

Technische Universität München
Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Design und funktionelle Charakterisierung neuartiger membranfusogener Peptidsequenzen

Mathias Hofmann

(staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker)

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Josef Friedrich

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra

Die Dissertation wurde am 21. Juli 2005 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02. November 2005 angenommen.

Meinen Lieben

*Die wahren Optimisten sind nicht überzeugt, dass alles gut gehen wird,
aber sie sind überzeugt, dass nicht alles schief gehen kann.*



(Friedrich Schiller)

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für die Offerierung des Projektes sowie die ständigen fruchtbaren Diskussionen während dessen Fortschreitens und vor allem für die mir eingeräumten forschersichen Freiheiten,

meinen Kooperationspartnern Katrin Weise, Julian Ollesch, Prashant Agrawal sowie deren Betreuern Prof. Dr. Jennifer Reed, DKFZ Heidelberg; Prof. Dr. Klaus Gerwert, Universität Bochum; Prof. Dr. Huub de Groot und Dr. Frans Hulsbergen, Universität Leiden, NL für die erfolgreiche Zusammenarbeit sowie die hilfreichen Ideen bei den Treffen innerhalb unseres Forschungsprojektes, sowie der VW-Stiftung für die finanziellen Rahmenbedingungen,

Stephanie Hauser und Florian Rieß für die fleißige Arbeit während ihrer Praktikantentätigkeit

Dr. Markus Gütlich für seinen unerschöpflichen Ideenreichtum und Walter Stelzer für die fachliche und technische Unterstützung am Massenspektrometer,

Dr. Holger Stalz, Eric Lindner und Bernhard Poschner für die unzähligen weiterführenden abendlichen Diskussionsrunden etc.,

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen Diskussionen, Ideen und Anregungen,

allen Leuten aus meinem Freundeskreis, die mich stets von neuem motiviert haben, meiner gesamten Familie für die mich anspornenden Worte und meiner Hande.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Membranfusion.....	2
1.2 Übergangszustände bei der Membranfusion.....	9
1.3 Rolle der Transmembrandomänen von fusogenen Membranproteinen bei der Membranfusion.....	13
1.4 Liposomenfusion durch FRET.....	16
2 Ziel der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Materialien.....	20
3.2 Geräte.....	21
3.3 Methoden.....	22
3.3.1 Peptidquantifizierung.....	22
3.3.2 Aufreinigung von Peptiden mittels Festphasenextraktion.....	23
3.3.3 HPLC und Massenspektrometrie.....	23
3.3.4 Herstellung von Liposomen und Messung der Fusionskinetiken.....	24
3.3.5 Bestimmung des P/L-Verhältnisses.....	26
3.3.6 Auswertung der Fusionskinetiken.....	27
3.3.7 Liposomenfusion mit Histidin-Peptiden.....	27
3.3.8 Aminopyrazol / Peptid Interaktionen.....	28
3.3.8.1 Kosolubilisierung.....	28
3.3.8.2 Massenspektrometrie.....	28
4 Ergebnisse.....	30
4.1 Peptide.....	30
4.1.1 Reinheit.....	30
4.1.2 Entfernung von <i>p</i> -Kresol bei Peptiden aus der Boc-Synthese.....	31
4.2 Peptidinduzierte Liposomenfusion.....	34

4.2.1	Design der Peptide.....	34
4.2.2	Liposomenfusion durch Peptide unterschiedlicher Länge.....	36
4.2.3	Sequenzspezifische peptidinduzierte Fusion.....	38
4.2.4	Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Fusion.....	41
4.2.4.1	Fusion durch Peptide ohne N-terminale Lysine.....	41
4.2.4.2	Fusion in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Aminosäuren.....	43
4.3	Einfluss von Lipiden auf die peptidinduzierte Membranfusion.....	46
4.3.1	Fusion von Liposomen unterschiedlicher Nettoladung.....	47
4.3.2	Synthetische Lipide.....	49
4.3.3	Fusion von Liposomen mit DHA-Lipiden.....	52
4.4	Einfluss von Liganden auf fusogene Peptide.....	56
4.4.1	Steigerung der Fusogenität durch ein dimeres Aminopyrazolderivat.....	56
4.4.2	Interaktion von Ligand mit Peptid.....	60
4.5	Fusogene Wirkung von SNARE-TMD-Peptiden aus Hefe.....	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Ermittlung und Optimierung der Reinheit von synthetischen Peptiden.....	65
5.2	Membranfusogene Eigenschaften <i>de novo</i> kreierter Peptide.....	67
5.2.1	Flexibilität des hydrophoben Kerns fördert Fusion.....	67
5.2.2	Bedeutung der flankierenden Aminosäuren.....	71
5.3	Lipide bei der Membranfusion.....	76
5.4	Steigerung der Fusogenität von Peptiden durch AmpOX.....	80
5.5	Charakterisierung der fusogenen Eigenschaften eines SNARE-TMD-Peptids.....	83
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	85
6	Literaturverzeichnis.....	89
	Abbildungsverzeichnis.....	96
	Verwendete Abkürzungen.....	98
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	100
	Lebenslauf.....	101

Zusammenfassung

Die Fusion von biologischen Membranen wird durch integrale Membranproteine wie zum Beispiel SNARE (soluble NSF [N-ethylmaleimide sensitive factor] protein receptor)-Proteine oder eine Vielfalt viraler Fusionsproteine gesteuert. Dabei sorgen membranextrinsische Domänen für die Erkennung spezifischer Zielmembranen und vermitteln die Annäherung in einem frühen Stadium der Membranfusion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass den Transmembrandomänen (TMDn) eine entscheidende Rolle bei der Fusion zukommt. So kann ihr Ersatz bzw. die Veränderung ihrer Sequenz zu einer nicht vollständigen Fusion führen. Bei TMD-Peptiden von SNARE-Proteinen sowie viralen Fusionsproteinen deutete sich ein Zusammenhang zwischen Fusogenität und struktureller Plastizität an.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine systematische Charakterisierung der Rolle der TMDn bei der Membranfusion. Basierend auf hydrophoben Aminosäuren mit unterschiedlichen Sekundärstrukturpräferenzen wurde eine Reihe von TMD-Peptiden *de novo* entworfen. Die Peptide wurden in Liposomen rekonstituiert und ihre fusogenen Eigenschaften systematisch ermittelt. Es zeigte sich, dass die Fusogenität der Peptide von der Länge der hydrophoben Kernsequenz abhängig ist. Im verwendeten System stellte eine hydrophobe Länge von 16 Aminosäuren das Optimum dar. Bei gleicher Länge korrelierten die Fusionswerte mit dem Verhältnis von β -Faltblatt begünstigenden Valin- zu α -Helix favorisierenden Leucinresten. So wies eine alternierende Leu-Val Sequenz (LV16) eine etwa 20-fache Fusogenität im Vergleich zu einer reinen Leu-Sequenz (L16) auf. Diese konnte ferner durch die Einfügung von helix-destabilisierenden Glycin- und Prolinresten nochmals um das Doppelte gesteigert werden. Die Mutation von β -verzweigten Aminosäuren in einem TMD-Peptid eines SNARE-Proteins führte im Gegenzug zu verringerten Fusogenitäten. Sekundärstrukturanalysen zeigten zudem, dass helix-destabilisierende Aminosäuren in der Sequenz eine stärkere Neigung des Peptids zur Umfaltung zwischen helikaler und faltblattartiger Struktur bewirken. Neben der hydrophoben Kernsequenz wurden auch Effekte durch die terminalen Aminosäuren eruiert. Hier zeigte sich, dass der ungeladene Zustand dieser Gruppen zu stark reduzierter Fusion führt. Durch ihre Protonierung konnte ihre Fusogenität allerdings wiederhergestellt werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit von durch pH-Absenkung gezielt induzierbaren Fusionsereignissen.

Konformationelle Flexibilität von membranständigen Fusionsproteindomänen stellt somit eine strukturelle Voraussetzung für deren fusogene Wirkung dar. Lipide unterschiedlicher Form sowie Nettoladung veränderten unabhängig von der Struktur der Peptide das Ausmaß der Fusion. Sowohl die Plastizität der Peptide als auch die Form der Lipide wirken sich daher auf die Restrukturierung der Lipiddoppelschicht aus und sind deshalb für die Fusion von Membranen von hoher Bedeutung.

1 Einleitung

1.1 Membranfusion

Das Auftreten von Membranen im Laufe der Evolution leitete die Ausbildung des eigentlichen Lebens ein. Sie stellen das Grundgerüst von zellulären Strukturen dar und ermöglichen die Kompartimentierung von Organellen, genetischem Material und Metaboliten. Das Grundgerüst von Membranen bilden lamellare Lipiddoppelschichten in flüssig-kristallinem Zustand. Die Freiheitsgrade der Bewegung der Lipide stehen im direkten Zusammenhang mit der Elastizität der Doppelschicht sowie den Membranfunktionen. Die Bedeutung der Lipiddynamik wird im „fluid-mosaic“ Modell für Biomembranen deutlich [1]. Hierin wird die flüssig-kristalline Natur von Lipiddoppelschichten als Matrix biologischer Membranen bezeichnet. Dies führte zu der Vorstellung von Membranen als zweidimensional orientierte viskose Flüssigkeiten. Die Aufrechterhaltung der Beschaffenheit einer Membran durch Vermeidung spontaner Fusion ist für das Überleben einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Grundlegende Zellfunktionen erfordern andererseits die regulierte Fusion von intrazellulären Membranen, wodurch die Ausbildung und das Überleben von mehrzelligen Organismen erst ermöglicht wird [2]. Die Fusion von Lipiddoppelschichten eukaryotischer Zellen ist deshalb ein fundamentaler biologischer Prozess. Sie tritt auf, wenn zwei separate Lipiddoppelschichten zu einer einzelnen Membran verschmelzen. Dabei können mindestens drei Typen unterschieden werden. i.) Extrazelluläre Fusion von eukaryotischen Zellen wie bei der Ausbildung von Muskeln und Knochen oder der Verschmelzung eines Spermiums mit der Eizelle bei der Befruchtung. ii.) Fusion der Nucleocapsidmembranen von Viren mit der endosomalen Membran nach Endocytose oder Fusion mit der Plasmamembran von Wirtszellen bei einer Virusinfektion. iii.) Intrazelluläre Fusion zwischen verschiedenen Organellen. Hierzu zählen beispielsweise Fusions- und Fissionsvorgänge von Transportvesikeln an subzellulären Kompartimenten während des sekretorischen Wegs sowie die Fusion von präsynaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran von Nervenzellen und der regulierten Exocytose von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt bei der neuronalen Reizweiterleitung [3-5].

Die Fusion von eukaryotischen Zellen ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene Fusionsproteine gesteuert wird. Ein sehr detailliert erforschtes Beispiel ist die Befruchtung bei Säugetieren [2]. Neben einer Vielzahl vorausgehender Prozesse wurde hierbei eine Reihe von Proteinen identifiziert, die für die Steuerung der Membranfusion verantwortlich sind. Es stellte sich heraus, dass sog. ADAM-Transmembranproteine („A Disintegrin and Metalloprotease“), die auf dem Spermium lokalisiert sind, sowie verschiedene Integrine auf der Oberfläche der Eizelle einen entscheidenden Beitrag leisten [6]. Kürzlich wurde zudem ein Membranprotein auf Spermien identifiziert, bei dessen Fehlen die Spermien von Mäusen zwar keine morphologischen Defekte

aufwiesen, es allerdings nicht zur Befruchtung der Eizelle kam. Dieses Protein wurde „Izumo“ genannt und ist auch bei der humanen Fertilisation beteiligt [7]. Trotz dieser neuerlichen Fortschritte bleiben die Vorgänge bei der Fusion von Plasmamembranen noch weitgehend ungeklärt.

Eine virale Infektion endet in einer Übertragung des genetischen Materials des Virus auf die Wirtszelle. Dabei erfolgt die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran, welche durch Membranglykoproteine koordiniert wird. Die dabei auftretenden Vorgänge sind für eine Reihe von Viren detailliert erforscht. Man unterscheidet zwei Typen von Fusionsproteinen auf Basis ihrer anfänglichen Konformation.

Influenza Viren zählen zur Gruppe der Orthomyxoviren. Influenza Hämagglutinin (HA) stellt dabei das fusogene Glykoprotein dar. Aufgrund seiner Struktur ist HA ein Beispiel für virale Hüllproteine bei Viren der Typs I. Zu dieser Klasse gehören unter anderem auch das zur Gruppe der Retroviren zählende Human Immunodeficiency Virus (HIV) sowie die Gruppe der Paramyxoviren und auch das der Gruppe der Fadenviren angehörende Ebola Virus [5,8,9]. HA ist das erste Protein dieses Typs, dessen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse geklärt werden konnte [10]. Es handelt sich um ein trimeres Glykoprotein, dessen Hauptmerkmal eine zentrale superhelikale Struktur aus drei langen α -Helices darstellt, die jeweils aus unterschiedlichen Untereinheiten stammen. HA wird vom Virus als Precursorprotein synthetisiert (HA0), dessen Struktur ebenfalls ermittelt werden konnte [11]. Durch proteolytische Spaltung bei Arg329 zerfällt es in die Fragmente HA1 und HA2 und wird so aktiviert. Nach Rezeptorbindung an die Plasmamembran der Zielzelle erfolgt die Endozytose des Virions. Durch die pH-Absenkung auf im Endosom wird in HA ein Umfaltungsprozess initiiert, der die Fusion von Virus- und endosomaler Membran einleitet. Neben der bekannten Röntgenstrukturen von HA sowohl bei neutralem pH-Wert [10] konnte auch die Röntgenstruktur einer Variante des HA-Proteins (TBHA2) bei pH 5 ermittelt werden [12]. Beim Vergleich beider Strukturen zeigte sich, dass durch Restrukturierung einer Schleifenregion („loop“) in eine Helix sowie einer in umgekehrter Weise erfolgende Restrukturierung eines helikalen Bereiches in einen Loop die Relokalisation des zentralen Bereichs des Proteins um etwa 100Å zum C-Terminus hin erfolgt [8,9]. In der Struktur bei pH 5 liegt das N-terminale Fusionspeptid näher an der C-terminalen Transmembrandomäne (TMD). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mehrere Modelle für die Membranfusion Viren mit Fusionsproteinen vom Typ I vorgeschlagen, die sich in der Rolle des Fusionspeptids während der eigentlichen Fusion unterscheiden [4]. Eine Möglichkeit ist dabei, dass das hydrophobe Fusionspeptid zunächst in die Zielmembran eindringt und durch Umfaltung im Zentrum des Proteins eine Drehung des durch die TMD in der Virusmembran verankerten Fusionsproteins um 180° erfolgt. Daraus resultierte eine Annäherung an die endosomale Membran [12]. In der finalen Struktur befinden sich Fusionspeptid und TMD wieder am gleichen Ende des Proteins, das ein Trimer aus helikalen Haarnadelmotiven darstellt. Durch die damit

verbundene Annäherung der beiden Membranen wird deren Fusion initiiert [5,9,13]. Neben diesem Modell wird allerdings noch ein weiterer Weg diskutiert. Aus der Insertion des Fusionspeptids in die Virusmembran und einer damit verbundenen Zugkraft könnte diese stark gekrümmt werden. Bei Anhaften des Virusproteins an der endosomalen Zielmembran würde durch die dort induzierte Krümmung eine Annäherung der virale Membran resultieren und die Fusion erfolgen [14]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der gleichzeitigen Insertion des Fusionspeptids sowohl in Virus- als auch Zielmembran. In diesem veralteten Modell würden die Fusionsproteine ihre Fusionpeptide, wie aus einer Pistole abgefeuert, willkürlich auf beide Membranen verteilen. Durch Umfaltungsprozesse würden dann die Membranen angenähert und schließlich fusioniert werden [15]. Anhand der gefundenen Ergebnisse zeigt sich zwar, dass das Fusionsprotein von Typ I eine Annäherung der Virusmembran an die Zielmembran durch eine konformationelle Änderung der Struktur seiner Coiled-coil Domäne bewerkstelligt, wie es aber letztendlich zur Fusion kommt, konnte nicht erschöpfend geklärt werden [4].

Im Gegensatz zu Typ I besitzen virale Fusionsproteine des Typs II eine vollkommen andere Struktur. Zu ihnen zählen unter anderem E-Glykoproteine aus Flavi- und Alphaviren wie das Semliki Forest Virus (SFV). Die Sekundärstruktur der Fusionsproteine besteht hier in erster Linie aus β -Strängen [16]. Zudem verfügen Typ II Proteine über ein internes und kein terminales Fusionspeptid. Ihre Fusion an der Zielmembran erfolgt schneller und weniger anfällig für niedrige Temperaturen [17,18]. Trotz dieser großen Unterschiede konnte gezeigt werden, dass sowohl virale Fusionsproteine von Typ I als auch von Typ II während der Fusion ähnliche Zwischenstufen durchlaufen. Dies wird als starker Hinweis auf einen zugrundeliegenden universellen Fusionsmechanismus gewertet [19].

In eukaryotischen Zellen sind sowohl bei der Fusion von intrazellulären Transportvesikeln entlang des sekretorischen Wegs als auch bei der Neurotransmitterausschüttung aus präsynaptischen Nervenzellen in den synaptischen Spalt eine Reihe von Proteinen aus verschiedenen Familien involviert, unter anderem auch die Rab-Proteine.

Rab-Proteine zählen zur Familie kleiner GTP (Guanosintriphosphat)-bindender Proteine. Sie regulieren die Membranfusion von sekretorischen Vesikeln (SV) an verschiedenen subzellulären Kompartimenten. Die Untergruppe der Rab3-Proteine wird für die Limitierung der Neurotransmitterausschüttung nach Induzierung durch ein Ca^{2+} -Signal verantwortlich gemacht. Sie verfügen über keine TMD und sind durch Prenylanker auf der cytosolischen Seite der Membran von synaptischen Vesikeln lokalisiert. Es wurde postuliert, dass Rab-Proteine im an GTP gebundenen Zustand durch Interaktion mit Rabphilin, einem peripheren Membranprotein auf synaptischen Vesikeln und RIM (Rab3 interacting molecule) für eine spezifische Platzierung der Transportvesikel

in der Zelle („targeting“) sowie für eine Steuerung der Fusion der Vesikel verantwortlich sind [20,21].

Neben den Rab-Proteinen sind bei der gezielten Annäherung von synaptischen Vesikeln weitere Faktoren, sog. „tethering“-Faktoren verantwortlich. Diese Vorgänge werden als erster Schritt bei der Annäherung von Vesikeln und der resultierenden Fusion an der Zielmembran bezeichnet [22-24].

Nach einer spezifischen Annäherung der Membran an die Zielmembran erfolgt die Einleitung des Fusionsereignisses durch SNARE-Proteine. Sie besitzen das für sie charakteristische SNARE-Motiv. Dieses besteht aus etwa 50 bis 60 Aminosäuren, welche acht für die Ausbildung von Coiled-coil Domänen typische helikale „heptad repeat“-Muster enthalten [25]. SNARE-Proteine sind auch bei der Exozytose, d.h. der Fusion von intrazellulären Transportvesikeln mit der Plasmamembran der Zelle, beteiligt. Dabei erlaubt die regulierte Exocytose die kontrollierte Sekretion.

Eine überwältigende Zahl von Arbeiten an SNARE-Proteinen deutet darauf hin, dass SNARE-Proteine für intrazelluläre Fusionsvorgänge ausschlaggebend sind. Am besten charakterisiert sind dabei die SNARE-Proteine bei der Neurotransmitterausschüttung durch Nervenzellen in den synaptischen Spalt, welche die Reizweiterleitung im menschlichen Körper ermöglicht [26].

Bei den SNARE-Proteinen unterscheidet man ursprünglich v-SNAREs (vesikelassoziiert) und t-SNAREs (lokalisiert auf der Zielmembran: engl. „target“). Ein Oberbegriff für v-SNAREs sind VAMPs (vesicle associated membrane proteins) wie beispielsweise das Synaptobrevin (Syb). Bekannte t-SNAREs sind Syntaxin (Syx) und SNAP-25 (synaptosome associated protein). Während Syb und Syx jeweils eine TMD besitzen, ist SNAP-25 durch Palmylierung von Seitenketten in der Membran verankert. Sie besitzen jeweils ein SNARE-Motiv (SNAP-25 besitzt zwei). Die drei Proteine assoziieren zu einem stabilen Komplex mit einer Stöchiometrie von 1:1:1. Dieser Komplex besteht aus einem Bündel von vier parallelen α -Helices, die jeweils ein SNARE Motiv darstellen. Die TMDn sind alle am gleichen Ende dieses Bündels lokalisiert. Der Komplex (Abb. 1) ist außergewöhnlich stabil und seine Struktur konnte aufgeklärt werden [27]. Bei genauerer Betrachtung der Struktur fiel auf, dass die unterschiedlichen Helices im Zentrum des Helixbündels des Kernkomplexes 3 Glutaminreste bzw. einen Argininrest beitragen. Diese Aminosäuren sind in allen bekannten SNARE-Proteinen konserviert. Deshalb werden die SNARE-Proteine neuerdings in Q-SNAREs (Q = Glutamin) und R-SNAREs (R = Arginin) eingeteilt werden [28]. Den Kernkomplex bilden stets drei Q-SNARE Motive, die weiterhin in Qa, Qb und Qc unterteilt werden können, und ein R-SNARE Motiv. So besitzt jeder SNARE Komplex die Zusammensetzung QaQbQcR.

Die Bildung des SNARE-Komplexes erfolgt nahezu irreversibel. Für die Dissoziation des Komplexes ist die ATPase (ATP: Adenosintriphosphat) NSF (N-ethylmaleimid sensitive factor) notwendig, bei der es sich um ein konserviertes Protein handelt, das bei allen SNARE-Komplexen

agiert. Es ist innerhalb des Assoziations-Dissoziations-Zyklus des SNARE-Komplexes von entscheidender Bedeutung [29].

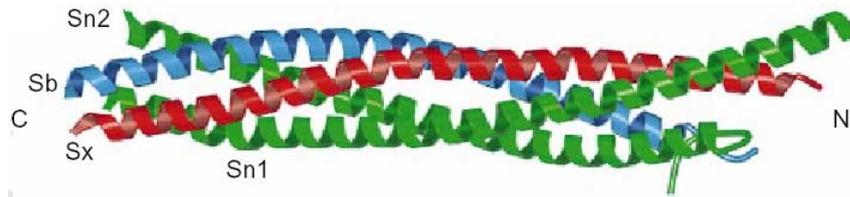


Abb. 1 Struktur des SNARE-Komplexes [27]. Der C-Terminus befindet sich links. Die SNARE-Motive von Synaptobrevin (Sb), Syntaxin (Sx) und SNAP-25 (Sn1 und Sn2) bilden ein paralleles Helixbündel.

SNARE-Proteine stellen die Maschinerie dar, durch welche die Fusion von Vesikelmembranen mit Plasmamembranen gesteuert wird. Dafür sind komplementäre SNARE-Proteine in den zwei Membranen wichtig. Bei der neuronalen Exocytose sind beispielsweise Syntaxin1a und SNAP-25 auf der präsynaptischen Plasmamembran lokalisiert, Synaptobrevin sitzt hauptsächlich auf den synaptischen Vesikeln. Bei Annäherung der beiden Membranen assemblieren diese Proteine zu einem SNARE-Komplex in der sogenannten trans-Konfiguration. Es wird angenommen, dass dies die Membranen zueinander zieht und so die durch die Hydratisierung der Phospholipide hervorgerufene Abstoßung überwunden werden kann. Dadurch könnten in den Membranen Übergangszustände auftreten, die letztendlich in der Fusion des Vesikels an der Membran enden. Nach der Fusion sind die SNARE-Proteine auf der Plasmamembran lokalisiert (sog. cis-Konfiguration) und können nach Dissoziation durch NSF sich wieder an der Fusion beteiligen. Gemäß dieser Sichtweise können SNARE-Proteine als Fusionskatalysatoren aufgefasst werden [30].

Untersuchungen an Liposomen konnten bestätigen, dass SNARE-Proteine eine minimale Fusionsmaschinerie darstellen. Hierzu wurde ein Satz von SNARE-Proteinen, welche bei der neuronalen Reizweiterleitung beteiligt sind, in Liposomen rekonstituiert. Dabei wurde eine Vesikelpopulation mit dem v-SNARE Protein Synaptobrevin (bzw. VAMP) bestückt und in eine andere Population die t-SNARE Proteine Syntaxin und SNAP-25 rekonstituiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nach Mischen beider Vesikelpopulationen zu einem stabilen SNARE-Komplex assemblieren. Dies führte bei physiologischer Temperatur zu vollständiger Fusion. Durch Inkubation der Vesikel bei 4°C erfolgte eine Ausbildung der SNARE-Komplexes bei kaum vorhandener Fusion. Die Assemblierung der in den Vesikeln vorhandenen SNARE-Proteine erfolgte zeitlich gesehen vor der Fusion [31]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Bildung des SNARE-Komplexes für die Fusion wichtig ist, da gezielte Abspaltung einer SNARE-Domäne von SNAP-25 durch das Botulinus Toxin die Membranfusion hemmte. Zusammen mit dem Ergebnis, dass die Fusionsgeschwindigkeit von Vesikeln, welche einen Satz von SNARE-Proteinen

enthalten, nicht durch vorherige Aggregation erhöht werden konnte, deutete das darauf hin, dass die Ausbildung des SNARE-Komplexes nicht alleine zur Annäherung dient, sondern im weiteren Verlauf der Fusion beteiligt ist [32].

Beim Vergleich der Strukturen von viralen Fusionsproteinen mit den SNARE-Proteinen zeigen sich zunächst Unterschiede. Bei der viralen Fusion sind oligomere Formen eines einzigen Fusionsproteins beteiligt, welches aus einer durchgehenden Polypeptidkette besteht. Bei der Membranfusion durch SNARE-Proteine ist ein Satz von verschiedenen Proteinen involviert. Auch die größtenteils aus β -Faltblattstrukturen bestehenden viralen Fusionsproteine des Typs II zeigen starke strukturelle Diskrepanzen zu den Fusionsproteinen des Typs I.

Sowohl in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht konnten allerdings Ähnlichkeiten zwischen viralen Fusionsproteinen und SNARE-Proteinen festgestellt werden. So erfolgt bei beiden Systemen die Ausbildung von superhelikalen Domänen [33]. Diese bestehen im SNARE-Komplex aus einem parallelen Helixbündel. Bei der viralen Fusion erfolgt die Ausbildung eines antiparallelen Helixbündels mit haarnadelartigen Strukturen („hairpins“). In den finalen Strukturen beider Fusionsproteintypen findet eine Kolo-kalisation von Fusionspeptid und TMD (virale Fusion) [10,12] bzw. aller TMDn (SNARE-medierte Fusion) statt [27,34].

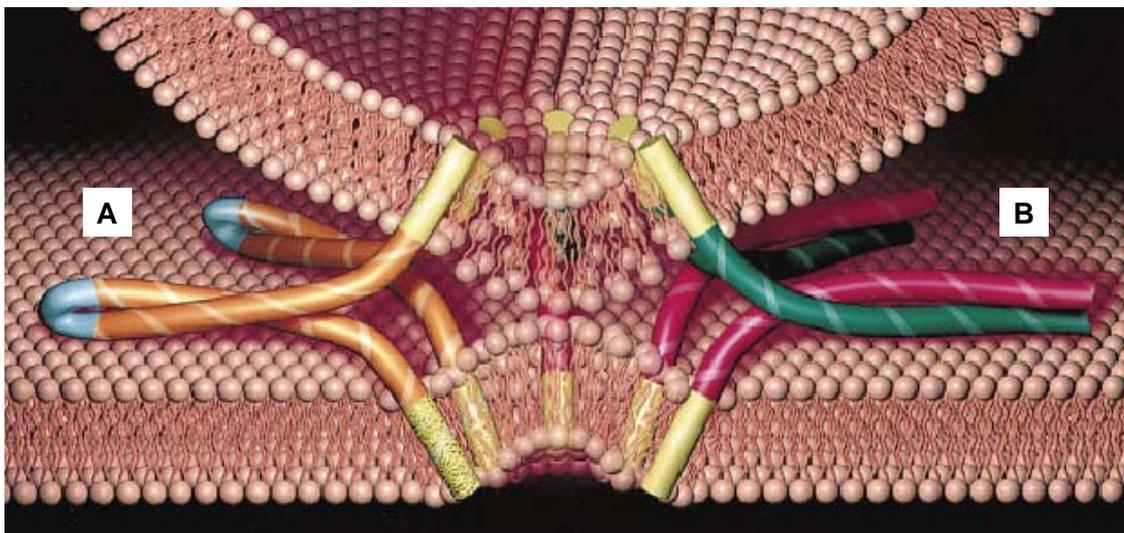


Abb. 2 Vergleich der Strukturen von viralen Fusionsproteinen mit dem SNARE-Komplex [31]. A, Virale Haarnadelstruktur der durchgehenden Polypeptidkette von Influenza HA. B, Angenommene Struktur des SNARE-Komplexes, welche wenig später kristallographisch bestätigt wurde [27].

Auch aus funktioneller Sicht ergeben sich bei beiden Systemen gewisse Ähnlichkeiten. Die Überwindung der Abstoßungskräfte der Membranen und die dadurch gewährleistete Annäherung erfolgt bei den viralen Fusionsproteinen durch eine Konformationsänderung. In ähnlicher Weise erfolgt die Bildung des SNARE-Komplexes vom N-Terminus her gleich einem Reißverschluss („zippering“). Dies führte schon vor der Kristallisation des SNARE-Komplexes durch Sutton et al.

[27] zur Postulierung von sogenannten „SNARE-pins“ (siehe Abb. 2B), welche hohe Ähnlichkeiten mit den bis dato bekannten viralen Haarnadelstrukturen („viral hairpins“; Abb.2A) aufweisen [31].

Die viralen sowie SNARE-medierte Fusionsvorgänge werden jeweils durch ein Signal ausgelöst. Bei viralen Fusionsproteinen erfolgt die für die Fusion notwendige Konformationsänderung durch die pH-Absenkung im Endoplasma. Bei der Neurotransmitterausschüttung induziert ein Ca^{2+} Signal über das Sensorprotein Synaptotagmin die Exocytose [35].

Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen von viralen Fusionsproteinen und den SNARE-Proteinen wurde die Formulierung eines allgemeinen Mechanismus der Membranfusion angestrebt [36]. Hierin bewirken sowohl Typ I und Typ II Virusfusionsproteine als auch SNARE-Proteine eine Annäherung der Membranen. Die finalen Strukturen der Fusionsproteine bzw. Proteinkomplexe, in denen die TMDen in großer Nähe zueinander vorliegen, weisen hierin große Ähnlichkeiten auf (Abb. 3).

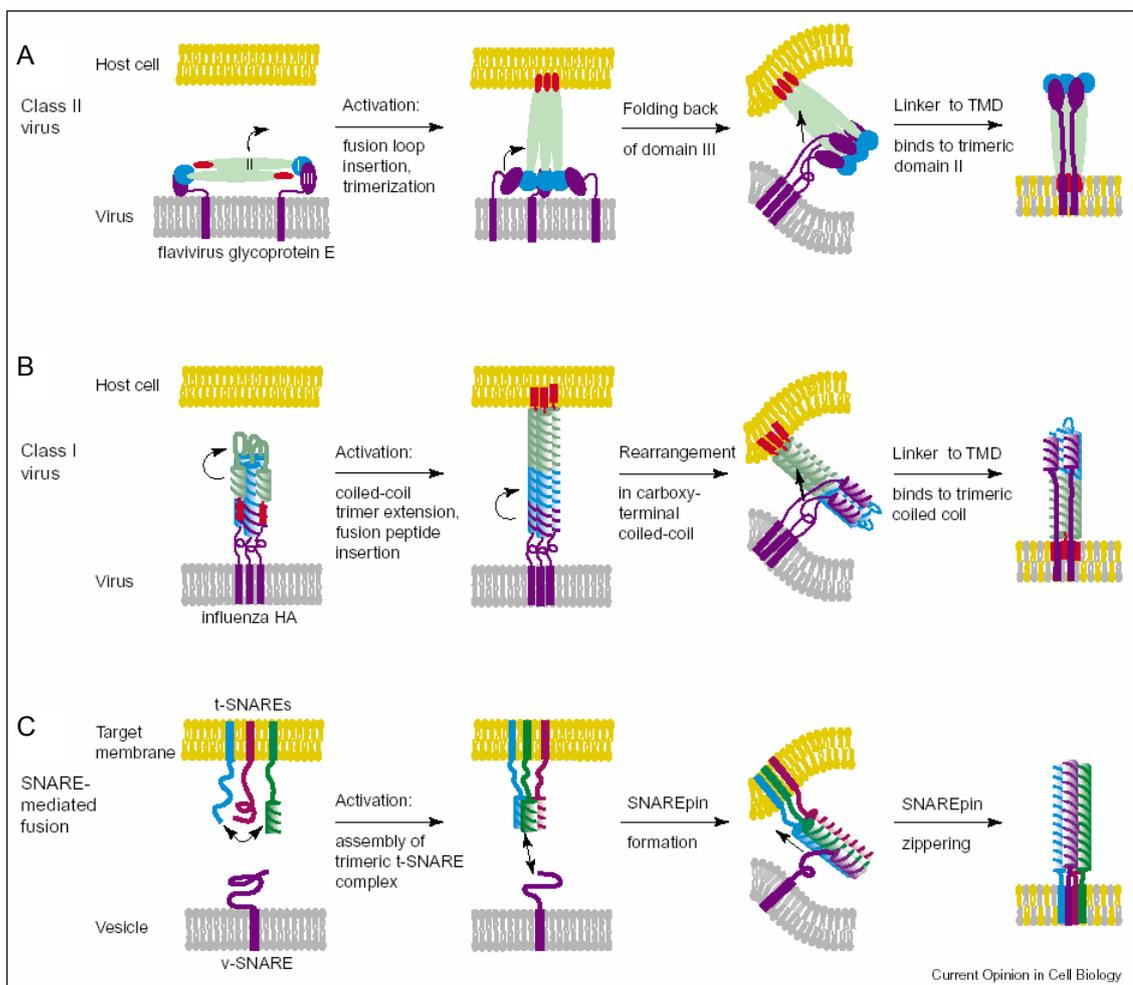


Abb. 3 Vergleich von viralen und intrazellulären Fusionsproteinen [36]. A, Virale Fusion von Typ II Fusionsproteinen. B, HA2 von Influenza haemagglutinin. C, Intrazelluläre Fusion von SNARE-Proteinen.

1.2 Übergangszustände bei der Membranfusion

Die Fusion zweier Membranen bedingt die Vermischung zweier Lipiddoppelschichten. Diese liegen im lebenden Organismus in flüssig-kristallinem Phasenzustand vor. Durch ihre Hydratisierung müssen bei der Annäherung hohe Abstoßungskräfte überwunden werden. Mit der Vermischung während der Fusion und der Ausbildung einer neuen Lipiddoppelschicht sind zudem drastische Restrukturierungen der Lipide der Membranen verbunden. Vieles deutet darauf hin, dass zur Überwindung der Abstoßungskräfte und der Restrukturierung maßgeblich die an der Fusion beteiligten Membranproteine beitragen. Der genaue Ablauf der Membranfusion konnte auf molekularer Ebene trotz vieler Bemühungen allerdings bislang noch nicht restlos geklärt werden. Unter verschiedenen Blickwinkeln wurden deshalb mehrere Modelle postuliert, in welchen unterschiedlich Zwischenzustände auftreten [37,38].

In einem Modell bilden die Membranproteine selbst einen Kanal, eine sogenannte „proteinartige“ Fusionspore, durch die fusionierenden Membranen. Dabei assemblieren zunächst die an der Fusion beteiligten Membranproteine zu einem Komplex, in dem keine Lipide vorkommen. In seiner Mitte bildet sich ein Kanal ähnlich einem Ionenkanal. Erst in einem späteren Schritt erfolgt dann die Vermischung der Lipide nach Auflösung des Komplexes (Abb. 4A). Dieses Modell wird unter anderem durch Ergebnisse bei der Messung der Kapazitätzunahme an Neutrophilen während der Exo- und Endocytose von Vesikeln unterstützt. Hier wurden vergleichbare Leitfähigkeiten ermittelt wie bei Ionenkanälen [39,40].

Bei anderen Modellen bilden die Lipide nichtlamellare Phasen im Übergangszustand aus. Bei dieser sog. „Stalk“-Hypothese wird die Vermischung von Lipiden zweier Membranen während deren Fusion mit einem „lipidartigen“ Übergangszustand erklärt. Demnach nähern sich diese an, durch lokale Störung ihrer Struktur erfolgt zunächst die Vermischung der proximalen Lipidschichten und es bildet sich der eigentliche „Stalk“ mit der Form ähnlich einer Eieruhr (Abb. 4B und 4C) [37]. Durch dessen Ruption erfolgt schließlich die Formierung der Fusionspore. Die TMDn der Membranproteine könnten in diesem Modell einen Ring um den Übergangszustand bilden. Computersimulationen unterstützen dieses Modell [41,42]. Der durch die Vermischung der proximalen Lipidschichten entstehende Übergangszustand wird als Hemifusion bezeichnet. Um das Fusionsverhalten von amphipatischen Peptiden zu erklären, wurde eine Variante des „Stalk“-Modells formuliert. Hierbei bilden die Peptide keine Ringe wie bei den TMDn in Abb. 4B und 4C, sondern liegen lediglich auf der Membran (Abb. 4D). Durch lokale Störung der Lipidschichten wird dabei die Abstoßungskraft der Hydrathüllen überwunden. Ein derartiges Modell könnte eine Erklärung für die sehr rasche Fusion durch virale Fusionsproteine vom Typ II liefern, deren interne Fusionspeptide nicht komplett in die Lipiddoppelschicht eintauchen können.

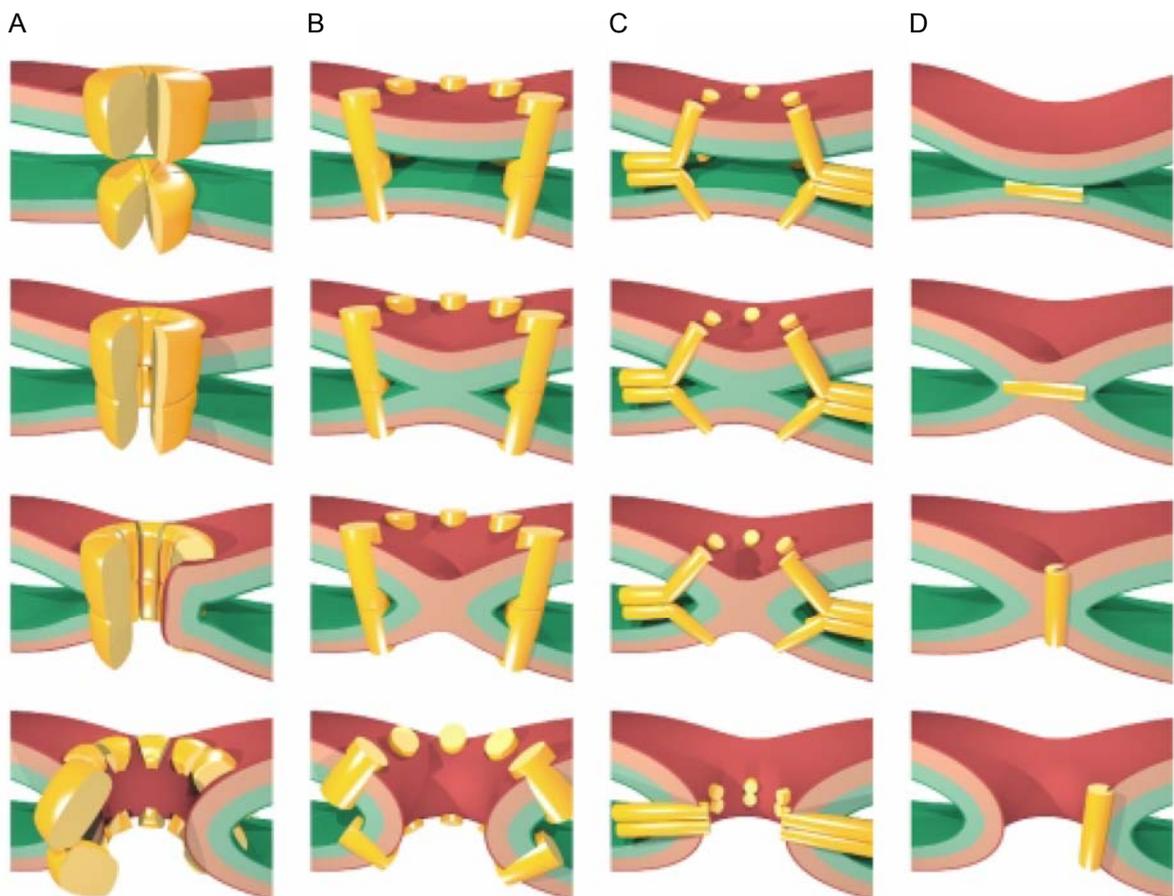


Abb. 4 Modellvorstellungen zur Rolle von Proteinen in Übergangszuständen während der Membranfusion [37]. A, Proteinartige Fusionsporen weisen oligomere Transmembrankomplexe mit einem hydrophilen Tunnel in der Mitte auf. B und C, Überwiegend auf der Interaktion von Lipiden basierende Übergangszustände. Die Transmembrandomänen bilden lockere Komplexe in Ringform, in deren Mitte sich die Lipide durch Ausbildung Übergangszustandes („Stalk“) vermischen. D, Fusion durch amphipatische Peptide, die eine lokale Störung der Lipidschichten hervorrufen.

