



Die krankheitsassoziierte Tau-Phosphorylierung behindert die Tubulinpolymerisation in Tau-Kondensaten

Adriana Savastano, David Flores, Harindranath Kadavath, Jacek Biernat, Eckhard Mandelkow und Markus Zweckstetter*

Abstract: Die zelluläre Kondensation von intrinsisch ungeordneten Proteinen (IDPs) durch Flüssig-flüssig-Phasentrennung (LLPS) ermöglicht die dynamische Kompartimentierung und Regulation biologischer Prozesse. Das IDP Tau, das den Aufbau von Mikrotubuli fördert und bei der Alzheimer-Krankheit hyperphosphoryliert wird, kann in Lösung und auf der Oberfläche von Mikrotubuli LLPS-Prozesse durchlaufen. Der Einfluss der Tau-Phosphorylierung auf Tau-LLPS-vermittelte Tubulinpolymerisation ist jedoch weitestgehend unbekannt. Wir zeigen hier, dass unmodifiziertes Tau sowie an krankheitsassoziierten Epitopen phosphoryliertes Tau zu flüssigkeitsähnlichen Tröpfchen kondensieren. Obwohl sich Tubulin in allen Tau-Tröpfchen in hohen Konzentrationen anreichert, ist es nicht in der Lage, aus dem Inneren von Tröpfchen, die durch am AT180-Epitop phosphoryliertes Tau (T231/S235) gebildet wurden, zu Mikrotubuli zu wachsen. Im Gegensatz dazu hemmte weder die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Tau noch die Phosphorylierung in der Repeatdomäne die Polymerisation von Tubulin aus Tau-Tröpfchen. Da gezeigt wurde, dass LLPS von IDPs verschiedene Arten der Zytoskelettassemblierung fördert, legt unsere Studie nahe, dass die IDP-Phosphorylierung ein weit verbreiteter Mechanismus für die Regulation der kondensatvermittelten Zytoskelettassemblierung sein könnte.

Zellen enthalten Kompartimente, die für eine Vielzahl von biochemischen Funktionen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen, jedoch nicht von Membranen umgeben sind.^[1] Viele dieser membranlosen Organellen bilden sich durch LLPS von IDPs. Die Kondensation von IDPs zu membranlosen Organellen erhöht die IDP-Konzentration innerhalb der Kondensate stark. Darüber hinaus werden Enzyme und andere Faktoren in membranlose Organellen rekrutiert, wodurch sowohl die grundlegenden biophysikalischen Eigenschaften membranloser Organellen verändert als

auch deren energieabhängige Regulation ermöglicht werden.^[2]

Das IDP Tau fördert den Aufbau und die Bündelung von Mikrotubuli (MTs), schützt MTs vor Depolymerisation,^[3] fördert das Neuritenwachstum^[4] und ist wichtig für die Zellpolarität.^[5] Zusätzlich kann Tau die MT-Assemblierung lokal von Nicht-Zentrosomenstellen in Zellen induzieren.^[6] Die Fähigkeit, MT-Assemblierungen lokal zu fördern, wurde mit LLPS von Tau in Verbindung gebracht.^[7] Tubulin reichert sich in Tau-Tröpfchen an und befördert so die Keimbildung von MTs.^[8] Darüber hinaus bildet Tau flüssigkeitsähnliche Kondensate auf der Oberfläche von MTs, welche die Bewegung von MT-assoziierten Motoren reguliert und Enzyme, die Tubulinstränge zerschneiden würden, abwehrt.^[9] Über den Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Fähigkeit von Tau, MT-Bündel aus kondensierten Phasen zu bilden, ist jedoch wenig bekannt. Mittels der Kombination von LLPS-Experimenten, Tubulinpolymerisationstests, Mutagenese, Prolin-gerichteter Phosphorylierung und NMR-Spektroskopie zeigen wir hier, dass die krankheitsassoziierte Phosphorylierung von Tau an T231 die Bindung der prolinreichen Region P2 von Tau an Tubulin stört und die Assemblierung von Tubulin innerhalb von Tau-Kondensaten blockiert.

