

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Funktion und Helixdynamik membranfusogener Peptide

Bernhard Christian Poschner

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Frischmann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. B. Küster

Die Dissertation wurde am 09.09.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.11.2008 angenommen.

"In der Wissenschaft geht es im Wesentlichen nicht um einen komplizierten mathematischen Formalismus oder eine ritualisierte Abfolge von Experimenten. Viel eher liegt ihr eine Art gewitzte Aufrichtigkeit am Herzen, die dem Bedürfnis entspringt, wirklich wissen zu wollen, was zum Teufel eigentlich los ist!"

Saul-Paul Sirag

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, welche zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für das Bereitstellen des Projekts sowie das Begleiten dieser Arbeit durch Diskussionen, Anregungen und Ideen. Ein wesentlicher Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit wurde mir durch die mir eingeräumten forschersichen Freiheiten zu Teil.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster für die Tätigkeit als Zweitgutachter und Herrn Prof. Dr. Dimitrij Frishman für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Konrad Fischer und Stefan Quint für die gute Zusammenarbeit während ihrer Masterarbeit.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen Diskussionen und Anregungen.

Dr. Markus Gütlich und Walter Stelzer für deren fachlich kompetente und technische Unterstützung.

Frau Nicole Dennhart für ihren besonderen Ehrgeiz meine Probleme zu lösen und den Arbeitsalltag angenehm zu gestalten.

Meinen Freunden Dr. Mathias Hofmann, Dr. Hande Sarikaya, Dr. Holger Stalz, Frau Sylvia Große und Dr. Eric Lindner für die Möglichkeit alles diskutieren zu können oder von allem abgelenkt zu werden.

Meiner Familie für die jahrelange und andauernde Unterstützung in all meinen Vorhaben.

Und Maria.

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Die Struktur von Peptiden und Proteinen.....	2
1.1.1 Die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden	2
1.1.2 Konformationelle Dynamik von Proteinen und Peptiden	7
1.2 Biologische Membranen und Membranfusion	8
1.2.1 Die Fusion von Membranen.....	9
1.2.2 Fusogene Proteine in der biologischen Membranfusion	11
1.2.3 Struktur- / Funktionsbeziehung von SNARE-Proteinen	11
1.3 Rolle der Transmembrandomänen (TMD) fusogener Proteine.....	14
1.4 Methoden der Strukturaufklärung von Peptiden	18
1.4.1 Zirkular Dichroismus Spektroskopie	19
1.4.2 Massenspektrometrie.....	21
1.4.3 Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion	23
2 Ziel der Arbeit	29
3 Materialien und Methoden.....	30
3.1 Materialien.....	30
3.2 Geräte	31
3.3 Methoden.....	32
3.3.1 Peptidlösungen.....	32
3.3.2 Aufreinigung der Peptide	32
3.3.3 Herstellung kleiner unilamellarer Liposomen (SUV's)	33
3.3.4 Fusionskinetik	34
3.3.5 Zirkular Dichroismus	35
3.3.6 Bestimmung des P/L-Verhältnisses	36
3.3.7 Deuterium/Wasserstoff-Austauschreaktionen.....	37
3.3.8 Kinetische Analyse der Austauschreaktionen	40
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Entwicklung des Zirkular Dichroismus-CDNN/PEPFIT Algorithmus	43
4.2 Synthetische Modellpeptide	46
4.3 Struktur-Eigenschaften der aliphatischen Varianten	48
4.3.1 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der aliphatischen Varianten	48
4.3.2 D/H-Austausch und Helixdynamik der aliphatischen Varianten	50
4.3.3 Induzierte Fusion der aliphatischen Varianten.....	61
4.4 Funktion und Struktur-Eigenschaften der unregelmäßigen Varianten	62
4.4.1 Fusion der unregelmäßigen Varianten	63
4.4.2 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der unregelmäßigen Varianten ..	64

4.4.3	D/H-Austausch und Helixdynamik der unregelmäßigen Varianten.....	66
4.4.4	Lokalisierung der Austausch-Orte in den unregelmäßigen Varianten	72
4.5	Struktur-Eigenschaften der Glycin/Prolin-Varianten	74
4.5.1	Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Glycin/Prolin-Varianten	74
4.5.2	D/H-Austausch und Helixdynamik der Glycin/Prolin-Varianten	76
4.6	Struktur-Eigenschaften der Histidin-Varianten	79
4.6.1	Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Histidin-Varianten	80
4.6.2	D/H-Austausch und Helixdynamik der Histidin-Varianten	81
4.7	Struktur-Eigenschaften der Längen-Varianten	87
4.7.1	Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Längen-Variantenr	87
4.8	Funktion und Struktur-Eigenschaften der acylierten Varianten	89
4.8.1	Fusion der acylierten Varianten	89
4.8.2	Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der acylierten Varianten.....	91
4.8.3	D/H-Austausch und Helixdynamik der acylierten Varianten.....	93
5	Diskussion	96
5.1	Die Helixdynamik kurzer Modellpeptide	96
5.2	Rolle der hydrophoben Kernsequenz	96
5.2.1	Die Dynamik der aliphatischen Peptid-Varianten.....	97
5.2.2	Der Einfluss von Glycin und Prolin auf die Helixdynamik	101
5.2.3	Die Helixdynamik lokaler Peptid-Domänen	103
5.3	Die Rolle der flankierenden Regionen der Peptide	107
5.3.1	Der Effekt der flankierenden Aminosäuren	107
5.3.2	Der Einfluss N-terminaler Acylketten.....	109
5.4	Wasserstoff/Deuterium-Austausch in Liposomen.....	110
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	111
6	Literaturverzeichnis	114
	Abbildungsverzeichnis	124
	Abkürzungen	127
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	129
	Lebenslauf.....	130

Zusammenfassung

Die Fusion von biologischen Membranen in eukaryotischen Organismen wird durch integrale Fusionsproteine vermittelt. In einer Vielzahl von Arbeiten wurde demonstriert, dass besonders den Transmembrandomänen (TMD) dieser Fusionsproteine eine bedeutende Rolle für den Vorgang der Membranfusion zukommt. Es wurde gezeigt, dass Peptide, welche der TMD von Fusionsproteinen entsprechen oder synthetische Modellpeptide, *in vitro* die Fusion von Liposomen bewirken können.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die strukturelle Charakterisierung von synthetischen TMD-Peptiden im Vergleich mit ihrer Fusogenität. Basierend auf hydrophoben Aminosäuren mit unterschiedlicher Sekundärstrukturpräferenz wurde die konformationelle Flexibilität und Helixdynamik synthetischer TMD-Peptide ermittelt. Es zeigte sich, dass die Konformation und Dynamik der helikalen Peptide von der Zusammensetzung aus β -Faltblatt begünstigenden Valin- und α -Helix favorisierenden Leucinresten abhängig war. Eine nicht fusogene Oligo-Leucin-Sequenz bildete eine stabile helikale Konformation, während eine fusogene Leucin/Valin-Sequenz ein Maximum an Helixdynamik unter Beibehaltung einer helikalen Struktur innerhalb von Membranen aufwies. Das Einfügen von Glycin und Prolin, welche als α -Helix-Brecher bekannt sind, auf die Sequenz aus alternierende Leucin- und Valinresten maximierte die Dynamik der α -Helix in Lösung, führte jedoch innerhalb der liposomalen Membran zu einer β -Faltblatt-Struktur. Dadurch war die Fusion durch diese Peptide mechanistisch nicht mit den helikalen Peptiden zu vergleichen und ähnelt möglicherweise eher der durch amphipatische Peptide. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch regionales Einbringen von Blöcken aus Valin auf einen Leucin-Hintergrund die Flexibilität einer helikalen Konformation regional gesteuert wurde. Dies legte zudem offen, dass den terminalen Bereichen hydrophober Peptide eine spezielle Bedeutung für den Vorgang der Membranfusion zukommt. Untersuchungen der basischen, flankierenden Aminosäuren zeigten, dass nicht die Helixdynamik, wohl aber deren konformationelle Flexibilität durch die Ladung der jeweiligen Aminosäure beeinflusst wird. Dies weist auf eine erhöhte Interaktion der Peptide in ungeladenem Zustand hin, welche in polarem Medium eine Umfaltung der α -Helix zum β -Faltblatt begünstigt. In membranintegriertem Zustand wirken sich die positiv geladenen, flankierenden Aminosäuren vermutlich über eine elektrostatische Interaktion mit der Phosphat-Gruppe der Lipide auf die Membranfusion aus. N-terminal an die Peptide gekoppelte Acylketten zeigte ebenso keinen Effekt auf die Helixdynamik der Peptide. Eine verminderte Tendenz zur kooperativen Entfaltung sowie ein Arrest in der Hemifusion deuteten hier auf eine gestörte Peptid/Peptid-Interaktion hin.

Die Dynamik der helikalen Konformation von TMD-Peptiden stellt somit eine strukturelle Voraussetzung für deren fusogene Wirkung dar. Terminal flexible Peptide, gekoppelt mit einer potentiellen Ladungsinteraktion zwischen den basischen flankierenden Aminosäuren und den Phosphat-Gruppen der Phospholipide der Membran, scheinen die Restrukturierung der Lipiddoppelschicht während der Fusion zu ermöglichen.

1 Einleitung

1.1 Die Struktur von Peptiden und Proteinen

Peptide sind makromolekulare, biologische Strukturen, welche sich aus verschiedenen Aminosäuren zusammensetzen. 20 Aminosäuren werden als kanonisch (genkodiert) bezeichnet und kommen am häufigsten in der Natur vor. Sie werden genkodiert in Organismen zu Proteinen aufgebaut und können weiter modifiziert werden. Primär wird die Struktur von Peptiden und Proteinen durch die Abfolge der einzelnen Aminosäuren bestimmt.

In einem Protein sind die einzelnen Bausteine, die Aminosäuren, kovalent zu einer langen Polypeptid-Kette verknüpft. Unter Primärstruktur versteht man die Reihenfolge der Aminosäuren, d.h. die Aminosäuresequenz. Polypeptidketten können eine große Anzahl an Konformationen einnehmen, jedoch kann ein Peptid durch die Ausbildung von Wechselwirkungen nur in bestimmten Konformationen energetisch stabilisiert werden. Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der einzelnen Aminosäuren. Durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und dem Stickstoff der Amino-Gruppe von nicht direkt benachbarten Aminosäuren entstehen vorzugsweise zwei Sekundärstrukturen: die α -Helix und das β -Faltblatt. Helikale Abschnitte können mit Faltblatt-Strukturen abwechseln. Derartige Sekundärstrukturen sind meist durch Teilstücke, in denen die Polypeptid-Kette in unregelmäßigen Schleifen verläuft, verknüpft. Unter dem Begriff Tertiärstruktur versteht man die räumliche Anordnung der gesamten Polypeptid-Kette.