Abb. 5 zeigt eine genauere Betrachtung der Vorgänge während der Fusion von zwei Vesikeln basierend auf der „Stalk“-Hypothese. Die Vesikel werden hierbei als kugelförmige Körper angenommen (Abb. 5A). Die äußeren, proximalen Lipidschichten bildet eine konvexe Wölbung aus, die auch positive Krümmung bzw. Krümmung genannt wird. Die inneren, distalen Lipidschichten hingegen verfügen über eine konkave Wölbung. In diesem Zusammenhang spricht man von negativer Krümmung. Bei Hemifusion sind die proximalen Schichten vermischt, zeitgleich aber die distalen Lipidschichten noch unverändert (Abb. 5B). Dadurch entsteht der sog. „Stalk“, welcher die Form einer Eieruhr besitzt (Vergrößerung in Abb. 5B). Dabei sind die Lipide der äußeren Schicht jedoch gezwungen, eine energetisch ungünstige konkave Wölbung bzw. negative Krümmung einzugehen. Da unter physiologischen Bedingungen Membranen in flüssig-kristallinem Zustand vorliegen, kann dies aufgrund ihrer Elastizität erfolgen. Zudem muss auch die intrinsische Struktur der Lipide berücksichtigt werden. Aufgrund des räumlichen Ausmaßes ihrer Kopfgruppen und der

Acylkettenregionen können sie Einfluss auf die Krümmung von Membranen ausüben. Phospholipide wie Diacyl-Phosphatidylethanolamin oder Diacyl-Phosphatidylglycerin beispielsweise besitzen bezüglich des räumlichen Querschnitts eine im Vergleich zur Acylkettenregion kleine Kopfgruppe. Man spricht in diesem Zusammenhang von kegelförmigen Phospholipiden. Sie verfügen über die Fähigkeit, negative Krümmung während Hemifusion zu begünstigen. Bei Lipiden wie Lysophosphatidylcholin (LPC), bei dem neben Cholin nur eine Fettsäure an Glycerin verestert ist, ist es genau umgekehrt. Da hier die Kopfgruppe größer ist als der hydrophobe Teil, stabilisieren sie positive Krümmung [43]. Diese Form wird als invertierter Kegel beschrieben. So kann die Lipidzusammensetzungen die Fusion fördern bzw. hemmen [44].

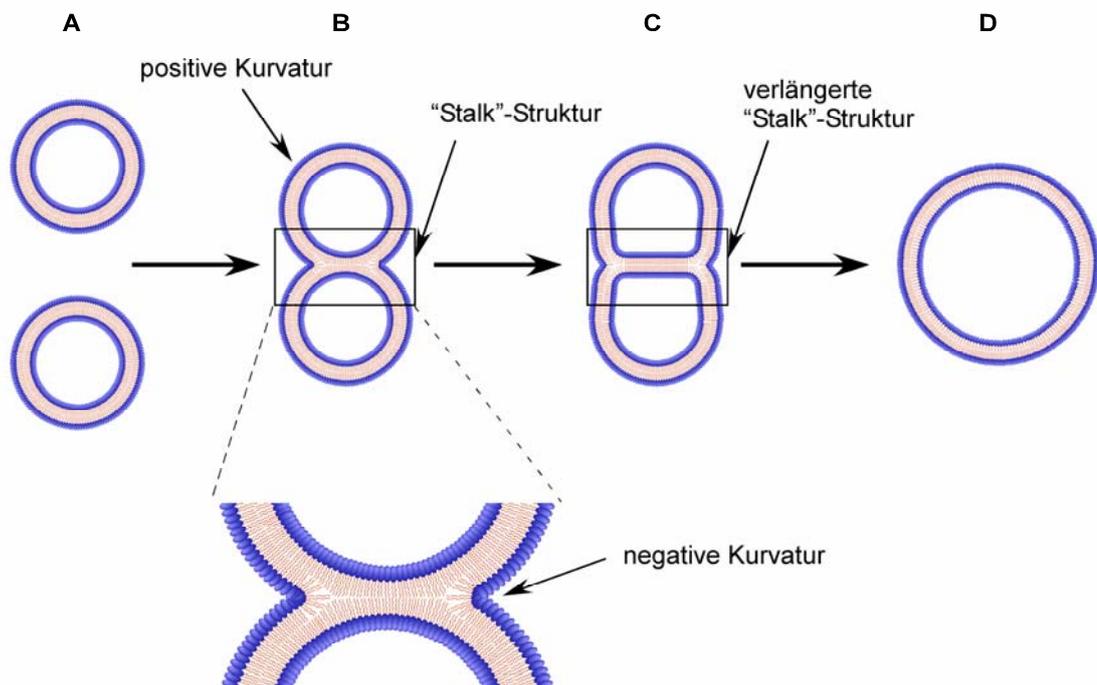


Abb. 5 Übergangszustände und Krümmung von Lipidschichten während der Vesikelfusion gemäß der „Stalk“-Hypothese. Die äußeren Lipidschichten kugelförmiger Vesikel bildet eine konvexe Krümmung bzw. positive Krümmung (A). Bei der Fusion erfolgt zunächst die Vermischung der proximalen Lipidschichten. Hierbei entsteht die sog. „Stalk“-Struktur (B), bei der die äußere Lipidschicht neben der ursprünglichen positiven Krümmung an der Kontaktfläche eine negative Krümmung eingehen muss. Durch Vergrößerung der Kontaktfläche entsteht die erweiterte „Stalk“-Struktur (C). Die komplette Fusion erfolgt durch Ruptur der „Stalk“-Struktur wodurch auch die distalen Lipidschichten vermischt werden (D).

Im weiteren Verlauf der Fusion vergrößert sich die „Stalk“-Struktur durch laterale Ausdehnung der Kontaktfläche der beiden Membranen und bildet eine verlängerte „Stalk“-Struktur (Abb. 5C). Ruptur dieser Struktur ermöglicht in der Vermischung der inneren Lipidschicht der Vesikel und führt somit zum Fusionsprodukt. Energieberechnungen bestätigen, dass bei der Fusion von Membranen zwischenzeitlich Übergangsstrukturen wie „Stalk“-Strukturen und verlängerte „Stalk“-

Strukturen auftreten können [45-48]. An Lipidschichten aus Diphytanylphosphatidylcholin, welches ähnlich wie Phosphatidylethanolamin eine negative Krümmung begünstigt, wurden Röntgenstrukturanalysen durchgeführt. Dabei wurden in Abhängigkeit der Temperatur und der relativen Feuchtigkeit verschiedene Muster erhalten (Abb. 6).

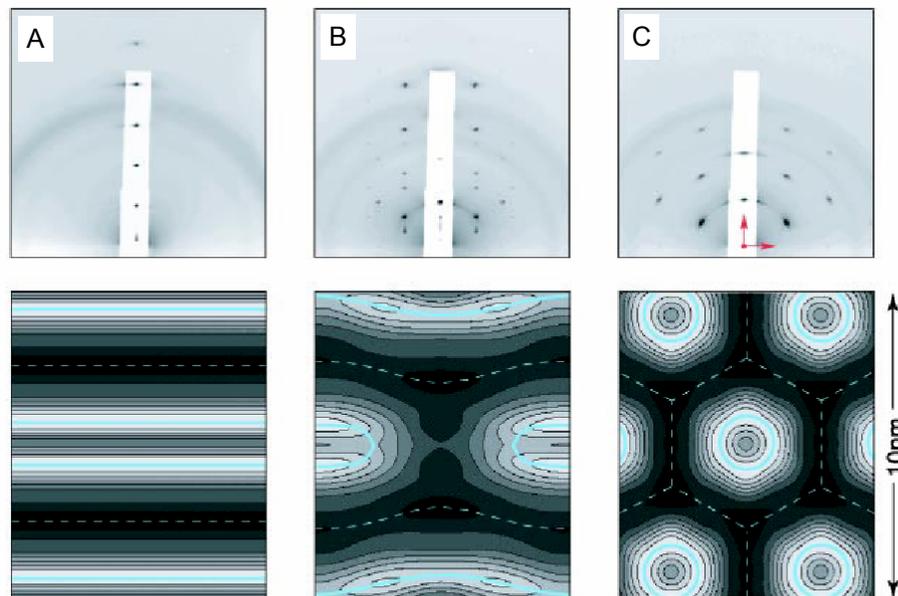


Abb. 6 Röntgenstrukturanalyse von Lipidschichten bei der Membranfusion [49]. A, Beugungsmuster (oben) und Elektronendichtetopologie (unten; hohe Intensität = weiß, niedrige Intensität = schwarz) einer lamellaren Lipidstruktur. B, Beugungsmuster einer rhombohedralen Struktur. Die Elektronendichte zeigt das Vorhandensein einer einem Uhrglas ähnlichen Struktur („Stalk“). C, Beugungsmuster einer zweidimensionalen hexagonalen Struktur.

Die Auswertung der Beugungsmuster zeigte, dass das untersuchte Lipid neben der anfänglichen lamellaren Phasen (Abb. 6A) durch Erhöhung der Temperatur und/oder der Feuchtigkeit verschiedene andere Phasenzustände eingeht. Dabei trat zunächst ein Zustand auf, dessen Form einer Sanduhr ähnelt und der „Stalk“-Hypothese entspricht (Abb. 6B). Daneben wurde auch eine hexagonale Struktur beobachtet, welche Lipiden in der H_{II} -Phase entspricht (Abb. 6C). Diese Beobachtung wird als Bestätigung für die „Stalk“-Hypothese und als damit verbundener Nachweis von Hemifusion gewertet [49].

1.3 Rolle der Transmembrandomänen von fusogenen Membranproteinen bei der Membranfusion

Die Rolle der TMD von Fusionsproteinen wurde bei der Diskussion der Übergangszustände während der Fusion schon angedeutet. Eine Vielzahl an Forschungsarbeiten beschäftigte sich deshalb mit ihrem Einfluss auf die Membranfusion. Bei Untersuchungen des Fusionsverhaltens von Influenza Hämagglutinin wurde beispielsweise dessen TMD durch einen Glykosylphosphatidylinositolrest (GPI-HA), also einen lipidartigen Membrananker, ersetzt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Zellen, welche GPI-HA exprimieren, den Kontakt mit der Membran von Erythrozyten herstellen. Dabei konnte zwar die Vermischung der Lipide gemessen werden, allerdings kam es nicht zu einer Vermischung des Inhalts der Liposomen mit der Zelle [50]. Bei Untersuchungen von Kapazitätsänderungen mittels „patch-clamp“ Technologie wurde festgestellt, dass bei der durch GPI-HA induzierten Fusion von Zellen kleine, nicht größer werdende Fusionsporen ausgebildet werden [51]. Diese Ergebnisse zeigten die Notwendigkeit einer membrandurchspannende Domäne für die Ausbildung bzw. die Ausweitung einer kleinen Fusionspore und dem Erhalt vollständiger Fusion. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Mutanten von HA erzielt, bei denen die TMD schrittweise verkürzt wurde. Dabei trat mit kürzerer TMD ein signifikant steigender Anteil an Hemifusion auf [52].

Bei den SNARE-Proteinen Sncl und Sso1, die aus Hefe stammen, wurde die TMD durch Geranylgeranylreste ersetzt. Es konnte bei Überexpression in Hefezellen festgestellt werden, dass die Exozytose an einem Punkt nach dem Andocken („Docking“) der Vesikel blockiert wurde. Es wurde deshalb postuliert, dass Fusionsproteine ohne TMD nicht dazu in der Lage sind, die Vermischung der distalen Lipidschichten zu katalysieren [53]. In gleicher Weise verhinderte ein Prenylanker, der anstelle der TMD in Hefe-SNAREs eingesetzt wurde, die Vakuolenfusion [54]. Kürzlich wurden zudem Untersuchungen an dem SNARE-Protein Snc2, einem v-SNARE aus Hefe, unternommen, wobei dessen TMD halbiert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Protein mit verkürzter TMD keine komplette Fusion induzieren konnte und überwiegend Hemifusion auftrat [55]. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Punktmutationen in der TMD von HA [56], dem VSV (Vesicular Stomatitis Virus) G-Protein [56] und von anderen viralen Fusionsproteinen erhalten [57-59]. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass es sich bei der TMD nicht nur um einen „Membrananker“, sondern vielmehr um eine eigenständige Domäne des Membranproteins handelt, welcher während der Fusion eine wichtige funktionelle Bedeutung zukommt.

Um die Rolle der TMD von Membranproteinen näher zu charakterisieren, wurden Fusionsstudien an Liposomen durchgeführt. Dabei wurden synthetische Peptide verwendet, deren Sequenz der TMD von Fusionsproteinen entspricht. Die TMD des VSV (vesikulärer Stomatitis

Virus) G-Proteins, welches strukturell und funktionell mit dem Influenza HA Fusionsprotein verwandt ist, wurde mit zwei unabhängigen Methoden untersucht. Dabei zeigte sich, dass das synthetische Peptid fusogene Eigenschaften besitzt, die mit denen des vollständigen Proteins vergleichbar sind [60,61]. Durch Mutation der TMD des VSV G-Proteins konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Fusion *in vivo* von der Sequenz des TMD abhängt [62]. Auf synthetische Peptide wirkten diese Mutationen *in vitro* die gleichen Effekte aus [60]. Die Untersuchung von Peptiden stellt folglich eine Alternative zu aufwändigen Analysenverfahren mit Hilfe rekombinanter Proteine dar.

Auch Peptide, die der Sequenz der TMD von synaptischen SNARE-Proteinen entsprechen, wurden untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch diese TMD-Peptide die Fusion von Liposomen fördern. Durch Aggregation mit zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} wurde eine weitere Erhöhung erreicht. Das Ausmaß der Fusion konnte durch anfängliche Zugabe von LPC in die äußere Lipidschicht der Liposomen verringert werden [60]. Da LPC positive Krümmung begünstigt [43], wirkt es der Ausbildung der negativen intrinsischen Krümmung in der äußeren Schicht entgegen, was für Hemifusion nötig ist. Dies diente im Gegenzug der Bestätigung von Hemifusion im Übergangszustand.

Durch Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die fusogenen Peptide in Lösung in einem Gleichgewicht aus α -helikaler und β -faltblattartiger Struktur vorliegen. Die Fähigkeit eines Peptids zur Induzierung von Liposomenfusion verhielt sich reziprok zur Stabilisierung dessen helikaler Struktur [61,63].

Ferner wurde durch Datenbankanalysen [63] eine Überrepräsentation von β -verzweigten Aminosäuren Ile und Val in den TMD von SNARE-Proteinen festgestellt (Abb. 7). Auch beim Vergleich der Zusammensetzung von TMDn von viralen Fusionsproteinen mit viralen nicht fusogenen Membranproteinen wurde festgestellt, dass bei den fusogenen Spezies β -verzweigte Aminosäuren häufiger vorkommen [62].

Studien an Peptiden haben gezeigt, dass Valin und Isoleucin in β -Faltblattstrukturen günstigere Energiezustände einnehmen als in helikalen Strukturen. Ihnen wurde deshalb bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen eine Propensität zur Helix-Destabilisierung zugeschrieben [64,65]. Diese Eigenschaft begründet sich in der Differenz der freien Energie der Rotamere von Valin bzw. Isoleucin, welche in der Faltblattstruktur niedriger ist als in Helixstruktur [66].

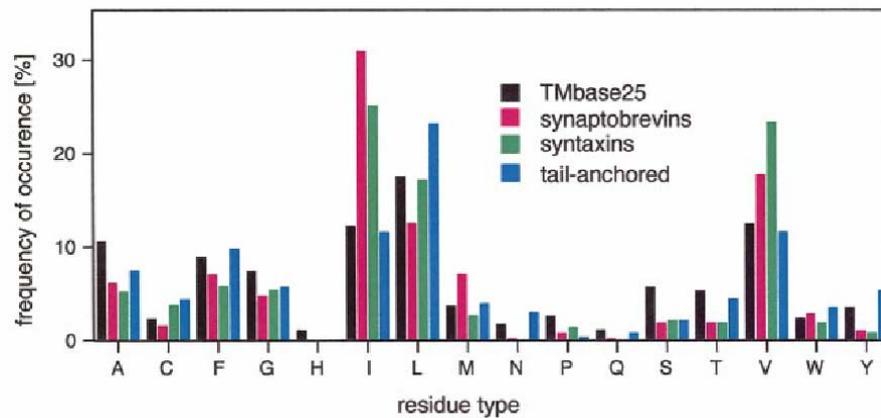


Abb. 7 Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von TMDn [63] zeigt eine Überrepräsentation von Leu, Ile und Val.

Die Häufung von β -verzweigten Aminosäuren in den überwiegend helikalen TMDn von fusogenen Proteinen deutet auf einen Zusammenhang zwischen helix-destabilisierender Tendenz der Aminosäuresequenz und Fusogenität hin. Deshalb wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach die strukturelle Plastizität der Peptide die Funktion des Fusionsproteins unterstützt [60,63].

1.4 Liposomenfusion durch FRET

Ein Verfahren zur experimentellen Bestimmung der Membranfusion basiert auf dem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) von zwei fluoreszierenden Farbstoffen. Aufgrund der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums eines Donorfarbstoffes mit dem Anregungsspektrum eines Akzeptorfarbstoffes erfolgt bei FRET ein strahlungsloser Energietransfer, d.h. es werden vom Donor keine Photonen emittiert. Die Effizienz (E) des FRET ist reziprok proportional zur 6. Potenz des Abstandes der beiden Moleküle und wird durch die Förster-Gleichung: $E = 1 / (1+(R/R_0)^6)$ ausgedrückt. In dieser wird der Zusammenhang zwischen der Effizienz des Energietransfers und dem Abstand R bzw. dem Försterradius R_0 beschrieben. Ihre Anwendung erlaubt sehr genaue Untersuchungen geringster Abstandsveränderungen.

Traditionell wird FRET bei der Aufklärung von Strukturen von Proteinen als eine Art molekulares Lineal verwendet [67]. Der Försterabstand beschreibt die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren, bei der eine Energietransfereffizienz (E) von 50% auftritt. Bei diesem Abstand wird die Hälfte der Emissionsenergie des Donors als Strahlung emittiert, durch die andere Hälfte wird der Akzeptor angeregt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Löschung der Emission des Donors durch den Akzeptor. Der Försterabstand R_0 ist von den spektralen Eigenschaften des Donors sowie des Akzeptors abhängig.

Auch zur Untersuchung der Membranfusion von Liposomen wurde ein Verfahren basierend auf FRET entwickelt [68,69]. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe NBD (7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol; Fluoreszenzdonor) und Rh (Lissamin-Rhodamin B sulfonsäure; Fluoreszenzakzeptor) sind dabei kovalent an PE (Phosphatidylethanolamin) gebunden. NBD-PE (Anregung 460 nm, Emission 530 nm) besitzt ein Emissionsspektrum, welches spektral mit dem Anregungsspektrum von Rh-PE (Anregung 530 nm, Emission 590 nm) überlappt. Beide Moleküle werden in Liposomen eingebaut. Die Konzentrationen der Fluorophore, bezogen auf die Anzahl an Lipidmolekülen, wird dabei so gewählt, dass diese auf den Liposomen Abstände unterhalb des Försterradius besitzen. Dadurch ist gewährleistet, dass nach Anregung von NBD der Großteil seiner Emissionsenergie strahlungslos auf Rh-PE übertragen wird. Bei der Fusion eines Donorliposoms, welches die beiden Farbstoffe enthält, mit einem sog. Akzeptorliposom, welches keine Farbstoffe enthält, werden die Lipide vermischt. Die Konzentration der Farbstoffe nimmt ab und somit auch der Abstand der beiden Fluorophore zueinander. In der Folge sinkt die FRET-Effizienz, wodurch Fluoreszenz von NBD in Form von Strahlung emittiert wird. Die Messung dieser Emission spiegelt also den Verlauf der Membranfusion wieder (Abb. 8). Durch zeitliche Aufnahme dieser Emissionsenergie wird eine Kinetik erhalten, anhand derer sich die Fusion der Liposomen beschreiben lässt.

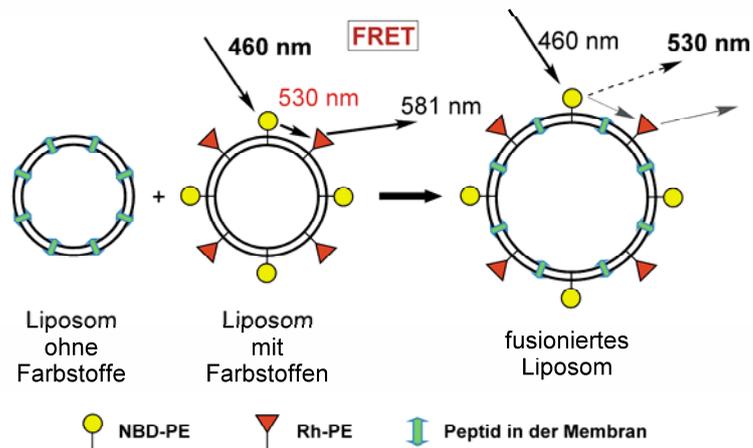


Abb. 8 Liposomenfusion durch FRET zwischen NBD-PE und Rh-PE. Durch die Fusion steigt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor an. Die Emissionsenergie von NBD-PE wird deshalb nicht mehr vollständig strahlungslos auf Rh-PE übertragen. Die Energie der Emission bei 530 nm wird in Abhängigkeit der Zeit gemessen und dient als Maß für die Fusion.

Bei der Herstellung von farbstoffmarkierten Liposomen wird NBD-PE sowie Rh-PE sowohl in die äußere als auch innere Lipidschicht eingebaut. Durch Bleichen mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit (DTN) kann NBD zu einem nicht fluoreszierenden Farbstoff reduziert werden [70] (Abb. 9).

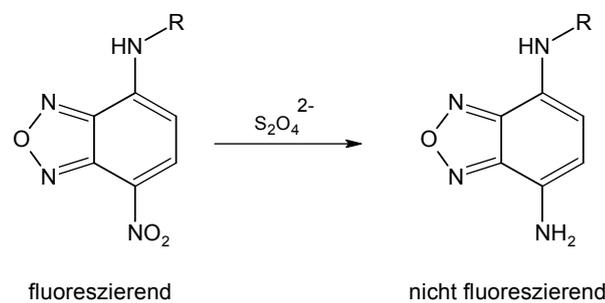


Abb. 9 Reduktion von NBD durch Dithionit ($S_2O_4^{2-}$). Aus dem fluoreszierenden NBD entsteht ein nicht fluoreszierendes Derivat.

Bei der Behandlung von rekonstituierten farbstoffmarkierten Liposomen mit DTN ist nur das NBD-PE in der äußeren Lipidschicht für die Reduktion zugänglich [71]. Unter geeigneten Bedingungen kann somit NBD in der äußeren Schicht vollständig reduziert werden. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen Hemifusion und kompletter Fusion, da nur im letzteren Fall ein Fluoreszenzanstieg DTN-behandelter Liposomen zu messen ist. Abb. 10 verdeutlicht nochmals die dabei auftretenden Zusammenhänge.

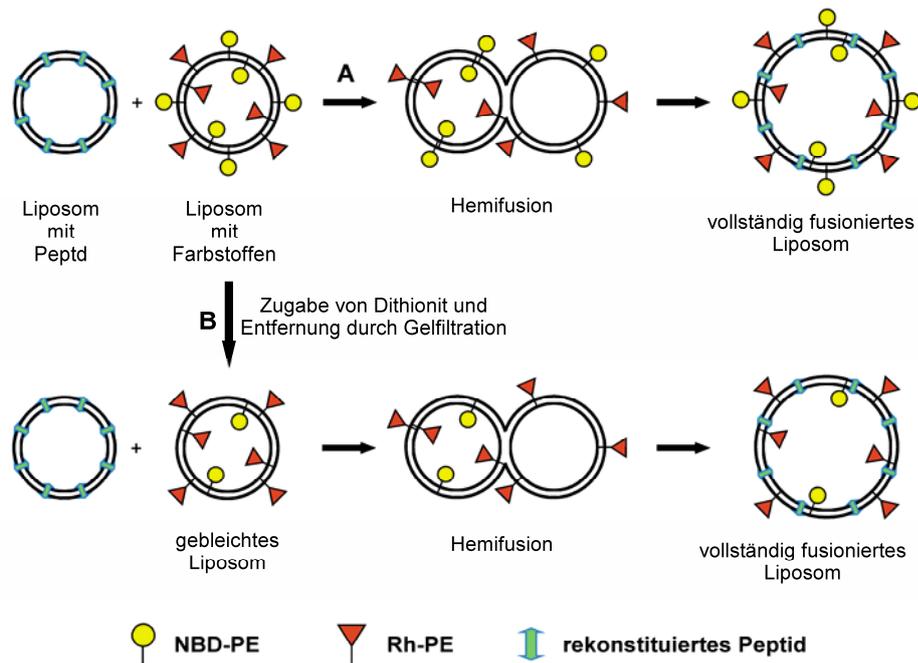


Abb. 10 Unterscheidung von Hemifusion und vollständiger Fusion durch Reduktion des NBD-PE in der äußeren Lipidschicht. A, Ohne DTN-Behandlung resultiert eine Vermischung der Lipide im Hemifusionszustand bereits in einem Anstieg der Fluoreszenz von NBD. Eine Unterscheidung vom Zustand kompletter Fusion ist deshalb nicht möglich. B, Nach DTN-Behandlung erfolgt im Hemifusionszustand noch kein Anstieg der NBD-Fluoreszenz. Dies ist erst nach Vermischung der inneren Lipidschicht der Fall.

Das beschriebene System wurde in der vorliegenden Arbeit dazu angewendet, um die Fusionseigenschaften von neuartigen membranfusogenen Peptiden zu charakterisieren.

2 Ziel der Arbeit

Wie oben ausgeführt, deutete sich ein struktureller Zusammenhang zwischen der Flexibilität von Peptiden, die den TMD von Fusionsproteinen entsprechen und deren fusogenen Eigenschaften an [60,63]. In dieser Arbeit soll ein neuer, eigenständiger Weg beschrrieben werden, um diese Hypothese aus anderer Perspektive heraus zu untersuchen. Durch das *de novo* Design und die Rekonstitution von Peptiden in Liposomen sollen die Zusammenhänge zwischen Sequenz der TMD und Fusogenität systematisch geklärt werden. Dabei sollen verschiedenen Komponenten des rekonstituierten Systems (vgl. Abb. 11) zunächst einzeln charakterisiert und die erhaltenen Erkenntnisse dann in ein Gesamtbild zusammengefügt werden.

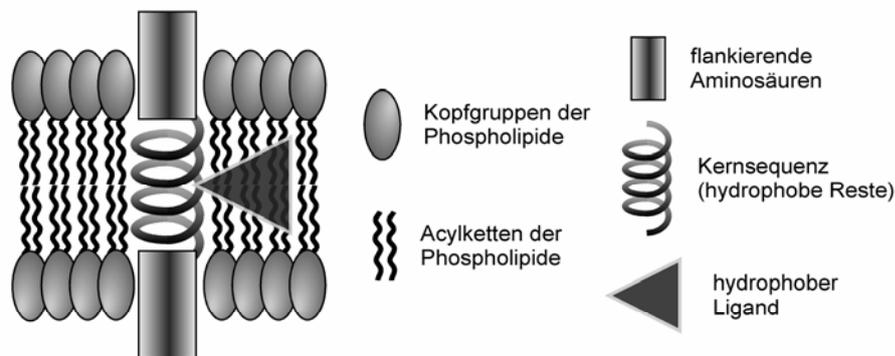


Abb. 11 Ziel der Arbeit: Charakterisierung der bei der Membranfusion beteiligten Komponenten. Phospholipide sind unterteilt in Kopfgruppen und Acylkettenregion. Sie bilden Lipiddoppelschichten. Peptide sind in hydrophobe Kernsequenz und flankierenden Aminosäuren unterteilt. Zudem wird der Einfluss eines hydrophoben Liganden evaluiert.

Durch systematische Variation der hydrophoben Kernsequenz der Peptide soll deren Fähigkeit zur Ausbildung verschiedener Sekundärstrukturen variiert werden. Untersuchungen in Liposomen sollen dann den Einfluss der Peptidsequenz auf die Fusogenität aufzeigen. Die Rolle der flankierenden Aminosäuren soll separat ermittelt werden. Die erhaltenen Ergebnisse aus der Betrachtung des Modellsystems sollen dazu dienen, die Fusionseigenschaften einer TMD eines SNARE-Proteins aus Hefe besser interpretieren zu können.

Hydrophobe Liganden stabilisieren Sekundärstrukturen von Peptiden. Ein Aminopyrazolderivat zeigte Interaktion mit Peptiden in der β -Faltblattkonformation. Daher soll der Zusammenhang zwischen Helix-Destabilisierung des Liganden und Fusogenität von Peptiden untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt betraf den Einfluss von Lipiden auf die Membranfusion. Durch die Verwendung unterschiedlicher Lipidspezies soll zunächst überprüft werden, wie sich die Nettoladung der Kopfgruppe auf die Membranfusion auswirkt. Untersuchungen an Lipiden mit der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA (Docosahexaensäure) als Seitenkette sollen Einflüsse der Acylkettenregion auf die Fusion aufzeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die verwendeten Peptide wurden durch tert-Butoxycarbonyl-(Boc)-Synthese [72] hergestellt (PSL, Heidelberg). Sie wurden als Lyophilisat erhalten. Da es sich um TFA (Trifluoacetat)-Salze aus der Synthese handelte, wurden sie nach Erhalt in milliQ-H₂O suspendiert und mittels verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert. Der pH-Wert wurde dabei mittels pH-Papier überprüft und von etwa 3 auf 7,5 erhöht. Danach wurden die Peptide erneut lyophilisiert (über Nacht). Um Zersetzung zu minimieren wurden sie fortan im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt.

Phosphatidylcholin (PC) wurde aus Hühnereigelb (Serva) mittels Säulenchromatographie aufgereinigt [73]. Dazu wurden 62,5 g wasserfreies Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I) in 75 ml CHCl₃ suspendiert und in eine Chromatographiesäule (Durchmesser ca. 2 cm, Höhe ca. 40 cm) gefüllt. Nach Absetzen des Al₂O₃ wurden 2,5 g Ei-PC, gelöst in 50 ml CHCl₃, auf die Säule gegeben. Danach wurde noch mit 40 ml CHCl₃ bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 10 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte langsam durch CHCl₃/MeOH 90:10 (v/v). Die ersten 50 ml wurden verworfen. Danach wurden Fraktionen von je 15 ml in CHCl₃-stabilen 50 ml Falcon-Tubes gesammelt. Die Überprüfung der Reinheit von PC in den gesammelten Fraktionen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC) [73]. Dabei wurden jeweils etwa 5 µl auf fluoreszenzmarkierte DC-Platten aus Kieselgel-60 (Alugram SIL G/UV₂₅₄) aufgetragen. Das Fließmittel war CHCl₃/MeOH/H₂O 65:25:4 (v/v/v). Die Detektion der Lipide auf der Platte erfolgte entweder mittels UV-Licht oder sie wurden für etwa 5 min in eine Jodkammer gestellt, wobei braune Flecken entstanden.

Anhand der Retentionsfaktoren (R_f) wurde die Reinheit von PC in den Fraktionen im Vergleich zu einem Standard ermittelt. Die R_f -Werte waren: PC = 0,25; PE = 0,5; Cholesterol = 0,88. Die Fraktionen mit reinem PC wurden in einem vorher leer gewogenen Kolben vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (etwa 150 mbar) entfernt. Nach Trocknung im Vakuum (20 mbar) für etwa 1 Stunde wurde das Gewicht des PC bestimmt. Das Lipid wurde in CHCl₃ zu 10 mg/ml gelöst und in kleine Braunglasfläschchen aliquotiert.

Phosphatidylserin (PS) sowie Phosphatidylethanolamin (PE), aufgereinigt aus Gehirn, sowie die synthetischen Lipide Palmitoylphosphatidylcholin (POPC), Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Dioleoylphosphatidylserin (DOPS), Stearyl-docosahexanyl-PE und -PS wurden von Avanti bezogen (Avanti Polar Lipids, USA). Sie wurden ebenfalls zu 10 mg/ml in CHCl₃ gelöst bzw. dementsprechend verdünnt. Die Fluoreszenzfarbstoffe N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-dihexadecanylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) und Lissamine™ rhodamine B-

dihexadecanylphosphatidylethanolamine (Rh-PE) wurden als Feststoff von Molecular Probes bezogen. Nach Lösen in CHCl_3 zu 1 mg/ml wurden sie auch in kleinere Gefäße aliquotiert. Da beim Abwiegen auf der Analysenwaage relativ ungenaue Werte erhalten wurden, erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der beiden Farbstoffe durch Aufnahme einer UV-Absorptionsspektrums. Die Berechnung der Konzentration erfolgte für NBD-PE durch Absorption bei 460 nm ($E = 21.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und für Rh-PE bei 530 nm ($E = 75.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Alle Lipide wurden nach Gebrauch stets mit Stickstoff überschichtet und nach luftdichtem Verschließen mit Parafilm im Gefrierschrank bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Das dimere Aminopyrazolderivat N,N'-Bis(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)oxaldiamid (AmpOX) wurde von der Arbeitsgruppe Schrader in Marburg synthetisiert [74] und aufgereinigt. Da es sich zeigte, dass die Substanz sowohl in TFE als auch in CHCl_3 sehr schlecht in Lösung gebracht werden konnte, wurde sie nach exaktem Einwiegen in DMSO gelöst und die Lösung zur Weiterverwendung verdünnt.

Alle anderen verwendeten Chemikalien wiesen Analysenqualität auf. Alle Puffer wurden in milliQ-Wasser angesetzt und die Stammlösungen mittels Einmalspritze durch einen Rundfilter (Porengröße $0,23 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert.

Die Messung der Fluoreszenzkinetiken wurden weiße, nicht bindende 96-Loch Platten der Firma Corning (Artikel-Nr. 3604, Corning Inc., USA) mit durchsichtigen Böden verwendet. Diese wurden vor erstmaligem Gebrauch und nach jedem Einsatz zunächst mit Detergenz Triton X-100 gereinigt, mit 96% Ethanol gewaschen und zuletzt mit dest. Wasser gespült. Nach Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur zeigten die Platten konstante Fusionsergebnisse und konnten etwa 20 mal wieder verwendet werden. Zum Vergleich und aus Kostengründen wurden auch durchsichtige 96-Loch Mikrotiterplatten der Firma Sarstedt (Nr. 82.1581; Sarstedt, USA) verwendet. Nach üblicher Vorreinigung (siehe oben) wiesen diese Platten identische Ergebnisse auf.

Zur Aufreinigung der Peptide mittels SPE wurden SepPak tC_2 -Säulen (Waters) verwendet.

3.2 Geräte

Die Quantifizierung der Peptide erfolgte am Ultrospec 3100pro UV/Vis-Spektrometer (Amersham Bioscience, USA) unter Verwendung einer Mikroquarzküvette (Volumen $100\mu\text{l}$). Die Datenausgabe erfolgte mittels Thermodrucker Modell DPU-414 (Seiko Instruments Inc., Japan).

Zur Rehydrierung der Lipidfilme wurde ein Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Die Sonifizierung der Lipidsuspension erfolgte im Branson Sonifier. Dabei regte der Ultraschallgenerator

(Typ 102C) mittels Netzgerät 450 den Becherresonator an (Branson, USA). Die Apparatur wurde während des Betriebs stets mit Eiswasser gekühlt.

Die Fusionskinetiken wurden am BMG FLUOstar (BMG LabTechnologies, USA) durch Messung der Fluoreszenz in 96-Loch Platten aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch die Computersoftware FLUOstar Galaxy Version 4.21 und das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel.

Fusionskinetiken von Liposomen mit Histidin-Peptiden wurden in Fluoreszenzküvetten aus Quarzglas (Schichtdicke 1 cm) am Fluoreszenzspektrometer RF-1501 (Shimadzu, Japan) aufgenommen. Dabei erfolgte die Auswertung durch die Software Hyper-RF. An diesem Gerät wurde auch die Quantifizierung von Tryptophan (Details siehe Methoden) durchgeführt.

Die Ultrazentrifugation erfolgte in Zentrifugenröhrchen aus Polyallomer im SW60-Ti Rotor in der LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter, USA).

Der Nachweis von *p*-Kresol mittels HPLC erfolgte mit einem Waters System Typ Alliance (Mod. 2695) mit Photodiodenarray (PDA)-Detektor (Mod. 996) auf einer analytischen Vydac C₄-Säule (214TP54, 250 x 4.6 mm, GraceVydac, USA). Die Auswertung erfolgte mittels Millennium32 Software (Waters, USA). Alle massenspektrometrischen Messungen wurden am Waters QToF-Ultima Elektrosprayionisation (ESI) Massenspektrometer durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde Masslynx 4.0 Software (Waters, UK) verwendet.

Die Lyophilisierung erfolgte in einem Gerät vom Typ Delta 1-20KD (Christ, Osterode).

3.3 Methoden

3.3.1 Peptidquantifizierung

Die Peptide wurden in Form ihrer Lyophilisate bei -80°C gelagert. Zum Lösen wurden sie zunächst im geschlossenen Gefäß mindestens 30 min auf Raumtemperatur temperiert. Dann wurden sie auf der Analysenwaage in Eppendorffreagiergefäßen (2 ml) eingewogen und in TFE (Trifluorethanol) zu etwa 2 mg/ml gelöst. Ungelöstes Peptid wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 10 min) entfernt. Da aufgrund ihrer hohen Hygroskopizität der ermittelte Wert der Waage zu ungenau und die Menge an ungelöstem Peptid unbekannt war, wurde die Konzentration des Peptids im Überstand anhand der Absorption von Tryptophan ermittelt. Die Messung wurde in TFE/DMSO (Dimethylsulfoxid) 1:1 (v/v) durchgeführt und ein Absorptionsspektrum im Bereich von 220 bis 330 nm gegen TFE/DMSO 1:1 (v/v). Anhand des Absorptionsmaximums bei 282 nm ($\epsilon =$

$5.600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) wurde die Konzentration des Peptids auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet (etwa $400 \mu\text{M}$).

Alternativ (für SPE) wurde Peptid in Acetonitril (AcN)/H₂O 20:80 (v/v) gelöst und gegen AcN/H₂O 80:20 (v/v) gemessen. Die ermittelten Konzentrationen, das Datum sowie der Name des Peptids wurden auf dem Reagiergefäß vermerkt. Die Lagerung von gelösten Peptiden erfolgte bei -20°C .

3.3.2 Aufreinigung von Peptiden mittels Festphasenextraktion

Eine SepPak tC₂-Plus Säule wurde senkrecht in einem Stativ eingespannt. Mit Hilfe einer 1 ml Einmalkunststoffspritze wurde die Säule zunächst mit 4 ml AcN konditioniert (Fließgeschwindigkeit $\approx 2\text{-}5 \text{ ml/min}$). Danach erfolgte die Equilibrierung mit AcN/H₂O 5:95 (v/v) bei etwa $1\text{-}2 \text{ ml/min}$. Ein Milliliter Peptidlösung einer Konz. von etwa 2 mg/ml in AcN/H₂O 20:80 (v/v) wurde langsam bei 1 ml/min über die Säule gepumpt. Der Durchfluss wurde gleichzeitig nach der Säule gesammelt. Dieser wurde mit der direkt folgenden Fraktion von $0,5 \text{ ml AcN/H}_2\text{O 5:95 (v/v)}$ vereinigt. In ihm befand sich das Peptid.

Die Säule wurde mit $4 \text{ ml AcN/H}_2\text{O 5:95 (v/v)}$ gewaschen. Danach wurde *p*-Kresol mit 100% AcN eluiert. Nach weiterem Spülen mit 4 ml AcN konnte die Säule wieder verwendet werden (bis zu vier mal). Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und für die weiteren Untersuchungen wieder in TFE gelöst.