Mikroskopieaufnahmen zeigten, dass die 441-Rest-Isoform von Tau (hTau40) in Gegenwart von 10 % Dextran kugelförmige Tröpfchen bildet (Abbildung S1a). Die Tröpfchen waren empfindlich gegenüber der Ionenstärke und dem aliphatischen Alkohol 1,6-Hexandiol (Abbildung S1b), d. h., sie zeigten typische LLPS-Eigenschaften. Zusätzlich phasenseparierte die kürzere Isoform von Tau (hTau23; mit 352 Resten) in Gegenwart von Dextran (Abbildung S1c). Als nächstes inkubierten wir hTau40 mit katalytischen Mengen der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (Cdk2), die Tau an mehreren Resten phosphoryliert (Abbildung 1 a, S2a,b), einschließlich T231/S235, einem Epitop, das vom monoklonalen Antikörper

[*] Dr. A. Savastano, Dr. D. Flores, Dr. H. Kadavath, Prof. Dr. M. Zweckstetter
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)
Von-Siebold-Straße 3a, 37075 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: Markus.Zweckstetter@dzne.de
Dr. J. Biernat, Prof. Dr. E. Mandelkow
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE)
Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn (Deutschland)
und
Research Center CAESAR
Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn (Deutschland)
Prof. Dr. M. Zweckstetter
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Faßberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202011157> zu finden.

© 2020 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. 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.

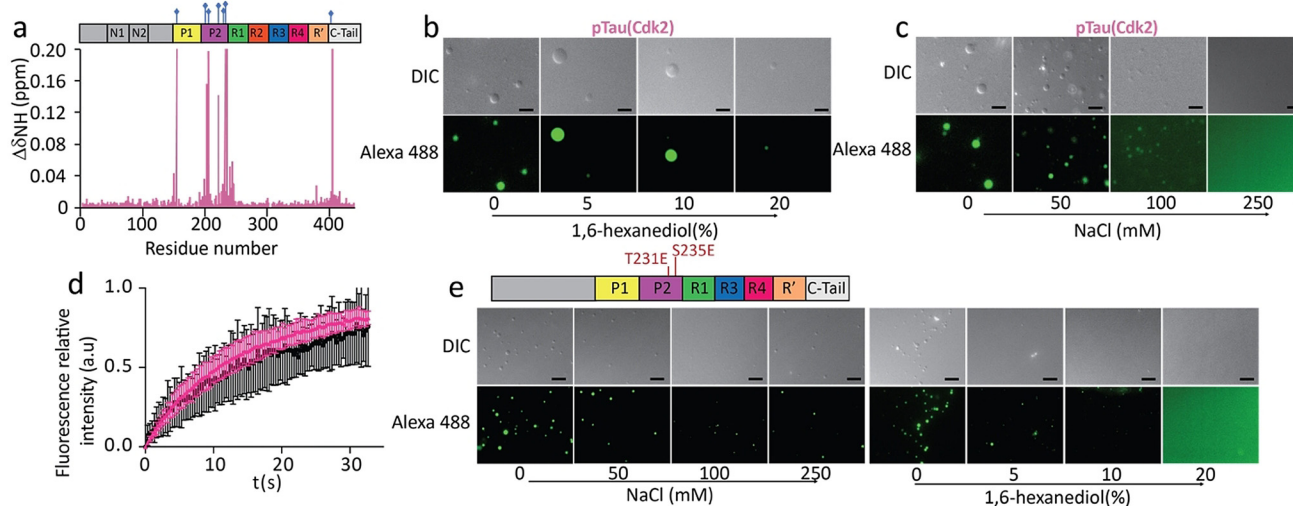


Abbildung 1. LLPS von Tau phosphoryliert an krankheitsassoziierten Epitopen. a) Änderungen in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen von hTau40 durch Cdk2-Phosphorylierung. b,c) pTau(Cdk2) (25 μM) bildet flüssigkeitsähnliche Tröpfchen, die sich bei Zugabe von 1,6-Hexandiol (b) und mit zunehmender Ionenstärke (c) auflösen. Maßstabsbalken 10 μm . d) FRAP von 50 μM pTau(Cdk2) (rosa) und hTau40 (schwarz). FRAP-Kurven wurden aus vier Einzelmessungen gemittelt; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. e) Die T231E/S235E-Mutante von hTau23 (50 μM) bildet flüssigkeitsähnliche Tröpfchen, die sich mit zunehmender Ionenstärke (links) oder durch Zugabe von 1,6-Hexandiol (rechts) auflösen. Maßstabsbalken 10 μm . Oberes Feld: Domänenorganisation von hTau23, mutiert zu T231E/S235E.