Eine Polypeptidkette nimmt im physiologischen Milieu eine, alleine durch die Aminosäuresequenz vorgegebene und für das jeweilige Protein charakteristische, räumliche Struktur an, die wiederum die funktionellen Eigenschaften des Proteins entscheidend mitbestimmt [1].

1.1.1 Die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden

Linus Pauling und Robert Corey untersuchten in den späten dreißiger Jahren mit röntgenkristallografischen Methoden erstmalig die genaue Struktur von Aminosäuren [2]. Ihr Ziel war es, Bindungslängen und Bindungswinkel dieser Proteinbausteine zu bestimmen, um so Voraussagen über die Konformation eines Proteins treffen zu können. Zunächst postulierten sie, dass die Peptideinheit starr und planar ist. Eine freie Rotation um die Bindung zwischen dem Carbonyl-C-Atom und dem Stickstoff-Atom ist nicht möglich, da diese Bindung partiellen Doppelbindungscharakter besitzt. Der Torsionswinkel um die Peptidbindung liegt aufgrund der Planarität bei ca. 180° und wird mit dem

Buchstaben ω bezeichnet. ϕ beschreibt den Torsionswinkel der C_{α} -N-Einfachbindung, ψ bezeichnet den Torsionswinkel der C_{α} -C-Einfachbindung (Abb. 1).

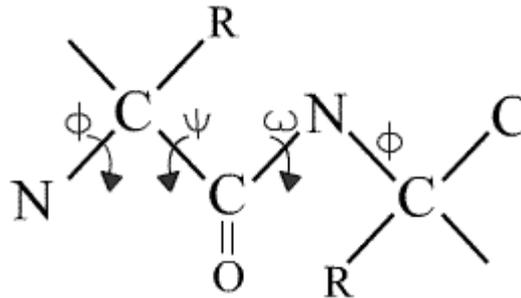


Abb. 1: Die Torsionswinkel am Peptidrückgrat. Der Winkel ω beträgt aufgrund der Starrheit der Peptidbindung ca. 180° . ϕ - und ψ -Winkel dagegen können innerhalb begrenzter Kombinationen variieren und so definierte Konformationen bestimmen.

Die ϕ - und ψ -Winkel können verschiedene Werte annehmen, wodurch sich unterschiedliche Konformationen eines Proteins ergeben. Die beiden Sekundärstrukturen α -Helix und β -Faltblatt weisen ganz bestimmte, charakteristische ϕ/ψ -Kombinationen auf. ϕ und ψ können keine beliebigen Werte annehmen, da sich bei bestimmten Torsionswinkeln Atome im Peptid gegenseitig sterisch behindern würden. Im Ramachandran-Plot sind die zulässigen Kombinationen an ϕ - und ψ -Winkeln aufgezeigt. Es wird deutlich, dass die zugelassenen Kombinationen sehr begrenzt sind [3].

Bei einem β -Faltblatt ordnen sich Teile der Aminosäurekette längs, entweder parallel oder antiparallel, zueinander an. Die Struktur wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl- und Amino-Gruppen der nebeneinanderliegenden Ketten stabilisiert. Die Seitenketten der Aminosäuren ragen dabei abwechselnd nach beiden Seiten senkrecht aus der Faltblatt-Ebene.

Die α -Helix ist die am häufigsten vorkommende Sekundärstruktur in Proteinen. Ihre helikale Struktur resultiert aus intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonyl- und Amino-Gruppen des Peptidrückgrats, die sich fast parallel zur Achse der Helix ausbilden. Dabei bildet die Carbonyl-Gruppe der ersten (i -ten) Aminosäure eine Wasserstoffbrücke mit dem Wasserstoff-Atom der fünften ($i+4$ -ten) Aminosäure aus. Die Seitenketten der Aminosäuren weisen nach außen. α -Helices sind überwiegend rechtsgängig. Eine Windung wird von 3,6 Aminosäuren gebildet und die Ganghöhe beträgt 0,54 nm.

Die Stabilisierung der α -Helix-Konformation bedingt sich in der Hauptsache durch einen enthalpischen Beitrag ($\Delta H^\circ_{\text{res}}$), welcher durch die Bildung der Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats zustande kommt [4, 5]. Die Konformation des Zufallsknäuels wird dagegen im Vergleich zur α -Helix sehr stark durch die konformationelle Entropie ($\Delta S^\circ_{\text{res}}$) einer zufälligen Faltung begünstigt [6], da es entropisch ungünstig ist die Dihedralwinkel des Peptidrückgrats in einer α -Helix zu fixieren [5, 7]. Dadurch kann die Bildung einer α -Helix durch die Änderung der freien Energie ($\Delta G^\circ_{\text{res}}$) beschrieben werden [8]. Die Änderung der freien Energie ($\Delta G^\circ_{\text{res}}$) ist somit eine lineare Funktion aus $\Delta H^\circ_{\text{res}}$ und

$\Delta S_{\text{res}}^{\circ}$ und ist proportional zur Anzahl der Aminosäuren eines Peptids, weshalb die Ausbildung helikaler Strukturen in Abhängigkeit der Länge einer Peptidkette geschieht. Die Seitenketten der unterschiedlichen Aminosäuren beeinflussen sowohl $\Delta S_{\text{res}}^{\circ}$ als auch $\Delta H_{\text{res}}^{\circ}$ und entscheiden aufgrund der daraus resultierenden Änderung der freien Energie über die Bildung einer α -Helix.

Eine Poly-Alanin-Sequenz beispielsweise faltet sich in eine helikale Konformation, da die enthalpische Komponente der entropischen stark überwiegt. Umgekehrt ist die Zufallsknäuel-Konformation entropisch innerhalb einer Sequenz aus Glycin in wässrigem Medium stabilisiert. Dieser markante Unterschied wird in der Hauptsache durch eine Reduktion der möglichen ϕ/ψ -Winkel-Kombinationen im Vergleich zwischen Glycin- und Alaninseitenkette verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass dies vorwiegend durch den Einfluss der Alaninseitenkette auf die konformationelle Entropie des Peptidrückgrats im Zufallsknäuel bewirkt wird [9, 10]. Förderlich für die Bildung einer α -Helix ist zudem ein enthalpischer Beitrag zwischen C_{β} und dem Helix-Rückgrat, welcher bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin auftritt [11]. Der CH_3 -Gruppe des Alanins wird kein Verlust an konformationeller Entropie während der Faltung vom Zufallsknäuel zur α -Helix zuteil [9]. Diese Faktoren bestimmen demnach die hohe konformationelle Präferenz des Alanins und die niedrige Präferenz von Glycin α -helikale Strukturen auszubilden. Im Vergleich zu Alanin erfahren alle anderen Aminosäureseitenketten einen unterschiedlich ausgeprägten, negativen Einfluss ihrer konformationellen Entropie während der Bildung einer α -Helix, durch die Einschränkung ihrer Seitenkettenrotamere.

Aus Untersuchungen der konformationellen Entropie-Änderung zwischen Zufallsknäuel und helikaler Faltung, kann jeder Aminosäure ein energetischer Beitrag zur Bildung einer α -Helix zugeordnet werden. Damit kann auch die Wahrscheinlichkeit einer jeden Aminosäure sich innerhalb einer α -Helix zu befinden ausgedrückt werden (Abb. 2). Eine Vielzahl von Faktoren wie Lösungsmittel, Sequenzposition oder benachbarte Aminosäuren beeinflussen jedoch die jeweilige Präferenz einer Aminosäure einen Beitrag zur Bildung einer α -Helix zu leisten.

Amino acid	Helix propensity (kcal/mol)
Ala	0.00
Glu (0)	0.16
Leu	0.21
Met	0.24
Arg (+)	0.21
Lys (+)	0.26
Gln	0.39
Glu (-)	0.40
Ile	0.41
Asp (0)	0.43
Ser	0.50
Trp	0.49
Tyr	0.53
Phe	0.54
Val	0.61
Thr	0.66
His (0)	0.56
His (+)	0.66
Cys	0.68
Asn	0.65
Asp (-)	0.69
Gly	1.00
Pro	3.16

Abb. 2: Neigung der unterschiedlichen Aminosäuren sich in einer α -helikalen Faltung wiederzufinden. Es ist die mittlere Wahrscheinlichkeit in ΔG (kcal/mol) aus verschiedenen Untersuchungen angegeben. Die Werte spiegeln die unterschiedliche Präferenz der Aminosäuren eine α -helikale Faltung einzugehen wieder und sind als relative Energien im Vergleich zu Alanin (0 kcal/mol) und Glycin (1 kcal/mol) ausgedrückt [12]. Bei geladenen Aminosäuren wird die unterschiedliche Ladung der Seitenkette mit 0, -, + angegeben.

Leucin wird als starker Helix-Bildner betrachtet, was auch durch seine Häufigkeit in α -Helices innerhalb von Proteinen bestätigt wird [13]. Isoleucin und Valin dagegen sind schlechtere Helix-Bildner als Leucin. Bei den β -verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin ist die Bildung der α -Helix durch eine sterische Hinderung der Atome an der γ -Position mit dem Carbonylsauerstoff in der nächsten Windung der α -Helix erschwert. Die Seitenkette muss dabei einen weitgehend eingeschränkten Drehwinkel eingehen, so dass es entropisch für diese Aminosäuren sehr ungünstig ist sich innerhalb einer α -Helix zu befinden [9, 14, 15].

Der Aminosäure Prolin kommt eine Sonderstellung innerhalb der Bildung von α -Helices zu. Die Seitenkette der Aminosäure Prolin ist zum Amid seines Rückgrats zyklisiert, wodurch keine Möglichkeit zur Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke durch Prolin gegeben ist. Prolin kann somit keinen Beitrag zur direkten Stabilisierung einer α -Helix leisten. Die Zyklisierung der Seitenkette schränkt außerdem die möglichen Dihedralwinkel sehr stark ein, wodurch die Bildung einer α -Helix zusätzlich erschwert wird [16-18].