3.3.3 HPLC und Massenspektrometrie

Die Fraktionen aus der SPE wurden mittels HPLC analysiert. Die Quantifizierung von *p*-Kresol erfolgte durch kontinuierliche Gradientenelution auf einer Vydac C₄-Säule.

Fließmittel A: AcN/H₂O/TFA 20:79.9:0.1 (v/v/v)

Fließmittel B: AcN/H₂O/TFA 90:9.9:0.1 (v/v/v)

Gradient für *p*-Kresol:

0 min	0% B
10 min	0% B
20 min	40% B
25 min	40% B
30 min	0% B
40 min	0% B

Flussrate: 0.4 ml/min

Probenvolumen: $20 \mu\text{l}$ pro Lauf.

Massenspektren der Peptide wurden am Q-ToF Ultima ESI Massenspektrometer (Waters, UK) in positivem ESI Modus aufgenommen. Einstellungen der Tune-Page: Kapillarspannung: 2.5 - 2.8 kV, Cone-Spannung: 60 V, ToF-Detektion: MCP-Spannung: 2.1 kV, ToF-Spannung: 9.1 kV.

Die Messung des kollisioninduzierten Zerfalls (CID = collision induced dissociation) erfolgte bei einem Argondruck von 12,5 psi und Kollisionsspannungen von 10 bis 30 eV. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit MassLynx 4.0 Software (Waters Corporation).

3.3.4 Herstellung von Liposomen und Messung der Fusionskinetiken

Die Ermittlung der Fusionskinetiken erfolgte durch Messung des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) von NBD-PE auf Rh-PE [68]. Dazu wurden drei Spezies von Liposomen hergestellt: i. Liposomen ohne Peptid, ii. Liposomen mit Peptid und iii. Donorliposomen mit den Farbstoffen NBD-PE und Rh-PE.

Die in CHCl_3 gelösten Lipide PC, PE und PS (Konz. je 10 mg/ml) wurden im Verhältnis 3:1:1 (v/v/v) in einem 2 ml Reagiergefäß gemischt. Standardmäßig wurden 600 μl Liposomensuspension hergestellt (Volumen des später verwendeten Puffers bei der Rehydrierung). Dazu wurden 90 μl PC, 30 μl PE und 30 μl PS verwendet, was aufgrund des Molekulargewichts der Lipide (ca. 800 g/mol) einer Lipidmenge von 1,87 μmol entspricht. In 600 μl Puffer betrug die Lipidkonzentration 3,1 mM bzw. 2,5 mg/ml. Peptide wurden in molaren Peptid/Lipid- (P/L)-Verhältnissen von nominal 0,0025 bis 0,01 in die Liposomen eingebaut. Die dazu benötigte Menge an in TFE gelöstem Peptid errechnete sich aus der vorher ermittelten Konzentration und dem angestrebten P/L-Verhältnis. Für 1 mol-% Peptid (entsprechend 0,0187 μmol bzw. 18,7 nmol) wurden von einer Peptidlösung einer Konzentration von 400 μM demnach 46,8 μl verwendet. Für die Herstellung von Donorliposomen wurden jeweils 0,8 mol-% (also 15 nmol) der Farbstoffe NBD-PE ($M_R = 956,3$ g/mol) und Rh-PE ($M_R = 1333,8$ g/mol) hinzugefügt. Da die Konzentration der beiden Farbstoffe jeweils 1 mg/ml betrug, mussten dafür 14 μl NBD-PE und 20 μl Rh-PE verwendet werden. Bei der Herstellung von Liposomen mit DHA-Lipiden wurden entweder nur PE, nur PS oder PE und PS durch synthetische Lipide, unter Beibehaltung der Lipidzusammensetzung PC/PE/PS 6:2:2 (w/w/w), ersetzt. So wurde beispielsweise die 20 % natürliches PE aus Gehirn durch 20 % SOPE ersetzt (entsprechend 0% DHA). Dann wurden 5, 10 und 20% S(DHA)PE verwendet und mit SOPE zu 20% ergänzt. Nach Zusammenpipettieren der Lipide / Peptide / Farbstoffe wurden die Lösungen gut homogenisiert (Vortexer). Mittels eines leichten Stickstoffstroms wurde unter Drehen des schräg gehaltenen Gefäßes ein dünner Lipidfilm erzeugt. Die vollständige Trocknung des Films zur Entfernung von CHCl_3 bzw. TFE erfolgte im Vakuum über Nacht. Der Lipidfilm wurde in wässrigem Puffer rehydriert. Dazu wurden im Normalfall 600 μl „Fusionspuffer“ (150mM NaCl / 20mM Tris-HCl (pH

7,4) / 5mM DTT / 0,1 mM EDTA) hinzu gegeben und das Gefäß mit Stickstoff überschichtet. Die Ausbildung multilamellarer Liposomen erfolgte durch Schütteln (1400 rpm) bei 37°C für 1 h. Danach wurden die Proben stets im Eisbad gekühlt.

Die Herstellung von kleinen unilamellaren Liposomen (SUV = small unilamellar vesicles) erfolgte durch Sonifizieren in Eiswasser. Dazu wurde etwa 10 min vor Durchführung der Becherresonator am Sonifiziergerät mit Eiswasser gekühlt. Die Proben wurden entweder einzeln oder zu dritt mittels des entsprechenden Aufsatzes in den Becher gehängt und gegen herausdrücken mit einer Stativklammer oben fixiert. Sonifiziert wurde 8 min bei 80% Amplitude (Output 35-38%).

Aggregate sowie größere Liposomen wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm / 4°C / 20 min) entfernt. Das Bleichen von NBD in Donorliposomen zur Messung der Vermischung der inneren Lipidschicht erfolgte durch 20 mM Dithionit (DTN; $M_R = 174,1$) auf Eis für 30 min. 100 µl der farbstoffmarkierten Liposomen wurden mit 10 µl frisch hergestellter Dithionitlösung (200 mM bzw. 34,6 mg/ml) gut gemischt und im Dunklen auf Eis aufbewahrt. Zur Entfernung des DTN in der Lösung wurde eine Säulenchromatographie („Spin-Column“) durchgeführt. Sephadex G50 fine (Amersham Bioscience, Schweden) wurde in Fusionspuffer (150mM NaCl / 20mM Tris-HCl (pH 7,4) / 0,1 mM EDTA) gelöst und über Nacht quellen gelassen. Die Säulen wurden aus 2ml-Einwegspritzen präpariert, die in 15 ml Falcon-Tubes gesteckt wurden. Zunächst wurde ein Antibiotika-Testplättchen in die Säule gegeben und diese dann mit der Lösung von Sephadex G50 (nach Aufschlännen) bis zum oberen Rand gefüllt. Es wurde 7 min bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach nochmaligem Befüllen der Säule wurde 3 min bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Austausch des 15 ml Falcon-Tubes wurde die Probe aufgetragen (110 µl) und 3 min zentrifugiert (1.000 rpm, 4°C). Im Durchlauf wurden so gebleichte Liposomen erhalten.

Donorliposomen (iii.), mit bzw. ohne DTN-Behandlung, wurden mit den andern Liposomen (i. oder ii.) im Verhältnis 1:4 auf Eis gemischt und in die 96-Loch Platten pipettiert. Dabei bestand die Driftkontrolle aus einem Teil Donorliposomen und 4 Teilen Puffer. Durch sie wurde die Zersetzung des Farbstoffes NBD, die Adsorption der Liposomen an die Gefäßwand sowie der elektronische Drift des Geräts während der Fluoreszenzmessung in den Kinetiken kontrolliert.

Nach zweiminütigem Temperieren der Platte auf 37°C (Wasserbad) wurde sofort die Messung im Lesegerät (BMG FluoSTAR) gestartet. Die Fluoreszenz von NBD bei 530 nm (Anregung 460 nm) wurde in Intervallen von 1 min aufgezeichnet (Gesamtdauer 60 Minuten). Danach erfolgte durch Hinzupumpen des Detergenz Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) die Zerstörung der Liposomen und die Messung der maximalen Fluoreszenz. Durch Tabellenkalkulation (Microsoft Excel) wurde aus deren Differenz zum anfänglichen Wert die aufgenommene Kinetik auf 100% kalibriert.

Zur Charakterisierung des Einflusses von AmpOX wurde dieses auf der Analysenwaage eingewogen und in DMSO gelöst. Nach Verdünnung der erhaltenen Stammlösung wurden entsprechende Mengen DMSO zu den Lipid/Peptid-Mischungen vor dem Auftrocknen hinzugefügt. Die Rekonstitution der Liposomen folgte wie oben beschrieben.

3.3.5 Bestimmung des P/L-Verhältnisses

Die Bestimmung des Peptid/Lipid (P/L)-Verhältnisses in Liposomen mit Peptid (ii.) erfolgte wie in [60] beschrieben. Dazu wurde zunächst nicht gebundenes Peptid durch Ultrazentrifugation (UZ) eines Aliquots aus den Proben, mit welchen die Fusionskinetiken vorher aufgenommen wurden, entfernt. 300 μ l der jeweiligen Probe wurde am Boden eines Zentrifugenröhrchens (Polyallomer; 11 x 60 mm; Beckman, USA) mit 700 μ l 60% Saccharose (w/v) gemischt und durch vorsichtiges Hinzutropfen von 2,5 ml 30% Saccharose (w/v) aus einer 10 ml-Spritze ohne Kolben samt langer Kanüle überschichtet. Nach Überschichtung mit weiteren 0,5 ml Puffer (150mM NaCl; 20 mM Tris (pH 7,4); 0,1 mM EDTA) mittels 1000 μ l Eppendorf-Hubkolbenpipette wurden die Röhrchen in die Zentrifugenbecher gestellt. Diese wurden auf der Analysenwaage auf \pm 1 mg austariert. Die UZ wurde im SW60Ti Rotor bei 56.000 rpm (322.000 \times g) für 20 h bei 20°C durchgeführt. Danach wurden Fraktionen von je 1 ml von unten nach oben mit einer 1 ml-Spritze und langer Nadel entnommen. Um Mischung der Fraktionen zu vermeiden, wurde dabei die Nadel stets am Rand der Lösung vorsichtig eingetaucht und nach Aufziehen der Fraktion wieder vorsichtig herausgezogen. Die Liposomen wurden in der oberen Fraktion (Nr. 4) erhalten, ungebundenes Peptid blieb in Fraktion Nr. 1. Die Fraktionen 2 und 3 wurden verworfen.

Das in Liposomen inkorporierte Peptid aus Fraktion Nr. 4 wurde durch Messung der Fluoreszenz des Tryptophan quantifiziert. 100 μ l der Fraktion wurden in der Fluoreszenzküvette in 800 μ l Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,4), 0,1 mM EDTA) und 100 μ l 10% SDS (w/v; Endkonzentration 1%) verdünnt. Unter stetigem Rühren wurde am Shimadzu RF-1501 Fluoreszenzspektrometer ein Emissionsspektrum zwischen 220 und 400 nm aufgenommen (Anregung 290 nm). Das Maximum bei 320-323 nm wurde abgelesen. Zunächst erfolgte die Messung eines Leerwertes (Liposomen ohne Peptid; i.) dabei wurde der Fluoreszenzwert A erhalten. Die Messung von Liposomen mit Peptid ergab den Wert B. Die Peptidproben wurden zweimal mit Peptid bekannter Konzentration (interner Standard, gelöst in TFE) aufgestockt (B1 und B2). Aus ihrer Differenz (B2-B1) sowie dem Wert B und dem Leerwert A wurde die Konzentration des Peptides anhand der zugegebenen Menge an internem Standard errechnet.

Die Quantifizierung der Lipide erfolgte durch Bildung eines Molybdophosphatkomplexes der enthaltenen Phosphatgruppe. Dabei wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zunächst wurden

je 75 µl der Fraktion Nr. 4 aus der UZ in Reagenzgläser aliquotiert und mit 400 µl 70% Perchlorsäure bei 200°C für 1,5 Stunden auf dem Heizblock aufgeschlossen. Parallel wurde die Bestimmung mit Phosphat-Standardlösungen (0, 20, 40, 60, 80 und 100 nmol) durchgeführt. Nach Abkühlen der klaren Lösungen wurden je 2,4 ml einer 0,44%-igen (w/v) Lösung von Hexa-Ammoniumheptamolybdat-4-hydrat und 2,4 ml einer 2,5%-igen (w/v) Lösung von Fiske-Subbarow Reduktionsreagenz hinzupipettiert und die Reagenzgläser gut gemischt (Vortexer, 1600 rpm). Nach Kochen für 10 min in siedendem Wasser wurden die Reagenzgläser in Eiswasser abgekühlt. Ein Milliliter der Lösungen wurde in Kunststoffküvetten überführt. Die Absorption bei 820 nm wurde am UV/Vis-Spektrometer gegen den Leerwert (0 nmol Phosphat) gemessen. Aus den Absorptionen der Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet. Die Werte der Standards wurden gegen die enthaltenen Phosphatmengen in einer Kalibrierungsgerade aufgetragen. Sie diente der Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Menge an Phosphat bzw. Lipid. Das P/L-Verhältnis wurde durch Division von Peptidkonzentration durch Lipidkonzentration erhalten.

3.3.6 Auswertung der Fusionskinetiken

Die Fusionskinetiken wurden unter der Verwendung von Microsoft Excel in Prozent [%] abhängig von der Zeit [min] erhalten. Von diesen Werten wurden die Werte der Kinetiken der leeren Liposomen (ohne Peptid) abgezogen. Die Fusionswerte wurden um den Wert des Fluoreszenzrückganges von NBD durch Zugabe unter dem Einfluss des Detergenz Triton X-100 korrigiert (2,8 %). Bei der Auswertung der Fusionskinetiken wurde zum einen deren Wert nach einer Stunde abgelesen (Fusionsausbeute). Zur Ermittlung der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit wurden die Kinetiken in den ersten 10 Minuten durch Anwendung eines Polynoms gefittet und die erste Ableitung gebildet (Origin 7.0 Software, OriginLabs). Dabei wurde der Wert bei $t = 1$ min abgelesen und für die Vergleiche der Peptide herangezogen (Einheit: %/min).

3.3.7 Liposomenfusion mit Histidin-Peptiden

Zur Messung der Fusogenität von Histidinpeptiden bei verschiedenen pH-Werten wurden diese zunächst standardmäßig in Lipidfilme integriert (siehe Kap. 3.3.4). Die Rehydrierung erfolgte unter Verwendung von Puffern im pH-Bereich von 4 bis 7,5. Hierbei wurde bei pH 4 bis 5 20 mM Tris-HCl durch 20 mM Zitronensäure-Natriumcitrat ersetzt. Zwischen pH 5,5 und 7,5 wurde 20 mM Tris-HCl durch 20 mM Tris-Maleat-NaOH ersetzt. Die Konzentrationen von NaCl (150mM), EDTA (0,1mM) und DTT (5 mM) blieb unverändert.

3.3.8 Aminopyrazol / Peptid Interaktionen

3.3.8.1 Kosolubilisierung

Die Wechselwirkung von AmpOX mit dem Peptid LLV16 wurde durch Kosolubilisierung in TFE und Messung der Trübung der Lösung (OD600) ermittelt. Dazu wurde zunächst AmpOX auf der Analysenwaage in ein Reagiergefäß eingewogen und dann TFE hinzugegeben, damit die Konzentration 10,5 mM betrug. Durch Behandlung der Probe für 15 min im Ultraschallbad konnte AmpOX in TFE kolloidal gelöst werden. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungen einer Konzentration von 10, 20, 50 und 100 μM AmpOX in TFE (je 500 μl) hergestellt. Die Trübung der Lösungen wurde durch Messung der OD600 am UV/Vis-Spektrometer ermittelt. Parallel wurden aus Stammlösungen Peptidlösungen mit einer Endkonzentration von 10 μM in TFE vorbereitet. Durch Verwendung der AmpOX-Stammlösungen wurden nun die gleichen Konzentrationen an AmpOX (10, 20, 50 bzw. 100 μM) in den peptidhaltigen Aliquoten erreicht. Somit ergaben sich AmpOX/Peptid (A/P)-Verhältnisse von 1, 2, 5 bzw. 10. Die Trübung dieser Lösungen wurde analog ermittelt.

3.3.8.2 Massenspektrometrie

Die hergestellten Proben von Peptid LLV16 (Konz. 10 μM) und AmpOX in verschiedenen A/P-Verhältnissen wurden unter Verwendung einer 50 μl Hamilton-Spritze und der Spritzenpumpe in das Q-ToF ESI Massenspektrometer injiziert (Flussrate 2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Dabei wurde dieses über die „MS Tune-Page“ der Software Masslynx angesteuert. Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um ein Tandemmassenspektrometer mit Quadrupol sowie time-of-flight (TOF) Massenanalysator. Bei der normalen Anwendung erfolgte die Massenauftrennung im TOF. Der Quadrupol sollte also eine optimale Transmission der Ionen ermöglichen. Durch das Steuerelement „MS Profile“ konnte hierfür die Radiofrequenz des Quadrupols optimiert werden. Somit wurde eine kontinuierlich hohe Sensitivität bei der Detektion von Ionen über einen breiten Massenbereich gewährleistet. Die Einstellungen in „MS-Profile“ erlauben die Optimierung eines Scans (Detektion im Massenspektrometer) auf drei verschiedene Massen. Dabei werden Prozentwerte der gesamten Scanzeit (üblicherweise eine Sekunde) angegeben. Die „dwell time“ gibt die Zeit während einem Scan an, bei der Ionen der ausgewählten Masse den Quadrupol passieren. „Ramp time“ bezeichnet die Zeit, in der der Quadrupol während des Scans die Radiofrequenz kontinuierlich bis zur nächsten Masse verändert. Durch entsprechende Selektion der Zeiten ist eine hohe Sensitivität über einen breiten Massenbereich gewährleistet. Bei der Detektion von AmpOX/Peptid-Komplexen wurden

folgende „MS-Profil“-Einstellungen verwendet: Mass1 = 100, dwell time = 20%, ramp time = 10%; Mass2 = 1300, dwell time = 60%, ramp time = 10%; Mass3 = 1600.

Die Massenspektren wurden im Bereich von 500 bis 2000 m/z aufgenommen. Bei den Tandem-MS Untersuchungen wurde bei einer festen Radiosequenz der Quadrupol auf das Signal des Komplexes justiert.

Die für die Untersuchungen an TFE-Lösungen von AmpOX mit Peptid verwendete Hamilton-Spritze wurde danach mehrmals mit TFE und AcN/H₂O/Ameisensäure 50:49:1 (v/v/v) gespült. Trotzdem waren in darauf folgenden Messungen von Peptid in TFE (ohne AmpOX) immer noch Signale von AmpOX sichtbar. Es empfahl sich daher, für die Injektion von AmpOX eine eigene Hamiltonspritze zu verwenden.

4 Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil ist in insgesamt fünf Kapitel unterteilt. Zunächst wird die Bestimmung der Reinheit der Peptide erläutert, da diese für die Untersuchungen sehr entscheidend ist. Danach folgen die Untersuchungen des Einflusses von Peptiden auf die Liposomenfusion. Dabei werden zunächst bei gleicher Zusammensetzung der verwendeten Lipide die Effekte der einzelnen Bereiche der Peptide untersucht, unterschieden in: i. flankierende Aminosäuren und ii. hydrophobe Kernsequenz. Das dritte Unterkapitel befasst sich mit den Einflüssen der Lipide während der Fusion. Im vierten Unterkapitel wird der Effekt des hydrophoben Liganden AmpOX, einem dimeren Aminopyrazolderivat, auf die fusogene Aktivität von Peptiden gezeigt und im letzten Abschnitt wird das verwendete System auf ein von einem SNARE-Protein aus Hefe abgeleitetes TMD-Peptid und zwei Mutanten desselben angewendet.

4.1 Peptide

4.1.1 Reinheit

Die Reinheit der Peptide ist von entscheidender Bedeutung für deren fusogene Eigenschaften. Verunreinigungen können nach Einbau in Liposomen das Resultat beeinflussen. Da die verwendeten Peptide eine hohe Anzahl an hydrophoben Seitenketten in ihrer Sequenz aufweisen, war eine Aufreinigung mittels HPLC sehr schwierig und mit sehr geringen Ausbeuten verbunden.

Zur Überprüfung der Reinheit der Peptide wurden Lösungen der Peptide in TFE massenspektrometrisch auf ihren Gehalt an verkürzten Fragmenten untersucht. Zwar konnten dabei keine quantitativen Aussagen getroffen werden, bezüglich verkürzter Syntheseprodukte bzw. Fragmente durch den Abbau während der Lagerung konnte aber die Reinheit abgeschätzt werden.

In Abb. 12 ist beispielhaft das Massenspektrum des Peptids LV16-P8G9 ($M = 2613,4 \text{ g/mol}$) im Bereich von 800 bis 1400 m/z dargestellt. Es zeigt bei 1307,5 und 872,9 m/z jeweils das zweifach bzw. dreifach geladene Ion des Peptids. Neben diesen beiden Ionen des vollständigen Peptids sind andere Signale kaum vorhanden. Die Reinheit des Peptids bezüglich enthaltener Peptidfragmente konnte somit auf etwa 90% geschätzt werden.

Die Überprüfung der Reinheit wurde an allen Peptiden durchgeführt. Dabei ergaben sich stets Werte zwischen 85 und 90%, die sich für die weiteren Untersuchungen als ausreichend erwiesen. Es wurden deshalb die direkt bezogenen Rohgemische verwendet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird hier auf die Abbildung aller Spektren der insgesamt 23 verwendeten Peptide verzichtet.

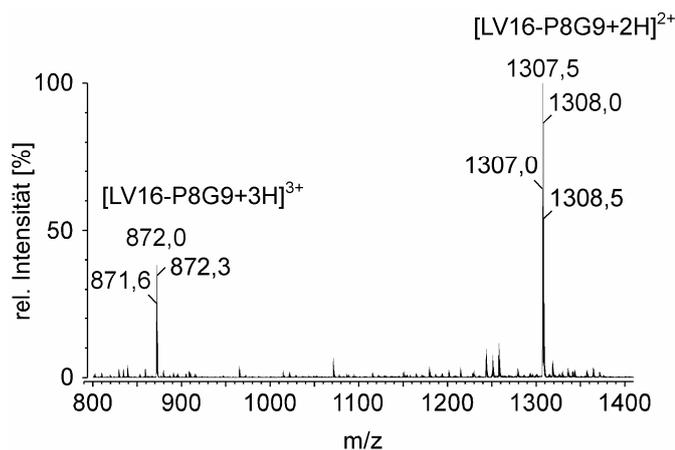


Abb. 12 Reinheit der Peptide am Beispiel LV16-P8G9 ($M = 2613,4 \text{ g/mol}$). Das Massenspektrum zeigt das zweifach sowie das dreifach geladene Ion bei $1307,5$ bzw. $872,0 \text{ m/z}$. Andere Signale treten kaum auf. Anhand der Intensitäten kann von einer Reinheit von etwa 90% ausgegangen werden. Die Massenspektren aller anderen Peptide wiesen vergleichbare Reinheiten auf.

4.1.2 Entfernung von *p*-Kresol bei Peptiden aus der Boc-Synthese

Bei einigen Peptiden, die via tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Peptidsynthese hergestellt wurden, trat eine Verunreinigung mit *p*-Kresol auf. Dieses wird bei der Entfernung der verwendeten Schutzgruppen während der Synthese eingesetzt [75]. Aufgrund seiner Struktur (4-Methylphenol) weist *p*-Kresol eine UV-Absorption bei 280 nm auf. Mittels HPLC und UV-Spektroskopie wurde nach Kalibrierung mit externem Standard ein Gehalt von $0,3 - 1,3 \%$ in den untersuchten Peptiden festgestellt. Dieser wirkte sich störend auf die Quantifizierung der Peptide aus, die mittels UV-Absorption von Tryptophan (282 nm) erfolgte. Da *p*-Kresol zudem einen sehr hohen Siedepunkt von 202°C besitzt, konnte es auch mittels Evakuierung bzw. Gefriertrocknung nicht entfernt werden.

Wie bereits erwähnt war eine Aufreinigung der Peptide mittels HPLC aufgrund des hohen Anteils an hydrophoben Aminosäuren schwierig und mit sehr geringen Ausbeuten verbunden. Aus diesem Grund wurde eine einfache und schnelle Methode auf Basis der Festphasenextraktion (SPE; „solid phase extraction“) entwickelt. Dabei wurden tC_2 -Säulen verwendet, deren Säulenmatrix Ethylgruppen trägt und somit eine geringere Hydrophobie als die oftmals verwendeten Oktadekanylgruppen (C_{18}) aufweist. Nach Lösen des Peptids in Acetonitril (AcN)/ H_2O (20:80) wurde es über eine vorher mit AcN/ H_2O (5/95) equilibrierte Säule geschickt. Dabei adsorbierte das Peptid nicht an die Säulenmatrix und wurde so direkt im Durchlauf erhalten. Die Verunreinigung *p*-Kresol haftete dagegen an die Säulenmatrix und wurde durch 100% AcN in einer weiteren Fraktion eluiert.

Der Nachweis von *p*-Kresol in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion erfolgte durch HPLC mit UV-Detektion bei 280 nm. Durch Injizieren einer *p*-Kresol-Lösung als Standard konnte eine Retentionszeit von ca. 20 min ermittelt werden (siehe Pfeil in Abb. 13A). Vor der Aufreinigung des Peptids LV16 zeigt dessen Chromatogramm deutlich das Signal von *p*-Kresol (siehe Pfeil in Abb. 13B). Nach der Aufreinigung durch SPE war kein Signal mehr zu erkennen. *p*-Kresol wurde also vollständig entfernt (Abb.13C).

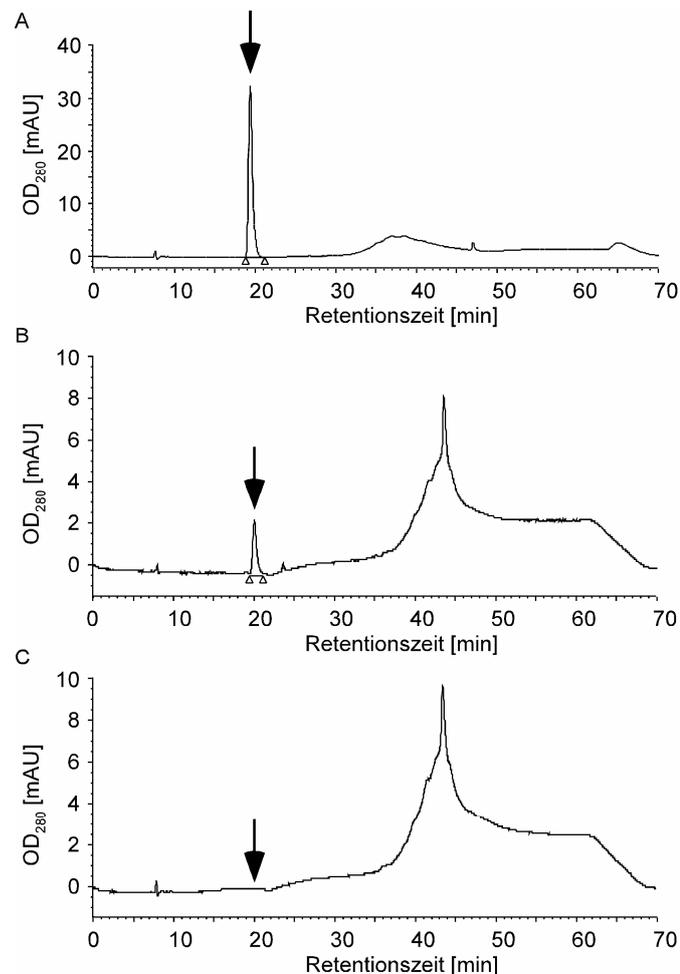


Abb. 13 Entfernung von *p*-Kresol durch SPE. A, Retentionszeit von *p*-Kresol im HPLC-Chromatogramm. B und C, Injektion des Peptids LV16 vor (B) und nach (C) SPE. Die Pfeile zeigen die Position von *p*-Kresol (vgl. A). Das Signal bei etwa 43 min zeigt das Peptid LV16. Nach SPE ist kein *p*-Kresol in der Probe vorhanden (C).

Die HPLC-Chromatogramme in Abb. 13B und 13C zeigten zusätzlich ein Signal bei etwa 43 min. Hierbei handelt es sich um das Peptid LV16. Es wird deutlich, dass unter den verwendeten Bedingungen mittels HPLC keine saubere Trennung des Peptids erfolgte, was die Problematik einer HPLC-Aufreinigung verdeutlicht.

Die Reinheit der Peptide wurde wiederum mittels Massenspektrometrie überprüft. Abb. 14 zeigt beispielhaft Massenspektren des Peptids LV16 vor (Abb. 14A) und nach (Abb. 14B) SPE. Das

Peptid erscheint als doppelt geladenes Ion bei $m/z = 1273,4$ (Sternchen). In A sind mehrere einfach geladene Peptidfragmente (a-d) zu erkennen (Details siehe Legende). Nach SPE (Abb. 14B) kamen diese Ionen hingegen nicht mehr vor. Allerdings sind auch in Abb. 14B zweifach geladene Ionen (beispielsweise bei $1222,9$ m/z) erkennbar. Diese stellen Fehlsynthese-Produkte dar, bei denen einzelne Aminosäuren fehlen. Sie konnten mittels SPE nicht entfernt werden.

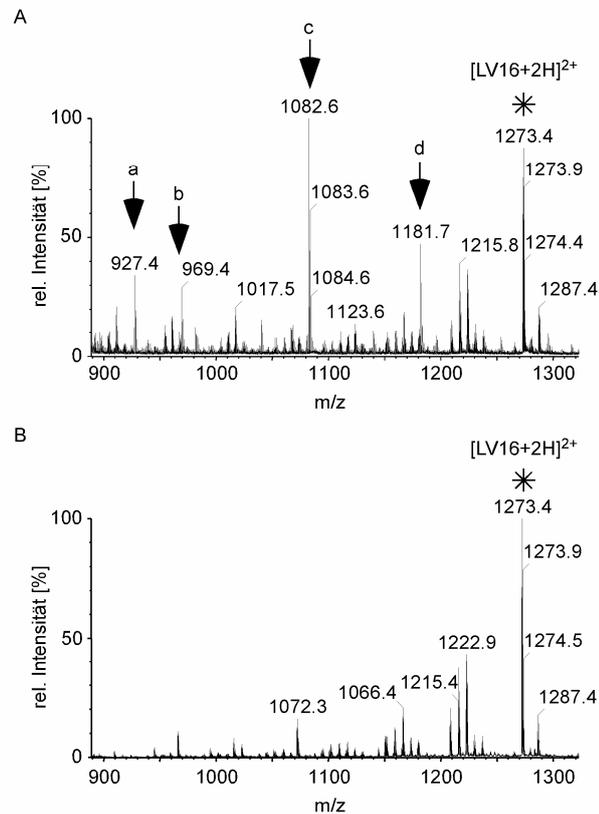


Abb. 14 Entfernung von Peptidfragmenten durch SPE. A, Massenspektrum vor SPE. LV16 führt zu einem doppelt geladenen Ion von $1273,4$ m/z (Stern). Dabei treten einige einfach geladene Fragmente auf (Pfeile), die als $\text{NH}_2\text{-VLVLVKKK-COOH}$ (a), $\text{NH}_2\text{-KWLVLVLV-COOH}$ (b), $\text{NH}_2\text{-KWLVLVLV-COOH}$ (c), und $\text{NH}_2\text{-KWLVLVLV-COOH}$ (d) identifiziert werden konnten. B, Durch SPE wurden diese Zersetzungsfragmente vollständig entfernt. Einige zweifach geladene Ionen (Fehlprodukte aus der Synthese) blieben vorhanden.

Die Verwendung der SPE erlaubt eine restlose Entfernung von *p*-Kresol aus den Peptiden LV16, LV20 und LV24. Dabei wurden sehr hohe Ausbeuten an Peptid von 97%, 93% bzw. 100% erhalten. Die massenspektrometrische Ermittlung der Reinheit hat zudem gezeigt, dass auch kleinere Peptidfragmente durch SPE entfernt werden konnten.

Die betroffenen Peptide stammen aus einer Synthesecharge von Ende des Jahres 2002. Aufgrund eines Fehlers sind bei ihnen am N-Terminus jeweils nur zwei Lysine vorhanden. Später erhaltene Peptide wurden ohne Verwendung von *p*-Kresol synthetisiert. Deshalb war deren Aufreinigung durch SPE nicht mehr notwendig.

4.2 Peptidinduzierte Liposomenfusion

4.2.1 Design der Peptide

Basierend auf den Ergebnissen aus der Untersuchung von Peptiden, die den TMDn von SNARE-Proteinen nachempfunden sind [63], wurde eine Reihe von neuartigen Peptiden am „Reißbrett“ entworfen und deren Einfluss auf die Fusion von kleinen unilamellaren Liposomen (SUV = small unilamellar vesicles) systematisch untersucht.

Die Sequenzen dieser *de novo* kreierte Peptide, welche im nachfolgenden als „LV-Peptide“ bezeichnet werden, sind in Abb. 15 zusammengefasst. Ein Tryptophan dient der Quantifizierung mittels UV-Absorption und Fluoreszenzspektroskopie.

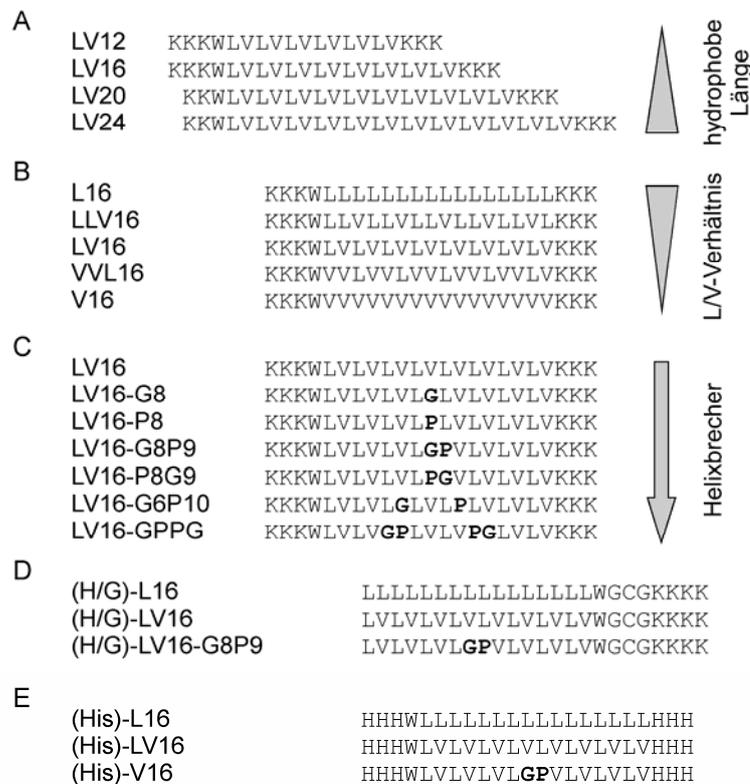


Abb. 15 Design der Peptide. A, In einer alternierenden Leu-Val-Sequenz wird die hydrophobe Länge der Peptide variiert. B, Peptide mit unterschiedlichen Anteilen an Leu und Val (Leu/Val-Verhältnis) in der Kernsequenz. C, In der „Muttersequenz“ LV16 wurden die Helixbrecher Gly und Pro eingefügt. Dies erfolgt in einzelner, paarweiser, zweifach isolierter und zweifach paarweiser Form. D, Sogenannte Host/Guest- (H/G)-Peptide weisen am N-terminus keine Lys-Reste auf. Stattdessen ist eine um das WGCG-Motiv erweiterte hydrophobe Sequenz (Guest) mit den hydrophilen Lysinen (Host) verbunden. E, Peptide, bei denen Histidine (His) die flankierenden Aminosäuren darstellen (im Gegensatz zu Lys).

Abb. 15A zeigt Peptide mit unterschiedlicher Länge. Sie basieren auf einer alternierenden Leu-Val-Sequenz im hydrophoben Kern. An diesen Peptiden sollte die optimale hydrophobe Länge für

die Fusogenität der Peptide ermittelt werden. Die Benennung der Peptide setzt sich aus dem Verhältnis der im hydrophoben Kern vorkommenden Leucin- und Valinresten (LV) und der Anzahl dieser Aminosäuren zusammen. LV20 und LV24 enthalten am N-Terminus jeweils nur zwei Lysine. Es konnte aber anhand von LV16 (mit 2 oder 3 N-terminalen Lysinen) gezeigt werden, dass dies keinen Einfluss auf die Fusogenität hat.

Bei einer hydrophoben Länge von 16 Aminosäuren wurde der Einfluss der Aminosäure des Leu/Val-Verhältnisses ermittelt (Abb. 15B). Valin besitzt eine β -verzweigte Seitenkette und wirkt daher destabilisierend auf α -Helices [64,65,76]. Der Einfluss des Leu/Val-Verhältnisses auf Fusogenität und konformationelle Flexibilität sollte hierbei systematisch untersucht werden.

Innerhalb einer Sequenz, die aus 16 alternierenden Leu und Val-Resten besteht (LV16), wurden die Helixbrecher Glycin und/oder Prolin eingefügt, um die Ausbildung einer Transmembranhelix zu stören (Abb. 15C). Dies erfolgte zunächst in der Mitte der Sequenz einzeln (LV16-G8 und LV16-P8) und paarweise (LV16-G8P9 und LV16-P8G9), wobei auch der Effekt von zwei einzelnen (LV16-G6P10) oder zwei paarweisen (LV16-GPPG) Helixbrechern untersucht wurde.

Um den Effekt der N-terminalen geladenen Lysine zu untersuchen, wurden basierend auf den von L.K. Tamm verwendeten Peptiden [77], drei sog. Host/Guest-(H/G)-Peptide kreiert, an deren N-Terminus keine Lysine vorhanden sind (Abb. 15D). Die hydrophobe Sequenz (Guest) aus jeweils 16 Aminosäuren ist mittels WGCG-Motiv mit vier Lysinen (Host) verknüpft. Die Lysinreste sorgen, wie oben bereits erwähnt, neben der Erhöhung der Löslichkeit für einen besseren Einbau der Peptide in die Lipiddoppelschicht. Hier soll der Einfluss des N-terminalen Tris-Lysin-Motivs auf die Fusogenität ermittelt werden.

Die Lysine sind bei physiologischem pH aufgrund der Protonierung der ϵ -Aminogruppe ($pK_a \approx 10,3$) positiv geladen und können somit elektrostatische Interaktionen mit den Kopfgruppen der Lipide eingehen. Um den Effekt der Ladungen der Peptide auf die Fusogenität zu ermitteln, wurde eine Reihe von Peptiden entworfen, bei denen die flankierenden Lysine durch Histidine ausgetauscht sind (vgl. Abb. 15E). Der Imidazolring von Histidin besitzt einen pK_a -Wert von etwa 6,0 und ist bei physiologischem pH ungeladen. Anhand von drei Peptiden mit unterschiedlichen Kernsequenzen, (His)-L16, (His)-LV16 und (His)-LV16-G8P9, wurde der Einfluss der Ladung der flankierenden Aminosäuren auf die Fusogenität ermittelt.

In den folgenden Unterkapiteln (4.2.2 bis 4.2.4) werden die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Fusogenität der Peptide gemäß ihrer Anordnung in Abb. 15 dargestellt. Die Lipidzusammensetzung der verwendeten Liposomen ist dabei stets identisch.

4.2.2 Liposomenfusion durch Peptide unterschiedlicher Länge

Peptide mit einer alternierenden Leu-Val-Sequenz von unterschiedlicher Länge wurden in Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC), welches aus Eigelb extrahiert wurde, Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS), welche aus Schweinehirn stammen (Gewichtsverhältnis 3:1:1) in unterschiedlichen Peptid/Lipid (P/L)-Verhältnissen eingebaut. Die Liposomenfusion wurde unter Anwendung einer etablierten Methode anhand der Verringerung des Fluoreszenzenergie transfers gemessen [68]. Die Basis bildet hierbei der sog. Fluoreszenzresonanzenergie transfer (FRET) zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen NBD und Rhodamin, die kovalent an PE gebunden sind (NBD-PE bzw. Rh-PE). Sie wurden in Liposomen in Konzentrationen (jeweils 0,8 mol-%) eingebaut, bei denen aufgrund des Abstandes (Försterradius) nach Anregung bei 460 nm die Fluoreszenzenergie des NBD-PE (530 nm) auf Rh-PE (Anregung bei 530 nm) übertragen wird. Bei der Fusion von farbstoffmarkierten (sog. Donorliposomen), mit unmarkierten (Akzeptor-) Liposomen, welche Peptid enthalten, vergrößert sich der Abstand der beiden Fluorophore auf der Oberfläche und die Fluoreszenz des NBD (530 nm) steigt an. Die Messung dieser Fluoreszenz erfolgt zeitabhängig und stellt die Kinetik der Vermischung der Lipide (Fusionskinetik) dar.

