aggregate des Polymers allein und mit ADP. Im Gegensatz dazu bildeten sich in Anwesenheit von ATP sphärische Strukturen, die nach einer Photobleichung schnelle Fluoreszenzrückgewinnung (FRAP) zeigten (Abb. 1e,f und S4). Dies bestätigt die Bildung komplexer Koazervate. Daher setzten wir für weitere Studien eine 5 mM Gastkonzentration ein, bei der nur ATP Koazervate bildet. Die Reversibilität und Reaktionsfähigkeit dieser Koazervation wurde durch Änderung des pH-Werts der Lösung bestätigt (Abb. S5).

pH-abhängige Koazervation-Auflösung mit zwei Enzymen

Nach der Bestätigung der reversiblen Bildung komplexer Koazervate etablierten wir einen reversiblen Koazervations-Auflösungsprozess unter Verwendung von zwei antagonistischen Enzymen: Esterase und Urease (Abb. 2a). Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff, um Ammoniak zu produzieren, wodurch der pH-Wert durch den Verbrauch von Protonen steigt, während Esterase Ethylacetat in Essigsäure und Ethanol umwandelt, wodurch der pH-Wert durch den Verbrauch von Hydroxidionen sinkt. Zu Beginn im Acetatpuffer bei pH 4 bildet das protonierte Polymer mit ATP Komplexe, die Koazervate bilden, was sich in einer hohen Trübung zeigt. Die Zugabe von Harnstoff erzeugt in situ Ammoniak, erhöht den pH-Wert und bewirkt die Deprotonierung des Polymers, was zur Auflösung der Koazervate führt. Umgekehrt führt die Zugabe von Esterase und Ethylacetat in situ zur Bildung von Essigsäure, senkt den pH-Wert und führt somit zur erneuten Bildung von Koazervaten und Trübung (Abb. 2a). Zeitabhängige CLSM-