Bis heute konnten nicht alle Faktoren, welche die Neigung der verschiedenen Aminosäuren sich in bestimmten Sekundärstrukturen wiederzufinden beschreiben, erschöpfend geklärt werden. Es wurden jedoch einige Faktoren vorgeschlagen. Zu diesen zählen zum einen hydrophobe Wechselwirkungen,

welche hydrophobe Aminosäuren innerhalb einer α -Helix ausbilden [5, 19], zum anderen sterische Behinderungen von speziell langen Seitenketten innerhalb einer α -Helix [20]. Außerdem können auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten untereinander [21, 22] oder dem Makrodipol einer Helix [23, 24] auf die Stabilität einer α -Helix einwirken. Zusätzlich tragen van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Peptidrückgrat zur Stabilität einer Helix bei [25].

Tatsächlich entscheidend für die Bildung und Stabilität einer α -Helix ist jedoch das umgebende Medium. Die Stabilität einer α -Helix wird in wässrigem Medium durch einen kompetitiven Effekt der Wassermoleküle auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb des Peptidrückgrats beeinträchtigt. Dieser Effekt entfällt in apolaren organischen Lösungsmitteln, welche daher die intramolekularen Wasserstoffbrücken innerhalb einer α -Helix stärken und diese somit stabilisieren [26, 27]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Stabilität einer α -Helix einer bestimmten Peptidsequenz durch das Zusammenspiel ihrer intrinsischen Helix-Neigung und ihrer Hydrophobizität in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität definiert wird. Für Peptide, welche unterschiedliche hydrophobe Reste enthalten, konnte in 50 % Methanol eine abnehmende Helikalität in der Reihe Leucin > Isoleucin > Alanin > Valin beobachtet werden, während alle Peptide in 70 % Ethanol ähnlich helikal waren [28]. Dieser maßgebliche Effekt der Alkohole auf die Peptidstruktur entsteht durch die niedrige Polarität des Lösungsmittels. Diese Eigenschaft bewirkt eine Schwächung hydrophober Interaktionen und führt zu einer Verstärkung der elektrostatischen Interaktionen, wie z.B. Wasserstoffbrücken [29]. Für viele Untersuchungen wird der halogenierte Alkohol Trifluoroethanol (TFE) verwendet. Bei diesem Lösungsmittel wurde ein stark α -Helix-fördernder Effekt nachgewiesen. Anhand von Alanin-Modellpeptiden wurde gezeigt, dass in Mischungen aus Wasser und Alkohol mit zunehmender TFE-Konzentration die Stärke der vorhandenen Wasserstoffbrücken zunimmt, was wiederum die Stabilisierung der helikalen Peptidkonformation erklärt [30]. Unterschiede in der Helix-Stabilisierung zwischen wässrigen Lösungen, welche verschiedene Alkohole enthalten, können anhand eines additiven Effekts der vorliegenden CH-Gruppen und bei halogenierten Alkoholen anhand der Halogenanzahl erklärt werden. Diese Gruppen üben einen positiven Effekt auf die α -Helix-Stabilität aus, während die Hydroxyl-Gruppe der Alkohole einen destabilisierenden Einfluss hat [31]. Gleichzeitig kann in diesen Mischungen ein derartiger additiver Effekt die starke Stabilisierung einer α -Helix durch TFE nicht vollständig erklären. In diesem Zusammenhang wird eine verstärkte Clusterbildung der TFE-Moleküle diskutiert [32]. Dabei können micellenartige Cluster aus TFE-Molekülen in wässriger Lösung eine hydrophobe Mikroumgebung bilden und so lokal für eine niedrigere Polarität im Vergleich zur gesamten Lösung sorgen. Dadurch können Wasserstoffbrücken innerhalb von TFE-Micellen weiter verstärkt werden. Spezielle in Bereichen hydrophober Aminosäuren finden sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen derartige TFE-Cluster wieder. Die Bildung derartiger Cluster ist abhängig von der Größe des hydrophoben Anteils des jeweiligen Alkohols, sowie von der Anzahl an Halogenen [31-33]. Bei höheren Alkoholkonzentrationen kann keine Clusterbildung beobachtet werden, da Wassermoleküle,

welche notwendig sind die Micellen zu separieren und dadurch zu stabilisieren, fehlen [34]. Dagegen kann in höheren Alkoholkonzentrationen die niedrige Polarität der Mischung für die Stabilisierung von α -Helices verantwortlich gemacht werden. In Analogie zu halogenierten Alkoholen können SDS-Micellen ebenfalls helikale Strukturen stabilisieren [35].

Auch innerhalb einer Lipidmembran ist die Wahrscheinlichkeit einer Aminosäure, sich innerhalb einer helikalen Faltung wiederzufinden, erhöht. Ähnlich wie SDS-Micellen oder Alkohol-Cluster stellen Lipidmembranen eine lokale Umgebung sehr niedriger Polarität dar und tragen maßgeblich zur Stabilisierung einer α -Helix bei. Zu rund 60 % werden membrandurchspannende α -Helices aus den hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Alanin gebildet [36, 37]. Ein weiteres Merkmal membrandurchspannender helikaler Domänen ist ein erhöhter Anteil an β -verzweigten Aminosäuren [38], welcher insgesamt ca. 30 % beträgt. Besonders in den Transmembrandomänen der SNARE-Proteine konnte eine derartige Überrepräsentation festgestellt werden. Der Anteil beträgt hier bis zu 50 % [39]. Auch den Aminosäuren Glycin und Prolin kommt innerhalb von Lipidmembranen eine besondere Bedeutung bei der Betrachtung der Sekundärstruktur zu. Auch diese beiden Aminosäuren treten verstärkt in helikalen Transmembrandomänen auf, obwohl sie in Lösung als sehr starke Helixbrecher bekannt sind. Das Hüllprotein des Bakteriophagen M13 beispielsweise enthält innerhalb seiner Transmembrandomäne drei Glycine und neun β -verzweigte Aminosäuren. Dennoch weist diese Transmembrandomäne eine helikale Struktur auf [40]. Der Anhäufung von Prolin innerhalb von Transmembrandomänen wurde deshalb auch eine funktionelle Eigenschaft zugeordnet [41]. Innerhalb einer Membran wird eine α -Helix durch Prolin nur wenig destabilisiert, da seine Dihedralwinkel bereits sehr eingeschränkt sind und deshalb ein nur geringer entropischer Unterschied zum Zufallsknäuel besteht [17]. Dennoch kann Prolin aufgrund der fehlenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung als flexibles Gelenk innerhalb einer α -Helix dienen [42].

Der Umgebung von Aminosäuren kommt demnach eine wichtige Bedeutung für die Ausbildung von definierten Strukturen zu. Diese Umgebung kann dadurch auch maßgeblich die konformationelle Dynamik von Proteinen und Peptiden beeinflussen.

1.1.2 Konformationelle Dynamik von Proteinen und Peptiden

Wie alle Moleküle haben auch Proteine keine starren Strukturen sondern sind innerhalb gewisser Grenzen dynamische Gebilde. Durch ihren Aufbau wird bei Proteinen eine Vielfalt von dynamischen Konformationen erreicht. Dabei kann zwischen den Bewegungen von Proteindomänen („rigid body motions“), welche im Nanosekunden-Bereich ablaufen, den Fluktuationen innerhalb von Sekundärstrukturen, welche im Picosekunden-Bereich ablaufen, und atomaren Fluktuationen wie den Drehungen und Streckungen von Bindungen, welche im Femtosekunden-Bereich ablaufen, unterschieden werden.

Domänenbewegungen sind allgemein dadurch charakterisiert, dass die Torsion einiger weniger Aminosäuren die Tertiärstruktur signifikant verändern kann. Beispielsweise liegt bei einer ganzen Reihe von Enzymen das aktive Zentrum zwischen zwei Domänen des Proteins in einer Art Spalt, der sich schließt, wenn das Substrat oder das Coenzym gebunden wird. Zwei relativ starre Proteindomänen sind dabei über eine flexible Schleifenregion verbunden, welche diese Art der Moleküldynamik ermöglicht [43]. Die Konformationen einzelner Domänen ändern sich dabei wenig. Aus diesem Grund erfordern Domänenbewegungen nur wenig Energie [44]. Proteine in Lösung können deshalb häufig mehr als nur eine stabile Konformation einnehmen. Energetisch bedeutet dies, dass ein Protein mehrere Energieminima besitzt und so innerhalb physiologischer Bedingungen gleichzeitig verschiedene Konformationen vorliegen können.

Fluktuationen innerhalb von Sekundärstrukturelementen von Proteinen und Peptiden laufen wesentlich schneller ab als Domänenbewegungen. Diese Fluktuationen ändern die globale Konformation eines Proteins nur wenig und äußern sich in geringen ϕ/ψ -Winkeländerungen. Die Fluktuationen betreffen z.B. die NH-Gruppen im Protein-Rückgrat, die mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung treten und so zu einem transienten Öffnen von intramolekularen Wasserstoffbrücken führen. In der Hauptsache werden diese Fluktuationen von den jeweiligen Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren bestimmt. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben kommt in Abhängigkeit vom umgebenden Lösungsmittel jeder Aminosäure eine Neigung sich in einer bestimmten Sekundärstruktur wiederzufinden zu. Diese Neigungen definieren die Stabilität einer gewissen Sekundärstruktur. Damit definiert die Primärstruktur einer Peptidsequenz dessen Dynamik, während der Dynamik einer Peptidkette eine funktionelle Bedeutung zugeordnet werden kann, da in der Natur ein stabiles Energieminimum innerhalb einer Struktur einfacher zu erreichen wäre. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die konformationelle Flexibilität von membrandurchspannenden Peptiden mit deren fusogenem Potential verglichen werden. Ein Hinweis auf eine derartige Kausalität wurde bereits an Peptiden, welcher der Transmembrandomänen von SNARE-Proteinen entsprachen [39] und an de novo kreierte hydrophobe Modellpeptiden [45] demonstriert. Außerdem durch Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie an einem Valin-haltigen Sequenzabschnitt einer Transmembrandomäne gezeigt [46].

1.2 Biologische Membranen und Membranfusion

Die Natur hat mit der Ausbildung von Membranen die Voraussetzung zur Entwicklung des Lebens geschaffen. Membranen ermöglichen die Kompartimentierung in Organellen bzw. die Abgrenzung von Zellinnerem und -äußeren. Diese Kompartimentierung gewährleistet eine funktionelle und räumliche Aufteilung in hoch spezialisierte, membranumhüllte Reaktionsräume innerhalb eukaryotischer Zellen.