Abb. 16 zeigt die Fusionsergebnisse von vier Peptiden unterschiedlicher hydrophober Länge. Die Fusionskinetiken (Abb. 16A) zeigten für LV16 die höchsten Werte. Sie besitzen eine anfängliche Steigung, die als globale Fusionsgeschwindigkeit interpretiert wird und die Wahrscheinlichkeit reflektiert mit der eine zufällige Kollision zweier Liposomen zum Fusionsereignis führt. Ihre Bestimmung erfolgte durch Anpassen der Werte in den ersten 10 Minuten mit anschließender Bildung der ersten mathematischen Ableitung mittels des Programms Origin. Der erhaltene Wert nach 1 min spiegelt die Steilheit der Kinetik wieder. Der erhaltene Fusionswert nach einer Stunde (1 h) entspricht der Summe bzw. die Ausbeute aller Fusionsereignisse.

Die Mittelwerte von anfänglicher Fusionsgeschwindigkeit bzw. -ausbeute der einzelnen Peptide wurden in Abb. 16B gegen das experimentell ermittelte P/L-Verhältnis aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass sowohl Fusionsgeschwindigkeit (Inset), als auch Fusionsausbeute linear mit dem P/L-Verhältnis ansteigen. Durch lineare Regression wurde die Ausgleichsgerade der Korrelation von Fusionsgeschwindigkeit bzw. Fusionsausbeute mit dem P/L-Verhältnis gebildet (vgl. Abb. 16C). Dabei werden durch die Steigungen der Ausgleichsgeraden zwei Parameter erhalten (Γ und Σ). Sie sind vom P/L-Verhältnis unabhängige Größen und dienen dem Vergleich der Fusogenitäten der Peptide bezüglich Fusionsgeschwindigkeit bzw. Fusionsausbeute.

Abb. 16D zeigt eine Gegenüberstellung der Fusogenitäten der vier untersuchten Peptide. Es wird deutlich, dass 16 Aminosäuren die optimale Länge bei der Fusion der verwendeten Liposomen

darstellen. Sowohl hinsichtlich der Fusionsgeschwindigkeit, als auch bezüglich der Fusionsausbeute wurde für die Peptide die Reihenfolge zu LV16 > LV20 > LV24 ≈ LV12 ermittelt.

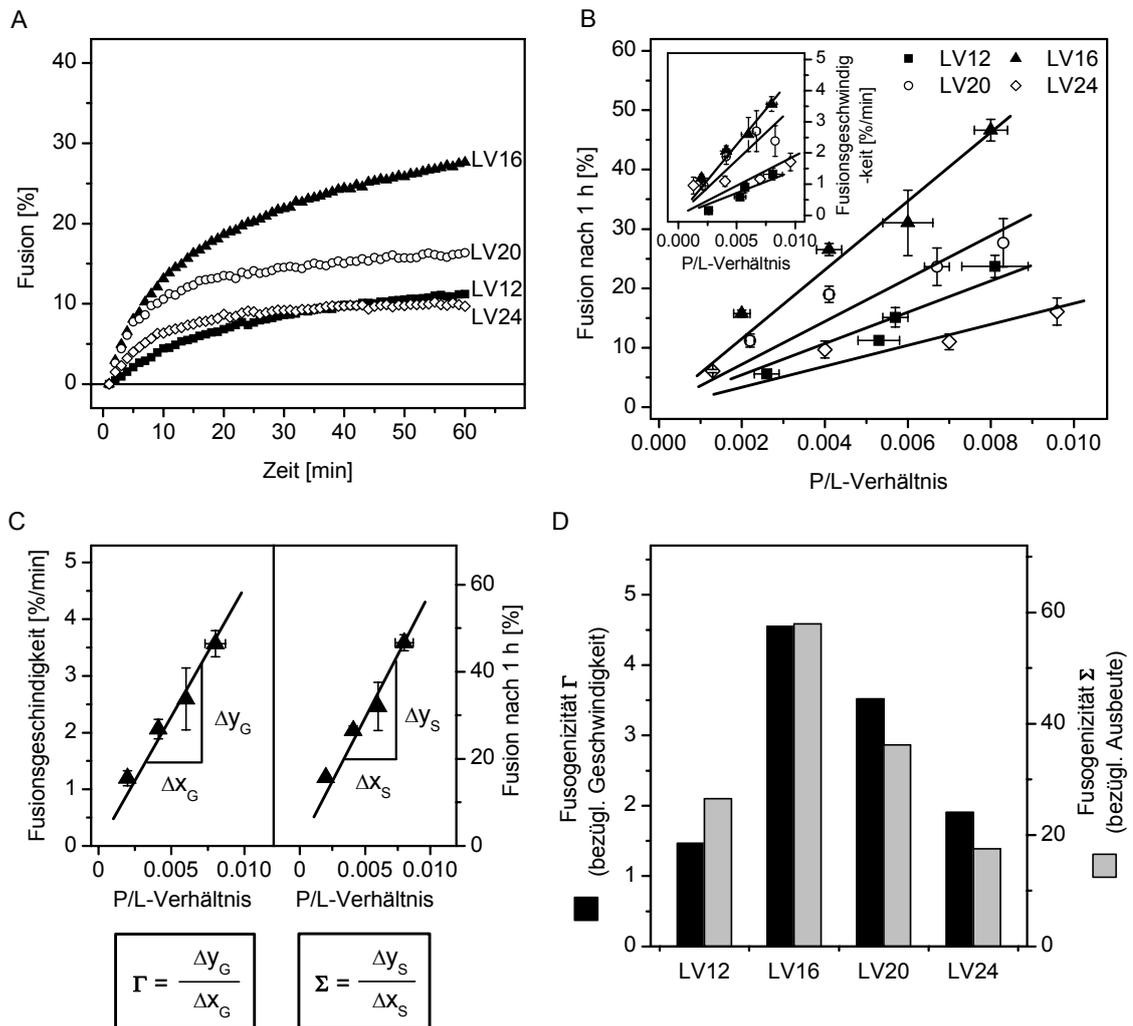


Abb. 16 Fusogene Aktivitäten von Peptiden unterschiedlicher Länge. A, Typische Fusionskinetiken bei einem P/L-Verhältnis von nominal 0,005. B, Die Korrelation der Fusionswerte nach 1 h bzw. der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeiten (Inset) mit den experimentell ermittelten P/L-Verhältnissen zeigt deren lineare Abhängigkeit (Linien). C, Ermittlung von Parametern, die vom P/L-Verhältnis unabhängig sind, am Beispiel LV16. Aus der Korrelation der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit (links) bzw. Fusion nach 1 h (rechts) mit dem P/L-Verhältnis werden durch lineare Regression zwei Steigungen (Γ bzw. Σ) berechnet. Diese sind dimensionslose Werte für die Fusogenitäten der Peptide und dienen dem Vergleich in D. Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3-6$ unabhängige Messungen). Hintergrundfusion, ermittelt durch parallele Messung von Liposomen ohne Peptid, wurde subtrahiert.

Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen wurden in den folgenden Experimenten Peptide einer hydrophoben Länge von 16 Aminosäuren untersucht. Dabei wurden verschiedene Gehalte an Leu und Val in der hydrophoben Kernsequenz verglichen. Zudem werden in die alternierende Leu-Val-Sequenz LV16 die helix-destabilisierenden Aminosäuren Gly und/oder Pro inkorporiert.

4.2.3 Sequenzspezifische peptidinduzierte Fusion

Nachdem gezeigt worden war, dass 16 Aminosäuren die optimale Länge der hydrophoben Kernsequenz der Peptide bilden, wurde deren Fusogenität unter dem Aspekt der Destabilisierung einer Helix untersucht. Dazu wurde zum einen das Leu/Val-Verhältnis verändert und zum anderen der Effekt von helixdestabilisierenden Aminosäuren in der Kernsequenz von LV16 untersucht. Abb. 17 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

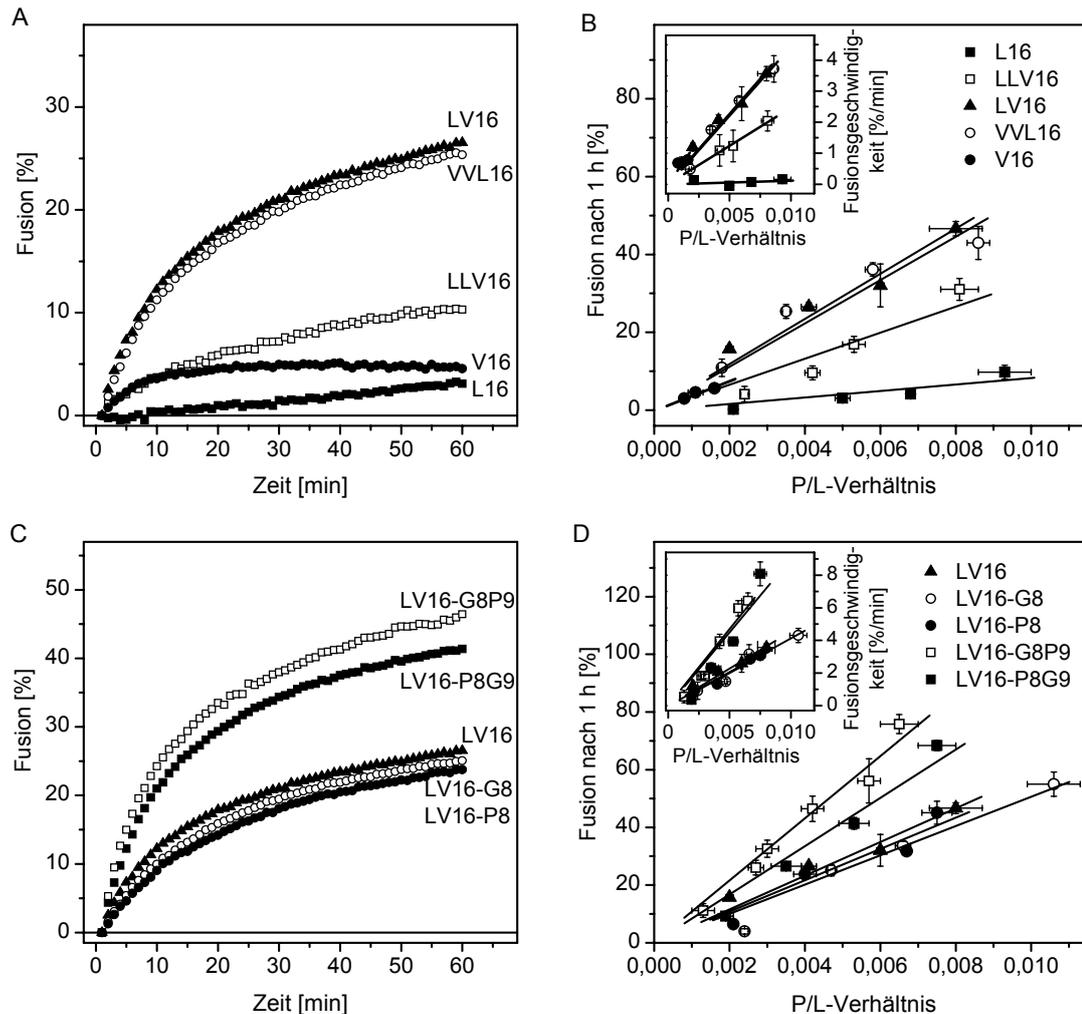


Abb. 17 Fusogene Aktivitäten von Peptiden gleicher Länge mit unterschiedlichen Kernsequenzen. A, Peptide mit unterschiedlichen Anteilen an Leu und Val bei einem P/L-Verhältnis von nominal 0,005. B, Die Fusion nach 1 h bzw. anfängliche Fusionsgeschwindigkeit (Inset) der Kinetiken aus A sind gegen die experimentell ermittelten P/L-Verhältnisse aufgetragen. C, Fusionskinetiken von Peptiden, welche helixdestabilisierende Reste in der „Muttersequenz“ LV16 enthalten. In D sind analog zu B wiederum die Fusion nach 1 h bzw. die anfängliche Fusionsgeschwindigkeit (Inset) gegen das P/L-Verhältnis aufgetragen. Messpunkte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler dar ($n = 3-18$ unabhängige Messungen). Hintergrundfusion, ermittelt durch parallele Messungen von Liposomen ohne Peptid, wurde subtrahiert.

Abb. 17A zeigt, dass ein Peptid aus Leucinen (L16) nahezu keinen fusogenen Effekt besitzt. Wurde jedoch der Anteil an Valin im Peptid erhöht, so resultierten mittlere (LLV16) bis starke (LV16, VVL16) fusogene Wirkungen. V16 wurde wesentlich schlechter eingebaut ($P/L < 0,002$). Deshalb kann ein Vergleich mit den anderen Peptiden nicht mit absoluter Gewissheit erfolgen. Abb. 17B zeigt, dass mit steigendem P/L-Verhältnis sowohl die Fusion nach einer Stunde als auch die Fusionsgeschwindigkeit (Inset) linear anstieg.

In der Sequenz LV16 wurde der Einfluss der helix-destabilisierenden Reste Glycin (G) und Prolin (P) untersucht. Der Einbau nur eines Glycins oder Prolins in der Mitte der Sequenz hatte keinen Effekt auf die Fusion (Abb. 17C). Wurde hingegen ein GP- oder PG-Paar verwendet, resultierte eine signifikante Fusionssteigerung. Auch bei den Peptiden mit Gly und/oder Pro stiegen sowohl Fusionsausbeute als auch Fusionsgeschwindigkeit mit dem P/L-Verhältnis linear an (Abb. 17D).

Aus den Fusionskinetiken wurden, wie in Kap. 4.2.2 erläutert, die Parameter Γ und Σ berechnet. Da beide Größen vom P/L-Verhältnis unabhängig sind, können die Peptide in Abb. 18 direkt miteinander verglichen werden.

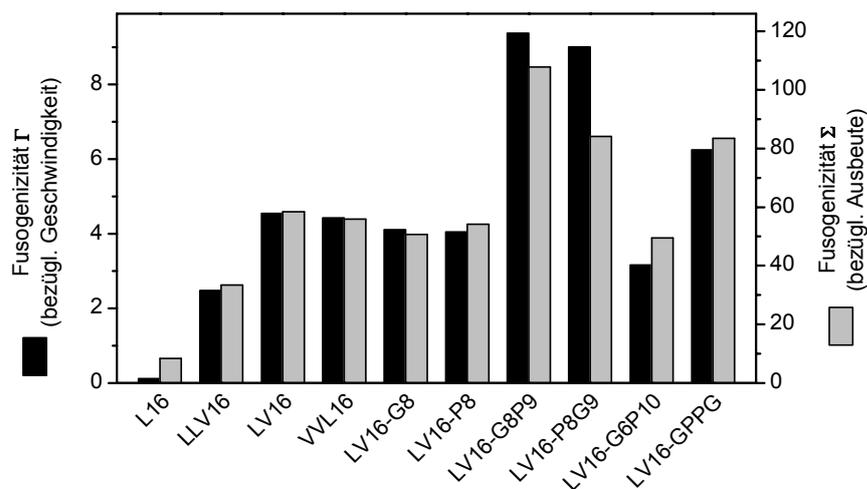


Abb. 18 Fusogenitäten von Peptiden gleicher Länge. Die beiden Parameter Γ (bezogen auf Fusionsgeschwindigkeit) und Σ (bezogen auf Fusionsausbeute nach 1 h) wurden analog Kap. 4.2.2 ermittelt.

Es wird deutlich, dass Fusionsgeschwindigkeit bzw. die Ausbeute der Fusion nach einer Stunde von L16 um das etwa 10- bzw. 80-fache gesteigert werden konnten. Die Fusogenitäten der Peptide lassen sich in folgende Reihenfolge einordnen: $L16 < LLV16 < VVL16 \approx LV16 \approx LV16-G8 \approx LV16-P8 < LV16-G8P9 \approx LV16-P8G9$. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Trennung von G und P in LV16-G6P10 die Fusogenität auf einen mit LV16 vergleichbaren Wert senkt. Die Einführung zweier isolierter GP- bzw. PG-Paare (LV16-GPPG) resultierte in Werten ähnlich LV16-

G8P9 bzw. LV16-P8G9. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine graphische Darstellung der Fusionskinetiken letzterer Peptide in Abb. 17 verzichtet.

Um zu zeigen, dass die gemessenen Fluoreszenzänderungen die Fusion beider Lipidschichten widerspiegelt und es sich dabei nicht um Fusionsintermediate wie Hemifusion handelt, wurde der Farbstoff NBD-PE in der äußeren Lipidschicht durch Behandlung mit Dithionit zu einem nicht fluoreszierenden Derivat reduziert [60]. Wie Abb. 19 zeigt, konnte am Beispiel der beiden Peptide LV16 und LV16-P8G9 kein Unterschied in der Fusionsausbeute nach einer Stunde ohne und mit Dithionitbehandlung festgestellt werden. Dies zeigt, dass sowohl innere als auch äußere Membran mit der gleichen Effizienz fusionieren.

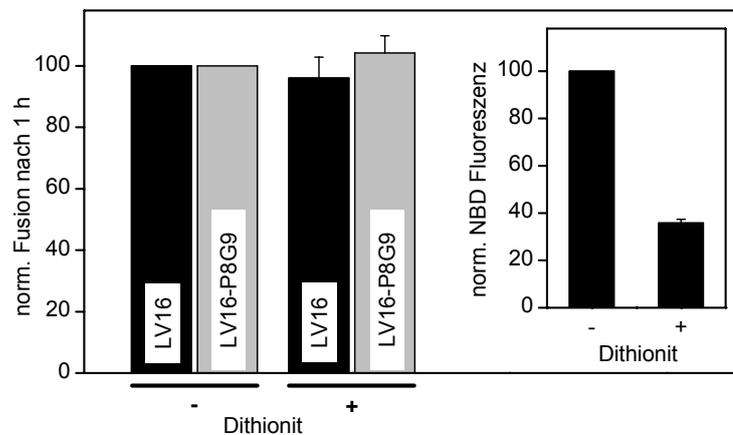


Abb. 19 Fusion der inneren Lipidschichten nach Behandlung mit Dithionit (DTN). Am Beispiel LV16 und LV16-P8G9 zeigt sich, dass die Fusion nach 1 h mit (+) und ohne (-) Behandlung mit 20 mM Dithionit (30 min auf Eis) vergleichbar ist. Beide Lipidschichten fusionieren also mit der gleichen Effizienz. Die mittleren Fusionswerte (Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 4$) wurden normalisiert (- DTN = 100%). Inset, Die ursprüngliche NBD-Fluoreszenz der Donorliposomen wurde durch DTN um $64 \pm 2\%$ verringert. Dies deutet auf ein bevorzugtes Bleichen der äußeren Lipidschicht hin, in welcher sich etwa 66% der Lipide der Liposomen befinden, deren mittlerer Durchmesser von 30 nm mittels Elektronenmikroskopie bestimmt wurde [63]. Alle Werte wurden bezüglich Hintergrundfusion von Liposomen ohne Peptid korrigiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fusogenität eines Peptids aus Leucinen durch die Einführung von β -verzweigten Valinen gesteigert werden kann und ein Optimum bei einem Leu/Val-Verhältnis von 1 erreicht (LV16). Durch Paare der helixdestabilisierenden Aminosäuren Gly und Pro wird die Fusogenität von LV16 noch weiter erhöht. Dies deutet sehr stark auf einen Zusammenhang zwischen der strukturellen Flexibilität eines Peptids und dessen Fusogenität hin.

4.2.4 Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Fusion

Die bisherigen Ergebnisse haben die Liposomenfusion durch Peptide unter Betrachtung deren hydrophober Kernsequenz beschrieben. Dieses Kapitel zeigt den Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Membranfusion. Dabei wurden, aufbauend auf bisherigen Erkenntnissen, drei unterschiedlich fusogene Sequenzen (L16, LV16 und LV16-G8P9) verwendet. Zunächst erfolgte die Ermittlung der Fusionseigenschaften von Peptiden, bei denen die N-terminalen Lysine fehlen, danach wird die Fusion abhängig vom Ladungszustand der flankierenden Aminosäuren gezeigt.

4.2.4.1 Fusion durch Peptide ohne N-terminale Lysine

Im Gegensatz zu TMDn aus SNARE-Proteinen besitzen Fusionspeptide von viralen Fusionsproteinen an ihrem N-Terminus keine Lysinreste. Zur Untersuchung der Fusion durch Peptide, die dem Influenza Hämagglutinin Fusionspeptid entsprechen waren von anderen Arbeitsgruppen sogenannte „Host/Guest“ (H/G)-Peptide entworfen worden [77]. Dabei besteht die „Host“-Sequenz aus Lysinen, die über ein WGCG-Motiv mit der hydrophoben Sequenz („Guest“) verbunden sind. Auf die LV-Peptide übertragen bietet diese Anordnung die Möglichkeit den Effekt der N-terminalen Lysine während der Membranfusion zu untersuchen.

Es wurden drei Sequenzen ausgewählt und deren Fusogenitäten in H/G-Peptiden unter gleichen Bedingungen wie bei den bereits untersuchten „Standardpeptiden“ ermittelt. In Abb. 20A sind die Sequenzen der Peptide wiedergegeben. Abb. 20B zeigt die Fusionskinetiken bei einem nominalen P/L-Verhältnis von 0,005. Eine reine Leu-Sequenz (L16) war nicht fusogen. Eine Sequenz aus alternierenden Leu- und Val-Resten führte zu erhöhter Liposomenfusion. Diese ließ sich durch Einbringen eines GP-Paares noch um etwa das doppelte verstärken. Die resultierenden Fusionsgeschwindigkeiten und Fusionswerte nach einer Stunde wurden wie unter Kap. 4.2.2 ermittelt und sind in Abb. 20C den Werten der „Standardpeptide“ gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass die Reihenfolge der Fusogenitäten auch bei den H/G-Peptiden $L16 < LV16 < LV16-G8P9$ beträgt.

Bezüglich der fusogenen Eigenschaften der drei untersuchten Peptide bestehen bei L16 und LV16-G8P9 keine signifikanten Unterschiede zwischen Peptiden mit bzw. ohne N-terminalen geladenen Aminosäuren. Bei LV16 tritt allerdings bei Peptiden mit N-terminalen Lysinen eine etwa doppelte Fusogenität auf.

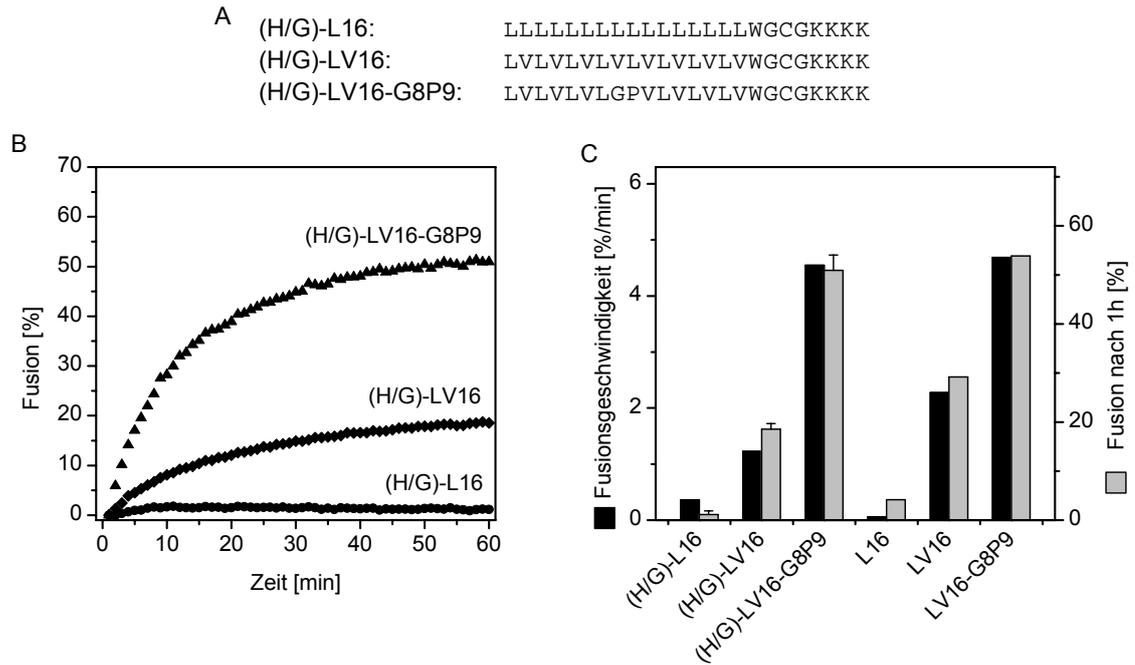


Abb. 20 Fusion durch H/G-Peptide. A, Sequenzen der Peptide. Am N-Terminus sind keine Lysinreste vorhanden. Die hydrophoben Sequenzen (Guest) sind über eine WGCG-Sequenz mit den hydrophilen Lysinen (Host) verbunden. B, Fusionskinetiken der Peptide bei P/L-Verhältnissen von nominal 0,005. C, Vergleich der Fusionsgeschwindigkeiten bzw. der Fusion nach 1 h der H/G-Peptide (P/L = 0,005; normalisiert) mit den Werten der Standardpeptide (errechnet aus Γ bzw. Σ für P/L = 0,005; aus Abb. 18). Werte für H/G-Peptide entsprechen Mittelwerten \pm Standardfehler (n = 4).

4.2.4.2 Fusion in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Aminosäuren

Die Fusogenität der Peptide wurde in den bisherigen Experimenten in einem Puffer mit physiologischem pH-Wert (7,4) ermittelt. Aufgrund des pK_a -Wertes der ϵ -Aminogruppe des Lysins ($pK_a = 10,3$) waren dabei die flankierenden Aminosäuren stets protoniert und somit positiv geladen. Peptide, bei denen diese Reste gegen Histidin ($pK_a = 6,0$) ausgetauscht sind, bieten die Möglichkeit, ihre Ladung durch den pH-Wert des Puffers zu beeinflussen.

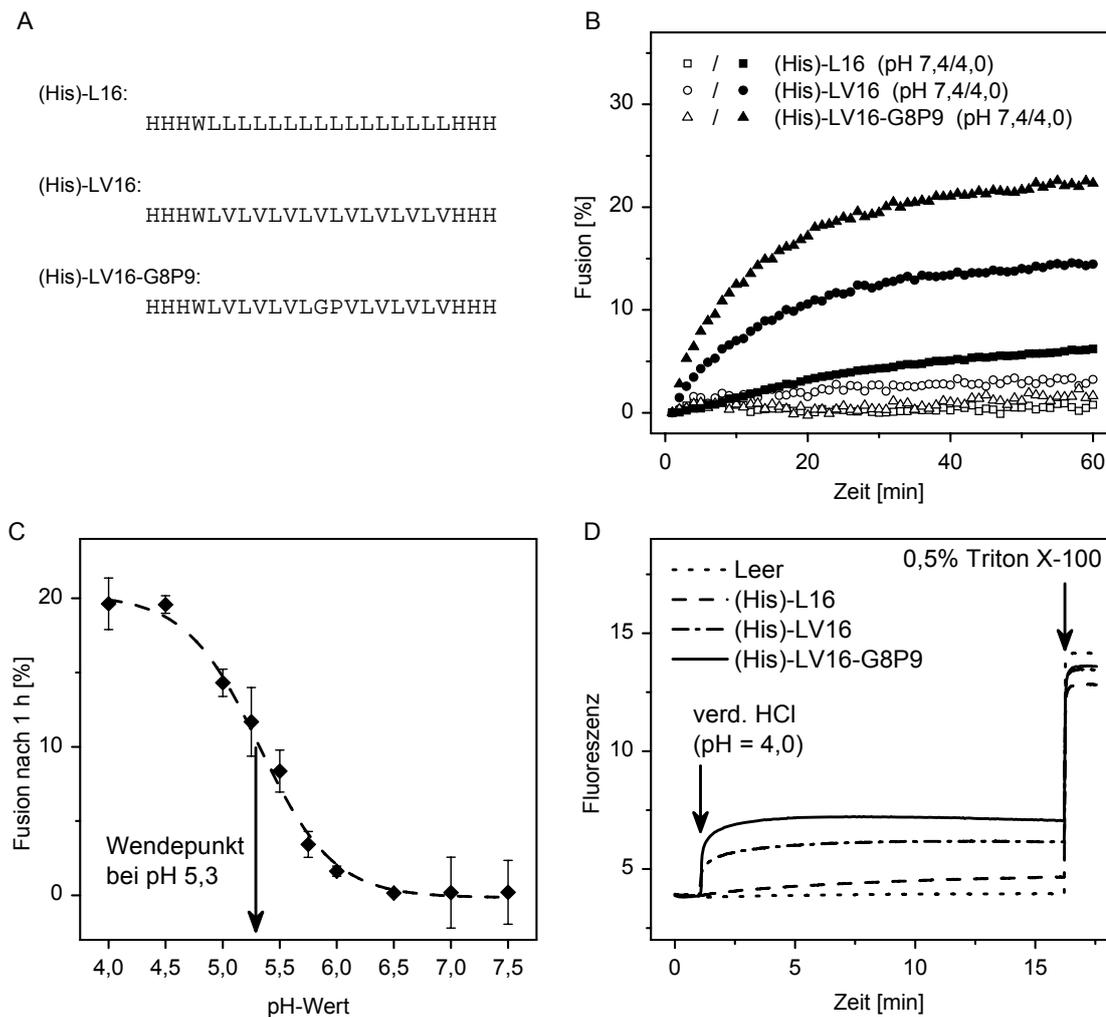


Abb. 21 Fusion von Peptiden in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Aminosäuren. A, Sequenzen der Peptide. Alle flankierenden Lysine (vgl. Abb. 15) wurden durch Histidine ersetzt. B, Fusionskinetiken der Peptide bei pH 7,4 (offene Symbole) und pH 4 (ausgefüllte Symbole) bei $P/L = \text{nominal } 0,005$. C, Fusionswerte nach 1 h von (His)-LV16-G8P9 ($P/L = 0,005$) in Abhängigkeit des pH-Wertes (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3-6$). Die erhaltene sigmoidale Kurve (gestrichelte Kurve) entspricht der Titrationskurve von Histidin und besitzt einen Wendepunkt bei pH 5,3. Alle Werte wurden bezüglich Spontanfusion von leeren Liposomen ohne Peptid korrigiert. D, pH-Induzierte Liposomenfusion gemessen „online“ durch den Fluoreszenzanstieg von NBD-PE. Nach 2 min (linker Pfeil) wurde durch Zugabe von 35 μl 0,5 M Salzsäure (Endkonzentration 18 mM) der pH-Wert der Liposomensuspension auf 4,0 gesenkt. Die Zugabe von Triton X-100 (rechter Pfeil; Endkonzentration 0,5%) nach 18 min resultiert in einer maximalen Fluoreszenz von NBD.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Histidingruppen der Peptide bei neutralem pH nicht und bei pH 4,0 positiv geladen sind. Abb. 21 zeigt die Fusion von Liposomen durch histidinflankierte Peptide. Die Sequenzen der Peptide sind in Abb. 21A wiedergegeben. Abb. 21B zeigt das Fusionsverhalten der Peptide bei einem nominalen P/L-Verhältnis von 0,005 im neutralen (pH = 7,4; umrandete Symbole) sowie im leicht sauren Milieu (pH 4,0; ausgefüllte Symbole). Während bei pH 7,4 keines der Peptide Fusion auslöste, war diese bei pH 4,0 deutlich ausgeprägt. Zudem hing die Fusion von der Sequenz der Peptide in der Reihenfolge (His)-L16 < (His)-LV16 < (His)-LV16-G8P9 ab. Dies stimmt mit den bisherigen Ergebnissen von den „Standardpeptiden“ sowie den H/G-Peptiden überein.

Zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Fusion und pH-Wert wurde die Fusion von Liposomen durch (His)-LV16-G8P9 im pH-Bereich von 4,0 bis 7,5 untersucht. Abb. 21C zeigt die Abhängigkeit der Fusion nach einer Stunde vom pH-Wert. Die erhaltene sigmoidale Kurve (gestrichelt) stellt die Titrationskurve von Histidin dar und besitzt einen Wendepunkt bei pH 5,3. Kontrollversuche mit Lys-flankiertem LV16 zeigten über den gesamten pH-Bereich konstante Fusionswerte von $30 \pm 2\%$ ($P/L = 0,005$), wodurch ausgeschlossen wird, dass die pH-Änderung sich anders als durch den Protonierungszustand der Histidine auswirkt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Abb. 21C zeigt, dass die Fusion von Liposomen, die Histidin-Peptide enthalten, vom pH-Wert abhängt, bei dem die Liposomen präpariert wurden. In weiteren Experimenten wurden Liposomen mit und ohne diesen Peptiden bei pH 6,5 hergestellt und die Fusionsereignisse nach späterer pH-Absenkung überprüft. Abb. 21D zeigt den Verlauf der Fluoreszenz von NBD in Donorliposomen, die mit den anderen Liposomen (+/- Peptid) in einer Fluoreszenzküvette unter ständigem Rühren gemischt wurden. Zum Zeitpunkt $t = 1$ min (linker Pfeil) wurde der pH-Wert durch Zugabe von 35 μ l 0,5 M Salzsäure schlagartig auf pH 4,0 gesenkt. Da in der Küvette der erreichte pH-Wert nicht gemessen werden konnte, wurde zuvor die benötigte Menge HCl in größerem Maßstab ermittelt. Bei $t = 16$ min (rechter Pfeil) wurden die Liposomen durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) aufgelöst. Der maximale Fluoreszenzwert entspricht 100% und kann zur Skalierung der Kinetiken verwendet werden. Es wird deutlich, dass leere Liposomen (ohne Peptid, gepunktete Linie) nach Ansäuern nicht fusionieren. War jedoch Peptid vorhanden, so erfolgte Fusion, deren Ausmaß in Übereinstimmung mit den Werten aus Abb. 21B von der Sequenz der Peptide abhing. Dies bestätigt, dass auch His-flankierte Peptide wie ihre Lys-Pendants in die Membran eingebaut werden.

Bei den Ergebnissen der Messung von Peptiden mit Histidinen als flankierende Aminosäuren wird die Bedeutung der Ladung der Peptide für die Fusion deutlich. Bei ungeladenen Termini tritt nahezu keine Fusion auf, wohingegen geladene Termini zur Fusion führen, welche zusätzlich von

der Kernsequenz abhängt. Dieses Phänomen bietet die Möglichkeit der Steuerung der Fusion zum einen durch den pH-Wert und zum anderen durch die Sequenz des hydrophoben Kerns.

4.3 Einfluss von Lipiden auf die peptidinduzierte Membranfusion

Neben der Flexibilität der Peptide spielen vor allem die in der Membran vorhandenen Lipide eine entscheidende Rolle bei der Fusion. Gemäß des „Stalk“-Modells sind am Übergangszustand während der Fusion maßgeblich beteiligt [43,46,49,78].

Von den Lipiden in der Membran gehen dabei mehrere Effekte aus. Ihre Ladungen bestimmen die Nettoladung der gebildeten Liposomen und können elektrostatische Abstoßungen bewirken. Zum anderen können Lipidspezies durch ihre Struktur die Krümmung einer Membran verändern (vgl. Abb. 5 in Kap. 1.2). So besitzen Lipide, deren Kopfgruppe kleiner ist als die Acylkettenregion das Vermögen, negative Krümmung (Kopfgruppen auf einer konkaven Seite) auszubilden. Lipide mit nur einer Acylkette, sog. Lysolipide hingegen begünstigen pos. Krümmung (Kopfgruppen auf der konvexen Seite) [43].

Zusätzlich zeigt die Lipidzusammensetzung von synaptischen Vesikeln einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (im englischen auch PUFA = polyunsaturated fatty acids) wie der Docosahexaensäure (DHA), einer sechsfach ungesättigten Fettsäure aus der ω -3 Familie [79]. Aus medizinischer Sicht wurden geringe Aufnahmen an DHA im Zusammenhang mit vielen Krankheitssymptomen wie beispielsweise Krebs, Herzkrankheiten, rheumatische Arthritis, Asthma, Depression und vielen andern gesehen [80]. Es wurde gezeigt, dass DHA an der sn-2 Position von Phosphatidylethanolamin und -serin sehr viel Raum einnimmt und die Packung von gesättigten Acylketten erschwert [81,82]. Zudem besitzt DHA eine geringere Hydrophobie als gesättigte Fettsäuren, was sich in einem Anstieg der Wasserpermeabilität von Membranen äußert [83]. In diesem Zusammenhang soll eine mögliche Beeinflussung eines TMD-Peptids in der Membran und damit verbundenen Veränderungen der peptidinduzierten Fusion von Liposomen genauer untersucht werden.

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Fusion von Liposomen durch Peptide in Abhängigkeit von deren Sequenz quantitativ untersucht. Die Lipidzusammensetzung der Liposomen blieb dabei unverändert. Im Folgenden werden die Effekte dieser Lipide untersucht. Zunächst wird dabei der Einfluss der Ladung der Kopfgruppen ermittelt. Danach erfolgt ein Vergleich mit synthetischen Lipiden mit definierten Acylketten. Des Weiteren wird der Einfluss der Anzahl an DHA-Lipiden in der Membran auf die Fusion gezeigt.

4.3.1 Fusion von Liposomen unterschiedlicher Nettoladung

Die in den bisherigen Untersuchungen verwendeten Liposomen bestanden aus dem „Standard-Lipidgemisch“ von PC, PE und PS (3:1:1). Aufgrund ihrer Zwitterionenstruktur sind PC und PE ungeladen, PS hingegen trägt eine zusätzliche negative Ladung an der Seringruppe. Insgesamt sind die Liposomen daher negativ geladen. Um den Einfluss dieser Ladung auf die Fusion zu überprüfen, wurden Untersuchungen an ungeladene Liposomen durchgeführt. Es wurde dabei PS im „Standard-Lipidgemisch“ durch PC ersetzt, die Liposomen bestanden somit aus PC und PE (4:1) und wiesen keine Nettoladung auf. Sowohl Akzeptor-Liposomen mit Peptid LV16 (P/L = nominal 0,005) als auch farbstoffmarkierte Donor-Liposomen wurden mit dieser neutralen Lipidmischung (A bzw. D = „0“) erzeugt. Diese wurden in den vier möglichen Permutationen mit Standard-Liposomen (A bzw. D = „-“) fusioniert. Zusätzlich wurde die Fusion von Liposomen untersucht, die nur aus PC bestehen und somit auch ungeladen sind.

Während in Abb. 22A die Kinetik der Fusion von negativ geladenen Liposomen unter dem Einfluss von LV16 mit den bisher gezeigten Ergebnissen übereinstimmte, ergaben sich drastische Änderungen bei Verwendung ungeladener Liposomen. Fusionierten ungeladene Liposomen miteinander (A/D = 0/0), so zeigte die erhaltene Kinetik eine wesentlich höhere anfängliche Fusionsgeschwindigkeit (Abb. 22B), wobei der Fusionswert nach einer Stunde sich nicht veränderte. Dies war auch der Fall, wenn ungeladene Liposomen (mit Peptid) mit farbstoffmarkierten, negativ geladenen Donorliposomen fusionierten (A/D = 0/- in Abb. 22). Erstaunlich war hingegen, dass die Inkubation von negativ geladenen Liposomen (mit Peptid) und neutralen Donorliposomen nicht zur Fusion führte.

Bei der Fusion von Liposomen aus PC zeigte sich eine geringere Fusionsgeschwindigkeit bei gleichzeitig geringerer Fusion nach einer Stunde.

Die Werte der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeiten in Abb. 22B weisen sehr große Unterschiede zwischen negativ geladenen und ungeladenen Liposomen auf. Die erhöhte Fusionsgeschwindigkeit ungeladener Liposomen kann durch die fehlende elektrostatische Abstoßung erklärt werden. Da diese Liposomen häufiger in physischen Kontakt treten, induziert das Peptid hier schneller die Fusion. Die Summe aller Ereignisse bleibt hingegen unverändert. Auffallend ist hingegen, dass die Fusion von ungeladenen Liposomen mit Donorliposomen (0/-) auch eine hohe Anfangssteigung aufweist, wohingegen der umgekehrte Fall (-/0) zu keiner Fusion führt. Erklärungsversuche durch elektrostatische Effekte scheinen hier eher zweifelhaft zu sein.

