

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Flip-Aktivität membranfusogener Modellpeptide in Phospholipidmembranen

Marcella Langer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. I. Antes

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Die Dissertation wurde am 09.12.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.02.2011 angenommen.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für die Überlassung des Projekts, die anregenden Diskussionen und vor allem die mir eingeräumten forscherschen Freiräume.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Rudi F. Vogel für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit sowie Frau Prof. Dr. Iris Antes für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere für die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Karolina Bobowski und Rashmi Srivastava für die wissenschaftlichen Diskussionen und ihre hilfreichen Ideen bedanken. Aline Schindler gebührt zusätzlich Dank für die schnelle und aufmerksame Korrektur dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei all meinen Freunden, die mir mit vielen freudigen Abendstunden den nötigen Ausgleich zu dieser Arbeit verschafften. Besonders danke ich meiner Familie für ihre immerwährende Hilfe und ihre liebevolle Unterstützung.

Vielen Dank!

Meinen Lieben

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Membranen und Phospholipide.....	3
1.1.1 Lipidkomponenten.....	3
1.2 Transmembrane Lipidbewegungen in biologischen Membranen.....	6
1.2.1 Verteilung der Membranlipide und die Rolle von Membranproteinen.....	7
1.2.2 Membranfusion.....	10
1.3 Charakterisierung von transmembranen Lipidbewegungen.....	12
1.3.1 Membranintegrale Modellpeptide.....	14
1.3.2 Phospholipid-Flip durch NBD-Phospholipidanaloga.....	17
2 Ziel der Arbeit.....	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Materialien.....	21
3.1.1 Geräte.....	22
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Ansetzen von Peptidlösungen.....	23
3.2.2 Herstellung von Liposomen.....	23
3.2.3 Messung und Auswertung der Fusions-Kinetik.....	25
3.2.4 Messung und Auswertung der Flip-Kinetik.....	26
3.2.5 Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	27
3.2.6 Bestimmung des P/L-Verhältnisses.....	27
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Synthetische Modellpeptide.....	29
4.2 Messung der Liposomendichtigkeit.....	31
4.3 Abhängigkeit des Phospholipid-Flips von der Peptidsequenz.....	33
4.3.1 Flip durch Peptide mit unterschiedlichem L/V-Verhältnis.....	33
4.3.2 Flip durch Peptide unterschiedlicher Länge.....	35
4.3.3 Flip durch eine acylierte Peptidvariante.....	36
4.3.4 Flip durch His-flankierte Peptide.....	37
4.3.5 Flip durch SNARE-Peptide.....	40

4.4	Abhängigkeit des Phospholipid-Flips von den Phospholipiden in der Liposomenzusammensetzung	43
4.4.1	Einfluss von DOPS und DOPE auf den NBD-PC-Flip	44
4.4.2	Einfluss von DOPS auf den NBD-PS-Flip	45
4.4.3	Einfluss von DOPE auf den NBD-PE-Flip.....	46
4.5	Einfluss elektrostatischer Interaktionen auf den Phospholipid-Flip	47
4.6	Messung der DTN-Bleichgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Peptidsequenz.....	48
4.7	Einfluss von LPC und Cholesterol auf den Phospholipid-Flip	50
4.7.1	Auswirkungen von LPC auf die Liposomenfusion und den Phospholipid-Flip	50
4.7.2	Auswirkungen von Cholesterol auf den Phospholipid-Flip und die Liposomenfusion	52
5	Diskussion.....	56
5.1	Flip-Eigenschaften von Modellpeptiden.....	56
5.1.1	Flexibilität der hydrophoben Kernsequenz und Phospholipid-Flip.....	56
5.1.2	Rolle der flankierenden Aminosäuren.....	61
5.2	Rolle der Phospholipide in der Liposomenzusammensetzung	63
5.3	Rolle des Lipid-Flips bei der Membranfusion.....	66
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	69
6	Literaturverzeichnis	73
	Abbildungsverzeichnis.....	84
	Tabellenverzeichnis.....	86
	Abkürzungen.....	87
	Lebenslauf.....	89

Zusammenfassung

Der transversale Phospholipidaustausch in Membranen, welcher auch als Flip-Flop bezeichnet wird, ist essentiell für die Verteilung neu synthetisierter Phospholipide. Es wird weiterhin vorgeschlagen, dass Lipid-Flip während der Fusion zweier Membranen stattfindet, wenn sich das Hemifusionsdiaphragma bildet und sich größere Liposomen formen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass integralen Proteinen und vor allem deren Transmembrandomänen (TMDn) eine entscheidende Rolle in der transversalen Diffusion von Phospholipiden zukommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Flip-Aktivität von Peptiden getestet, die in früheren Arbeiten, basierend auf hydrophoben Aminosäuren mit unterschiedlichen Sekundärstrukturpräferenzen, *de novo* entworfen wurden oder die TMDn natürlich vorkommender, fusogener Proteine nachahmen. Die Peptide wurden in Liposomen inkorporiert und der durch sie ausgelöste Flip für die fluoreszenz-markierten C₆NBD-Phospholipidanaloga Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) bestimmt und mit ihrer strukturellen Flexibilität und Fusogenität systematisch verglichen.

Es zeigte sich, dass die Effizienz mit der die Peptide den Flip der drei Phospholipidspezies katalysieren entscheidend von der Primärstruktur des hydrophoben Kerns abhängt. Peptide deren α -Helix-Rückgrad eine ausgeprägte lokale Dynamik aufweist (LV16-G8P9 und LV16) induzierten Flip von PC, PS und PE mit ähnlichen Raten und Ausmaß. Wenig flexible Peptide (LLV16 und L16) zeigten dagegen unterschiedlich ausgeprägten kopfgruppenspezifischen Flip für PC, PE und PS. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die hydrophobe Länge einer alternierenden LV-Sequenz, sowie eine Palmitoyl-Kette am N-terminalen Peptidende den Flip beeinflussen. Neben der hydrophoben Kernsequenz wurde auch der Effekt der flankierenden Aminosäuren getestet. Es zeigte sich, dass ungeladene Histidin-Triplets den Flip von PC und PE reduzieren. Durch Protonierung der Histidine konnte das Flip-Ausmaß teilweise wieder auf das Level der Lysin-Varianten angehoben werden. Die Variation der liposomalen Zusammensetzung modulierte die peptidinduzierte Flip-Aktivität unter Beibehaltung der Kopfgruppenspezifität. Dabei konnte eine stimulierende Wirkung negativ geladener Lipide in der Zusammensetzung festgestellt werden.

Ein klarer Zusammenhang zwischen der Flip-Aktivität und der Fusion konnte nicht festgestellt werden. Cholesterol inhibierte den Flip mehr als die Fusion. Umgekehrt konnte Lysophosphatidylcholin (LPC) die Fusion blockieren, aber nicht den Flip. Somit können die Daten eine Rolle für Flip während der Fusion nicht bestätigen.

Die getesteten Modellpeptide besitzen eine spezifische Flip-Aktivität, die durch ihre Dynamik und α -helikale Konformation bedingt ist. Komplexe Wechselwirkungen der Phosphatgruppen und Carbonylen der Lipide mit den basischen, terminalen Aminosäuren sowie dem hydrophoben Kern

der Peptide scheinen die Lipid-Lipid-Interaktion in einer Doppelmembran in Abhängigkeit der Peptiddynamik zu stören und somit Flip zu ermöglichen.

Einleitung

1.1 Membranen und Phospholipide

Die Ausbildung von Membranen ist ein wichtiger Bestandteil für die Entstehung des Lebens. Sie bilden die Barriere zwischen Zellinnerem und -äußerem und ermöglichen die Kompartimentierung in Organellen innerhalb der eukaryotischen Zelle.

Biologische Membranen bestehen aus einer etwa 60 Å dicken Lipiddoppelschicht [1, 2], die durch eine innere, hydrophobe Acylkettenregion und einen hydrophilen, äußeren Bereich charakterisiert ist. Sie sind funktionell und zeichnen sich durch ihre integralen und peripheren Proteine aus, die verschiedene Reaktionen katalysieren. Schon 1972 prägten Singer und Nicolson [3] das „Flüssig-Mosaik-Modell“, welches Biomembranen als zweidimensionale, viskose Flüssigkeit beschreibt, in denen Membranproteine und Lipide lateral ungehindert diffundieren können. Die Lipiddoppelschicht ist eine Permeabilitätsbarriere zwischen dem Inneren und Äußeren einer Zelle. Erst die Integration von Membranproteinen gewährleistet einen gezielten Stofftransport und Signalaustausch durch die hydrophobe Kernregion der Membran. Viele Zellfunktionen werden durch die Fusion zweier membranumhüllter Organellen ermöglicht. Spezifische Membranproteine regulieren die Verschmelzung zweier Lipiddoppelschichten. Somit ist die Interaktion zwischen Lipiden und Proteinen für das Überleben einer Zelle von entscheidender Bedeutung.

Lipidkomponenten

Die Struktur von Biomembranen wird hauptsächlich durch Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol geprägt. Den weitaus größten Anteil nehmen die Glycerophospholipide ein (Abb 1).

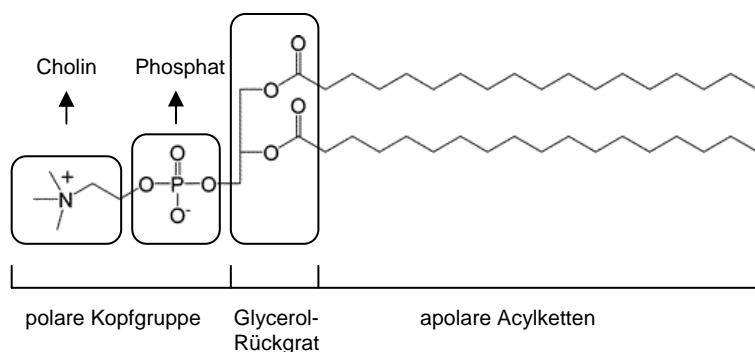


Abb. 1: Struktur eines Phospholipids am Beispiel von Dioctadecanoylphosphatidylcholin (DSPC).

Sie sind amphipatische Moleküle, die einen polaren Kopf bestehend aus einer Phosphatgruppe und einen hydrophoben Bereich aufgebaut aus zwei Fettsäureketten aufweisen. Beide Regionen sind durch die Hydroxylgruppen des dreifachen Alkohols Glycerol miteinander verestert [4]. Die

Phosphateinheit ist häufig zusätzlich mit Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol oder Inosit verestert. Je nach strukturellem Aufbau des polaren Bereiches kann zwischen zwitterionischen und negativ geladenen Lipiden unterschieden werden. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind zwitterionische Moleküle, die eine negative Ladung an der Phosphateinheit und eine positive Ladung an der Stickstoffgruppe besitzen. Dadurch entsteht ein permanentes Dipolmoment und die Nettoladung der Lipide ist neutral. Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylglycerin (PG) hingegen weisen eine zusätzliche negative Ladung auf und sind somit Moleküle mit einer negativen Nettoladung. In Wasser sind Lipide sehr schlecht löslich. Sie bilden auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen spontane Aggregate aus mehrschaligen (multilamellaren) oder einzelnen (unilamellaren) Lipiddoppelschichten, die sich zu einem geschlossenen Vesikel formen (Abb. 2)

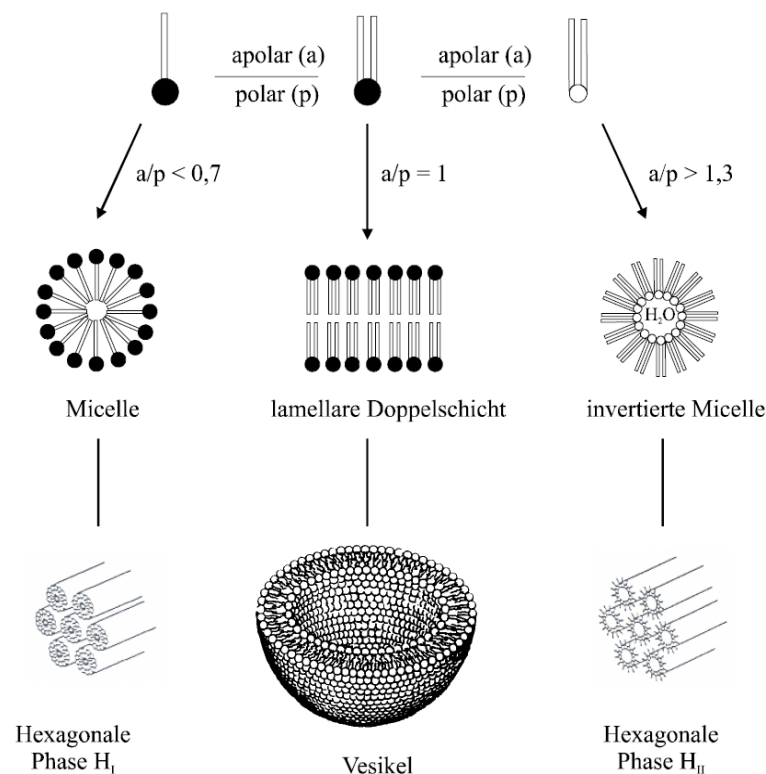


Abb. 2: Darstellung des molekularen Aufbaus von Phospholipiden und der daraus resultierenden Überstrukturen. a/p = Packungsparameter, bezeichnet das Grenzflächenverhältnis von Acylketten und Kopfgruppe eines Phospholipids. Die Phospholipidaggregate können sich je nach Aufbau zu einem Vesikel (lamellare Doppelschichten), einer hexagonalen H_I - (Mizellen) oder hexagonalen H_{II} -Phase (inverse Mizellen) zusammenschließen. Abbildung verändert nach [5, 6].

In dieser sogenannten lamellaren Mesophase stehen sich die Lipidmoleküle in einer Doppelschicht gegenüber, wobei die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Umgebung ausgerichtet sind, während die hydrophoben Acylketten den Zwischenraum bilden und das wässrige Milieu verdrängen. Phospholipide mit unterschiedlich großem Verhältnis an apolaren (a) und polaren (p)

Bereichen bilden mizellare Aggregate, die in einer hexagonalen (H_I) oder invertierten hexagonalen Phase (H_{II}) vorliegen. Lysolecithine (Mono-acyl-phosphatidylcholin), die ein a/p -Verhältnis kleiner als 0,7 aufweisen, bilden Mizellen. Hier sind die polaren Kopfgruppen zum wässrigen Milieu hin ausgerichtet, während die Acylketten nach innen orientiert sind und einen wasserfreien Innenraum schaffen. Invertierte Mizellen entstehen mit Phosphatidylethanolaminen, da ihr apolarer Bereich dominiert (ihr a/p -Verhältnis ist größer als 1,3). Die Kopfgruppen sind nach innen gerichtet und umschließen einen polaren Raum. Lipiddoppelschichten weisen einen thermotropen Polymorphismus auf. Es zeigen sich verschiedene temperaturabhängige lamellare Phasen, die durch die Anordnung der Acylketten definiert sind. Hierbei unterscheidet man zwischen Sub-Gel-Phase (L_c), Gel-Phasen I-II (L_β und P_β) und flüssig-kristallinen (fluide) Phase (L_α) (Abb. 3). In der L_c -Phase zeigen die Acylketten eine kristalline Anordnung, die ihre freie Rotation stark einschränkt. Dieser Membranzustand ist nur in unteren Temperaturbereichen stabil und benötigt eine mehrwöchige Inkubationszeit. Die L_β - bzw. P_β -Phase ist ebenfalls durch einen hohen Ordnungsgrad der Lipidketten charakterisiert, welche in gestreckter *all-trans*-Konformation vorliegen. In der P_β -Phase wird zusätzlich eine periodisch gewellte Überstruktur ausgebildet („ripple“-Struktur).

Die L_α -Phase ist durch eine hohe Flexibilität der Acylketten gekennzeichnet. Auf Grund von zahlreichen *gauche*-Isomeren der Kohlenwasserstoffketten nimmt die Beweglichkeit der Lipidmoleküle und somit die laterale Diffusion in der Membranschicht stark zu. Die benötigte Temperatur bei der eine Phasenumwandlung stattfindet, ist abhängig von der Länge und dem Sättigungsgrad der Acylketten, sowie dem Aufbau der Kopfgruppe der Lipide. Mit zunehmender Länge der Lipidketten und deren Sättigungsgrad erhöht sich die Phasenübergangstemperatur von der L_β - in die L_α -Phase.

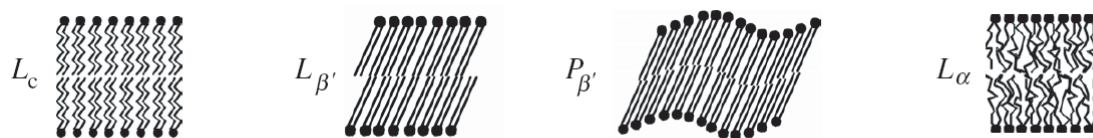


Abb. 3: Darstellung thermotropher Phasenzustände von Lipiddoppelschichten. L_c = lamellare Sub-Gel-Phase, orthorhombische Anordnung der Acylketten. L_β = lamellare Gelphase I, die Acylketten zeigen einen Neigungswinkel von 30° , P_β = lamellare Gelphase II (Ripple-Phase), periodisch gewellte Überstruktur, L_α = lamellare flüssigkristalline Phase [7].

Die Eigenschaften einer Lipidmembran werden somit hauptsächlich von ihrer Zusammensetzung und dem Verhältnis verschiedener Lipidmoleküle bestimmt. Damit biologische Membranen ihren flüssig-kristallinen Zustand beibehalten, ist eine Thermoadaptation der Lipidmembran und die Anpassung an hohe Drücke lebensnotwendig. Beispielsweise sind Lipide, die bei physiologischen Temperaturen die Gel-Phase bevorzugen, nur im geringen Maße in Zellmembranen enthalten [8].

Tiefe Temperaturen und steigende Drücke erhöhen den Ordnungsgrad der Membranschicht enorm. Tiefseebewohner, die solchen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind, zeigen einen hohen Anteil an *cis*-ungesättigten Lipidketten in der Membran, um ihre Fluidität zu gewährleisten [9]. Dem entgegen wird die Membranfluidität von Organismen, die in Lebensräumen mit höheren Temperaturen leben, durch einen steigenden Prozentsatz an langen und gesättigten Lipiden aufrechterhalten.

In Membranen sind Phospholipide in der Lage unterschiedliche Bewegungen auszuführen. Neben der Rotation um ihre Längsachse und dem hin und her Schwingen, sind Lipide fähig innerhalb der Membranschichten zu diffundieren. Man unterscheidet dabei zwischen lateraler (innerhalb eines Membranblattes), transmembraner (Flip-Flop von einem Blatt zum gegenüber liegenden Blatt) und intermembraner Lipidbewegung (von einer Doppelmembran in eine andere). In Zellen sind diese drei genannten Bewegungen wichtig für den Lipid- und Membrantransport. Einerseits kann dadurch die physiologische Zusammensetzung der beiden Lipidschichten einer zellulären Membran aufrechterhalten werden und andererseits ermöglicht es die notwendige Zufuhr von Lipiden in Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Chloroplasten), die nicht in der Lage sind ihr Repertoire an benötigten Lipidmolekülen selber zu erzeugen, da sie weder einen eigenen Synthesemechanismus für derartige Strukturen aufweisen, noch an den vesikulären Transportweg gekoppelt sind.

1.2 Transmembrane Lipidbewegungen in biologischen Membranen

Lipide stellen nicht nur das Grundgerüst von zellulären Strukturen dar, sondern sind in ihrer Aufgabe als dynamische Regulatoren verschiedener physiologischer Prozesse (z.B. Entwicklung und Überleben einer Zelle, intrazelluläre Signaltransduktion, Membrantransport) von enormer Bedeutung. Der transmembrane und intermembrane Lipidtransport, sowie die Verschmelzung zweier Membranen spielen dabei eine wesentliche Rolle. Bis heute ist jedoch noch nicht geklärt, wie die Assemblierung und die Fusion von biologischen Membranen mechanistisch ablaufen.

Lipid Flip-Flop wird als transversale Bewegung von Lipiden in der Membran charakterisiert (Flip: von der äußeren zur inneren Schicht; Flop: von der inneren zur äußeren Schicht). Er ist energieaufwändig, da der hydrophile Kopf den hydrophoben Zwischenraum der Membran durchdringen muss [10-12]. Die hierfür benötigte Energie beträgt ca. 15 kcal mol^{-1} – 50 kcal mol^{-1} [13-15]. In proteinfreien Membranen erfolgt dieser Prozess mit Halbwertszeiten von Stunden bis Tagen [16]. Aus vielen Studien konnte jedoch gezeigt werden [17-22], dass die Translokation von Phospholipiden in biologischen Membranen ein erleichterter Diffusionsprozess ist, der bestimmte Membranproteine benötigt [23]. Er ist schnell (Halbwertszeiten von Sekunden bis wenigen Minuten), bidirektional und kopfgruppenunabhängig.

Verteilung der Membranlipide und die Rolle von Membranproteinen

Der Transfer von Lipiden aus einem Membranblatt zum gegenüberliegenden ist entscheidend für die Verteilung der neu synthetisierten Lipide in die Membranschichten. Die Synthese der Phospholipide erfolgt im Cytosol und von dort müssen sie dann zur exoplasmatischen Membranseite transportiert werden, um ein einseitiges Membranwachstum zu vermeiden. Sowohl in eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen weist die Membran eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Schicht auf. Diese Asymmetrie ist verbunden mit verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften der beiden Membranblätter, die essentiell für die Regulation von Stoffwechselprozessen und dem Signalaustausch zwischen Zellen sind. In eukaryotischen Zellen, z.B. Erythrozyten, befinden sich Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (Chol) hauptsächlich im exoplasmatischen Blatt und tragen zu einer erhöhten Membranstabilität und Barriere-Funktion durch eine dichtere Packung bei. Die Aminophospholipide (PE und PS) hingegen sind in der cytosolischen Seite lokalisiert (Abb. 4).

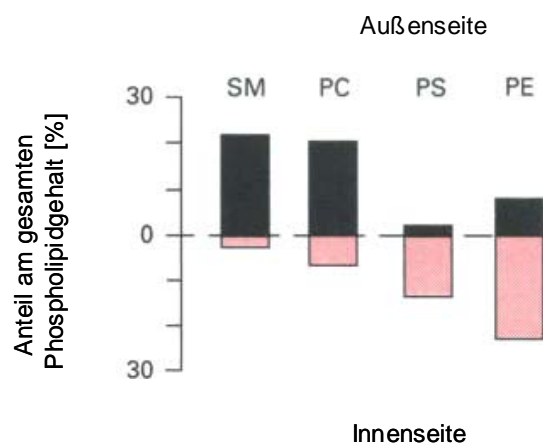


Abb. 4: Phospholipidverteilung in der Plasmamembran von menschlichen Erythrozyten. SM = Sphingomyelin, PC = Phosphatidylcholin, PS = Phosphatidylserin, PE = Phosphatidylethanolamin. Abbildung verändert nach [16].

Wird PS ebenfalls auf der Zellaußenseite exponiert, hat dies spezifische, physiologische Konsequenzen, die Zellapoptose signalisieren und zu anschließender Eliminierung durch Phagozytose führen kann [24]. Beispielsweise löst die Präsenz von PS im exoplasmatischen Blatt aktivierter Thrombozyten die Bindung von Gerinnungsfaktoren an die Zellen aus. Das Phospholipid dient hierbei als Second Messenger für die Regulation der Blutgerinnung [25]. In Erythrozyten führt die Translokation von PS in die Zellaußenseite zur Eliminierung der Zelle aus dem Blutkreislauf [26, 27]. Aminophospholipide sind auch auf der Oberfläche von Endosomen und Exosomen lokalisiert [28, 29]. Die exponierten, negativ geladenen PS-Moleküle stabilisieren

den fusogenen Zustand der Vesikel und fördern die Verschmelzung mit der cytosolischen Seite der Plasmamembran [30]. Damit zwei Plasmamembranen miteinander fusionieren können, wie es im Fall der Eizellenbefruchtung nötig ist, wird die Spermienzelle ebenfalls dadurch aktiviert, dass sie ihre transmembrane Lipidverteilung ändert. Die Möglichkeit zur Fusion mit der Eizellenmembran wird dadurch begünstigt, dass sich PS in die äußere Membranschicht integriert [31, 32].

Phospholipide, insbesondere PS, sind demzufolge ein wichtiger Bestandteil für die Funktionalität von Zellen und zellulären Strukturen. Bis heute ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, wie der Transportweg der Phospholipide nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Zielort abläuft.

Die Bewegung der Lipide zwischen beiden Einzelschichten einer Membran ist stark eingeschränkt. Wie schon in Kapitel 1.2 erwähnt, sind die Halbwertszeiten für den Flip-Flop von Lipiden in proteinfreien Liposomen relativ lang. Spontane transmembrane Diffusion kann somit die lebensnotwendige Asymmetrie der Plasmamembran nicht stören. 1973 postulierte Bretscher [33], dass bestimmte Membranproteine benötigt werden, um den Flip-Flop in biologischen Systemen zu ermöglichen. Es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die Translokation von Lipiden in biologischen Membranen nur wenige Sekunden bis Minuten braucht [34, 35]. Für den transmembranen Transport der Phospholipide in physiologisch relevanten Zeiten sind verschiedene, spezifische Membranproteine verantwortlich, die eine energieunabhängige und auch energieabhängige Verteilung dieser Moleküle in die Membranschichten katalysieren und regulieren [18, 36, 37]. Solche Membranproteine werden je nach ihrer Funktionalität als Flippasen, Floppasen oder Scramblasen bezeichnet. ATP-unabhängige Flippasen vermitteln bidirektionalen und kopfgruppenunabhängigen Flip-Flop durch erleichterte Diffusion. Sie sind hauptsächlich im ER lokalisiert, da hier ein dynamisches Gleichgewicht hinsichtlich der inneren und äußeren Zusammensetzung der Membran herrscht [38]. Die Enzyme für die Phospholipidsynthese sind hauptsächlich auf der cytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert [39]. Somit entsteht eine asymmetrische Lipidverteilung im ER, die jedoch durch schnellen Flip-Flop entlang des Konzentrationsgradienten ausgeglichen wird. Die Verteilung der Lipide in die Plasmamembranschichten benötigt jedoch eine energieabhängige Regulation, da eine Asymmetrie der beiden Membranblätter vorliegt, die aufrecht erhalten werden muss. Die Aminophospholipid-Translokase (AP-Translokase), welche als Flippase charakterisiert ist, transportiert nur die Aminophospholipide PE und PS aktiv von der äußeren in die innere Schicht der Plasmamembran. ATP-abhängige Floppasen konnten aus der Familie der ABC-Transporter identifiziert werden. Sie pumpen sowohl Aminophospholipide als auch PC und SM von der cytosolischen in die exoplasmatische Membranschicht [40]. Eine dritte Gruppe von Proteinen, welche Einfluss auf die Asymmetrie der Plasmamembran ausüben, sind die sogenannten Scramblasen, die als Ca^{2+} -abhängiger Phospholipid-Kanal wirken [36, 41]. Sie sind nicht-selektiv und werden durch eine

erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol aktiviert, wodurch der passive Transport der Phospholipide PE, PS, PC und SM entlang ihres Konzentrationsgradienten katalysiert wird. Die Folge ist der Verlust der Lipidasymmetrie in der Plasmamembran und die Exposition von PS in die exoplasmatische Schicht. Eine Gruppe bekannter Scramblasen in eukaryotischen Zellmembranen stellen die PLSCR-Proteine dar (PLSCR1-4), die im Nucleus, in Mitochondrien und in Membranen verschiedener Gewebe zu finden sind [42].

Während Membranproteine mit aktiver Flippasen- bzw. Floppasen-Eigenschaft identifiziert werden konnten (ABC-Transporter und AP-Translokasen), sind bis heute keine Proteine bekannt, die passiven Flip-Flop im ER als zusätzliche oder ausschließliche Funktion innehalten [36, 42]. Obwohl allgemein anerkannt ist, dass Proteine an der Lipidtranslokation im ER beteiligt sind, bleibt es bisher ungeklärt, ob bestimmte Proteingruppen für die Katalyse benötigt werden oder die bloße Anwesenheit von Proteinen in der Membran ausreicht. Untersuchungen an bakteriellen Membranproteinen aus *E. coli* konnten energieunabhängige Flippase-Aktivität für zwei Proteine (Leader peptidase Lep; Kalium-Kanal KcsA) nachweisen [37]. Dabei wurde angenommen, dass die membranintegrale Domäne des Proteins eine wesentliche Rolle für die Lipidtranslokation spielt. Lep ist ein Monomer und durch 2 TMDn mit der Membran verankert. Das Homotetramer KcsA durchspannt die Membran durch insgesamt 8 TMDn, da jedes Monomer 2 TMDn besitzt. Beide Proteine waren befähigt Flop zu ermöglichen. Wobei Lep am effektivsten die Phospholipidtranslokation katalysierte. Membranproteine, die mit einem β -Barrel in der Membran verankert sind oder mehr als 8 Transmembranhelices aufweisen, zeigten keine Flip-Flop-Aktivität. D.h. nur Proteine, welche die Membran mit einer einzelnen α -Helix bzw. wenigen α -helikalen Transmembransegmenten durchspannten, konnten Flop katalysieren. Es wird daher geschlussfolgert, dass hauptsächlich die Transmembrandomäne (TMD) essentiell für die Lipidtranslokation ist. Diese Hypothese wurde im „Slip-Pop“-Modell verankert. In diesem Modell (Abb. 5) wird davon ausgegangen, dass die membranintegralen Peptidsequenzen durch dynamische Prozesse (z.B. Neigen, Abwinkeln und Rotieren der α -Helix) Störungen in der Lipid-Lipid-Anordnung bzw. an der Lipid- α -Helix-Grenzfläche verursachen können. Durch die erhöhte Beweglichkeit der α -Helix wird ein Peptid-angrenzendes Phospholipid befähigt, mit dem polaren Kopf in den hydrophoben Zwischenraum der Membran zu gleiten („Slip“). Während diesem Übergangszustand ist es dem Phospholipid möglich sich in die Ausgangsposition zurück zu orientieren, oder mit der Kopfgruppe in der gegenüberliegenden Membranseite wieder aufzutauchen („Pop up“). Des Weiteren wird angenommen, dass eine größere Querschnittsfläche der TMDn, auf Grund von mehr membrandurchspannenden α -Helices, die Flip-Flop-Ereignisse eines Lipids reduziert. Einerseits ist die Bewegungsfreiheit im Vergleich zu einer einzelnen α -Helix reduziert, andererseits können auf Grund der höheren Flächenverfügbarkeit stabilere Lipid-TMD-Wechselwirkungen entstehen.

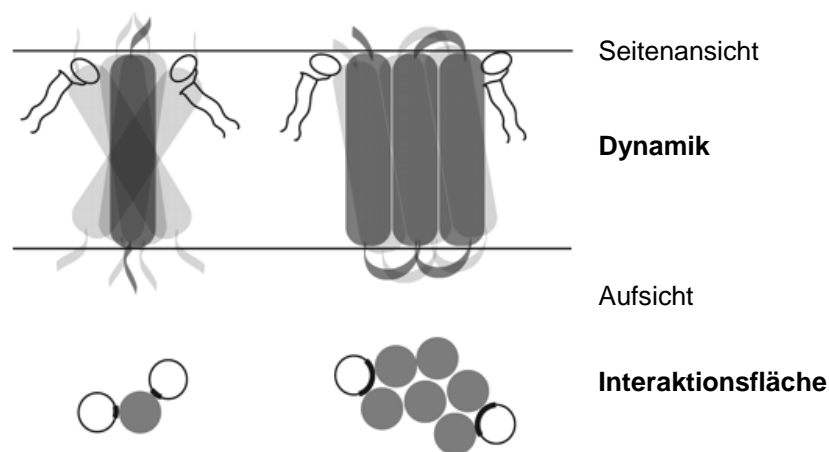


Abb. 5: Modell des „Slip-Pop-Mechanismus“ für die Phospholipidtranslokation in biologischen Membranen. Die Seitenansicht (oberer Bereich) und die Aufsicht (unterer Bereich) der Membran sind mit einer einzelnen α -Helix- und einer multi- α -Helix-membrandurchspannenden Transmembrandomäne (TMD) eines Proteins schematisch dargestellt. Die Dynamik (graue Schatten) einer einzelnen membrandurchspannenden α -Helix ist größer als bei einer TMD mit multiplen- α -Helices und verursacht dadurch stärkere Störungen am Lipid- α -Helix-Grenzbereich. Dem entgegen führen TMDn mit multiplen- α -Helices auf Grund ihrer größeren Flächenverfügbarkeit für die Lipidmoleküle zu stabileren Lipid-TMD-Interaktionen (dick markierte Bereiche in der Aufsicht). Es wird angenommen, dass eine einzelne membrandurchspannende α -Helix den Phospholipidtransfer von einer Membranseite zur gegenüberliegenden am wirksamsten katalysiert. Abbildung verändert nach [37].

Membranfusion

Die Verschmelzung zweier Membranen ist mit einer Umorientierung durch Diffusion der Lipidmoleküle in den Membranschichten verbunden. Für die Initiation des Fusionsprozesses und der regulierten Verschmelzung mit einer Ziellmembran sind Fusionsproteine erforderlich [43]. Dabei ist es essentiell die Integrität der Membran zu bewahren. Der Ablauf der Membranfusion ist charakterisiert durch verschiedene Zwischenzustände [44-46]. Wie der Mechanismus im Detail aussieht, bleibt noch zu klären.

Die „Stalk-Hypothese“ [44, 47, 48] beschreibt, dass während der Fusion zweier Membranen die äußeren Membranschichten miteinander verschmelzen, während die inneren Schichten unverändert bleiben und den sogenannten „Stalk“ bilden (Abb. 6). Die laterale Ausdehnung der „Stalk-Struktur“ führt zu einem instabilen Übergangszustand, der als Hemifusion bezeichnet wird. Wenn das Hemifusionsdiaphragma zerreißt, kommt es zur vollständigen Fusion beider Membranen, da jetzt auch die Vermischung der inneren Schichten durch Bilden einer Fusionspore ermöglicht wird.