Membranen werden aus Lipiden, welche sich zu Lipiddoppelschichten zusammenschließen, gebildet. Membranlipide sind Moleküle, welche aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil

bestehen. Aufgrund dieser Eigenschaften bilden sich in wässriger Umgebung spontan geschlossene, bimolekulare Schichten aus. Einzig nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Lipidmolekülen stabilisieren und garantieren die Integrität dieser Membranen [47]. In biologische Membranen ist eine Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Aufgaben integriert. Singer und Nicolson haben in diesem Zusammenhang den Begriff des „Flüssig-Mosaik-Modells“ geprägt [48]. Dieser charakterisiert die Membran als zweidimensionale Flüssigkeit mit in ihr schwimmenden Proteinen. Diese herausragende Eigenschaft ermöglicht eine sehr schnelle laterale Diffusion sowohl der Lipide als auch der Membranproteine.

Die Lipidschichten der Membran bilden vor allem für polare Moleküle eine schwer durchdringbare Barriere. In biologischen Membranen sorgt eine Vielzahl an Proteinen dafür, gezielt die durch die Lipide geschaffene Barriere, zu durchbrechen. Man spricht im Zusammenspiel von Lipiden und Proteinen von der selektiven Permeabilität der Membran. Einige Kanalproteine sorgen beispielsweise für den Stofftransport durch die Membran.

Eine weitere herausragende Eigenschaft der biologischen Membranen ist es jedoch, miteinander zu verschmelzen ohne dabei ihre Integrität zu verlieren. Innerhalb von eukaryotischen Zellen wird die Versorgung verschiedenster Kompartimente durch einen koordinierten Vesikelfluss gewährleistet. Der Prozess der Membranfusion ermöglicht dabei den Austausch von Stoffen zweier Vesikel.

In vielen Transportvorgängen der Zelle spielt der Vorgang der Membranfusion eine entscheidende Rolle. So werden neu synthetisierte Lipide und Proteine von membranumhüllten Organellen durch Vesikel zu anderen Kompartimenten oder zur Plasmamembran transportiert und dort freigesetzt. Aber auch in extrazellulären Prozessen spielt die Membranfusion eine bedeutende Rolle. Als Beispiele seien hier genannt die Endozytose oder das Verschmelzen von Spermium und Eizelle. Auch das Eindringen eines membranumhüllten Virus in seine Wirtszelle erfordert die Fusion von Membranen.

1.2.1 Die Fusion von Membranen

Die Membranfusion spiegelt den Vorgang der Vermischung zweier Lipiddoppelschichten zu einer kontinuierlichen Membran wider. Der für die Bildung von Membranen verantwortliche hydrophobe Effekt [49] spielt auch für die Fusion eine entscheidende Rolle, da er während der Fusion die Integrität der Membranen garantiert. Für den Fusionsvorgang ist es notwendig, die Abstoßungskräfte, welche durch die Hydratisierung der Lipide zustande kommen, zu überwinden. Der Ablauf der Membranfusion ist noch nicht im Detail geklärt, dennoch scheinen Fusionsproteine dabei eine entscheidende Rolle zu spielen.

Während der Fusion werden aus physikalischen Gründen verschiedene Zwischenzustände durchlaufen [50-52]. Eine akzeptierte Modellvorstellung zur Membranfusion mit unterschiedlichen Zwischenzuständen wird durch die „Stalk“-Hypothese beschrieben [53] (Abb. 3). Dabei müssen sich

zwei Membranen annähern und die Abstoßung der hydratisierten Lipidschichten überwinden. Kommt es zum Kontakt der beiden Membranen, können, durch die entstehenden lokalen Störungen der Struktur, die proximalen Schichten miteinander verschmelzen. Die entstehende Struktur wird als „Stalk“ bezeichnet. Kommt es zur lateralen Expansion des „Stalks“ so wird dieser Zustand als Hemifusion bezeichnet. Reißt dieser instabile Zwischenzustand auf, erfolgt die Bildung einer Fusionspore, welche zur Vermischung der distalen Schichten der beiden Membranen führt und am Ende die Fusion zweier Vesikel komplettiert [50, 54, 55].

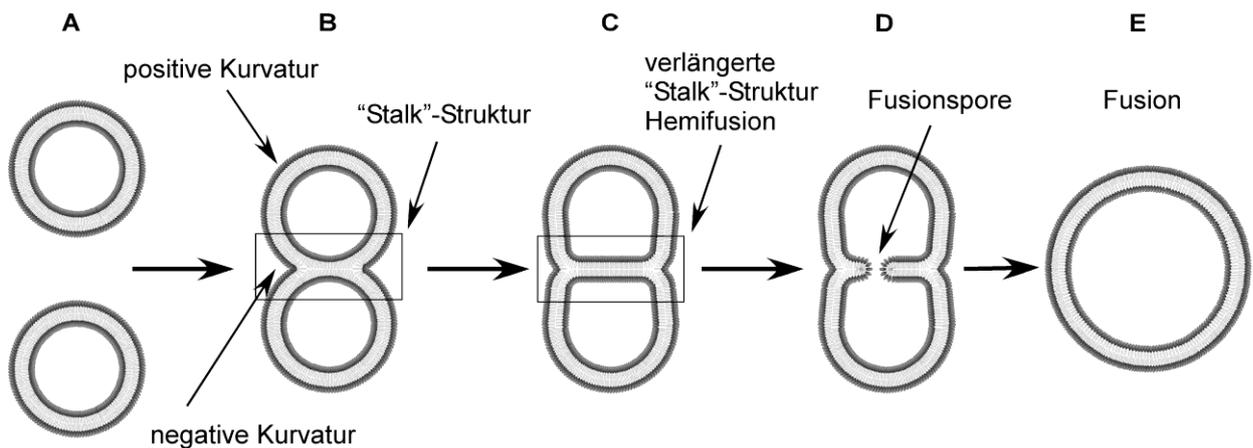


Abb. 3: Übergangszustände der Membranfusion nach der „Stalk-Hypothese“. Zwei getrennte Membranen (A) nähern sich an und treten in Kontakt. Zuerst kommt es zur Vermischung der proximalen Lipidschichten, wodurch eine „Stalk-Struktur“ entsteht (B). Dabei entsteht eine stark gekrümmte Membran und die Lipide der proximalen Schichten müssen eine negative Krümmung eingehen. Durch Expansion der „Stalk-Struktur“ entsteht eine größere Kontaktfläche und bildet den Hemifusionszustand (C). Diese Struktur zerreißt schließlich, so dass es zur Bildung einer Fusionspore (D) und im Folgenden zur kompletten Fusion und Vermischung der distalen Schichten kommt (E). Abbildung verändert nach [56].

Aus Röntgenstrukturanalysen [51, 53, 55] und Energieberechnungen [57, 58] ergeben sich klare Hinweise auf die Existenz der „Stalk“-Strukturen und damit den Hemifusionszustand.

Beim Durchlaufen des Fusionsprozesses müssen die Lipidschichten verschiedene Krümmungen einnehmen. Diese werden durch den flüssigen Phasenzustand der Lipide ermöglicht. In einem kugelförmigen Vesikel bildet die äußere Lipidschicht dabei eine konvexe Wölbung aus, was als positive Krümmung bezeichnet wird. Die innere Lipidschicht dagegen besitzt eine konkave Wölbung oder negative Krümmung. Zum Erreichen des Hemifusionszustandes müssen jedoch die Lipide der äußeren Lipidschicht eine energetisch ungünstige negative Krümmung eingehen. Die intrinsische Struktur der Lipide kann verschiedene Krümmungen begünstigen und dadurch die Membran in ihren Übergangszuständen stabilisieren. Aufgrund des räumlichen Ausmaßes ihrer Kopfgruppe und der Acylketten können verschiedene Lipide eine negative oder positive Krümmung stabilisieren. Man spricht in diesem Zusammenhang von kegelförmigen (stabilisieren eine negative Krümmung) oder invertiert kegelförmigen (stabilisieren eine positive Krümmung) Lipiden. Die Lipidzusammensetzung kann somit direkt einen Einfluss auf die Fusion von Membranen ausüben [59, 60].

1.2.2 Fusogene Proteine in der biologischen Membranfusion

Für die Rolle und Funktionsweise von Fusionsproteinen gibt es verschiedene Hypothesen. Die erste Hypothese besagt, dass Proteine lediglich die Aktivierungsenergie für die Fusion herabsetzen. Einer anderen Hypothese zufolge, interagieren Proteine direkt mit Lipiden und helfen die nötigen Übergangszustände der Membranfusion zu stabilisieren.

Der Vorgang der Membranfusion kann in einer Vielzahl von Prozessen eukaryotischer Zellen gefunden werden. Als sehr wichtige und gut erforschte Vorgänge wären hier nur zu nennen: (a) die extrazelluläre Fusion eukaryotischer Zellen, wie sie z.B. bei der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium auftritt [47]. (b) die Fusion viraler Membranen mit der Plasmamembran oder der endosomalen Membran einer Wirtszelle, wie sie z.B. bei den Influenza Viren und den Humanen Immundefizienz Viren (HIV) vorkommt [61-63]. (c) intrazelluläre Fusionsvorgänge, wie die Fusion von Transportvesikeln mit der Membran von Organellen, oder auch sekretorische Prozesse, wie die Fusion von präsynaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran und der damit verbundenen Exozytose von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt bei der neuronalen Reizweiterleitung [64, 65].

Die Gesamtheit der intrazellulären Fusionen laufen nach ähnlichen Mechanismen unter Beteiligung hoch konservierter Proteine ab. Zu nennen sind hier die Familie der SNARE-(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) Proteine, die Rab-Proteine, welche der Familie der Ras-GTPasen angehören, und die SM-(Sec1/Munc18) Proteine. Den letztgenannten Protein-Familien wird eine regulatorische Funktion bezüglich der SNARE-Proteine zugeschrieben.

Angesichts einer großen Vielfalt an Fusionsvorgängen, die sich in ihrer Funktion wesentlich unterscheiden, jedoch ähnlichen Mechanismen unterliegen, sollen hier lediglich einige intrazelluläre Fusionsvorgänge, welche durch SNARE-Proteine vermittelt werden, näher betrachtet werden.