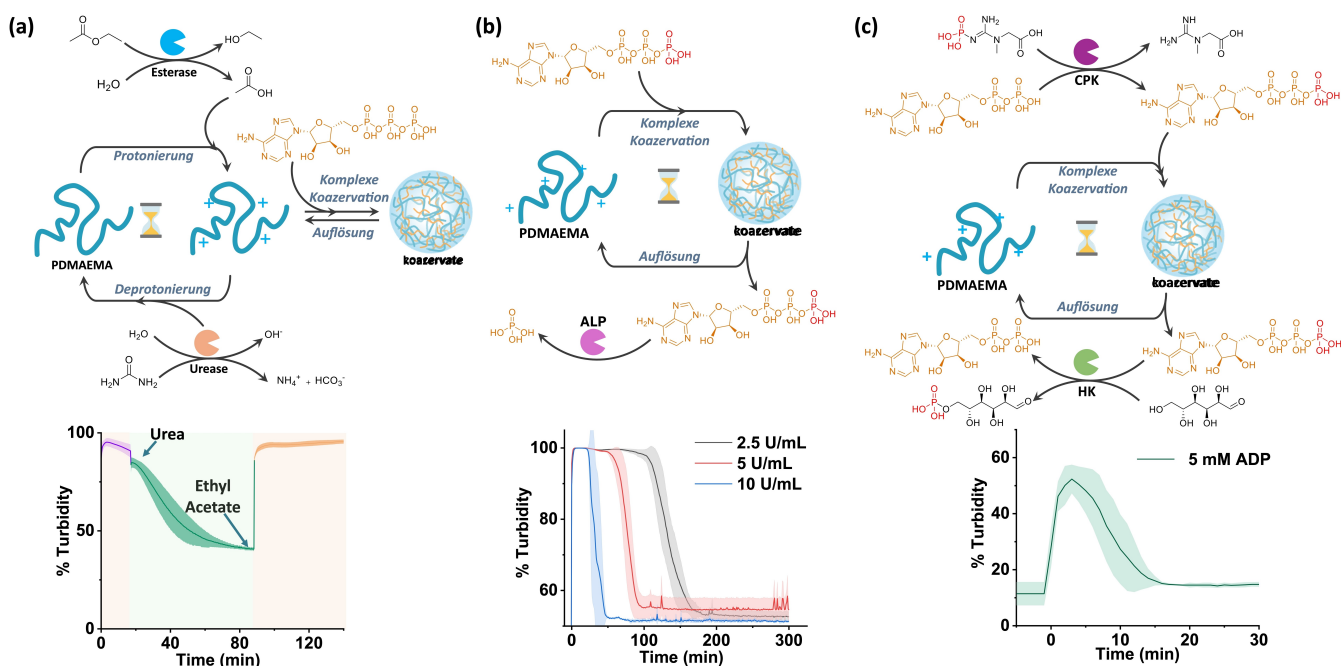


Abbildung 2. (a) Enzymatisch vermittelte stimuli-responsiv Koazervation. Kinetik der pH-modifizierenden Enzyme. Pfeile zeigen die Zugabe von Substraten an. [PDMAEMA] = 1,25 mM, [ATP] = 8 mM, Esterase = 200 U/mL, Urease = 285 U/mL, [ethyl acetate] = 240 mM, [urea] = 24 mM, pH 4,5, 10 mM Acetatpuffer. (b) ATP-gesteuerte ALP-vermittelte transiente Koazervation von PDMAEMA. Zeitabhängige % Trübungsänderungen bei variierenden Einheiten von ALP. [PDMAEMA] = 0,5 mM, [ATP] = 5 mM, 50 mM HEPES, pH 7,3. (c) ERN-vermittelte ATP-gesteuerte transiente Koazervation von PDMAEMA (HK und CPK). Zeitabhängige % Trübungsänderungen. [PDMAEMA] = 0,5 mM, [ATP] = [ADP] = 5 mM, [Mund4] = 5 mM, [PCr] = 20 U/mL, [HK] = 10 U/mL, [PCr] = $7,5 \times 10^{-3}$ M, [Glukose] = 0,1 M, 50 mM HEPES, pH 7,3. $N = 3$, \pm Standardabweichung.

Bilder bestätigten die Auflösung und Neubesetzung der Koazervate, die jeweils durch die Aktivität von Urease und Esterase getrieben wurden (Abb. S6). Dieser Prozess ist jedoch am effektivsten im ersten Zyklus, da die Anhäufung von Nebenprodukten und der Abbau von Substraten die Enzymaktivität hemmen. Eine ähnliche pH-reversible Koazervation wird auch mit der Kopplung von Urease und Glukoseoxidase beobachtet (Abb. S7).

Transiente Koazervation mit einem einzelnen Enzym

Nachdem die reversible Bildung komplexer Koazervate bestätigt wurde, war das nächste Ziel, eine transiente Koazervation mit ERN zu etablieren. Um die transiente enzymatische Schaltung von ATP-betriebenen Koazervaten zu untersuchen, wurde zunächst nur Alkalische Phosphatase (ALP) verwendet. ALP katalysiert die Hydrolyse von Phosphatgruppen aus ATP (Abb. 2b). Um transiente Koazervation zu erreichen, muss die Rate der Koazervation die Rate der Auflösung übersteigen. Wir passten die Konzentrationen der Enzyme sowie die ALP-Konzentrationen an und führten 2,5, 5 und 10 U/mL ALP in eine 50 mM HEPES-Lösung bei pH 7,3 mit 0,5 mM PDMAEMA ein. Ohne ATP trat keine Veränderung der Absorbanz oder Trübung auf, was darauf hinweist, dass keine Koazervation stattfand.

Zugabe von 5 mM ATP initiierte Koazervation, was zu einem Anstieg der Trübung führte (Abb. 2b). Im Laufe der

Zeit beobachteten wir die Auflösung der Koazervate aufgrund der ATP-Hydrolyse durch ALP. Zusätzlich beschleunigte eine Erhöhung der ALP-Einheiten den Beginn der Auflösung, was eine temporale Regulierung der Koazervation demonstriert. Entsprechende zeitabhängige CLSM-Bilder (Abb. S8) bestätigten einen Rückgang der Koazervatenzahl aufgrund der ATP-Hydrolyse durch ALP.