AT180 in unlöslichen Tau-Ablagerungen im Gehirn von Patienten erkannt wird.^[10] pTau(Cdk2) bildete in Gegenwart von Dextran kugelförmige Kondensate (Abbildung 1b und S2c). Die pTau(Cdk2)-Tröpfchen fusionierten und lösten sich mit ansteigender Ionenstärke oder nach Zugabe von Hexandiol auf (Abbildung 1b,c und S2d,e). Die Intra-Tröpfchendiffusion von Cdk2-phosphoryliertem hTau40 war ähnlich der des unmodifizierten Proteins (Abbildung 1d). Da Cdk2 nicht nur T231 und S235, sondern auch andere Stellen phosphoryliert (Abbildung 1a, S2b), haben wir ein mutiertes Tau hergestellt, bei dem T231 und S235 durch Glutamat ersetzt wurden, um die AT180-spezifische Phosphorylierung nachzuahmen. Das mutierte Protein hTau23(T231E,S235E) bildete kugelförmige Tröpfchen, die gegenüber der Zugabe von NaCl empfindlich waren und sich in Gegenwart von 5–10% 1,6-Hexandiol auflösten, d.h. LLPS-Eigenschaften zeigten (Abbildung 1e).

Tau senkt die kritische Konzentration für die Tubulinpolymerisation.^[3,11] In Übereinstimmung mit früheren Studien, die zeigten, dass das MT-Wachstum bei 25 °C nicht spontan auftritt, sondern eine Keimbildung erfordert,^[11] beobachteten wir keine Tubulinpolymerisation, wenn es bei Raumtemperatur mit GTP und hTau40 gemischt wurde (Abbildung S3a). Somit sind unter diesen

Lösungsbedingungen die Konzentrationen von Tubulin und Tau für die Tubulinpolymerisation nicht ausreichend. Da eine Schlüsseleigenschaft von LLPS die Bildung einer hochkonzentrierten Phase ist, wiederholten wir das Experiment, bil-

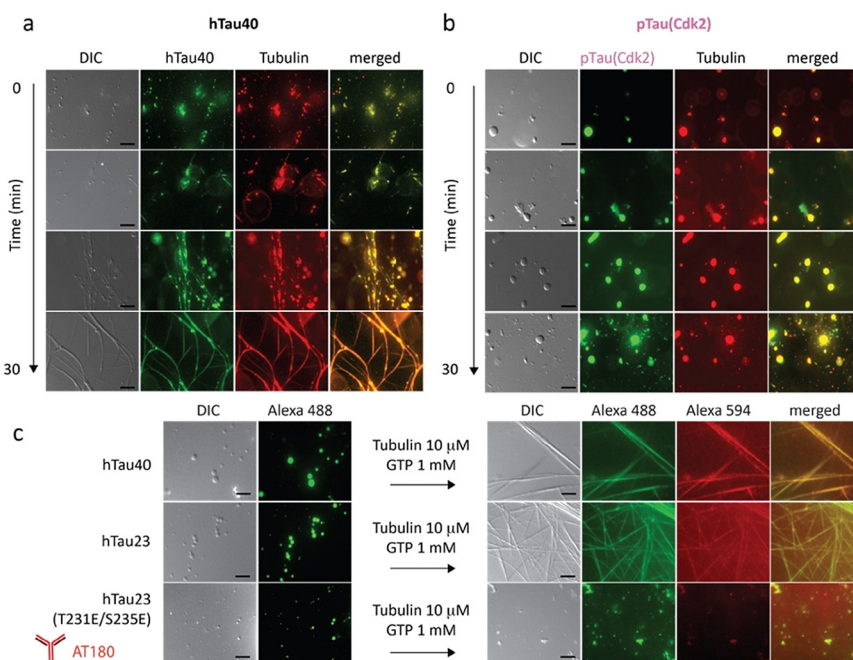


Abbildung 2. Die AT180-Phosphorylierung blockiert die Keimbildung von MT-Filamenten in Tau-Tröpfchen. a) DIC- und Fluoreszenzmikroskopie des Wachstums von MTs aus hTau40-Tröpfchen (25 μM) nach Zugabe von Tubulin (10 μM) und GTP; Maßstabsbalken 10 μm . b) Mikroskopie von pTau(Cdk2)-Tröpfchen, in denen sich Tubulin anreichert, aber keine MTs in Gegenwart von GTP gebildet werden; Maßstabsbalken 10 μm . c) LLPS von hTau40, hTau23 und hTau23(T231E/S235E) und die Polymerisation von Tubulin zu MTs im Fall der Wildtyp-Proteine, jedoch nicht für die hTau23-Mutante, die die AT180-Phosphorylierung nachahmt. Maßstabsbalken 10 μm .