1.2.3 Struktur- / Funktionsbeziehung von SNARE-Proteinen

SNARE-Proteine sind kleine (12 kDa - 35 kDa) Membranproteine, welche in allen eukaryotischen Organismen vertreten sind. SNARE-Proteine besitzen üblicherweise einen Membrananker. Das charakteristische Merkmal aller Mitglieder dieser Protein-Familie ist ein ca. 60 Aminosäuren langer, konservierter Abschnitt, welcher als SNARE-Motiv bezeichnet wird. Jeweils vier SNARE-Domänen lagern sich zu einem SNARE-Komplex zusammen, dessen Bildung als die Triebkraft des Fusionsprozesses angesehen wird [66, 67].

Die ursprüngliche Klassifizierung der SNARE-Proteine erfolgte aufgrund ihrer Lokalisierung. Entsprechend wurden die SNARE-Proteine der Vesikelmembran als v-(vesicular) und die Proteine der Zielmembran als t-(target) SNAREs bezeichnet [68, 69]. Es zeigte sich jedoch, dass diese Klassifizierung nicht ausreichend war, da auch gleichartige Vesikel miteinander fusionieren können. In einer

Klassifizierung auf struktureller Basis werden SNARE-Proteine daher nach konservierten Glutamin-(Q) Resten und Arginin-(R) Resten in Q- und R-SNAREs unterteilt [70].

Am besten untersucht sind die SNARE-Proteine, welche an der Exozytose synaptischer Vesikel in Neuronen beteiligt sind. Dabei ist das SNARE-Protein Synaptobrevin 2 (Syb) mit der Membran der synaptischen Vesikel assoziiert, während sich die Proteine Syntaxin 1a (Syx) und SNAP-25 an der Plasmamembran befinden. Synaptobrevin und Syntaxin besitzen C-terminal jeweils eine einzelne Transmembrandomäne (TMD), an welche sich das SNARE-Motiv anschließt. SNAP-25 dagegen ist durch palmitoylierte Cystein-Reste in der Membran verankert. Während Syx und Syb jeweils ein SNARE-Motiv besitzen, trägt SNAP-25 zwei dieser Motive. Die vier SNARE-Domänen dieser drei Proteine lagern sich zu einer stabilen „coiled-coil“-Struktur zusammen, welche aus vier verwundenen, parallel angeordneten α -Helices besteht [71]. Die Bildung dieses stabilen, ternären Komplexes ist von starken Konformationsänderungen der einzeln relativ unstrukturierten SNARE-Proteine begleitet [66]. Die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes zeigt, dass sich im Inneren des parallelen Helix-Bündels senkrecht zur Achse ausgerichtete Ebenen aus Aminosäureseitenketten befinden, welche die Kontaktflächen der Helices darstellen. Diese Kontaktflächen werden größtenteils durch apolare Reste gebildet. Im Zentrum des Helix-Bündels befindet sich jedoch eine Interaktionsebene die aus den hydrophilen Aminosäuren Arginin (R) und Glutamin (Q) aufgebaut ist (Abb. 4). Drei der Helices tragen je ein Glutamin und eine Helix ein Arginin bei. Aufgrund dieser zentralen hoch konservierten Aminosäuren erfolgte die oben erwähnte Klassifizierung in Q-SNAREs und R-SNAREs.

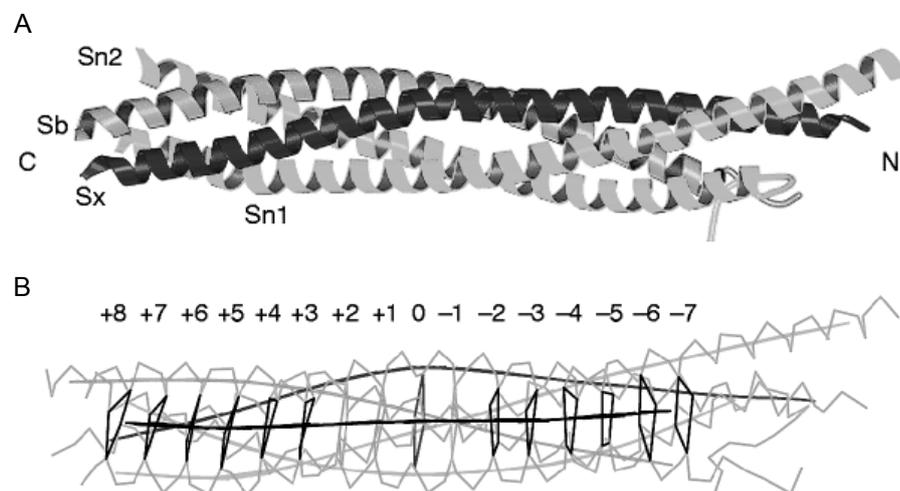


Abb. 4: Struktur des SNARE-Komplexes [71]. A. Die Termini der Helices sind jeweils mit C und N markiert. Das Helixbündel des neuronalen SNARE-Komplexes besteht aus den Helices der SNARE-Proteine Synaptobrevin 2 (Sb) und Syntaxin 1A (Sx). SNAP-25 trägt 2 Helices (Sn1 und Sn2) zum Bündel bei. B. Die parallelen Interaktionsebenen des SNARE-Komplexes. Die zentrale, hydrophile Interaktionsebene aus Glutamin und Arginin ist mit Position 0 bezeichnet.

Die Assemblierung des SNARE-Komplexes läuft *in vitro* sehr langsam ab. Die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt dagegen ist ein sehr schneller Prozess. Die Ursache für die langsame Assemblierung *in vitro* ist vor allem der N-terminale Bereich von Syntaxin, welcher eine

regulatorische Funktion einnimmt [72]. Dieser Bereich bildet eine Domäne aus drei α -Helices und kann mit dem SNARE-Motiv von Syntaxin interagieren. Nur wenn das SNARE-Motiv von Syntaxin nicht mit seiner eigenen N-terminalen Domäne assembliert ist, kann ein SNARE-Komplex mit den anderen SNARE-Proteinen gebildet werden [73]. Das Entfernen dieser N-terminalen Domäne von Syntaxin konnte die Assemblierung des SNARE-Komplexes *in vitro* deutlich beschleunigen.

Neben der N-terminalen Domäne von Syntaxin nehmen *in vivo* viele weitere Proteine regulatorische Funktionen für die Bildung des SNARE-Komplexes ein. Die Tatsache der hohen Konservierung der SNARE-Motive und experimentelle Befunde legen nahe, dass die Assemblierung des SNARE-Komplexes die wesentliche Triebkraft für die Initiation der Fusion von Membranen darstellt, während Selektivität durch zusätzliche Faktoren erreicht wird. So konnte gezeigt werden, dass SNARE-Proteine eines Komplexes durch andere SNARE-Proteine ersetzt werden können ohne dabei die Geschwindigkeit oder Stabilität des SNARE-Komplexes zu beeinträchtigen [74].

Die Fusion von Membranen lässt sich grundsätzlich in drei Schritte unterteilen. Die zu fusionierenden Membranen müssen zunächst zusammengebracht werden („priming“). Danach muss ein zeitlich stabiler Kontakt zwischen diesen Membranen hergestellt werden („docking“), um im nächsten Schritt die eigentliche Fusion der Membranen zu ermöglichen („fusion“).

Abb. 5 beschreibt den hypothetischen Mechanismus der SNARE-vermittelten Membranfusion [75]. Vor Beginn des Fusionsereignisses sind alle SNARE-Proteine ungebunden. Das SNARE Protein Syntaxin liegt in seiner „geschlossenen Form“ vor, sein aus drei α -Helices bestehender N-Terminus bindet an das eigene SNARE-Motiv. Kommt es zum Öffnen dieses Komplexes kann Syntaxin einen binären Komplex mit SNAP-25 eingehen. An diesen binären Komplex lagert sich dann das vesikuläre Synaptobrevin an. Die Bildung des SNARE-Komplexes beginnt dabei an den N-Termini der vier SNARE-Domänen („nucleation“) und schreitet entlang der parallel angeordneten SNARE-Domänen zu den C-terminalen Transmembrandomänen voran („zippering“). Dadurch kommt es zur Ausbildung von trans-SNARE-Komplexen, welche die beiden gegenüberliegenden Membranen überbrücken [76]. Durch das Voranschreiten der Komplexbildung Richtung C-terminaler Bereiche werden die beiden Membranen nach dem Reißverschlussverfahren zusammengezogen. Es kommt zur Überwindung der durch die Hydratisierung der Phospholipide hervorgerufenen Membranabstoßung. Danach erfolgt im Übergang vom trans- zum cis-SNARE-Komplex die Fusion der Membranen. Als Triebkraft für die initialen Schritte der Fusion wird die bei der Ausbildung der helikalen Strukturen freigesetzte Energie gesehen [77]. Damit die einzelnen SNARE-Proteine für weitere Fusionsereignisse zur Verfügung stehen, muss der cis-Komplex wieder getrennt werden. Dies erfolgt durch die ATPase NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) in Zusammenspiel mit ihrem Cofaktor α -SNAP (soluble NSF-attachment protein). Die Hydrolyse von ATP durch NSF sorgt schließlich für die Disassemblierung des SNARE-Komplexes. Die freien SNARE-Proteine können anschließend zu ihrem ursprünglichen Kompartiment zurücktransportiert werden (v-SNAREs) und für weitere Fusionsrunden kompetent gemacht werden (t-SNAREs).