Transiente Koazervation mit ATP-basiertem ERN

Um die Kontrolle über die transiente Koazervation zu verbessern, entwarfen wir ERN mit zwei komplementären Phosphoryltransferasen: Kreatininphosphokinase (CPK) und Hexokinase (HK) sowie deren Substrate Phosphocreatin (PCr) und Glukose, die die ATP-Bildung und -Hydrolyse antreiben (Abb. 2c). HK hydrolysiert ATP zu ADP, während CPK ATP aus ADP unter Verwendung von PCr regeneriert. Dadurch erhalten wir eine zeitliche Kontrolle über sowohl die Koazervation als auch die Auflösung. Wir führten 4 mM ADP zu einer Lösung bestehend aus PDMAEMA, HK, CPK und Glukose hinzu. Zunächst war keines der Enzyme aktiv (Abb. S9,10). Nach der Zugabe von PCr wurde ein allmählicher Anstieg der Trübung beobachtet, was auf eine zunehmende Population von Koazervaten aufgrund in situ synthetisierten ATPs hinweist. Die Koazervation nahm für einige Minuten kontinuierlich zu (etwa 10 Minuten, siehe Abb. 2c). Danach trat ein Zerfall auf, bedingt durch die von HK katalysierte Hydrolyse von ATP,

als der primäre Treibstoff PCr vollständig verbraucht war, um ATP (wieder) zu regenerieren.

Als Nächstes, um zu untersuchen, ob die Enzymkatalyse innerhalb oder außerhalb der Koazervate stattfindet, beobachteten wir die Enzymlokalisierung mithilfe von CLSM. Die katalytische Aktivität von HRP, die während der Polymer-Synthese durch BioATRP in der Probe vorlag, wurde als Nächstes getestet. HRP katalysiert die Produktion von fluoreszierendem Resorufin aus seinen Substraten Amplex Red in Gegenwart von H_2O_2 . Wir beobachteten, dass die Reaktion bevorzugt innerhalb der Tröpfchen stattfand, da die Fluoreszenz innerhalb der Tröpfchen im Vergleich zur Lösung erhöht war. Dies bestätigt die Kompartimentierung von HRP und deren erhaltene Aktivität (Abb. S11). Durch das Mischen von Rinderserumalbumin (BSA), das mit TAMRA markiert war, mit dem Polymer vor der Koazervation, beobachteten wir eine homogene und konsistente Verteilung in allen Koazervaten (Abb. S12). Ähnlich wurden Alexa Fluor 488-markiertes HRP, Urease und CPK (HRP-488, Urease-488 und CPK-488) sowie Alexa Fluor 647-markiertes HK und GOx (HK-647 und GOx-647) einheitlich von den Koazervaten eingeschlossen (Abb. 3a,b). Daher wurden alle getesteten Proteine/Enzyme innerhalb

der Koazervate lokalisiert und führten ihre Reaktionen von dort aus durch, was eine schnelle und effiziente Wirkung auf die Tröpfchen gewährleistete.^[46]

ERN-Polymerisations-induzierte Koazervation (ERN-PIC)

Unser endgültiges Ziel war es, eine vollständige enzymatische Kontrolle in einem einzigen Reaktionsansatz zu erreichen, der Polymerisation, Koazervation und Auflösung integriert. Zunächst führten wir eine BioATRP-Reaktion in Anwesenheit von 44 mM ATP durch, was ausreichend für die Koazervation war (Abb. 3c). Die Trübung der Lösung nahm im Laufe der Zeit zu (Abb. 3d). Das kleine Molekül DMAEMA, das nicht mit ATP koazervieren kann, wurde schrittweise durch BioATRP polymerisiert, was zu einer biokatalytischen Polymerisation führte, die Koazervation induzierte (bioPIC). Die zunehmende Multivalenz und Ladungsdichte mit der Polymerlänge förderte die Wechselwirkung des Gegenions ATP, was zur Koazervation führte. Im Vergleich zum Monomer mit derselben ATP-Konzentration zeigte das Polymer eine etwa fünfmal höhere Trübung (Abb. 3d). Der Monomerumsatz betrug 72 %, und die Poly-