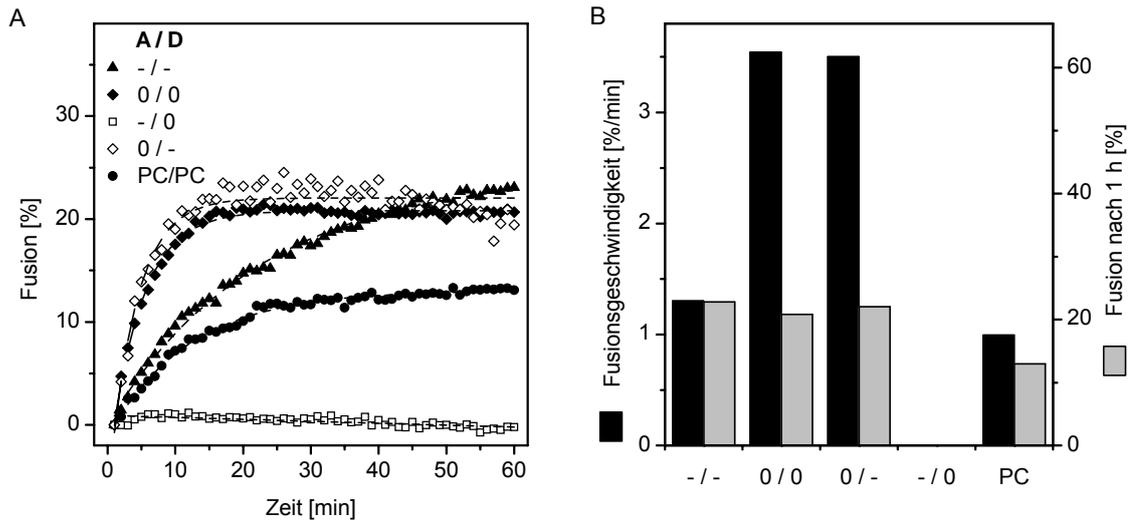


Abb. 22 Fusion von Liposomen unterschiedlicher Nettoladung. A, Typische Fusionskinetiken von Liposomen mit LV16 ($P/L = \text{nominal } 0,005$). Negativ geladene Liposomen („-“) aus PC/PE/PS (3:1:1) und ungeladene Liposomen („0“) aus PC/PE (4:1) fungieren als Fusionspartner mit Peptid oder als farbstoffmarkierte Donorliposomen. Werte sind Mittelwerte ($n=3$). Die Fusion von Liposomen des jeweiligen Lipidtyps ohne Peptid wurde parallel ermittelt und subtrahiert. Zudem wurde die Liposomenfusion von ungeladenem PC („PC“) dargestellt. Kinetiken wurden gefittet (gestrichelte Linien). B, Zusammenfassung der ermittelten anfänglichen Fusionsgeschwindigkeiten und der Fusionswerte nach einer Stunde.

Liposomen aus PC sind ebenfalls ungeladen, sie besitzen allerdings kein PE. Da PE aufgrund seiner Kegelform negative Kurvartur begünstigt, fördert es in den anderen Lipidgemischen die Fusion, in reinem PC wird dementsprechend eine geringere Anfangssteigung bei gleichzeitig verringerter Fusionsausbeute erhalten.

4.3.2 Synthetische Lipide

Gereinigte Glycerophospholipide aus natürlichen Quellen bestehen aus einem Gemisch zahlreicher Spezies mit gleicher Kopfgruppe, aber variierenden Acylketten. Daher ergibt sich eine Mischung aus Molekülen mit unterschiedlich langen hydrophoben Gruppen. Eine Zusammensetzung der verwendeten Lipide natürlichen Ursprungs, basierend auf Daten von Avanti Polar Lipids [84], ist in Abb. 23 dargestellt. Die angegebene Nomenklatur bezieht sich auf die Länge der Kohlenstoffketten und deren Anzahl an cis-Doppelbindungen. Ein Palmitylrest beispielsweise besitzt 16 Kohlenstoffatome und keine Doppelbindung. Er wird daher als C16:0 bezeichnet. Für einen Oleylrest steht dementsprechend die Bezeichnung C18:1. Es wird deutlich, dass die Zusammensetzung sehr stark variiert. In PC (Abb. 23A) kommen hauptsächlich Seitenketten mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen vor, in PE (Abb. 23B) und PS (Abb. 23C) sind auch längere Ketten vorhanden. Bezüglich des Gehaltes an gesättigten (G) und ungesättigten (U) Seitenketten besitzen PC und PS nahezu gleiche Anteile ($G/U = 0,82$ bzw. $0,93$), PE hingegen besitzt vermehrt ungesättigte Seitenketten ($G/U = 0,41$).

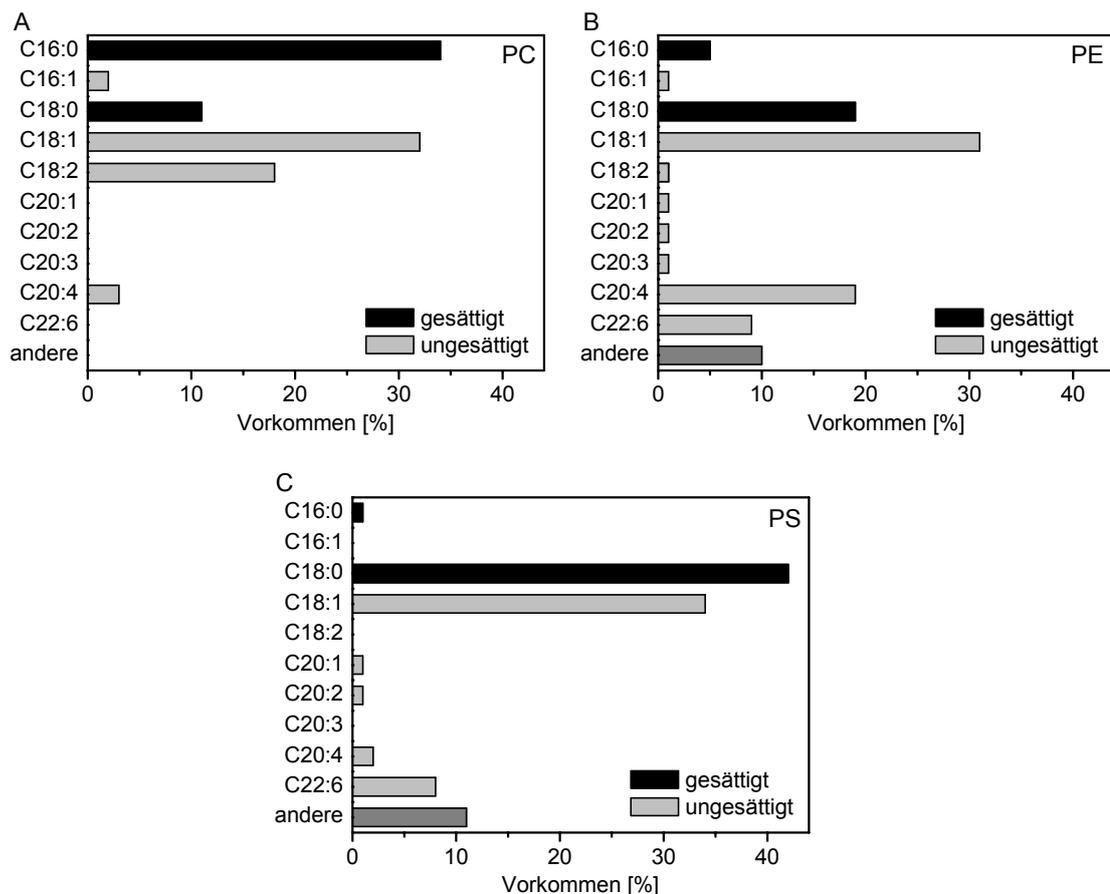


Abb. 23 Zusammensetzung der Acylketten von Lipiden aus natürlichen Quellen [84]. A, Phosphatidylcholin (PC) aus Eigelb. B, Phosphatidylethanolamin (PE) aus Schweinehirn. C, Phosphatidylserin (PS) aus Schweinehirn.

Es wird deutlich, dass die Dicke einer aus Phospholipiden aus natürlichen Quellen gebildeten Membran nicht als homogen bezeichnet werden kann. Bei der Verwendung von synthetischen Lipiden ist dies hingegen der Fall, da sie über definierte Acylkettenlängen verfügen. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Peptide in Liposomen aus synthetischen Lipiden vergleichbare fusogene Eigenschaften wie in natürlichen Lipiden besitzen. Dazu wurden einige Peptide in Liposomen aus Palmityl-(C16:0)-Oleyl-(C18:1)-PC (POPC), Di-Oleyl-(C18:1)-PE (DOPE) und Di-Oleyl-(C18:1)-PS (DOPS) im Gewichtsverhältnis 3:1:1 eingebaut. Diese Lipidmischung wurde verwendet, da hier zum einen die Kopfgruppen unverändert sind, zum anderen besitzt die Mischung aufgrund des hohen Anteils an ungesättigten Seitenketten vergleichbare Phasenübergangstemperaturen wie die natürliche Mischung. Dies war für die Präparation der Liposomen bei 4°C von Bedeutung, da auch die synthetische Lipidmischung hier im flüssig-kristallinen Phasenzustand vorlag.

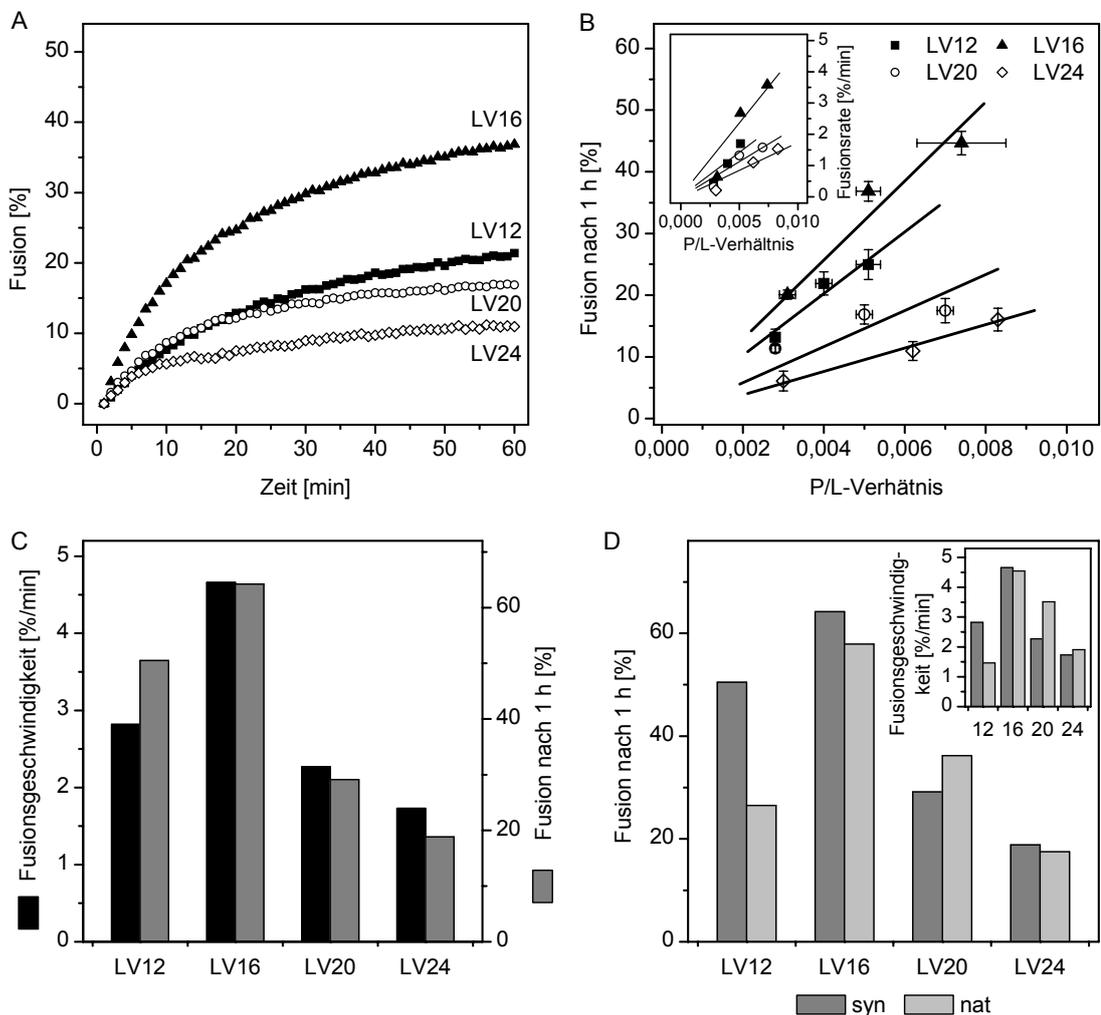


Abb. 24 Peptidinduzierte Fusion von Liposomen aus synthetischen Lipiden. A, Fusionskinetiken von Peptiden unterschiedlicher Länge (P/L = 0,005). B, Zusammenhang zwischen Fusion nach 1 h bzw. anfänglicher Fusionsgeschwindigkeit (Inset) und dem experimentell ermittelten P/L-Verhältnis. C, Vergleich der Fusionsgeschwindigkeiten und der Fusion nach 1 h (P/L = 0,01). D, Fusionswerte nach 1 h und Fusionsgeschwindigkeiten (Inset) der Peptide in Liposomen aus synthetischen (syn) Lipiden (grau) im Vergleich zu Liposomen aus natürlichen (nat) Lipiden (hellgrau).

Peptide mit Kernsequenzen aus alternierenden Leu- und Val-Resten unterschiedlicher Länge (LV12, LV16, LV20, LV24) wurden in Liposomen aus synthetischen Lipiden rekonstituiert. Abb. 24 zeigt das Resultat der Fusionsmessungen. Die Fusionskinetiken in Abb. 24A sind mit den Ergebnissen in Liposomen natürlicher Lipide vergleichbar (vgl. Abb. 16). LV16 zeigte wieder den größten Effekt. Es bestand wiederum ein linearer Zusammenhang zwischen Fusion nach einer Stunde bzw. anfänglicher Fusionsgeschwindigkeit und dem P/L-Verhältnis (Abb. 24B und Inset). In der Gegenüberstellung der Peptide in Abb. 24C ließen sich diese nach Normalisierung der Werte auf $P/L = 0,01$ sowohl bezüglich der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit als auch bezüglich der erreichten Fusionsausbeute nach einer Stunde in die Reihenfolge $LV16 > LV12 > LV20 > LV24$ bringen. Hierin besteht ein Unterschied zu den in der natürlichen Lipidmischung erhaltenen Ergebnisse aus Kap. 4.2.2. (vgl. Abb. 16). Abb. 24D verdeutlicht nämlich, dass bezüglich der erhaltenen Fusion nach einer Stunde bei LV12 ein signifikanter Unterschied zwischen synthetischen und natürlichen Lipiden besteht. Dies gilt auch für die Fusionsgeschwindigkeiten (Inset).

4.3.3 Fusion von Liposomen mit DHA-Lipiden

Docosahexaensäure (DHA) ist eine sechsfach ungesättigte ω -3-Fettsäure (Abb. 25). Sie gehört zur Familie der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche im Zusammenhang mit der Behandlung von Herzkrankheiten sowie der Heilung von Krebs diskutiert wird [80]. Auch für neurobiologische Funktionen sind diese Fettsäuren essentiell. Aufgrund der Struktur weist DHA eine hohe konformationelle Flexibilität auf und steht im Zusammenhang mit einer Erhöhung des Wassergehaltes und einer somit erhöhten Dielektrizitätskonstante innerhalb der Membran. Zudem nimmt sie als Acylkette in einem Lipid mehr Raum ein als andere Fettsäuren und bewirkt so eine Kegelform des Phospholipids (Querschnitt der durch die Acylketten eingenommenen Fläche größer als die der Kopfgruppe) und kann somit negative Krümmung, ähnlich wie PE, begünstigen [43]. Daher wurde der Einfluss auf die Fusogenität von ausgewählten Peptiden untersucht.

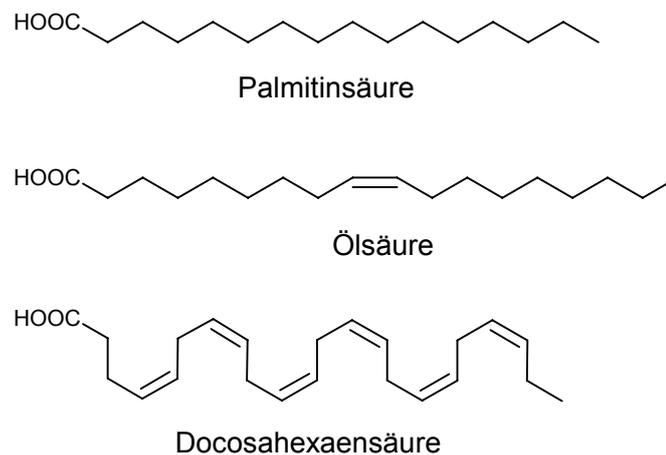


Abb. 25 Struktur von Docosahexaensäure (DHA) im Vergleich zu Palmitinsäure und Ölsäure.

Die Veränderung der Fusogenität durch DHA wurde zunächst am Peptid LV16 untersucht. Bei den verwendeten Phospholipiden war jeweils eine Acylkette Stearinsäure (sn1-Position), die andere war DHA (sn2-Position). Als Kopfgruppen dienten zum einen Phosphatidylethanolamin (S-DHA-PE) und zum anderen Phosphatidylserin (S-DHA-PS). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den bereits erhaltenen Ergebnissen wurde wiederum mit einem Lipidgemisch aus natürlichen Lipiden von PC/PE/PS (3:1:1) gearbeitet (vgl. Abb. 23 Kap. 4.3.2). Deshalb konnten bei Austausch von PS oder PE Liposomen mit jeweils maximal 10% DHA, beim gemeinsamen Austausch von PE und PS dementsprechend Liposomen mit bis zu 20 % DHA, erzeugt werden. Die DHA-Lipide wurden in verschiedenen Verhältnissen mit den synthetischen Phospholipiden SOPE (Stearyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin) bzw. SOPS (Stearyl-Oleoyl-Phosphatidylserin) gemischt. Dadurch war

gewährleistet, dass von der sn1-Position (konstantes Vorhandensein der Stearylkette) keine Einflüsse ausgingen und der ungesättigte Oleylrest an sn2 durch verschiedene Mengen des sechsfach ungesättigten DHA ausgetauscht wurde.

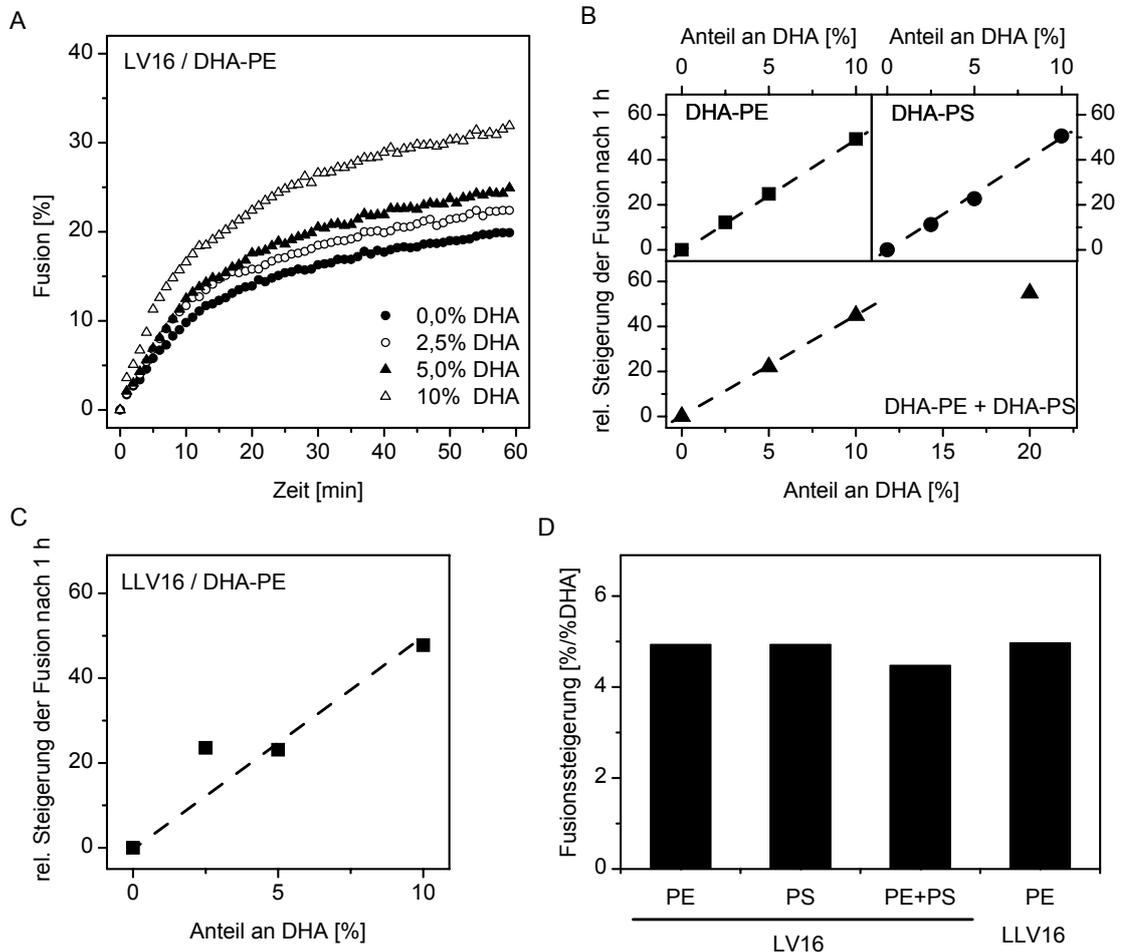


Abb. 26 Einfluss von DHA-Lipiden auf die peptidinduzierte Liposomenfusion. A, Fusionskinetiken von Liposomen mit LV16 (normalisiert auf P/L = 0,005) mit unterschiedlichen Gehalten an DHA (als Prozentwert aller Acylketten in der jeweiligen Lipidmischung). B, Relative Steigerung der Fusion nach 1 h durch DHA in Liposomen mit LV16 (normalisiert auf P/L = 0,005). DHA ist an PE gebunden (oben links), an PS gebunden (oben rechts) oder es werden jeweils gleiche Anteile an PE und an PS gebundener DHA eingebaut. Die Skalierung der x-Achsen ist identisch. Die gestrichelten Linien verdeutlichen den linearen Anstieg der prozentualen Fusionssteigerung. C, Relative Fusionssteigerung von DHA-PE bei der durch LLV16 induzierten Liposomenfusion (P/L = 0,005). D, Zusammenfassung der relativen Fusionssteigerungen durch DHA. Die Werte wurden aus den jeweiligen Regressionsgeraden bis zu einem Anteil an DHA-Lipiden von 10% errechnet.

Abb. 26A zeigt Fusionskinetiken von Liposomen mit dem Peptid LV16. Das P/L-Verhältnis wurde auf 0,005 normalisiert. Bei der Herstellung von Liposomen mit unterschiedlichen Gehalten an DHA (gebunden an PE) zeigte sich eine Verstärkung der fusogenen Wirkung von LV16. Die relative Steigerung der Fusion nach einer Stunde durch DHA-PE korreliert mit dem Anteil der DHA-Lipide (Abb. 26B, oben links). Wurden Lipide verwendet, bei denen DHA an PS anstelle von PE gebunden

ist, so zeigte sich der gleiche Einfluss auf die Steigerung der Fusogenität von LV16 (Abb. 26B, oben rechts). Beim gleichzeitigen Austausch von SOPE und SOPS mit DHA-Lipiden wurde wiederum bis etwa 10% ein linearer Anstieg der relativen Fusionszunahme erhalten. Allerdings konnte durch Einfügung von 20% DHA die Fusion nicht um mehr als 60% gesteigert werden (Abb. 26B, unten).

Um zu überprüfen, ob die erhaltene Steigerung der Fusogenität eines Peptids von dessen Sequenz abhängt, wurden zusätzlich Liposomen mit dem Peptid LLV16 (bei P/L = 0,005) untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei der Verwendung steigender Anteile an DHA-PE die relative Steigerung der Fusion nach einer Stunde durch LLV16 mit den Effekten bei LV16 identisch ist (gestrichelte Linie in Abb. 26C). Abb. 26D zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse bei der peptidinduzierten Fusion. Hier ist die relative Fusionssteigerung pro Prozent inkorporierter DHA-Seitenketten wiedergegeben. Aufgrund der geringen Fusogenität bei dem zusätzlich untersuchten Peptid L16 lagen die Effekte dabei innerhalb der Ungenauigkeit der Messungen, so dass der Effekt nicht quantifiziert werden konnte. Es wurde gezeigt, dass durch Vorhandensein von DHA-Lipiden in Liposomen die fusogene Wirkung von Peptiden erhöht werden kann. Das Ausmaß korreliert dabei mit dem Gehalt an DHA. Bei einem Gehalt von 20% DHA als Seitenkette wurde eine maximale relative Steigerung der Fusogenität von etwa 55% erhalten. Da die Messungen zeigten, dass die relativen Steigerungen der Fusogenitäten von LV16 und LLV16 gleich waren, wurde die Steigerung der spontanen Fusion von Liposomen ohne Peptid unter dem Einfluss von DHA-Lipiden untersucht.

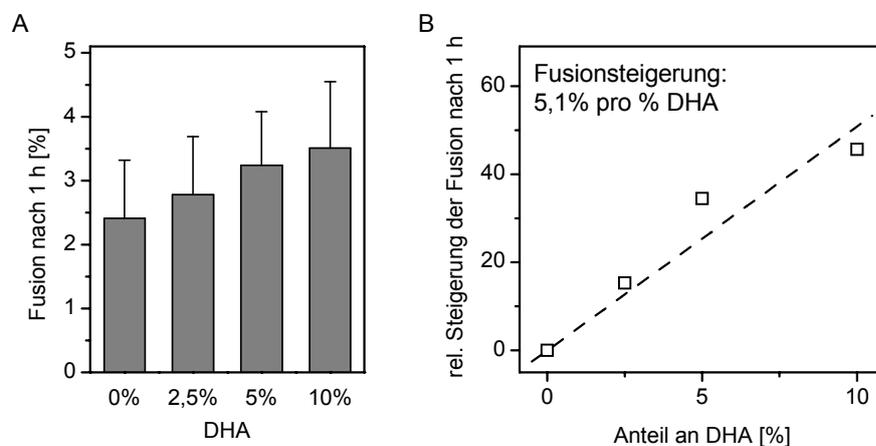


Abb. 27 Einfluss von DHA-Lipiden auf die spontane Liposomenfusion. A, Absolute Fusionswerte nach einer Stunde von Liposomen ohne Peptid mit steigenden Gehalten an DHA (als Prozentwert aller Acylketten in der jeweiligen Lipidmischung). B, Relative Steigerung der spontanen Fusion nach einer Stunde durch DHA in Liposomen. Mittelwerte \pm Standardfehler (n=4).

Abb. 27 zeigt den Einfluss von DHA-Lipiden auf die spontane Fusion von Liposomen ohne Peptid. In Abb. 27A wird deutlich, dass DHA-Lipide auch die nicht von Peptiden induzierte Fusion steigern. Allerdings ist der Effekt sehr schwer zu quantifizieren, da die Steigerung innerhalb der Ungenauigkeit der Messung von etwa 1 % (siehe Fehlerbalken) liegt. In Abb. 27B wurden dennoch

die mittleren relativen Steigerungen der spontanen Fusion nach einer Stunde mit dem Gehalt an DHA korreliert. Unter dem Vorbehalt, dass die erhaltenen Werte großen Ungenauigkeiten unterliegen, konnte hier durch lineare Regression eine relative Fusionssteigerung von etwa 5,1 % ermittelt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Werten der Steigerung der peptidinduzierten Fusion in Abb. 26D überein.

Zusätzlich wurden Experimente mit DHA-Lipiden auch in Liposomen aus den rein synthetischen Lipiden POPC/DOPE/DOPS (vgl. Kap. 4.3.2) durchgeführt. Hier konnte kein fusionssteigernder Effekt von DHA sowohl bei der peptidinduzierten Fusion von LV16 und LLV16, als auch bei Betrachtung der spontanen Fusion festgestellt werden. Es wurde deshalb auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Effekte von DHA-Lipiden weniger im Zusammenhang mit den Peptiden, sondern vielmehr im Zusammenhang mit einer geänderten Lipidzusammensetzung gesehen werden müssen. Die Tatsache, dass in der synthetischen Lipidmischung kein Unterschied festgestellt wurde, deutet darauf hin, dass DHA nur in Verbindung mit der Inhomogenität der Beschaffenheit der Membran aus natürlichen Lipiden fusionssteigernd wirkt.

4.4 Einfluss von Liganden auf fusogene Peptide

4.4.1 Steigerung der Fusogenität durch ein dimeres Aminopyrazolderivat

Aminopyrazolderivate wurden entwickelt, um Alzheimer-Plaques (β -Faltblatt-Aggregate des $\text{A}\beta$ -Peptids) aufzulösen [85]. Durch eine rationelle Denkweise wurde eine Reihe von Derivaten entwickelt, die in der Lage sind, Wasserstoffbrücken mit Peptiden in der β -Konformation einzugehen [74,86,87]. Die Grundstruktur bildet dabei ein planarer Pyrazolring. Dieser besitzt eine Anordnung von Protonendonor- und Protonenakzeptorgruppen (DAD-Wasserstoffbrücken-Muster), welche komplementär zum Rückgrat eines Peptids in der β -Konformation ist (siehe Abb. 28). Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Aminopyrazolen und $\text{A}\beta$ -Peptiden konkurriert mit der Aggregation zu β -Faltblattstrukturen. Es wurde zudem gezeigt, dass Aminopyrazole β -Faltblattstrukturen bei löslichen Peptiden stabilisieren [86]. Ausgehend von der Flexibilität der TMD als treibende Kraft für Membranfusion stellte sich die Frage, ob die nicht-kovalente Bindung eines Liganden an die Kernsequenz eines Peptids die Sekundärstruktur bzw. die Flexibilität verändern kann. Aus einer Stabilisierung der Sekundärstruktur würde sich folglich eine Veränderung des fusogenen Eigenschaften des Peptids ergeben. Die Verwendung dieser Liganden im Zusammenhang mit der Kernsequenz eines Peptids, welches die TMD nachahmt bietet die Möglichkeit, nähere Erkenntnisse über die Rolle der Flexibilität des Peptids in den Fusionsübergangszuständen zu erhalten.

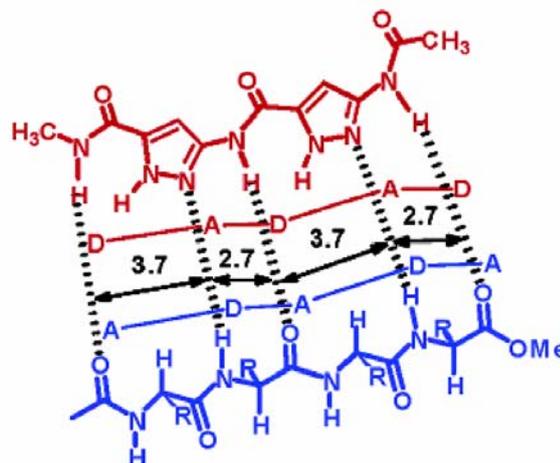


Abb. 28 Stabilisierung der α -Konformation durch ein Aminopyrazolderivat aus Rzepecki 2004. Bildung eines Wasserstoffbrücken Donor(D)-Akzeptor(A)-Donor-Motivs.

Freundlicherweise wurden einige dimere Aminopyrazolderivate von der Arbeitsgruppe Schrader zur Verfügung gestellt, um ihren Einfluss auf die Fusogenität von Peptiden in Liposomen zu untersuchen. Der Großteil dieser Arbeit erfolgte in der Diplomarbeit von Bernhard Poschner unter

meiner Anleitung. Aus Gründen der Vollständigkeit sollen hier nochmals die wichtigsten Ergebnisse aus der Diplomarbeit dargestellt werden.

Abb. 29 zeigt eine kurze Zusammenfassung eines Teils der erreichten Resultate. Die Peptide L16, LLV16 und LV16 (Abb. 29A) enthalten unterschiedliche Anzahlen an der β -verzweigten Aminosäure Valin. Bei ihnen wurden verschiedene Fusogenitäten festgestellt (siehe Kap. 4.2.3). Bei AmpOX handelt es sich um ein diacyl-verknüpftes dimeres Aminopyrazolderivat (Struktur siehe Abb. 29A).

AmpOX wurde zusammen mit Peptid in Liposomen der Standardmischung PC/PE/PS (3:1:1) rekonstituiert. Dabei wurde es schon vor der Auftrocknung des Lipidfilms mit den anderen Komponenten gemischt. Die verwendete Menge an AmpOX wurde im molaren Verhältnis zu der Menge an Peptid berechnet. Es wurden Parallelmessungen von Peptid ohne AmpOX und Peptid/AmpOX in steigenden AmpOX/Peptid (A/P)-Verhältnissen durchgeführt.

Abb. 29B zeigt die Fusionskinetiken von LLV16 ($P/L = 0,005$) mit AmpOX in unterschiedlichen A/P-Verhältnissen (von 0,2 bis 5,0). Dabei ist eine Steigerung der Fusion von LLV16 zu verzeichnen. Unter gleichen Bedingungen wurden weitere Messreihen mit den Peptiden L16 und LV16 durchgeführt. Für den Vergleich der Peptide wurden deren Fusionswerte nach einer Stunde herangezogen. In Abb. 29C ist die relative Steigerung der Fusion der drei Peptide gegen das A/P-Verhältnis aufgetragen. Alle Kurven weisen anfangs einen starken Anstieg auf, erreichen aber ab einem A/P-Verhältnis von 1 bis 2 ein Plateau. Der Wert des Plateaus entspricht einer „maximalen“ relativen Fusionssteigerung, sozusagen einem maximalen Effekt von AmpOX. Dieser ist von der Struktur des Peptids abhängig. Sein Ausmaß zeigt die Abfolge $LLV16 > L16 > LV16$.

Da die getesteten Peptide unterschiedlich viele β -verzweigte Valinreste besitzen, verfügen sie über unterschiedliche Strukturen. In Abb. 29D ist die Differenz an α -Helixstrukturen in 10% TFE und 100% TFE (ermittelt durch FTIR, ref. [88]) der Peptide den erhaltenen relativen Fusionssteigerungen bei $A/P = 2$ gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass der Effekt von Aminopyrazol bei LLV16, welches bei Verringerung der Lösungsmittelpolarität weniger α -Helixstrukturen ausbildet, am größten ist (vgl. Abb. 29D). Bei einem Peptid höherer Flexibilität (LV16, Abb. 29D) ist der fusionssteigernde Effekt durch AmpOX hingegen niedriger.

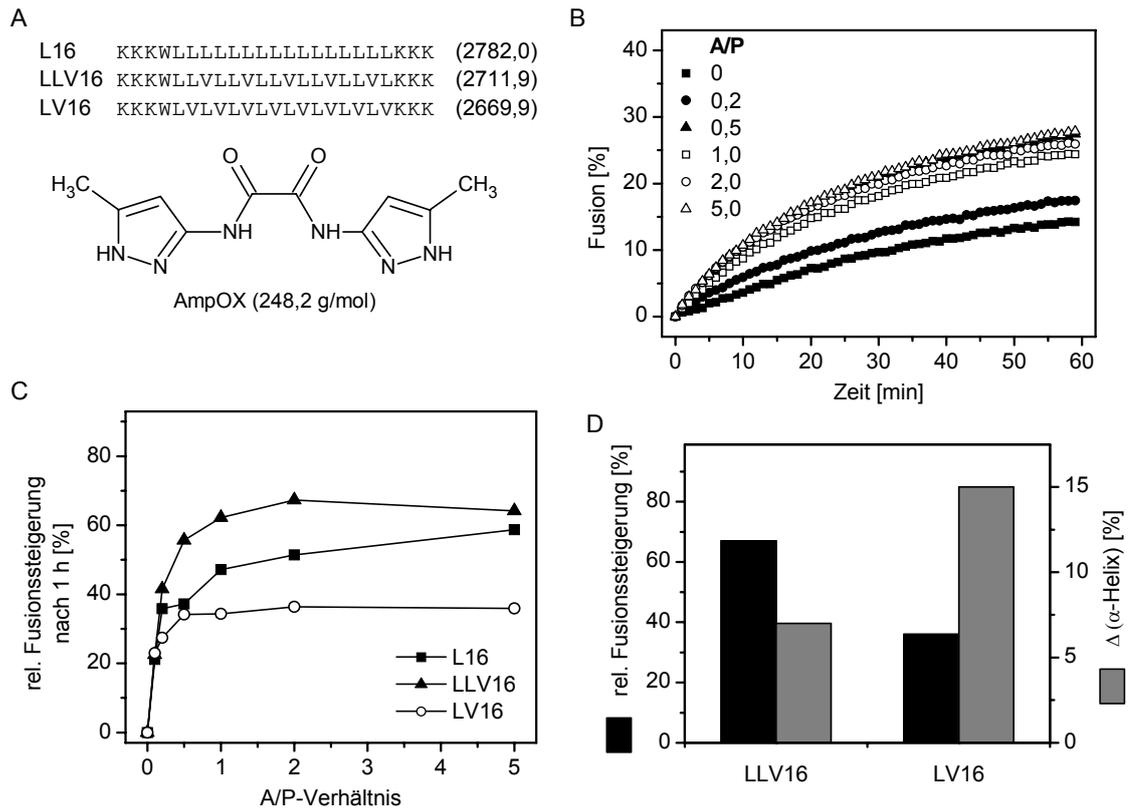


Abb. 29 Peptidinduzierte Liposomenfusion unter dem Einfluss des hydrophoben Liganden AmpOX. A, Sequenzen der untersuchten Peptide sowie Struktur von AmpOX. B, Typische Fusionskinetiken von LLV16 ($P/L = \text{nominal } 0,005$) ohne bzw. mit unterschiedlichen Anteilen an AmpOX (AmpOX/Peptid (A/P)-Verhältnis) zeigen die Steigerung der absoluten Fusionswerte durch AmpOX. C, Zusammenhang zwischen relativer Fusionssteigerung (bezüglich Fusion nach einer Stunde) und dem A/P-Verhältnis bei verschiedenen Peptiden. D, Der relativen Fusionssteigerung bei $A/P = 2$ aus D ist die Flexibilität der Peptide erhalten aus der Differenz an α -Helixstrukturen in 10% und 100% TFE (basierend auf FTIR-Daten [88]) gegenübergestellt.

Die Fusionswerte in Abb. 29B spiegeln die Vermischung der Lipide ohne Differenzierung in Fusionsintermediate wie Hemifusion (Vermischung der äußeren Lipidschichten) und vollständige Fusion (Vermischung der äußeren und inneren Lipidschichten) wider. Durch Behandlung farbstoffmarkierter Donorliposomen mit dem Reduktionsmittel Dithionit wurde im Folgenden NBD-PE in der äußeren Lipidschicht in ein nicht-fluoreszierendes Derivat umgesetzt (vgl. Abb. 9). So konnte exklusiv die Vermischung der inneren Lipidschichten gemessen werden. Bei den bisherigen Fusionskinetiken der LV-Peptide konnte kein Unterschied mit und ohne DTN-Behandlung festgestellt werden (vgl. Abb. 19 in Kap. 4.2.3). Sowohl äußere, als auch innerer Lipidschicht fusionierten mit der gleichen Effizienz.

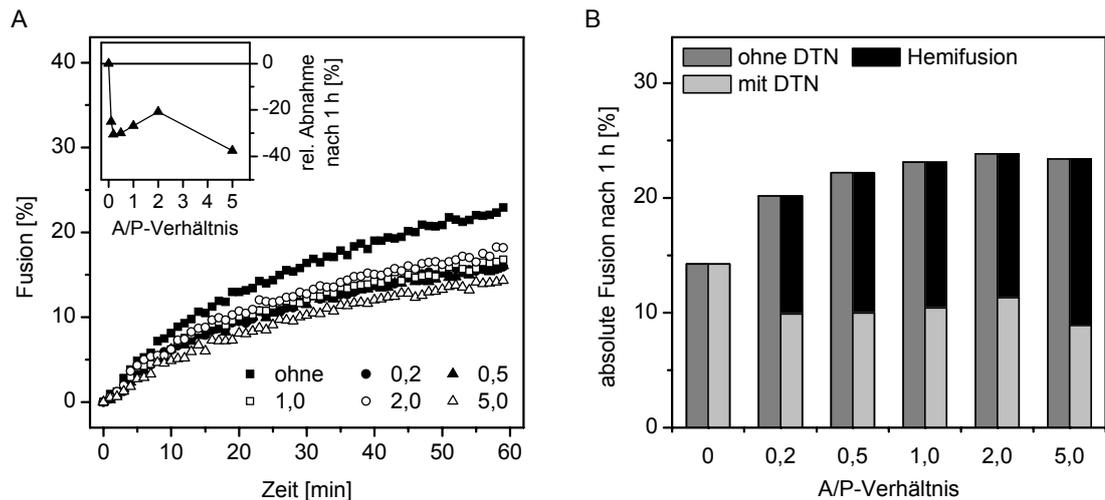


Abb. 30 Fusion der inneren Lipidschichten bei der peptidinduzierten Fusion unter dem Einfluss von AmpOX. A, Typische Fusionskinetiken von LLV16 ($P/L = 0,005$) nach Bleichen des NBD in der äußeren Lipidschicht mit Dithionit (DTN) bei verschiedenen A/P-Verhältnissen. Die erhaltenen relativen Fusionsabnahmen nach 1 h sind gegen das A/P-Verhältnis aufgetragen (Inset). F, Zusammenfassung der Fusionsergebnisse ohne (aus Abb. 15) und mit DTN-Behandlung. Die relativen Änderungen wurden mittels Fusionswert von LLV16 ($P/L = 0,005$; Mittelwert = 14,3%) in absolute Werte umgerechnet. Die schwarzen Balken zeigen die Differenz der Werte ohne und mit DTN-Behandlung und symbolisieren den Anteil an Hemifusion.