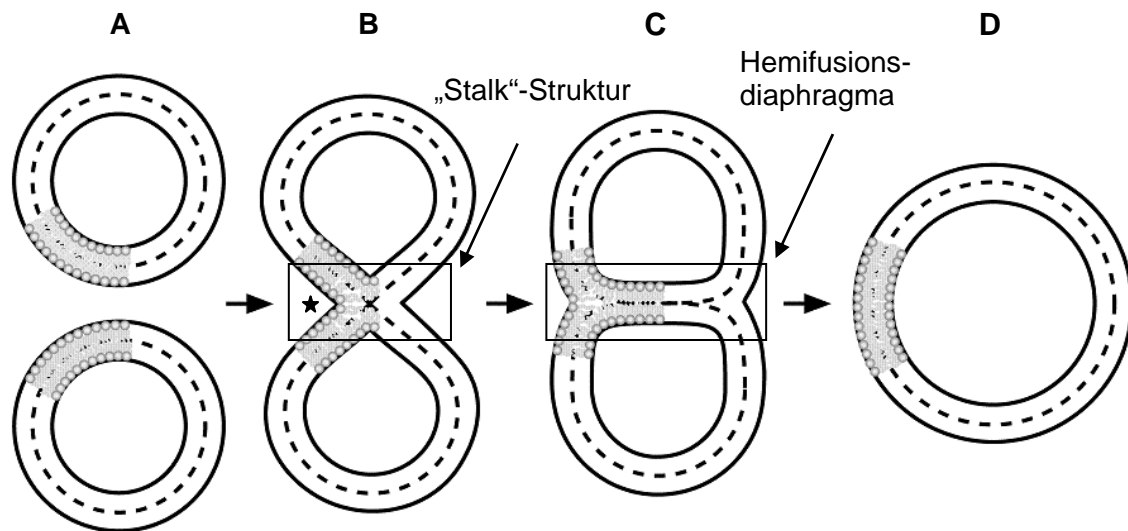


Abb. 6: Ablauf der Membranfusion von Vesikeln gemäß der „Stalk-Hypothese“. Zunächst erfolgt die Annäherung zweier getrennter Membranen (A), die miteinander in Kontakt treten. Es bildet sich eine „Stalk“-Struktur aus (B), die durch Vermischung der äußeren Membranschichten verursacht wird. Die inneren Schichten beider fusionierender Vesikel bleiben noch separiert. Während dieses Übergangszustands werden die Membranen an den Kontaktstellen (B, Stern) stark gekrümmt und die Lipide der äußeren Schicht gehen dort von einer ursprünglich positiven in eine negative Krümmung über. Durch Erweiterung der Kontaktfläche bildet sich eine erweiterte „Stalk“-Struktur (Hemifusionsdiaphragma) (C). Dieser Zustand wird als Hemifusion bezeichnet. Erst durch Zerreißen des Hemifusionsdiaphragmas (Fusionspore wird gebildet) kommt es auch zur Vermischung der inneren Membranschichten, die in einer vollständigen Fusion der Vesikel resultiert (D). Abbildung verändert nach [49, 50].

Die Fusion von kleinen Liposomen ist mit einer Verringerung des Flächenverhältnisses zwischen äußerer und innerer Membranschicht verbunden. Die Flächenänderung resultiert aus der Expansion des „Stalks“ und kann entweder dadurch ausgeglichen werden, dass sich die äußere Schicht verdichtet, oder die Translokation von Lipiden aus der äußeren in die innere Membranschicht (Flip) erfolgt. Die Hypothese, dass Lipid-Flip während der Fusion benötigt wird, unterstützen molekulare Dynamik-Simulationen von fusionierenden Liposomen, in denen vereinfachte Modellproteine integriert sind [51]. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass während der Polyethylenglycol (PEG)-induzierten Liposomenfusion eine Umverteilung der Lipide von der äußeren in die innere Membranschicht erfolgt [52]. Die Durchtrittsraten der Phospholipide in die innere Membran korreliert dabei eng mit der Fusionsrate der Liposomen [53]. Ob Flip-Flop relevant für natürliche Fusionsprozesse ist, wie zum Beispiel die Fusion von sekretorischen Vesikeln in eukaryotischen Zellen, die durch SNARE (soluble NSF [N-ethylmaleimide sensitive factor] protein receptor)-Proteine angetrieben wird, bleibt gegenwärtig noch zu klären.

1.3 Charakterisierung von transmembranen Lipidbewegungen

In einer Vielzahl von Studien wurde versucht, Proteine zu identifizieren, die als Flippasen/Floppasen im ER agieren. Bisher ist es noch nicht gelungen eine Flippase/Floppase erfolgreich zu isolieren und zu charakterisieren. Außerdem bleibt noch zu klären, wie Flip-Flop in biologischen Membranen mechanistisch abläuft. Es gibt verschiedenen Ansätze und Methoden um transmembrane Lipidbewegungen (im ER und in bakteriellen cytoplasmatischen Membranen) zu analysieren. Dabei hat das Einsetzen von fluoreszenz-, radioaktiv- und spin-markierten Phospholipidanaloga zu einem wesentlichen Fortschritt in der Erforschung der transmembranen Bewegung von Phospholipiden beigetragen [54, 55]. In den 70er Jahren konnten Kornberg et al. [54] erstmals zeigen, dass Flip-Flop in proteinfreien Liposomen ein langsamer Prozess ist. Sie verwendeten ein spin-markiertes Phospholipidanalogen, welches an der Kopfgruppe mit einem Nitroxid-Ring substituiert war. In kleinen PC-Liposomen konnte somit eine Translokationszeit von ca. 6,5 h ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse liefern Untersuchungen von radioaktiv-markierten Dimyristoyl (DM)-PC in DMPC- und DMPC/DMPE-Vesikeln [56]. Ferner zeigte das fluoreszenzmarkierte PC-Analogen ebenfalls lange Translokationszeiten ($T_{1/2} \sim 7,5$ h) in Palmityloleoyl (PO)-PC-Vesikeln [57]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Flip-Flop-Raten von Phospholipidanaloga mit erhöhtem Sättigungsgrad der Acylketten und zunehmender Temperatur steigt [58, 59].

Frühe Versuche mit spin-markierten Phospholipiden in Membranen von Erythrozyten wiesen darauf hin, dass integrale Proteine transmembrane Lipidbewegungen katalysieren können. Die Translokationszeiten verkürzten sich auf ungefähr 5 min – 60 min für das PE- und PS-Analogen im Vergleich zu proteinfreien Membranen [60, 61].

Zur Identifizierung von Flippasen und Floppasen in biologischen Membranen werden in einer Vielzahl von Studien kurzkettige Phospholipidanaloga verwendet. Sie haben den Vorteil teilweise wasserlöslich zu sein und können mittels Rinderserumalbumin (BSA) aus der äußeren Membranschicht extrahiert werden. Die Entwicklung des BSA-Rückaustausch-Methode [18] erlaubte die Detektion von schnellen transmembranen Phospholipidbewegungen in mikrosomalen Membranen aus Rattenleber. Es wurden Halbwertszeiten von weniger als 25 s für die Phospholipidtranslokation gemessen, die bidirektional und teilweise sensitiv gegenüber Proteasen war. Durch Kombination der klassischen BSA-Rückaustausch-Methode mit der so genannten stopped-flow-Methode war es möglich, kürzere Halbwertszeiten (ca. 8 s – 148 s) für den Flip-Flop von Phospholipidanaloga in mikrosomalen Membranen zu detektieren [21, 62]. Das Bleichen von fluoreszenz-markierten Phospholipidanaloga mit Dithionit (DTN) hat sich als weitere Methode bewährt, Flip-Flop in Membranen zu untersuchen [55]. Dabei ist die Zugänglichkeit der Fluorophore zu DTN ein Maß für die Phospholipidtranslokation.

Studien mit markierten Phospholipidanaloga weisen einen Mangel an thermodynamischen Informationen hinsichtlich der Energiebarriere von Flip-Flop auf. Eine weitere Methode den Flip-Flop-Mechanismus von Phospholipiden zu analysieren, wurde von der Conboy Arbeitsgruppe eingeführt. Sie bedienen sich der Summenfrequenzschwingungsspektroskopie (SFG-Spektroskopie) in Kombination mit planaren Membrandoppelschichten [63]. Eine mechanistische Charakterisierung hinsichtlich thermodynamischer Parameter in Abhängigkeit von lateralem Druck und Temperatur ist möglich und trägt dazu bei, die Energetik von transmembranen Phospholipidbewegungen zu verstehen. Die Methode benötigt keine chemisch modifizierten Analoga und beschreibt demzufolge Flip-Flop von nativen Phospholipiden.

SFG-Spektroskopie hat sich bewährt, Moleküle an Ober- und Grenzflächen zu beobachten, da sie sich durch eine hohe Empfindlichkeit auszeichnet [64]. Zwei Laserstrahlen, ein einstellbarer im infraroten (ω_{IR}) und ein frequenzfester im sichtbaren Frequenzbereich (ω_{vis}), werden auf der Probe überlagert und als Frequenzsumme (SFG-Signal; $\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{IR}} + \omega_{\text{vis}}$) detektiert. Ein SFG-Signal wird nur auf asymmetrischen Oberflächen und Medien erzeugt und verschwindet innerhalb inversionssymmetrischen Materialien und isotropischen Medien [63]. Die innere und äußere Schicht einer Membran hat Einfluss auf das SFG-Signal. Die Veränderung der entgegengesetzten Ausrichtung innerhalb eines Bilayers, ist mit einer SFG-Signaländerung verbunden. Um Flip-Flop detektieren zu können, wurde ein asymmetrischer Bilayer aus einer Phospholipidspezies konstruiert [65]. Eine Membranschicht bestand dabei aus dem deuterierten und die gegenüberliegende Schicht aus dem protonierten Phospholipid. Erfolgen transmembrane Phospholipidbewegungen, wird diese Membransymmetrie gestört und kann mittels SFG-Spektroskopie detektiert werden.

Studien mit dieser Technik konnten bekräftigen, dass in proteinfreien Membranen Flip-Flop abhängig von der Acylkettenlänge und der Kopfgruppe eines Phospholipids ist. Zusätzlich zeigten Versuche mit spin-markierten Phospholipiden eine deutlich geringere Flip-Flop-Rate, als das entsprechende native Phospholipid [13, 66]. Durch Insertion der Peptide Gramicidin A, WALP und Melittin in Distearoyl (DS)-PC-Doppelschichten wurde weiterhin bestätigt, dass transmembrane Peptide die Energiebarriere für Flip-Flop signifikant reduzieren [67, 68].

Weitere Arbeitsgruppen versuchen mit Hilfe von molekularen Computersimulationen thermodynamische Eigenschaften und Energieprofile von Flip-Flop-Ereignissen in der Anwesenheit von Peptiden und in reinen Phospholipidmembranen zu berechnen. Grundsätzlich können Simulationen genutzt werden, um das Verhalten von Atomen in Lipidaggregaten bzw. Membranen zu verfolgen, was auf experimenteller Ebene schwierig ist. Allerdings handelt es sich meistens um erheblich vereinfachte Modelle („coarse-grained“-Modelle) und es bleibt offen, in wie weit diese Berechnungen reale Ereignisse widerspiegeln. Der Vergleich mit experimentellen Daten ist daher notwendig. Beispielsweise konnten Computersimulationen zeigen, dass Flip-Flop von Dipalmitoyl (DP)-PC in einer proteinfreien Membran durch Bildung einer Wasserpore erfolgt

und der Prozess Stunden bis Tage benötigt. Die berechneten Energien für den Phospholipidtransfer und für die Bildung der Pore waren identisch [69]. Simulationen, die eine künstliche Porenbildung in der Membran erzeugten, konnten Phospholipid Flip-Flop im Bereich von Nanosekunden beobachten [70, 71]. Auf Basis der Computerberechnungen kann geschlussfolgert werden, dass der geschwindigkeitslimitierende Schritt von Flip-Flop in proteinfreien Membranen die Bildung einer Wasserpore ist, die zu lokalen Defekten in der Membran führt und somit Phospholipidtranslokation ermöglicht.

Zusätzlich wurde der Einfluss von transmembranen Peptiden (WALP und KALP) auf das Energieprofil für den Phospholipidtransfer simuliert. Die Ergebnisse zeigten, dass Peptide, die freie Energie für den Membrantransfer von PE und PG stark reduzierten [72].

Membranintegrale Modellpeptide

Die Annahme, dass die bloße Anwesenheit von membrandurchspannenden Proteinen Flip-Flop induzieren kann, wurde in einigen Studien an Modellmembranen [73, 74] mit α -helikalen membranintegralen Peptidsegmenten untersucht. Da es bisher nicht möglich war, energieunabhängige Flippasen aus dem ER zu identifizieren, wurde eine Anzahl von bis heute gut charakterisierten membrandurchspannenden Peptiden als Modelle für TMDn von Proteinen verwendet. Die als XALP bezeichneten, α -helikalen, synthetischen Peptide bestehen aus einem hydrophoben Kern mit alternierenden Alanin (A)- und Leucin (L)-Resten, die durch polare Aminosäuren (X) flankiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass transmembrane XALP-Peptide in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden oder synthetischen Lipiden Flip-Flop von NBD-Phospholipidanaloga induzieren können. Jedoch ist die Translokation stark von der Kopfgruppe des Lipidanalogs abhängig und wurde kaum für PS und nicht für PC beobachtet [74]. Molekulardynamik-Simulationen konnten bestätigen, dass die Peptide WALP und KALP die benötigte Aktivierungsenergie für den Transfer von Dioleyl (DO)-PE und DOPG, nicht aber für DOPC, reduzierten [72].

Im ER muss es jedoch gewährleistet sein, dass alle Spezies von Phospholipiden schnell von einer Membranseite zur gegenüberliegenden transportiert werden können.

Ein weiteres „Modell-Set“ an synthetischen Peptiden, das für die Untersuchung von Flip-Flop herangezogen werden kann, stellen die LV-Peptide dar [75, 76]. Sie sind gut charakterisierte Modellpeptide hinsichtlich ihrer membranfusogenen Eigenschaften und strukturellen Flexibilität. Somit ist eine systematische Charakterisierung der Flip-Flop-Effizienz dieser Peptide in Abhängigkeit der Struktur-/Funktionsbeziehung möglich.

Das Design dieser Peptide beruht auf Analysen von TMDn von Fusionsproteinen [77]. Frühere Studien zeigten, dass synthetische Peptide, welche die TMDn von Fusionsproteinen nachahmen, in der Lage sind die Fusion zweier Liposomen *in vitro* zu katalysieren (Abb. 7).

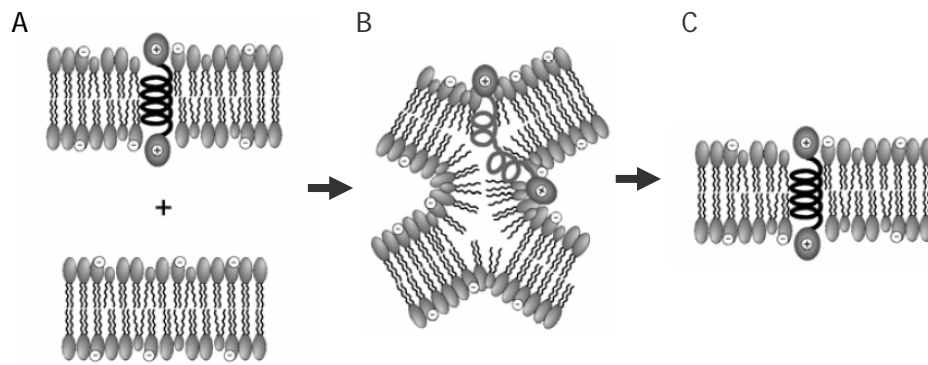


Abb. 7: Schematische Darstellung der peptidinduzierten Membranfusion. Fusogene Peptide erzeugen durch ihre konformationelle Flexibilität eine leichte Änderung der Membranstruktur und begünstigen dadurch die Vermischung der Membranschichten. Nicht-fusogene Peptide besitzen nur eine geringe konformationelle Flexibilität und können daher keine Membranfusion induzieren. A: Annäherung zweier Membranen. B: Peptidinduzierte Vermischung der äußeren Membranschichten. C: Vollständige Membranfusion. Abbildung verändert nach [50].

Beispielsweise sind die fusogenen Eigenschaften der synthetischen Peptidsequenz, welche der TMD des VSV (vesikulärer Stomatitis Virus) Proteins entspricht, mit denen des vollständigen Fusionsproteins vergleichbar [78, 79]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen der TMD im vollständigen Fusionsprotein und auch im Peptid die Fusion reduzieren [80]. Des Weiteren wird Liposomenfusion auch durch Peptide ermöglicht, die der Sequenz der TMD von synaptischen SNARE-Proteinen entsprechen [77]. Demzufolge können solche TMDn als eigenständige, funktionelle Einheit betrachtet werden.

Durch Datenbankanalysen der TMD von Fusionsproteinen konnte die Anhäufung an β -verzweigten Aminosäuren festgestellt werden. Während in SNARE-TMDn eine Überrepräsentation an Valin und Isoleucin vorliegt, weisen TMDn viraler Fusionsproteine vermehrt Isoleucin und Glycin auf. In einem β -Faltblatt nehmen β -verzweigte Aminosäuren einen energetisch günstigeren Zustand ein, als in α -helikalen Strukturen. Verantwortlich hierfür ist ein Entropieverlust bei der Bildung einer α -Helix, da die Freiheitsgrade ihrer Seitenketten im Vergleich zur β -Faltblatt-Konformation stärker eingeschränkt sind. Die Destabilisierung der α -helikalen Konformation, wird zusätzlich durch sterische Hinderungen der Seitenketten mit dem Peptidrückgrad begünstigt. Den Aminosäuren Isoleucin und Valin wird infolgedessen bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen eine Tendenz zur α -Helix-Destabilisierung zugeschrieben [81, 82]. In hydrophober Umgebung sind β -verzweigte Aminosäuren dennoch befähigt eine α -helikale Faltung einzugehen [83]. Somit können solche Aminosäuren innerhalb einer α -helikalen Konformation für ein vorübergehendes, lokales Öffnen der α -Helix sorgen und dadurch eine dynamische α -Helix erzeugen.

Strukturelle Untersuchungen membranfusogener Peptide zeigten, dass ein Gleichgewicht zwischen β -Faltblatt und α -Helix in Lösung vorliegt. Mutationen, welche die α -helikale Konformation

stabilisieren, verhielten sich dabei reziprok zur Fusogenität [77]. Es deutete sich an, dass die fusogenen Eigenschaften in Zusammenhang mit der Propensität der Peptidsequenz zur Destabilisierung der α -Helix stehen.

Ausgehend von diesen Befunden wurden weniger komplexe, membranfusogene Peptide *de novo* synthetisiert, um die Struktur-/Funktionsbeziehung für TMDn natürlicher Fusionsproteine zu untersuchen. Der hydrophobe Kern dieser sogenannten LV-Peptide ist aus β -Faltblatt favorisierendem Valin und α -Helix begünstigendem Leucin aufgebaut. Für eine bessere Löslichkeit sind die Peptide zusätzlich durch Lysin-Triplets flankiert. Die Variation der hydrophoben Aminosäuren Valin und Leucin beeinflusst die strukturelle Flexibilität dieser Peptide und resultiert in unterschiedlichen Sekundärstrukturpräferenzen.

Fusionsexperimente mit LV-Peptiden, die in Liposomen rekonstituiert wurden, bestätigen einen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis von Valin- und Leucin-Resten in der Peptidsequenz und ihrer Fusogenität [75]. Alternierende Sequenzen aus beiden Aminosäuren zeigten ein hohes Fusionsausmaß, während Oligoleucin-Sequenzen kaum fusogene Wirkung aufwiesen. Eine Steigerung des fusogenen Ausmaßes kann durch Einbringen der α -Helix-destabilisierenden Aminosäuren Glycin und Prolin erreicht werden. Die Länge des hydrophoben Kerns und die Ladung der flankierenden Aminosäuren beeinflussen zusätzlich die Fusogenität [84, 85]. Strukturanalysen zeigten, dass die konformationelle Flexibilität der Peptide durch das Leucin/Valin-Verhältnis beeinflusst wird [75]. Somit steigern α -Helix-destabilisierende Aminosäuren die Tendenz des Peptids zur Umfaltung zwischen α -helikalen und β -faltblattartigen Strukturen, innerhalb der Titration von apolaren zu polaren Medien.

Zusätzlich wurde durch Wasserstoff/Deuterium (D/H)-Austausch-Experimente bekräftigt [86], dass valinreiche Sequenzen eine höhere lokale Entfaltungsdynamik aufweisen und folglich auch einen beschleunigten D/H-Austausch bewirken (Abb. 8).

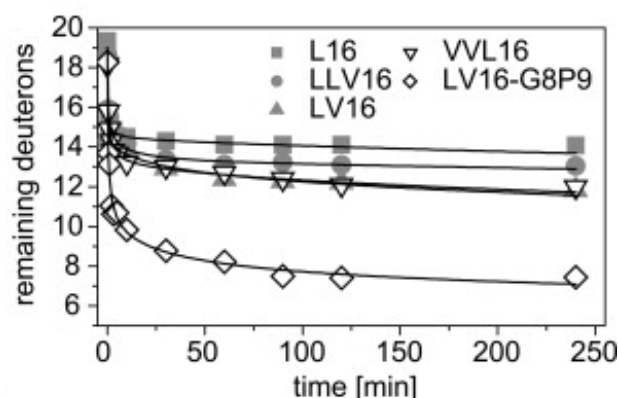
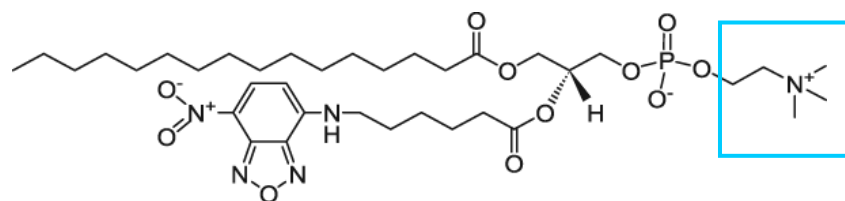


Abb. 8: Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Kinetik der LV-Peptide in liposomalen Membranen. Die Anzahl an verbleibenden Deuteronen ist ein Maß für die α -Helixdynamik und korreliert mit der Fusogenität der Peptide [86].

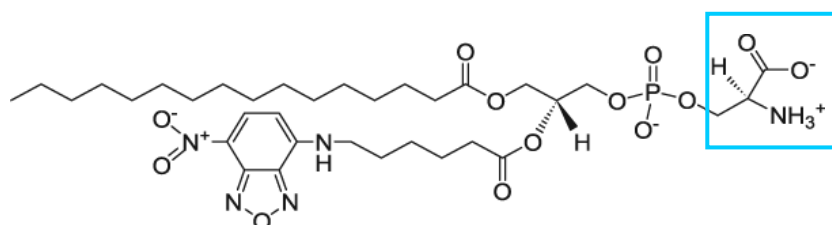
LV-Peptide haben sich als gutes Modell für die Untersuchung struktureller Zusammenhänge zwischen fusogenen Eigenschaften und der konformationellen Flexibilität von membranständigen Peptiden erwiesen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Fusogenität dieser Peptide sequenzspezifisch ist und direkt mit ihrer konformationellen Flexibilität korreliert. Bisher ist jedoch unklar, wie dieser Zusammenhang mechanistisch erklärt werden kann.

Phospholipid-Flip durch NBD-Phospholipidanaloga

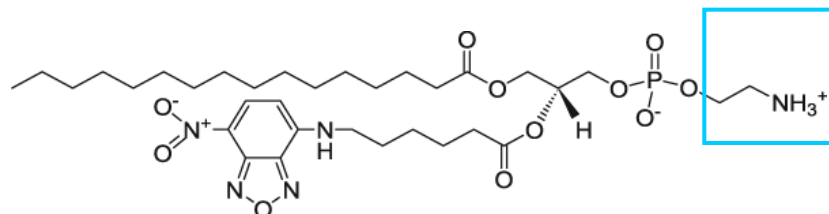
Die Verwendung von 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD)-Phospholipidanaloga ermöglicht die experimentelle Bestimmung der transmembranen Verteilung und Bewegung von Phospholipiden in einer Lipiddoppelschicht. Dabei wird die Acylkette in der *sn*-2-Position eines langkettigen, natürlich vorkommenden Phospholipids durch eine kürzere NBD-markierte Acylkette (oft 6 oder 12 Kohlenstoffatome lang) ersetzt (Abb. 9). Während langkettige Phospholipide sich nicht in Wasser lösen können, erhöht sich bei einer kürzeren Acylkette die Wasserlöslichkeit [87]. Die Phospholipidanaloga können sich somit leicht in die äußere Membranschicht einbauen.



1-Palmitoyl-2-[6-(NBD)aminocaproyl]phosphatidylcholin



1-Palmitoyl-2-[6-(NBD)aminocaproyl]phosphatidylserin



1-Palmitoyl-2-[6-(NBD)aminocaproyl]phosphatidylethanolamin

Abb. 9: Struktur der kurz-kettigen NBD-Phospholipidanaloga, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Im Gegensatz zur Nitroxid-Gruppe in spin-markierten Analoga, ist das NBD-Molekül sperriger und weist eine höhere Polarität auf. Der leichte Detergenzcharakter und die erhöhte Polarität der NBD-Phospholipide können somit in zu hoher Konzentration die Membraneigenschaften verändern [87]. Die NBD-Gruppe ist zum wässrigen Milieu hin exponiert und führt dazu, dass die markierte Acylkette hauptsächlich im hydrophileren Phosphoglycerol-Bereich der Membran lokalisiert ist [88-90]. Die C₁₂NBD-Acylkette ist stärker zur polaren Zwischenschicht ausgerichtet als die kürzere C₆-NBD-Variante, da die längere Kette ein weiteres Vordringen von NBD in die wässrige Phase ermöglicht [88, 91]. Trotz dieser Unterschiede zu natürlichen Phospholipiden haben sich die NBD-Analoga als gutes Werkzeug bewährt Lipidbewegungen zu untersuchen. Durch eine hohe Fluoreszenzsensitivität reichen geringe Konzentrationen aus, um Signale mittels Fluoreszenzspektroskopie detektieren zu können. Des Weiteren ist es möglich die NBD-Gruppe durch DTN zu reduzieren (Abb. 10) und somit ein nicht fluoreszierendes NBD-Derivat zu erhalten.

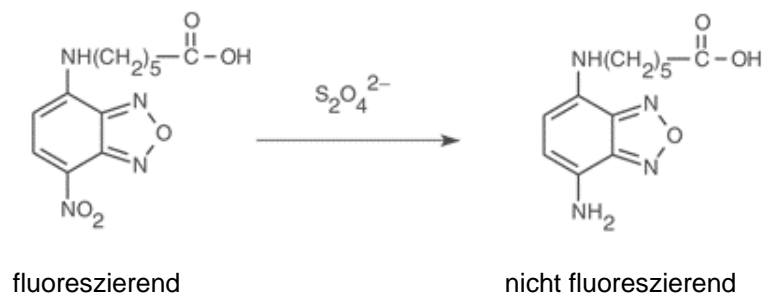


Abb. 10: Reduktionsreaktion von NBD durch Dithionit (DTN) zu einem nicht fluoreszierenden Derivat.

Die Aufzeichnung von Flip-Flop-Kinetiken ist möglich, da DTN nur sehr langsam membranpermeabel ist und NBD in der äußeren Membranschicht innerhalb weniger Sekunden reduziert wird [55]. Für die Ermittlung von Flip-Ereignissen wird die äußere Membranschicht mit NBD-Phospholipidanaloga markiert. Die Phospholipidanaloga können dann in die innere Membranschicht flippen (Abb. 11). Wird anschließend die äußere Membranseite mit DTN behandelt, können nur noch die NBD-markierten Phospholipidanaloga fluorenszenzspektrometrisch detektiert werden, die sich in die Membraninnenseite eingebaut haben. Die Höhe des Fluoreszenzsignals ist dabei ein Maß für den Gehalt an geflippten NBD- Phospholipidanaloga.

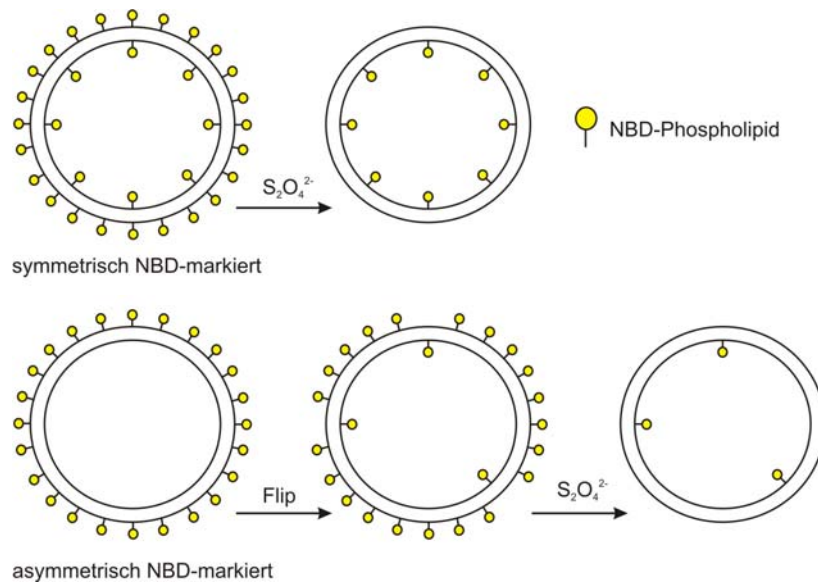


Abb. 11: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Ermittlung von Flip-Ereignissen. Oberes Bild: Liposomen sind symmetrisch mit NBD-Phospholipidanaloga markiert und nur die NBD-Moleküle der äußeren Membranschicht werden durch DTN reduziert. Die nach Reduktion gemessene Fluoreszenz entspricht dem maximalen Anteil an NBD-Molekülen in der inneren Membranschicht. Unteres Bild: Liposomen sind nur in der äußeren Membranschicht mit NBD-Phospholipiden markiert. Der Flip kann nach Reduktion der äußeren NBD-Moleküle fluoreszenzspektroskopisch ermittelt werden.

Ziel der Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass membranintegrale Proteine und transmembrane Modellpeptide die Energiebarriere für den Lipid-Flip/Flop reduzieren und die Translokation erleichtern [14, 34, 36, 72].

In dieser Arbeit erfolgt die systematische Charakterisierung der Flip-Aktivität von synthetischen Modellpeptiden. Hierfür wurden Peptide betrachtet, die auf Grund ihrer Aminosäuresequenz aus α -Helix-stabilisierenden Leucinen und β -Faltblatt-fördernden Valinen unterschiedliche Sekundärstrukturpräferenzen aufweisen. Zusätzlich werden Peptide herangezogen, die von den TMDn natürlicher SNARE-Proteinen abgeleitet sind. In früheren Studien konnten diese Peptide bisher detailliert bezüglich ihrer konformationellen Flexibilität, lokalen α -Helixdynamik und ihrem fusogenen Potential beschrieben werden [75]. Es soll weiterhin eine Korrelation zwischen der Flip-Aktivität und der Fusogenität der Peptide festgestellt werden [86]. Auf Basis dieser Struktur-/Funktionsbeziehung der Peptide, wird der peptidinduzierte Flip-Prozess mechanistisch beleuchtet. Die Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf strukturelle Eigenschaften geben, die TMDn natürlicher, in biologischen Membranen vorkommender Proteine benötigen, um energieunabhängig Flip/Flop zu induzieren.

Die Peptide sollten in Liposomen rekonstituiert und die äußere Membranschicht mit C₆NBD-Phospholipidanaloga markiert werden. Unter Anwendung eines DTN-Bleaching-Assays kann die transversale Bewegung und die Verteilung der kurzkettigen, fluoreszenz-markierten Phospholipidanaloga über beide Membranhälften beobachtet werden.

Durch Variation des Leucin/Valin-Anteils der hydrophoben Kernsequenz der Peptide soll der Einfluss der Primärstruktur auf den Flip-Prozess der fluoreszenz-markierten Phospholipide PC, PS und PE betrachtet werden. Zusätzlich werden die Rolle der hydrophoben Sequenzlänge, der Effekt einer N-terminalen Acylierung und die Auswirkungen der flankierenden Aminosäuren auf das Flip-Potential einer alternierenden LV-Sequenz näher betrachtet. Weiterhin sollte die Änderung der liposomalen Lipidzusammensetzung Aufschluss über die Effekte der Membranlipide während eines Flip-Prozesses geben.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit betrifft die Aufklärung der Rolle von Flip während der Fusion zweier Membranen. Hierfür sollte gezielt LPC bzw. Cholesterol in die liposomale Membran eingebaut werden, um den Effekt auf die Fusion und den Flip zu untersuchen.

Material und Methoden

1.4 Materialien

Die Synthese der verwendeten Peptide erfolgte durch Fmoc-Synthese (PSL, Heidelberg) und sie wurden als Lyophilisat bei -80 °C gelagert.

Alle verwendeten Lipide (siehe Tab. 1) wurden mit Stickstoff beschichtet und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Tab. 1: Verwendete Lipide.

Substanz	Hersteller	Konzentration
Phosphatidylcholin (PC) aus Hühnereigelb	Serva	10 mg/ml in CHCl ₃
Palmitoyloleylphosphatidylcholin (POPC)	Anvanti Polar Lipids, USA	10 mg/ml in CHCl ₃
Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE)	Anvanti Polar Lipids, USA	10 mg/ml in CHCl ₃
Dioleylphosphatidylserin (DOPS)	Anvanti Polar Lipids, USA	10 mg/ml in CHCl ₃
L- α -Lysophosphatidylcholin (LPC) aus Hühnereigelb	Sigma-Aldrich	2 mg/ml in Tris-HCl-Puffer
Cholesterol	Sigma-Aldrich	10 mg/ml in CHCl ₃
N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-dihexadecanylphosphatidylethanolamin (NBD-PE)	Avanti Polar Lipids, USA	1 mg/ml in CHCl ₃
Lissamine™ rhodamine B-dihexadecanylphosphatidylethanolamin (Rh-PE)	Avanti Polar Lipids, USA	1 mg/ml in CHCl ₃
1-Palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-Phosphatidylcholin (C ₆ NBD-PC)	Anvanti Polar Lipids, USA	0,5 mM in Ethanol
1-Palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-Phosphatidylserin (C ₆ NBD-PS)	Anvanti Polar Lipids, USA	0,5 mM in Ethanol
1-Palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn glycero-3-Phosphatidylethanolamin (C ₆ NBD-PE)	Anvanti Polar Lipids, USA	0,5 mM in Ethanol

Die Konzentrationsbestimmung der farbstoffmarkierten Phospholipide erfolgte mittels UV-Absorption bei 530 nm für Rh-PE ($\epsilon = 75000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und bei 460 nm für NBD-Phospholipide ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Standardchemikalien wiesen Analysenqualität auf und wurden, soweit nicht anders angegeben, von Roth, Applichem und Sigma-Aldrich bezogen. Verwendete Puffer wurden mit milliQ-Wasser angesetzt und vor Verwendung filtriert.