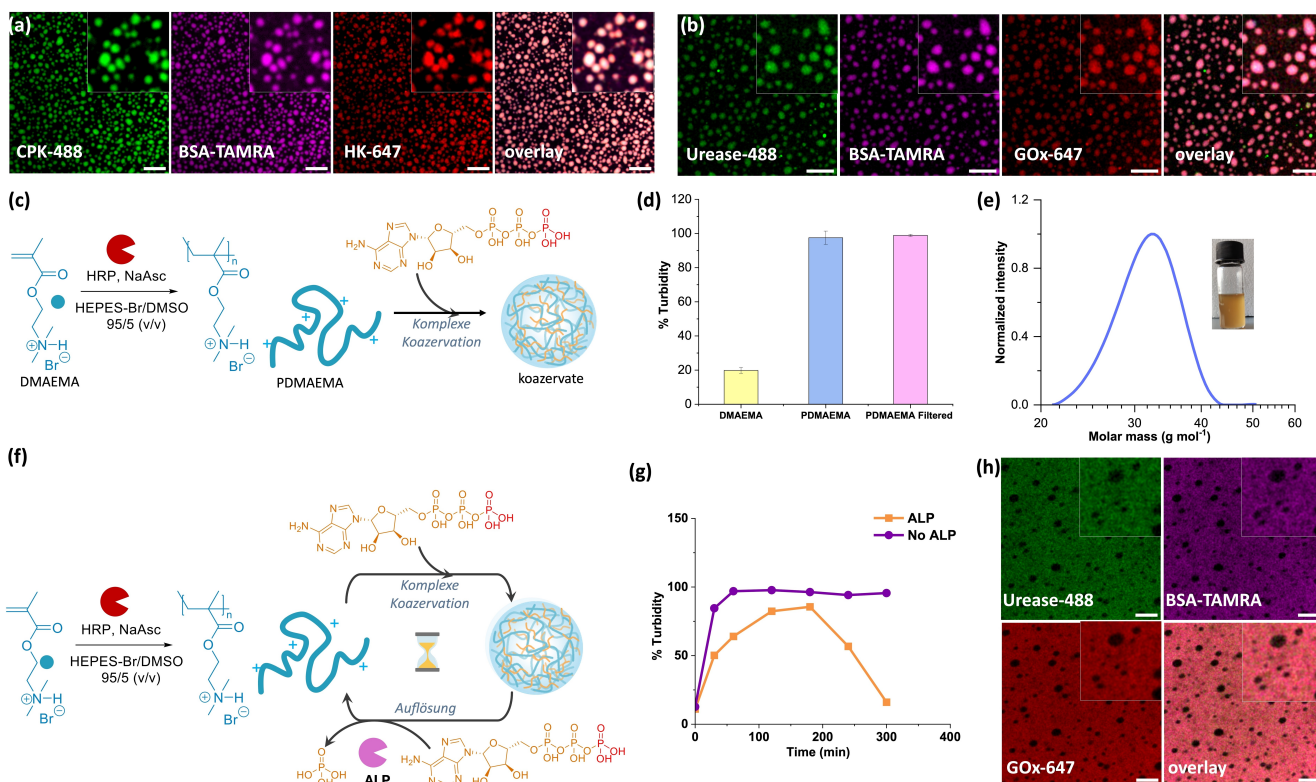


Abbildung 3. CLSM-Bilder von Koazervaten mit segregierten Proteinen/Enzymen. (a) Koazervate mit CPK-488, BSA-TAMRA, HK-647 und Überlagerung. (b) Koazervate mit Urease-488, BSA-TAMRA, GOx-647 und Überlagerung. Skalierbalken = 20 μ m. (c) Schema des bioPIC-Prozesses. (d) % Trübung des Monomers und des Polymers nach der Reaktion (zusammen mit nicht umgesetztem Monomer), gefiltertes Polymer zur Entfernung des nicht umgesetzten Monomers bei der Koazervation ($n=3$, \pm Standardabweichung). (e) Die Molekulargewichtverteilung von PDMAEMA, das durch bioPIC erzeugt wurde, mit einem Foto der trüben Suspension nach der Polymerisation. (f) Schema des ERN-PIC, (g) Zeitabhängige Änderungen der % Trübung in Anwesenheit von 0,4 U/mL ALP. (h) CLSM-Bilder von Koazervaten mit segregierten Proteinen/Enzymen, Koazervate als schwarze Bereiche um Urease-488, BSA-TAMRA, GOx-647 und Überlagerung. Einfügungen zeigen vergrößerte Bilder. [DMAEMA] = 1,5 M, [ATP] = 44 mM (bioPIC), 22 mM (ERN-PIC). Skalierbalken = 20 μ m.