Abb. 30A zeigt die Fusionskinetiken von Liposomen mit LLV16 ($P/L = \text{nominal } 0,005$) nach DTN-Behandlung. Das Inset in Abb. 30A zeigt die relative Abnahme der Fusion nach einer Stunde. In Abb. 30B sind die Ergebnisse mit und ohne DTN-Behandlung zusammengefasst. Aus den relativen Zunahmen (- DTN) bzw. Abnahmen (+ DTN) wurden anhand des mittleren Fusionswerts von LLV16 (14,3 % nach einer Stunde) die entsprechenden absoluten Fusionswerte errechnet. Nach Zugabe von AmpOX wurde demnach zwar die Vermischung der äußeren Lipidschicht begünstigt, gleichzeitig aber die der inneren verringert. AmpOX sorgte also für eine Steigerung der Fusogenität eines Peptides bei gleichzeitiger signifikant erhöhter Hemifusion.

4.4.2 Interaktion von Ligand mit Peptid

In Kap. 4.4.1 wurde gezeigt, dass durch AmpOX die Fusogenität eines Peptids gesteigert werden kann, wobei die komplette Fusion verringert wird und Hemifusion verstärkt auftritt. Da die Ergebnisse keine Aussage über die Art der Interaktion von AmpOX mit Peptid geben, wurde diese in Lösung untersucht. Trotz seiner schlechten Löslichkeit konnte AmpOX in TFE suspendiert werden. Dabei wurde eine kolloidale Lösung mit sichtbarer Trübung erhalten, welche über Absorptionsmessungen bei 600 nm quantifiziert wurde. Abb. 31A zeigt, dass mit steigender Konzentration die Absorption einer reinen AmpOX-Lösung bei 600 nm stetig zunimmt (graue Balken). Wurde hingegen die Trübung von AmpOX in Gegenwart des Peptids LLV16 gemessen, so wurde bei konstanter Peptidkonzentration von 10 μM bis zu einem A/P-Verhältnis von 5 (50 μM AmpOX bei 10 μM Peptid LLV16) keine signifikante Absorption bei 600 nm ermittelt (schwarze Balken). Das Ergebnis zeigt somit, dass in TFE kolloidal gelöstes AmpOX durch Peptid in Lösung gebracht werden kann. Dies deutet auf eine Interaktion von AmpOX mit Peptid bis zu einer Stöchiometrie von 5:1 hin.

Um diese Interaktion genauer zu untersuchen, wurden die gleichen Lösungen mittels Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Die TFE-Lösungen wurden bei gleichen Messparametern (bei einem Fluss von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$) in die Ionenquelle des Massenspektrometers injiziert. Das Massenspektrum von LLV16 in Abb. 31B zeigt zunächst dessen zweifach geladenes Ion bei 1357,3 m/z. Bei der Untersuchung von Peptidlösungen mit AmpOX zeigt der Peak bei 1481,7 m/z deutlich den Komplex von AmpOX und LLV16 mit der Stöchiometrie 1:1. Die Intensität nahm mit steigendem A/P-Verhältnis zu. Die relativen Intensitäten des Signals bei 1481,7 im Vergleich zu LLV16 betragen 8,6%, 12,6% und 18,3% (bei A/P = 1, 2 bzw. 5). Höhere Stöchiometrien mit zwei bzw. drei AmpOX-Molekülen pro Peptid konnten ebenfalls detektiert werden, allerdings nur mit sehr geringen Intensitäten. So zeigte die Messung einer Lösung mit A/P = 5 zusätzlich Signale höherer Stöchiometrien. Die relative Intensität eines 2:1 Komplexes betrug dabei 2,2% und die des 3:1 Komplexes 1% der Signalhöhe des Peptids.

Um den AmpOX/LLV16-Komplex näher zu untersuchen, wurde dieser durch die Einstellung der Radiofrequenz im Quadrupol von den anderen Ionen isoliert. Daraufhin wurde er durch den kollisionsinduzierten Zerfall (CID; collision induced dissociation) in der Kollisionszelle zwischen Quadrupol und ToF-Analysator (time of flight) in Abhängigkeit der Kollisionsspannung dissoziiert. Die Detektion der Zerfallsprodukte erfolgte dann im ToF-Analysator. Abb. 31C zeigt die erhaltenen Spektren. Bereits bei einer Kollisionsspannung von 20 eV war bei 1357,8 m/z das freie LLV16 (zweifach geladen) und bei 249,1 m/z das Signal von AmpOX (einfach geladen) zu erkennen. Daneben war der undissoziierte Komplex noch deutlich zu sehen. Bei einer Spannung von 30 eV zeigte sich die vollständige Dissoziation des Komplexes in LLV16 und AmpOX. Eine

Kollisionsenergie von 20 bis 30 eV reicht also aus, um den Komplex zu dissoziieren. Bei dieser Kollisionsenergie wurde das Peptid noch nicht fragmentiert.

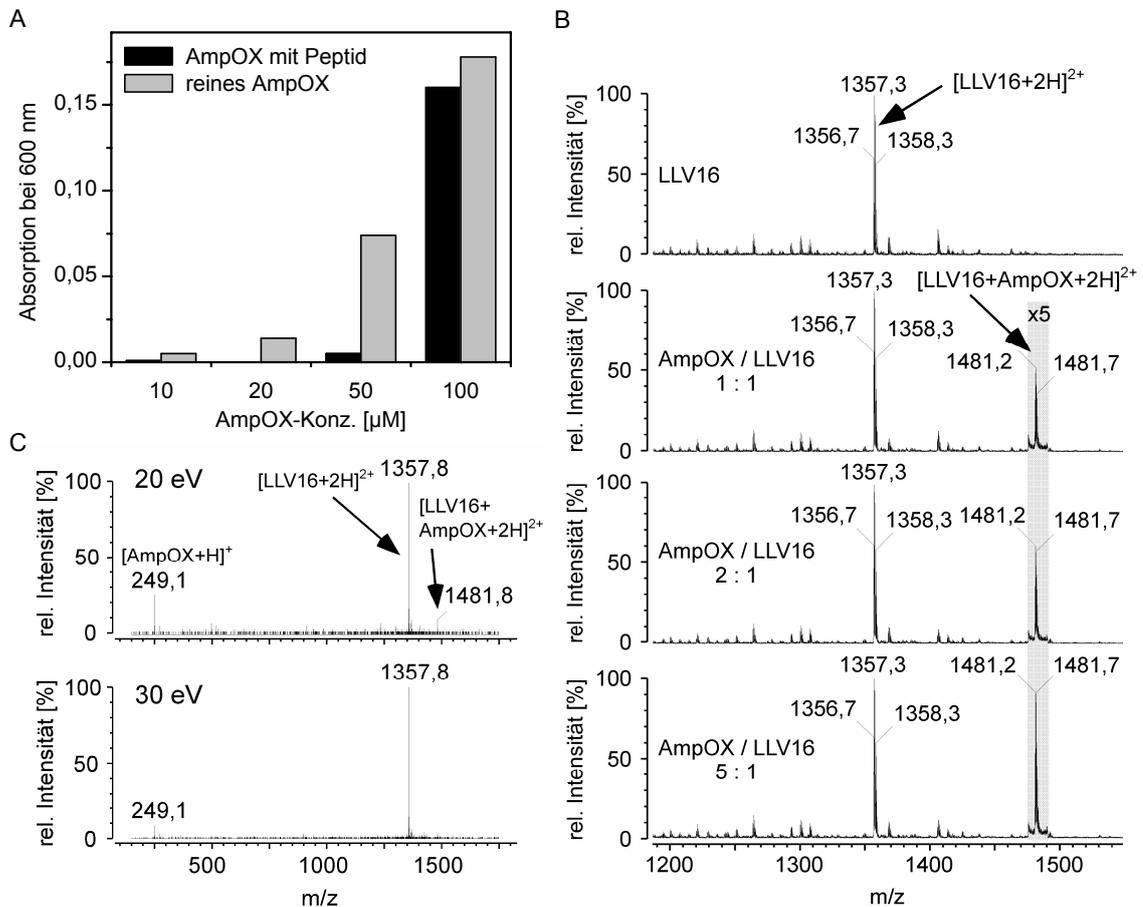


Abb. 31 Interaktion von AmpOX mit Peptid LLV16. A, Photometrische Messung der Trübung. Messparameter ist die Absorption bei 600 nm. AmpOX in verschiedenen AmpOX-Konzentrationen mit Peptid LLV16 in TFE (Peptid-konzentration $10\mu\text{M}$; schwarze Balken). Im Vergleich zu AmpOX der gleichen Konzentration ohne Peptid (graue Balken) tritt bis zu einer AmpOX-Konzentration von $50\mu\text{M}$ (entsprechend $A/P = 5$) keine Absorption bei Anwesenheit von Peptid auf. B, Massenspektren von LLV16 ohne und mit AmpOX in verschiedenen A/P-Verhältnissen zeigen neben dem zweifach geladenen Ion von LLV16 (bei $1357,3\text{ m/z}$) als weiteres Signal ($1481,2\text{ m/z}$; zweifach geladen) den 1:1 Komplex von AmpOX und LLV16, dessen Intensität mit steigenden A/P ansteigt (hier zwischen 1475 m/z und 1495 m/z fünffach vergrößert und grau hinterlegt). C, CID des Ions bei $1481,7\text{ m/z}$ durch MS/MS zeigt bei einer Kollisionsenergie von 20 eV (oben) eine Fragmentierung in Peptid LLV16 ($1357,8\text{ m/z}$) und AmpOX ($249,1\text{ m/z}$). Bei 30 eV ist der Komplex vollständig dissoziiert.

Die Ergebnisse der Messungen weisen auf nicht-kovalente Komplexbildung hin. Da gezeigt werden konnte, dass TFE die Ausbildung der helikalen Konformation begünstigt [89], deuten die Ergebnisse auf eine Interaktion von AmpOX mit LLV16 in helikaler Konformation hin, schließen jedoch eine vorwiegende Komplexbildung mit anderen Konformationen wie β -Faltblatt oder Random Coil (unstrukturierte Bereiche) nicht aus.

4.5 Fusogene Wirkung von SNARE-TMD-Peptiden aus Hefe

Vam3p ist ein etwa 33 kDa großes Membranprotein, das in der Membran von Hefevakuolen (*Saccharomyces cerevisiae*) vorkommt und beim intrazellulären Proteintransport mitwirkt [90]. Es gehört zur Familie der SNARE-Proteine und agiert zu einem späten Zeitpunkt bei der Vakuolenfusion. Neben mehreren N-terminalen Domänen, welche bezüglich ihrer Rolle bei der Fusion von Hefevakuolen bereits erforscht sind [54,91], verfügt Vam3p über eine C-terminale TMD. Peptide, die deren Sequenz sowie zweier Mutanten entsprechen, wurden in Liposomen aus PC/PS/PE (3:1:1) rekonstituiert und ihre fusogenen Eigenschaften mit Hilfe des bereits beschriebenen Verfahrens untersucht.

Zunächst wurde die Vermischung der Lipide als Summe von Fusionsintermediaten wie Hemifusion und kompletter Fusion betrachtet. Abb. 32A zeigt die Sequenz der drei verwendeten Peptide. Vam3p-wt entspricht der TMD des Proteins. In Vam3p-A4 sind vier β -verzweigte Aminosäuren aus der wt-Sequenz gegen Alanin ausgetauscht; in Vam3p-A4bb sind ebenfalls vier Aminosäuren mutiert, wobei das Raster gegenüber Vam3p-A4 um zwei Reste verschoben ist und nur eine der ausgetauschten Aminosäuren eine β -verzweigte Seitenkette besitzt. Zur Verbesserung der Löslichkeit besitzen die Peptide wiederum jeweils drei Lysine an den beiden Termini. Ein Tryptophanrest ermöglicht die Quantifizierung.

Abb. 32B zeigt die Fusionskinetiken der drei Peptide bei unterschiedlichen P/L-Verhältnissen. Sowohl A4 also auch A4bb zeigten signifikant geringere Fusionswerte als das wt-Peptid. Dabei zeigten wt und A4bb Kurven von vergleichbarer Form. Diese waren jeweils von einer starken anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit geprägt und flachten im weiteren Verlauf asymptotisch ab. Vam3p-A4 hingegen löste eine wesentlich flachere Fusionskinetik aus, welche auch nach 60 min noch anstieg. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Kinetiken wurden ermittelt und neben den Fusionswerten nach einer Stunde gegen die erhaltenen P/L-Werte in Abb. 32C (bzw. Inset) aufgetragen. Dabei zeigte sich bezüglich der Fusionswerte nach einer Stunde die Reihenfolge $wt > A4 > A4bb$. Bei Betrachtung der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit hingegen zeigten A4 und A4bb vergleichbare Werte. Diese Reihenfolgen waren in allen getesteten P/L-Bereichen identisch. Abb. 32D zeigt die Zusammenfassung der Werte. Dabei wird nochmals deutlich, dass A4 eine signifikant verringerte anfängliche Fusionsgeschwindigkeit aufweist.

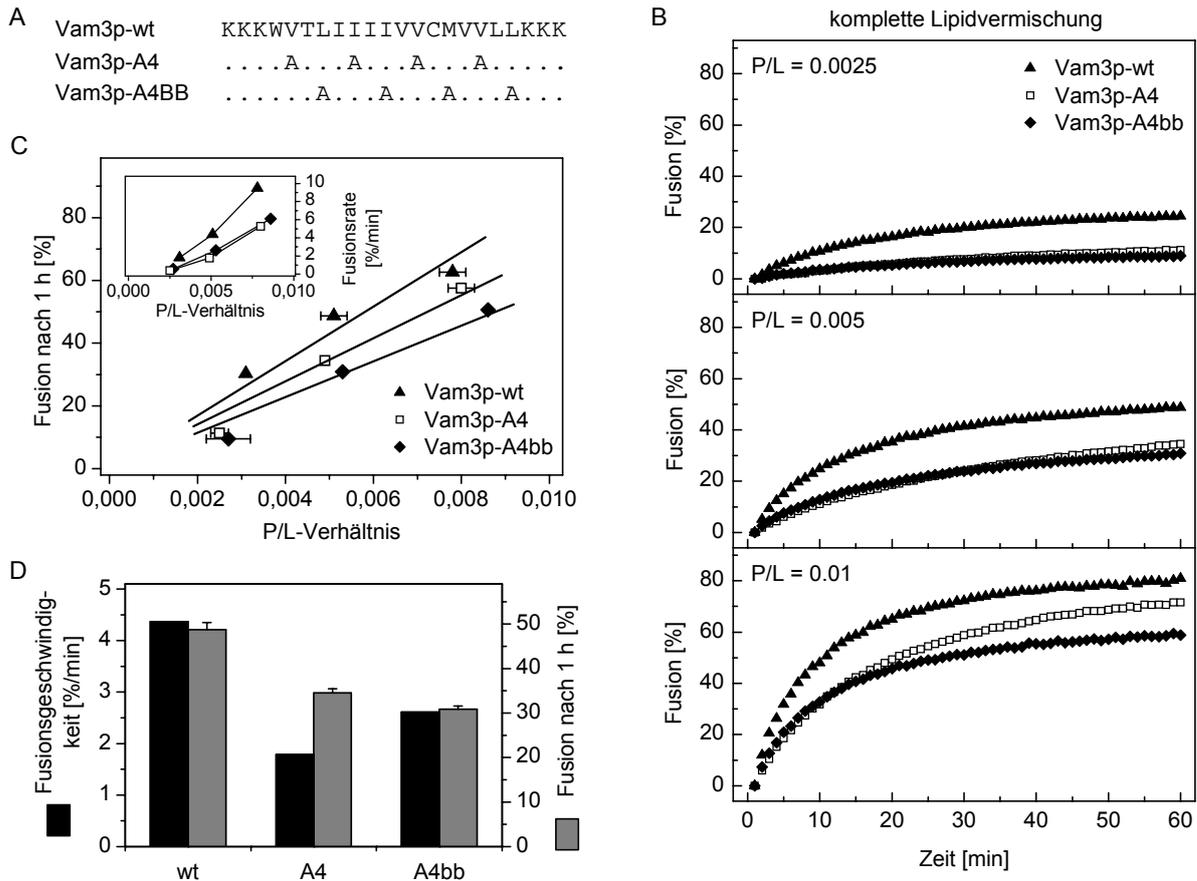


Abb. 32 Durch Vam3p-TMD-Peptide induzierte Vermischung der Lipide. A, Sequenzen der untersuchten Peptide. Die Punkte symbolisieren die Reste von A4-wt. B, Typische Kinetik von kompletter Lipidvermischung bei P/L-Verhältnissen von 0,0025, 0,005 und 0,01. Bemerkenswert ist, dass Vam3p-A4bb trotz geringerer Fusogenität einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Vam3p-wt aufweist. Vam3p-A4 hingegen zeigt bei allen P/L-Werten eine geringere Anfangssteigung und eine weitaus geringer ausgeprägte Tendenz zur asymptotischen Abflachung gegen Ende des Inkubationszeitraums. C, Komplette Lipidvermischung bei unterschiedlichen P/L-Verhältnissen. Sowohl die Fusion nach einer Stunde (Linien entsprechen linearer Regression) als auch die Fusionsgeschwindigkeiten (Inset, Punkte durch Linien verbunden) von wt und den beiden Mutanten unterscheiden sich bei allen P/L-Verhältnissen. D, Vergleich der mittleren Fusionsgeschwindigkeiten und Fusion nach 1 h ($P/L \approx 0,005$). Datenpunkte symbolisieren Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3-7$).

Um zu überprüfen, ob die Peptide in der Lage sind, komplette Fusion zu induzieren, wurde wiederum NBD in der äußeren Schicht von farbstoffmarkierten Liposomen durch Dithionit (DTN) reduziert. Abb. 33A zeigt die Fusion der verwendeten Peptide ($P/L = 0,005$) nach Behandlung mit DTN. Die Fluoreszenz von NBD wurde dabei um $77 \pm 2\%$ verringert (Inset). Es kann deshalb von einer Reduktion des NBD in der äußeren Lipidschicht ausgegangen werden. Während die Werte von wt und A4bb mit den Ergebnissen ohne DTN in Abb. 32 übereinstimmten, waren sie bei A4 deutlich verringert. In Abb. 33B sind die anfänglichen Fusionsgeschwindigkeiten und die Fusionswerte nach einer Stunde nach DTN-Behandlung zusammengefasst. Bezüglich beider Parameter lassen sich die Effekte der drei Peptide in die Reihenfolge $wt > A4bb > A4$ einordnen.

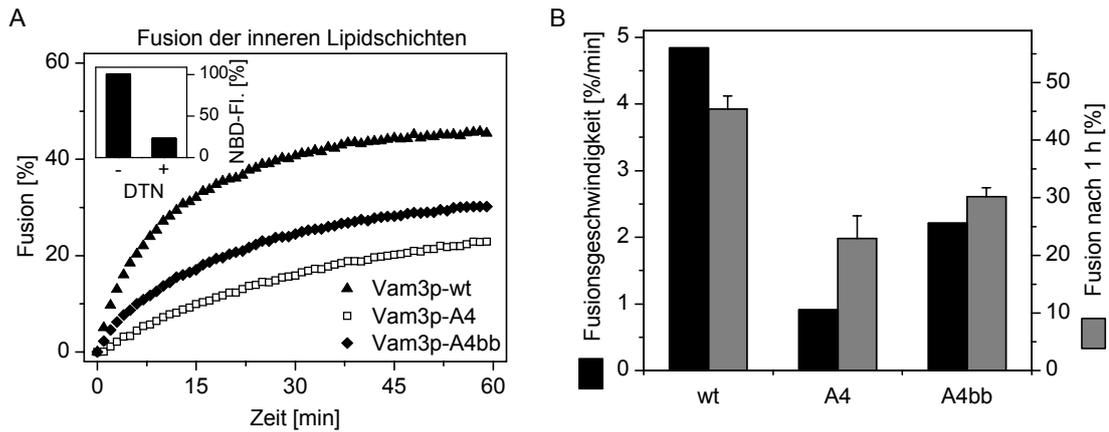


Abb. 33 Durch Vam3p-TMD-Peptide induzierte Fusion der inneren Lipidschichten. A, Typische Fusionskinetik nach Bleichen des NBD-PE in der äußeren Lipidschicht mittels Dithionit ($P/L = 0,005$). Durch die Behandlung mit DTN wurde die mittlere anfängliche NBD-Fluoreszenz um $77 \pm 2\%$ verringert (Inset). Dies weist auf eine Bleichung der äußeren Lipidschicht der Liposomen hin. Vam3p-wt und Vam3p-A4bb zeigen vergleichbare Kinetiken wie in ungebleichten Proben (vgl. Abb. 32). Vam3p-A4 hingegen weist verringerte Werte auf. B, Vergleich der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeiten und der Fusionswerte nach einer Stunde bei der Fusion der inneren Membran bei $P/L = 0,005$. Im Vergleich zu den Ergebnissen in Abb. 32 sind beide Fusogenizitätsparameter bei Vam3p-A4 signifikant verringert. Datenpunkte symbolisieren Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3-7$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl bei Vam3p-wt als auch bei Vam3p-A4bb die Vermischung der inneren und der äußeren Membran mit gleicher Effizienz erfolgt. Bei A4 hingegen erfolgt die Vermischung der inneren Membran (entsprechend vollständiger Fusion) in geringerem Ausmaß. Ein signifikanter Anteil der Fusion durch A4, die ohne DTN-Behandlung beobachtet wurde, entspricht demnach Hemifusion.

5 Diskussion

5.1 Ermittlung und Optimierung der Reinheit von synthetischen Peptiden

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag auf der Charakterisierung von synthetischen Peptiden. Um hierbei vergleichbare Ergebnisse zu erhalten sowie Unterschiede in den Eigenschaften der einzelnen Peptide quantifizieren zu können, war eine konstant hohe Reinheit der Peptide über die gesamte Zeit der Experimente von entscheidender Bedeutung.

Da die Ausstattung unseres Forschungsinstituts auch massenspektrometrische Untersuchungen erlaubt, wurde die Reinheit aller Peptide vor ihrer experimentellen Verwendung am Waters QToF-ESI-Massenspektrometer untersucht. Allerdings muss beachtet werden, dass ohne internem Standard keine quantitativen Aussagen über die Reinheit der Peptide erfolgen können. Allerdings ist es möglich eine Abschätzung der Reinheit vorzunehmen, wenn alle Proben stets unter Verwendung der gleichen Messparameter untersucht werden.

Trotz der Schwierigkeiten durch die hohe Anzahl an hydrophoben Aminosäuren bei der Synthese der Peptide zeigte sich, dass die Reinheit der erworbenen Peptide sehr zufriedenstellend war. So wurden unter Anwendung der Boc-Synthese [72] Peptide mit Reinheiten von über 90% Hauptprodukt erhalten. Dieser Wert erwies sich als ausreichend für die Charakterisierung der Peptide in den weiteren Untersuchungen. Bei einigen älteren Chargen der Peptide, die aus dem Jahr 2002 stammten, zeigte sich allerdings eine Verunreinigung mit *p*-Kresol.

p-Kresol wird bei der boc-Synthese als reversibler Ionenfänger eingesetzt und unterdrückt die Seitenkettenalkylierung von Tryptophan während der Abspaltung des Peptids durch Flusssäure von der Matrix, wodurch die bei der Synthese erhaltene Qualität des Peptids wesentlich verbessert werden kann [75]. Diese aromatische Verbindung (4-Methylphenol) besitzt eine deutliche UV-Absorption und stört deshalb die Quantifizierung der Peptide mittels Absorption von Tryptophan.

Festphasenextraktion (SPE) wird häufig zur Entfernung von Störsubstanzen aus Peptiden vor der Aufreinigung mittels HPLC angewendet [92]. Dabei bindet das Peptid vorübergehend an eine hydrophobe Matrix, Verunreinigungen werden entfernt und das Peptid durch nachfolgende Elution mit organischem Lösungsmittel erhalten. Im Gegensatz zur technisch wesentlich aufwendigeren Aufreinigung basierend auf HPLC, ist die Methode sehr schnell, effizient und gut anwendbar. Zudem ist eine Aufreinigung von hydrophoben Peptiden mittels HPLC sehr schwierig und meist mit geringen Ausbeuten verbunden.

Hier wurde deshalb eine alternative SPE-Methode entwickelt. Bei ihrer Anwendung bindet nicht das in einem Lösungsmittel höherer Polarität gelöste sehr hydrophobe Peptid, sondern die Verunreinigung *p*-Kresol an die Säulenmatrix. Das Peptid wird so im Durchlauf aufgefangen,

während *p*-Kresol erst durch Elution mit organischem Lösungsmittel erhalten wird. Es konnte gezeigt werden, dass somit *p*-Kresol quantitativ aus den Peptidproben entfernt wird. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten außerdem, dass neben *p*-Kresol auch kürzere Peptidfragmente, die wahrscheinlich durch Zersetzung des Peptids während der Lagerung entstanden sind, entfernt wurden [93].

Die entwickelte SPE-Methode erlaubt somit die Entfernung niedermolekularer Verunreinigungen sowie kleinerer Peptidfragmente wobei der Verlust an Peptid sehr gering ist. Sie bietet eine schnelle und effiziente Alternativmethode zu HPLC-basierten Anwendungen. Die gereinigten Peptide konnten in den weiteren Experimenten erfolgreich eingesetzt werden.

5.2 Membranfusogene Eigenschaften *de novo* kreierter Peptide

5.2.1 Flexibilität des hydrophoben Kerns fördert Fusion

Ergebnisse von Untersuchungen an TMDn von neuronalen SNARE-Proteinen [63] sowie von viralen Fusionsproteinen [60] deuteten auf einen Zusammenhang von Fusogenität einer TMD und konformationeller Plastizität hin. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden in dieser Arbeit eine Reihe von hydrophoben Modellpeptiden *de novo* kreiert und bezüglich ihrer membranfusogenen Eigenschaften charakterisiert. Aufgrund der geringen Anzahl unterschiedlicher Sequenzen wurde die Interpretation der Ergebnisse erleichtert.

Zunächst wurden Peptide unterschiedlicher hydrophober Längen verglichen. Die Basis bildete dabei eine alternierende Leu/Val-Sequenz. Die Peptide wurden in Liposomen inkorporiert und ihre membranfusogenen Eigenschaften ermittelt. Eine Kernsequenz von 16 Aminosäuren führt hierbei zu einem Optimum an Fusogenität. Sowohl kürzere Peptide mit 12 Aminosäuren, als auch längere (mit 20 oder 24) weisen signifikant geringere Fusogenitäten auf. Dabei muss die Aussagekraft dieser Ergebnisse aufgrund der identischen Sequenzabfolge vorrangig im Zusammenhang mit der unterschiedlichen hydrophoben Länge betrachtet werden. Ausgehend von einem membran-durchspannenden Einbau der Peptide in der Lipiddoppelschicht kommt folglich den Lipiden eine entscheidende Rolle zu. Diese Ergebnisse sollen deshalb im Zusammenhang mit den Effekten der Lipide diskutiert werden (siehe Kap. 5.3).

Aufgrund des Optimums an Fusogenität bei dieser Peptidlänge wurden im Folgenden Peptide mit einer hydrophoben Sequenz von 16 Aminosäuren untersucht. Leucin und Valin besitzen die Neigung, unterschiedliche Sekundärstrukturen zu begünstigen. Es konnte gezeigt werden, dass Leu eine hohe Tendenz zur Ausbildung von α -Helices besitzt [94-97]. Valin hingegen besitzt mit seiner β -verzweigten Seitenkette eine wesentlich geringere Tendenz dazu und destabilisiert deshalb helikale Strukturen [64,76]. Ein Peptid mit einer hydrophoben Sequenz aus Leucinen (L16) ist folglich günstiger für die Ausbildung einer membrandurchspannenden Helix. Basierend auf dieser Sequenz wurden sukzessiv β -verzweigte Aminosäuren (Val) im Kern eingebaut. Beim Vergleich von Peptiden mit verschiedenen Leu/Val-Verhältnissen zeigte sich eine maximale Fusogenität für ein Leu/Val-Verhältnis von 1 (LV16).

Gly und Pro sind aufgrund ihrer Struktur dazu in der Lage, die helikale Faltung eines Peptids zu destabilisieren [98-100]. Beim Einbau der beiden Aminosäuren in die Sequenz von LV16 zeigte sich, dass ein einzelnes Gly oder Pro die Fusogenität im Vergleich zur „Muttersequenz“ (LV16) nicht verändert. Auch wenn beide Reste isoliert voneinander eingesetzt werden (LV16-G6P10), war kein Unterschied zu verzeichnen. Allerdings führte der Einbau eines Gly/Pro- bzw. Pro/Gly-Paares (LV16-G8P9 bzw. LV16-P8G9) sowie der Einbau von zwei dieser Paare (LV16-GPPG) in die

Sequenz von LV16 zu einem signifikanten Anstieg der Fusogenität. Der helix-destabilisierende Effekt eines Gly/Pro bzw. Pro/Gly-Paares im Zusammenhang mit der Leu/Val-Mischsequenz führte zu einer etwa 80-fachen Steigerung der Fusionsgeschwindigkeit im Vergleich zur am wenigsten fusogenen Leucinsequenz (L16).

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen den erhaltenen Fusogenitäten und der Struktur der Peptide wurde deren Sekundärstruktur in Lösungsmitteln von unterschiedlicher Polarität durch Zirkulardichroismus- (CD) Spektroskopie bzw. Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) untersucht [88]. Die Arbeiten zur CD-Spektroskopie erfolgten innerhalb eines Kooperationsprojektes durch Katrin Weise im Arbeitskreis von Frau Reed am DKFZ Heidelberg, die FTIR-Untersuchungen wurden von Julian Ollesch im Arbeitskreis von Herrn Gerwert an der Universität Bochum durchgeführt.

Hierbei wurden Polaritätstitrationen der Peptide durchgeführt, wobei die Sekundärstrukturgehalte der Peptide bei verschiedenen Anteilen an TFE in wässrigem Puffer ermittelt wurden. Aus der Änderung der Polarität des Lösungsmittels resultierten unterschiedliche Sekundärstrukturgehalte der Peptide. Die Differenz an α -helikaler Struktur zwischen 20 und 80 % TFE wurden als Maß für die Flexibilität der Peptide angesehen. Dabei wurden durch die Anwendung der beiden Methoden zwei Konzentrationsbereiche von 0,1 mg/ml (CD) bzw. 1,5 mg/ml (FTIR) abgedeckt. In Abb. 34 sind die erhaltenen Differenzen im Gehalt an α -helikalen Strukturen aus den Polaritätstitrationen den ermittelten Fusogenitäten gegenübergestellt.

Bei den „aliphatischen“ Peptiden mit unterschiedlichen Leu/Val-Verhältnissen sowie den Peptiden, bei denen ein einzelnes Gly oder Pro in die LV-Sequenz eingefügt worden ist, zeigen sich gute Übereinstimmung zwischen Fusogenität und Änderung der Helikalität. Auf die Darstellung der Fusogenität von V16 wurde hierbei verzichtet, da dieses Peptid nur in sehr geringen Mengen in die Liposomen integriert werden konnte. Zudem lagen aufgrund von Problemen bei der Durchführung der FTIR-Messungen keine Werte für LV16-G8P9 vor.

Bei Peptiden mit Gly/Pro- bzw. Pro/Gly-Paar sind die Änderung in helikaler Struktur weniger stark ausgeprägt. Hier scheint eine anderer struktureller Mechanismus als bei den aliphatischen Peptiden vorzuliegen.

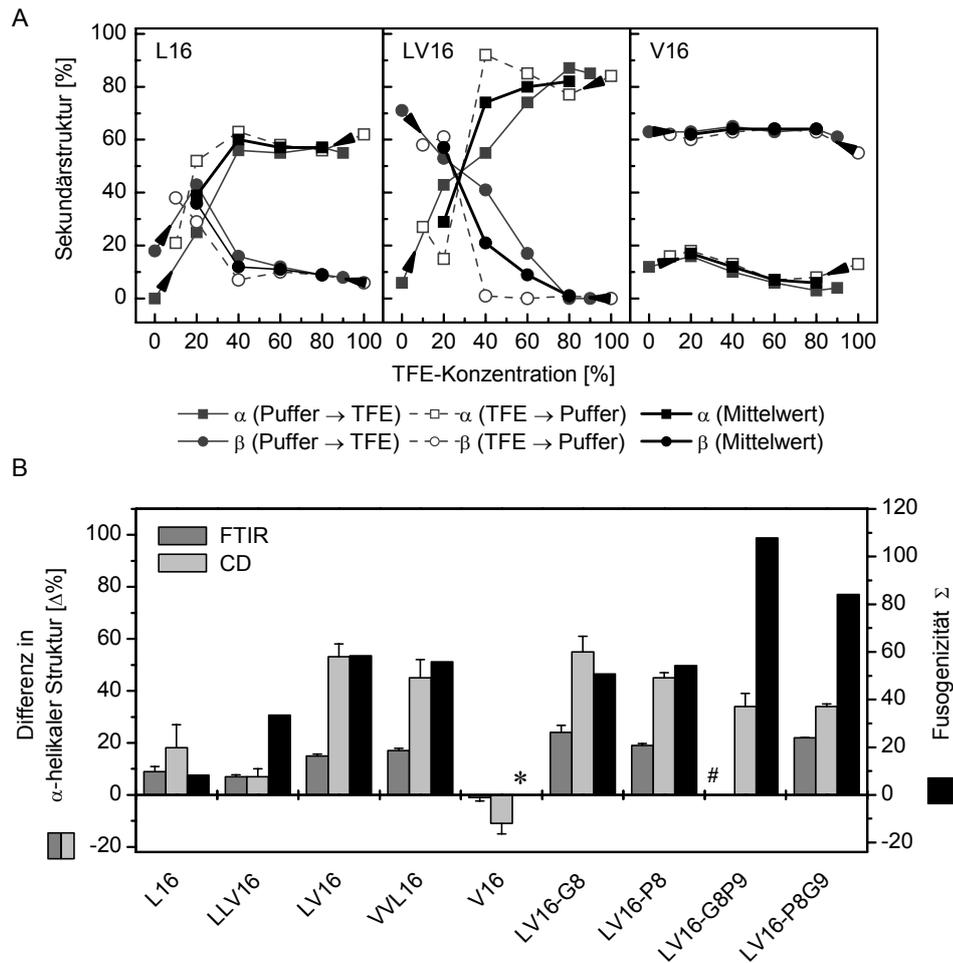


Abb. 34 Vergleich der konformationellen Flexibilität [88] mit der Fusogenität von Peptiden einer Kernsequenz aus 16 Aminosäuren. A, Strukturgehalte der Peptide L16, LV16 und V16 (Konz. 0,1 mg/ml) bei Polaritätstitrationen ermittelt durch CD-Spektroskopie. B, Die Änderung des Helixanteils der Peptide bei Polaritätstitrationen zwischen 80% und 20% TFE aus CD- sowie FTIR Messungen ist dem Fusogenitätsparameter Σ gegenübergestellt. Aufgrund der geringen Einbauraten von V16 wurde auf eine Darstellung des Wertes verzichtet (*). Für LV16-G8P9 lagen keine FTIR-Daten vor (#).

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden vier ausgewählte Peptide von signifikant unterschiedlicher Fusogenität mittels ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie (ssNMR) untersucht [88]. Diese Arbeit wurde von Prashant Agrawal unter Anleitung von Frans Hulsbergen im Arbeitskreis von Herrn de Groot an der Universität Leiden (Niederlande) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Abb. 35. Dabei deutet eine Verschiebung von 175 ppm auf eine rein helikale Struktur und eine Verschiebung von 170 ppm auf eine reine Faltblattstruktur hin. Eine reine Leu-Sequenz zeigte bei den Messungen α -helikale Strukturen (175,8 ppm). Eine gemischte Leu/Val-Sequenz zeigt ein zweigeteiltes Signal mit Maxima bei 172,5 ppm und 171,5 ppm, welches auf das Vorhandensein größerer Anteile an β -faltblattartigen Strukturen hindeutet. Auch das Peptid mit einem Gly/Pro-Paar, welches signifikant höhere Fusogenitäten aufweist (vgl. Abb. 34), zeigt eine Verbreiterung des Signals (bei 171,3 ppm) und somit eine klare Zwischenstruktur im Vergleich zu

L16 bzw. V16 (170,3 ppm). Bei V16 kann von einer nahezu reinen Faltblattstruktur ausgegangen werden.

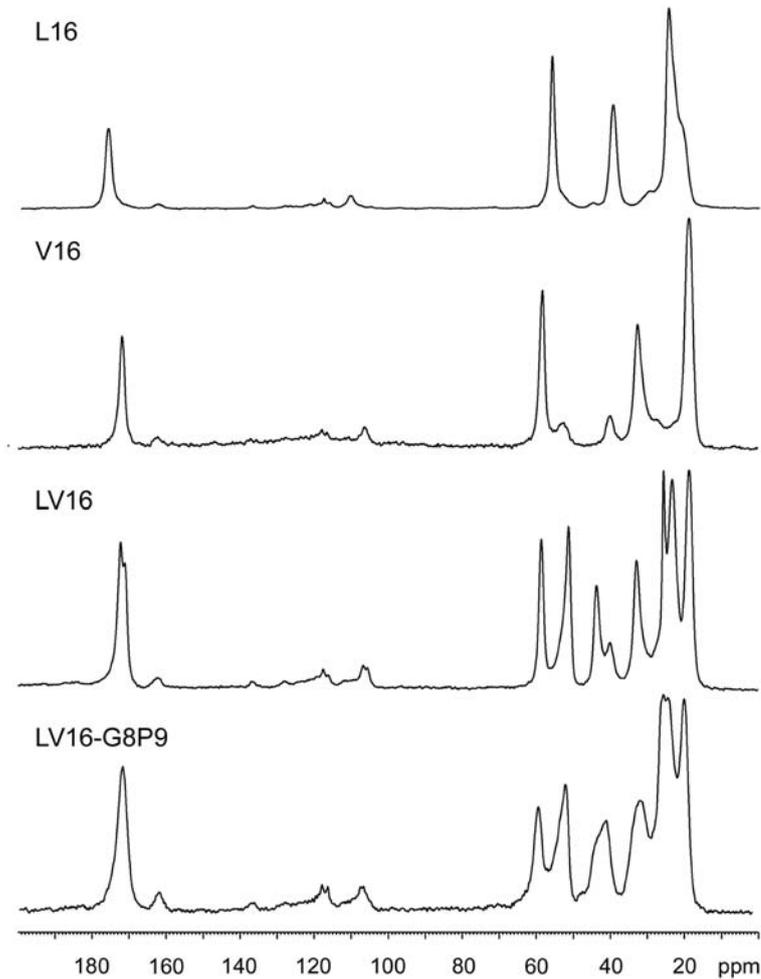


Abb. 35 ^{13}C -NMR-Spektren von lyophilisierten Peptiden [88]. Die Signale zwischen 170 und 176 ppm zeigen ^{13}C -Verschiebungen des Peptidrückgrats. Ein Wert von 175 ppm ist charakteristisch für eine α -Helix, 170 ppm zeigt β -Faltblattstruktur.

Anhand der strukturellen Untersuchungen der Peptide mittels CD-, FTIR- sowie NMR-Spektroskopie konnte ein tendenzieller Zusammenhang zwischen konformationeller Flexibilität und Fusogenität aufgezeigt werden. Je stärker die Struktur des TMD-Peptids zwischen helikaler und faltblattartiger Konformation vorliegt, desto höher ist seine Fusogenität.