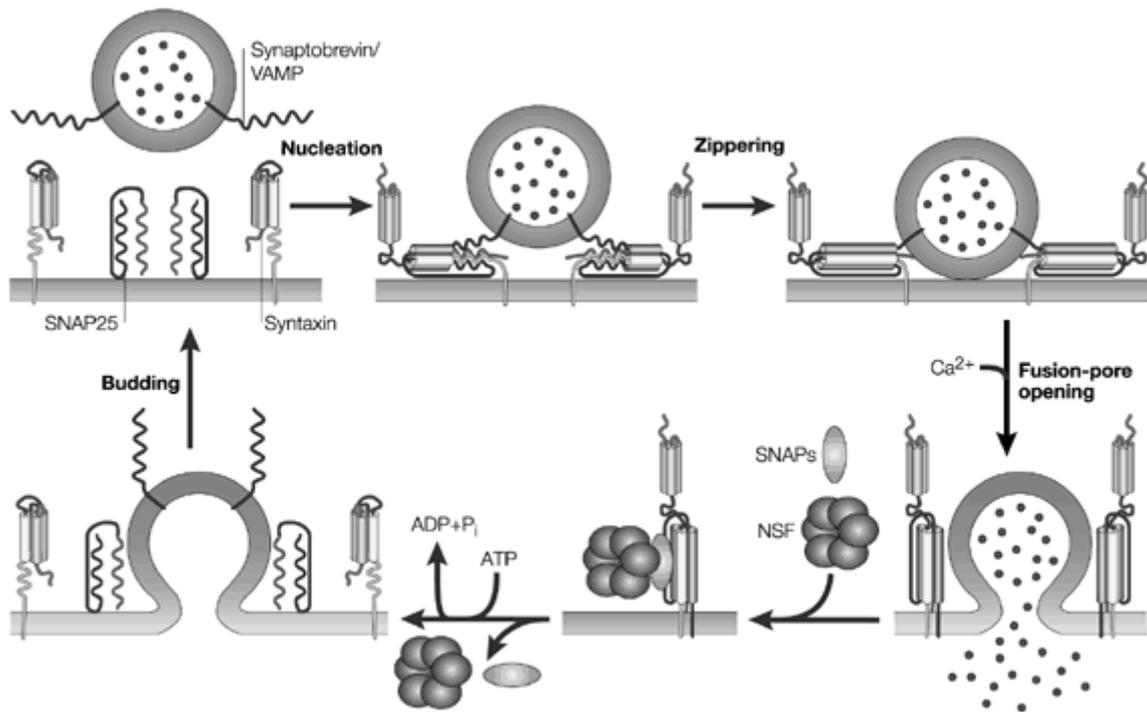


Abb. 5: Der hypothetische Mechanismus der Membranfusion [75]. Syntaxin muss von einer „geschlossenen Konformation“ in eine „geöffnete Konformation“ wechseln. Dadurch kann die Assemblierung des SNARE-Komplexes N-terminal an den SNARE-Proteinen Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP-25 beginnen („nucleation“). Die sukzessive Bildung des SNARE-Komplexes („zippering“) bringt die Membranen in räumliche Nähe. Durch Übergang eines trans-SNARE-Komplexes in einen cis-SNARE-Komplex kann die Fusion vollendet werden. Nach der Fusion muss der cis-SNARE-Komplex unter Aufwendung metabolischer Energie und der Hilfe der Proteine NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) und α -SNAP (soluble NSF-attachment protein) wieder getrennt werden, um für weitere Fusionsereignisse zur Verfügung zu stehen.

Der Vorgang der Membranfusion selbst benötigt keine metabolische Energie in Form von ATP. Lediglich die Disassemblierung des relaxierten cis-Komplexes erfordert Energie. Damit ist die im SNARE-trans-Komplex gespeicherte Konformationsenergie ausreichend, um die Fusion von Membranen zu initiieren.

Des Weiteren kann in der finalen Struktur des cis-SNARE-Komplexes eine Kollokalisierung der Transmembrandomänen der SNARE-Proteine festgestellt werden [71, 78]. Die Rolle der Transmembrandomänen wird vor allem bei der Diskussion von Übergangszuständen der Membranfusion erörtert [50].

1.3 Rolle der Transmembrandomänen (TMD) fusogener Proteine

Obwohl der exakte Ablauf der Membranfusion und die treibenden Kräfte für diesen Vorgang noch nicht geklärt werden konnten, wurde eine große Anzahl an Einflüssen auf die Verschmelzung von Lipidmembranen detailliert charakterisiert. Nachdem in den vorangehenden Kapiteln auf die Hypothesen

bezüglich der Funktion der löslichen Domänen der Fusionsproteine und auch auf die Rolle der Lipide eingegangen wurde, soll im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf die Rolle der Transmembrandomänen fusogener Proteine gerichtet werden.

Die Frage, welche sich an dieser Stelle stellt, ist wie Proteine und Lipide miteinander interagieren um den Vorgang der Membranfusion zu ermöglichen. Diese Fragestellung deutet auf eine funktionelle Rolle der membrandurchspannenden Domänen fusogener Proteine hin.

Eine Vielzahl von Arbeiten hat sich mit der Rolle der Transmembrandomänen beschäftigt. Dabei wurde auf klassische Weise die Transmembrandomäne verschiedener Fusionsproteine beeinflusst und die jeweiligen Auswirkungen auf die Fusionsreaktion selbst bzw. die jeweiligen Stadien der Fusion bestimmt.

Aus der Konsequenz ihrer Membranintegration ist ein Mitwirken der Transmembrandomänen bei dem ersten Schritt der Fusion sehr unwahrscheinlich und wurde bisher nicht gezeigt. Desweiteren wurde, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, gezeigt, dass die löslichen Domänen der Fusionsproteine eine entscheidende Auswirkung auf den initialen Schritt der Fusion (das Überwinden der Membranabstoßung durch die Hydratisierung der Lipide) haben.

Die Hypothese von intermediären Strukturen während der Membranfusion ist weitestgehend akzeptiert und wird durch viele Hinweise bekräftigt [79, 80]. Arbeiten, welche sich mit Untersuchungen der Transmembrandomänen fusogener Proteine beschäftigen, lieferten sowohl Hinweise bezüglich des Einflusses der membrandurchspannenden Helices auf die Fusion als auch auf die Existenz der angesprochenen Zwischenzustände. Beispielsweise zeigten Fusogenitätsdaten von Influenza Hämagglutinin (HA) dessen Transmembrandomäne durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker ersetzt wurde, dass es zu einer Vermischung der Lipidschichten und zur Ausbildung einer kleinen Fusionspore kam. Die Vervollendung des Fusionsvorganges und das Vermischen der Inhalte der zu fusionierenden Vesikel konnte jedoch nicht erreicht werden [81, 82]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Mutanten von Hämagglutinin gezeigt, bei denen Punktmutationen in die TMD eingefügt wurden [83] oder die TMD verkürzt wurde [84]. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Untersuchungen der SNARE-Protein-vermittelten Fusion. Auch dort konnte gezeigt werden, dass der Zustand der Hemifusion einen tatsächlichen Zwischenschritt der Fusion darstellt. Bei SNARE-Proteinen aus der Hefe (Snc1 und Sso1) wurden die Transmembrandomänen durch Geranylgeranyl-Anker (C16) ersetzt. In vivo konnte festgestellt werden, dass die Exozytose blockiert wurde, während das Andocken der Vesikel und das Vermischen der proximalen Lipidschichten nicht durch das Ersetzen der Transmembrandomänen durch lipidartige Anker kompromittiert wurde [85]. Aus diesen und weiteren Ergebnissen wird deutlich, dass den Transmembrandomänen fusogener Proteine eine bedeutende funktionelle Rolle zukommt. Die löslichen Domänen fusogener Proteine scheinen alleine nicht ausreichend zu sein, die komplette Membranfusion zu bewirken. Vielmehr ist ein Zusammenspiel von löslichen Domänen und Transmembrandomänen notwendig Membranen zu fusionieren.

Nachdem eine Reihe von Beobachtungen eine funktionelle Rolle der Transmembrandomänen zeigen konnte, gilt es nun die mechanistischen Einflüsse der Transmembrandomänen auf die verschiedenen Stadien der Membranfusion zu klären.

Ein klarer Beweis, dass die Transmembrandomänen bei der Vermischung der äußeren Lipidschichten und der Bildung eines Hemifusionsintermediats beteiligt sind, fehlt bis jetzt. Dennoch ergaben sich Hinweise, welche zur Hypothese führten, dass Transmembrandomänen durch die Deformation von Lipidbilayern einen Beitrag zur Initiation der Fusion leisten könnten. Die lokale Krümmung der Membran könnte durch die Anwesenheit der Transmembrandomänen erhöht werden und, ähnlich der Beiträge von Lipiden verschiedener intrinsischer Krümmung, die Bildung einer „Stalk“-Struktur begünstigen [79, 80]. Ein derartiger Beitrag von Transmembrandomänen zur Fusion bedingt jedoch eine direkte Interaktion der Proteine mit den Membranlipiden. Transmembrandomänen von SNARE-Proteinen weisen in ihren flankierenden Regionen häufig positiv geladene Reste (Lysin und Arginin) auf [86]. Aus diesem Grund wäre sowohl eine Interaktion mit negativ geladenem Phosphatidylserin denkbar [87], wie auch mit der Phosphatgruppe der Phospholipide [88].

Neben einer direkten Interaktion der Proteine mit den Lipiden wird auch ein indirekter, mechanischer Einfluss der Proteine auf die Lipide diskutiert. Die strukturelle Dynamik der Transmembrandomänen könnte für eine mechanische Deformation der Membran sorgen und so die Initiation der Fusion erleichtern. Um in diesem Hinblick die Rolle der Transmembrandomänen näher zu charakterisieren, wurden Fusionsstudien *in vitro* an Liposomen durchgeführt. Dabei wurden synthetische Peptide verwendet, deren Sequenz der Transmembrandomäne von Fusionsproteinen entspricht. Das synthetische Peptid, welches der Transmembrandomäne des VSV (vesikulärer Stomatitis Virus) G-Proteins entspricht, zeigte ähnliche fusogene Eigenschaften wie das komplette Fusionsprotein [89, 90]. Auch Peptide, die der Sequenz der TMD synaptischer SNARE-Proteinen entsprachen, konnten *in vitro* die Fusion von Liposomen bewirken [39]. Diese Untersuchungen zeigten ebenso eine klare Sequenzabhängigkeit der peptidvermittelten Fusion. Punktmutationen, welche im kompletten VSV G-Protein die Fusion reduzierten [91], zeigten eine ähnliche Reduktion in der Fusogenität der Peptide in Liposomen. Weiterhin erwies sich eine Oligo-Leucin-Sequenz als nicht fusogen [90].

Ferner wurde durch Datenbankanalysen eine Überrepräsentation von β -verzweigten Aminosäuren Isoleucin und Valin in den Transmembrandomänen von SNARE-Proteinen [39] und eine Anhäufung von Isoleucin und Glycin in den Transmembrandomänen viraler Fusionsproteine festgestellt [91]. Es ist bekannt, dass β -verzweigte Aminosäuren die Bildung löslicher α -Helices stören [92]. Bei β -verzweigten Aminosäuren ist der Verlust an Entropie während der Bildung einer α -Helix höher, dadurch, dass die Freiheitsgrade der Seitenkette in der helikalen Konformation stärker eingeschränkt sind als in der β -Faltblatt-Konformation. Außerdem können sterische Behinderungen der Seitenketten mit dem Peptidrückgrat die helikale Konformation destabilisieren. Jedoch können in hydrophober Umgebung auch β -verzweigte Aminosäuren eine helikale Faltung eingehen [93], zusätzlich innerhalb einer helikalen Konformation für ein transientes, lokales Öffnen der α -Helix sorgen.