deten jedoch zuerst Tröpfchen von hTau40 durch Zugabe von Dextran und gaben erst nach Tröpfchenbildung Tubulin und GTP hinzu. Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass sich das zugesetzte Tubulin in den hTau40-Tröpfchen anreicherte (Abbildung 2a und S3b). Zusätzlich verformten sich die Tröpfchen, und kleine MT-Filamente begannen aus den Tröpfchen zu wachsen. Tatsächlich wurden innerhalb von 30 Minuten lange MT-Bündel unter dem Mikroskop beobachtet (Abbildung 2a). In Abwesenheit von hTau40 bildeten sich keine MTs, wenn 10% Dextran vorhanden waren (Abbildung S3c). Die Beobachtungen stimmen mit der zuvor beschriebenen Anreicherung von Tubulin in Tau-Tröpfchen und der anschließenden Polymerisation von Tubulin aus der Tau-dichten Phase überein.^[8] Die Daten zeigen, dass die Anreicherung von Tubulin in einem Tau-Kondensat einen effizienten Mechanismus für die Tubulinpolymerisation darstellt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Tau am AT180-Epitop die Tau-geförderte Tubulinpolymerisation stört.^[10c] Da die Tubulinkonzentration in hTau40-Tröpfchen erhöht ist (Abbildung S3b),^[8] untersuchten wir, ob die Anreicherung von Tubulin in pTau(Cdk2)-Tröpfchen diese Hemmwirkung überwindet. Wir haben daher Tubulin und GTP zu einer Lösung mit vorgeformten pTau(Cdk2)-Tröpfchen gegeben. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass sich Tubulin effizient in den pTau(Cdk2)-Tröpfchen anreichert (Abbildung 2b, S3b). Bemerkenswerterweise war die Konzentration von pTau(Cdk2) in den Tröpfchen höher als für das unmodifizierte Protein, in Übereinstimmung mit einer erhöhten LLPS-Neigung von phosphoryliertem Tau.^[7a,b,8] Überraschenderweise wuchs Tubulin jedoch nicht aus pTau(Cdk2)-Tröpfchen zu MTs (Abbildung 2b). Wir wiederholten die Experimente dann mit der doppelten pTau(Cdk2)-Konzentration (Abbildung S3d). Wiederum wurde jedoch keine MT-Bildung beobachtet (Abbildung S3e). Zusätzlich inhibierte die Cdk2-Phosphorylierung von hTau23 die Tubulinpolymerisation aus Tröpfchen (Abbildung S3f,g). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen reicherte sich Tubulin in vorgeformten hTau23(T231E,S235E)-Tröpfchen an, polymerisierte jedoch nicht zu MTs (Abbildung 2c). Die Experimente zeigen, dass selbst hohe Tubulinkonzentrationen in Tau-Kondensaten für die MT-Bildung nicht ausreichen, wenn Tau am AT180-Epitop phosphoryliert ist.

Wir fragten dann, ob die beeinträchtigte MT-Keimbildung in Tau-Tröpfchen spezifisch für die AT180-Phosphorylierung ist. Zu diesem Zweck phosphorylierten wir hTau40 mit der Kinase MARK2 (Abbildung S4a–c). In Übereinstimmung mit früheren Studien^[7a,b,8] bildete pTau(MARK2) in Gegenwart von 10% Dextran kugelförmige Tröpfchen (Abbildung S4d, links). Bei Zugabe von Tubulin und GTP bildeten sich MT-Filamente (Abbildung S4d, rechts). Diese waren jedoch im Vergleich zu unmodifiziertem hTau40 weniger häufig/regelmäßig, möglicherweise aufgrund der abgeschwächten Bindung von MARK2-phosphoryliertem Tau an Tubulin (Abbildung S5a).^[12] Als nächstes phosphorylierten wir hTau40 mit der Tyrosinkinase C-Abl (Abbildung S4e–g, S6).^[13] Die Bindung von pTau(C-Abl) an MTs war durch NMR-Spektroskopie nicht von der des nicht modifizierten Proteins zu unterscheiden (Abbildung S5b). Zusätzlich pha-

senseparierte pTau(C-Abl) und – nach Zugabe von Tubulin und GTP – polymerisierte zu MTs (Abbildung S4h).