Geräte

Die Konzentrationsbestimmung der Peptidstammlösungen erfolgte am Ultrospec 3100 pro UV/Vis-Spektrometer (Amersham Bioscience, USA) in einer 100 μl Mikroquarzküvette (Hellma, Deutschland).

Die Lyophilisation der Peptide und Lipide wurde in einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ Delta 1-20KD (Christ, Osterode, Deutschland) durchgeführt.

Die Rehydrierung der Lipidfilme erfolgte in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg). Zur Herstellung kleiner unilamellarer Liposomen wurde die Lipidsuspension in einem Branson Sonifier mit Becherresonator (Branson, USA) sonifiziert.

Für die Aufzeichnung der Flip-Kinetiken und für die Peptidquantifizierung in Liposomen wurde ein Fluoreszenzspektrometer RF-1501 (Shimadzu, Japan) verwendet. Die Auswertung fand mittels der Software Hyper-RF statt.

Die Messung der Fusions-Kinetik erfolgte am BMG FLUOstar (BMG LabTechnologies, USA) in 96-Loch Platten (Conring Inc., USA) und wurde durch die Computersoftware FLUOstar Galaxy Version 4.21 ausgewertet.

Die Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden in Liposomen wurde durch Aufzeichnung von Zirkulardichroismus (CD)-Spektren mittels eines J-710 Spektral-Polarimeters (Jasco, Easton, MD, USA) in einer 0,5 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde der CDNN/PEPFIT-Algorithmus (BP, 2007 CD-Spectra) verwendet.

1.5 Methoden

Ansetzen von Peptidlösungen

Die Lyophilisate der Peptide wurden bei -80 °C gelagert und zum Lösen für ca. 20 min auf Raumtemperatur gebracht. Die Peptide wurden auf einer Analysenwaage in 2 ml Reagiergefäße eingewogen und zu ca. 2 mg/ml in TFE (Trifluorethanol) gelöst. Ungelöstes Peptid wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C , 10 min) abgetrennt. Danach konnte die Absorption von Tryptophan bei 282 nm (je nach Peptid: $\epsilon = 5600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bzw. $\epsilon = 6800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in TFE/DMSO (Dimethylsulfoxid) 1:1 (v:v) ermittelt werden, um mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die genaue Peptidkonzentration zu berechnen. Die Peptidlösungen wurden bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Herstellung von Liposomen

Verwendete Puffer

Tris-HCl-Puffer:

- (A) 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA
- (B) 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA
- (C) 600 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA
- (D) 10 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Zitronensäure-Natriumcitrat Puffer:

- (E) 150 mM NaCl, 20 mM Zitronensäure-Natriumcitrat (pH 4,2), 0,1 mM EDTA
- (F) 10 mM NaCl, 20 mM Zitronensäure-Natriumcitrat (pH 4,2)

Kleine unilamellare Liposomen (SUV's)

Die Durchführung der Fusions- und Flip-Experimente sowie der CD-Messungen erfolgte durch Herstellen kleiner, unilamellarer Liposomen (SUV's). Zur Bestimmung der Flip-Kinetiken wurden drei Liposomenspezies hergestellt:

- a) Liposomen mit 0,1 mol-% C₆NBD-Phospholipid (Kontrollliposomen)
- b) Liposomen mit 1 mol-% Peptid (Peptidliposomen)
- c) Peptid- und farbstofffreie Liposomen (Leerliposomen)

Zur Durchführung der Fusionsexperimente wurden, statt der C₆NBD-Phospholipide, die Farbstoffe NBD-PE und Rh-PE für die Liposomenherstellung verwendet:

- d) Liposomen mit 0,8 mol-% NBD-PE/ Rh-PE (Donorliposomen)
- e) Liposomen mit 0,16 mol-% NBD-PE/ Rh-PE (Kontrollliposomen)

Die CD-Messungen erfolgten in Liposomen mit integriertem Peptid und ohne farbstoffmarkierten Phospholipiden.

Aus den in CHCl₃ gelösten Lipiden PC bzw. POPC, DOPE und DOPS (Konzentration 10 mg/ml) wurden Lipidmischungen in Cyclohexan mit folgenden Verhältnissen hergestellt:

- PC bzw. POPC, DOPE und DOPS: Verhältnis 3:1:1 (v/v/v)
- PC und DOPE im Verhältnis 4:1 (v/v) und
- PC und DOPS im Verhältnis 4:1 (v/v).

Standardmäßig wurden Lipid/Cyclohexanlösungen mit einem Endvolumen von 16 ml hergestellt. Dazu wurden 2400 µl PC oder POPC, 800 µl DOPS und 800 µl DOPE bzw. 3200 µl PC mit 800 µl DOPS oder DOPE aus den Lipidstammlösungen (Konzentration 10 mg/ml) gemischt und das CHCl₃ in der Speedvac verdampft. Für die Fusionsexperimente wurden zusätzlich jeweils 0,8 mol-% (15 nmol) bzw. 0,16 mol-% (3 nmol) der Farbstoffe NBD-PE (M_R = 956,3 g/mol) und Rh-PE (M_R = 1333,8 g/mol) zu der Lipidmischung hinzugefügt.

Die trockenen Lipide wurden dann in 16 ml Cyclohexan unter vortexen gelöst. Bei einem Molekulargewicht der Lipide von ca. 800 g/mol betrug die Endkonzentration 3,1 mM. In 600 µl Cyclohexanlösung betrug die Lipidmenge 1,87 µmol. Um ein nominales Peptid/Lipid- (P/L)-Verhältnis von 0,01 in den Liposomen zu erhalten, musste entsprechend 1,87 nmol Peptid zugegeben werden. Für eine Peptidlösung mit einer Konzentration von 400 µM entsprach dies 46,8 µl.

Für einen Liposomenansatz mit 1 mol-% Peptidanteil wurden 600 µl Lipid/Cyclohexan-Lösung mit entsprechender Menge an in TFE gelöstem Peptid durch 30 s Sonifizieren gemischt. Die Cyclohexan/TFE Emulsion wurde bei -80 °C eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die Rehydrierung der getrockneten Lipid- und Peptidmoleküle erfolgte in wässrigen Puffern (siehe Kap. 3.2.2.1). Für die Fusions- und Flip-Experimente wurden, je nach Art des Versuches, Tris-HCl Puffer (A-C) oder ein Zitronensäure-Natriumcitrat Puffer (E) hinzugegeben. Für die CD-Spektroskopie wurde ebenfalls ein Tris-HCl Puffer (D) oder ein Zitronensäure-Natriumcitrat Puffer (F) verwendet. Von dem entsprechenden Puffer wurden 600 µl auf den lyophilisierten

Lipid/Peptidfilm gegeben und zur Ausbildung von multilamellaren Liposomen für 1 h bei 37 °C geschüttelt (1400 rpm, Eppendorff Schüttler).

Durch Sonifizieren wurden kleine unilamellare Liposomen (SUV's) hergestellt. Die Beschallung erfolgte im Becherresonator unter Eiskühlung für 8 min bei 80 % Amplitude (Output 35 % - 40 %). Peptid- bzw. Lipidaggregate sowie größere Liposomen wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 20 min) entfernt. Der Überstand mit den SUV's wurde in ein frisches Eppendorffgefäß überführt und bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

Für Versuche mit LPC wurden nominal 3 mol-%, 8 mol-% oder 20 mol-% LPC in die äußere Membranschicht eingebaut. Hierfür wurde nach Herstellung der Liposomen ein entsprechendes Volumen aus einer LPC-Stammlösung (2,5 mg/ml in Tris-HCl Puffer) unter vortexen zu der Liposomensuspension dazupipettiert. Anschließend wurde die Suspension auf Eis für 20 min inkubiert, damit sich das LPC in die äußere Membranschicht einbauen kann.

Messung und Auswertung der Fusions-Kinetik

Die Messung der Fusion von SUV's erfolgte mittels FRET (Fluoreszenzenergietransfer) zwischen NBD-PE und RH-PE.

20 µl Donorliposomen (farbstofftragende Liposomen 0,8 mol-%) wurden mit 80 µl Peptid- oder Leerliposomen (Akzeptorliposomen) in eisgekühlte 96-well Platten pipettiert. Als Driftkontrolle dienten 20 µl Donorliposomen, die mit 80 µl Puffer verdünnt wurden, um die temperaturbedingte Veränderung der NBD-Fluoreszenz sowie die Adsorption der Liposomen an der Gefäßwand der Platte zu kontrollieren. Zusätzlich wurden 100 µl Kontrollliposomen (farbstofftragende Liposomen 0,16 mol-%) unverdünnt auf die Platte aufgetragen. Anschließend wurde die gekühlte Platte für 2 min im Wasserbad auf 37 °C temperiert und die Messung im Fluoreszenz-Spektrometer (BMG FLUOstar) sofort gestartet. Die Aufzeichnung der NBD-Fluoreszenz (Anregung bei 460 nm, Emission bei 530 nm) erfolgte in einminütigen Intervallen für 60 min. Zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz wurden die Liposomen mittels des Detergenz Triton X-100 (Endkonzentration 0,5 %) zerstört. Das resultierende Fluoreszenz-Signal wurde als 100 % Fusion definiert und dementsprechend die prozentuale Fusion zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelt. Der Abstand der Fluoreszenzlabel der Kontrollliposomen (0,16 mol-% Farbstofflipide) entspricht dem der vollständig fusionierten Liposomen. Die Berechnung des Quotienten aus den Fluoreszenzwerten der Kontrollliposomen vor der Detergenzlyse und danach ergibt den Faktor, um welchen die Fluoreszenzwerte der Proben nach Detergenzlyse korrigiert wurden.

Messung und Auswertung der Flip-Kinetik

Die Messung von Flip erfolgte durch Fluoreszenzmessung von NBD-markierten Phospholipiden. Zur Farbstoffmarkierung der äußeren Membranschicht von Liposomen mit und ohne integriertem Peptid wurden jeweils 0,1 mol-% in EtOH gelöstem C₆NBD-Phospholipid unter langsamem Vortexen mit den Proben gemischt. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert, um die Integration der C₆NBD-Phospholipide in die äußere Membranschicht zu ermöglichen. In Kontrollliposomen waren die äußere und zusätzlich die innere Membranschicht mit C₆NBD-Phospholipiden markiert, da die Label-Zugabe schon während der Liposomenherstellung erfolgte. Für die Bestimmung der Flip-Kinetik wurde die jeweilige Probe für definierte Zeitpunkte (standardmäßig: t = 0 min, 5 min, 10 min, 20 min und 60 min) zu je 25 µl in frische Eppendorfgläser aufgeteilt und entsprechend ihrer vorgegebenen Zeit bei 37 °C inkubiert, um Lipid-Flip-Flop zu ermöglichen. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis gestoppt. Das Bleichen von NBD-Lipiden in der äußeren Membranschicht erfolgte durch Zugabe von 500 µl einer 15 mM Dithionitlösung (DTN-Lösung) in eisgekühltem Tris-HCl Puffer (pH 7,4) für 10 min auf Eis. DTN ist nicht membranpermeabel und reduziert nur die in der äußeren Schicht lokalisierten C₆NBD-Phospholipide zu einem nichtfluoreszierenden Derivat (siehe Abb. 10, Kap. 1.3.2) Im Anschluss wurde die NBD-Fluoreszenz der Proben sofort im Fluoreszenz-Spektrometer (RF-1501 Shimadzu, Japan) vermessen (Anregung bei 460 nm, Emission bei 530 nm). Das aufgezeichnete Fluoreszenzsignal (F_x) entspricht den C₆NBD-Phospholipiden, die in die innere Membranschicht geflippt sind. Parallel dazu wurden Ansätze vermessen, denen nur 500 µl eisgekühlter Tris-HCl Puffer zugegeben wurden (F_0). Somit konnte die Gesamtfluoreszenz von NBD in der inneren und äußeren Membranschicht ermittelt werden und ermöglichte die Bestimmung des Fluoreszenzanteils der geflippten C₆NBD-Phospholipide (F_{Flip}) zum entsprechenden Zeitpunkt (1).

$$F_{Flip} = \left(\frac{F_x}{F_0} \right) \quad (1)$$

Die Ermittlung der Fluoreszenz von Kontrollliposomen (symmetrische Farbstoffmarkierung), mit und ohne DTN-Bleichung, ergab den Fluoreszenzwert für die maximale Integration an C₆NBD-Phospholipiden in die innere Membranschicht. Dieser Fluoreszenzwert ($F_{Flip(100)}$) wurde als maximaler Flip definiert und dementsprechend der prozentuale Flip ($Flip [\%]$) zu jedem aufgenommenen Zeitpunkt bestimmt (2).

$$Flip [\%] = \left(\frac{F_{Flip}}{F_{Flip(100)}} \right) \cdot 100\% \quad (2)$$

Die gemessene NBD-Fluoreszenz nach 0 min Inkubation bei 37 °C wurde zur Korrektur des Backgrounds von allen anderen Fluoreszenzwerten abgezogen. Zur Berechnung der Flip-Geschwindigkeit in [%/min] wurde mittels des Programms Origin die gemessene Flip-Kinetik gefittet und durch Bilden der ersten Ableitung der Wert nach 1 min abgelesen.

Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Bestimmung der Sekundärstruktur von membranintegralen Peptiden in Liposomen aus POPC/DOPE/DOPS (3:1:1) (v/v/v) erfolgte mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie. Die Messung beruht auf Absorptionsunterschiede von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht von optisch aktiven Substanzen. Im UV Bereich von 180 nm – 260 nm weisen Proteine charakteristische positive und negative Absorptionsbanden auf, die abhängig von ihrer Sekundärstruktur sind.

Zur Herstellung der Peptidliposomen wurde 1 mol-% Peptid und eine Lipidkonzentration von 1,5 mM (Peptid/Lipid-Verhältnis von 0,01) benötigt. Die Messung wurde in einer Quarzküvette mit 0,05 mm Schichtdicke bei 20 °C durchgeführt. Die Aufnahme der CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 nm – 260 nm erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 100 nm min⁻¹. Für jede Messung wurden 10 Spektren aufgezeichnet und gemittelt, um das Signalrauschen zu minimieren. Anschließend wurde von den Peptidspektren die Absorption des Leerwerts (Liposomen ohne Peptid) subtrahiert. Für die Ermittlung der Sekundärstrukturanteile wurden die gemessenen CD-Signale in mittlere Elliptizität pro Residuum umgerechnet (3) und mit Hilfe der CDNN/PEPFIT Software ausgewertet [92].

$$[\theta_{mr}](\lambda)(MRW) = \frac{\theta(\lambda) \cdot M}{n \cdot 1000 \cdot c \cdot l} \quad (3)$$

$[\theta_{mr}](\lambda)$ = molare Elliptizität; $[\theta](\lambda)$ = gemessene Elliptizität; MRW = mean residue weight; M = Molmasse; n = Anzahl der Peptidbindungen; c = Peptidkonzentration; l = optische Weglänge

Bestimmung des P/L-Verhältnisses

Die Quantifizierung des in Liposomen inkorporierten Peptids erfolgte durch Messung der Tryptophan-Fluoreszenz. Für eine vollständige Lyse der Liposomen wurden 135 µl der

unverdünnten Probe mit 90 μl 10 %-iger SDS-Lösung (w/v), 90 μl EtOH und 225 μl Puffer gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min geschüttelt (1400 rpm, Eppendorff Schüttler). Anschließend wurde der Ansatz zu 3 x 160 μl aliquottiert die wie folgt weiterverarbeitet wurden:

- Zu Aliquot A wurden 10 μl TFE hinzugefügt.
- Zu Aliquot B wurden 5 μl TFE sowie 5 μl interner Standard (Peptid 50 μM in TFE) gegeben.
- Zu Aliquot C wurden 10 μl interner Standard hinzupipettiert.

Zu 160 μl einer Liposomenprobe ohne Peptid wurden 10 μl TFE zugegeben (Kontrolllösung). Alle Aliquots wurden bei Raumtemperatur für 10 min geschüttelt (1400 rpm, Eppendorff Schüttler). Die Aufnahme eines Emissionsspektrums zwischen 260 nm – 400 nm erfolgte am Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregung von 280 nm. Die Emission bei 320 nm wurde abgelesen. Der gemessene Fluoreszenzwert d der Kontrolllösung (Liposomen ohne Peptid) diente als Leerwert. Danach wurden die Aliquots A – C nacheinander vermessen und ergaben die Fluoreszenzwerte a, b und c. anhand der zugegebenen Menge an internem Standard konnte die Peptidkonzentration aus der Differenz der gemessenen Fluoreszenzwerte (b-a) und (c-b) sowie dem Wert der Probe a und dem Leerwert d berechnet werden.

Die Quantifizierung der Lipide erfolgte durch Bildung eines Molybdophosphatkomplexes der enthaltenen Phosphatgruppe. Die Phosphatbestimmung erfolgte in Doppelansätzen. Hierfür wurden je 7 μl der Probe und 100 μl 70 % Perchlorsäure in ein Reagenzglas pipettiert und bei 200 °C für 1 h auf dem Heizblock aufgeschlossen. Die Bestimmung mit Phosphatstandardlösungen (0, 20, 40, 60, 80 und 100 nmol) wurde parallel durchgeführt. Nach Abkühlen der Proben wurden je 500 μl einer 0,44 %-igen (w/v) Lösung von Hexa-Ammoniumheptamolybdat-4-hydrat und 500 μl einer 2,5 %-igen (w/v) Lösung von Fiske-Subbarow Reduktionsreagenz hinzugefügt und gut gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 100 °C auf dem Heizblock erhitzt und nach dem Abkühlen in Kunststoffküvetten überführt. Die Absorption bei 820 nm wurde am UV/Vis-Spektrometer gegen den Leerwert (0 nmol Phosphat) gemessen. Die gemittelten Absorptionswerte aus der Doppelbestimmung der Phosphat-Standardmessung wurden gegen die enthaltene Phosphatmenge aufgetragen. Mittels dieser Kalibrierungskurve konnte der Phosphat- bzw. Lipidgehalt in den Proben bestimmt werden. Die Menge an Phosphat ist äquivalent zur Menge an Phospholipid.

Das P/L-Verhältnis errechnet sich durch Division der Peptidkonzentration und Lipidkonzentration.

Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse präsentiert, welche in insgesamt sieben Kapitel unterteilt sind. Es werden verschiedene Modellpeptide hinsichtlich ihrer Flip-Aktivität für drei verschiedene NBD-Phospholipidanaloga systematisch untersucht. Zunächst werden bei gleicher Zusammensetzung der Liposomen, Peptide mit unterschiedlichen Leucin/Valin-Anteilen und hydrophober Länge untersucht. Anschließend werden der Einfluss einer N-terminalen Acylkette und der Effekt der flankierenden Aminosäuren dieser Peptide genauer beleuchtet. Weiterhin werden Peptide untersucht, die von Transmembranbereichen vakuolärer und synaptischer SNARE-Proteine abgeleitet sind und zusätzlich zwei Mutanten eines solchen Peptids betrachtet.

Ein weiteres Augenmerk gilt dem Einfluss der Aminophospholipide in der Liposomenzusammensetzung auf den peptidinduzierten Flip von Phospholipiden.

Die Auswirkungen von elektrostatischen Interaktionen sowie der Einfluss von LPC und Cholesterol in der Liposomenmembran auf die Fusion der Liposomen und den Flip werden in den letzten beiden Kapiteln untersucht.

1.6 Synthetische Modellpeptide

Synthetische Modellpeptide wurden basierend auf natürlich vorkommende TMDn von SNARE-Proteinen teilweise in früheren Arbeiten [75] entworfen. Diese Peptide enthalten hydrophobe Kernsequenzen aus α -Helix-stabilisierenden und -destabilisierenden Aminosäuren bzw. natürliche Sequenzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Flip-Aktivität dieser Peptide bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften charakterisiert.

Die Primärstrukturen, der im nachfolgenden als „LV-Peptide“ und „SNARE-Peptide“ bezeichneten Modellpeptide, sind in Abb. 12 zusammengefasst. Die Peptide beinhalten ein Tryptophan zur Quantifizierung mittels UV-Absorption und Fluoreszenzspektroskopie und sind von einem Lysin (Lys)- oder Histidin (His)-Triplett flankiert. In Abb. 12 A sind alternierende Leucin/Valin (Leu/Val)-Sequenzen mit einer hydrophoben Länge von 16 Aminosäuren dargestellt. Leucin fördert die Bildung einer α -Helix, während Valin auf Grund seiner β -verzweigten Seitenkette die α -helikale Struktur behindert. Durch Einbringen von Glycin (Gly) und Prolin (Pro) wird die α -helikale Struktur zusätzlich gebrochen. In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt [50, 84], dass die Variation von Leucin und Valin zu strukturellen und funktionellen Unterschieden führt. In Übereinstimmung mit der Sekundärstrukturpräferenz der Aminosäuren, weisen die Peptide verschiedene lokale Umfaltungsdynamiken auf, die ihrer Fusogenität entsprechen [86]. Der Einfluss des Leu/Val-Verhältnisses sowie der α -Helixbrecher Gly/Pro auf die Flip-Eigenschaften sollte untersucht werden.

A	L16 LV16 LLV16 LV16-G8P9	KKKWLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLKKK KKKWLVVLVLVLVLVLVLVLVKKK KKKWLLVLLVLLVLLVLLVLLVKKK KKKWLVVLVLVLPVLVLVLVKKK	LV- Verhältnis
B	LV12 LV16 LV24	KKKWLVVLVLVLVLVLVKKK KKKWLVVLVLVLVLVLVLVKKK KKKWLVVLVLVLVLVLVLVLVLVLVKKK	hydrophobe Länge
C	ac16-LV16	ac16-KKKWLVVLVLVLVLVLVLVKKK	acylierte Variante
D	His-L16 His-LV16 His-LV20	HHHWLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLHHH HHHWLVVLVLVLVLVLVLVHVVH HHHWLVVLVLVLVLVLVLVLVHVVH	His- Variante
E	Vam3p-wt Syx-wt Syb-wt Syb-multA Syb-L8	KKKWVTLIIIIIVVCMVLLKKK KKKWIMIIICCVILGIIIASKKK KKKWILGVICAIILIIIIIVYKKK KKKWI AGVIA AIILIIII AVY KKK KKKWIL LLICLL IL LLI IL LL KKK	SNARE- Peptide

Abb. 12: Primärstruktur der verwendeten Modellpeptide. A, Kernsequenzen mit variierendem Leu/Val-Anteil. Zusätzlich wurden in die LV16-Sequenz an der 8. und 9. Position die Helixbrecher Glycin (Gly) und Prolin (Pro) eingefügt. B, Peptide mit unterschiedlicher hydrophober Länge der alternierenden Leucin/Valin (Leu/Val)-Sequenz. C, An den N-Terminus der LV16-Sequenz wurde eine Acetyl-Palmitoyl-Kette gekoppelt. D, Die hydrophobe Kernsequenz unterschiedlicher Länge und Leu/Val-Anteil ist mit Histidinen (His) flankiert. E, Peptidvarianten die aus dem Transmembransegment der Fusionsproteine Vam3p (Vamp3p-wt), Syntaxin (Syx-wt) und Synaptobrevin (Syb-wt) abgeleitet wurden. In der Syb-wt-Sequenz wurden zusätzlich Aminosäuren durch Alanine oder Leucine ausgetauscht.

Um zu testen, ob die Länge des hydrophoben Kerns Einfluss auf die Flip-Aktivität des Peptids ausübt, wurden Sequenzen mit 12 und 24 alternierenden Leucin- und Valin-Molekülen verwendet (Abb. 12 B).

Abb. 12 C zeigt eine LV16-Sequenz an dessen N-terminalen Ende eine Acetyl-Palmitoyl-Kette gekoppelt ist. Einige natürlich vorkommende Fusionsproteine weisen Acylierung auf. Es sollte daher untersucht werden, ob eine Acylierung an der Peptidsequenz Unterschiede im Flip-Verhalten zeigt.

Die Bedeutung des Ladungszustandes und der Art der flankierenden Aminosäuren für die Fusion und deren struktureller Einfluss wurde in früheren Studien gezeigt [84, 85]. His- und Lys-flankierte Peptide wiesen dabei die gleiche Fusogenität auf, solange beide Aminosäuren geladen waren. Bei physiologischem pH sind die Seitenketten der Histidine ungeladen ($pK_a \approx 6$) und blockieren die fusogene Wirkung der LV-Peptide. Die Fusogenität kann durch Protonierung der Histidine bei pH 4 wieder hergestellt werden. Abb. 12 D zeigt die His-flankierten Peptidvarianten, welche hinsichtlich ihrer Flip-Eigenschaften untersucht wurden.

Ergänzend zu den LV-Peptiden wurden auch synthetische Modellpeptide, die den TMDn des vakuolären Fusionsproteins Vam3p (Vam3p-wt) und der synaptischen Fusionsproteine Syntaxin-1a (Syx-wt) sowie Synaptobrevin-2 (Syb-wt) nachempfunden sind, hinsichtlich ihrer Flip-Eigenschaften getestet. Für Synaptobrevin-2 wurden zusätzlich zwei Mutanten herangezogen, die im folgenden als Syb-multA und Syb-L8 bezeichnet werden. In der Mutante Syb-multA sind drei Aminosäuren gegen α -Helix-stabilisierende Alanine eingetauscht, um deren α -helikale Konformation zu fördern. Eine weitere α -Helixstabilität wurde mit der Mutante Syb-L8 erzielt, in der acht Aminosäuren der Syb-wt-Sequenz durch Leucine ausgetauscht wurden. Beziehungen zwischen strukturellen und funktionellen Eigenschaften wurden in vorausgegangenen Arbeiten beschrieben [77, 93]. Auch für die SNARE-Peptide, die in Abb. 12 E dargestellt sind, sollte die Flip-induzierende Wirkung getestet werden.

In den folgenden Kapiteln erfolgt die systematische Charakterisierung der Flip-Aktivität der in Abb. 12 aufgelisteten Peptide hinsichtlich ihrer Fähigkeit den Flip von C₆NBD-Phospholipidanaloga mit verschiedenen Kopfgruppen in kleinen unilamellaren Liposomen zu induzieren, die eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung aufweisen.

1.7 Messung der Liposomendichtigkeit

Die Fähigkeit, die Translokation verschiedener C₆NBD-Phospholipidanaloga von der äußeren zur inneren Membranschicht von Liposomen zu induzieren (Lipid-Flip), wurde für die LV-Peptide und SNARE-Peptide untersucht. Dazu wurden in kleinen unilamellaren Liposomen, bestehend aus den synthetischen Lipiden Diolelylphosphatidylethanolamin (DOPE) und Diolelylphosphatidylserin (DOPS) sowie dem natürlichen Lipid Phosphatidylcholin (PC), welches aus Hühnereigelb extrahiert wurde, Peptide in einem Peptid/Lipid-(P/L)-Verhältnis von 0,01 integriert.

Die Flip-Aktivität wurde unter Anwendung einer etablierten Methode mittels DTN-Bleichung der NBD-Fluorophore [34, 55] bestimmt. Für den Versuch wurden die kurzkettigen, fluoreszenzmarkierten Phospholipidanaloga 1-Palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl -*sn*-glycero-3-Phosphatidylcholin (C₆NBD-PC), -Phosphoserin (C₆NBD-PS), und -Phosphoethanolamin (C₆NBD-PE) verwendet. Die verschiedenen Kopfgruppen der Phospholipidanaloga repräsentieren somit die Kopfgruppen der Phospholipide, aus denen die Liposomen zusammengesetzt sind. Jeweils 0,1 mol-% einer Spezies der C₆NBD-Phospholipidanaloga wurden zu der Liposomensuspension gegeben und in die äußere Membranschicht inkorporiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37 °C wurden die NBD-Moleküle mittels 15 mM DTN zu einem nicht fluoreszierenden Derivat reduziert. Da DTN impermeabel für die Membran ist, werden nur die C₆NBD-Phospholipide in der äußeren Membranschicht gebleicht. NBD-markierte Phospholipidanaloga, die in die innere Membranschicht übergegangen sind, sind nicht zugänglich für DTN und ihre Fluoreszenz (530 nm) kann demzufolge als Maß für die Flip-Aktivität genutzt werden [34].

Im Folgenden wurde kontrolliert, ob die Membranimpermeabilität von DTN auch für die verwendeten sonifizierten Liposomen in dieser Arbeit zutrifft. Um die Liposomendichtigkeit zu testen, wurden 0,1 mol-% der entsprechenden NBD-Phospholipidanaloga in beide Membranschichten integriert, indem sie vor der Liposomenausbildung zu der Phospholipidsuspension zugegeben wurden. In die Liposomen war zusätzlich 1 mol-% LLV16 integriert um sicherzustellen, dass mögliche Störungen der Membranstruktur durch integrale Peptide die Membranpermeabilität für DTN nicht fördern. In Abb. 13 sind die Bleich-Kinetiken für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE dargestellt.

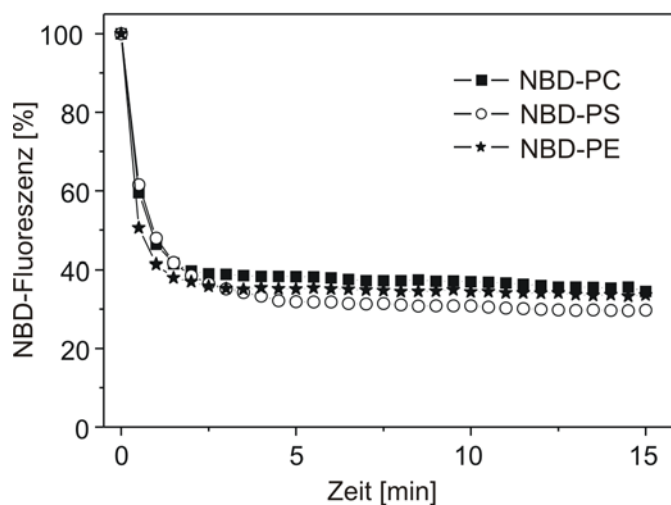


Abb. 13: Dithionit (DTN)-Bleich-Kinetik NBD-markierter Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit 1 mol-% LLV16. Es zeigt sich, dass nach Zugabe von 15 mM DTN bei $t = 0$ min und 3°C eine schnelle Reaktion von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in ein nicht fluoreszierendes Derivat erfolgt. Nach 3 min stellt sich ein stabiles Plateau mit einer verbleibenden Fluoreszenz von etwa 35 % ein. Es wird bevorzugt die äußere Membranschicht gebleicht, in der sich etwa 65 % der C₆NBD-Phospholide befinden, bei einem mittleren Durchmesser der Liposomen von 35 nm [77]. Die mittleren Fluoreszenzwerte ($n = 3$) wurden normalisiert (- DTN = 100 %).

Nach Bleichen der LLV16-Liposomen mit 15 mM DTN wurden ungefähr zwei Drittel der NBD-Fluoreszenz beseitigt und sie geht nach ca. 3 min in ein stabiles Plateau über. Für alle 3 Phospholipidanaloga konnte gezeigt werden, dass DTN vorrangig die NBD-Moleküle in der äußeren Membranschicht bleicht, welche zwei Drittel der Gesamtlipide in den verwendeten Liposomen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 35 nm entspricht [77]. Ebenfalls bleibt das Fluoreszenzsignal über den Messzeitraum von 15 min stabil, sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei einer Inkubation der Liposomen für 10 min mit 15 mM DTN keine Bleichung der NBD-Moleküle in der inneren Membranschicht erfolgt.

Im Folgenden wurde die Flip-Aktivität der LV-Peptide und SNARE-Peptide für die Translokation von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in kleinen unilamellaren Liposomen aus PC, DOPS und DOPE untersucht.

1.8 Abhängigkeit des Phospholipid-Flips von der Peptidsequenz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die verwendeten Liposomen für DTN impermeabel sind, wurde für alle LV-Peptide und SNARE-Peptide die Flip-Aktivität für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in kleinen unilamellaren Liposomen aus PC, DOPS und DOPE im Verhältnis 3:1:1 untersucht. Das P/L-Verhältnis betrug stets 0,01. Es kann somit Aufschluss darüber gegeben werden, in wie weit eine Abhängigkeit zwischen der Peptidsequenz und der Kopfgruppe des flippenden Phospholipids besteht. Um die Flip-Aktivität der Peptide zu vergleichen, wurde die Flip-Kinetik für die Zeitpunkte 0 min, 5 min, 10 min, 20 min und 60 min aufgezeichnet. Die Steigung der Flip-Kinetik spiegelt die Geschwindigkeit wider, mit der die Flip-Ereignisse eingetreten sind. Um die initiale Steilheit der Kinetik zu ermitteln, wurde die erste mathematische Ableitung mit Hilfe des Programms Origin bestimmt und der Wert nach 1 min als Maß für die Flip-Geschwindigkeit herangezogen.

Flip durch Peptide mit unterschiedlichem L/V-Verhältnis

Die Flip-Aktivität von LV-Peptiden mit einer hydrophoben Länge von 16 Aminosäuren wurde in Bezug auf α -Helixstabilität untersucht. Dafür wurde das Leu/Val-Verhältnis variiert und zusätzlich der Einfluss des α -Helix-destabilisierenden Aminosäurepaares Pro/Gly in der Kernsequenz von LV16 untersucht. In Abb. 14 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die Flip-Kinetiken von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE sind in Abb. 14 A dargestellt. Es zeigt sich, dass Liposomen ohne Peptid geringe Flip-Aktivität aufweisen, da nur niedrige Signale gemessen wurden. Für den peptidinduzierten Flip ist ein Zusammenhang zwischen der Primärstruktur des hydrophoben Kerns und der Kopfgruppe der geflippten Phospholipide zu erkennen. Zum Vergleich der Flip-Effizienz der Peptide sind das Ausmaß an Flip nach 1 h und die Flip-Geschwindigkeit in Abb. 14 B dargestellt.