Das Ergebnis eines strukturellen Zusammenhangs zwischen konformationeller Flexibilität der TMD und der Fusogenität stimmt mit Ergebnissen aus Untersuchungen an natürlichen Fusionsproteinen überein. β -Verzweigte Aminosäuren und/oder Glycin sind in TMDn von SNARE-Proteinen [63] sowie in viralen Fusionsproteinen [60] überrepräsentiert. Zudem ist ein Gly/Pro-Paar in der TMD von Typ C Retroviren konserviert [101]. Funktionelle Studien konnten außerdem

zeigen, dass die Mutation von Gly in den TMDn von Influenza Hämagglutinin [56] und dem VSV G-Protein [62] oder die Mutation von Pro innerhalb der TMD des Moloney Virus Fusionsproteins [58] die Fusogenitäten dieser Proteine in zellulären Untersuchungsverfahren drastisch reduzierte. Dies deutet stark darauf hin, dass die intrinsische strukturelle Flexibilität der TMD im Zusammenhang mit der Funktion des Membranproteins während der Fusion steht.

5.2.2 Bedeutung der flankierenden Aminosäuren

Neben der Charakterisierung der hydrophoben Kernsequenz der Peptide wurde auch der Einfluss der flankierenden Aminosäuren betrachtet. Hierbei wurden zunächst die N-terminalen Lysine mit ihren positiven Ladungen charakterisiert. Dies erfolgte durch Ermittlung der Fusogenitäten von „Host/Guest“-Peptiden mit unterschiedlichen hydrophoben Sequenzen.

„Host/Guest“-Peptide wurden ursprünglich entworfen, um die Eigenschaften von Fusionspeptiden viraler Fusionsproteine wie Influenza Hämagglutinin zu ermitteln. Die Peptide sind aus einer hydrophilen C-terminalen Sequenz aus vier Lysinen, einem flexiblen Verbindungsstück (zusammen „Host“ genannt) sowie der hydrophoben N-terminalen „Guest“-Sequenz aufgebaut. Die Verknüpfung der hydrophoben Sequenz mit einem unstrukturierten und stark geladenen Rest sorgt für eine gute Löslichkeit in Wasser. Untersuchungen an Guestsequenzen unterschiedlicher Länge, die vom Fusionspeptid von Influenza Hämagglutinin abgeleitet wurden, konnten zeigen, dass bei deren Zugabe zu vorgeformten Liposomen und Erythrozyten Fusion bzw. Hämolyse induziert wird. Deren Ausmaß war von der Länge der „Guest“-Sequenz abhängig. Spektroskopische Untersuchungen zeigten die Ausbildung von helikalen Sekundärstrukturen der Peptide in der Membran. Durch Verwendung des „Host/Guest“-Systems konnte so eine funktionelle und strukturelle Charakterisierung der hydrophoben Fusionspeptide von viralen Fusionsproteinen erfolgen [77,102].

Im Gegensatz zu den C-terminalen TMDn sind Fusionspeptide von viralen Fusionsproteinen N-terminale amphipatische Sequenzen. Ihnen kommt eine Schlüsselrolle bei der durch Glykoproteine gesteuerten Membranfusion zu, da sie durch Eindringen in Lipidschichten zellulärer Zielmembranen das Fusionprotein darin verankern und die eigentliche Fusion somit einleiten [103]. Obwohl sich der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht mit dem Einfluss der Fusionspeptide sondern vielmehr mit der Charakterisierung der TMD beschäftigt, bietet die Untersuchung von „Host/Guest“-Peptiden dennoch die Möglichkeit, den Einfluss der N-terminalen Ladungen der Lysine zu untersuchen. Deshalb wurden drei verschiedene Kernsequenzen an C-terminalen „Host“-Domänen fusioniert und unter identischen Bedingungen untersucht.

Beim Vergleich der beiden Peptidarten zeigte sich, dass die Reihenfolge der Fusogenität mit (H/G)-LV16-G8P9 > (H/G)-LV16 > (H/G)-L16 mit der Abfolge der Werte bei den „Standardpeptiden“ übereinstimmt. Die Sequenzspezifität ist also auch bei den Host/Guest-Peptiden vorhanden und ist nicht von den N-terminalen Lysinen abhängig. Es stellte sich heraus, dass (H/G)-L16 sowie (H/G)-LV16-G8P9 keine signifikanten Unterschiede zu den Fusogenitäten der Standardpeptide L16 bzw. LV16-G8P9 aufweisen. Allerdings zeigte (H/G)-LV16 eine um fast die Hälfte reduzierte Fusogenität gegenüber LV16. Obwohl die ermittelten P/L-Verhältnisse vergleichbar waren und somit die Einbauraten keine Unterschiede aufwies, können keine Aussagen über eine mögliche Diskrepanz bei der Orientierung der beiden Peptidvarianten relativ zur Membran getroffen werden. Derartige Unterschiede könnten auch eine Erklärung für die veränderte Fusogenität von LV16 liefern. Im Umkehrschluss müsste dann angenommen werden, dass die beiden Varianten von LV16-G8P9 sowie L16 jeweils vergleichbar in der Membran eingebaut werden. Die Diskrepanz bei den Peptiden mit der LV16-Sequenz könnte in dem verringerten „hydrophobic mismatch“ der „Host/Guest“-Variante (hydrophobe Sequenz um das WGCG-Motiv erweitert) begründet sein. Die vergleichbare Fusogenität der beiden Varianten von LV16-G8P9 ließe im Zusammenhang mit vermindertem „hydrophobic mismatch“ auf einen anderen Mechanismus beim „Host/Guest“-Peptidschließen.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit den Effekten der Ladungen an den beiden Termini der Peptide. Die Standardpeptide tragen hier jeweils drei Lysine. Diese sorgen vermutlich für eine Verankerung der Peptide in der Membran sowie eine bessere Löslichkeit der Peptide [104]. Die Peptide wurden in Liposomen bei einem pH-Wert von 7,4 rekonstituiert. Aufgrund des pK_a-Wertes der ε-Aminogruppe von Lysin (pK_a = 10,3) liegen diese in protonierter Form vor und tragen eine positive Ladung. Der mögliche Einfluss dieser Ladungsinteraktion mit den Kopfgruppen der Lipide sollte durch den Einsatz von Histidin-flankierten Peptiden untersucht werden. Hier wurden alle Lysine gegen Histidine ausgetauscht. Histidin besitzt einen niedrigeren pK_a-Wert (pK_a = 6,0). Peptide mit Histidin an den Termini sind deshalb bei neutralem pH ungeladen. Bei pH 4 hingegen tragen auch sie eine positive Ladung. Durch den Einsatz von His-flankierten Peptiden konnte also der Einfluss der Ladung auf die Fusogenität von unterschiedlichen hydrophoben Kernsequenzen in Liposomen identischer Lipidzusammensetzung ermittelt werden.

Experimente mit Lys-flankierten Peptiden zeigten, dass Fusionsuntersuchungen im pH-Bereich von 4 bis 7,4 möglich sind. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die pH-Änderung sich lediglich auf den Protonierungszustand von His auswirkt. Auch beim Einbau der Peptide war kein Unterschied zu den Lys-flankierten Varianten festzustellen.

Die Ergebnisse aus den Fusionsuntersuchungen zeigten, dass His-flankierte Peptide bei neutralem pH-Wert (pH = 7,4) keine fusogene Wirkung auf Liposomen haben. Bei pH 4 hingegen

zeigen diese Peptide ausgeprägte Fusogenitäten, deren Ausmaß von der Kernsequenz der Peptide abhängt [(His)-L16 < (His)-LV16 < (His)-LV16-G8P9]. Die Sequenzspezifität des hydrophoben Kerns ist auch bei den His-flankierten Peptiden gegeben. Bei der genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen pH-Wert und Fusogenität von (His)-LV16-G8P9 wurde die sigmoidale Titrationskurve von Histidin erhalten. Der ermittelte Wendepunkt ergab einen Wert von 5,3. Dieser ist gegenüber dem pK_a -Wert von Histidin ($pK_a = 6,0$) um etwa 0,7 niedriger. Ausgehend von einem Einbau der Peptide in der Membran lässt sich dieser Unterschied dadurch erklären, dass durch die Verankerung des Peptids dessen terminale Histidine an hydratisierten Phosphatgruppen lokalisiert sind. Sie sind deshalb für die Protonierung nicht so leicht zugänglich wie freies Histidin. Daher ist die Titrationskurve der Histidine in den Lipiddoppelschichten zu niedrigeren pH-Werten verschoben.

Die Fusion von Liposomen mit His-flankierten Peptiden war vom pH-Wert abhängig, bei welchem die Peptide präpariert wurden. Unklar war jedoch, ob der Protonierungszustand der Histidine sich in erster Linie auf den Einbau der Peptide in die Membran bei der Rekonstitution (und damit indirekt auf die Fusion) auswirkte oder ob auch eine nachträgliche pH-Absenkung effektiv war. Daher wurden Liposomen bei pH 6,5 präpariert und deren Fusion nach pH-Absenkung betrachtet. Durch kontinuierliche Messung der Fluoreszenz von NBD war es dabei möglich, die Fusion „online“ am Fluoreszenzspektrometer zu verfolgen. Es zeigte sich, dass Liposomen ohne Peptid nach pH-Absenkung auf pH = 4 keine Fusion aufwiesen. Wurden His-flankierte Peptide in Liposomen eingebaut, so war nach schlagartiger pH-Absenkung (von 6,5 auf 4,0) eine deutliche Fusion messbar, welche durch den Fluoreszenzanstieg quantifiziert werden konnte. Das Ausmaß dieser Fusion war wiederum von der Kernsequenz der Peptide abhängig.

Der Einfluss der positiven Ladung der flankierenden Aminosäuren auf die Fusogenität kann nicht erschöpfend geklärt werden. Die Möglichkeit der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Peptid und negativ geladenem Lipid (Phosphatidylserin) und einer dadurch initiierten Annäherung der miteinander fusionierenden Liposomen ist unwahrscheinlich, da global gesehen bei einem P/L-Verhältnis von 0,005 trotz der sechs positiven Ladungen des Peptids dennoch die negative Ladung des PS um den Faktor 6,8 überwiegt.

Es scheint vielmehr plausibel, dass das Peptid ohne Ladungen an den Termini schwächere Interaktionen mit den Lipiden in der Membran eingeht. Dies kann im Zusammenhang mit „hydrophobic mismatch“ gesehen werden. Ein Peptid, dessen hydrophobe Kernsequenz in helikaler Konformation zu „kurz“ ist, um eine Membran zu durchspannen erzeugt definitionsgemäß über negativen „hydrophobic mismatch“. Dieser wird durch die Membran kompensiert indem die Lipide beispielsweise nichtlamellare, hexagonale H_{II} -Phasen eingehen [104-106]. Die Struktur des Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* zeigte geladene Aminosäuren wie Lys im Bereich der

Kopfgruppen der Phospholipide. Aromatische Aminosäuren wie Trp hingegen kommen an der Grenze zu den Acylketten vor [106,107] (Abb.36).

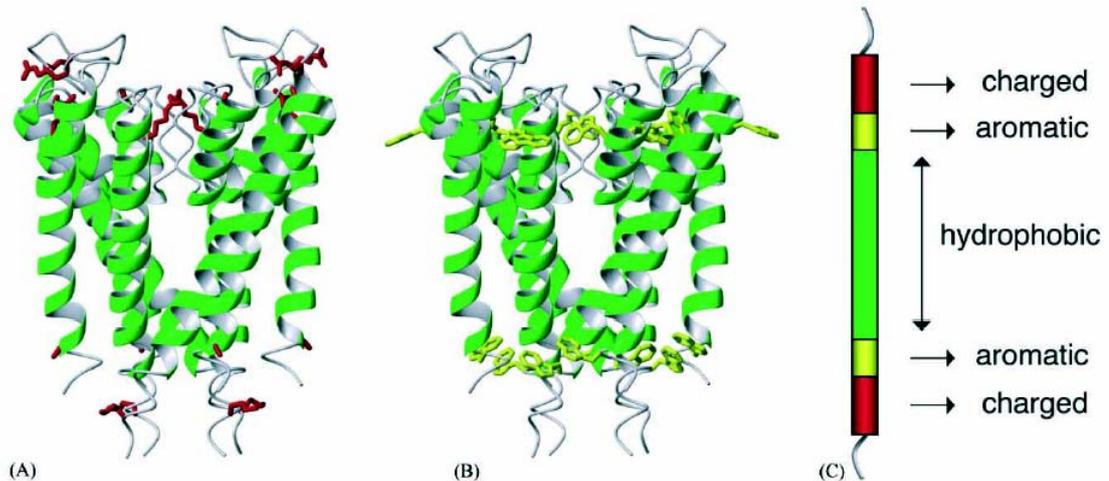


Abb. 36 Die Struktur der TMD des Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* [106]. A, Die hydrophoben TMDn (grün) sind von geladenen Argininresten (rot) umgeben. B, Näher am hydrophoben Bereich befindet sich ein Gürtel aus Tryptophanen (gelb). C, Schematische Verteilung der Aminosäuren. Dabei handelt es sich um ein generelles Motiv in den TMD von Membranproteinen [106].

Es ist vorstellbar, dass die ungeladenen Histidine eines Peptides aufgrund ihrer aromatischen Struktur nahe an den Acylketten der Lipide in der Membran lokalisiert sind (vgl. Abb. 37). Der Imidazolring der Histidine erhält durch pH-Absenkung eine positive Ladung, woraus möglicherweise elektrostatische Wechselwirkungen der Histidine mit den Kopfgruppen der Lipide resultieren (vergleichbar den Lysin). Durch die damit verbundene Induzierung von nichtlamellaren Phasen in der Membran (Abb. 37) könnte die Fusogenität der His-Peptide bei niedrigen pH-Werten erklärt werden. Allerdings bleibt dies nur eine Hypothese, deren Bestätigung schwierig ist. Trotzdem bietet das System der pH-induzierten Fusion von Liposomen mit His-Peptiden die Möglichkeit, das Ausmaß der Liposomenfusion sowohl durch den pH-Wert, als auch durch die Kernsequenz der Peptide, zu steuern.

Sowohl Host/Guest-Peptide ohne N-terminale Lysine als auch His-flankierte Peptide sind in der Lage, Membranfusion zu induzieren. Dabei bleibt jeweils die Sequenzspezifität der Standardpeptide erhalten. Neben der Kernsequenz ist auch der Ladungszustand der terminalen Gruppen für die Fusion von Bedeutung. Die erhaltenen Ergebnisse lassen zwar keine vollständige Erklärung für die Effekte dieser Gruppen zu, ein Zusammenhang mit der Störung der lamellaren Phasen in der Membran ist allerdings vorstellbar.

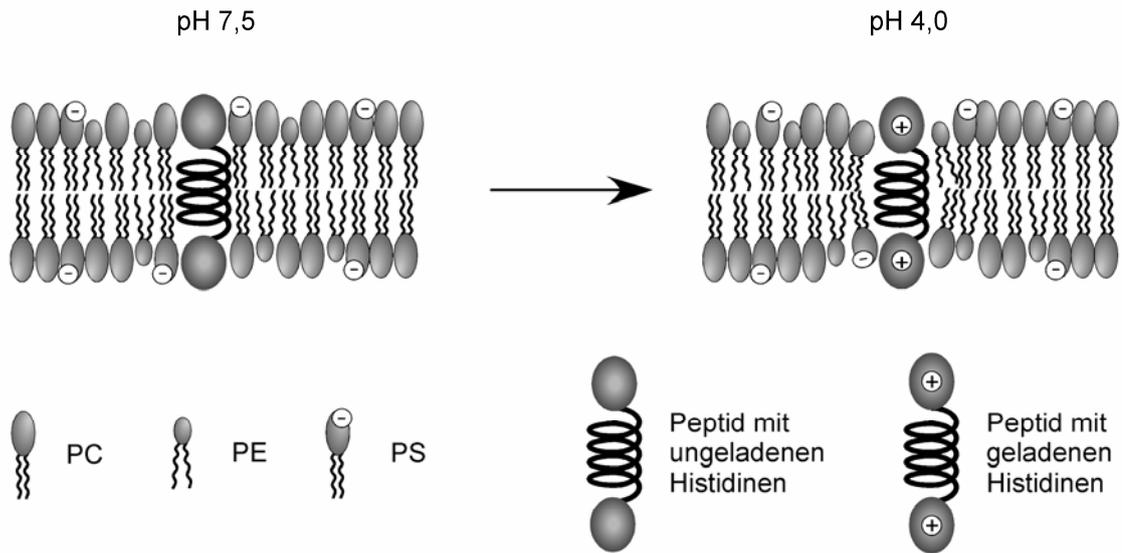


Abb. 37 Möglicher Einfluss terminaler Ladungen von Histidin-flankierten Peptiden auf die Membranstruktur. Bei pH 7,5 sind die terminalen Histidine ungeladen. Die hydrophobe Kernsequenz affiziert die Packung der Membran nicht. Durch pH-Absenkung werden die Histidine protoniert. Sie streben weiter zum Rand der Membran. Aus dem entstehenden „hydrophobic mismatch“ resultieren nichtlamellare Phasen in der Membran.

5.3 Lipide bei der Membranfusion

Bei gleicher Lipidmischung konnten die fusogenen Eigenschaften der Peptide detailliert charakterisiert werden. Da mit der Fusion eine Vermischung der Lipidschichten zweier Membranen und somit eine drastische Restrukturierung der Lipidmoleküle verbunden ist, sollte deren Einfluss auf die Fusion genauer untersucht werden. Dabei wurden zunächst die Ladungen der Kopfgruppen variiert. Es folgte der Vergleich von Lipiden natürlicher Herkunft mit ihren synthetischen Pendants. Der Einfluss von hochgradig ungesättigten DHA-Lipiden wurde zusätzlich an mehreren Peptiden untersucht.

Anhand ihrer hydrophilen und hydrophoben Abschnitte lässt sich eine Membran in verschiedene Bereiche unterteilen. Den hydrophoben Bereich bilden dabei die Acylkettenregionen der Phospholipide. Der hydrophile Teil besteht aus den Kopfgruppen. Bei den Untersuchungen der Fusionsvorgänge durch Peptide wurden Membranen verwendet, welche sich aus Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen zusammensetzen. Dabei tragen Phosphatidylcholin (PC) sowie Phosphatidylethanolamin (PE) aufgrund ihrer Zwitterionenstruktur keine Nettoladung. Phosphatidylserin (PS) hingegen besitzt zusätzlich eine negative Ladung an der Kopfgruppe, die von der Seringruppe herrührt. Liposomen aus der „Standard“-Lipidmischung von PC/PE/PS (3:1:1), mit welcher die Peptide charakterisiert wurden, verfügen also über eine negative Nettoladung. Um den Einfluss der geladenen Kopfgruppen der Lipide auf die Membranfusion zu untersuchen, wurde PS gegen PC ausgetauscht und somit Liposomen ohne Nettoladung erzeugt. Bei einer Reihe von Fusionsexperimenten mit dem Peptid LV16 konnten Unterschiede im Fusionsverhalten von negativ geladenen und neutralen Liposomen festgestellt werden. Dabei wurden sowohl Akzeptorliposomen, in welchen Peptid vorhanden war, als auch farbstoffmarkierte Donorliposomen aus einer neutralen Lipidmischung hergestellt. Diese wurden in allen vier möglichen Permutationen mit negativ geladenen Liposomen gemischt und die Fusionskinetiken aufgenommen.

Zunächst fiel auf, dass bei der Fusion von ungeladenen Liposomen eine wesentlich höhere anfängliche Fusionsgeschwindigkeit im Vergleich zu negativen Liposomen zu beobachten war. Die Fusionsausbeute nach einer Stunde blieb dabei unverändert. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der verminderten Abstoßung zwischen den Liposomen ohne Nettoladung zu finden sein. Stellt man sich die Fusionsereignisse als zufällige Kollisionen von Liposomen vor, so spiegelt die anfängliche Fusionsgeschwindigkeit die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der ein zufälliges Aufeinandertreffen zweier Liposomen zu deren Fusion führt [32]. Ohne elektrostatische Abstoßung könnte die Kollision neutraler Liposomen häufiger in Fusion umgesetzt werden, was in der erhöhten anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit resultieren würde. Das Ausmaß der Fusion nach einer Stunde entspricht gemäß dieser Vorstellung der Summe aller Fusionsereignisse. Die Tatsache, dass dieser Wert bei ungeladenen Liposomen (PC/PE = 4:1) gegenüber geladenen Liposomen

(PC/PE/PS = 3:1:1) unverändert bleibt, deutet darauf hin, dass das Ausmaß der Fusion in diesem Fall nur vom Peptid abhängt.

Die Kinetiken von ungeladenen Liposomen aus PC sprechen allerdings zunächst gegen diese Vorstellung. Hierbei konnte sowohl eine geringere anfängliche Fusionsgeschwindigkeit, als auch eine geringere Fusion nach einer Stunde beobachtet werden. Bezieht man allerdings die Form der einzelnen Lipide in die Überlegungen mit ein, so kann man auch hier einen Zusammenhang erkennen. Basierend auf der „Stalk“-Hypothese erfolgt bei der Fusion zunächst die Bildung eines Übergangszustandes, der als Hemifusion bezeichnet wird [46,47,49]. Eine mögliche Rolle der Lipide während der Hemifusion ist in Abbildung 38 zusammengefasst. Aufgrund der Größe ihrer Kopfgruppen und ihrer Acylkettenregionen nehmen Lipide dabei unterschiedliche Formen an, die allerdings nicht statisch gesehen werden können. So besitzt PE eine kleine Kopfgruppe im Vergleich zur Acylkettenregion, woraus sich eine stärker ausgeprägte Kegelform ergibt. PC hingegen besitzt in der Membran eine nahezu zylindrische Form. Im Übergangszustand ergeben sich daraus große Packungsdefizite der Acylkette (Abb. 38A). Aufgrund der Kegelform von PE ergibt sich eine gewisse Neigung zur Ausbildung von nichtlamellaren hexagonalen Lipidphasen [43,108]. Diese begünstigen die Lipidstrukturen im Übergangszustand der Membranfusion (Abb. 38B). Hieraus lässt sich ableiten, dass es bei Vorhandensein von PE in einer Membran zur erleichterten Ausbildung von Fusionsintermediaten kommen und somit auch zur beschleunigten peptidinduzierten Fusion führen kann, was den Unterschied der Fusionsneigung von Liposomen aus PC bzw. PC/PE (4:1) erklärt. In der „Standard“-Lipidmischung PC/PE/PS (3:1:1) ergeben sich keine großen Veränderungen des Übergangszustand (Abb. 38C) im Vergleich zu PC/PE (4:1). Die verringerte Anfangssteigung lässt sich wohl auf elektrostatische Abstoßung der Liposomen zurückführen.

Unerwartet waren die Ergebnisse der Fusionsexperimente von geladenen mit ungeladenen Liposomen. Wurden ungeladene Akzeptorliposomen (A) mit negativ geladene Donorliposomen (D) fusioniert, so zeigten sich Kinetiken, die denen von ungeladenen Liposomen entsprachen. Dies lässt sich aus der fehlenden elektrostatischen Abstoßung der Liposomen erklären. Hingegen zeigten geladene Akzeptorliposomen und ungeladene Donorliposomen keine messbare Fusion. Eine Erklärung dafür kann gegenwärtig nicht gefunden werden.

Es zeigt sich, dass die peptidinduzierte Fusion durch Lipide sowohl durch den Ladungszustand ihrer Kopfgruppen, als auch durch ihre intrinsische Struktur moduliert werden kann. Deshalb ist es im Sinne der Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus Fusionsuntersuchungen besonders wichtig, stets mit identischen Lipidzusammensetzungen zu arbeiten.

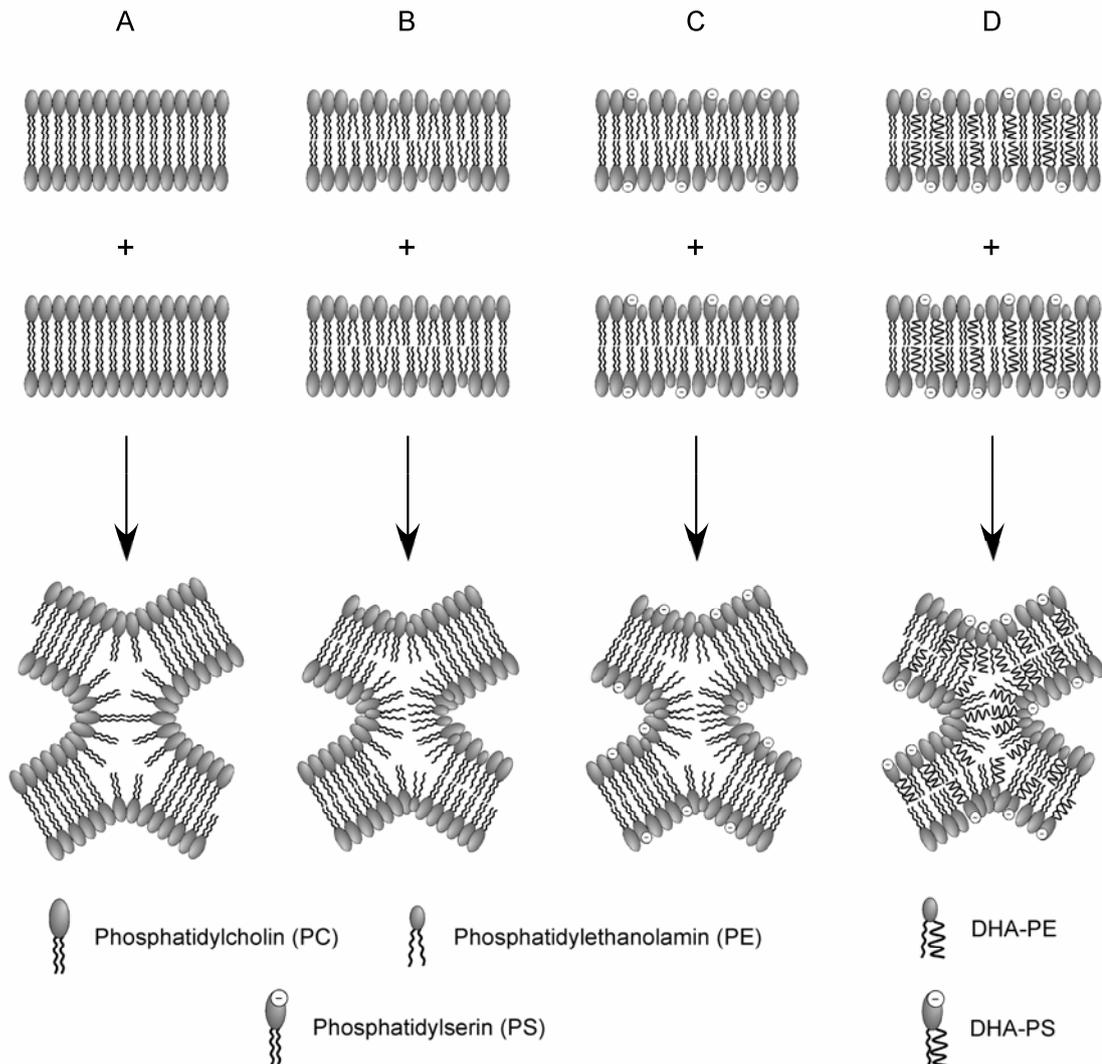


Abb. 38 Möglicher Einfluss der Lipide auf die Ausbildung von Fusionsintermediaten. A, Eine Membran aus PC zeigt starke Packungsdefizite während der bei Hemifusion auftretenden negativen Krümmung. B, Durch das Vorhandensein von PE wird die Ausbildung von negativer Krümmung begünstigt. C, Durch PS (negative Ladung) wird die Struktur von B kaum geändert. D, Durch Einfügen von DHA-Lipiden sind im Übergangszustand noch weniger Defizite in der Packung der Acylketten vorhanden.

Neben den Kopfgruppen der Lipide wurden auch die Acylkettenregionen betrachtet. Die zur Charakterisierung der Peptide verwendeten Lipide waren natürlichen Ursprungs. Es handelt sich dabei um ein Gemisch von Lipiden mit drei unterschiedlichen Kopfgruppen, die jeweils an Seitenketten mit unterschiedlichen Längen und unterschiedlichen Sättigungsgraden gebunden sind. Eine daraus aufgebaute Membran besitzt deshalb eine vergleichbare mittlere Dicke, kann allerdings nicht als homogen betrachtet werden. Im Gegensatz dazu verfügt eine Membran aus synthetischen Lipiden mit definierten Acylketten über eine exakt definierbare Dicke. Zur Evaluierung sich daraus ergebender Unterschiede wurde das Fusionsverhalten von Peptiden unterschiedlich langer Kernsequenzen in Membranen aus synthetischen Lipiden ermittelt und mit den Werten aus natürlichen Membranen verglichen. Dabei blieb die Identität der Kopfgruppen der Lipide

unverändert. Die synthetischen Lipide wiesen ferner einen großen Gehalt an ungesättigten Oleylseitenketten (C18:1) auf, um niedrige Phasenübergangstemperaturen zu erhalten und so zu gewährleisten, dass eine Rekonstitution der Liposomen auf Eis ohne Phasenübergang durchzuführen war.

Beim Vergleich der Fusogenitäten von Peptiden unterschiedlicher Länge zeigte sich auch in Liposomen aus synthetischen Lipiden (POPC/DOPE/DOPS, 3:1:1) ein Optimum für LV16. Allerdings wies das kürzere LV12 hier eine signifikant erhöhte Fusogenität im Vergleich zu den natürlichen Lipiden auf, die sich sowohl bei der anfänglichen Fusionsgeschwindigkeit als auch bei der Fusionsausbeute zeigte. Dieser Effekt könnte im Zusammenhang mit dem in Kap. 5.2.2 erwähnten negativen „hydrophobic mismatch“ stehen [106]. Geht man von einem membrandurchspannenden Einbau des Peptids LV12 aus, so ist die natürliche Lipidmischung möglicherweise dazu in der Lage, den „mismatch“ durch Umorganisieren seiner unterschiedlichen Acylketten zu kompensieren. In der synthetischen Lipidmischung hingegen sind die dafür notwendigen kürzerkettigen Lipide nicht vorhanden, wodurch diese Membran stärker durch LV12 deformiert wird. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Fähigkeit von LV12, sich als Transmembranhelix in die synthetische Membran einzubauen von der Membrandicke abhängt. Dies könnte sich indirekt auf die Sekundärstruktur auswirken.

Die Bedeutung der Form der Lipide für die Membranfusion wird auch aus den Ergebnissen mit DHA-Lipiden deutlich (vgl. Abb. 38D). Die durch das Peptid LV16 induzierte Fusion von Liposomen konnte durch DHA-Lipide signifikant gesteigert werden. Bei Kontrollexperimenten mit dem Peptid LLV16, welches über eine geringere Fusogenität verfügt, konnte allerdings gleiche relative Fusionssteigerungen beobachtet werden. Auch beim Leerwert war eine entsprechende Zunahme zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt der hochgradig ungesättigten DHA-Lipide weniger im Zusammenhang mit einer Änderung der Struktur der Peptide zu sehen ist. Vielmehr handelt es sich dabei um einen Effekt, der durch die Form des DHA-Lipids ausgeübt wird. Die C22:6 Acylkette von DHA an der sn2-Position Phospholipiden nimmt in der Ebene der Membran mehr Raum als eine einfach ungesättigte Acylkette ein. Dies führt zu einer Kegelform ähnlich PE [43,81]. Zudem bewirken DHA-Lipide in der Membran aufgrund der hohen Flexibilität ihrer Seitenkette eine starke Störung der Packung der Acylketten, was sich unter anderem in einer veränderten lateralen Kompressibilität und Permeabilität ausdrückt [80]. Dieser Effekt scheint sich nur in der natürlichen Lipidmischung auszuwirken, da Versuche mit synthetischen Lipiden keine Fusionssteigerung durch DHA-Lipide zeigten. Es ist vorstellbar, dass die Störung der Packung der Membran sich in der natürlichen Lipidmischung aufgrund deren Inhomogenität stärker auf die Fusion auswirkt als in der besser gepackten synthetischen Membran.

5.4 Steigerung der Fusogenität von Peptiden durch AmpOX

Aufgrund ihrer Struktur sind Aminopyrazole in der Lage nicht-kovalent an ein Peptid in der β -Konformation zu binden. Dies erfolgt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in einem Protonen-Donor-Akzeptor-Donor Motiv [74,86]. Die Fusogenität von Peptiden steht im Zusammenhang mit deren konformationeller Flexibilität. Deshalb wurde untersucht, inwieweit ein dimeres Aminopyrazolderivat in der Lage ist, die Fusogenität eines Peptids zu verändern und ob die Ergebnisse auf die Beeinflussung der Konformation des Peptids hindeuten.

Fusionsuntersuchungen von Peptiden mit AmpOX haben gezeigt, dass mit steigendem AmpOX/Peptid (A/P)-Verhältnis die Fusionswerte signifikant ansteigen. Es wurden drei Peptide verglichen, bei denen in eine Leu-Sequenz eine steigende Anzahl der β -verzweigten Aminosäure Valin eingefügt wurden (L16, LLV16 und LV16). Der fusionssteigernde Effekt war von der Sequenz der Peptide abhängig und bei LLV16 am stärksten ausgeprägt. Allerdings ist die Steigerung bei L16 aufgrund der niedrigen Fusogenität des Peptids und des Fehlerbereichs des Untersuchungsverfahrens nicht absolut aussagekräftig. Da die verglichenen Peptide über unterschiedliche Flexibilitäten verfügen, wurden diese mit den erhaltenen Fusionssteigerungen durch AmpOX verglichen. Dabei fiel auf, dass das Ausmaß der Steigerung sich reziprok zur Flexibilität der Peptide verhält. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte im Zusammenhang mit Interaktionen von AmpOX und Peptid gesehen werden können. Auch konnte bei Liposomen ohne Peptid keine Änderung der Fusionskinetiken beobachtet werden.

Fusionsexperimente mit DTN-behandelten Donorliposomen, durch welche die Messung von Fusionsintermediaten ausgeblendet wird, zeigten, dass das Ausmaß der Vermischung der inneren Lipidschichten bei Anwesenheit von AmpOX zurückging. Aus diesen Werten konnte das Auftreten von Fusionsintermediaten, bei denen nur die äußeren Lipidschichten fusioniert sind, quantifiziert werden. Es wurde festgestellt, dass durch AmpOX vermehrt Hemifusion auftritt.

Da die Fusionsergebnisse keine eindeutigen Schlussfolgerungen über die Interaktion von AmpOX und Peptid erlauben, wurde durch Absorptionsspektroskopie und Massenspektrometrie die Interaktion näher untersucht.

Um die Stöchiometrie der Interaktion von AmpOX mit Peptid zu ermitteln, wurde die Trübung von Mischungen verschiedener A/P-Verhältnisse zunächst absorptionsspektroskopisch untersucht. Dabei konnte AmpOX in TFE kolloidal gelöst werden. Die Trübung dieser Lösungen konnte durch Zugabe von Peptid jedoch vermindert werden. Dies deutete auf eine Interaktion von AmpOX mit dem in TFE sehr gut löslichen Peptid hin. Es wurde festgestellt, dass bis zu einem A/P-Verhältnis von 5 klare Lösungen erhalten wurden. Dies weist stark auf eine Stöchiometrie von 5:1 des nicht-kovalenten AmpOX/Peptid Komplexes hin.

Um diese AmpOX/Peptid-Komplexe noch genauer zu charakterisieren, wurden sie mittels Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) in der Gasphase untersucht. Aufgrund der milden Ionisierungsbedingungen eignet sich ESI-MS besonders gut für die Detektion von nicht-kovalenten Interaktionen. Ursprünglich als Methode zur Identifizierung großer Makromoleküle entwickelt [109], findet sie eine breite Anwendung bei der Untersuchung vielerlei nicht-kovalenter Interaktionen [110,111]. Bei der Untersuchung der Proben aus den Trübungsmessungen konnte der 1:1 Komplex detektiert werden. Dabei stieg die Intensität des Signals mit steigendem A/P-Verhältnis an. Komplexe höherer Stöchiometrie wurden allerdings nur mit sehr geringen Intensitäten detektiert, was auf die Zersetzung der Komplexe während der Ionisierung zurückzuführen ist. Weiterhin erlaubte das verwendete Massenspektrometer die Anwendung von Tandem-MS mit kollisionsinduziertem Zerfall (CID; collision induced dissociation). Dieses Verfahren bietet Vorteile bei der Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden und erlaubt die Fragmentierung von Ionen großer Massen [112]. Bei der Untersuchung von Komplexen unterschiedlicher Stöchiometrien (1:1 bis 5:1) reichten geringe Kollisionsenergien bereits aus, um das Ion in Peptid und AmpOX zu zersetzen. Bei diesen Energien erfolgte noch keine Fragmentierung des Peptids. Dadurch konnte zum einen der Komplex eindeutig identifiziert werden und zum anderen wurde gezeigt, dass es sich um nicht-kovalente Wechselwirkungen handelt.

Das Lösungsmittel bei den Untersuchungen war reines TFE. Dieser primäre Alkohol verringert die Solvatisierung des Rückgrats eines Peptids in der ungefalteten Konformation und begünstigt daher α -helikale Peptidstrukturen [89]. Deshalb liegt ein Peptid in TFE vorzugsweise in Helixkonformation vor. Dies zeigten auch Strukturanalysen durch CD-Spektroskopie (siehe oben).

Obwohl bei Untersuchungen der Interaktion von Aminopyrazolderivaten mit löslichen Peptiden gezeigt werden konnte, dass diese bevorzugt mit β -Konformationen erfolgt [74,86,113], deuten die Ergebnisse von CD-Spektroskopie im Lösungsmittel TFE als auch in Liposomen (B. Poschner, persönliche Mitteilung) auf eine Interaktion mit helikaler Struktur hin. Dabei kann allerdings eine Interaktion von AmpOX mit nicht-helikalen Bereichen bzw. Populationen des Peptides in höheren A/P-Stöchiometrien nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend von einer helikalen Struktur der TMD ist ausserdem eine auf dem Leucin-Zipper-Motiv basierende TMD-TMD-Interaktion mit daraus resultierender Oligomerisierung vorstellbar. AmpOX könnte dazu in der Lage sein, diese Zustände zu beeinflussen. Eine genaue strukturelle Erklärung für die Interaktion von TMDn in Anwesenheit des Liganden kann anhand der vorgestellten Ergebnisse nicht erfolgen und bedarf deshalb weiterer Untersuchungen dieser nicht-kovalenten Komplexe, beispielsweise in Membranen .

Die Fusionsuntersuchungen konnten allerdings zeigen, dass die Interaktion von AmpOX mit Peptid zu vermehrt auftretender Hemifusion führt. Dieser Effekt war bei strukturell flexibleren Peptiden weniger ausgeprägt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die nicht-kovalente

Interaktion von AmpOX mit einer relativ starren (nicht flexiblen) Peptidstruktur erfolgt. Außerdem könnte diese Komplexbildung zu einer stärkeren Störung der Ordnung der Lipidschichten führen. Es ist bekannt, dass durch die Störung der Packung der Lipide in der Membran, wie diese zum Beispiel durch virale Fusionspeptide ausgeübt wird, Fusion auftreten kann [114,115]. Die eventuell durch AmpOX alleine ausgeübte Störung der Packung der Lipide in der Membran zeigte bei Messungen der Fusion von Liposomen ohne Peptid keinen Effekt. Durch Interaktion mit dem Peptid wäre es dennoch vorstellbar, dass eine beschleunigte Vermischung der äußeren Lipidschichten auftritt und daraus Hemifusion resultiert. Durch eine verringerte strukturelle Flexibilität wäre der Komplex von AmpOX und Peptid weiterhin nicht in der Lage, die Vermischung der inneren Lipidschichten zu begünstigen (vgl. Kap. 5.6).

5.5 Charakterisierung der fusogenen Eigenschaften eines SNARE-TMD-Peptids

Bei der Untersuchung von *de novo* kreierten Peptiden stellte sich ein Zusammenhang zwischen Fusogenität und struktureller Flexibilität heraus. Anhand dieser Erkenntnisse sollte zum Abschluss der Arbeiten die TMD des SNARE-Proteins Vam3p aus Hefe mit Hilfe des vorgestellten Untersuchungsverfahrens *in vitro* charakterisiert werden.

Unter Anwendung eines etablierten Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Vakuolenfusion in Hefe *in vivo* [116] konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen Domänen des Hefe t-SNARE Proteins Vam3p die einleitenden Schritte während der Fusion der Hefevakuolen koordinieren [91]. Der Austausch der TMD von Vam3p durch einen Prenylanker führte zu einem Abbruch der Vakuolenfusion. Da das prenylierte Vam3p dabei befähigt blieb, trans-Komplexe einzugehen, lässt sich neben der Wichtigkeit der TMD auf ihre Funktion nach der trans-Komplexbildung schließen [54].