Folglich scheint ein Kriterium von Fusogenität nicht bloße Hydrophobizität zu sein. Vielmehr konnte Fusogenität mit der Stabilität der helikalen Konformation der Transmembranpeptide korreliert werden. Peptide, welche den Transmembrandomänen von SNARE-Proteinen entsprechen, zeigten in Lösung ein Gleichgewicht aus α -Helix und β -Faltblatt. Gleichzeitig zeigte sich, dass Mutationen, welche die Stabilität der helikalen Faltung erhöhten, die Fusogenität der Peptide verminderten [39].

Lokales und transientes Öffnen von Wasserstoffbrücken innerhalb des Peptidrückgrats einer membrandurchspannenden α -Helix wird als treibende Kraft für die Fusogenität eines Peptids diskutiert. Hinweise darauf wurden bereits anhand des SNARE-Proteins Sso1p erhalten [46]. Dort konnte eine hohe Dynamik eines valinhaltigen Sequenzabschnitts innerhalb der Transmembran-Helix gezeigt werden.

Diese Hypothese sollte mit Hilfe von synthetischen Modellpeptiden experimentell bestätigt werden [45]. Basierend auf hydrophoben Aminosäuren mit unterschiedlichen Sekundärstrukturpräferenzen wurde eine Reihe von TMD-Peptiden de novo kreiert. Diese Peptide wurden in Liposomen rekonstituiert und ihre fusogenen Eigenschaften ermittelt. Die Fusionswerte korrelierten mit dem Verhältnis von β -Faltblatt begünstigenden Valin- zu α -Helix favorisierenden Leucinresten. Es zeigte sich, dass eine Oligo-Leucin Sequenz nahezu keine Fusion von Liposomen bewirken konnte, während eine alternierende Sequenz aus Leucin und Valin ein deutliches Maß an Liposomenfusion erreichte (Abb. 6).

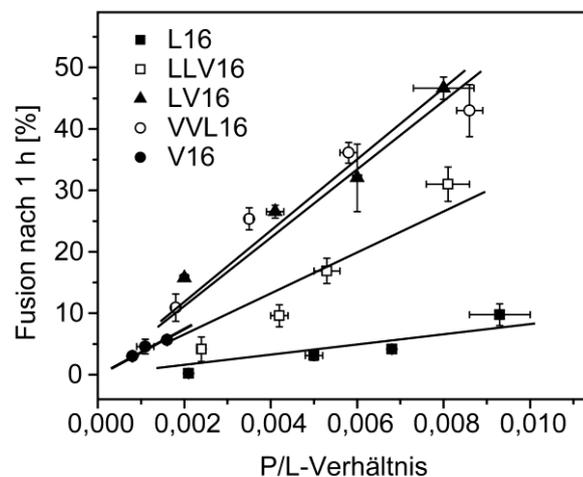


Abb. 6: Fusogenität von synthetischen Modellpeptiden mit hydrophoben Kernsequenzen aus Leucin und Valin unterschiedlicher Zusammensetzung [45]. Die Fusion nach 1h ist gegen das Peptid zu Lipid (P/L-) Verhältnis aufgetragen. Es erfolgte eine Korrektur der Ergebnisse bezüglich der Hintergrundfusion, welche durch Messung der Fusion von Liposomen ohne Peptid ermittelt wurde.

Die Fusogenität konnte ferner durch das Einfügen von Helix-destabilisierenden Glycin- und Prolinresten gesteigert werden.

Sekundärstrukturanalysen (Zirkular Dichroismus, FTIR) zeigten, dass Helix-destabilisierende Aminosäuren in der Sequenz eine, innerhalb der Titration von apolarem zu polarem Medium, stärkere Neigung des Peptids zur Umfaltung zwischen helikaler und faltblattartiger Struktur bewirken (Abb. 7).

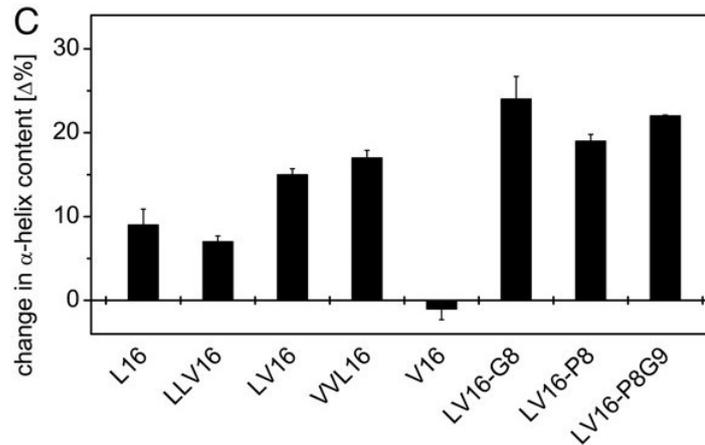


Abb. 7: Bestimmung der konformationellen Flexibilität mittels FTIR-Spektroskopie [45]. Der unterschiedliche Anteil an α -helikaler Sekundärstruktur der Peptide in 10 % TFE und 100 % TFE stellt das Maß für konformationelle Flexibilität dar. Die Änderung der Sekundärstruktur korreliert dabei mit der Fusogenität der Peptide.

Die konformationelle Flexibilität von membranständigen Peptiden stellt somit eine strukturelle Voraussetzung für deren fusogene Wirkung dar.

Weiterhin konnten Hinweise gefunden werden, welche daraufhin deuten, dass Transmembrandomänen beim Übergang des Hemifusionsintermediats zur kompletten Fusion beteiligt sind [94]. Bei Untersuchungen eines Peptids, welches der Transmembrandomäne des Hefe SNARE-Proteins Vam3p entspricht, wurde festgestellt, dass der relative Anteil an Hemifusion im Vergleich zur kompletten Fusion bei einer niedrigen Peptidkonzentration in den Liposomen erhöht war. Dieses nicht-lineare Verhalten legt einen kooperativen Effekt der Transmembrandomänen während des Übergangs von der Hemifusion zur kompletten Fusion nahe. Außerdem zeigte sich, dass der relative Anteil an Hemifusion während der Reaktionszeit abnimmt, so dass der Zustand der Hemifusion als regulärer Zwischenzustand der Membranfusion betrachtet werden muss. Eine mechanistische Erklärung, in wie weit Protein/Protein-Interaktionen Einfluss auf die Membranfusion nehmen, fehlt bis heute. Jedoch stützen weitere experimentelle Daten die Tatsache, dass eine Multimerisierung von SNARE-Proteinen, welche durch die Transmembrandomänen vermittelt wird, eine Rolle für die Membranfusion spielt. Es wurden beispielsweise Multimere von SNARE-Proteinen beobachtet [95] und eine kooperative Wirkungsweise der SNARE-Proteine in der Exozytose gezeigt [96].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Transmembrandomänen fusogener Proteine aktiv am Fusionsprozess beteiligt sind.

1.4 Methoden der Strukturaufklärung von Peptiden

Untersuchungen von räumlichen Proteinstrukturen werden seit langer Zeit verfolgt. Viele dieser Studien wurden mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind jedoch durch die Darstellung von Röntgendaten starrer Molekülmodelle geprägt. In den Vordergrund

neuerer Arbeiten rückt jedoch immer mehr der dynamische Charakter von Proteinkonformationen. Daten zur molekularen Dynamik führen hierbei zu einem vertieften Verständnis der Funktionen von Proteinen. Die inhärente Flexibilität von Proteinen beruht darauf, dass die Konformation fast ausschließlich durch schwache, nichtbindende Wechselwirkungen bestimmt wird. Der Beitrag jeder einzelnen Wechselwirkung zur freien Energie der Proteinkonformation ist von derselben Größenordnung wie die thermische Energie bei physiologischen Temperaturen, so dass diese Wechselwirkungen im Laufe einer kurzen Zeitspanne wiederholt geöffnet und neu gebildet werden. Das Ziel der heutigen Forschung ist es, die Struktur und innere Flexibilität von Proteinmolekülen detailliert zu charakterisieren. Da es in einem Protein sehr viele schwache Bindungen gibt, welche sich unkorreliert oder simultan öffnen können, ist eine Vielzahl unterschiedlicher interner Bewegungen zu erwarten. Die innere Flexibilität beruht dabei auf dem Ablauf komplexer, kinetischer Prozesse. Aus diesem Grund ist eine Kombination vieler strukturaufklärender Methoden bei einer Charakterisierung von Proteinstrukturen notwendig.

1.4.1 Zirkular Dichroismus Spektroskopie

Die Zirkular Dichroismus (CD) Spektroskopie ist eine Methode, mit der die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung untersucht werden kann. Er beschreibt die Absorption von zirkulär polarisiertem Licht durch optisch aktive Moleküle. Chirale Moleküle, also auch Aminosäuren, sind optisch aktiv. Unterschiedliche Enantiomere dieser Moleküle weisen ein Absorptionsverhalten in Abhängigkeit von der zirkulären Polarisation des Lichts auf. Demzufolge ist die Absorption von links polarisiertem Licht und rechts polarisiertem Licht unterschiedlich. Der Zirkular Dichroismus ist nach (1) definiert.

$$\Delta A(\lambda) = [\varepsilon(l) - \varepsilon(r)] \cdot l \cdot c = \Delta \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A = Absorption; c = Konzentration [mol/l]; l = optische Wellenlänge [cm], ε = molarer Extinktionskoeffizient [1/Mol cm] nach Lambert Beer

(1)

Die chiralen Eigenschaften der Aminosäuren ermöglichen eine Sekundärstrukturanalyse mittels der Zirkular Dichroismus Spektroskopie. CD-Spektren im fernen UV-Bereich (von 170 nm – 250 nm) liefern für das Auftreten bestimmter Sekundärstrukturelemente charakteristische Banden (Abb. 8).