Die Effizienz mit der die Peptide Flip von C₆NBD-PC induzieren korreliert mit dem Anteil an Valin. Während L16 kaum Flip induzierte, resultiert die Erhöhung des Val-Anteils in ein gesteigertes Ausmaß an Flip und einer schnelleren initialen Flip-Geschwindigkeit. LV16 zeigte einen etwa 45 % höheren Flip-Wert als LLV16. Der Einbau eines α -Helix-destabilisierenden Gly/Pro-Paares steigerte den Flip zusätzlich um 30 %. Die Flip-Aktivität der Peptide für C₆NBD-PC genügt folgender Reihenfolge: LV16-G8P9 > LV16 > LLV16 > L16.

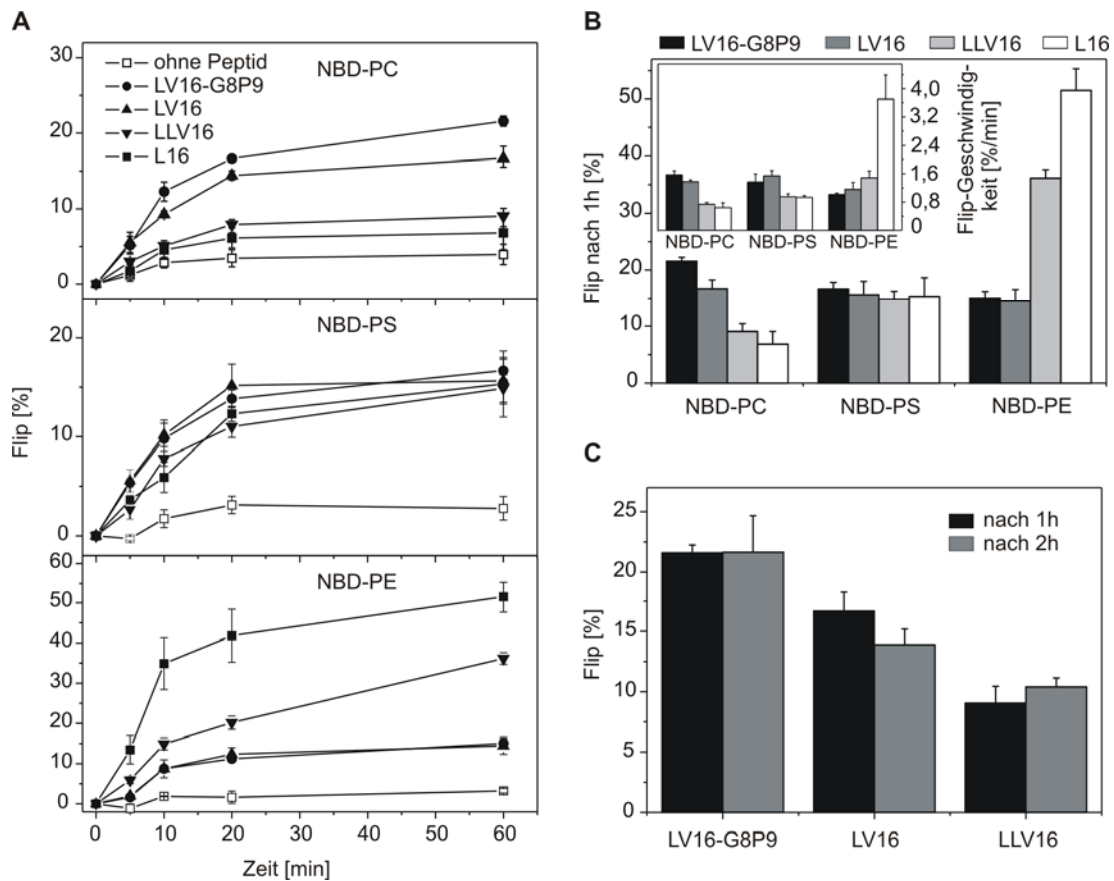


Abb. 14: Flip-Aktivität von Peptiden gleicher Länge mit unterschiedlichem Leu/Val-Anteil in der hydrophoben Kernsequenz. In die alternierende LV16-Sequenz wurde zusätzlich ein Gly/Pro-Paar eingebracht. A, Flip-Kinetiken der Peptide für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) von den Kinetiken aus A sind für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE zusammengefasst. C, das Ausmaß an Flip nach 1 h und nach 2 h ist für C_6 NBD-PC aufgetragen. Messpunkte stellen Mittelwerte dar, \pm Standardfehler ($n = 3-5$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,0092 - 0,012$).

C_6 NBD-PS wird von allen untersuchten Peptiden unabhängig vom Leu/Val-Anteil mit ähnlicher Effizienz aus der äußeren in die innere Membranschicht transportiert. Der Flip nach 1 h beträgt je nach Peptid etwa 15 % – 16 %. Ein ausgeglichenes Leu/Val-Verhältnis und der zusätzliche Einbau von Glycin und Prolin in die Sequenz erhöht jedoch die initiale Flip-Geschwindigkeit um je etwa 40 %.

Für den Flip von C_6 NBD-PE verhält es sich im Vergleich zu C_6 NBD-PC umgekehrt. Mit steigendem Val-Gehalt in der Sequenz sinkt die Flip-Effizienz. Sowohl das Ausmaß an Flip, als auch die Flip-Geschwindigkeit sind stark erhöht, wenn die Peptidsequenz ausschließlich aus Leucinen besteht (L16). Der induzierte Flip durch L16 nach 1 h beträgt ungefähr 51 % und wird um das 3,5 fache reduziert, wenn die Peptidsequenz aus gleichen Leu/Val-Anteilen (LV16) besteht. Ein zusätzliches Gly/Pro-Paar in der LV16-Sequenz (LV16-G8P9) hat keine weiteren Auswirkungen auf den Flip für C_6 NBD-PE. Die Flip-Effizienz der Peptide für C_6 NBD-PE lässt sich in folgende Reihenfolge einordnen: $L16 > LLV16 > LV16 \approx LV16-G8P9$.

Die Peptide mit hohem Leu/Val-Anteil, LV16 und LV16-G8P9, zeigen für die drei untersuchten NBD-Phospholipidanaloga ähnlich gute Flip-Aktivität mit einem Flip von ca. 15 % - 21 %. Sequenzen die hauptsächlich aus α -Helix-stabilisierenden Leucinen bestehen (L16, LLV16) weisen eine stärkere Abhängigkeit gegenüber der Phospholipidkopfgruppe auf. Während für die PC-Translokation durch LLV16 nur maximal 9 % und für L16 noch weniger Flip nach 1 h gemessen werden konnte, induzierten beide Peptide für PE ein hohes Ausmaß an Flip von etwa 36 % – 51 %.

Die Aufnahme der Flip-Kinetik von C₆NBD-PC für 2 h zeigte keine weitere Steigerung des Flips (Abb. 14 C). Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass die peptidinduzierten Flip-Ereignisse von C₆NBD-PC nach 1 h in der Sättigung sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Flip von C₆NBD-PC und C₆NBD-PE abhängig vom Leu/Val-Verhältnis ist, während der C₆NBD-PS-Flip von allen Peptidsequenzen etwa gleich gut katalysiert wird. Die Flip-Effizienz von C₆NBD-PC kann durch Einbau von α -Helix-destabilisierenden Valinen in ein aus Leucin bestehendes Peptid und dem zusätzlichen Einbringen der α -Helixbrecher Glycin und Prolin gesteigert werden. Umgekehrt fördert eine α -helikale, aus Leucinen bestehende Sequenz (L16) den C₆NBD-PE-Flip am stärksten.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Sequenz mit gleichen Anteilen an Leucin und Valin (LV16) alle drei Phospholipidspezies gleich gut von der äußeren in die innere Membran transportieren kann, wurde im Folgenden die hydrophobe Länge dieser Sequenz variiert, um deren Einfluss auf den Phospholipid-Flip zu untersuchen.

Flip durch Peptide unterschiedlicher Länge

Die hydrophobe Länge einer alternierenden Leu/Val-Sequenz sollte hinsichtlich ihrer Flip-Eigenschaften untersucht werden. Hierfür wurden zum Vergleich LV-Peptide mit einem hydrophoben Kern aus 12, 16 und 24 Aminosäuren herangezogen. Die Flip-Kinetiken von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE für LV12 und LV24 sind in Abb. 15 A dargestellt und zeigen eine Abhängigkeit in Bezug auf die Peptidlänge. Die kurze LV12-Sequenz weist eine stärkere Tendenz auf, den Flip der Phospholipide zu induzieren als die lange LV24-Sequenz.

Abb. 15 B zeigt die Gegenüberstellung von Flip nach 1 h und initiale Flip-Geschwindigkeit für die drei alternierenden LV-Varianten (LV12, LV16 und LV24). Eine kurze Leu/Val-Sequenz von 12 Aminosäuren zeigt höhere Flip-Werte nach 1 h als die längeren Varianten. Der induzierte Flip von LV16 und LV24 ist für C₆NBD-PS und C₆NBD-PE gleich und beträgt 14 % - 15 %.

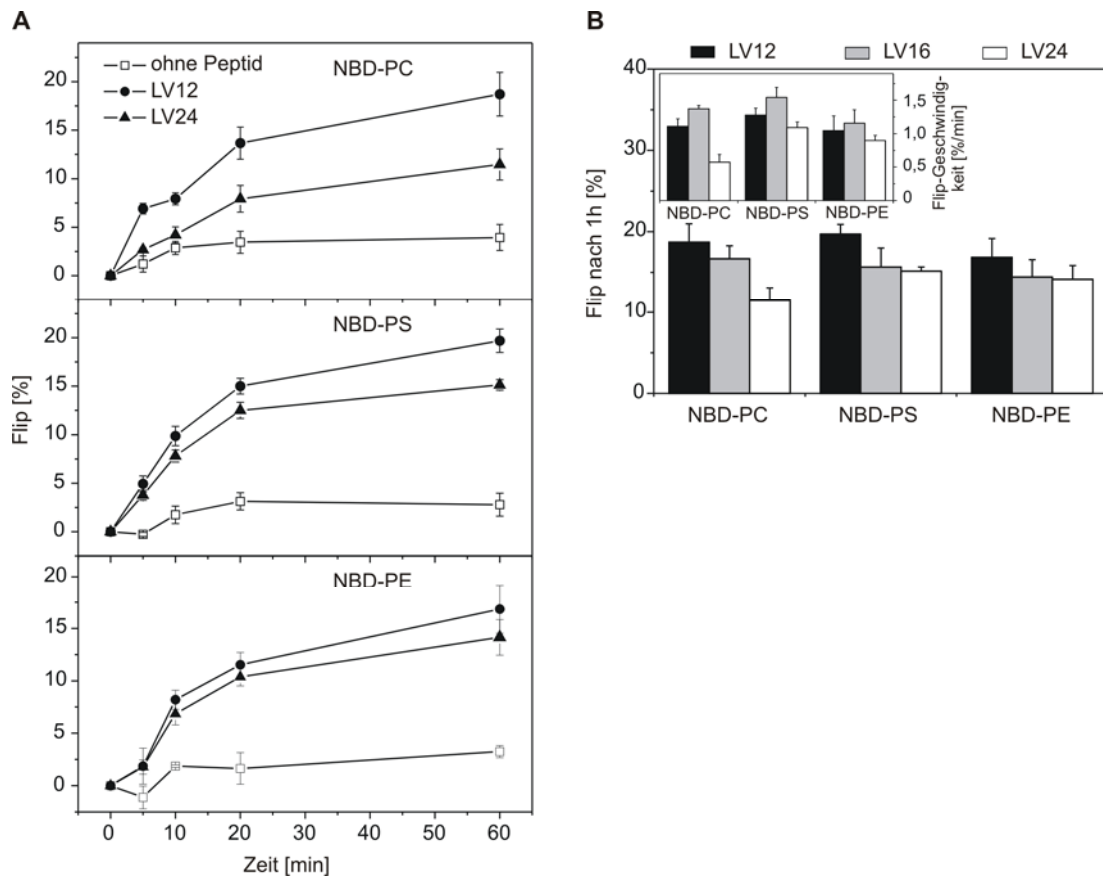


Abb. 15: Flip-Aktivität von Peptiden mit gleichem Leu/Val-Anteil in der hydrophoben Kernsequenz und unterschiedlicher Länge. A, Flip-Kinetiken der Peptide für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) von den Kinetiken aus A sind für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE zusammengefasst. Die Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler dar ($n = 3-5$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,0087 - 0,012$).

Der Flip von C_6 NBD-PC wird von einer langen LV24-Sequenz jedoch nicht so gut gefördert wie durch LV16. Der PC-Flip nimmt mit steigender Länge des hydrophoben Kerns der Peptide tendenziell ab.

Für die Flip-Geschwindigkeiten der Phospholipide ergeben sich jedoch Unterschiede zum gemessenen Flip nach 1 h. Hier zeigten sich für die mittlere Peptidlänge (LV16) die schnellsten Flip-Raten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Länge einer alternierenden Leu/Val-Sequenz Einfluss auf die Flip-Effizienz hat. Wobei eine kurze LV12-Sequenz die höchsten Flip-Ausmaße erzeugt, während eine mittlere LV16-Sequenz tendenziell schnellere Flip-Raten aufweist.

Flip durch eine acylierte Peptidvariante

Es ist bekannt, dass an natürlichen Fusionsproteinen Acylierungen auftreten. Bisher ist jedoch unklar welche Funktionen die Acylketten übernehmen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass in Abhängigkeit von der Länge der Acylkette eine verminderte Fusogenität von LV16 auftrat [84].

Der Einfluss auf die Flip-Eigenschaften einer Palmitoyl-Kette am N-terminalen Ende einer LV16-Sequenz (ac16-LV16) sollte untersucht werden. Die Flip-Kinetiken in Abb. 16 A zeigen, dass ac16-LV16 für alle drei Phospholipidspezies ähnlich gut Flip induziert. Aus Abb. 16 B wird deutlich, dass eine Acylkette am LV16-Peptid sowohl den Flip nach 1 h als auch die Flip-Geschwindigkeit relativ zu LV16 erhöht. Im Fall der C₆NBD-PE Translokation konnte eine Steigerung des Ausmaßes an Flip und der Geschwindigkeit von etwa 80 % bzw. 100 % beobachtet werden, während für C₆NBD-PC und C₆NBD-PS beide Parameter nur um etwa 40 % bzw. 70 % anstiegen. Beide Peptidvarianten katalysieren die Translokation der Phospholipide unabhängig von der Kopfgruppe, wobei ac16-LV16 eine Präferenz für PE hinsichtlich des Flip-Ausmaßes zeigt.

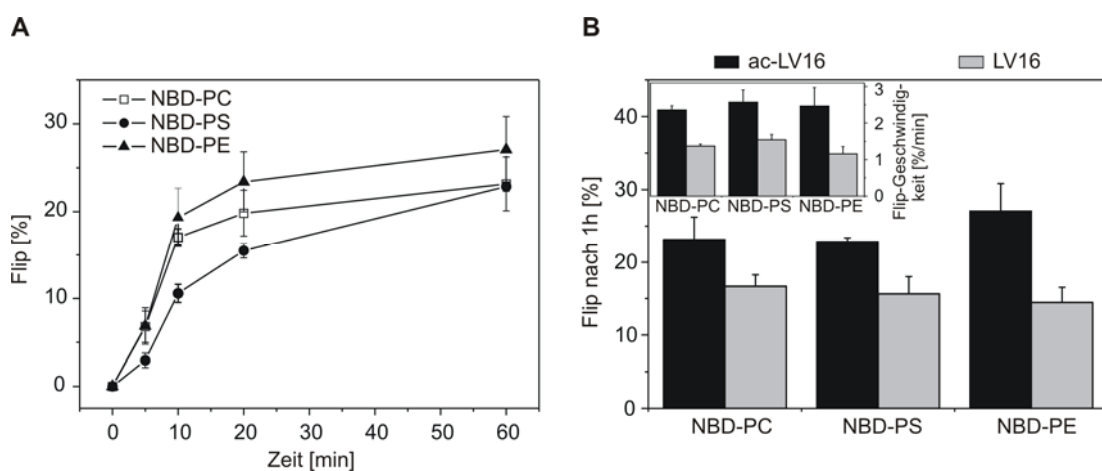


Abb. 16: Flip-Aktivität einer LV16-Sequenz mit einer N-terminalen Palmitoyl-Kette (ac16-LV16). A, Flip-Kinetiken der Peptide für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) von den Kinetiken aus A und von LV16 sind für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE zusammengefasst. Die Messpunkte stellen Mittelwerte ± Standardfehler dar (n = 3-5 unabhängige Messungen, P/L = 0,0081 – 0,009).

Flip durch His-flankierte Peptide

Es ist bisher bekannt, dass die Ladung der flankierenden Aminosäuren für die Fusogenität eines Peptids von entscheidender Bedeutung ist [85]. Auf Grund des pK_a-Wertes der ε-Aminogruppe des Lysins (pK_a = 10,3) sind die terminalen Lysine bei physiologischem pH-Wert positiv geladen, während Histidin (pK_a = 6) erst ab einem pH-Wert von ca. 6 im protonierten Zustand vorliegt. Ungeladene, His-flankierte Peptide waren nicht befähigt, Fusion zu induzieren. Im positiv geladenen Zustand konnte das fusogene Potential dieser Peptide wieder hergestellt werden und war mit der Fusogenität der Lys-flankierten Peptide vergleichbar. Im Folgenden soll der Einfluss der terminalen Aminosäuren Lysin und Histidin sowie deren Ladungszustand auf die Flip-Aktivität einer reinen Leu-Sequenz und einer alternierenden Leu/Val-Sequenz untersucht werden. Zusätzlich

wird der Einfluss der Länge der His-flankierten Leu/Val-Sequenz auf strukturelle Eigenschaften genauer untersucht.

Einfluss des Ladungszustandes der flankierenden Histidine

Die Ladung der His-flankierten Peptide kann durch den pH-Wert des Puffers verändert werden. Somit wird die Möglichkeit gegeben zu klären, ob die Ladung der Seitenketten einen Einfluss auf die Flip-induzierenden Eigenschaften der Peptide ausübt. Abb. 17 A zeigt den Flip nach 1 h und die Flip-Geschwindigkeit von C₆NBD-PC und C₆NBD-PE für die His-flankierten Peptide His-LV16 und His-LV20 sowie für die Lys-flankierte LV16-Sequenz bei pH 7,4 und pH 4,2.

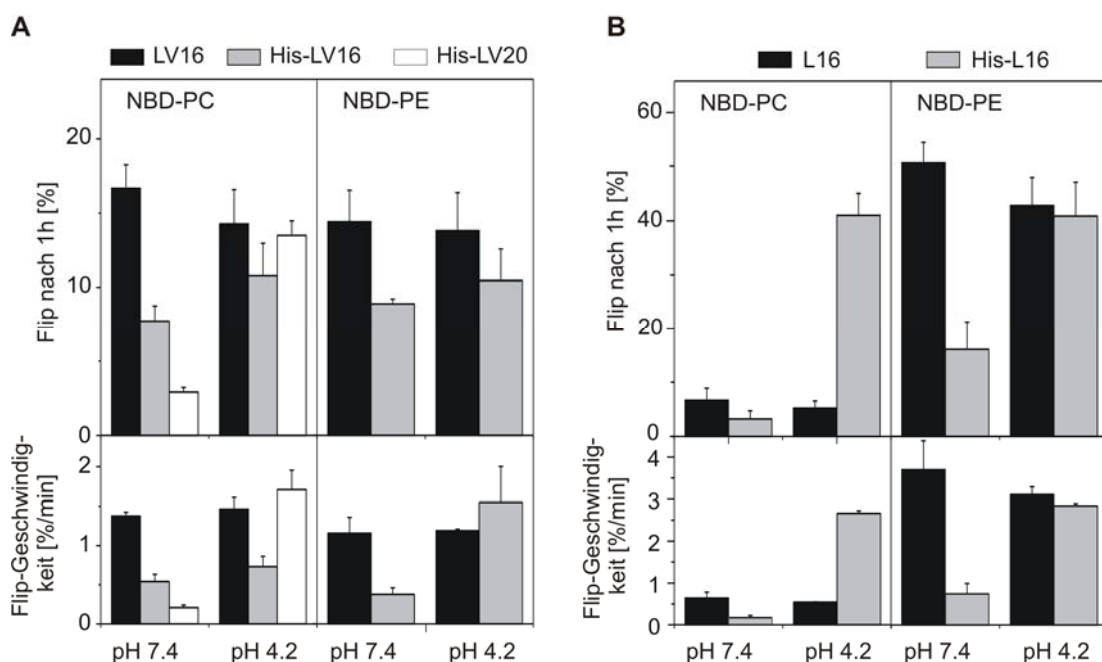


Abb. 17: Flip-Aktivität von Peptiden in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Lys- und His-Aminosäuren. A, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit der Peptide LV16, His-LV16 und His-LV20 für C₆NBD-PC und C₆NBD-PE bei pH 7,4 (20 mM Tris-HCl Puffer) und pH 4,2 (20 mM Natriumcitrat Puffer). B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit der Peptide L16 und His-L16 für C₆NBD-PC und C₆NBD-PE bei pH 7,4 und pH 4,2. Die Messpunkte stellen Mittelwerte ± Standardfehler dar (n = 4-5 unabhängige Messungen, P/L = 0,0079 – 0,0091).

Es zeigte sich, dass bei neutralem pH-Wert (pH 7,4) die His-flankierten Peptidvarianten reduzierte Flip-Aktivität im Vergleich zu LV16 aufwiesen. In leicht saurem Milieu (pH 4,2) war auch die Flip-Aktivität von LV16 etwas reduziert. Das Flip-Potential der His-flankierten Peptide konnte durch Protonierung der Histidine bei pH 4,2 wieder erhöht werden. Das vollständige Flip-Potential der Lys-flankierten Peptidsequenz wurde für beide Phospholipidanaloga jedoch nicht wiederhergestellt. Nur die längere His-LV20-Sequenz erreichte für C₆NBD-PC das Ausmaß an

Flip nach 1 h und die Flip-Geschwindigkeit wie LV16. In Abb. 17 B ist der Flip für C₆NBD-PC und C₆NBD-PE durch die Peptidsequenzen L16 und His-L16 dargestellt. Wie schon in Kap. 4.3.1 Abb. 14 gezeigt, vermittelt L16 kaum C₆NBD-PC-Flip. Durch die His-flankierte Variante (His-L16) wird die Flip-Aktivität für C₆NBD-PC bei neutralem pH-Wert fast vollständig eliminiert. Es ist bemerkenswert, dass durch Protonierung der Histidine bei pH 4,2 ein sehr starker Anstieg des C₆NBD-PC-Flips auf über 40 % beobachtet werden konnte. Oligoleucin-Sequenzen (L16) katalysieren den C₆NBD-PE-Flip am stärksten (siehe Kap. 4.3.1 Abb. 14). Die Flip-Aktivität von L16 bei neutralem pH-Wert wird durch Austausch der Lysine gegen Histidine (His-L16) auf ca. ein Drittel reduziert. Durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 4,2 erreichen L16 als auch His-L16 für den Flip-Ausmaß und die Flip-Geschwindigkeit von C₆NBD-PE weitestgehend gleiche Werte. Für L16 zeigt sich, wie für LV16, ein etwas erniedrigtes Flip-Potential bei pH 4,2 relativ zu pH 7,4.

Die Flip-Werte von C₆NBD-PC mit LV16 konnten also nur durch die längere, His-flankierte LV20-Sequenz, nicht aber mit His-LV16 im protonierten Zustand erreicht werden. Es deutet sich an, dass nicht nur die Ladung entscheidend für die Flip-Aktivität ist, sondern auch die Art der flankierenden Aminosäure eine Rolle spielt.

Im Folgenden soll durch Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie geklärt werden, ob es bei neutralem und leicht saurem pH-Wert Strukturunterschiede zwischen His-L16 und His-LV20 gibt.

Einfluss der Peptidlänge auf die Sekundärstruktur

Wie oben aufgeführt, zeigen die His-flankierten Leu/Val-Peptide im protonierten Zustand Unterschiede zur Lys-Variante für das Flip-Verhalten von C₆NBD-PC. Nur das geladene His-LV20, aber nicht die His-LV16-Sequenz, konnte das vollständige Flip-Potential der LV16-Sequenz bei pH 4,2 erreichen. Es soll durch CD-Spektroskopie offengelegt werden, in wie weit ein His-flankiertes Peptid strukturelle Unterschiede zu einer Lys-flankierten Sequenz in POPC/DOPS/DOPE-Liposomen aufweist. Dadurch kann Aufschluss darüber gegeben werden, ob die Sekundärstruktur den ermittelten Flip (Kap. 4.3.4.1) beeinflusst hat. Die Strukturanalysen erfolgten in Puffern mit pH 7,4 und pH 4,2. Frühere Arbeiten zeigten [85], dass His-flankierte Peptide keine pH-abhängigen Strukturunterschiede aufwiesen. Die ermittelten CD-Spektren (Abb. 18 A) konnten nur für His-LV16 eine pH-abhängige, strukturelle Umfaltung nachweisen. Hier gab es einen geringen Anstieg des β -Faltblattanteils und eine Reduktion der α -Helikalität. Die Sekundärstruktureigenschaften der anderen Peptide blieben weitestgehend erhalten. Aus Abb. 18 B geht hervor, dass His-LV16 im Vergleich zu LV16 einen 2,5-mal höheren Anteil an β -Faltblatt aufweist und die α -Helikalität um mehr als die Hälfte reduziert ist. Bei einer längeren His-flankierten Sequenz von 20 Aminosäuren ist, bezogen auf die LV16-Sequenz, der Anteil an α -Helix nur um etwa 19 % erniedrigt und der β -Faltblattanteil um ca. 50 % erhöht. Es deutet sich an,

dass eine Reduktion des α -helikalen-Anteils einer alternierenden LV-Sequenz das Flip-Potential hemmt. Folglich ist die α -Helix maßgeblich für den Flip.

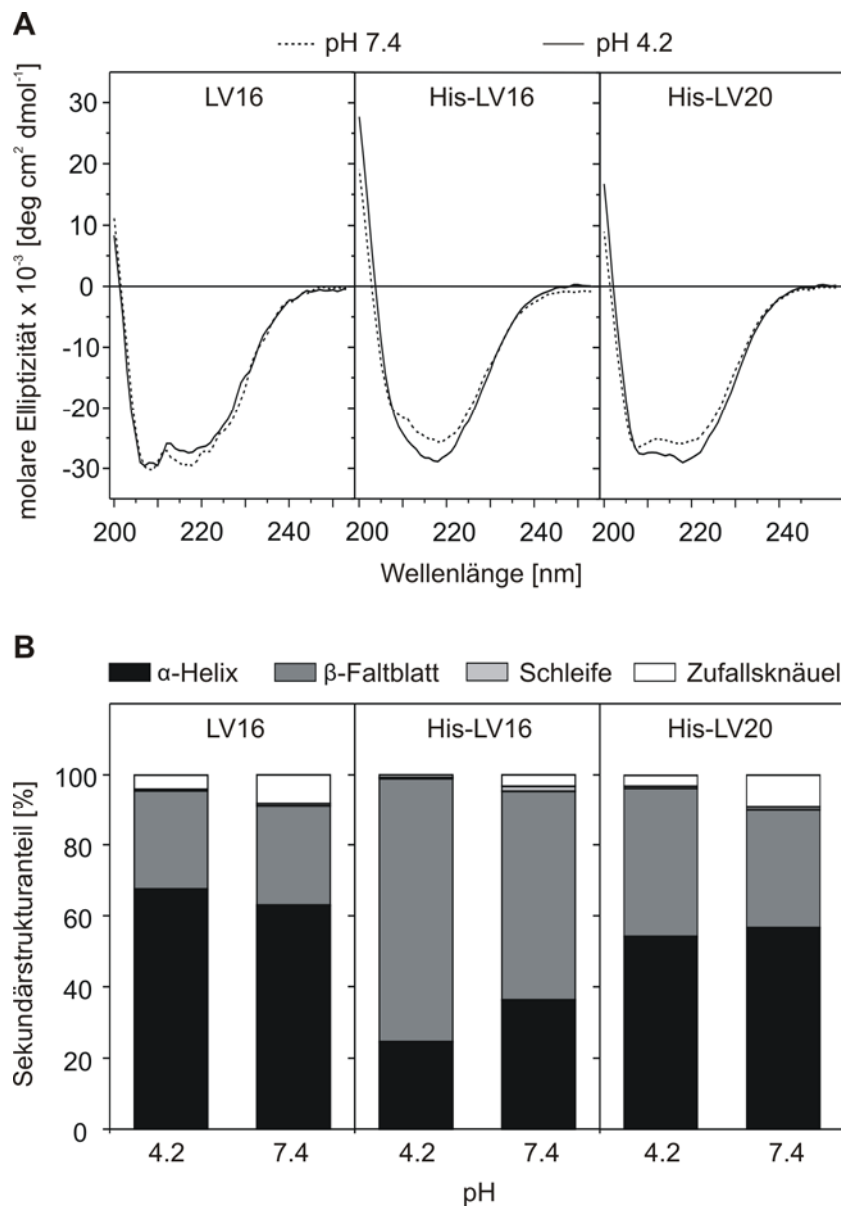


Abb. 18: Sekundärstruktur His- und Lys-flankierter Peptide. A, gemittelte CD-Spekten von LV16, His-LV16 und His-LV20 in POPC/DOPS/DOPE-Liposomen bei pH 4,2 (20 mM Natriumcitrat Puffer) und pH 7,4 (20 mM Tris-HCl Puffer). B, Sekundärstrukturanteile von LV16, His-LV16 und His-LV20 bei pH 7,4 und pH 4,2.

Flip durch SNARE-Peptide

Modellpeptide, die TMDn der SNARE-Proteine Synaptobrevin-2, Syntaxin-1a und dem SNARE-Protein Vam3p nachahmen, sollten auf ihre Flip-Aktivität hin untersucht werden. Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1a sind präsynaptische Q-SNARE-Proteine von sekretorischen Vesikeln und

notwendig für die neuronale Exocytose zur Ausschüttung von Neurotransmittern. Die TMDn dieser Proteine interagieren miteinander und formen dadurch einen stabilen Komplex, damit die Membranfusion initiiert werden kann [94, 95]. Vam3p hingegen ist ein Q-SNARE aus Hefevakuolen (*Saccharomyces cerevisiae*) und an der intrazellulären Vakuolenfusion beteiligt [96]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die TMDn dieser Proteine *in vitro* die Fusion von Liposomen induzieren können und Mutationen in der TMD-Sequenz, welche die α -helikale Konformation fördern, eine Reduktion des fusogenen Potentials zur Folge haben [77, 97]. Synthetische Modellpeptide, die von der TMD des Synaptobrevin-2 stammen wurden durch Austausch von β -verzweigte Aminosäuren mit Alaninen und Leucinen zu stabileren α -Helices mutiert und wiesen in ihren Eigenschaften verminderte Fusion und strukturelle Flexibilität im Vergleich zu den Sequenzen der Wildtypen Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1a auf [77, 93]. Zunächst wurde die Flip-Aktivität einer Synaptobrevin-2-TMD (Syb-wt) untersucht und zusätzlich zwei Mutanten dieser Wildtyp-Sequenz getestet. In der Mutante Syb-multA wurden drei Alanine ausgetauscht, wobei nur eine β -verzweigte Aminosäure mutiert wurde. In der Syb-L8-Mutante sind acht Aminosäuren durch α -Helix-fördernde Leucine ausgetauscht. Ergänzend wurden synthetische Modellpeptide hinsichtlich ihres Flip-Potentials getestet, die den TMDn von Vam3p (Vam3p-wt) und Syntaxin-1a (Syx-wt) nachempfunden waren.

Syb-wt und Mutanten

Die Fähigkeit Phospholipid-Flip zu induzieren wurde für die Wildtyp-Sequenz Syb-wt einer TMD von Synaptobrevin-2 sowie zwei Mutanten Syb-multA und Syb-L8 untersucht. Die in Abb. 19 A dargestellten Flip-Kinetiken zeigen für C₆NBD-PE eine starke Sequenzabhängigkeit. Die Flip-Werte reichen bis zu 65 %, während C₆NBD-PC und C₆NBD-PS maximal 22,5 % Flip aufweisen. Das Ausmaß an Flip nach 1 h (Abb. 19 B) ist für C₆NBD-PC und C₆NBD-PS ähnlich hoch. Syb-wt und Syb-multA zeigen gleiche Flip-Werte für C₆NBD-PC und C₆NBD-PS von ca. 14 % – 15 %, während Syb-L8 für beide Phospholipidanaloga etwa 6 % mehr Flip induziert. Die Flip-Geschwindigkeit ist jedoch weitestgehend sequenzunabhängig. C₆NBD-PE wird von Syb-L8 am besten und schnellsten von der äußeren in die innere Membranschicht transportiert. Die Flip-Werte sind fast dreimal so hoch wie die von Syb-wt erzielten Werte. Für den Flip von C₆NBD-PE ergibt sich die Reihenfolge Syb-L8 > Syb-multA > Syb-wt, die mit dem Anteil an β -verzweigten Aminosäuren korreliert.