Die Fusogenität einer Vam3p-Wildtypsequenz (Vam3p-wt) wurde mit der von zwei Mutanten (Vam3p-A4 und Vam3p-A4bb) verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Peptide unterschiedliche Fusogenitäten aufweisen. D.h., dass die fusogene Wirkung der TMD von Vam3p von der Sequenz der Peptide abhängig ist. Dies betont die Vergleichbarkeit des auf Liposomenfusion basierenden Untersuchungsverfahrens *in vitro* mit dem *in vivo* System in Hefezellen.

Ein Austausch β -verzweigter Aminosäuren in der Wildtypsequenz führte zu einer verringerten Fusogenität. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen bei *de novo* kreierten Peptiden, wo in umgekehrter Weise eine Einfügung von β -verzweigten Aminosäuren eine Steigerung der Fusion bedingte. Diese korrelierte außerdem mit der strukturellen Flexibilität der Peptide [88]. Es kann deshalb auch bei den Vam3p Peptiden von einem Zusammenhang zwischen Fusogenität und konformationeller Flexibilität ausgegangen werden. Dies wird durch Ergebnisse aus der CD-spektroskopische Untersuchung der Peptide unterstützt. In CD-Spektren von Vam3p-wt sowie der beiden Mutanten aus Puffern mit unterschiedlichen Anteilen an TFE zeigte die wt-Sequenz eine höhere strukturelle Flexibilität. Die beiden Ala-Mutanten wiesen eine über einen weiten Bereich stabile helikale Struktur auf (W. Stelzer, persönliche Mitteilung).

Untersuchungen mit DTN-behandelten Donorliposomen zeigten, dass ein Teil der durch Vam3p-A4 induzierten Liposomenfusion sich lediglich in der Vermischung der äußeren Lipidschichten äußerte. Für die TMDn von viralen Fusionsproteinen konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen die Fusion im Zustand Hemifusion abstoppen können [56,62]. Bei Vam3p-wt und Vam3p-A4bb hingegen erfolgte die Vermischung beider Lipidschichten mit derselben Effizienz. Geht man von der Vorstellung aus, dass die Fusion der Liposomen in Lösung durch zufällige Kollisionen ausgelöst wird, so lässt sich anhand der Kinetiken schlussfolgern, dass die dabei gebildeten

Fusionsintermediate durch A4 nur sehr langsam in vollständige Fusion überführt werden, während wt und A4bb hier schnell eine vollständige Fusion der Membranen bewirken. Diese Diskrepanz scheint zunächst nicht mit der Flexibilität der beiden Peptide zusammenzuhängen. Da diese bei den CD-Messungen kaum Unterschiede aufwiesen (W. Stelzer, persönliche Mitteilung).

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Interpretation der Daten ergibt sich aus dem Oligomerisierungsverhalten der TMD von Fusionsproteinen. Vielfach wurde eine Oligomerisierung der TMD im Zusammenhang mit der Formierung von Fusionskomplexen diskutiert. Beispiele wurden sowohl im Bereich der viralen Fusionsproteine [117-119] als auch der SNARE-Proteine [120-122] entdeckt. So konnte unter anderem die Homodimerisierung des neuronalen SNARE-Proteins Synaptobrevin in Abhängigkeit von TMD-Interaktionen gezeigt werden [123]. Bei den Mutanten der TMD von Vam3p befinden sich die vier gegen Alanin ausgetauschten Aminosäuren einmal innerhalb (A4) und einmal außerhalb (A4bb) einer Helix-Helix-Kontaktfläche (R. Roy, persönliche Mitteilung). Die Diskrepanz im Fusionsverhalten von Vam3p-A4 deutet auf einen Zusammenhang zwischen Oligomerisierungsverhalten und Fusogenität hin. Auch die geringeren Unterschiede in den Fusionskinetiken bei höheren P/L-Verhältnissen deuten auf eine zunehmende Effizienz des Hemifusions-Fusions-Übergangs bei höheren P/L-Werten hin. Auch bei der Liposomenfusion durch SNARE-Proteine konnte mit verringertem Protein/Lipid-Verhältnis eine verminderten Effizienz des Hemifusions-Fusions-Übergangs beobachtet werden [55].

Die Oligomerisierung von TMDn scheint sowohl *in vivo* als *auch in vitro* für den Übergang von Hemifusion zu Fusion entscheidend zu sein. Bisher blieb dieser Aspekt bei den *de novo* kreierte Peptiden unbeachtet. Die Untersuchungen zeigten allerdings bei diesen Peptiden keine Fusionsintermediate. Für weitere Studien zur Aufklärung der Vorgänge bei der Membranfusion bietet der Parameter Oligomerisierung allerdings einen interessanten Forschungsaspekt.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die LV-Peptide stellen eine Gruppe membranfusogener Peptide dar, welche *de novo* entworfen wurden. Durch Sekundärstrukturanalyse konnte die Fusogenität dieser Peptide mit ihrer strukturellen Flexibilität korreliert werden. Das TMD-Peptid des SNARE Proteins Vam3p zeigte *in vitro* fusogene Eigenschaften, die durch Einfügung von helix-stabilisierenden Aminosäuren verringert werden konnten. Auch hier konnte ein Zusammenhang zwischen Flexibilität und Fusogenität gezeigt werden.

Bei der Betrachtung der Abläufe während der Membranfusion wird gemäß der „Stalk“-Hypothese der Übergangszustand Hemifusion angenommen (siehe Abb. 39). Dieser wird durch die alleinige Vermischung der äußeren, proximalen Lipidschichten definiert [46,47,49,124]. Dem Ablauf der Fusion können zwei Geschwindigkeitskonstanten zugeschrieben werden. k_1 spiegelt die Wahrscheinlichkeit wider, mit der ein zufälliges Aufeinandertreffen zweier Liposomen zur Hemifusion führt, k_2 beschreibt die Umsetzung eines Fusionsintermediats in vollständige Fusion.

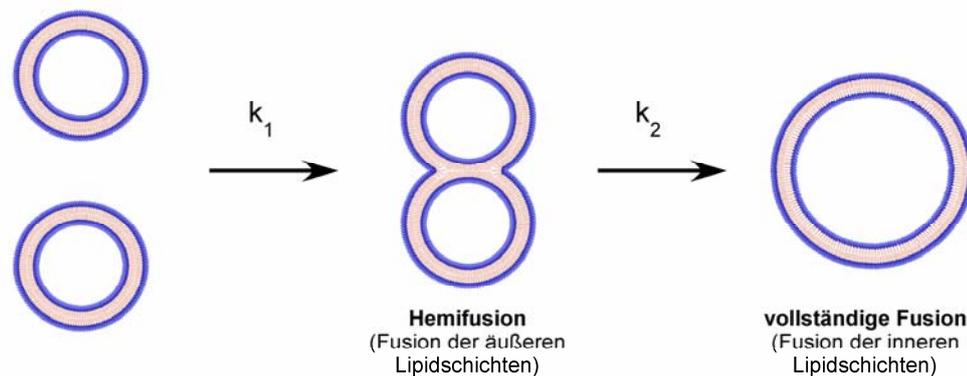


Abb. 39 Modellvorstellung zum Ablauf der Fusion zweier Vesikel. Die Kollision zweier Liposomen führt zur Hemifusion, beschrieben durch die Geschwindigkeitskonstante k_1 . Das Fusionsintermediat wird weiter zum vollständig fusionierten Zustand umgesetzt (k_2).

Es wurde gezeigt, dass Lipide durch die elektrostatischen Abstoßungen gleichartig geladener Kopfgruppen und ihre Form die Stabilität des Übergangszustandes beeinflussen können (vgl. Abb. 38 in Kapitel 5.3). Lipide scheinen durch die Struktur der aus ihnen gebildeten Fusionsintermediate Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante k_1 auszuüben.

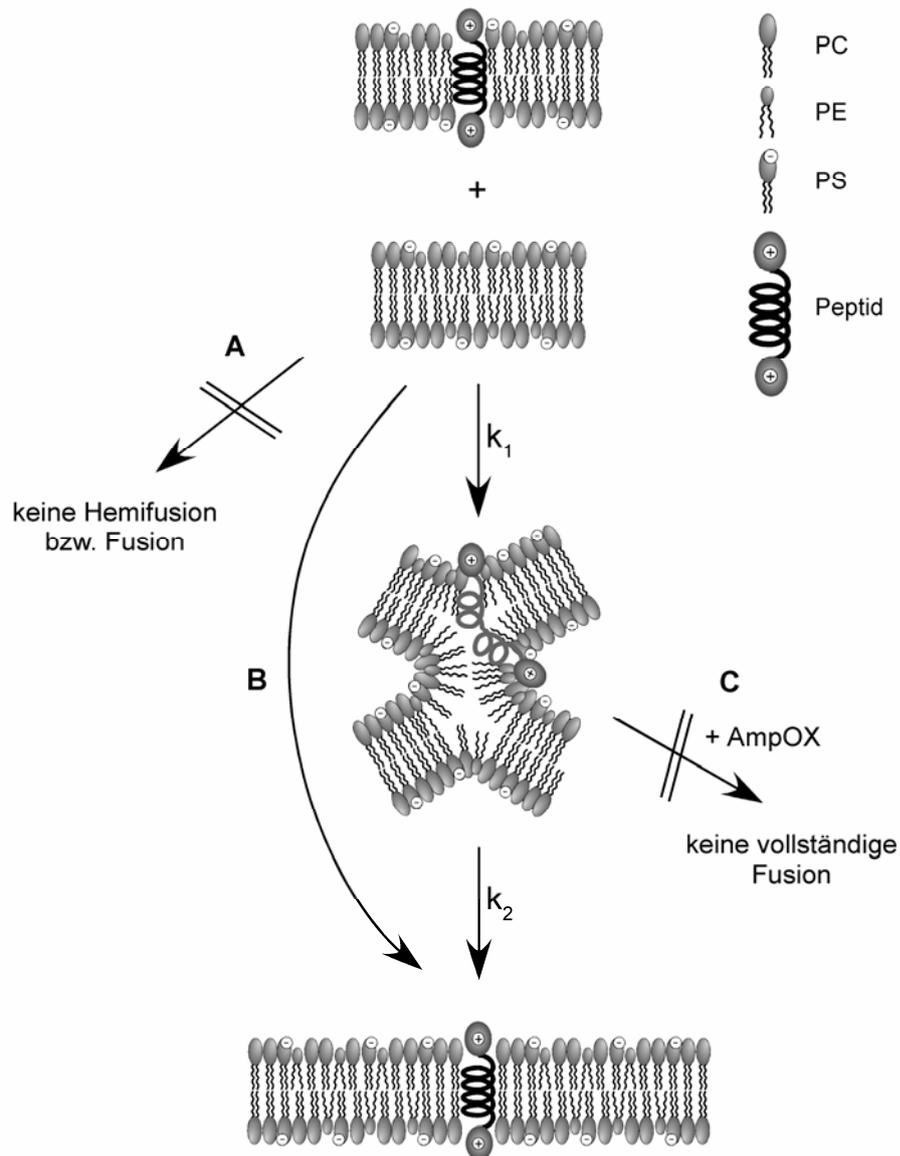


Abb. 40 Modellvorstellung zur peptidinduzierten Membranfusion. A, Aufgrund geringer konformationeller Flexibilität sind nicht-fusogene Peptide nicht in der Lage, die Vermischung der Lipidschichten zu begünstigen. B, Bei fusogenen Peptiden erfolgt aufgrund konformationeller Flexibilität eine leichte Änderung der Struktur. Dadurch wird Fusion begünstigt. C, Bindet AmpOX an ein Peptid, so erfolgt keine vollständige Umsetzung des Fusionsintermediats. Eine mögliche Erklärung liegt in der durch AmpOX eingeschränkten Flexibilität des Peptids.

Bei den LV-Peptiden wurde keine Präferenz zur Ausbildung von Fusionsintermediaten festgestellt. Die Funktion der Peptide während der Membranfusion kann durch ihre Flexibilität formuliert werden (Abb. 40). Ein nicht fusogenes Peptid (beispielsweise L16) induziert keine Fusion (Abb. 40A). Verfügt ein Peptid über helix-destabilisierende Aminosäuren, kann im Übergangszustand eine Konformationsänderung erfolgen (Abb. 40B). Diese Strukturänderung könnte die nötige freie Energie in Form einer erhöhten Entropie der Peptide zur Verfügung stellen, um den Hemifusions-Fusions-Übergang zu gewährleisten.

Die Interaktion des Liganden AmpOX mit Peptiden wurde in Faltblattstruktur gezeigt [86]. Die erhaltenen Ergebnisse deuten allerdings auf eine Interaktion mit helikalen Peptiden hin. In weiteren Experimenten müsste deshalb zusätzlich eine Stabilisierung der helikalen Struktur gezeigt werden. Würde dies gelingen, so würde die eingeschränkte Flexibilität eine Erklärung für die verminderte Effizienz des Hemifusions-Fusions-Übergang darstellen (Abb. 40C).

Auch die Membranfusion *in vivo* lässt sich in frühe und späte Abschnitte unterteilen. In frühen Schritten sorgen die membranextrinsischen Domänen von Fusionsproteinen für eine Annäherung der proximalen Lipidschichten der Membranen. Im Falle der SNARE-Proteine resultiert dies aus der Ausbildung von superhelikalen Strukturen durch die SNARE-Domänen [4], bei viralen Fusionsproteinen wie Influenza Hämagglutinin erfolgt im endosomalen pH-Bereich eine Umfaltung [5] und eine damit verbundene Lokalisierung des Fusionspeptids in der Nähe der TMD. Beide Prozesse ermöglichen die Überwindung der Energiebarrieren, die sich aus der Hydratisierung der Membranen ergeben, und leiten dadurch die Fusion ein.

Der Austausch der TMD bei Influenza Hämagglutinin gegen einen lipidartigen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker [50,125] führte zu einer Annäherung an die Zielmembran sowie die Einleitung der Hemifusion, die aber nicht in vollständige Fusion umgesetzt wurde. Analog zeigten SNARE-Proteine signifikante Defizite bei der Vermischung der distalen Lipidschichten, wenn diese durch eine lipidartige Geranylgeranylierung [53] bzw. einen Prenylanker [54] anstelle der TMD in der Membran verankert wurden.

Bei Mutanten des Influenza Hämagglutinin mit verkürzter TMD konnte festgestellt werden, dass für die vollständige Fusion an der Zielmembran eine membrandurchspannende Domäne notwendig ist. Verkürzungen führten ähnlich wie bei GPI-verankerten Proteinen nur zum Stadium Hemifusion [52]. Erst kürzlich wurde in einer weiteren Arbeit gezeigt, dass die Halbierung der TMD eines SNARE-Proteins die vollständige Fusion von Liposomen hemmt und ausschließlich die Ausbildung von Hemifusion erfolgt [55]. Durch Verwendung von GTP γ S konnte die durch SNARE-Proteine gesteuerte Vakuolenfusion in Hefezellen im Status Hemifusion abgestoppt werden. Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus unklar ist, wurde dies als ein Hinweis auf die Funktion der membranextrinsischen Domänen vor dem Hemifusions-Fusions-Übergang gewertet [126]. Die vollständige Vermischung der Lipidschichten stellt folglich einen der letzten Schritte bei der Membranfusion dar und hängt entscheidend von den TMDn der Fusionsproteine ab.

Die Fusogenität von *de novo* kreierte Peptiden wird durch ihre konformationelle Flexibilität gefördert [88]. Dies ist auch bei den TMD von SNARE-Proteinen [63] sowie viralen Fusionsproteinen [60] der Fall. Die strukturelle Flexibilität von TMDn könnte also in Form von erhöhter Entropie eine Verringerung der freien Energie im Übergangszustand bewirken, welche im

finalen Schritt der Fusion die vollständige Vermischung der distalen Lipidschichten der Membranen fördert.

Die Notwendigkeit der strukturellen Flexibilität der TMDn für einen erfolgreichen „Abschluss“ des Fusionsereignisses zeigt sich auch in den natürlichen Fusionsproteinen. β -verzweigte Aminosäuren sind sowohl in den TMDn von SNARE-Proteinen [63] als auch in viralen Fusionsproteinen [62] überrepräsentiert. Die Mutation eines helix-destabilisierenden Glycins in der TMD von Influenza Hämagglutinin [56] sowie im VSV G-Protein [62] reduzierte die Fusogenitäten der vollständigen Proteine drastisch. Auch die Mutation eines Prolins in der TMD des Moloney Virus Fusionsproteins [58] reduzierte dessen fusogene Neigung. Zudem kommt in den TMDn von Typ C Retroviren ein konserviertes Gly/Pro-Paar vor [101]. Dies verdeutlicht, dass Aminosäuren, deren helix-destabilisierende Eigenschaften bereits nachgewiesen werden konnten [76,100], möglicherweise dazu in der Lage sind, die Fusogenität von Fusionsproteinen zu erhöhen.

Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Oligomerisierung von TMDn von Fusionsproteinen eine Rolle spielt. Sowohl im Bereich der viralen Fusionsproteine [117-119] als auch der SNARE-Proteine [120-123] wurde ein Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und Fusogenität gesehen. Die Ergebnisse bei den TMD-Peptiden von Vam3p zeigten mit steigenden P/L-Verhältnissen verringerte Diskrepanzen beim Hemifusions-Fusions-Übergang zwischen der nicht-oligomerisierenden und der oligomerisierenden Mutante. Auch Untersuchungen an einem vollständigen SNARE-Fusionsprotein zeigten bei niedrigen Protein/Lipid-Verhältnissen vermehrt Hemifusion [55].

Konformationelle Flexibilität stellt eine wichtige strukturelle Eigenschaft für in der Membran agierende Domänen von Fusionsproteinen dar. Obwohl das genaue Zusammenspiel zwischen dieser Flexibilität und anderer struktureller Merkmale mit den Membranlipiden nicht eindeutig geklärt werden konnte, scheinen Lipide aufgrund ihrer Form die Ausbildung von Fusionsintermediaten zu beeinflussen. Einige Hinweise auf Zusammenhänge des Hemifusions-Fusions-Übergangs mit dem Oligomerisierungszustand der TMDn von Fusionsproteinen werfen weitere Fragen auf, deren genauere Erforschung Ziele zukünftiger Projekte sein könnten. Dabei sind die Möglichkeiten des *in vitro* Systems noch nicht vollständig ausgeschöpft. Durch die Verknüpfung von Fusogenitätsmessungen mit Oligomerisierungsdaten sollte man zukünftig in der Lage sein, einem allumfassenden Verständnis des Membranfusionsmechanismus noch näher zu kommen.

6 Literaturverzeichnis

1. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.
2. Chen, E.H. and Olson, E.N. (2005): Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308, 369-73.
3. Chen, Y.A. and Scheller, R.H. (2001): SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98-106.
4. Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T.C. (2003): Membrane fusion. *Cell* 112, 519-33.
5. Tamm, L.K., Crane, J. and Kiessling, V. (2003): Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins. *Curr Opin Struct Biol* 13, 453-66.
6. Primakoff, P. and Myles, D.G. (2002): Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296, 2183-5.
7. Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005): The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-8.
8. Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G. and White, J.M. (1996): Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 627-61.
9. Colman, P.M. and Lawrence, M.C. (2003): The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 309-19.
10. Wilson, I.A., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1981): Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366-73.
11. Chen, J., Lee, K.H., Steinhauer, D.A., Stevens, D.J., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998): Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95, 409-17.
12. Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1994): Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371, 37-43.
13. Tamm, L.K. (2003): Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1614, 14-23.
14. Kozlov, M.M. and Chernomordik, L.V. (1998): A mechanism of protein-mediated fusion: coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys J* 75, 1384-96.
15. Stegmann, T., Doms, R.W. and Helenius, A. (1989): Protein-mediated membrane fusion. *Annu Rev Biophys Chem* 18, 187-211.
16. Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G. and Rey, F.A. (2001): The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137-48.
17. Shangguan, T., Alford, D. and Bentz, J. (1996): Influenza-virus-liposome lipid mixing is leaky and largely insensitive to the material properties of the target membrane. *Biochemistry* 35, 4956-65.
18. Corver, J., Ortiz, A., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X. and Wilschut, J. (2000): Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* 269, 37-46.

19. Zaitseva, E., Mittal, A., Griffin, D.E. and Chernomordik, L.V. (2005): Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J Cell Biol* 169, 167-77.
20. Geppert, M. and Sudhof, T.C. (1998): RAB3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci* 21, 75-95.
21. Sudhof, T.C. (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-47.
22. Pfeffer, S.R. (1999): Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol* 1, E17-22.
23. Waters, M.G. and Hughson, F.M. (2000): Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* 1, 588-97.
24. Pfeffer, S. (2001): Vesicle tethering factors united. *Mol Cell* 8, 729-30.
25. Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A. and Scheller, R.H. (2001): A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-41.
26. Jahn, R. (2004): Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 170-8.
27. Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-53.
28. Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. and Jahn, R. (1998): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15781-6.
29. Yu, R.C., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1999): NSF N-terminal domain crystal structure: models of NSF function. *Mol Cell* 4, 97-107.
30. Jahn, R. and Sudhof, T.C. (1999): Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863-911.
31. Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (1998): SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-72.
32. Schuette, C.G. et al. (2004): Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2858-63. Epub 2004 Feb 23.
33. Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1998): Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95, 871-4.
34. Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T.R. (2002): Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol* 9, 107-11.
35. Tucker, W.C., Weber, T. and Chapman, E.R. (2004): Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* 304, 435-8.
36. Sollner, T.H. (2004): Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16, 429-35.
37. Jahn, R. and Grubmüller, H. (2002): Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 14, 488-95.
38. Szule, J.A. and Coorsen, J.R. (2003): Revisiting the role of SNAREs in exocytosis and membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641, 121-35.
39. Lollike, K., Borregaard, N. and Lindau, M. (1995): The exocytotic fusion pore of small granules has a conductance similar to an ion channel. *J Cell Biol* 129, 99-104.

40. Lindau, M. and Almers, W. (1995): Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 7, 509-17.
41. Noguchi, H. and Takasu, M. (2001): Self-assembly of amphiphiles into vesicles: a Brownian dynamics simulation. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 64, 041913.
42. Noguchi, H. and Tasuka, M. (2001): Fusion pathways of vesicles: A Brownian dynamics simulation. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* 115, 9547-51.
43. Haque, M.E. and Lentz, B.R. (2004): Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: studies of lipid perturbant effects. *Biochemistry* 43, 3507-17.
44. Haque, M.E., McIntosh, T.J. and Lentz, B.R. (2001): Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 40, 4340-8.
45. Kuzmin, P.I., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y.A. and Cohen, F.S. (2001): A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7235-40.
46. Kozlovsky, Y. and Kozlov, M.M. (2002): Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophys J* 82, 882-95.
47. 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, 2634-51.
48. 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, 2951-64.
49. Yang, L. and Huang, H.W. (2002): Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* 297, 1877-9.
50. Kemble, G.W., Danieli, T. and White, J.M. (1994): Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* 76, 383-91.
51. Markosyan, R.M., Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (2000): The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing nonenlarging fusion pores. *Mol Biol Cell* 11, 1143-52.
52. Armstrong, R.T., Kushnir, A.S. and White, J.M. (2000): The transmembrane domain of influenza hemagglutinin exhibits a stringent length requirement to support the hemifusion to fusion transition. *J Cell Biol* 151, 425-37.
53. Grote, E., Baba, M., Ohsumi, Y. and Novick, P.J. (2000): Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *J Cell Biol* 151, 453-66.
54. Rohde, J., Dietrich, L., Langosch, D. and Ungermann, C. (2003): The transmembrane domain of Vam3 affects the composition of cis- and trans-SNARE complexes to promote homotypic vacuole fusion. *J Biol Chem* 278, 1656-62.
55. Xu, Y., Zhang, F., Su, Z., McNew, J.A. and Shin, Y.K. (2005): Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 12, 417-22.
56. Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Roth, M.G. and Cohen, F.S. (2000): A point mutation in the transmembrane domain of the hemagglutinin of influenza virus stabilizes a hemifusion intermediate that can transit to fusion. *Mol Biol Cell* 11, 3765-75.

57. Owens, R.J., Burke, C. and Rose, J.K. (1994): Mutations in the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J Virol* 68, 570-4.
58. Taylor, G.M. and Sanders, D.A. (1999): The role of the membrane-spanning domain sequence in glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* 10, 2803-15.
59. Shmulevitz, M., Salsman, J. and Duncan, R. (2003): Palmitoylation, membrane-proximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J Virol* 77, 9769-79.
60. 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, 32016-21.
61. 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, 14925-34.
62. 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, 3425-30.
63. 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, 709-21.
64. Minor, D.L., Jr. and Kim, P.S. (1994): Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* 367, 660-3.
65. 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, 9074-6.
66. Stapley, B.J. and Doig, A.J. (1997): Free energies of amino acid side-chain rotamers in alpha-helices, beta-sheets and alpha-helix N-caps. *J Mol Biol* 272, 456-64.
67. Stryer, L. and Haugland, R.P. (1967): Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 719-26.
68. Struck, D.K., Hoekstra, D. and Pagano, R.E. (1981): Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20, 4093-9.
69. Duzgunes, N., Allen, T.M., Fedor, J. and Papahadjopoulos, D. (1987): Lipid mixing during membrane aggregation and fusion: why fusion assays disagree. *Biochemistry* 26, 8435-42.
70. McIntyre, J.C. and Sleight, R.G. (1991): Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* 30, 11819-27.
71. Langner, M. and Hui, S.W. (1993): Dithionite penetration through phospholipid bilayers as a measure of defects in lipid molecular packing. *Chem Phys Lipids* 65, 23-30.
72. Miranda, L.P. and Alewood, P.F. (1999): Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1181-6.
73. New, R.R.C.E. (1990): *Liposomes - A practical approach*. Oxford University Press.
74. Rzepecki, P., Gallmeier, H., Geib, N., Cernovska, K., Konig, B. and Schrader, T. (2004): New heterocyclic beta-sheet ligands with peptidic recognition elements. *J Org Chem* 69, 5168-78.

75. Miranda, L.P., Jones, A., Meutermans, W.D.F. and Alewood, P.F. (1998): p-Cresol As a Reversible Acylium Ion Scavenger in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J Am Chem Soc* 120, 1410-1420.
76. Liu, L.P. and Deber, C.M. (1998): Uncoupling hydrophobicity and helicity in transmembrane segments. Alpha-helical propensities of the amino acids in non-polar environments. *J Biol Chem* 273, 23645-8.
77. Han, X. and Tamm, L.K. (2000): A host-guest system to study structure-function relationships of membrane fusion peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13097-102.
78. Chizmadzhev, Y.A. (2004): The mechanisms of lipid-protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry* 63, 129-36.
79. Deutsch, J.W. and Kelly, R.B. (1981): Lipids of synaptic vesicles: relevance to the mechanism of membrane fusion. *Biochemistry* 20, 378-85.
80. Stillwell, W. and Wassall, S.R. (2003): Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126, 1-27.
81. Mitchell, D.C., Gawrisch, K., Litman, B.J. and Salem, N., Jr. (1998): Why is docosahexaenoic acid essential for nervous system function? *Biochem Soc Trans* 26, 365-70.
82. Mitchell, D.C. and Litman, B.J. (1998): Molecular order and dynamics in bilayers consisting of highly polyunsaturated phospholipids. *Biophys J* 74, 879-91.
83. Huster, D., Jin, A.J., Arnold, K. and Gawrisch, K. (1997): Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ^{17}O NMR. *Biophys J* 73, 855-64.
84. Avanti Polar Lipids, I., www.avantilipids.com.
85. Rzepecki, P. et al. (2004): Prevention of Alzheimer's disease-associated A β aggregation by rationally designed nonpeptidic beta-sheet ligands. *J Biol Chem* 279, 47497-505.
86. Rzepecki, P., Molt, O., Zadnavor, R., Harms, K. and Schrader, T. (2003): Aminopyrazole Oligomers for beta-Sheet Stabilization of Peptides. *Synthesis*.
87. Cernovska, K., Kemter, M., Gallmeier, H.C., Rzepecki, P., Schrader, T. and König, B. (2004): PEG-supported synthesis of pyrazole oligoamides with peptide beta-sheet affinity. *Org Biomol Chem* 2, 1603-11.
88. Hofmann, M.W. et al. (2004): De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14776-81.
89. Kentsis, A. and Sosnick, T.R. (1998): Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding. *Biochemistry* 37, 14613-22.
90. 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), 1299-306.
91. Laage, R. and Ungermann, C. (2001): The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 12, 3375-85.
92. Herraiz, T. and Casal, V. (1995): Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *J Chromatogr A* 708, 209-21.
93. Hofmann, M.W., Stalz, H. and Langosch, D. (2005): Solid-phase Extraction as a tool to remove impurities and small fragments from synthetic peptides. *Anal Biochem*.

94. Merutka, G. and Stellwagen, E. (1990): Positional independence and additivity of amino acid replacements on helix stability in monomeric peptides. *Biochemistry* 29, 894-8.
95. O'Neil, K.T. and DeGrado, W.F. (1990): A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250, 646-51.
96. Lyu, P.C., Liff, M.I., Marky, L.A. and Kallenbach, N.R. (1990): Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* 250, 669-73.
97. Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T.M. and Baldwin, R.L. (1990): Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature* 344, 268-70.
98. Monne, M., Hermansson, M. and von Heijne, G. (1999): A turn propensity scale for transmembrane helices. *J Mol Biol* 288, 141-5.
99. Cordes, F.S., Bright, J.N. and Sansom, M.S. (2002): Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol* 323, 951-60.
100. Li, S.C. and Deber, C.M. (1992): Glycine and beta-branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments. *FEBS Lett* 311, 217-20.
101. Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q. and Herrmann, A. (2000): The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Biosci Rep* 20, 571-95.
102. Tamm, L.K., Han, X., Li, Y. and Lai, A.L. (2002): Structure and function of membrane fusion peptides. *Biopolymers* 66, 249-60.
103. Li, Y., Han, X. and Tamm, L.K. (2003): Thermodynamics of fusion peptide-membrane interactions. *Biochemistry* 42, 7245-51.
104. 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, 20839-46.
105. Killian, J.A. and von Heijne, G. (2000): How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci* 25, 429-34.
106. 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, 271-84.
107. Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
108. Fenske, D.B., Jarrell, H.C., Guo, Y. and Hui, S.W. (1990): Effect of unsaturated phosphatidylethanolamine on the chain order profile of bilayers at the onset of the hexagonal phase transition. A 2H NMR study. *Biochemistry* 29, 11222-9.
109. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
110. Loo, J.A. (1997): Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 16, 1-23.
111. Krutchinsky, A.N., Ayed, A., Donald, L.J., Ens, W., Duckworth, H.W. and Standing, K.G. (2000): Studies of noncovalent complexes in an electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometer. *Methods Mol Biol* 146, 239-49.

112. Jedrzejewski, P.T. and Lehmann, W.D. (1997): Detection of modified peptides in enzymatic digests by capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and a programmable skimmer CID acquisition routine. *Anal Chem* 69, 294-301.
113. Rzepecki, P. and Schrader, T. (2005): beta-Sheet ligands in action: KLVFF recognition by aminopyrazole hybrid receptors in water. *J Am Chem Soc* 127, 3016-25.
114. Evans, E. and Needham, D. (1987): Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* 91, 4219-4228.
115. Epand, R.M. (2003): Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim Biophys Acta* 1614, 116-21.
116. Haas, A. (1995): A quantitative assay to measure homotypic vacuole fusion in vitro. *Methods Cell Sci.* 17, 283-294.
117. Doms, R.W. and Helenius, A. (1986): Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment. *J Virol* 60, 833-9.
118. Tatulian, S.A. and Tamm, L.K. (2000): Secondary structure, orientation, oligomerization, and lipid interactions of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin. *Biochemistry* 39, 496-507.
119. Sjoberg, M. and Garoff, H. (2003): Interactions between the transmembrane segments of the alphavirus E1 and E2 proteins play a role in virus budding and fusion. *J Virol* 77, 3441-50.
120. Laage, R. and Langosch, D. (1997): Dimerization of the synaptic vesicle protein synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein) II depends on specific residues within the transmembrane segment. *Eur J Biochem* 249, 540-6.
121. 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, 40-4.
122. Laage, R., Rohde, J., Brosig, B. and Langosch, D. (2000): A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. *J Biol Chem* 275, 17481-7.
123. Roy, R., Laage, R. and Langosch, D. (2004): Synaptobrevin transmembrane domain dimerization-revisited. *Biochemistry* 43, 4964-70.
124. Yang, L. and Huang, H.W. (2003): A rhombohedral phase of lipid containing a membrane fusion intermediate structure. *Biophys J* 84, 1808-17.
125. Nussler, F., Clague, M.J. and Herrmann, A. (1997): Meta-stability of the hemifusion intermediate induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin. *Biophys J* 73, 2280-91.
126. Reese, C., Heise, F. and Mayer, A. (2005): Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature*.
127. Weiss, T.M., van der Wel, P.C., Killian, J.A., Koeppe, R.E., 2nd and Huang, H.W. (2003): Hydrophobic mismatch between helices and lipid bilayers. *Biophys J* 84, 379-85.

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Beschreibung	Seite
1	Struktur des SNARE-Komplexes	6
2	Vergleich der Strukturen von viralen Fusionsproteinen mit dem SNARE-Komplex	7
3	Vergleich von viralen und intrazellulären Fusionsproteinen	8
4	Modellvorstellungen zur Rolle von Proteinen in Übergangszuständen während der Membranfusion	10
5	Übergangszustände und Krümmung von Lipidschichten während der Vesikelfusion gemäß der „Stalk“-Hypothese	11
6	Röntgenstrukturanalyse von Lipidschichten bei der Membranfusion	12
7	Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von TMDn	15
8	Liposomenfusion durch FRET zwischen NBD-PE und Rh-PE	17
9	Reduktion von NBD durch Dithionit	17
10	Unterscheidung von Hemifusion und vollständiger Fusion durch Reduktion von NBD-PE in der äußeren Lipidschicht	18
11	Ziel der Arbeit	19
12	Reinheit der Peptide am Beispiel LV16-P8G9	30
13	Entfernung von <i>p</i> -Kresol durch SPE	32
14	Entfernung von Peptidfragmenten durch SPE	33
15	Design der Peptide	34
16	Fusogene Aktivitäten von Peptiden unterschiedlicher Länge	37
17	Fusogene Aktivitäten von Peptiden gleicher Länge mit unterschiedlichen Kernsequenzen	38
18	Fusogenitäten von Peptiden gleicher Länge	39
19	Fusion der inneren Lipidschichten nach Behandlung mit Dithionit	40
20	Fusion durch H/G-Peptide	42
21	Fusion von Peptiden in Abhängigkeit des Ladungszustandes der flankierenden Aminosäuren	43
22	Fusion von Liposomen unterschiedlicher Nettoladung	48

Abb.	Beschreibung	Seite
23	Zusammensetzung der Acylketten von Lipiden aus natürlichen Quellen	49
24	Peptidinduzierte Fusion von Liposomen aus synthetischen Lipiden	50
25	Struktur von DHA im Vergleich zu Palmitinsäure und Ölsäure	52
26	Einfluss von DHA-Lipiden auf die peptidinduzierte Liposomenfusion	53
27	Einfluss von DHA-Lipiden auf die spontane Liposomenfusion	54
28	Stabilisierung der β -Konformation durch ein Aminopyrazolderivat	56
29	Peptidinduzierte Liposomenfusion unter dem Einfluss des hydrophoben Liganden AmpOX	58
30	Fusion der inneren Lipidschichten bei der peptidinduzierten Liposomenfusion unter dem Einfluss von AmpOX	59
31	Interaktion von AmpOX mit Peptid LLV16	61
32	Durch Vam3p-TMD-Peptide induzierte Vermischung der Lipide	63
33	Durch Vam3p-TMD-Peptide induzierte Fusion der inneren Lipidschichten	64
34	Vergleich der konformationellen Flexibilität mit der Fusogenität von Peptiden einer Kernsequenz aus 16 Aminosäuren	69
35	^{13}C -NMR-Strukturen von lyophilisierten Peptiden	70
36	Die Struktur der TMD des Kaliumkanals von <i>Streptomyces lividans</i>	74
37	Möglicher Einfluss terminaler Ladungen von Histidin-flankierten Peptiden auf die Membranstruktur	75
38	Möglicher Einfluss der Lipide auf die Ausbildung von Fusionsintermediaten	78
39	Modellvorstellung zum Ablauf der Fusion zweier Vesikel	85
40	Modellvorstellung zur peptidinduzierten Membranfusion	86

Verwendete Abkürzungen

A/P	AmpOX/Peptid
AcN	Acetonitril
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease
AmpOX	N,N'-Bis-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-oxaldiamin
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butoxycarbonyl
CD	Circularer Dichroismus
CID	collision induced dissociation
DC	Dünnschichtchromatographie
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOPS	Dioleylphosphatidylserin
DTN	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektronensprayionisation
FTIR	Fouriertransformation Infrarot
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
H/G	Host/Guest
HA	Influenza Hämagglutinin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
LPC	Lysophosphatidylcholin
NBD	7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol
NSF	N-Ethylmaleimid sensitive factor
P/L	Peptid/Lipid
PC	Phosphatidylcholin
PDA	Photodiodenarray
PE	Phosphatidylethanolamin
POPC	Palmitoyloleylphosphatidylcholin

PS	Phosphatidylserin
PUFA	polyunsaturated fatty acid
R _f	Retentionsfaktor
Rh	Lissamin-Rhodamin B sulfonsäure
RIM	Rab3 interacting molecule
S-DHA-PE	Stearyl-docosahexaenyl-phosphatidylethanolamin
S-DHA-PS	Stearyl-docosahexaenyl-phosphatidylserin
SFV	Semliki Forest Virus
SNAP	synaptosome associated protein
SNARE	soluble NSF protein receptor
SOPE	Stearyl-oleyl-phosphatidylethanolamin
SOPS	Stearyl-oleyl-phosphatidylserin
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SUV	small unilamellar vesicle
SV	sekretorisches Vesikel
Syb	Synaptobrevin
Syx	Syntaxin
TFA	Trifluoracetat
TFE	Trifluorethanol
TMD	Transmembrandomäne
ToF	time of flight
UZ	Ultrazentrifuge
VSV	vesikulärer Stomatitis Virus

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Publikationen im Rahmen der Dissertation:

Hofmann, M.W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J., Langosch, D. (2004)

De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion.

Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14776-81.

Hofmann, M.W., Stalz, H. and Langosch, D. (2005)

Solid-phase Extraction as a tool to remove impurities and small fragments from synthetic peptides.

Anal. Biochem. 344, 144-46

Hofmann, M., Langosch, D.

Flexibilität fördert Fusion

TUM-Mitteilungen 1-2005, 60

Posterbeiträge im Laufe der Promotion:

M.W. Hofmann, H. Stalz, W. Stelzer and D. Langosch

Length and sequence of designed model peptides influence their fusogenic activity on liposomal membranes

3rd International Symposium on „Conformational Control of Biomolecular Functions“
7. – 9. May 2003, Velen

M.W. Hofmann, H. Stalz, W. Stelzer and D. Langosch

Fusogenic activity of artificial transmembrane peptides in liposomal membranes

ELSO Meeting 2003, Dresden

M.W. Hofmann, B.C. Poschner, K. Weise, J. Ollesch, P. Agrawal, W. Stelzer, F. Hulsbergen, H. de Groot, K. Gerwert and D. Langosch

Fusogenic activity of conformationally flexible de novo designed transmembrane peptides

30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference 2005, Budapest, Ungarn

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Mathias Wilhelm Hofmann
Geburtsdatum/-ort: 24.03.1976, Nürnberg
Wohnsitz: Erdinger Str. 27b, 85356 Freising

Schulische Ausbildung

09/82 – 07/86 Grundschule Stein-Oberweiherbuch
09/86 – 06/95 naturwissenschaftliches Gymnasium Stein
Allgemeine Hochschulreife, 30.06.1995

Akademische Ausbildung

10/96 – 09/98 Grundstudium Lebensmittelchemie
Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main
Vordiplom Chemie und Botanik, 28.09.1998
10/98 – 10/00 Hauptstudium Lebensmittelchemie
Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main
Erstes Staatsexamen, 06.10.2000
11/01 Abschluß des Studiums als staatl. geprüfter Lebensmittelchemiker
Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker Teil B, 30.11.2001
seit 05/02 Promotion an der TU München am Lehrstuhl Chemie der
Biopolymere bei Prof. Dr. D. Langosch

Sonstige Tätigkeiten

07/95 – 04/96 Wehrdienst an der Fernmeldeschule Feldafing bei Starnberg
06/96 – 09/96 Praktikum Siemens AG, Nürnberg
11/00 – 04/01 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Produktbereich Enterale Ernährung
Labor instrumentelle Analytik, Schwerpunkt Methodvalidierung;
Labore für Rohstoffkontrolle, Mikrobiologie und Endkontrolle
05/01 – 10/01 Staatliches Untersuchungsamt Hessen, Gießen
12/01 – 01/02 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Produktbereich Enterale Ernährung
Labor instrumentelle Analytik, Schwerpunkt Methodvalidierung