Um die Wechselwirkung von Tau mit Tubulin mit hoher Auflösung zu charakterisieren, führten wir NMR-Experimente mit Tau in Gegenwart steigender Tubulinkonzentrationen durch. Um die Verbreiterung des NMR-Signals zu vermindern,^[7b] wurden die Experimente zuerst in Abwesenheit von molekularen Verdichtungsreagenzien gemessen, d. h. unter Bedingungen, unter denen hTau40 nicht phasensepariert und Tubulin nicht polymerisiert. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen^[14] beobachteten wir progressive Änderungen der NMR-Signalintensität und der Position einzelner hTau40-Reste bei steigenden Tubulinkonzentrationen (Abbildung 3a). Besonders starke Signalverbreiterungen wurden für die Reste ≈ 224 –237 in der P2-Region, ≈ 245 –253 in R1, ≈ 274 –287 an der Grenze zwischen R1/R2 und ≈ 300 –318 in R2/R3 beobachtet (Abbildung 3b). Eine zusätzliche Tubulin-induzierte Verbreiterung wurde in P1 und R' beobachtet, was darauf hinweist, dass Reste in diesen beiden Domänen zur Tau/Tubulin-Wechselwirkung beitragen. Die Bedeutung der Repeatdomäne von Tau für die Bindung an nicht polymerisiertes Tubulin wird durch biochemische Studien gestützt.^[15]

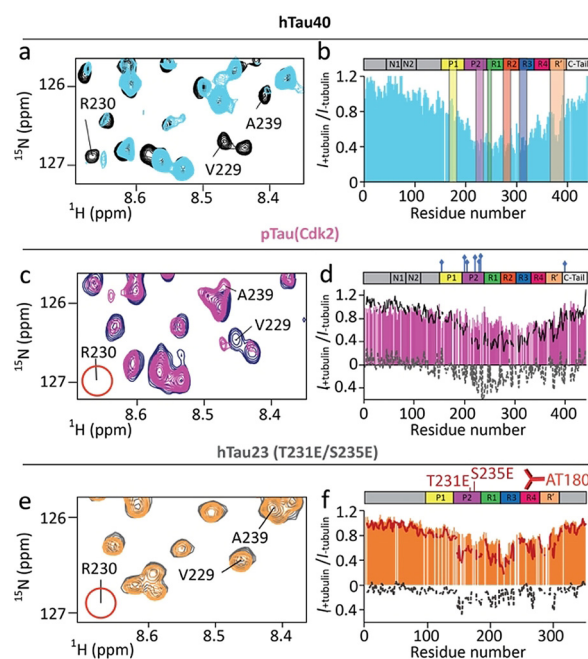


Abbildung 3. Die AT180-Phosphorylierung stört die Wechselwirkung der P2-Region von Tau mit Tubulin. a,c,e) Überlagerung einer ausgewählten Region der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von hTau40 (a), pTau(Cdk2) (c) und hTau23 (T231E/S235E) (e) in ihrem freien Zustand (a: schwarz; c: blau; e: grau) und in Gegenwart von Tubulin (Molverhältnis 1:0.5 Tau/Tubulin; a: hellblau; c: rosa; e: orange). Bei der Phosphorylierung durch Cdk2 oder T231E/S235E-Mutation verschwindet der Kreuzpeak von R230 (gekennzeichnet durch einen roten Kreis). b,d,f) Abnahme von ^1H - ^{15}N -Signalintensitäten von hTau40 (b), pTau(Cdk2) (d) und hTau23 (T231E/S235E) (f) (jeweils $10\ \mu\text{M}$) nach Zugabe von $5\ \mu\text{M}$ nicht-polymerisiertem Tubulin. Zuvor identifizierte Schlüsselbereiche der Tau/Tubulin-Wechselwirkung^[14a] sind in (b) markiert. Zum Vergleich sind die Profile von hTau40 (schwarz) und hTau23 (rot) dargestellt. Unterschiede werden als gestrichelte Linie dargestellt.