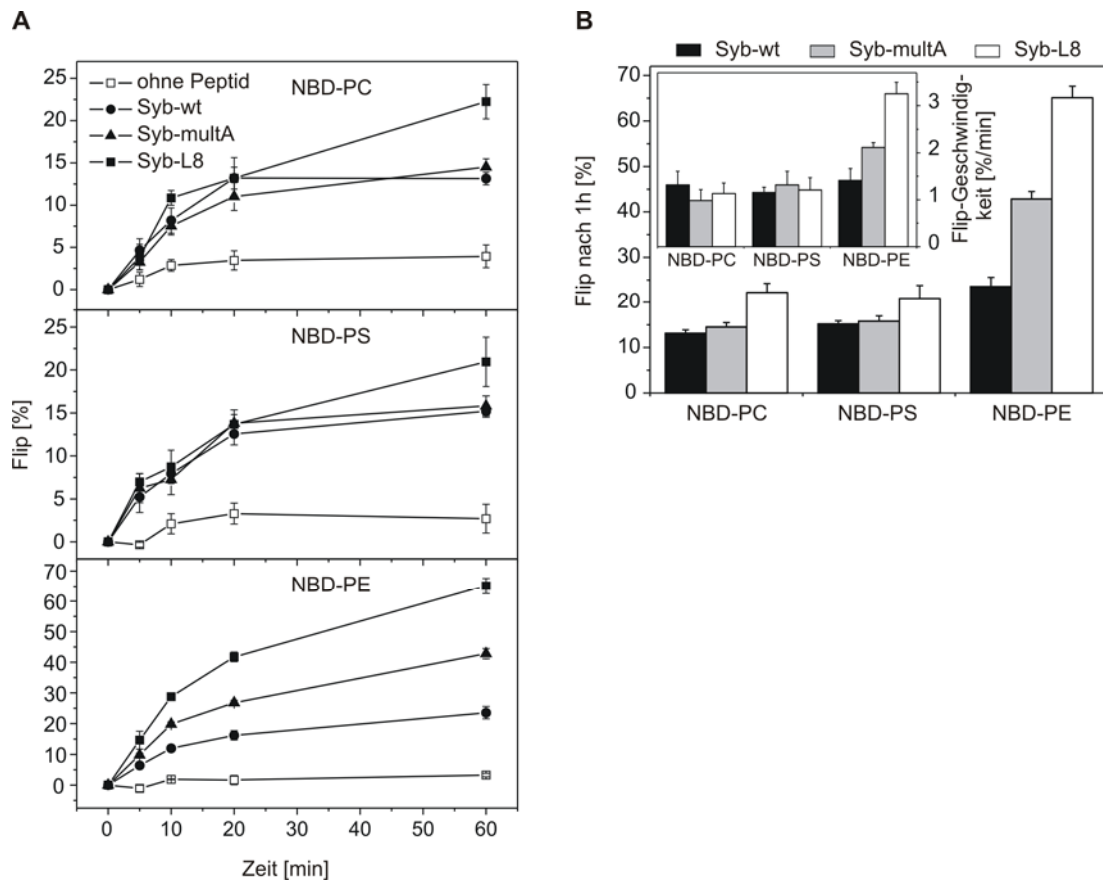


Abb. 19: Flip-Aktivität von Syb-TMD-Peptiden mit unterschiedlichen Anteilen an β -verzweigten Aminosäuren. A, Flip-Kinetiken der Peptide Syb-wt, Syb-multA und Syb-L8 für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) von den Kinetiken aus A sind für C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE zusammengefasst. Die Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler dar ($n = 3-4$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,0086 - 0,011$).

Syx-wt und Vam3p-wt

Für die Modellpeptide Syx-wt und Vam3p-wt ist durch frühere Arbeiten bekannt, dass sie die Fusion von Liposomen *in vitro* induzieren [77, 97]. Es sollte ergänzend zu Syb-wt überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß diese Peptide den Flip von Phospholipiden induzieren können. Abb. 20 A zeigt die Flip-Kinetik für die drei getesteten Phospholipidanaloga. Beide Peptide zeigen unabhängig von ihren Sequenzunterschieden ein ähnliches Potential Flip zu induzieren. Für C_6 NBD-PC und C_6 NBD-PS ergeben sich für beide Sequenzen Flip-Werte von etwa 15 % - 17 % nach 1 h (Abb. 20 B). Der Flip von C_6 NBD-PE wird von beiden Peptiden doppelt so gut katalysiert. Es wird auch bei Betrachtung der in Abb. 20 B (Inset) dargestellten Flip-Geschwindigkeit deutlich, dass C_6 NBD-PE effizienter als die anderen zwei Phospholipidanaloga mittels Syx-wt und Vam3p-wt durch die Membran transportiert wird.

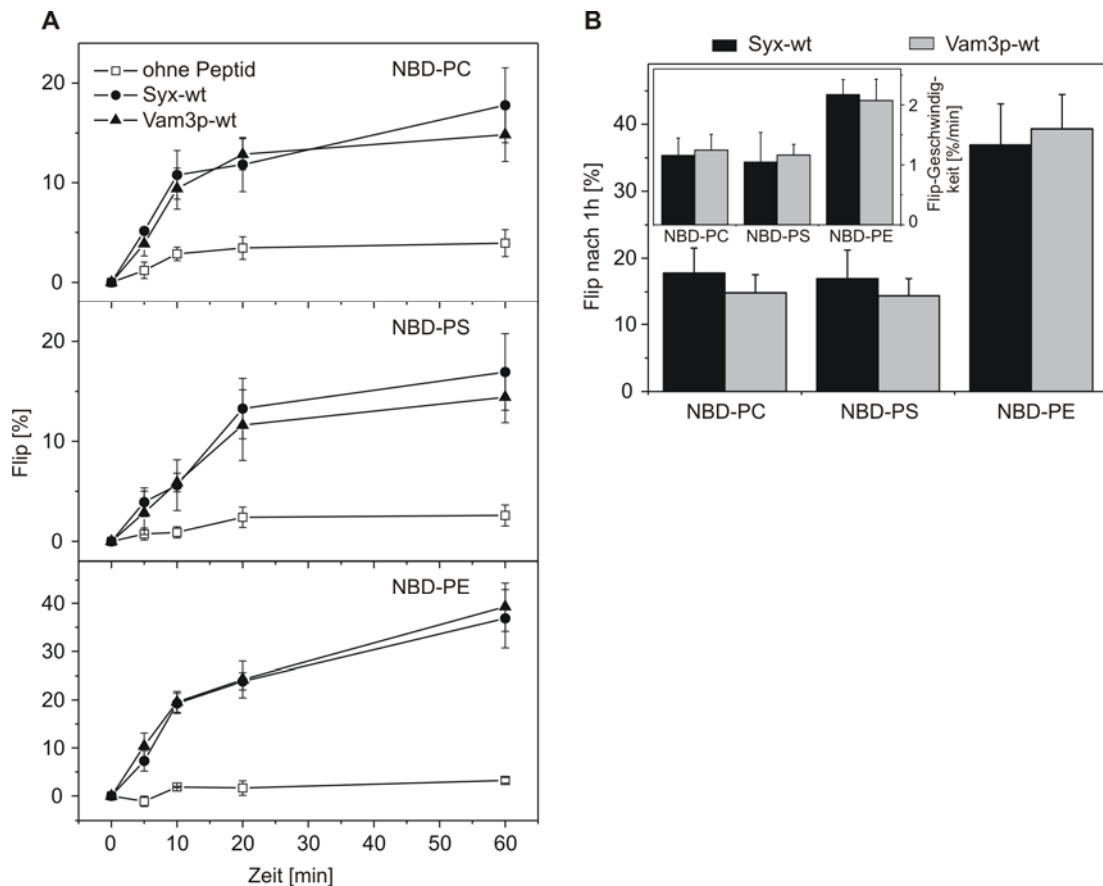


Abb. 20: Flip-Aktivität eines Syx-TMD- (Syx-wt) und Vam3p-TMD-Peptids (Vam3p-wt). A, Flip-Kinetiken der Peptide für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) der Kinetiken aus A sind für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE zusammengefasst. Die Messpunkte stellen Mittelwerte ± Standardfehler dar (n = 3 unabhängige Messungen, P/L = 0,0085 – 0,009).

1.9 Abhängigkeit des Phospholipid-Flips von den Phospholipiden in der Liposomenzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Lipidmembran charakterisiert ihre Eigenschaften [98]. Die Ladung der Kopfgruppen bestimmt die Nettoladung der Membran und beeinflusst intra- und intermembrane elektrostatische Wechselwirkungen. Des Weiteren bewirkt die Lipidspezies, auf Basis ihrer Struktur, Veränderungen in der Krümmung einer Membran. Eine positive Krümmung (konvexe Anordnung der Kopfgruppen) wird von Lipiden mit nur einer Acylkette (Lysolipide) bevorzugt, während eine negative Krümmung (Lipidköpfe in konkaver Anordnung) von Lipiden ausgebildet wird, deren Kopfgruppe kleiner ist als die Acylkettenregion. Aus früheren Studien geht hervor, dass der Zusammensetzung der Lipidmembran eine wichtige Rolle für die peptidinduzierte Fusion von kleinen unilamellaren Liposomen zukommt [50]. Es liegt nahe, dass die Zusammensetzung der Liposomen ebenfalls Einfluss auf die transmembranen Bewegungen von Phospholipiden mit unterschiedlicher Ladung und Kopfgröße ausübt. Es soll daher der Effekt der liposomalen

Zusammensetzung auf die peptidinduzierte Translokation einer Lipidspezies untersucht werden, mit dem Augenmerk auf eine mögliche Beeinflussung der Flip-Aktivität durch veränderte Lipid-Lipid- bzw. Lipid-Peptid-Wechselwirkung.

Im vorherigen Kapitel wurde bei unveränderter Zusammensetzung der Liposomen die Abhängigkeit der Peptidsequenz von LV- und SNARE-Peptiden auf die Phospholipidtranslokation untersucht. Im Folgenden soll anhand der LV-Peptide mit variierendem Leu/Val-Anteil der Effekt der Membranzusammensetzung auf den Flip von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE gezeigt werden. Zunächst werden die Phospholipide systematisch aus der ursprünglichen Zusammensetzung PC/DOPS/DOPE eliminiert und die Auswirkung auf den C₆NBD-PC-Flip ermittelt. Anschließend wird das Flip-Verhalten von C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in Liposomen untersucht, die das entsprechende Phospholipid nicht in ihrer Zusammensetzung enthalten.

Einfluss von DOPS und DOPE auf den NBD-PC-Flip

Bisher wurde der peptidinduzierte Flip in Liposomen bestehend aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) analysiert. Die Liposomen weisen eine negative Nettoladung auf, da die Seringruppe von DOPS eine zusätzliche negative Ladung trägt, während PC und DOPE auf Grund ihrer zwitterionischen Struktur ungeladen sind. In Kap. 4.3.4 konnte gezeigt werden, dass die Ladung und Art der flankierenden Aminosäuren den Flip von Phospholipiden beeinflusst. Durch Variation der liposomalen Zusammensetzung kann Aufschluss darüber gegeben werden, welchen Einfluss die Phospholipide auf die Phospholipidtranslokation ausüben. Das Phospholipid DOPE oder DOPS wurde dabei durch PC ersetzt. Die getesteten Liposomen bestanden somit aus PC/DOPS (4:1), PC/DOPE (4:1) oder reinem PC und beinhalteten jeweils 1 mol-% eines LV-Peptids (LV16-G8P9, LV16 oder L16).

In Abb. 21 A sind die Flip-Kinetiken von C₆NBD-PC in drei verschiedenen Liposomen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Sequenzspezifität für die C₆NBD-PC-Translokation beibehalten bleibt und nicht durch die Lipid-Zusammensetzung beeinflusst wird. Eine stärkere α -Helix-destabilisierende Peptidsequenz katalysiert höhere Flip-Werte (LV16-G8P9 > LV16 > L16), wie schon in Kap. 4.3.1 gezeigt. Im Vergleich der liposomalen Zusammensetzung zeigen sich jedoch Unterschiede im Flip nach 1 h und in der Flip-Geschwindigkeit für C₆NBD-PC. Aus Abb. 21 B geht hervor, dass die Eliminierung von DOPE aus der Standardmischung PC/DOPS/DOPE in einem etwa 40 % gesteigerten Flip resultiert. Im Gegensatz dazu führen Liposomen ohne DOPS zu einem ca. 20 % verminderten Flip, verglichen mit der ursprünglichen Lipidmischung. Reine PC-Liposomen wiesen eine zusätzliche Flip-Reduktion für alle drei Peptidsequenzen auf. Es wird deutlich, dass den Phospholipiden DOPE im Vergleich zu reinen PC-Liposomen und DOPS eine stimulierende Wirkung auf die Translokation von C₆NBD-PC zugeschrieben werden kann, wobei das negativ geladene DOPS einen viel stärkeren Effekt aufweist.

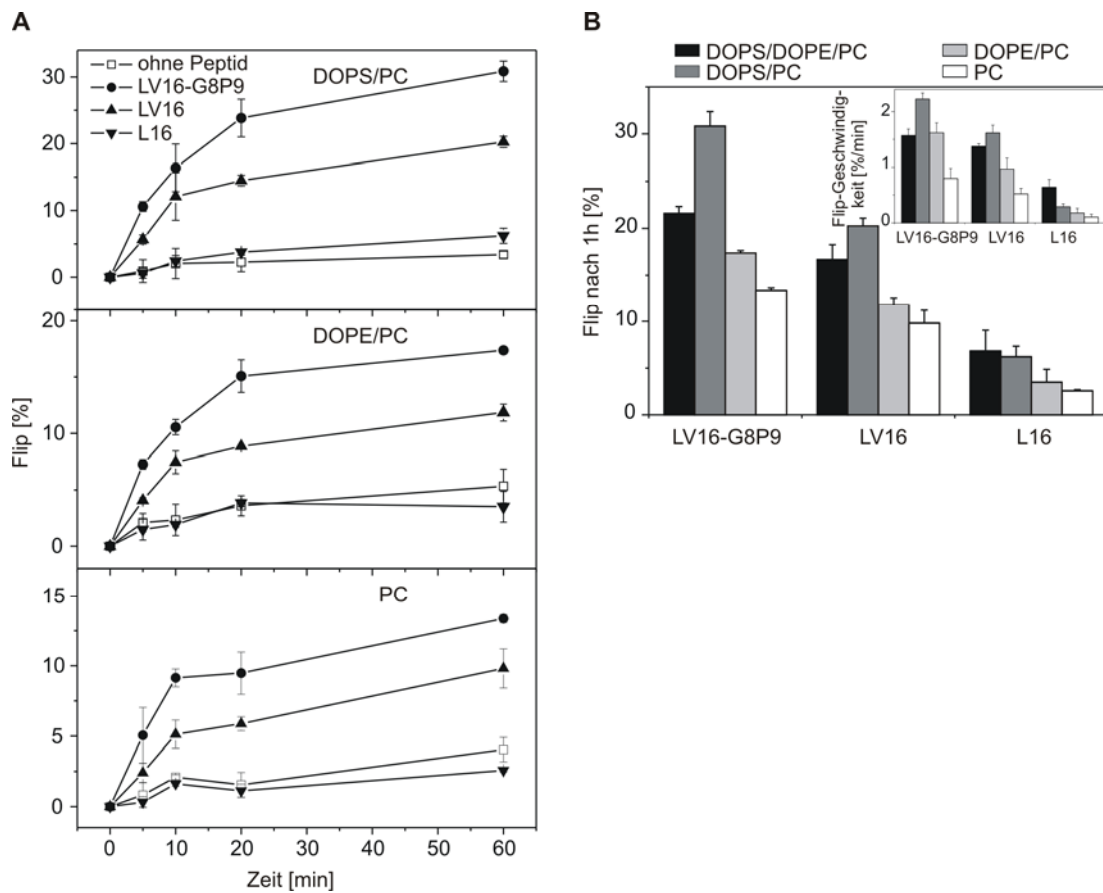


Abb. 21: Peptidinduzierter C_6 NBD-PC-Flip von LV-Peptiden. A, Flip-Kinetiken der Peptide in Liposomen aus PC/DOPS (4:1), PC/DOPE (4:1) und reinem PC. B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) der Kinetiken aus A sind zusammengefasst. Zum Vergleich ist der C_6 NBD-PC-Flip in PC/DOPS/DOPE-Liposomen (3:1:1) aus Kap. 4.3.1 dargestellt. Messpunkte stellen Mittelwerte dar \pm Standardfehler ($n = 3-5$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,0083 - 0,013$).

Im Folgenden sollen die Flip-Eigenschaften von C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE in Abhängigkeit der Peptidsequenz für Liposomen untersucht werden, welche das dem NBD-Analogen entsprechende Phospholipid (DOPS bzw. DOPE) nicht in der liposomalen Zusammensetzung enthalten.

Einfluss von DOPS auf den NBD-PS-Flip

Im vorherigen Kapitel erzielten die LV-Peptide bessere Flip-Werte für C_6 NBD-PC in Liposomen, die DOPS enthielten. Nun wurde überprüft, welchen Einfluss die Eliminierung von DOPS auf die Flip-Aktivität von LV-Peptiden für den C_6 NBD-PS-Flip hat. Die Liposomen ohne DOPS weisen eine neutrale Nettoladung auf, während das NBD-Analogen negativ geladen ist. Die aufgezeichnete Flip-Kinetik (Abb. 22 A) zeigt, außer für LV16-G8P9, ein viel geringeres Flip-Potential der Peptide. Im Vergleich zur Standardlipidmischung (Abb. 22 B) weisen LV16 und L16

einen über 50 % verminderten Flip nach 1 h auf. Hingegen konnte für die Peptidsequenz mit einem α -Helix-brechenden Aminosäurenpaar Gly/Pro (LV16-G8P9) sogar ein leichter Anstieg, sowohl im Flip nach 1 h, als auch in der Flip-Geschwindigkeit beobachtet werden.

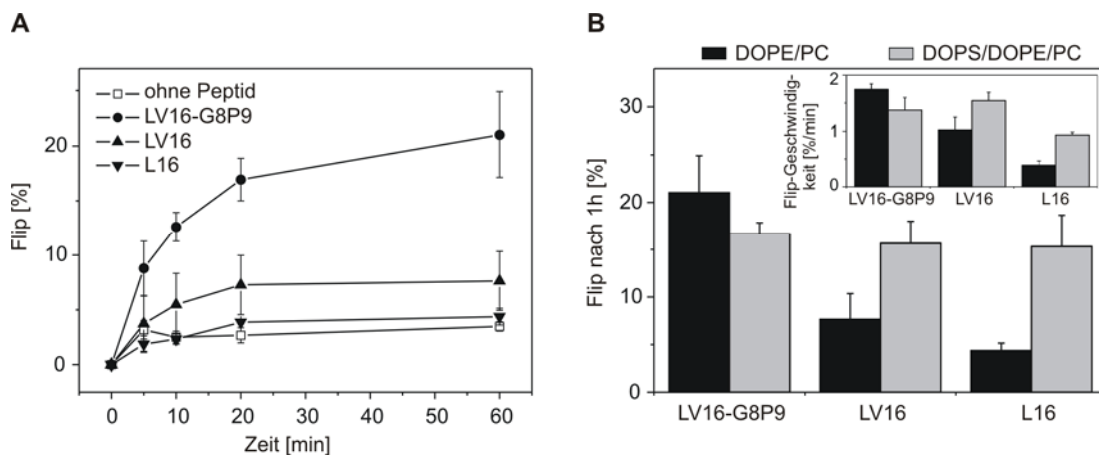


Abb. 22: Peptidinduzierter C_6 NBD-PS-Flip von LV-Peptiden. A, Flip-Kinetik der Peptide in Liposomen aus PC/DOPE (4:1). B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) der Kinetik aus A ist zum Vergleich mit dem C_6 NBD-PS-Flip in PC/DOPS/DOPE-Liposomen (3:1:1) aus Kap. 4.3.1 zusammengefasst. Messpunkte stellen Mittelwerte dar \pm Standardfehler ($n = 4$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,0087 - 0,01$).

Einfluss von DOPE auf den NBD-PE-Flip

Die Flip-Aktivität von LV-Peptiden wurde für die Translokation von C_6 NBD-PE in Liposomen überprüft, die kein DOPE beinhalten. In Abb. 23 A ist die peptidinduzierte Flip-Kinetik von C_6 NBD-PE in PC/DOPS-Liposomen (4:1) dargestellt. Alle Peptide zeigten ein sequenzspezifisches Potential Flip zu induzieren. Aus Abb. 23 B geht hervor, dass, außer für die Leu-Sequenz (L16), der C_6 NBD-PE-Flip für die getesteten Peptidsequenzen anstieg, wenn kein DOPE in der liposomalen Zusammensetzung enthalten war. Dabei war der Effekt größer, wenn die Instabilität der α -helikalen Konformation der Peptidsequenz zunahm (LV16-G8P9 > LV16). Eine α -helikale Leu-Sequenz (L16) zeigte, wie schon in Kap. 4.3.1, sehr hohe Flip-Werte für C_6 NBD-PE sowohl in PC/DOPS-Liposomen (4:1) als auch in PC/DOPS/DOPE-Liposomen (3:1:1).

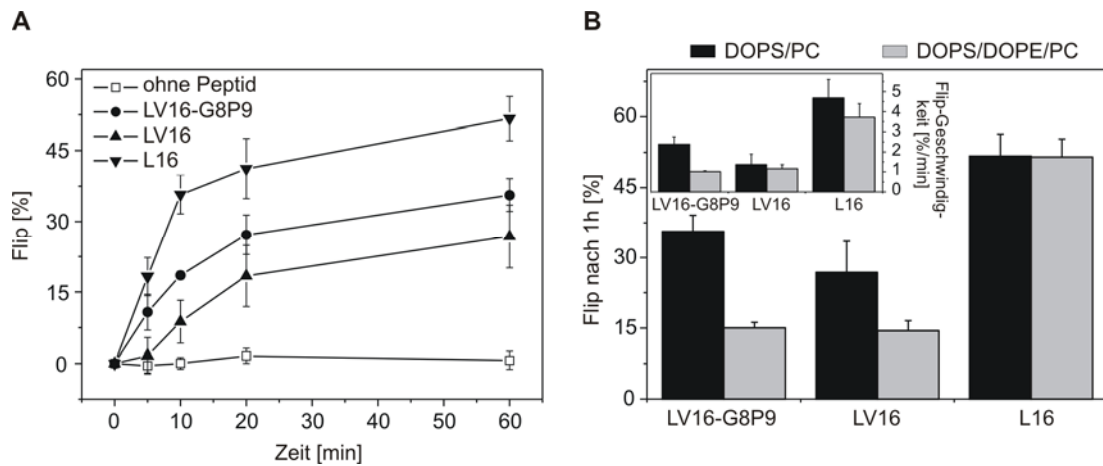


Abb. 23: Peptidinduzierter C_6 NBD-PE-Flip von LV-Peptiden. A, Flip-Kinetik der Peptide in Liposomen aus PC/DOPS (4:1). B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit (Inset) der Kinetik aus A ist zum Vergleich mit dem C_6 NBD-PE-Flip in PC/DOPS/DOPE-Liposomen (3:1:1) aus Kap. 4.3.1 zusammengefasst. Messpunkte stellen Mittelwerte dar \pm Standardfehler ($n = 4$ unabhängige Messungen, $P/L = 0,008 - 0,010$).

1.10 Einfluss elektrostatischer Interaktionen auf den Phospholipid-Flip

Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) besitzen eine negative Nettoladung, die durch das negativ geladene DOPS verursacht wird. Die in die Liposomen integrierten Peptide hingegen sind an den Termini durch die flankierenden Lys-Triplets positiv geladen. Elektrostatische Interaktionen der Peptide mit den Phospholipiden, vor allem mit dem negativ geladenen DOPS, sind auf Grund der unterschiedlichen Ladungsträger wahrscheinlich. Die Erhöhung der Salzkonzentration im Tris-HCl Puffer kann die elektrostatischen Wechselwirkungen in den Liposomen verändern, da sie eine Erhöhung der Ionenstärke bewirkt. Die Verwendung von Puffern mit variierender NaCl-Konzentration ermöglicht es, den Einfluss von elektrostatischen Interaktionen auf die peptidinduzierte Phospholipidtranslokation zu untersuchen. Die Flip-Aktivität von Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit 1 mol-% LV16 wurde für C_6 NBD-PC bei drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen überprüft. Zusätzlich erfolgte die Überprüfung, in welchem Ausmaß die NaCl-Konzentration im Puffer Auswirkungen auf die Fusion solcher Liposomen hat.

In Abb. 24 A sind die Kinetiken für den Flip von C_6 NBD-PC und der Liposomenfusion in Puffern mit Salzkonzentrationen von 150 mM, 300 mM und 600 mM NaCl aufgezeigt. In beiden Versuchen, die mit 1 mol-% LV16 durchgeführt wurden, konnte keine Abhängigkeit bezüglich der Salzkonzentration beobachtet werden. Der Vergleich des Flips nach 1 h und der Flip-Geschwindigkeit für C_6 NBD-PC in Abb. 24 B verdeutlicht nochmal, dass die Flip-Werte vom Salzgehalt im Puffer nicht beeinflusst worden sind.

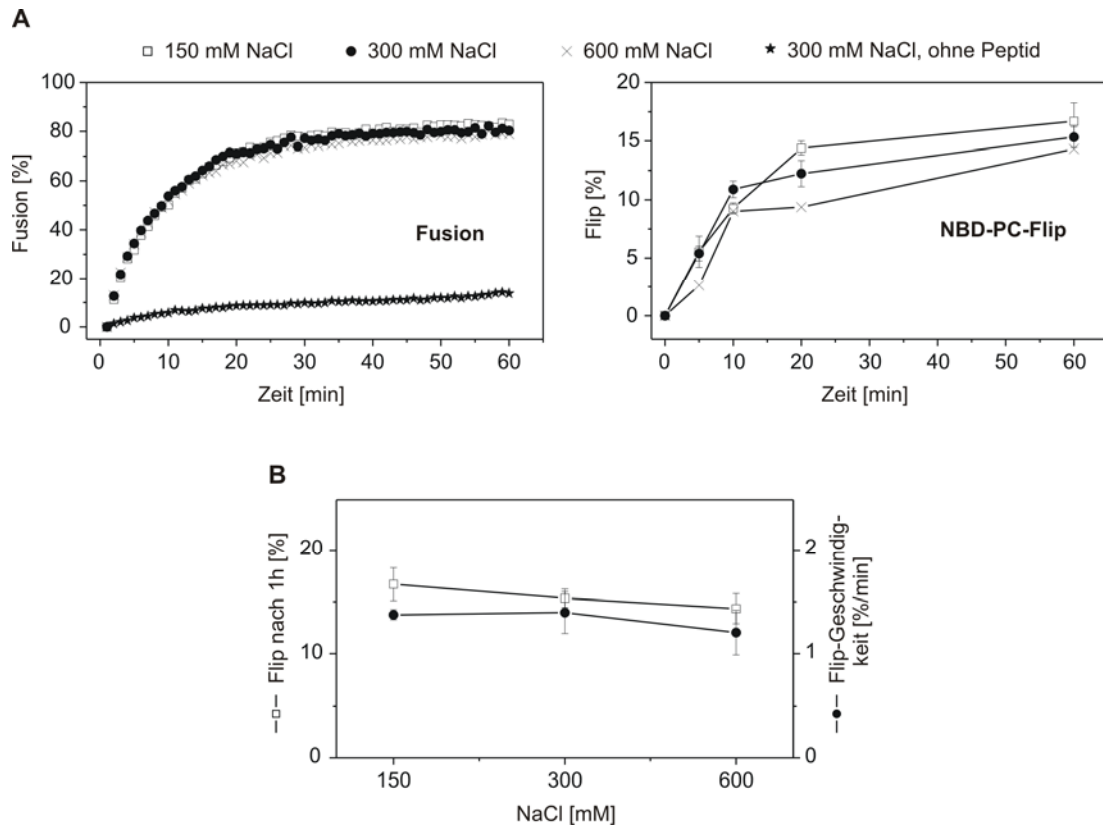


Abb. 24: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die peptidinduzierte Liposomenfusion und den Flip von C₆NBD-PC. A, gemittelte Fusions- und C₆NBD-PC-Flip-Kinetik mit LV16 (1 mol-%) bei unterschiedlichem Gehalt an NaCl (150 mM, 300 mM und 600 mM). B, der Flip nach 1 h bzw. die initiale Flip-Geschwindigkeit der Flip-Kinetik aus A. Die Messpunkte stellen Mittelwerte dar ± Standardfehler (n = 3 unabhängige Messungen P/L = 0,009 – 0,011).

1.11 Messung der DTN-Bleichgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Peptidsequenz

Es wurde weiterhin versucht zu klären, ob es eine sequenzabhängige Interaktion mit den Phospholipidanaloga bzw. den Membranlipiden gibt, die Rückschlüsse auf das Flip-Verhalten der Peptidsequenz geben kann. Es ist bekannt, dass sich bei einem C₆-NBD-Phospholipid die markierte kurze Acylkette hauptsächlich in hydrophileren Membranbereichen (Phosphoglycerol-Bereich) lokalisiert [88, 89]. Dadurch ist es möglich mittels DTN die NBD-Gruppe in der äußeren Membranschicht zu bleichen. Es wurde im Folgenden überprüft, ob eine membranintegrale Peptidsequenz die Zugänglichkeit des NBD-Moleküls für DTN verändert, die möglicherweise in Beziehung mit dem peptidinduzierten Flip steht. Es wurde deshalb die Bleichgeschwindigkeit von DTN für C₆NBD-PC und C₆NBD-PS in Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit 1 mol-% LV16 oder L16 ermittelt. Die DTN-Konzentration wurde von standardmäßigen 15 mM auf 8 mM reduziert, um dadurch den Reaktionsprozess zu verlangsamen. Der erhaltene Wert stellt ein Maß

für die Zugänglichkeit von DTN zur NBD-Gruppe dar. In Abb. 25 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

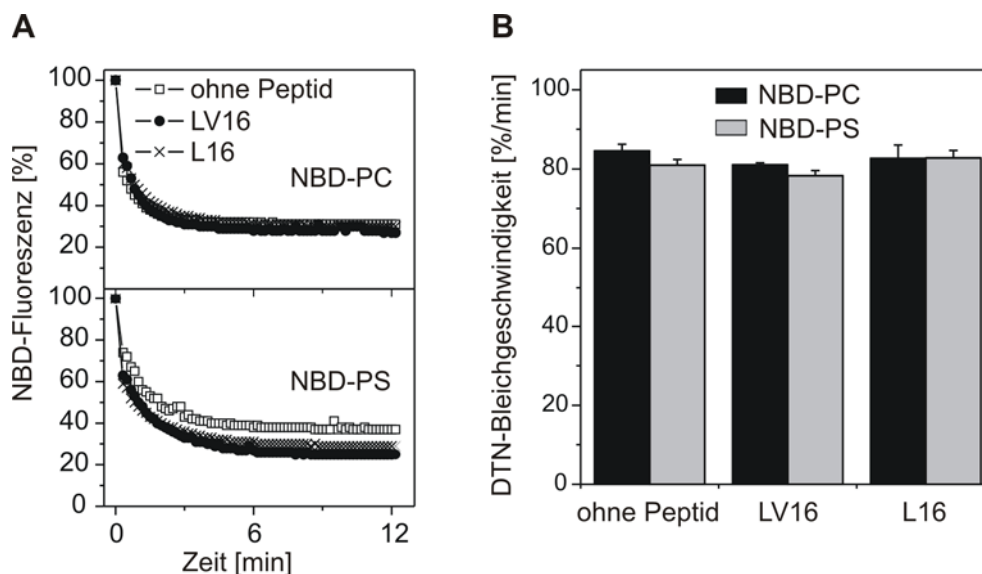


Abb. 25: Einfluss der Peptidsequenz LV16 und L16 auf die DTN-Bleichung von NBD-markierten Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1). A, Bleich-Kinetik von C_6 NBD-PC- und C_6 NBD-PS-markierten Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit LV16, L16 (jeweils 1 mol-%) und ohne Peptid. Es zeigt sich nach Zugabe von 8 mM DTN ($t > 0$ min) eine schnelle Reaktion von C_6 NBD-PC und C_6 NBD-PS in ein nicht fluoreszierendes Derivat. Nach etwa 5 min stellt sich ein stabiles Plateau mit einer verbleibenden Fluoreszenz von etwa 35 % ein. Die mittleren Fluoreszenzwerte (Mittelwert \pm Standardfehler; $n = 3$ P/L = 0,0082 – 0,0098) wurden normalisiert (- DTN = 100 %). B, ermittelte DTN-Bleichgeschwindigkeit der Kinetiken aus A.

Die Bleich-Kinetik für C_6 NBD-PC und C_6 NBD-PS mit und ohne Peptid zeigen ein stabiles Plateau bei etwa 35 % verbleibender NBD-Fluoreszenz nach weniger als 5 min Inkubation mit DTN (Abb. 25 A). Für C_6 NBD-PS in Liposomen ohne Peptid lag das Plateau etwas höher. Die Liposomen sind demzufolge über dem Messzeitraum stabil und nicht permeabel für DTN. Für die in Abb. 25 B zusammengefassten Bleichgeschwindigkeiten wurden die ersten 6 min der aufgezeichneten Bleich-Kinetik mittels des Programms Origin gefittet und die erste mathematische Ableitung gebildet. Der ermittelte Wert nach 1 min wurde zum Vergleich herangezogen. Liposomen mit integralen Peptidsequenzen zeigen keine signifikanten Unterschiede zu peptidfreien Liposomen. DTN bleicht nach 1 min etwa 80 % der C_6 NBD-PC- und C_6 NBD-PS-Moleküle, die in der äußeren Schicht lokalisiert sind. Die Zugänglichkeit der C_6 NBD-Acyllkette für DTN in den Liposomen wird weder durch die Kopfgruppe der Phospholipidanaloga noch durch eine Peptidsequenz merklich beeinflusst.

1.12 Einfluss von LPC und Cholesterol auf den Phospholipid-Flip

Die Fusion zweier Membranen verursacht eine Umorientierung der Lipide in den Membranschichten. Der Mechanismus, der diesem Prozess zu Grunde liegt, ist noch nicht geklärt. Es wurde vermutet, dass während der Membranfusion der Transfer von Lipiden aus der äußeren in die innere Membranschicht erfolgt [52]. In welchem Ausmaß Flip-Flop für die Verteilung der Lipide verantwortlich ist, bleibt jedoch noch zu klären. Im Folgenden soll untersucht werden, welcher Zusammenhang zwischen Membranfusion und Phospholipid-Flip besteht. Es wurde dafür die peptidinduzierte Liposomenfusion durch Lysophosphatidylcholin (LPC) inhibiert und anschließend mit Flip-Daten verglichen, die ebenfalls nach Zugabe von LPC ermittelt wurden. Danach wurde versucht, den Phospholipid-Flip von C₆NBD-PC durch Zugabe von Cholesterol zu blockieren und anschließend mit Fusionsdaten aus Versuchsreihen verglichen, die ebenfalls Cholesterol in den Liposomen enthielten. Die Messung der Flip-Aktivität und der Membranfusion erfolgte in Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit LV16, Syx-wt oder Syb-wt (0,5 mol-% - 1 mol-%).