mere wiesen eine Größenverteilung von 20–40 kDa mit einer niedrigen Dispersität von 1,06 auf (Abb. 3e, Tabelle S1).

Anschließend führten wir ERN-PIC durch, bei dem HRP die Monomerpolymerisation durch BioATRP katalysierte, welche in Anwesenheit von ATP Koazervation durchlief, gefolgt von der Auflösung durch ALP-vermittelte ATP-Hydrolyse zu Pi (Abb. 3f). Wie erwartet, folgte auf einen anfänglichen Anstieg der Trübung ein Rückgang, was den ERN-PIC-Prozess bestätigte (Abb. 3g). In Abwesenheit von ALP wurde nur Koazervation ohne Auflösung beobachtet. Interessanterweise konnten Koazervate, die während der bioPIC gebildet wurden, keine markierten Proteine aufnehmen, die nach der Koazervation hinzugefügt wurden (Urease-488, BSA-TAMRA oder GOX-647), was auf eine selektive Permeabilitätsbarriere hinweist (Abb. 3h). Der Partitionierungskoeffizient war bei bioPIC-Koazervaten signifikant niedriger (Abb. S13). Als die Koazervate durch Spin-Filtration und Entfernen von ATP aufgelöst und mit frischem ATP wiedergebildet wurden, lokalisierten sich die Proteine innerhalb der

Koazervate (Abb. S14). Weitere Untersuchungen mit HRP-488 zeigten, dass HRP außerhalb der bioPIC-Koazervate lokalisiert war und oft in halbkreisförmigen Mustern an deren Oberfläche haftete. Diese Beobachtung deutet auf eine Ausschließung aus dem dichten inneren Netzwerk hin, was mit der selektiven Permeabilität der bioPIC-Koazervate übereinstimmt. Kleine Molekülfarbstoffe wie Resorufin, TAMRA und Nile Red lokalisierten sich innerhalb der Koazervate, während markierte Proteine wie GOX-647, HK-647 und BSA-TAMRA ausgeschlossen wurden, was die selektive Barriere verstärkt.

Wir vermuten, dass in bioPIC PDMAEMA in Anwesenheit von ATP polymerisiert, wobei ATP sowohl als Gegenion als auch als Vernetzer wirkt, was ein dicht gepacktes, miteinander verbundenes Netzwerk schafft. Dieses dichte Netzwerk schränkt die Diffusion größerer Moleküle wie Proteine ein, lässt jedoch kleinere Moleküle wie Farbstoffe aufgrund ihrer Größe und der kleineren Hohlräume im Netzwerk hindurch. Im Gegensatz dazu sind die Polymerketten, wenn ATP nach der Polymerisation hinzugefügt wird, flexibler, was eine lockerere Struktur erzeugt, die sowohl kleine als auch große Moleküle diffundieren lässt. Somit steuert die Reihenfolge der ATP-Zugabe die interne Struktur der Koazervate und den darin eingeschlossenen Inhalt. Ähnliche Ergebnisse mit PDDA und ATP zeigen, dass ATP-Vernetzung die Aufnahme von RNA steuert.^[47] Diese ATP-modulierte molekulare Selektivität entspricht unseren Beobachtungen der Enzymausschluss oder -aufnahme je nach den Methoden der Koazervatenvorbereitung (Abb. S15).

Diese selektive Permeabilität könnte einen kontrollierten molekularen Austausch zwischen Makromolekülen in Lösung und denen innerhalb der Koazervate ermöglichen, was weitere experimentelle und theoretische Untersuchungen rechtfertigt. Diese Studie zeigt die Verwendung von BioATRP, um Koazervation *in situ* zu steuern, und bietet eine Strategie für die enzymatische Kontrolle über Koazervation zusätzlich zur umwelt- und gegenionbasierten ERN.