Die gleiche NMR-Analyse wurde anschließend für pTau-(Cdk2) durchgeführt (Abbildung 3c). Bereiche von pTau-(Cdk2) C-terminal zu Repeat R2, d.h. die Bereiche R3, R4 und R', zeigten ein ähnliches Tubulin-Bindungsprofil wie unmodifiziertes Tau (Abbildung 3d). Im Gegensatz dazu waren die in der P2-Region und in R1 befindlichen Reste bei Zugabe von Tubulin weniger verbreitert (Abbildung 3d). Zudem schwächte die Substitution von T231 und S235 durch Glutamat die Signalverbreiterung in P2 und R1 ab (Abbildung 3e,f). Die Daten zeigen, dass die Phosphorylierung am AT180-Epitop die Wechselwirkung der P2-Region von Tau mit Tubulin stört. Diese Störung verringert jedoch nicht die Gesamtaffinität der Bindung von Tau an Tubulin.^[10c]

Als nächstes verwendeten wir NMR, um die Tau/Tubulin-Wechselwirkung unter LLPS-Bedingungen zu untersuchen. Die Experimente sind schwierig, da unter LLPS-Bedingungen eine schnelle Tubulinpolymerisation auftritt und LLPS die Verbreiterung der NMR-Signale verstärkt. Um diese Probleme zu minimieren, wurden die Temperatur auf 5°C sowie die NMR-Messdauer verringert. Die Mikroskopieaufnahmen zeigten, dass sowohl hTau40 als auch pTau(Cdk2) bei 5°C Tröpfchen bilden (Abbildung S7a,b). Anschließend haben wir NMR-Spektren für hTau40 und pTau(Cdk2) in An- und Abwesenheit von Tubulin gemessen. Das Gesamt-NMR-Signal von hTau40 in Gegenwart von Tubulin und Dextran war auf 30–40% verringert (Abbildung S7c). Im Fall von pTau(Cdk2) war die Abnahme dagegen viel geringer (Abbildung S7c). Dies deutet darauf hin, dass die starke Signalabnahme bei hTau40 auf die Tubulinpolymerisation zurückzuführen ist. Gleichzeitig zeigte die Analyse, dass sowohl für hTau40 als auch für pTau(Cdk2) die Repeatregion unter LLPS-Bedingungen an Tubulin bindet (Abbildung S7c,d).

Die Phosphorylierung der P2-Region von Tau verändert die elektrostatischen Eigenschaften der Tau/Tubulin-Wechselwirkung. Zusätzlich können die Phosphatgruppen Salzbrücken bilden. Um Hinweise auf die Bildung intramolekularer Salzbrücken in phosphoryliertem Tau zu finden, haben wir ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren aufgenommen, die für die Arginin-Guanidinium-Seitenkettengruppen optimiert sind. Für unmodifiziertes hTau40 beobachteten wir einen großen Cluster überlappender Signale (¹H-Verschiebungen von 7.3–

7.4 ppm) zusammen mit einem breiten, leicht nach unten verschobenen Signal bei ca. 7.45 ppm (Abbildung 4). Die geringe Dispersion und Intensität dieser NMR-Signale wird durch den schnellen Austausch labiler Guanidiniumprotonen der Seitenketten verursacht. Im Gegensatz dazu schärften sich die NMR-Signale, und es traten neue Signale im Spektrum von pTau(Cdk2) auf (Abbildung 4). Um die Identität der pTau(Cdk2)-spezifischen Signale zu bestimmen, zeichneten wir den gleichen Spektralbereich für ein Tau-Peptid auf, das die Reste 225–246 umfasst und am AT180-Epitop phosphoryliert ist (T231 und S235; als Tau(225–246)-AT180 bezeichnet). Tau(225–246)-AT180 enthält zwei Argininreste, nämlich R230 und R242. Die Überlagerung des Spektrums von Tau(225–246)-AT180 mit dem von pTau(Cdk2) zeigte, dass sich ein Arginin-Signal in dem breiten Resonanzcluster befindet, der von labilen Guanidinium-Protonen stammt. Das andere Signal überlappt jedoch mit dem Signal bei ca. 7.53 ppm (Abbildung 4), der spezifisch für das Salzbrückenbildende Seitenketten-Guanidiniumproton von R230 ist.^[16] Die Analyse legt nahe, dass die Cdk2-Phosphorylierung zur Bildung einer intramolekularen Salzbrücke zwischen R230 und phosphoryliertem T231 führt.