Auswirkungen von LPC auf die Liposomenfusion und den Phospholipid-Flip

LPC ist ein Lysolipid und besitzt nur eine Acylkette in seiner Struktur (Abb. 26). Dadurch ist der Kopfbereich des Moleküls im Vergleich zur seiner Acylkettenregion größer und bevorzugt eine positive Krümmung. Während der Fusion zweier Membranen wird angenommen, dass sich ein Lipid-„Stalk“ ausbildet (Abb. 6, Kap. 1.2.2), wobei sich die äußeren aber nicht die inneren Membranschichten vermischen. Die Ausbildung dieser Übergangstruktur benötigt eine negative Krümmung der äußeren Membranschicht. Der Einbau von LPC in die äußere Schicht blockiert demzufolge den Fusionsvorgang. Es wurde in Studien gezeigt, dass die Inhibierung der Fusion durch LPC reversibel und konzentrationsabhängig ist [77, 99].

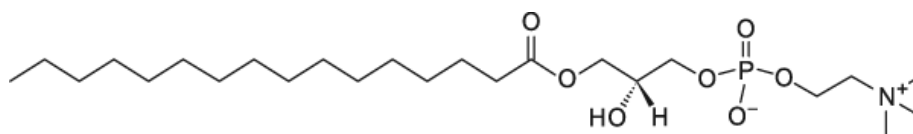


Abb. 26: Struktur von Lysophosphatidylcholin.

Es wurde der Einfluss von LPC auf die Liposomenfusion und auf den Phospholipid-Flip untersucht, um Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden Mechanismen zu treffen.

Liposomenfusion

Durch Integration von LPC in die äußere Membranschicht von Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) sollte gezeigt werden, ab welcher LPC-Konzentration die, durch das Peptid LV16 induzierte Fusion vollständig blockiert wurde. Es wurde 1 mol-% Peptid verwendet und nach Herstellung der Liposomen nominal 3 mol-%, 8 mol-% oder 20 mol-% LPC eingesetzt und in die äußere Membranschicht eingebaut. In Abb. 27 sind die erhaltenen Fusions-Kinetiken gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass LPC die Liposomenfusion durch LV16 in konzentrationsabhängiger Weise hemmt. 8 mol-% LPC reduziert die Fusion um mehr als 30 %, während 20 mol-% LPC die Fusion fast vollständig blockiert.

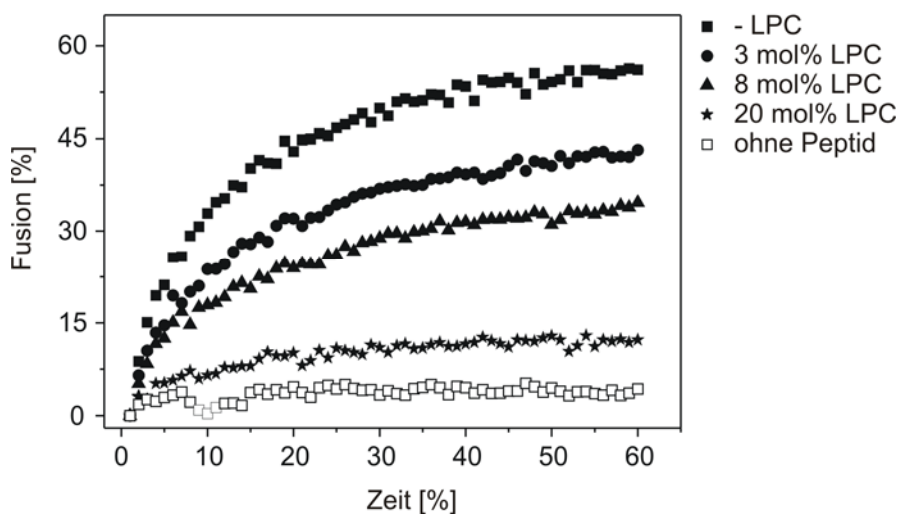


Abb. 27: Einfluss von LPC auf die peptidinduzierte Fusion für LV16 (1 mol-%). Die gemittelte Fusions-Kinetiken ($n = 4$, $P/L = 0,0087 - 0,0112$) für Liposomen mit unterschiedlichem LPC-Gehalt (3 mol-%, 8 mol-%, 20 mol-%) sind gezeigt.

Phospholipid-Flip

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass 20 mol-% LPC einen stark hemmenden Einfluss auf die Liposomenfusion hat. Es wurde in Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) überprüft, welchen Effekt diese LPC-Konzentration auf den peptidinduzierten Flip von C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE ausübt. Liposomen mit 1 mol-% der Peptide LV16-G8P9, LV16 und L16 wurden getestet und mit Flip-Daten verglichen, die in Abwesenheit von LPC ermittelt wurden. Abb. 28A zeigt die Flip-Kinetiken von C_6 NBD-PC, C_6 NBD-PS und C_6 NBD-PE mit 20 mol-% LPC. Es zeigen sich die gleichen Sequenzabhängigkeiten für C_6 NBD-PC und C_6 NBD-PE, die schon in Kap. 4.3.1 ermittelt wurden. Im Fall des C_6 NBD-PS-Flips, der ohne LPC sequenzunspezifisch ist (vergl. Abb. 14), konnte hier eine Abhängigkeit bezüglich der Peptidsequenz festgestellt werden.

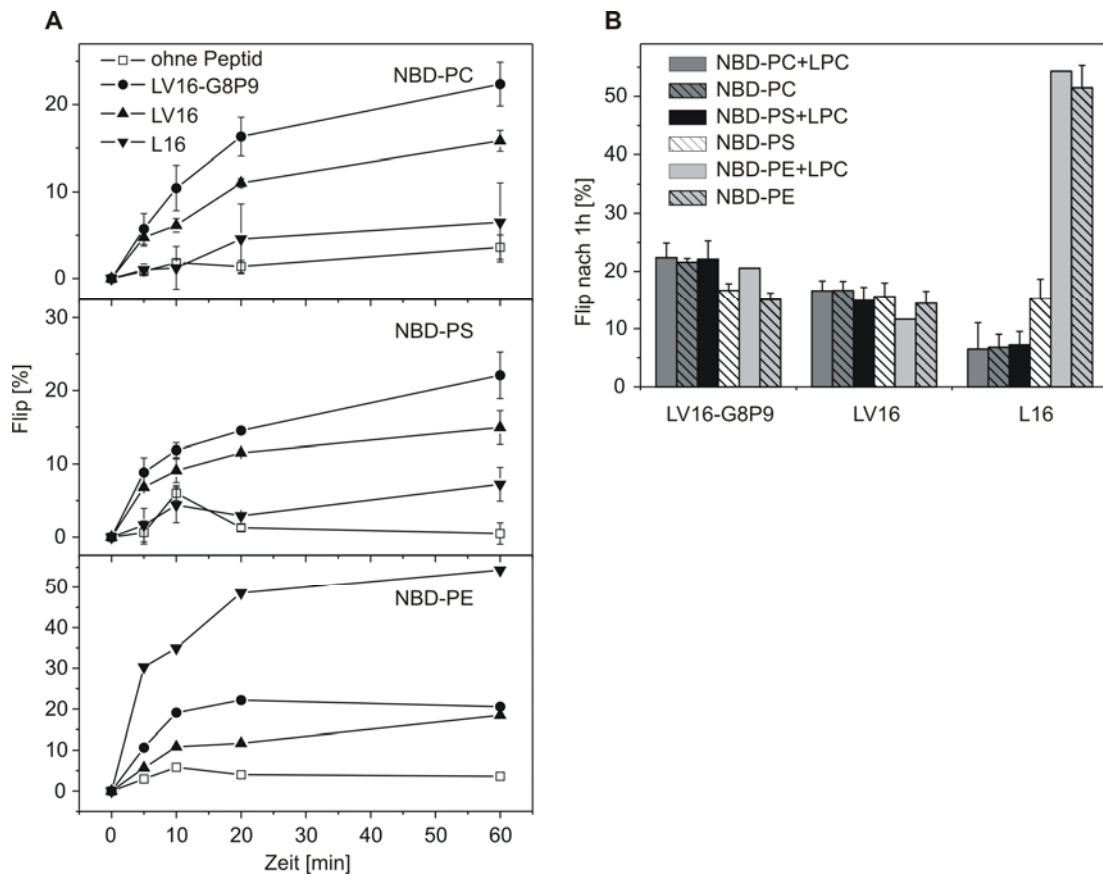


Abb. 28: Einfluss von LPC auf den peptidinduzierten Flip von LV-Peptiden. A, Flip-Kinetik der Peptide für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in Liposomen mit 20 mol-% LPC. B, der Flip nach 1 h der Kinetiken aus A ist zum Vergleich mit dem Flip in LPC-freien Liposomen aus Kap. 4.3.1 zusammengefasst. Messpunkte stellen Mittelwerte dar ± Standardfehler (n = 1-3 unabhängige Messungen, P/L = 0,009 – 0,013).

Aus Abb. 28 B ist ersichtlich, dass die α -helikale L16-Sequenz signifikant in ihrem C₆NBD-PS Flip-Potential gehemmt wird, wenn LPC in der Liposomenmembran vorhanden ist. Ansonsten ergeben sich kaum Unterschiede im Flip nach 1 h mit oder ohne Integration von LPC. Die LPC-hemmende Wirkung für die Liposomenfusion konnte nicht für die Translokation von Phospholipidanaloga festgestellt werden. Die resultierenden Flip-Ereignisse sind von der Fusion unabhängig, also nicht Resultat der Lipidvermischung.

Auswirkungen von Cholesterol auf den Phospholipid-Flip und die Liposomenfusion

Cholesterol ist Bestandteil der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen. Es ist bekannt, dass die Phospholipidtranslokation dort nur aktiv durch Flippasen/Floppasen bzw. in Ca²⁺-abhängiger Weise durch Sramblasen katalysiert werden kann. Dem entgegen ist im ER eine sehr geringe Cholesterolkonzentration zu verzeichnen und der Transport der Phospholipide erfolgt ohne Energiezufuhr durch erleichterte Diffusion mittels membranintegraler Proteine. In

Modellmembranen aus DOPC zeigte Cholesterol einen hemmenden Effekt auf den peptidinduzierten Flop [74]. Es wurde versucht durch den Einbau von Cholesterol in Liposomen den peptidinduzierten Flip zu inhibieren und anschließend das fusogene Potential solcher Liposomen zu beobachten, um Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Flip und Fusion zu ziehen. In synaptischen Vesikeln beträgt der Cholesterolanteil etwa 40 mol-% [100]. Auf Basis dieses Ergebnisses wurde für die Versuche ein Cholesterolgehalt in den Liposomen von 20 mol-% und 40 mol-% gewählt. Die Flip-Aktivität für C₆NBD-PC und die fusogenen Eigenschaften wurden für die synaptischen SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt, sowie für eine LV16-Sequenz untersucht.

Phospholipid-Flip

In Liposomen wurden 20 mol-% oder 40 mol-% Cholesterol eingebaut und Flip von C₆NBD-PC für 1 mol-% Syx-wt, Syb-wt und LV16 getestet. In Abb. 29 A sind die Flip-Kinetiken für die drei Peptide zusammengefasst.

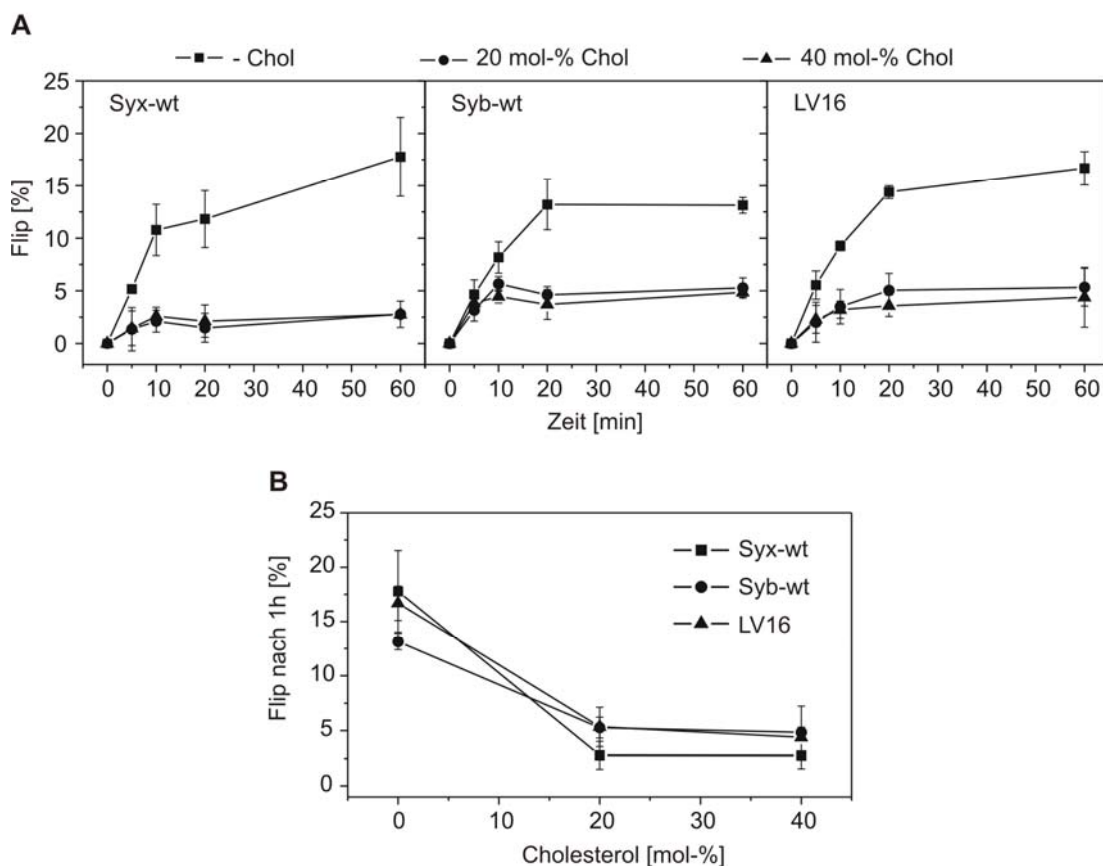


Abb. 29: Einfluss von Cholesterol auf den peptidinduzierten Flip der SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt sowie dem LV-Peptid LV16. A, Flip-Kinetik der Peptide für C₆NBD-PC, in Liposomen mit 0 mol-%, 20 mol-% und 40 mol-% Cholesterol. B, der Flip nach 1 h von den Kinetiken aus A. Messpunkte stellen Mittelwerte dar \pm Standardfehler (n = 3 unabhängige Messungen P/L = 0,0084 – 0,011).

Es zeigt sich, dass beide Cholesterolkonzentrationen den Flip durch die drei Peptidsequenzen fast vollständig inhibieren. Der Flip nach 1 h (Abb. 29 B) sinkt auf unter 5 %.

Liposomenfusion

Es wurde getestet, welche Auswirkungen der Flip-inhibierende Effekt von Cholesterol auf die Liposomenfusion hat. Hierfür wurden Liposomenspezies wie in Kap. 4.7.2.1 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass nur 0,5 mol-% Peptid in die Liposomen integriert wurden. Die in Abb. 30 A dargestellten Fusions-Kinetiken zeigen, dass die SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt fusogener sind als LV16.

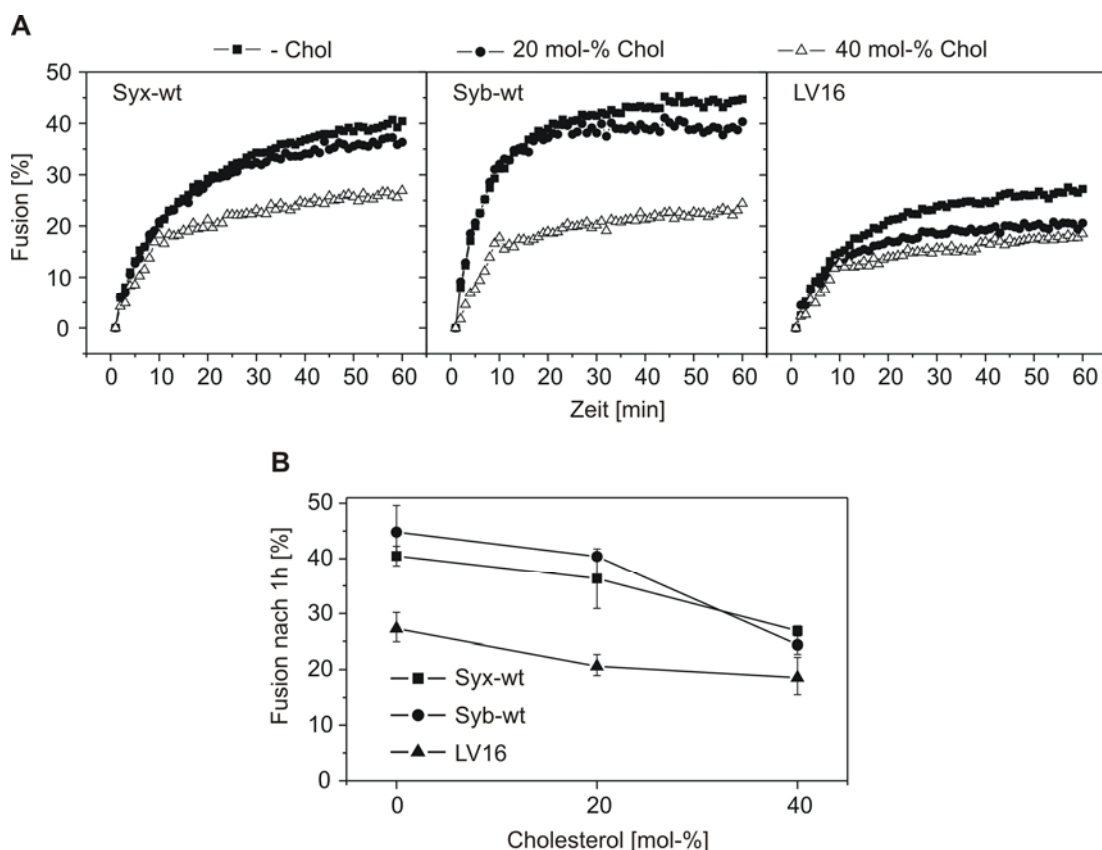


Abb. 30: Einfluss von Cholesterol auf die peptidinduzierte Fusion der SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt sowie dem LV-Peptid LV16. A, gemittelte Fusions-Kinetik der Peptide in Liposomen mit 20 mol-%, 40 mol-% und ohne Cholesterol. B, die Fusion nach 1 h von den Kinetiken aus A. Messpunkte stellen Mittelwerte dar \pm Standardfehler (n = 3-4 unabhängige Messungen, P/L = 0,0085 – 0,01).

Die Fusionsereignisse nach 1 h (Abb. 30 B) sind für die LV16-Sequenz um etwa 35 % geringer als für die beiden SNARE-Peptide. Der Einbau von 20 mol-% Cholesterol in die Liposomen zeigt eine geringe Hemmung der Fusogenität für die SNARE-Peptide. Der Effekt für LV16 ist jedoch etwas stärker. Eine Verdopplung des Cholesterolgehaltes vermindert die Fusion um ca. 35 % - 45 %

abhängig von der Peptidsequenz. Im Gegensatz zum C₆NBD-PC-Flip, der fast vollständig durch Cholesterol blockiert wurde, lässt sich für die Liposomenfusion eine konzentrationsabhängige Inhibierung durch Cholesterol feststellen. Die Fusion wird durch 40 mol-% Cholesterol jedoch nicht vollständig gehemmt.

Diskussion

1.13 Flip-Eigenschaften von Modellpeptiden

Zur Aufklärung des Mechanismus mit dem Peptide die Lipidtranslokation vermitteln wurden in dieser Arbeit kurze Modellpeptide bezüglich ihrer Flip-Eigenschaften charakterisiert. Die verwendeten LV-Peptide stellen ein einfaches System zur Bestimmung der strukturellen Voraussetzungen einer membrandurchspannenden α -Helix dar, um den Phospholipidtransfer zu ermöglichen. Bisher konnte anhand dieser Peptide gezeigt werden, dass eine Struktur-/Funktionsbeziehung hinsichtlich ihrer konformationellen Flexibilität, α -Helixdynamik und Fusogenität vorliegt. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten der Zusammenhang von struktureller Flexibilität und der Flip-Aktivität der Peptide, sowie die Rolle von Flip während der Liposomenfusion überprüft werden. Es wurden daher ähnliche Liposomenzusammensetzungen und Peptid/Lipid-Verhältnisse gewählt, die schon in Fusionsexperimenten, CD-Spektroskopie und D/H-Austausch-Experimenten verwendet wurden, um einen einfachen Vergleich der verschiedenen Parameter zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde das Flip-Potential von membrandurchspannenden Peptiden mittels Bleichen der NBD-Fluorophore in der äußeren Membranschicht durch DTN ermittelt. Hierfür musste gewährleistet sein, dass DTN während der Aufnahme der Flip-Kinetik nicht zugänglich für die Fluorophore war, die sich in der inneren Schicht der Membran lokalisierten. Die Untersuchung an beidseitig NBD-markierten Liposomen mit einer integralen Peptidsequenz konnte bestätigen, dass nach Behandlung mit DTN nur die äußeren, nicht aber die inneren NBD-Moleküle, zugänglich für DTN waren, da nach etwa 3 min ein stabiles Plateau erkennbar war, das über den Messzeitraum stabil blieb. Die Methode konnte demzufolge für weitere Experimente genutzt werden.

Flexibilität der hydrophoben Kernsequenz und Phospholipid-Flip

Die Flip-Aktivität wurde für zwei verschiedenartige Modellpeptide untersucht. Zum einen wurden LV-Peptide betrachtet, deren hydrophobe Domänen aus den beiden Aminosäuren Leucin und Valin aufgebaut waren und zum anderen wurden Peptidsequenzen untersucht, die den TMDn von SNARE-Proteinen entsprachen. Die Peptide waren für eine erleichterte Integration in die Membran durch Lys-Triplets flankiert. Zunächst wird die Flip-Aktivität der LV-Peptide diskutiert. Die Ergebnisse für die SNARE-Peptide sollen im Zusammenhang mit der Rolle von Flip in der Membranfusion erörtert werden.

Der Einfluss der Primärstruktur von Modellpeptiden auf den Flip von drei verschiedenen C₆NBD-Phospholipidanaloga wurde charakterisiert. Hierfür wurden zunächst Peptide mit einer hydrophoben Kernsequenz von 16 Aminosäuren in liposomale Membranen inkorporiert und

untersucht. Der Vergleich zwischen alternierenden LV-Sequenzen unterschiedlicher Länge sowie einer LV16-Sequenz mit N-terminaler Acylierung erfolgte im Anschluss.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Flip-Effizienz von C₆NBD-PC und C₆NBD-PE, aber nicht C₆NBD-PS, entscheidend von der Primärstruktur des hydrophoben Kerns der Peptide abhängt. Der PC-Flip steigt in der Rangordnung L16 < LLV16 < LV16 < LV16-G8P9 an, während C₆NBD-PE eine umgekehrte Reihenfolge aufweist. Bemerkenswert ist, dass LV16 und LV16-G8P9 ähnliche Flip-Effizienzen für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS, und C₆NBD-PE mit etwa 15 % - 20 % Flip nach 1 h zeigen, während L16 und LLV16 den PE-Flip viel stärker als den PC-Flip katalysieren. Eine ausschließlich Leucinen bestehende Sequenz hat kaum Potential die Translokation von C₆NBD-PC voranzutreiben, während ihr induzierter PE-Flip über 50 % beträgt. Die beobachtete Kopfgruppenspezifität steht möglicherweise im Zusammenhang mit den strukturellen Eigenschaften dieser Peptidsequenzen. In einer jüngsten Studie [86] wurde die α -Helixdynamik von LV-Peptiden mittels D/H-Austausch-Kinetiken charakterisiert. Sie beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der intrahelikale Wasserstoffbrücken vorübergehend gebrochen werden. Das Öffnen und Schließen dieser intramolekularen Wasserstoffbrücken dient als Maß für die α -Helixdynamik der Peptide. Die experimentellen Daten konnten auch durch computersimulierte Molekulardynamik bestätigt werden [101]. In Abb. 31 ist eine Zusammenfassung der α -helikalen Dynamik für die LV-Peptide graphisch dargestellt. Die Strukturen wurden durch molekulare Dynamiksimulationen produziert und sind farblich bezüglich der Stabilität ihrer lokalen α -helikalen Wasserstoffbrückenbindungen, markiert. Es wird deutlich, dass mit erhöhtem Val-Anteil und dem Einbau eines Gly/Pro-Paares, eine zunehmende Abweichung der α -Helikalität und eine steigende Bewegung des Peptid-Rückgrads zu beobachten sind.

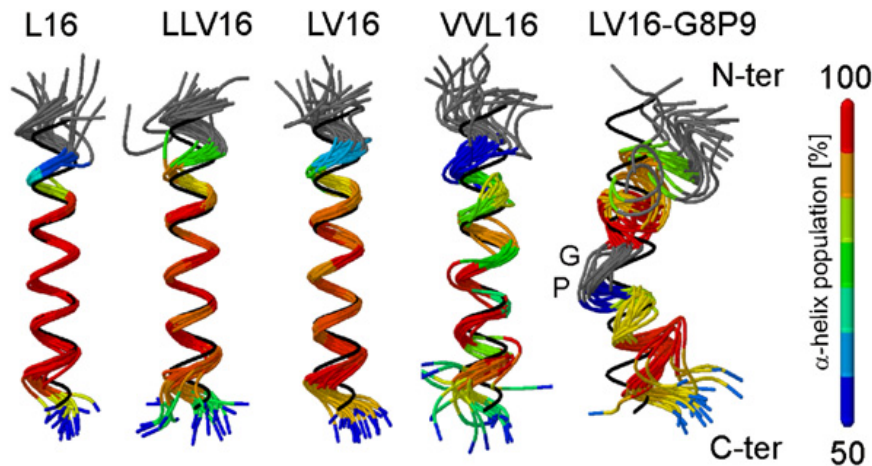


Abb. 31: Graphische Darstellung der Dynamik von LV-Peptiden. Eine ideale starre α -Helix ist in schwarz aufgezeigt. Die farbliche Markierung gibt den durchschnittlichen Bestand der α -helikalen Wasserstoffbrückenbindungen an. Es zeigt sich eine deutliche Änderung der α -Helikalität und Fluktuation mit ansteigendem Val-Anteil oder durch Einbringen eines Gly/Pro-Paares. Abbildung verändert nach [101].

Im Vergleich dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Peptide mit geringer Kopfgruppenspezifität (LV16, LV16-G8P9) eine stärkere α -Helixdynamik aufweisen, als solche Peptide mit erhöhter Flip-Aktivität für PE (L16, LLV16). Obgleich die Zahl der untersuchten Fälle hier sehr begrenzt ist, ist diese Korrelation kompatibel damit, dass die Dynamik des α -Helixstrangs die Effizienz beeinflusst, mit der die Peptide mit den verschiedenen Kopfgruppen interagieren und demzufolge die Flip-Aktivität modifiziert.

Im Fall der Peptidsequenz LV16-G8P9 beträgt der α -helikale Anteil in liposomalen Membranen jedoch nur 20 %, während die β -Faltblattkonformation dominiert [86, 102]. In diesem Fall scheint der geringe Anteil hoch dynamischer α -Helices zum Flip beizutragen. Kol [34] behaupten ebenfalls in ihrem Slip-Pop-Modell, dass die α -Helices der TMDn den Phospholipid-Flip-Flop ermöglichen. Die Phospholipidtranslokation benötigt vermutlich auch keine transmembran liegende α -Helix, da für LV16-G8P9 angenommen wird, dass sich diese Peptidsequenz über ein Schleifen-Motiv nur in eine Schicht der Membran integriert, sodass beide Peptidenden in eine Richtung gestreckt werden [84].

Die Kopfgruppenspezifität von peptidinduziertem Lipid-Flop wurde schon durch Killian und Mitarbeiter in früheren Studien untersucht. Sie verwendeten XALP-Peptide mit einem aus alternierenden Leu- und Ala-Resten aufgebauten hydrophoben Kernbereich, der durch die Aminosäuren Lysin, Histidin oder Tryptophan flankiert war. Die Flop-Aktivität dieser Peptide nimmt in der Reihenfolge PG > PE >> PS ab und war nicht detektierbar für PC [74]. Keines der XALP-Peptide konnte daher die Translokation von PC katalysieren, wie sie in der vorliegenden Arbeit für LV16 und LV16-G8P9 festgestellt wurde. Die Ergebnisse für XALP-Peptide stimmen

mit der ermittelten Flip-Aktivität für die starren, α -helikalen L16- und LLV16-Sequenzen überein. Demzufolge könnte die beobachtete Kopfgruppenabhängigkeit für die XALP-Peptide auf ein starres α -Helix-Rückgrad zurückzuführen sein.

Die membranintegralen Modellpeptide sind grundsätzlich in der Lage über ihre flankierenden Lys-Reste und dem hydrophoben Peptidkern mit den Lipiden in der Membran zu interagieren. Molekulardynamik-Studien haben vorgeschlagen [103, 104], dass die positiven polaren Seitenketten der Lysine durch elektrostatische Wechselwirkungen und Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Kopfgruppen, den Phosphaten sowie den Carbonylen der Lipide wechselwirken können. Zusätzlich kann das Rückgrad einer teilweise ungefalteten α -Helix Wasserstoffbrücken mit Lipiden ausbilden [104].

Wenn die α -Helixdynamik eine entscheidende Rolle bezüglich der Kopfgruppenspezifität für den Flip spielt, ist es denkbar, dass eine direkte α -Helix-Lipid-Interaktion dafür verantwortlich ist. Durch den Einfluss der flankierenden Aminosäuren, die sich an die Lipide binden, wird zusätzlich die Peptid-Lipid-Wechselwirkung modifiziert. Bei flexiblen Peptiden kommt es zu lokalen Öffnungen von Wasserstoffbrücken, d.h. sie bieten vorübergehend Bindungsstellen an, die mit Lipiden in Wechselwirkung treten könnten. Molekulardynamik-Studien mit anderen membranintegralen Peptiden lassen darauf schließen, dass Peptid-Lipid-Wechselwirkungen maßgeblich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Haupt- und Seitenketten der Moleküle beeinflusst werden [103, 104]. Es wäre denkbar, dass die PE-Kopfgruppe mit einem flexiblen Peptidkern Wasserstoffbrücken ausbildet und somit stärker an das Peptid gebunden ist. Als Konsequenz würde der Membrandurchtritt von C_6 NBD-PE gehemmt und hohe Flip-Werte werden erst durch wenig flexible Peptide ermöglicht, da die Peptid-Lipid-Bindung in diesem Fall nicht mehr so stark ist bzw. aufgehoben wird. Zusätzlich könnte eine starre Leu-Sequenz genügend lokale Defekte in der Membran für die Translokation von C_6 NBD-PE hervorrufen. Dafür spricht, dass C_6 NBD-PE eine intrinsische Tendenz auf Grund der kegelförmigen Molekülstruktur besitzt, sich bevorzugt in die innere Membranschicht zu integrieren. Durch den lateralen Druck auf die äußere Schicht und die kleine Kopfgruppe wird die Möglichkeit zum peptidinduzierten Transfer begünstigt und resultiert in eine hohe Flip-Effizienz [74]. Folglich wäre für den PE-Flip die Anwesenheit eines transmembranen Peptids ausreichend und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit flexiblen Peptidsequenzen der inhibierende Faktor. C_6 NBD-PC besitzt im Gegensatz zu C_6 NBD-PE eine große, positiv geladene Kopfgruppe die nicht in der Lage ist, Wasserstoffbrücken mit flexiblen Peptiden auszubilden. Folglich kann es nicht auf gleiche Weise wie PE mit flexiblen Peptidsequenzen in Wechselwirkung treten. Eine dynamische α -Helix ist zudem tendenziell hydrophiler und könnte für C_6 NBD-PC als „Rutsche“ durch den hydrophoben Membranbereich dienen. Gleichzeitig ist es denkbar, dass kooperative Effekte von DOPE und DOPS in der Lipidzusammensetzung den PC-Flip begünstigen, indem sie

stärker mit flexibleren Peptidsequenzen interagieren und Platz für die C₆NBD-PC Kopfgruppe schaffen, um in den hydrophoben Membranbereich einzutauchen.

Für den PS-Flip zeigten alle untersuchten Peptidsequenzen ähnlich gute Flip-Aktivitäten von etwa 15 % Flip. Demzufolge ist die Integration eines Peptids für die Translokation von C₆NBD-PS ausreichend, unabhängig von der α -Helixdynamik. Es ist wahrscheinlich, dass die zusätzliche negative Ladung an der Kopfgruppe diesen Effekt begünstigt.