Darüber hinaus ermöglicht sie die Echtzeitüberwachung des Ausmaßes der Koazervation mit Polymerlängen für neue polymere Materialien und ermöglicht es, die Polymerisationsreaktion zu stoppen, wenn die gewünschte Trübung erreicht ist. Danach können die Polymerlängen geschätzt werden.

Zusammenfassung

Unsere Studie führt einen neuen Ansatz zur Bildung von Koazervaten durch *in situ* enzymatische Polymersynthese aus kleinen Molekülen in wässrigen Umgebungen ein, der die natürlichen Polymerisationsprozesse genau nachahmt. Im Gegensatz zu früheren Methoden, die Enzyme einsetzen, um externe Bedingungen wie den pH-Wert zu verändern, verwenden wir ein Enzymreaktionsnetzwerk (ERN), um Polymere direkt zu synthetisieren und gleichzeitig deren Koazervation dynamisch zu regulieren. Dieser Ansatz ähnelt der Bildung intrinsisch ungeordneter Proteine, bei denen kleine Aminosäuren zu Proteinen polymerisieren und anschließend eine Koazervation durchlaufen, was einen vereinfachten Weg zur Bildung von Koazervaten aus kleinen Molekülen ohne komplexe Polymersynthese in nicht-wässrigen Lösungsmitteln bietet.

Wir entwickelten die Systeme bioPIC und ERN-PIC, um die Koazervation durch Polymerwachstum in Anwesenheit von ATP zu treiben, wobei die Regeneration durch enzymatische Aktivität präzise geregelt wurde. Darüber hinaus beobachteten wir, dass die während des bioPIC gebildeten Koazervate keine markierten Proteine aufnehmen konnten, die von außen hinzugefügt wurden, im Gegensatz zur Koazervation nach bioATRP. Dies deutet auf die Bildung einer hochselektiven Permeabilitätsbarriere innerhalb der Koazervate hin, die von der Zubereitungsmethode abhängt. Nach unserem Wissen wurde diese Art der dynamischen Kontrolle – bei der die Koazervation intrinsisch mit der Polymerisation verknüpft ist – bisher noch nicht erreicht, was einen bedeutenden Fortschritt bei der Integration biologischer Prozesse mit synthetischen Materialien unter milden, wässrigen Bedingungen darstellt.

Unsere Ergebnisse unterstreichen das transformative Potenzial von enzymgesteuerten Koazervatsystemen, um komplexe Herausforderungen im Bereich des biomimetischen Materialdesigns zu bewältigen und biologische Wege mit synthetischen Polymergerüsten zu verbinden. Enzymkontrollierte Koazervate haben großes Potenzial für verschiedene Anwendungen wie künstliche Zellen und Organellenmodelle zur Untersuchung zellulärer Prozesse und zur Produktion von Biomolekülen, gezielte Arzneimittelabgabe und Biosensoren durch Freisetzung von Medikamenten oder Änderung physikalischer und optischer Eigenschaften als Reaktion auf Biomarker. Darüber hinaus können Koazervate in intelligenten Materialien für die Gewebezüchtungen, weiche Robotik und umweltfreundliche Materialsynthese eingesetzt werden, die bioinspirierte Lösungen und nachhaltige Fertigungsalternativen bieten.

Hintergrundinformationen

Die Autoren haben zusätzliche Quellen im Abschnitt "Unterstützende Informationen" zitiert.^[48–50]

Autorenbeiträge

S.D. und A.B. entwarfen das Konzept und die Idee. A.B. synthetisierte das Polymer und führte antagonistische sowie orthogonale Urease-Glukoseoxidase-, HK-CPK-Enzymkinetiken, Enzym-Protein- markierte Farbstoff-Imaging von Koazervaten und bioPIC durch. S.S. und S.D. führten die Koazervations-Experimente mit null, einem und zwei Enzymen durch. M.K., S.D. und S.S. führten das FRAP-Experiment und die CLSM-Analyse der Koazervate durch. Alle Autoren analysierten die Daten und entwarfen das Manuskript. Alle Autoren haben die endgültige Version des Manuskripts genehmigt.