Ein wichtiger Aspekt der MT-Polymerisation ist die Konformation, die die Tubulinmonomere annehmen.^[17] Während am wachsenden Ende von MTs gekrümmte αβ-Tubulindimere angefügt werden, nehmen die bereits in MTs eingebauten Heterodimere eine gerade Konformation an, die der Struktur Stabilität verleiht.^[17] Unsere Beobachtungen in Kombination mit früheren Ergebnissen^[8] legen nahe, dass nicht membrangebundene Kompartimente, in denen Tau konzentriert ist, durch Stabilisierung des αβ-Tubulin-Heterodimers zu einem Polymerisationsmechanismus ohne Template beitragen könnten. Wenn jedoch Tau an T231 in der prolinreichen Region P2 phosphoryliert wird, geht R230 eine intramolekulare Salzbrücke mit der T231-Phosphatgruppe ein. R230 ist somit nicht mehr in der Lage, eine intermolekulare Salzbrücke mit Tubulin zu bilden. Dieses Modell steht im Einklang mit Mutagenese und biochemischen Experimenten, die zeigten, dass R230 für die MT-Polymerisation wichtig ist.^[18]

Wir haben gezeigt, dass unmodifiziertes 3R- und 4R-Tau sowie an krankheitsassoziierten Epitopen phosphoryliertes Tau zu flüssigkeitsähnlichen Tröpfchen kondensieren. Obwohl Tubulin in allen Tau-Tröpfchen angereichert war, war es nicht in der Lage, aus dem Inneren von Tröpfchen, die durch am AT180-Epitop phosphoryliertes Tau (T231/S235) gebildet wurden, zu MTs zu wachsen. Die blockierte MT-Polymerisation aus Tröpfchen von AT180-phosphoryliertem Tau steht in auffallendem Kontrast zu der hocheffizienten MT-Polymerisation in Tröpfchen von unmodifiziertem Tau. Der Effekt ist zudem spezifisch, weil weder die Phosphorylierung von Tau in der Repeatdomäne noch an seinen Tyrosinresten die Assemblierung von Tubulin aus Tau-Tröpfchen inhibierte. Da gezeigt wurde, dass LLPS von IDPs verschiedene Arten der Zytoskelett-Assemblierung fördert,^[19] könnte die Modulation dieses Prozesses durch IDP-Phosphorylierung ein Mechanismus sein, der bei der kondensatvermittelten Zytoskelettanordnung weit verbreitet ist.

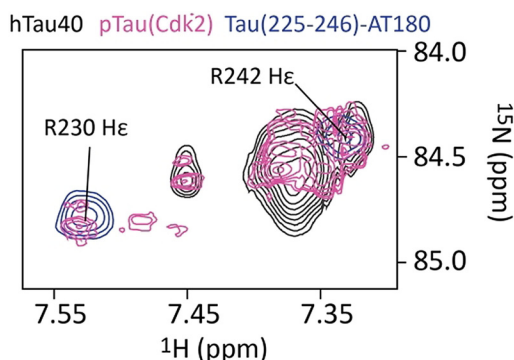


Abbildung 4. Nachweis einer intramolekularen Salzbrücke in pTau-(Cdk2). Überlagerung der Guanidiniumregion der 2D ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von hTau40 (schwarz), pTau(Cdk2) (pink) und Tau(225–246)-AT180 (blau).

Danksagung

Wir danken Maria-Sol Cima-Omori für die Hilfe bei der Probenvorbereitung. M.Z. wurde durch das Advanced Grant „787679 – LLPS-NMR“ des ERC und die DFG durch SPP2191 (DFG ZW 71/9-1) und SFB860 (Projekt B2) unterstützt. E.M. wurde von der DFG durch SPP2191 (DFG Ma 563/14-1) unterstützt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Flüssig-flüssig-Phasentrennung · IDP · NMR-Spektroskopie · Phosphorylierung · tau