Neben der Variation des Leu/Val-Verhältnisses im hydrophoben Kern sollte zusätzlich der Effekt der hydrophoben Länge einer Peptidsequenz untersucht werden. Auf Basis einer alternierenden Leu/Val-Sequenz wurden Peptide mit einer hydrophoben Länge von 12 und 24 Aminosäuren betrachtet. Dabei zeigte die Länge der hydrophoben Kernsequenz ebenfalls eine Abhängigkeit bezüglich der Kopfgruppenspezifität. Für die kurze LV12 Variante zeigt sich ein tendenziell höheres Ausmaß an Flip für C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE im Vergleich zur längeren LV16-Sequenz. Eine mögliche Ursache für die erhöhte Flip-Aktivität könnte die β -Faltblattstruktur von LV12 darstellen. In einer früheren Arbeit [84] wurde mittels CD-Spektroskopie gezeigt, dass LV12 zwar in apolaren Lösungen eine stabile α -Helix ausbildet, in liposomalen Membranen jedoch gezwungen wird sich in Form eines β -Faltblatts durch die Membran zu strecken. Wie schon für LV16-G8P9, kann auch hier nicht geklärt werden, in wie weit die β -Faltblattkonformation neben dem verbleibenden α -Helixanteil von 20 % zu erhöhtem Flip beiträgt. Im Unterschied zum Flip-Ausmaß war die anfängliche Geschwindigkeit für die Lipidtranslokation für LV12 geringer als für LV16. Das deutet darauf hin, dass die Unterschiede im Flip bei späten Zeiten angeglichen werden. Weiterhin sind die ermittelten Flip-Werte bei früheren Zeitpunkten (5 min, 10 min und 20 min) genauer, da sie die Schnelligkeit widerspiegeln, mit der anfängliche Flip-Ereignisse auftreten. Das würde heißen, dass LV12 zwar das höchste Ausmaß an Flip nach 1 h zeigt, LV16 jedoch schneller Flip katalysiert. Die längere LV24-Sequenz zeigt nur für den PC-Flip eine deutliche Reduktion in der Flip-Aktivität im Vergleich zu LV16. Dieser Unterschied könnte einerseits in einem verringerten hydrophoben „mismatch“ begründet sein. Die Acylketten der Lipide passen sich durch strecken an die hydrophobe Länge der Sequenz an, sodass die Membrandicke um die Peptidumgebung zunimmt [105-108]. Als Konsequenz ist die Translokation für C₆NBD-PC erschwert, da die große, positiv geladene PC-Kopfgruppe einen längeren hydrophoben Membranzwischenraum durchqueren muss. Andererseits könnte die längere Peptid-Variante auch einen veränderten Einbauwinkel in der Membran annehmen, wodurch der PC-Flip zusätzlich beeinflusst wird. Für den PS- und PE-Flip hat ein längerer hydrophober Peptidkern keine Auswirkungen, da für LV16 und LV24 gleich gute Flip-Aktivitäten gemessen wurden. Eine LV16-Sequenz, die N-terminal mit einer Palmitoyl-Kette versehen war, zeigte eine Steigerung im Flip-Potential für C₆NBD-PS, C₆NBD-PE und C₆NBD-PC mit ähnlichem Ausmaß. Die Acylierung bevorzugt keine Lipid-Kopfgruppe, trägt aber zur Förderung der Lipid-

Translokation bei Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie zeigten in vorangegangenen Studien [109] einen stabilisierenden Effekt der Acylkette auf die α -helikale Konformation einer LV16-Sequenz. Die lokale α -Helixdynamik blieb jedoch unverändert. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei gleichbleibender lokaler Flexibilität der α -Helix eine Stabilisierung der α -helikalen Konformation zum erhöhten Flip-Potential beiträgt.

Für eine konkretere Aussage über den mechanistischen Hintergrund der Kopfgruppenspezifität, wurde der Flip von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE in Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse werden in Kap. 5.2 diskutiert und in Bezug zu den bisherigen Erkenntnissen gesetzt.

Rolle der flankierenden Aminosäuren

Neben der Charakterisierung des Einflusses der hydrophoben Kernsequenz der Peptide auf die Flip-Aktivität wurde zusätzlich der Einfluss der flankierenden Aminosäuren untersucht. Die Peptide tragen an ihren Enden Lys-Triplets, die für eine bessere Löslichkeit sorgen und eine Verankerung in der Membran begünstigen [110]. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass den flankierenden Aminosäuren eine entscheidende Bedeutung für die Fusion artifizierender Liposomen zukommt [85]. Peptide, deren flankierende Lysine durch Histidine ausgetauscht wurden, zeigten bei neutralem pH-Wert keine fusogene Wirkung mehr. Jedoch generierten die His-Varianten bei pH 4 Fusionsausmaße, die mit den entsprechenden Lys-flankierten Peptiden vergleichbar waren. Bei neutralem pH-Wert liegen die Lysine in protonierter Form vor, während die Histidine ungeladen sind. Wird der pH-Wert auf 4,0 gesenkt, trägt auch die His-Seitenkette eine positive Ladung. Es wurde geschlossen, dass die Ladung der flankierenden Reste maßgeblich für die Liposomenfusion *in vitro* ist. In weiterführenden Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass strukturelle Unterschiede für die blockierte Fusogenität der His-Varianten bei neutralem pH-Wert verantwortlich sind, da die Sekundärstruktur pH-Wert unabhängig war [84]. Weiterhin konnten für die Lys- und die His-Derivate durch D/H-Austausch-Experimente vergleichbare α -Helixdynamiken festgestellt werden. Demzufolge scheint die Ladung der Enden eine wichtige Rolle in der Liposomenfusion zu spielen. Eine mögliche Begründung sind Ladungsinteraktionen zwischen den flankierenden Bereichen der Peptide mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Lipide bzw. der PS-Kopfgruppe. Wobei anzumerken ist, dass letztere Interaktion für die Fusion *in vitro* nicht notwendig war [50]. Die durchgeführten Flip-Experimente mit Lys- und His-flankierten LV16- und L16-Sequenzen ergaben ebenfalls eine Abhängigkeit des Flip-Potentials bezüglich der Ladung und der Art der flankierenden Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass die Lys-flankierte LV16-Sequenz den PC-Flip in PC/DOPE/DOPS-Liposomen bei neutralem pH-Wert zweimal effizienter katalysiert, als His-LV16, welches unter diesen Bedingungen neutral geladene Histidine besitzt. Das Ergebnis stimmt

mit Untersuchungen der Killian Arbeitsgruppe überein, die auch einen Effekt der polaren, flankierenden Aminosäuren der XALP-Peptide auf die Lipid-Translokation beobachtet haben. In Liposomen aus *E. coli* Lipiden (80 % PE, 15 % PG) zeigten sie, dass Lys-flankierte Peptide aktiver im PG- und PE-Flop waren, als die His- oder Trp-flankierten Peptidvarianten [73]. Allerdings verschwinden diese Unterschiede in DOPC und DOPC/DOPE Liposomen [74], was eventuell mit dem Fehlen von negativ geladenen Lipiden in der Liposomenzusammensetzung erklärt werden könnte. Darüber hinaus entspricht der PC-Flip der protonierten His-Varianten bei pH 4,2 teilweise dem Flip-Ausmaß des entsprechenden Lys-flankierten Peptids. Es liegt daher nahe, dass die positive Ladung der flankierenden Reste den PC-Flip fördert. Interessanterweise konnte der PC-Flip das vollständige Level von LV16 bei pH 4,2 wieder erreichen, wenn die hydrophobe Länge der His-Variante auf 20 Aminosäurereste erweitert wurde.

Sekundärstrukturanalysen zeigten, dass durch den Austausch von Lysinen mit Histidinen die α -helikalen Fraktionen der dynamischen LV16-Sequenz in der Membran nahezu pH-unabhängig reduziert wurden. Die lokale Flexibilität blieb davon jedoch unbeeinflusst und war ähnlich der der Lys-Variante [84]. Die Strukturänderung von His-LV16 zu einem erhöhten β -Faltblattanteil könnte auf einen negativen „mismatch“ Effekt zurückzuführen sein. Negativer, hydrophober „mismatch“ wird durch eine membrandurchspannende α -Helix verursacht, welche zu kurz ist, um den hydrophoben Bereich der Membran vollständig zu durchspannen [111, 112]. Dadurch werden lokale Änderungen der Lipidstruktur bzw. -organisation verursacht, sodass sich die Membrandicke in der Peptidumgebung verringert.

Die LV16-Sequenz hat einen hydrophoben Kern, der im Zustand einer idealen α -Helix einer Länge von 2,4 nm entspricht. Demzufolge ist diese α -Helix nicht in der Lage den nicht deformierten hydrophoben Bereich der liposomalen Membran zu durchspannen, die vorwiegend aus Lipiden mit gesättigten und mono-ungesättigten C18-Acyllketten besteht. Sie umfasst etwa 2,7 nm – 3 nm in der flüssig-kristallinen Phase [113]. Lysine, aber nicht Histidine, die beide Enden der Peptidsequenz flankieren, können die hydrophobe Länge durch Exponieren ihrer Seitenkette in den Kopfgruppenbereich um ca. 0,19 nm auf jeder Seite ausdehnen [110, 114-116]. Somit wäre der negative „mismatch“ verringert bzw. aufgehoben. Unabhängig vom Protonierungszustand besitzt His-LV16 nicht die Eigenschaft, sich mit Hilfe der flankierenden His-Reste zu strecken. Somit liegt es in der Membran verkürzt vor und der negative hydrophobe „mismatch“ bleibt bestehen. Gleichzeitig ist der α -helikale Anteil von His-LV16 stark reduziert, so dass, bezogen auf LV16, weniger dynamische α -Helices zur Verfügung stehen um Flip zu katalysieren. Folglich könnten der hydrophobe „mismatch“ und die geringen Anteile an α -Helices zum verminderten Flip-Potential des protonierten His-LV16 im Vergleich zu LV16 führen. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde eine längere His-flankierte Sequenz von 20 Aminosäuren herangezogen um den hydrophoben negativen „mismatch“ auszugleichen und dadurch die α -helikalen Anteile in der

Sequenz zu erhöhen. Das Flip-Potential müsste, bezogen auf His-LV16, somit wieder geteigert werden. Es zeigte sich, dass eine 20 Reste lange Leu/Val-Sequenz (nominale hydrophobe Länge = 3 nm) sich offenbar der hydrophoben Dicke der Doppelmembran anpassen kann, da die α -Helikalität von His-LV20 zunimmt. Folglich lässt sich vermuten, dass LV16 und His-LV20 ein vergleichbares Ausmaß an α -Helikalität aufweisen, die im gleichen Grad PC-Flip induzieren, wie es experimentell gezeigt wurde. Überraschenderweise konnte eine protonierte His-L16-Sequenz den PC-Flip mit hohem Ausmaß katalysieren. Sowohl die Lys-Variante bei pH 4,2 und pH 7,4 als auch His-L16 bei pH 4,2, zeigten nur geringe Flip-Aktivität für C₆NBD-PC (siehe auch Kap. 4.3.4.1). Wie die enorme Steigerung im PC-Flip zu begründen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Der PE-Flip hängt ähnlich vom Ladungszustand der flankierenden Reste ab, wie der PC-Flip. Er sinkt um das dreifache für His-L16 bei pH 7,4 im Vergleich zur L16-Sequenz und konnte bei pH 4,2 wieder vollständig hergestellt werden. Es wurde demzufolge keine Ausdehnung des hydrophoben Sequenzbereichs benötigt. His-L16 behält seine α -Helikalität in der Membran, weil eine reine Leu-Sequenz [85] ein viel starreres Peptidrückgrad bildet als eine Leu/Val-Sequenz [86]. Für His-LV16 ergab sich ein ähnliches Verhaltensmuster im PE-Flip, wie für den PC-Flip. Auch hier konnte durch Protonierung der Histidine das Flip-Ausmaß von LV16 nur teilweise wiederhergestellt werden. Vermutlich liegt die Ursache wiederum im hydrophoben „mismatch“, allerdings fehlen Ergebnisse für die längere His-LV20-Sequenz. Es ist daher schwierig diese Hypothese zu bestätigen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die positive Ladung wichtig für die Lipidtranslokation ist, aber keine Voraussetzung darstellt. Die Eliminierung der Ladung an den flankierenden Bereichen führte zwar zu einem reduzierten Flip-Potential, blockierte den Flip aber nicht vollständig. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen bestätigt, die zeigten, dass ein KWK-Peptid allein keine Lipidtranslokation möglich macht [73]. Ladungsinteraktionen zwischen den geladenen Peptidenden und den negativ geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide sowie wahrscheinlich auch der PS-Kopfgruppe in der liposomalen Membran üben offensichtlich einen fördernden Effekt auf den Lipid-Flip aus. Der entscheidende Faktor für die unterschiedliche Translokation der Phospholipide mit verschiedenen Kopfgruppen ist jedoch die Art des hydrophoben Peptidbereichs.

1.14 Rolle der Phospholipide in der Liposomenzusammensetzung

Zur Charakterisierung der Flip-Aktivität von Modellpeptiden wurden Untersuchungen in Liposomen mit gleicher Lipidzusammensetzung durchgeführt. Während eines Flip-Ereignisses muss die Membranstruktur lokal gestört werden, damit das Lipid zur gegenüberliegenden Membranseite gelangen kann. Es ist daher wichtig zu verstehen in wie weit die Membranlipide

dazu beitragen peptidinduzierten Flip zu ermöglichen. Die in den Liposomen verwendeten Phospholipide DOPE, DOPS und PC (1:1:3) entsprechen bezüglich ihrer Kopfgruppe den untersuchten Phospholipidanaloga. Durch Eliminierung von DOPE, DOPS oder beiden Phospholipiden aus den Liposomen, können weitere Aussagen über Lipid-Lipid- und Lipid-Peptid-Wechselwirkungen gegeben werden, welche die kopfgruppenspezifische Translokation der Phospholipide beeinflussen.

Die „Standard“-Lipidmischung weist eine negative Nettoladung auf, die durch die zusätzliche negative Ladung der Serinkopfgruppe von DOPS herrührt. PC und DOPE dagegen haben auf Grund ihrer zwitterionischen Struktur, die aus der negativ geladenen Phosphatgruppe und dem positiv geladenen Kopf besteht, keine resultierende Nettoladung. Das Ersetzen der Aminophospholipide durch PC ermöglicht es, den Einfluss der Kopfgruppen zu untersuchen.

Die systematische Änderung der Lipidzusammensetzung der liposomalen Membran beeinflusste den PE-, PS- und PC-Flip. Das negativ geladene DOPS stimulierte den peptidinduzierten PC- und PS-Flip, da eine Eliminierung zu niedrigerem Flip führte. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit unterschiedlichen Peptid-Lipid-Interaktionen, in denen DOPS stärker mit den Peptiden interagiert als PC. Zum einen kann DOPS mit den Lysinen über die Phosphatgruppe wechselwirken, so wie es auch für PC bzw. DOPE möglich ist. Zum anderen könnte, auf Grund der negativen Nettoladung von DOPS, eine Ser-Lys-Interaktion in einer engeren Bindung mit dem Peptid resultieren, welche nicht in Bezug zum hydrophoben Kern steht. Durch Eliminieren von DOPS aus der Lipidmischung wurde zudem reduzierter peptidinduzierter PS-Flip beobachtet. Gleichzeitig ist der PS-Flip in der dreiteiligen Lipidmischung unabhängig von der hydrophoben Peptidsequenz. Das weist auf eine Konkurrenz zwischen DOPS in den Liposomen und dem C₆NBD-PS-Analagon um Peptidbindungsstellen hin. Wenn DOPS nicht in den Liposomen vorhanden ist, kann das PS-Analagon verstärkt an Lysin binden und Flip ist demzufolge reduziert. Da der PS-Flip für alle untersuchten Peptide etwa gleich hohe Flip-Werte aufwies, ist es wahrscheinlich, dass eine Ser-Lys-Interaktion die ausschlaggebende Interaktion für den PS-Flip ist. Zusätzlich wird die Translokation der negativ geladenen Serinkopfgruppe durch die Membran begünstigt, da das Dipolpotential der Membran im inneren, hydrophoben Acylkettenbereich positiv ist [74, 117, 118]. Interessanterweise konnte entgegen der genannten Hypothese für LV16-G8P9 keine Reduktion im PS-Flip in der Abwesenheit von DOPS beobachtet werden. Es wird angenommen, dass LV16-G8P9 als einzelner β -Strang vorliegt und über ein Schleifenmotiv ein β -Faltblatt bildet, das nur in einer Membranschicht inseriert ist [84]. Möglicherweise ist diese Struktur in DOPS-freien Liposomen weniger stabilisiert, sodass die terminalen Lysine des Peptids nicht so stark mit der negativen Kopfgruppe des PS-Analagon interagieren können. C₆NBD-PS könnte demzufolge leichter durch die Membran transportiert werden.

In vorangegangenen Studien zeigte sich durch Einfügen von DOPG in die Lipidmembran, welches wie DOPS eine negative Ladung trägt, ein verbesserter PG-Flop mittels Lys-, aber nicht Trp-

flankierten XALP-Peptiden [74]. Das wiederum ist mit dem Vorschlag vereinbar, dass Lipid-Moleküle, die zu einer bestimmten Zeit eng mit dem Peptid assoziiert sind, nicht zum Flippen neigen. Stattdessen bildet sich ein Lipid-Peptid-Komplex, der um sich herum einen Bereich gestörter Membrananordnung erzeugt. Das wiederum erleichtert die Translokation von Lipiden, die dicht an einem Peptid lokalisiert sind, jedoch nicht direkt mit ihm interagieren. Zusätzlich ist das Ausmaß der lokalen Störung der Membran um das Peptid herum abhängig von der Flexibilität der α -Helix. Gleichzeitig ist denkbar, dass die Lys-Phosphat-Interaktionen mit den Phospholipiden PC, DOPS und DOPE durch flexiblere Peptide stärker werden. Somit kann der Anstieg der Flip-Aktivität für C₆NBD-PC in der Reihenfolge L16 < LLV16 < LV16 < LV16-G8P9 erklärt werden. Die Affinität zwischen Peptid und PC-Phosphatgruppe wird in dieser Reihenfolge stärker. Ebenso nimmt der stimulierende Effekt von DOPS zu, da es auch besser an flexiblere Peptide bindet. Die Peptid/DOPS-Affinität ist im Allgemeinen jedoch stärker als die von Peptid/PC, da DOPS zusätzlich Ser-Lys-Wechselwirkungen eingeht. Als Konsequenz werden Interaktionsflächen der Peptide bevorzugt von DOPS besetzt und C₆NBD-PC kann flippen, da es sich ebenfalls dicht an der Peptidhelix befindet, aber nicht so starke Bindungen mit dem Peptid eingehen kann. Bemerkenswert ist, dass das Ausmaß an PC- und PE-Flip bei pH 4,2 für L16 und LV16 in Standardliposomen gemindert war, im Vergleich zu den Flip-Werten bei pH 7,4. Das wäre mit einer reduzierten Peptid/DOPS-Affinität zu erklären, da DOPS bei niedrigem pH-Wert von 4,2 teilweise protoniert ist. Untersuchungen der pK_a-Werte in Liposomen ergaben für die Carboxylgruppe von PS pK_a = 3,6 und für die Aminogruppe pK_a = 9,8 [119].

Die Beseitigung von DOPE aus der Liposomenzusammensetzung hat ebenfalls Auswirkungen auf den Flip. Sowohl für PC- als auch für den PE-Flip konnte gesteigerter Flip beobachtet werden. Demzufolge hat DOPE eine hemmende Funktion in Gegenwart von DOPS in der liposomalen Zusammensetzung. Der inhibierende Effekt könnte mit der bekannten Fähigkeit von DOPE zusammenhängen, die Ordnung der Acylkettenregion auf Grund seiner kegelförmigen Molekülstruktur zu erhöhen [120, 121].

Es ist denkbar, dass DOPE ähnlich gute Lys-Phosphat-Interaktionen wie DOPS eingeht. PC kann zwar auch diese Bindung eingehen, hat jedoch durch die relative große Kopfgruppe vielleicht eine tendenziell geringe Bindungsaffinität zu Lysin. Somit würde ein flexibler Kern etwas stärkere Lys-Phosphat-Interaktionen mit DOPE und DOPS eingehen als mit PC (entsprechendes gilt ebenso für die Phospholipidanaloga), wodurch, wie schon oben beschrieben, lokale Defekte um die Peptid-Membranregion entstehen durch die C₆NBD-PC flippen kann, da die Bindung zum Peptid nicht so stark ist.

Dass der PE-Flip in DOPE freien Liposomen besser funktioniert, könnte auf eine dichtere Packung der Membran zurückzuführen sein. In reinen eggPC-Lipos ist der PC-Flip am geringsten, da der Effekt von DOPS und DOPE fehlt.

Falls elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und den Peptiden maßgeblich für den PC-Flip sind, sollte die Reduktion derartiger Interaktionen ein geringeres Flip-Ausmaß für C₆NBD-PC erzeugen. Eine erhöhte Salzkonzentration im wässrigen Milieu schirmt Ladungsträger weitestgehend ab, sodass Lipid-Peptid-Interaktionen schwächer werden müssten. Allerdings zeigten Flip-Experimente mit LV16 kein verändertes Verhalten im induzierten PC-Flip, wenn die Salzkonzentration bis zum Vierfachen der üblichen Konzentration erhöht war. Zusätzlich hatten hohe Salzgehalte keinen Einfluss auf das fusogene Potential von LV16. Vermutlich sind die elektrostatischen Interaktionen zwischen Peptid- und Lipid-Ladungen stärker, als mit Ladungen aus der wässrigen Umgebung. In früheren Studien wurde vermutet, dass Aminosäurereste, die nahe oder an der Grenze zwischen nichtpolaren und polaren Bereichen der Membran liegen, eine Umgebung einnehmen, die eine tatsächlich niedrigere Dielektrizitätskonstante aufweist, als eine wässrige Umgebung [122].

Eine weitere Möglichkeit, zu testen wie intensiv die Peptide mit den Phospholipidanaloga interagieren, sollten anhand von DTN-Bleichkinetiken demonstriert werden. Das NBD-Molekül an der kurzen C₆-Acylkette bevorzugt eine hydrophile Umgebung, sodass es an der Grenzfläche zwischen hydrophilen und hydrophoben Bereichen der Membran lokalisiert ist [87, 88]. Unter der Annahme, dass die Interaktionen der C₆NBD-Analoga mit membranintegralen Peptiden das NBD-Molekül verstärkt in hydrophobere Bereiche der Membran anordnet, kann man die Zugänglichkeit von DTN zur NBD-Gruppe als Maß für die Stärke der Peptid-Lipid-Interaktion heranziehen. Hierfür wurde die anfängliche Bleichgeschwindigkeit der NBD-Moleküle mittels DTN gemessen. Im Vergleich zu peptidhaltigen Membranen sollten Liposomen ohne Peptid die beste DTN-Zugänglichkeit aufweisen und somit die schnellste anfängliche Bleichgeschwindigkeit gemessen werden. Im Versuch konnte dieses Verhalten allerdings nicht beobachtet werden. Die Zugänglichkeit für DTN zum Lipid-assoziierten NBD-Molekül war weder abhängig von der Peptidsequenz, noch beeinflusste die Art der Lipidkopfgruppe die Bleichgeschwindigkeit. Es ist daher wahrscheinlich, dass Effekte, die durch die Peptide in der Membran verursacht werden, keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Lokalisation der NBD-Gruppe haben. Andererseits ist es auch denkbar, dass DTN gut in den tieferen Phosphoglycerol-Bereich eindringen kann, obwohl es nicht befähigt ist, in die gegenüberliegende Membranschicht überzutreten.

1.15 Rolle des Lipid-Flips bei der Membranfusion

Untersuchungen an Peptiden, welche den Sequenzen der TMDn natürlich vorkommender SNARE-Proteine entsprechen, zeigten ein Optimum an Fusogenität. Durch strukturelle Änderungen mittels Mutationen, welche die Stabilität der Peptide fördern, wurde das fusogene Potential reduziert. Es stellte sich ein ähnlicher Zusammenhang zwischen struktureller Flexibilität und Fusogenität heraus, wie er für die LV-Peptide beobachtet wurde [75, 93].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei experimentellen Untersuchungen des Flip-Potentials von LV-Peptiden eine Abhängigkeit zwischen der Translokation der Lipidkopfgruppe und der strukturellen Flexibilität eines Peptids. Die TMDn der synaptischen SNARE-Proteine Synaptobrevin-2 (Syb-wt) und Syntaxin-1a (Syx-wt), sowie die des vakuolären SNARE-Proteins Vam3p (Vam3p-wt) sollten ebenfalls mittels der vorgestellten Methode untersucht werden. Ein Augenmerk galt dabei einer möglichen Beziehung zwischen Fusion und Flip.

Da SNARE-Proteine und im Speziellen ihre TMDn entscheidend für den Prozess der Fusion von Doppelmembranen sind [123, 124], soll der beobachtete Flip, neben den strukturellen Eigenschaften der Peptide, vielmehr im Zusammenhang mit der Liposomenfusion diskutiert werden, um die Rolle von Flip bei der Membranfusion zu klären. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich zwei Mutanten von Syb-wt untersucht (Syb-multA und Syb-L8), die eine erhöhte α -Helix-Stabilität und dadurch ein geringeres fusogenes Potential zeigten.

Es ist vorstellbar, dass im Fusionsprozess die Lipidneuanordnung von der äußeren zur inneren Membranseite durch Lipid-Flip ermöglicht wird. Wenn das Hemifusionsdiaphragma gebildet wird, sinkt das Flächenverhältnis von äußerer zu innerer Membranschicht. Durch Flip wäre es möglich dieses Verhältnis wieder auszugleichen, sodass eine vollständige Fusion möglich ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Flip-Versuche durchgeführt mit ähnlichen P/L-Verhältnissen und einer Liposomenzusammensetzung wie sie in früheren Fusionsuntersuchungen verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass einerseits die Reihenfolge, mit der die LV-Peptide PC-Flip induzierten, gut mit der Reihenfolge ihrer Fusogenität korrelierte und auch die SNARE-Peptide effizient im PC-Flip waren. Andererseits befolgen die Syb-Mutanten diese Korrelation nicht. Syb-L8 ist weniger fusogen als Syb-wt und zeigt auch eine geringere lokale α -Helix-Dynamik [77, 93], induziert aber stärker den PC-Flip. Alle Syb-Varianten zeigen jedoch das bei den LV-Peptiden ermittelte Ausmaß an PS-Flip und wenig fusogene Peptide induzieren den PE-Flip ebenfalls effizienter. Bemerkenswerterweise war im Fall der SNARE-Peptide Syx-wt und Vam3p-wt das ermittelte Flip-Ausmaß für C₆NBD-PE im Vergleich zu C₆NBD-PC und C₆NBD-PS sogar verdoppelt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass Syx-wt und Vam3p-wt ein hohes fusogenes Potential aufweisen und Syx-wt eine dynamische α -Helix besitzt [77, 93, 97]. Demzufolge widerspricht ein hoher PE-Flip dem Verhalten strukturell flexibler LV-Peptide wie LV16 und LV16G8P9, die alle drei Phospholipidanaloga kopfgruppenunabhängig von der äußeren in die innere Membran transferierten. Nur weniger flexible LV-Peptide mit einer starren α -Helix konnten den PE-Flip bisher am besten katalysieren. Neben der strukturellen Flexibilität der membranintegralen Peptide muss folglich auch die Primärstruktur des hydrophoben Kerns Einfluss auf das Flip-Potential ausüben. SNARE-Peptide zeigen zwar eine Kombination an β -Faltblatt-bevorzugenden und α -Helix-stabilisierenden Aminosäuren, jedoch ist die Variation der Arten von Aminosäuren komplexer, als bei den einfach aufgebauten LV-Peptiden. Es gibt folglich keine klare

Korrelation zwischen Fusogenität und Flip-Effizienz der Peptide. Extrapoliert man die Daten auf das Level von Proteinen, zeigen sie gegenwärtig keine Rolle von Flip für die Fusion.

Experimente mit LV16 zeigten, dass durch Einbau von LPC in die äußere Liposomenmembran eine konzentrationsabhängige Reduktion des fusogenen Potentials erfolgte. LPC hat auf Grund seiner Molekülform eine Stabilisierung der positiven Krümmung der äußeren Membranschicht zur Folge und inhibiert den Fusionsprozess. Durch 20 mol-% LPC wurde die Fusion fast vollständig blockiert. Im Vergleich dazu konnte der peptidinduzierte Flip von C₆NBD-PC, C₆NBD-PS und C₆NBD-PE durch LV16 nicht durch den Einbau von LPC beeinflusst werden. Demzufolge kann ausgeschlossen werden, dass der in dieser Arbeit beobachtete peptidinduzierte Flip in Liposomen lediglich das Resultat von ansteigendem lateralem Druck der äußeren Membranschicht durch die Stalk-Formation ist. Das ist im Einklang mit vielen Untersuchungen, die schnellen Flip-Flop von Phospholipiden in planaren Membranschichten beobachten konnten, die bekanntlich nicht befähigt sind, spontan zu fusionieren [65, 67, 125]. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Flip trotz allem während der Fusion stattfindet. Umgekehrt zeigte sich, dass Flip der fluoreszenzmarkierten Phospholipide durch Zugabe von 20 mol-% Cholesterol weitestgehend inhibiert wurde. Auch die induzierte Phospholipidtranslokation durch XALP-Peptide wurde nach Einbau von Cholesterol in die Liposomenmembran blockiert [74]. Cholesterol verfügt über die Eigenschaft, die Packungsdichte und Hydrophobizität [42] der Membran zu erhöhen. Die komprimierte Lipidanordnung vergrößert die Dicke der Membran und damit des hydrophoben Bereichs, wodurch der Durchtritt der Phospholipide zur gegenüberliegenden Membranseite erheblich erschwert wird [126].

Für die peptidinduzierte Liposomenfusion war lediglich eine geringe Reduktion des Fusionsausmaßes mit 20 mol-% Cholesterol zu verzeichnen. Erst durch Verdopplung der Cholesterolkonzentration konnte eine Verringerung der Fusogenität bis zu 50 % beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass der inhibierende Effekt des Cholesterolanteils für LV16 geringer war, als für die Peptide der synaptischen TMDn von SNARE-Proteinen. Die Membran natürlicher, synaptischer Vesikel weist einen hohen Cholesterolgehalt von 40 mol-% auf [100]. Obwohl dieser Anteil in den untersuchten Modellliposomen zu einem verminderten fusogenen Potential führte, ist es wahrscheinlich, dass *in vivo* trotzdem eine schnelle und gezielte Verschmelzung der synaptischen Membranen gewährleistet ist. In einem biologischen System wirken viele kooperative, biochemische Prozesse zwischen Proteinen, Lipiden und Co-Faktoren, die zur optimalen Vesikelfusion beitragen, welche im verwendeten Modellsystem fehlen.

Dass die Fusion nicht vollständig blockiert wurde, lässt darauf schließen, dass Flip nicht für die Fusion benötigt wird. Vielmehr scheinen andere Faktoren zu dominieren um ein vollständiges Fusionsereignis zu erzeugen. Untersuchungen durch Polyethylenglycol (PEG)-induzierte Fusion zweier Membranen und auch Molekulardynamik-Simulationen geben zwar Hinweise darauf, dass ein Lipidtransfer von der äußeren in die innere Membranschicht während des Fusionsprozesses

erfolgen könnte, lassen jedoch unklar, ob Flip und Fusion mechanistisch miteinander verbunden sind [51, 53]. Es bleibt daher immer noch zu klären, wie die Flächenänderung der äußeren und inneren Membranseite während der Fusion ermöglicht wird.

Kürzlich wurde gezeigt, dass GUV's (große unilamellare Vesikel) in der Lage waren große Hemifusionsdiaphragmen ohne integralem Peptid zu erzeugen [127]. Das weist darauf hin, dass kein schneller Flip-Flop für die Ausdehnung einer solchen „Stalk“-Struktur notwendig ist. Ein weiteres Argument warum es unwahrscheinlich ist, dass fusogene Membranproteine signifikant Lipidtranslokation in der Plasmamembran einer Zelle fördern, wäre der resultierende Ausgleich der Plasmamembran-Asymmetrie, welcher durch ATP-abhängige Flippasen/Floppasen aufrechterhalten wird [34, 36, 38]. Umgekehrt könnte Flip, der durch SNARE-TMDn induziert wird, in Membranen mit einer Lipidzusammensetzung, ähnlich der in der Arbeit verwendeten Standardlipidmischung PC/PS/PE aber mit geringem Cholesterolgehalt, biologisch relevant sein. Dieses Kriterium entspricht Membranen des ER, in dem ATP-unabhängige Lipidtranslokation benötigt wird für die Verteilung der neusynthetisierten Lipide. Flip-Aktivität, die in isolierten ER-Membranen gemessen wurde, zeigte keine Kopfgruppenspezifität [34], wie es hier für die SNARE-TMDn und einige LV-Peptide beobachtet wurde. Trotz beträchtlichem Aufwand wurden noch keine Proteine identifiziert, die ATP-unabhängigen Flip-Flop im ER katalysieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Proteine mit einer einzelnen, membrandurchspannenden α -Helix, welche vielfältige Funktionen ausüben, die Fähigkeit für Flip teilen. Das lässt vermuten, dass ihre membrandurchspannende Domäne und die flankierenden Reste in der Lage sind entsprechende Protein/Lipid-Interaktionen einzugehen.

Untersuchungen an Membranproteinen von *E. coli* wiesen darauf hin, dass deren TMDn ihre Fähigkeit Phospholipide von einer Membranseite zur gegenüberliegenden zu transportieren beeinflussen [37]. Proteine mit einer einzelnen α -Helix-durchspannenden TMD konnten den Flop von Phospholipiden in einer energieunabhängigen Weise effektiver als polytope Membranproteine katalysieren. Die Hypothese, dass den TMDn eine entscheidende Rolle für die Lipidtranslokation zukommt, konnte durch membranintegrale Modellpeptide in liposomalen Membranen bestätigt werden. In diesen Experimenten war es möglich, Flip/Flop von Phospholipiden durch Peptide zu katalysieren, der abhängig von der Peptidsequenz und der Phospholipidkopfgruppe war [73, 74].

1.16 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass Flip-Flop in biologischen Membranen sehr schnell, kopfgruppenunabhängig und proteinabhängig ist. Die genauen Mechanismen dieses Prozesses sind trotz allem noch weitgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass membranfusogene Modellpeptiden mit unterschiedlichen Leu/Val-Anteilen und Peptide, welche die TMDn von SNARE-Proteinen nachahmen in der Lage waren, Phospholipid-Flip zu katalysieren. Durch

Sekundärstrukturanalysen, D/H-Austausch-Experimenten und Molekulardynamik-Simulationen aus vorangegangenen Arbeiten konnten die SNARE-Peptide und LV-Peptide hinsichtlich ihrer globalen und lokalen Helixdynamik gut charakterisiert werden [75, 86, 93, 101]. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation zwischen ihrer Fusogenität und der konformationellen Flexibilität der LV-Peptide, die jedoch durch syb-L8 in Frage gestellt wurden. Auf Basis dieser strukturellen Befunde wurden die mechanistischen Hintergründe, die zu einer peptidinduzierten Phospholipidtranslokation führen, betrachtet.

Die Befunde dieser Arbeit zeigten, dass die Translokation von Phospholipiden durch membranintegrale Modellpeptide in Liposomen mit variierenden Lipidzusammensetzungen auftritt, die wiederum die Flip-Effizienz entsprechend modulieren.