Danksagung

Die finanzielle Unterstützung durch die DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) wird gewürdigt: S. D. ist Mitglied des GRK 2516 (Projekt Nr. 405552959) und M. K. ist Doktorand im GRK 2516- Programm. Diese Forschung wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des CRC 1552; Projekt Nr. 465145163 finanziert. A.B. möchte die Unterstützung durch das Athene Young Investigator-Programm der TU Darmstadt anerkennen. Besonderer Dank geht an Prof. A. Walthers, Prof. S. Seiffert und Prof. P. Besenius für ihre Unterstützung bei Spektroskopie- und Mikroskopieeinrichtungen an der JGU sowie an Prof. N. Bruns für die Nutzung von Laborräumen an der TU Darmstadt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

- [1] N. Gao, S. Mann, *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 297–307.
- [2] B. C. Buddingh, J. C. M. van Hest, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 769–777.
- [3] M. C. Huber, A. Schreiber, P. von Olshausen, B. R. Varga, O. Kretz, B. Joch, S. Barnert, R. Schubert, S. Eimer, P. Kele, S. M. Schiller, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 125–132.
- [4] R. Roodbeen, J. C. M. van Hest, *BioEssays* **2009**, *31*, 1299–1308.

- [5] Z. Lin, T. Beneyton, J.-C. Baret, N. Martin, *Small Methods* **2023**, *7*, 2300496.
- [6] M. Abbas, W. P. Lipiński, J. Wang, E. Spruijt, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3690–3705.
- [7] Q.-H. Zhao, F.-H. Cao, Z.-H. Luo, W. T. S. Huck, N.-N. Deng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202117500.
- [8] A. J. Dzieciol, S. Mann, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *41*, 79–85.
- [9] K. P. Sonu, S. Vinikumar, S. Dhiman, S. J. George, M. Eswaramoorthy, *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 1847–1852.
- [10] A. Huang, L. Su, *Acc. Mater. Res.* **2023**, *4*, 729–732.
- [11] S. Chowdhuri, S. Das, R. Kushwaha, T. Das, B. K. Das, D. Das, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203820.
- [12] W. Mu, Z. Ji, M. Zhou, J. Wu, Y. Lin, Y. Qiao, *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabf9000.
- [13] M. Chen, G. Liu, M. Zhang, Y. Li, X. Hong, H. Yang, *Small* **2023**, *19*, 2206437.
- [14] W. M. Aumiller, C. D. Keating, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 129–137.
- [15] K. K. Nakashima, J. F. Baaij, E. Spruijt, *Soft Matter* **2018**, *14*, 361–367.
- [16] K. K. Nakashima, M. H. I. van Haren, A. A. M. André, I. Robu, E. Spruijt, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3819.
- [17] S. Deshpande, F. Brandenburg, A. Lau, M. G. F. Last, W. K. Spoelstra, L. Reese, S. Wunnavu, M. Dogterom, C. Dekker, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1800.
- [18] S. N. Semenov, A. S. Y. Wong, R. M. van der Made, S. G. J. Postma, J. Groen, H. W. H. van Roekel, T. F. A. de Greef, W. T. S. Huck, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 160–165.
- [19] N. Modi, S. Chen, I. N. A. Adjei, B. L. Franco, K. J. M. Bishop, A. C. Obermeyer, *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 4735–4744.
- [20] H. Karoui, M. J. Seck, N. Martin, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 2794–2802.
- [21] W. K. Spoelstra, E. O. van der Sluis, M. Dogterom, L. Reese, *Langmuir* **2020**, *36*, 1956–1964.
- [22] A. Samanta, M. Hörner, W. Liu, W. Weber, A. Walther, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 3968.
- [23] J. Deng, A. Walther, *Chem* **2020**, *6*, 3329–3343.
- [24] E. Shandilya, A. S. Bains, S. Maiti, *J. Phys. Chem. B* **2023**, *127*, 10508–10517.
- [25] A. Jain, S. Kassem, R. S. Fisher, B. Wang, T.-D. Li, T. Wang, Y. He, S. Elbaum-Garfinkle, R. V. Uljijn, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 15002–15007.
- [26] H. Fu, J. Huang, J. J. B. van der Tol, L. Su, Y. Wang, S. Dey, P. Zijlstra, G. Fytas, G. Vantomme, P. Y. W. Dankers, E. W. Meijer, *Nature* **2024**, *626*, 1011–1018.
- [27] W. J. Altenburg, N. A. Yewdall, D. F. M. Vervoort, M. H. M. E. van Stevendaal, A. F. Mason, J. C. M. van Hest, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6282.
- [28] A. F. Mason, B. C. Buddingh, D. S. Williams, J. C. M. van Hest, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17309–17312.
- [29] S. Patra, S. Chandrabhas, S. Dhiman, S. J. George, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 12577–12586.
- [30] S. Cao, T. Ivanov, J. Heuer, C. T. J. Ferguson, K. Landfester, L. Caire da Silva, *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 39.
- [31] M. Abbas, W. P. Lipiński, K. K. Nakashima, W. T. S. Huck, E. Spruijt, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 1046–1054.
- [32] B. Saha, A. Chatterjee, A. Reja, D. Das, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14194–14197.
- [33] M. Tena-Solsona, B. Rieß, R. K. Grötsch, F. C. Löhner, C. Wanzke, B. Käschorf, A. R. Bausch, P. Müller-Buschbaum, O. Lieleg, J. Boekhoven, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15895.
- [34] C. Yuan, A. Levin, W. Chen, R. Xing, Q. Zou, T. W. Herling, P. K. Challa, T. P. J. Knowles, X. Yan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18116–18123.
- [35] S. Yu, W. Chen, G. Liu, B. Flores, E. L. DeWolf, B. Fan, Y. Xiang, M. J. Webber, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 7498–7505.