- [1] a) S. Alberti, D. Dormann, *Annu. Rev. Genet.* **2019**, *53*, 171–194; b) S. Boeynaems, S. Alberti, N. L. Fawzi, T. Mittag, M. Polymenidou, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J. Shorter, B. Wolozin, L. Van Den Bosch, P. Tompa, M. Fuxreiter, *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 420–435.
- [2] a) T. J. Nott, T. D. Craggs, A. J. Baldwin, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 569–575; b) A. K. Rai, J. X. Chen, M. Selbach, L. Pelkmans, *Nature* **2018**, *559*, 211–216.
- [3] a) D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *J. Mol. Biol.* **1977**, *116*, 207–225; b) M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 1858–1862.
- [4] D. G. Drubin, S. C. Feinstein, E. M. Shooter, M. W. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1799–1807.
- [5] A. Caceres, S. Potrebic, K. S. Kosik, *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 1515–1523.
- [6] a) D. G. Drubin, M. W. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2739–2746; b) Y. Kanai, J. Chen, N. Hirokawa, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3953–3961; c) S. A. Lewis, I. E. Ivanov, G. H. Lee, N. J. Cowan, *Nature* **1989**, *342*, 498–505; d) J. Knops, K. S. Kosik, G. Lee, J. D. Pardee, L. Cohen-Gould, L. McConlogue, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 725–733; e) G. Lee, S. L. Rook, *J. Cell Sci.* **1992**, *102*, 227–237; f) A. Muroyama, T. Lechler, *Development* **2017**, *144*, 3012–3021.
- [7] a) S. Wegmann, B. Eftekhazadeh, K. Tepper, K. M. Zoltowska, R. E. Bennett, S. Dujardin, P. R. Laskowski, D. MacKenzie, T. Kamath, C. Commins, C. Vanderburg, A. D. Roe, Z. Fan, A. M. Molliex, A. Hernandez-Vega, D. Muller, A. A. Hyman, E. Mandelkow, J. P. Taylor, B. T. Hyman, *EMBO J.* **2018**, *37*, 7; b) S. Ambadipudi, J. Biernat, D. Riedel, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 275; c) X. Zhang, Y. Lin, N. A. Eschmann, H. Zhou, J. N. Rauch, I. Hernandez, E. Guzman, K. S. Kosik, S. Han, *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2002183.
- [8] A. Hernández-Vega, M. Braun, L. Scharrel, M. Jahnel, S. Wegmann, B. T. Hyman, S. Alberti, S. Diez, A. A. Hyman, *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2304–2312.
- [9] a) R. Tan, A. J. Lam, T. Tan, J. Han, D. W. Nowakowski, M. Vershinin, S. Simo, K. M. Ori-McKenney, R. J. McKenney, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1078–1085; b) V. Siahhaan, J. Krattenmacher, A. A. Hyman, S. Diez, A. Hernandez-Vega, Z. Lansky, M. Braun, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1086–1092.
- [10] a) L. Amniai, G. Lippens, I. Landrieu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 743–746; b) K. Baumann, E. M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms, E. Mandelkow, *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 417–424; c) L. Amniai, P. Barbier, A. Sillen, J. M. Wieruszeski, V. Peyrot, G. Lippens, I. Landrieu, *FASEB J.* **2009**, *23*, 1146–1152.
- [11] a) D. K. Fyngenson, E. Braun, A. Libchaber, *Phys. Rev. E* **1994**, *50*, 1579–1588; b) K. A. Johnson, G. G. Borisy, *J. Mol. Biol.* **1979**, *133*, 199–216.
- [12] J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Neuron* **1993**, *11*, 153–163.
- [13] P. Derkinderen, T. M. Scales, D. P. Hanger, K. Y. Leung, H. L. Byers, M. A. Ward, C. Lenz, C. Price, I. N. Bird, T. Perera, S. Kellie, R. Williamson, W. Noble, R. A. Van Etten, K. Leroy, J. P. Brion, C. H. Reynolds, B. H. Anderton, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 6584–6593.
- [14] a) M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000034; b) A. Sillen, P. Barbier, I. Landrieu, S. Lefebvre, J. M. Wieruszeski, A. Leroy, V. Peyrot, G. Lippens, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3055–3064.
- [15] a) N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9511–9522; b) K. A. Butner, M. W. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 717–730.
- [16] M. Schwalbe, H. Kadavath, J. Biernat, V. Ozenne, M. Blackledge, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *Structure* **2015**, *23*, 1448–1458.
- [17] G. J. Brouhard, L. M. Rice, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 451–463.
- [18] B. L. Goode, P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, S. C. Feinstein, *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 353–365.
- [19] M. R. King, S. Petry, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 270.

Manuskript erhalten: 18. August 2020

Veränderte Fassung erhalten: 29. September 2020

Akzeptierte Fassung online: 5. Oktober 2020

Endgültige Fassung online: 9. November 2020