Dass die Effizienz mit der Lipide, die unterschiedliche Lipidkopfgruppen besitzen, flippen entscheidend von der Primärstruktur der Peptide abhängt, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. In biologischen Membranen wird eine Kopfgruppenabhängigkeit im Allgemeinen nicht beobachtet. In Studien von Kol wurden für XALP-Modellpeptide kein PC-Flip und kaum PS-Flip detektiert [74]. Diese Peptide sind daher nicht repräsentativ für die TMDn von Flippasen in biologischen Membranen. Killian und Mitarbeiter vermuten, dass in biologischen Systemen eine große Variation an TMDn zu finden ist, die möglicherweise mehr polare oder geladene Seitenketten im hydrophoben Kern besitzen und somit in der Lage sind, die verschiedenen Phospholipidklassen zu transferieren. Durch Untersuchungen an LV-Peptiden die Flip in Abhängigkeit ihrer konformationellen Flexibilität katalysieren, kann diese Vermutung bekräftigt werden. Man könnte schlussfolgern, dass kopfgruppenspezifischer Flip von der Kapazität abhängt, mit der die verschiedenen Lipidkopfgruppen an die TMDn binden können. In Bezug auf die LV-Peptide ergeben sich für flexible Peptide im Vergleich zu starren α -Helices mehr Kontakt- und Interaktionsflächen für die Lipide. Weiterhin konnte durch NMR-Studien bestätigt werden, dass mit einer erhöhten Flexibilität der LV-Peptide die umgebene Lipidstruktur in der Membran stärker gestört wird [128, 129]. Für den peptidinduzierten Flip flexibler Sequenzen (LV16 und LV16-G8P9) könnten dadurch die ähnlich hohen Werte im PE-, PS- und PC-Flip erklärt werden. Zum einen sind hier möglicherweise die Bindungsaffinitäten gestärkt und zum anderen sind die lokalen Störungen in der Membran größer. Diese Beobachtung ist auch vereinbar mit dem vorgestellten Slip-Pop-Modell von Kol et al. [34], in dem hauptsächlich die durch die TMDn verursachten lokalen Störungen der Membranstruktur für die Phospholipidtranslokation verantwortlich gemacht werden.

Es ist wahrscheinlich, dass die gegensätzliche Sequenzabhängigkeit von dem PE- und PC-Flip auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten mit den Peptiden zurückzuführen ist. Eine dynamische α -Helix ist durch die Fähigkeit charakterisiert ihre α -helikale Konformation vorübergehend zu öffnen. Somit ist sie in der Lage Wasserstoffbrücken auszubilden. Je dynamischer eine α -Helix ist, desto mehr Bindungsmöglichkeiten hat sie. Es ist vorstellbar, dass die PE-Kopfgruppe

Wasserstoffbrücken mit den Peptiden eingeht und dadurch fester an flexible Peptide bindet als an eine starre α -helikale Oligoleucin-Sequenz, die keine Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Somit hindern flexible Peptide die PE-Translokation. Der limitierende Faktor für den PE-Flip scheint dabei nur die Bindungsstärke mit dem Peptid darzustellen. Eine starre Leu-Sequenz ist für die kleine PE-Kopfgruppe völlig ausreichend um die Membran zu durchqueren. Allerdings kann dadurch nicht erklärt werden warum der PE-Flip in einem DOPE/PC-Liposomen im Vergleich zu einem DOPS/DOPE/PC-Liposomen gehemmt ist. Es scheint, dass DOPS eine zusätzliche Rolle im Mechanismus der PE-Translokation spielt.

Im Gegensatz zu PE kann PC keine Wasserstoffbrücken mit den dynamischen α -Helices eingehen. PC benötigt jedoch auf Grund der großen, positiv geladenen Kopfgruppe die peptidinduzierten lokalen Störungen von flexiblen Peptiden um die Membran zu durchqueren. Demzufolge ist der PC-Flip für die wenig flexiblen Sequenzen LLV16 und L16 am niedrigsten.

Für das negativ geladene PS-Molekül stellen wahrscheinlich Ladungs-Ladungsinteraktionen zwischen Serin und den flankierenden Lysinen die entscheidende Peptid-Lipid-Bindung für den Flip dar. Somit ist die PS-Translokation von der Peptidsequenz unabhängig. Es müsste zusätzlich die Auswirkung des PS-Flips für Peptide mit neutral geladenen Termini überprüft werden, um eine genauere Aussage treffen zu können. Andererseits sollte auch PS, so wie schon für PE erläutert, mit den dynamischen α -Helices Wasserstoffbrücken ausbilden. Demzufolge hätte der PS-Flip eine ähnliche Sequenzspezifität wie PE zeigen müssen. Es ist daher bemerkenswert, dass die Eliminierung von DOPS aus der Liposomenzusammensetzung in einen sequenzspezifischen PS-Flip resultiert. Allerdings induzieren flexible Peptide den PS-Flip am effektivsten, was wiederum im Gegensatz zum PE-Flip steht.

Für PE und PC zeigten die Ergebnisse deutlich, dass Lys-Lipid-Interaktionen den Flip fördern, während neutrale Termini das Flip-Potential z.T. stark reduzieren. LV16-Peptide mit positiv geladenen His-Resten konnten nicht die Flip-Werte der Lys-Varianten erreichen. Die Unterschiede hierfür können in ihrer Eigenschaft liegen als Donor oder Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen mit den Lipidkopfguppen, den Phosphaten und den Carbonylen zu fungieren, wie es in Molekulardynamik-Simulationen gezeigt werden konnte [103, 104]. Allerdings konnte ein protoniertes His-L16 nahezu dieselben Flip-Ausmaße erzielen, wie die Lys-flankierte L16 Sequenz. Vielmehr scheint der negative hydrophobe „mismatch“ für das geringere Flip-Potential des protonierten His-LV16 im Vergleich zu LV16 verantwortlich zu sein, da er die α -Helikalität von His-LV16 reduziert. LV16 kann den „mismatch“ ausgleichen, da die flankierenden Lysine die Fähigkeit besitzen zu „snorkeln“, d. h. ihre Seitenketten zum hydrophilen Bereich hin auszustrecken und dadurch die hydrophobe Länge einer TMD anzupassen [110]. Auch eine längeres His-LV20 Peptid kann den hydrophoben mismatch verringern und dadurch seine α -Helikalität erhöhen. Für L16 und das protonierte His-L16 wurden keine Unterschiede im Flip-Potential beobachtet, da His-L16 nahezu genauso α -helikal ist wie L16. Es kann daher

geschlussfolgert werden, dass der dynamische α -helikale Anteil in einem Peptid maßgeblich für den Flip ist.

Sowohl in dieser Arbeit als auch in früheren Studien [74] stimulierten negativ geladene Lipide in der Liposomenzusammensetzung die Phospholipittranslokation. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind Ladungsinteraktionen zwischen positiven Peptidresten und der negativen Lipid-Kopfgruppe dafür verantwortlich. Ein direkter Vergleich der Daten für die XALP-Peptide aus früheren Studien durch die Arbeitsgruppe von Killian und den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit sind jedoch schwierig, auf Grund der Verwendung unterschiedlicher TMD-Sequenzen, Membranlipide und NBD-Phospholipidanaloga.

Im Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Peptide wurde deutlich, dass die Flip-Aktivität eine Abhängigkeit bezüglich der Kopfgruppe des C₆NBD-Phospholipidanalogs aufweist, welche auf eine komplexe Wechselwirkung zwischen Primärstruktur, hydrophober Länge, der Art und Ladung der flankierenden Aminosäuren des Peptids, sowie der Membranzusammensetzung zurückzuführen ist. Die Befunde weisen darauf hin, dass hoch dynamische TMDn verschiedenartiger, einschließlich fusogener, Proteine in der Lage sind, die Translokation von Phospholipiden in biologischen Membranen mit geringem Cholesterolanteil zu vermitteln.

Eine Rolle von Flip für die Membranfusion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es bleibt daher immer noch zu klären, wie die Lipidneuordnung während der Fusion zweier Membranen erfolgt.

Für weitere Arbeiten wäre es notwendig, die Peptid-Lipid-Interaktionen genauer zu charakterisieren und experimentell nachzuweisen, um eine detaillierte Aussage über die mechanistischen Abläufe der Phospholipidbewegungen in Membranen geben zu können. Außerdem wäre es von großer Bedeutung Flippasen zu isolieren, damit sie strukturell und funktionell charakterisieren werden können. Das würde enorm dazu beitragen ein besseres Verständnis für den transversalen Phospholipidtransport in biologischen Membranen zu erlangen.

Literaturverzeichnis

1. White, S.H. and Wimley, W.C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-365.
2. Wiener, M.C. and White, S.H. (1992). Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups. *Biophys J* 61, 428-433.
3. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
4. Menger, F.M., Chlebowski, M.E., Galloway, A.L., Lu, H., Seredyuk, V.A., Sorrells, J.L. and Zhang, H. (2005). A tribute to the phospholipid. *Langmuir* 21, 10336-10341.
5. Eibl, H. (1984). Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen. *Angew. Chem.* 96, 247-262
6. Peters, H. (2001). Das Photoreaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides* als Modellmembranprotein zur Reinigung, Rekonstitution in Liposomen aus ungewöhnlichen Phospholipiden, Charakterisierung und heterologen Expression, Universität Stuttgart.
7. Winter, R. and Dzwolak, W. (2005). Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 363, 537-562; discussion 562-533.
8. Stubbs, C.D. (1983). Membrane fluidity: structure and dynamics of membrane lipids. *Essays Biochem* 19, 1-39.
9. Winter, R. (1990). Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen. *Chemie in unserer Zeit* 24, 71-81.
10. Contreras, F.X., Sanchez-Magraner, L., Alonso, A. and Goni, F.M. (2010). Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Lett* 584, 1779-1786.
11. Marrink, S.J., de Vries, A.H. and Tieleman, D.P. (2009). Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochim Biophys Acta* 1788, 149-168.

12. Marti, J. and Csajka, F.S. (2004). Transition path sampling study of flip-flop transitions in model lipid bilayer membranes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 69, 061918.
13. Liu, J. and Conboy, J.C. (2005). 1,2-diacyl-phosphatidylcholine flip-flop measured directly by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biophys J* 89, 2522-2532.
14. Sanyal, S. and Menon, A.K. (2009). Flipping lipids: why an' what's the reason for? *ACS Chem Biol* 4, 895-909.
15. Ramachandran, S. Kumar, P.B., and Laradji, M. (2008). Lipid flip-flop driven mechanical and morphological changes in model membranes. *J Chem Phys* 129, 125104.
16. Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 (Pt 1), 1-14.
17. Bishop, W.R. and Bell, R.M. (1985). Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter. *Cell* 42, 51-60.
18. Buton, X., Morrot, G., Fellmann, P. and Seigneuret, M. (1996). Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 271, 6651-6657.
19. Watkins, W.E. and Menon, A.K. (2002). Reconstitution of phospholipid flippase activity from E. coli inner membrane: a test of the protein translocon as a candidate flippase. *Biol Chem* 383, 1435-1440.
20. Gummadi, S.N. and Menon, A.K. (2002). Transbilayer movement of dipalmitoylphosphatidylcholine in proteoliposomes reconstituted from detergent extracts of endoplasmic reticulum. Kinetics of transbilayer transport mediated by a single flippase and identification of protein fractions enriched in flippase activity. *J Biol Chem* 277, 25337-25343.
21. Marx, U., Lassmann, G., Holzhutter, H.G., Wustner, D., Muller, P., Hohlig, A., Kubelt, J. and Herrmann, A. (2000). Rapid flip-flop of phospholipids in endoplasmic reticulum membranes studied by a stopped-flow approach. *Biophys J* 78, 2628-2640.
22. Pomorski, T. and Menon, A.K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol Life Sci* 63, 2908-2921.
23. Sahu, S.K. and Gummadi, S.N. (2008). Flippase activity in proteoliposomes reconstituted with *Spinacea oleracea* endoplasmic reticulum membrane proteins: evidence of biogenic membrane flippase in plants. *Biochemistry* 47, 10481-10490.

24. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85-90.
25. Lentz, B.R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* *42*, 423-438.
26. Tanaka, Y. and Schroit, A.J. (1983). Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. *J Biol Chem* *258*, 11335-11343.
27. Schroit, A.J., Madsen, J.W. and Tanaka, Y. (1985). In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* *260*, 5131-5138.
28. Deutsch, J.W. and Kelly, R.B. (1981). Lipids of synaptic vesicles: relevance to the mechanism of membrane fusion. *Biochemistry* *20*, 378-385.
29. Lenoir, G., Williamson, P. and Holthuis, J.C. (2007). On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. *Curr Opin Chem Biol* *11*, 654-661.
30. Kinnunen, P.K. and Holopainen, J.M. (2000). Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Rep* *20*, 465-482.
31. Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nievelstein, P.F., Verkleij, A.J., van Golde, L.M., Colenbrander, B. and Gadella, B.M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* *114*, 3543-3555.
32. Gadella, B.M. and Harrison, R.A. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* *67*, 340-350.
33. Bretscher, M.S. (1973). Membrane structure: some general principles. *Science* *181*, 622-629.
34. Kol, M.A., de Kroon, A.I., Killian, J.A. and de Kruijff, B. (2004). Transbilayer movement of phospholipids in biogenic membranes. *Biochemistry* *43*, 2673-2681.
35. Devaux, P.F., Herrmann, A., Ohlwein, N. and Kozlov, M.M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta* *1778*, 1591-1600.
36. Gummadi, S.N., and Kumar, K.S. (2005). The mystery of phospholipid flip-flop in biogenic membranes. *Cell Mol Biol Lett* *10*, 101-121.

37. Kol, M.A., van Dalen, A., de Kroon, A.I. and de Kruijff, B. (2003). Translocation of phospholipids is facilitated by a subset of membrane-spanning proteins of the bacterial cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 278, 24586-24593.
38. Pomorski, T., Holthuis, J.C., Herrmann, A. and van Meer, G. (2004). Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci* 117, 805-813.
39. Löffler, G., Heinrich, P.C. and Petrides, P.E. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*, Volume 8. Auflage (Springer Medizin Verlag, Heidelberg).
40. Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W. and Zwaal, R.F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439, 317-330.
41. Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R.A. and Devaux, P.F. (1992). Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31, 6355-6360.
42. Holthuis, J.C., and Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 209-220.
43. Ungermann, C. and Langosch, D. (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* 118, 3819-3828.
44. Kozlovsky, Y. Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M. (2002). Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J* 83, 2634-2651.
45. Malinin, V.S. and Lentz, B.R. (2004). Energetics of vesicle fusion intermediates: comparison of calculations with observed effects of osmotic and curvature stresses. *Biophys J* 86, 2951-2964.
46. Haque, M.E. and Lentz, B.R. (2004). Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: studies of lipid perturbant effects. *Biochemistry* 43, 3507-3517.
47. Yang, L. and Huang, H.W. (2002). Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* 297, 1877-1879.
48. Lee, J. and Lentz, B.R. (1997). Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry* 36, 6251-6259.
49. Poschner, B.C., Fischer, K., Herrmann, J.R., Hofmann, M.W. and Langosch, D. (2010). Structural features of fusogenic model transmembrane domains that differentially regulate inner and outer leaflet mixing in membrane fusion. *Mol Membr Biol* 27, 1-11.

50. Hofmann, M. (2005). Design und funktionelle Charakterisierung neuartiger membranfusogener Peptidsequenzen, Technische Universität München.
51. Smeijers, A.F., Pieterse, K., Markvoort, A.J. and Hilbers, P.A. (2006). Coarse-grained transmembrane proteins: hydrophobic matching, aggregation, and their effect on fusion. *J Phys Chem B* *110*, 13614-13623.
52. Lentz, B.R., Talbot, W., Lee, J. and Zheng, L.X. (1997). Transbilayer lipid redistribution accompanies poly(ethylene glycol) treatment of model membranes but is not induced by fusion. *Biochemistry* *36*, 2076-2083.
53. Evans, K.O. and Lentz, B.R. (2002). Kinetics of lipid rearrangements during poly(ethylene glycol)-mediated fusion of highly curved unilamellar vesicles. *Biochemistry* *41*, 1241-1249.
54. Kornberg, R.D. and McConnell, H.M. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* *10*, 1111-1120.
55. McIntyre, J.C. and Sleight, R.G. (1991). Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* *30*, 11819-11827.
56. Wimley, W.C. and Thompson, T.E. (1991). Transbilayer and interbilayer phospholipid exchange in dimyristoylphosphatidylcholine/dimyristoylphosphatidylethanolamine large unilamellar vesicles. *Biochemistry* *30*, 1702-1709.
57. Bai, J. and Pagano, R.E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* *36*, 8840-8848.
58. John, K., Schreiber, S., Kubelt, J., Herrmann, A. and Muller, P. (2002). Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes. *Biophys J* *83*, 3315-3323.
59. Armstrong, V.T., Brzustowicz, M.R., Wassall, S.R., Jenki, L.J. and Stillwell, W. (2003). Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys* *414*, 74-82.
60. Seigneuret, M. and Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3751-3755.
61. Morrot, G., Herve, P., Zachowski, A., Fellmann, P., and Devaux, P.F. (1989). Aminophospholipid translocase of human erythrocytes: phospholipid substrate specificity and effect of cholesterol. *Biochemistry* *28*, 3456-3462.

62. Vehring, S., Pakkiri, L., Schroer, A., Alder-Baerens, N., Herrmann, A., Menon, A.K. and Pomorski, T. (2007). Flip-flop of fluorescently labeled phospholipids in proteoliposomes reconstituted with *Saccharomyces cerevisiae* microsomal proteins. *Eukaryot Cell* *6*, 1625-1634.
63. Miranda, P.B. and Shen, Y.R. (1999). Liquid Interfaces: A Study by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* *103*, 3292-3307.
64. Shen, Y.R. (1989). Surface properties probed by second-harmonic and sum-frequency generation *Nature* *337*, 519-525.
65. Liu, J. and Conboy, J.C. (2004). Direct measurement of the transbilayer movement of phospholipids by sum-frequency vibrational spectroscopy. *J Am Chem Soc* *126*, 8376-8377.
66. Anglin, T.C. and Conboy, J.C. (2009). Kinetics and thermodynamics of flip-flop in binary phospholipid membranes measured by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biochemistry* *48*, 10220-10234.
67. Anglin, T.C., Brown, K.L. and Conboy, J.C. (2009). Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and melittin. *J Struct Biol* *168*, 37-52.
68. Anglin, T.C., Liu, J. and Conboy, J.C. (2007). Facile lipid flip-flop in a phospholipid bilayer induced by gramicidin A measured by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Biophys J* *92*, L01-03.
69. Tieleman, D.P. and Marrink, S.J. (2006). Lipids out of equilibrium: energetics of desorption and pore mediated flip-flop. *J Am Chem Soc* *128*, 12462-12467.
70. Gurtovenko, A.A. and Vattulainen, I. (2007). Molecular mechanism for lipid flip-flops. *J Phys Chem B* *111*, 13554-13559.
71. Gurtovenko, A.A., Onike, O.I. and Anwar, J. (2008). Chemically induced phospholipid translocation across biological membranes. *Langmuir* *24*, 9656-9660.
72. Sapay, N., Bennett, W.F. and Tieleman, D.P. (2010). Molecular simulations of lipid flip-flop in the presence of model transmembrane helices. *Biochemistry* *49*, 7665-7673.
73. Kol, M.A., de Kroon, A.I., Rijkers, D.T., Killian, J.A. and de Kruijff, B. (2001). Membrane-spanning peptides induce phospholipid flop: a model for phospholipid translocation across the inner membrane of *E. coli*. *Biochemistry* *40*, 10500-10506.

74. Kol, M.A., van Laak, A.N., Rijkers, D.T., Killian, J.A., de Kroon, A.I. and de Kruijff, B. (2003). Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry* *42*, 231-237.
75. Hofmann, M.W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J. and Langosch, D. (2004). De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14776-14781.
76. Sengupta, D., Meinhold, L., Langosch, D., Ullmann, G.M. and Smith, J.C. (2005). Understanding the energetics of helical peptide orientation in membranes. *Proteins* *58*, 913-922.
77. Langosch, D., Crane, J.M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L.K. and Reed, J. (2001). Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *J Mol Biol* *311*, 709-721.
78. Langosch, D., Brosig, B. and Pipkorn, R. (2001). Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J Biol Chem* *276*, 32016-32021.
79. Dennison, S.M., Greenfield, N., Lenard, J. and Lentz, B.R. (2002). VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion. *Biochemistry* *41*, 14925-14934.
80. Cleverley, D.Z. and Lenard, J. (1998). The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3425-3430.
81. Minor, D.L., Jr. and Kim, P.S. (1994). Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* *367*, 660-663.
82. Street, A.G. and Mayo, S.L. (1999). Intrinsic beta-sheet propensities result from van der Waals interactions between side chains and the local backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9074-9076.
83. Li, S.C. and Deber, C.M. (1992). Glycine and beta-branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments. *FEBS Lett* *311*, 217-220.
84. Poschner, B.C. (2008). Funktion und Helixdynamik membranfusogener Peptide, Technische Universität München.
85. Hofmann, M.W., Poschner, B.C., Hauser, S. and Langosch, D. (2007). pH-Activated fusogenic transmembrane LV-peptides. *Biochemistry* *46*, 4204-4209.

86. Poschner, B.C., Quint, S., Hofmann, M.W. and Langosch, D. (2009). Sequence-specific conformational dynamics of model transmembrane domains determines their membrane fusogenic function. *J Mol Biol* 386, 733-741.
87. Devaux, P.F., Fellmann, P. and Herve, P. (2002). Investigation on lipid asymmetry using lipid probes: Comparison between spin-labeled lipids and fluorescent lipids. *Chem Phys Lipids* 116, 115-134.
88. Huster, D., Muller, P., Arnold, K. and Herrmann, A. (2001). Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophys J* 80, 822-831.
89. Devaux, P.F. (2002). Reconstitution of flippase activity into liposomes. *Cell Mol Biol Lett* 7, 227-229.
90. Mazeres, S., Schram, V., Tocanne, J.F. and Lopez, A. (1996). 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labeled phospholipids in lipid membranes: differences in fluorescence behavior. *Biophys J* 71, 327-335.
91. Huster, D., Muller, P., Arnold, K. and Herrmann, A. (2003). Dynamics of lipid chain attached fluorophore 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) in negatively charged membranes determined by NMR spectroscopy. *Eur Biophys J* 32, 47-54.
92. Poschner, B.C., Reed, J., Langosch, D. and Hofmann, M.W. (2007). An automated application for deconvolution of circular dichroism spectra of small peptides. *Anal Biochem* 363, 306-308.
93. Stelzer, W., Poschner, B.C., Stalz, H., Heck, A.J., and Langosch, D. (2008). Sequence-specific conformational flexibility of SNARE transmembrane helices probed by hydrogen/deuterium exchange. *Biophys J* 95, 1326-1335.
94. Margittai, M., Otto, H., and Jahn, R. (1999). A stable interaction between syntaxin 1a and synaptobrevin 2 mediated by their transmembrane domains. *FEBS Lett* 446, 40-44.
95. Hohl, T.M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J.E., Sollner, T.H. and Engelhardt, H. (1998). Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol Cell* 2, 539-548.
96. Wada, Y., Nakamura, N., Ohsumi, Y. and Hirata, A. (1997). Vam3p, a new member of syntaxin related protein, is required for vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 110 (Pt 11), 1299-1306.
97. Hofmann, M.W., Peplowska, K., Rohde, J., Poschner, B.C., Ungermann, C. and Langosch, D. (2006). Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J Mol Biol* 364, 1048-1060.

98. Dickey, A. and Faller, R. (2008). Examining the contributions of lipid shape and headgroup charge on bilayer behavior. *Biophys J* 95, 2636-2646.
99. Chernomordik, L., Kozlov, M.M. and Zimmerberg, J. (1995). Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol* 146, 1-14.
100. Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831-846.
101. Quint, S., Widmaier, S., Minde, D., Hornburg, D., Langosch, D. and Scharnagl, C. (2010). Residue-specific side-chain packing determines the backbone dynamics of transmembrane model helices. *Biophys J* 99, 2541-2549.
102. Ollesch, J., Poschner, B.C., Nikolaus, J., Hofmann, M.W., Herrmann, A., Gerwert, K. and Langosch, D. (2008). Secondary structure and distribution of fusogenic LV-peptides in lipid membranes. *Eur Biophys J* 37, 435-445.
103. Johansson, A.C. and Lindahl, E. (2006). Amino-acid solvation structure in transmembrane helices from molecular dynamics simulations. *Biophys J* 91, 4450-4463.
104. Jaud, S., Fernandez-Vidal, M., Nilsson, I., Meindl-Beinker, N.M., Hubner, N.C., Tobias, D.J., von Heijne, G. and White, S.H. (2009). Insertion of short transmembrane helices by the Sec61 translocon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11588-11593.
105. Khandelia, H., Ipsen, J.H. and Mouritsen, O.G. (2008). The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1528-1536.
106. Killian, J.A. and Nyholm, T.K. (2006). Peptides in lipid bilayers: the power of simple models. *Curr Opin Struct Biol* 16, 473-479.
107. Marsh, D. (2008). Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1545-1575.
108. Nyholm, T.K., Ozdirekcan, S. and Killian, J.A. (2007). How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry* 46, 1457-1465.
109. Poschner, B.C. and Langosch, D. (2009). Stabilization of conformationally dynamic helices by covalently attached acyl chains. *Protein Sci* 18, 1801-1805.

110. de Planque, M.R., Kruijtzter, J.A., Liskamp, R.M., Marsh, D., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., 2nd, de Kruijff, B. and Killian, J.A. (1999). Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J Biol Chem* 274, 20839-20846.
111. Killian, J.A. (1998). Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1376, 401-415.
112. de Planque, M.R. and Killian, J.A. (2003). Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol* 20, 271-284.
113. de Planque, M.R., Bonev, B.B., Demmers, J.A., Greathouse, D.V., Koeppe, R.E., 2nd, Separovic, F., Watts, A. and Killian, J.A. (2003). Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochemistry* 42, 5341-5348.
114. Strandberg, E. and Killian, J.A. (2003). Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get? *FEBS Lett* 544, 69-73.
115. Chamberlain, A.K., Lee, Y., Kim, S. and Bowie, J.U. (2004). Snorkeling preferences foster an amino acid composition bias in transmembrane helices. *J Mol Biol* 339, 471-479.
116. Kandasamy, S.K. and Larson, R.G. (2006). Molecular dynamics simulations of model trans-membrane peptides in lipid bilayers: a systematic investigation of hydrophobic mismatch. *Biophys J* 90, 2326-2343.
117. Zheng, C. and Vanderkooi, G. (1992). Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: calculation of the electrostatic potential. *Biophys J* 63, 935-941.
118. Clarke, R.J. (2001). The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Adv Colloid Interface Sci* 89-90, 263-281.
119. Tsui, F.C., Ojcius, D.M. and Hubell, W.L. (1986). The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophys. J.* 49, 459-468.
120. Killian, J.A. (2003). Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett* 555, 134-138.
121. Lafleur, M., Bloom, M., Eikenberry, E.F., Gruner, S.M., Han, Y., and Cullis, P.R. (1996). Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order. *Biophys J* 70, 2747-2757.

122. Shahidullah, K. and London, E. (2008). Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids. *J Mol Biol* *379*, 704-718.
123. Langosch, D., Hofmann, M. and Ungermann, C. (2007). The role of transmembrane domains in membrane fusion. *Cell Mol Life Sci* *64*, 850-864.
124. Liu, T., Wang, T., Chapman, E.R. and Weisshaar, J.C. (2008). Productive hemifusion intermediates in fast vesicle fusion driven by neuronal SNAREs. *Biophys J* *94*, 1303-1314.
125. Kulakowska, A., Jurkiewicz, P., Sykora, J., Benda, A., Mely, Y., and Hof, M. Fluorescence lifetime tuning--a novel approach to study flip-flop kinetics in supported phospholipid bilayers. *J Fluoresc* *20*, 563-569.
126. Bennett, W.F., MacCallum, J.L. and Tieleman, D.P. (2009). Thermodynamic analysis of the effect of cholesterol on dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes. *J Am Chem Soc* *131*, 1972-1978.
127. Nikolaus, J., Stockl, M., Langosch, D., Volkmer, R. and Herrmann, A. (2010). Direct visualization of large and protein-free hemifusion diaphragms. *Biophys J* *98*, 1192-1199.
128. Agrawal, P., Kiihne, S., Hollander, J., Hofmann, M., Langosch, D. and de Groot, H. (2010). A solid-state NMR study of changes in lipid phase induced by membrane-fusogenic LV-peptides. *Biochim Biophys Acta* *1798*, 202-209.
129. Langosch, D. and Arkin, I.T. (2009). Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Sci* *18*, 1343-1358.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur eines Phospholipids am Beispiel von Dioctadecanoylphosphatidylcholin.	3
Abb. 2: Darstellung des molekularen Aufbaus von Phospholipiden und der daraus resultierenden Überstrukturen.	4
Abb. 3: Darstellung thermotropher Phasenzustände von Lipiddoppelschichten.	5
Abb. 4: Phospholipidverteilung in der Plasmamembran von menschlichen Erythrozyten.	7
Abb. 5: Modell des „Slip-Pop-Mechanismus“ für die Phospholipidtranslokation in biologischen Membranen.	10
Abb. 6: Ablauf der Membranfusion von Vesikeln gemäß der „Stalk-Hypothese“.	11
Abb. 7: Schematische Darstellung der peptidinduzierten Membranfusion.	15
Abb. 8: Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Kinetik der LV-Peptide in liposomalen Membranen. ..	16
Abb. 9: Struktur der kurzkettigen NBD-Phospholipidanaloga.	17
Abb. 10: Reduktionsreaktion von NBD durch Dithionit (DTN).	18
Abb. 11: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Ermittlung von Flip-Ereignissen.	19
Abb. 12: Primärstruktur der verwendeten Modellpeptide.	30
Abb. 13: Dithionit (DTN)-Bleich-Kinetik NBD-markierter Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1) mit 1 mol-% LLV16.	32
Abb. 14: Flip-Aktivität von Peptiden gleicher Länge mit unterschiedlichem Leu/Val-Anteil in der hydrophoben Kernsequenz.	34
Abb. 15: Flip-Aktivität von Peptiden mit gleichem Leu/Val-Anteil in der hydrophoben Kernsequenz und unterschiedlicher Länge.	36
Abb. 16: Flip-Aktivität einer LV16-Sequenz mit einer N-terminalen Palmitoyl-Kette (ac16-LV16).	37
Abb. 17: Flip-Aktivität von Peptiden in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Lys- und His-Aminosäuren.	38
Abb. 18: Sekundärstruktur His- und Lys-flankierter Peptide.	40
Abb. 19: Flip-Aktivität von Syb-TMD-Peptiden mit unterschiedlichen Anteilen an β -verzweigten Aminosäuren.	42
Abb. 20: Flip-Aktivität eines Syx-TMD- (Syx-wt) und Vam3p-TMD-Peptids (Vam3p-wt).	43
Abb. 21: Peptidinduzierter C ₆ NBD-PC-Flip von LV-Peptiden.	45

Abb. 22: Peptidinduzierter C ₆ NBD-PS-Flip von LV-Peptiden.....	46
Abb. 23: Peptidinduzierter C ₆ NBD-PE-Flip von LV-Peptiden.....	47
Abb. 24: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die peptidinduzierte Liposomenfusion und den Flip von C ₆ NBD-PC..	48
Abb. 25: Einfluss der Peptidsequenz LV16 und L16 auf die DTN-Bleichung von NBD-markierten Liposomen aus PC/DOPS/DOPE (3:1:1).	49
Abb. 26: Struktur von Lysophosphatidylcholin.	50
Abb. 27: Einfluss von LPC auf die peptidinduzierte Fusion für LV16 (1 mol-%).	51
Abb. 28: Einfluss von LPC auf den peptidinduzierten Flip von LV-Peptiden.....	52
Abb. 29: Einfluss von Cholesterol auf den peptidinduzierten Flip der SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt sowie dem LV-Peptid LV16.	53
Abb. 30: Einfluss von Cholesterol auf die peptidinduzierte Fusion der SNARE-Peptide Syx-wt und Syb-wt sowie dem LV-Peptid LV16.	54
Abb. 31: Graphische Darstellung der Dynamik von LV-Peptiden.....	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Lipide.....	21
--------------------------------	----

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Circularer Dichroismus
Chol	Cholesterol
D/H	Deuterium/Wasserstoff
d.h.	das heißt
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	Diolelylphosphatidylethanolamin
DOPS	Diolelylphosphatidylserin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC	Distearoylphosphatidylcholin
DTN	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FTIR	Fouriertransformation Infrarot
Kap.	Kapitel
LPC	Lysophosphatidylcholin
NBD	7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol
NSF	N-Ethylmaleimid sensitive factor
P/L	Peptid/Lipid
PC	Phosphatidylcholin
PDA	Photodiodenarray
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
POPC	Palmitylolelylphosphatidylcholin
PS	Phosphatidylserin
R _f	Retentionsfaktor

Rh	Lissamin-Rhodamin B sulfonsäure
SFG	Summenfrequenzschwingung
SM	Sphingomyelin
SNARE	soluble NSF protein receptor
SUV	small unilamellar vesicle
Syb	Synaptobrevin
Syx	Syntaxin
Tab.	Tabelle
TFE	Trifluorethanol
TMD	Transmembrandomäne
vergl.	vergleich
VSV	vesikulärer Stomatitis Virus
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Lebenslauf***Persönliche Angaben***

Name: Marcella Langer
Geburtsdatum/-ort: 06.08.1983, Görlitz
Wohnsitz: Giggenhauser Str. 22, 85354 Freising

Schulische Ausbildung

1990 – 1992 Elisabethschule Görlitz (Grundschule)
1992 – 1994 Grundschule Hähnichen
1994 – 2002 Städtisches Gymnasium Rothenburg,
Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/2002 – 04/2007 Biologiestudium, Universität Bayreuth
Schwerpunkt: Molekular- und Zellbiologie
Diplomarbeit: „Produktion mikrobieller
Sekundärstoffe in adephtagen Wasserkäfern“
04/2007 Abschluss des Studiums mit dem Titel:
Diplom-Biologin (Dipl.-Biol.-Univ.)
seit 06/2007 Promotion an der TU München am Lehrstuhl für
Chemie der Biopolymere bei Prof. Dr. D. Langosch

Sonstige Tätigkeiten

04/2005 – 06/2005 Wissenschaftliche Hilfsmitarbeiterin am Lehrstuhl
für Pflanzenökologie, Universität Bayreuth

Sprachenkenntnisse

Englisch, Grundkenntnisse Französisch