- [36] A. Belluati, S. Jimaja, R. J. Chadwick, C. Glynn, M. Chami, D. Happel, C. Guo, H. Kolmar, N. Bruns, *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 564–574.
- [37] T. B. Silva, M. Spulber, M. K. Kocik, F. Seidi, H. Charan, M. Rother, S. J. Sigg, K. Renggli, G. Kali, N. Bruns, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2703–2712.
- [38] G. Kali, T. B. Silva, S. J. Sigg, F. Seidi, K. Renggli, N. Bruns, in *Progress in Controlled Radical Polymerization: Mechanisms and Techniques*, American Chemical Society, **2012**, *11*, 171–181.
- [39] K. Renggli, M. Spulber, J. Pollard, M. Rother, N. Bruns, in *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Materials II*, American Chemical Society, **2013**, 163–171.
- [40] P. van de Wetering, E. E. Moret, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, M. J. van Steenbergen, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 589–597.
- [41] A. Mishra, S. Dhiman, S. J. George, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 2740–2756.
- [42] R. B. Stockbridge, R. Wolfenden, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22747–22757.
- [43] S. Dhiman, A. Jain, S. J. George, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1329–1333.
- [44] S. Dhiman, A. Jain, M. Kumar, S. J. George, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16568–16575.
- [45] A. Das, S. Ghosh, A. Mishra, A. Som, V. B. Banakar, S. S. Agasti, S. J. George, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 14844–14855.
- [46] B. G. O'Flynn, T. Mittag, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2021**, *69*, 70–79.
- [47] A. Agrawal, A. Radakovic, A. Vonteddu, S. Rizvi, V. N. Huynh, J. F. Douglas, M. V. Tirrell, A. Karim, J. W. Szostak, *Sci. Adv.* **2024**, *10*, eadn9657.
- [48] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, *Nat. Methods.* **2012**, *7*, 676–682.
- [49] P. M. McCall, S. Srivastava, S. L. Perry, D. R. Kovar, M. L. Gardel, M. V. Tirrell, *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1636–1645.
- [50] K. J. Rodriguez, M. M. Pellizzoni, R. J. Chadwick, C. Guo, N. Bruns, *Methods Enzymol.* **2019**, *627*, 249–262.

Manuskript erhalten: 6. November 2024

Akzeptierte Fassung online: 10. Dezember 2024

Endgültige Fassung online: 23. Dezember 2024