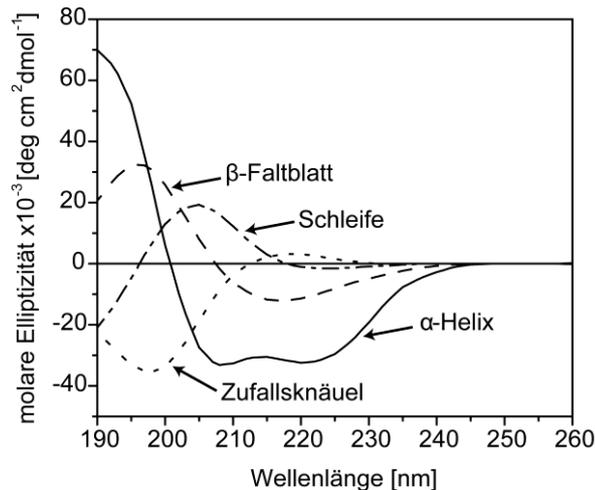


Abb. 8: Zirkular Dichroismus Spektren der Hauptkomponenten. Theoretische CD-Spektren 100 %-iger Sekundärstrukturen der α -Helix, des β -Faltblatts, des Zufallsknäuels und des generellen Schleifen-Motivs. Dargestellt ist die molare Elliptizität als Funktion der Wellenlänge.

Bei Proteinen oder Peptiden, welche meist mehrere Sekundärstrukturelemente aufweisen, überlagern sich diese Banden. Für die Entstehung eines CD-Spektrums und die Ausprägung von Maxima und Minima dieses Spektrums spielen verschiedene Eigenschaften der Peptidbindung sowie der Sekundärstruktur eine Rolle [97, 98].

Die Amidbindung wird durch zwei Banden charakterisiert. Einem relativ schwachen, jedoch breiten $n \rightarrow p^*$ Übergang bei 220 nm und einen starken $p \rightarrow p^*$ Übergang bei 190 nm. Unter den wesentlichen Sekundärstrukturelementen zeigt die Zufallsknäuel Faltung ein positives Signal bei 212 nm, was einem $p \rightarrow p^*$ Übergang zu Grunde liegt, und ein negatives Signal bei 195 nm aus einem $n \rightarrow p^*$ Übergang. Der $n \rightarrow p^*$ Übergang eines β -Faltblatts ist negativ und tritt bei einer Wellenlänge von 217 nm auf während sein $p \rightarrow p^*$ Übergang zwischen 195 nm und 197 nm positiv ist. Spektren von β -Faltblättern in Proteinen können sehr stark variieren. Hier spielen Effekte wie Art der Seitenkette der Aminosäure oder das umgebende Lösungsmittel eine große Rolle. Zudem können β -Faltblätter parallel oder antiparallel auftreten, sie können verdrillt sein und inter- oder intramolekular gebildet werden. Im Vergleich zu den charakteristischen Banden des β -Faltblatts kommt es bei der α -Helix zu einer Excitonenkopplung wodurch es zu einer Aufspaltung des $p \rightarrow p^*$ Übergangs in eine senkrecht polarisierte Komponente bei 192 nm und eine parallel polarisierte Komponente bei 209 nm kommt. Die Energie des $n \rightarrow p^*$ Übergangs wird außerdem durch die Excitonenkopplung gesenkt, so dass eine Rotverschiebung des Minimums hin zu 222 nm zu beobachten ist. Diese charakteristischen Banden ermöglichen es, anhand des Vergleichs von Proteinen und Peptiden bekannter Struktur die Sekundärstruktur der untersuchten Peptide abzuschätzen.

Zur Ermittlung der Sekundärstruktur muss die gemessene Elliptizität einer Protein- oder Peptidprobe als molare Elliptizität auf die Anzahl der Aminosäuren bzw. der Peptidbindungen bezogen werden (2).

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

MRW=mean residue weight; n=Anzahl der Peptidbindungen; M=Molmasse; c=Konzentration des Proteins oder Peptids; l=optische Weglänge; $[\theta](\lambda)$ =molare Elliptizität; $\theta(\lambda)$ =gemessene Elliptizität

(2)

Die gemessenen Spektren können im Anschluss dekonvolviert werden [99, 100]. Um den relativen Anteil der Sekundärstrukturelemente zu bestimmen, werden die spektralen Informationen wie individuelle, überlagerte Spektren der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale des Peptids behandelt. Durch den Vergleich mit Referenzspektren kann so eine Bestimmung dieser einzelnen Elemente vollzogen werden. Verschiedene Computerprogramme nutzen auf Grundlage neuronaler Netzwerke Algorithmen zur Quantifizierung der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente [101, 102].

1.4.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde in den 20er Jahren von den beiden Physikern J. J. Thomson und F. W. Aston zur Analyse von Elementen entwickelt. Ab Beginn der 50er Jahre fand diese Technik ihren Weg in die komplexere organische Chemie. Mit Entwicklung der Elektrospray-Ionisierungs-Technik (ESI) hielt die Massenspektrometrie schließlich auch Einzug in die Analytik von Biomolekülen, speziell von Proteinen und Peptiden.

Das Prinzip der Massenspektrometrie macht sich die Tatsache zunutze, dass elektrische und magnetische Felder einen Einfluss auf geladene Teilchen ausüben. Im Vakuum ist der Einfluss dieser Felder direkt mit der Masse sowie der Ladung des Teilchens verknüpft. Da eine Beeinflussung von Teilchen im elektromagnetischen Feld nur auf geladene Teilchen erfolgen kann, müssen demnach neutrale Teilchen erst geladen werden. Ein Massenspektrometer führt deshalb zwei entscheidende Funktionen aus: die Ionisierung von Teilchen und deren Analyse. Es stellt deshalb ein analytisches Instrument dar, welches zuerst Teilchen in die Gasphase bringt und sie ionisiert und die Bewegung dieser Ionen weiterhin als Funktion ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses misst. Der letzte Schritt wird in den meisten Massenspektrometern zweigeteilt ausgeführt, wobei die Ionen zuerst entweder räumlich oder zeitlich hinsichtlich ihres Verhältnisses von Masse zu Ladung getrennt und dann detektiert werden.

Ein Massenspektrometer ist meist aus drei funktionellen Einheiten aufgebaut: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor (Abb. 9).

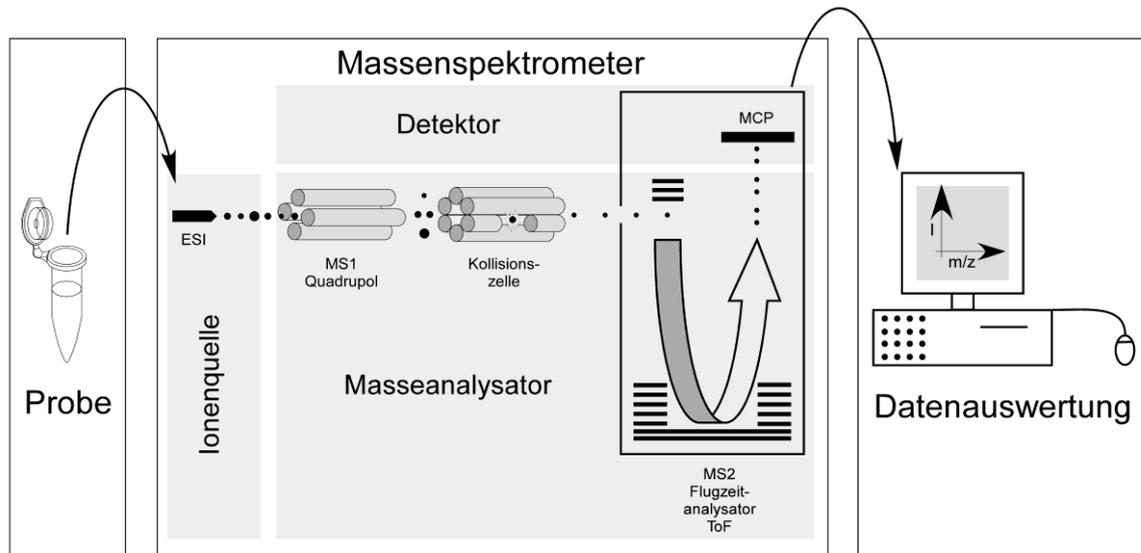


Abb. 9: Klassischer Aufbau eines Massenspektrometers. Eine Probe wird über einen Ionenquelle in den Masseanalysator eingebracht und dort hinsichtlich ihres Verhältnisses von Masse zu Ladung getrennt, um dann am Detektor detektiert zu werden. Zusätzlich kann im Masseanalysator Einfluss auf die Ionen ausgeübt werden, beispielsweise diese zu selektieren (MS1) und zu fragmentieren (Kollisionszelle).

Klassische Ionisierungstechniken, wie Elektronen Einschlag oder Chemische Ionisierung, waren nicht geeignet, labile und große biologische Makromoleküle für die Massenspektrometrie zugänglich zu machen. Erst mit der Entwicklung der Ionendesorptionstechniken, insbesondere der FAB („Fast Atom Bombardment“) Ionisierungsmethode, konnten nun auch sensible Biomoleküle massenspektrometrisch analysiert werden. Abgelöst wurden diese Techniken jedoch mittlerweile von den erfolgreichsten Ionisierungsmethoden für Biomoleküle, der „Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation“ (MALDI) und der Elektrospray-Ionisierung (ESI).

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird eine Lösung des zu untersuchenden Analyten mittels eines Stickstoffstroms in ein elektrisches Feld versprüht. Der Analyt selbst muss in Lösung als Ion vorliegen, also eine Ladung tragen. Beim Versprühen der Lösung im elektrischen Feld bilden sich kleinere Tröpfchen, welche an ihrer Oberfläche Ladungen tragen. Durch Ladungsabstoßung auf der Oberfläche kommt es zur Teilung der Tröpfchen in immer kleinere Tröpfchen, da diese eine größere Oberfläche besitzen und damit entropisch begünstigt sind. Dieser Effekt wird durch die Verdunstung des Lösungsmittels während des Sprühens weiter beschleunigt. Wird die Ladungsdichte auf den Tröpfchen zu groß, kommt es zu Coulomb-Explosionen, wodurch geladene Analytmoleküle schließlich in die Gasphase übergehen. Als Gasphasen-Ionen können sie dann in den Masseanalysator des Massenspektrometers gelangen und analysiert werden.

1.4.3 Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion

Eine Methode die strukturelle Dynamik (Stabilität) von Proteinen und Peptiden zu charakterisieren ist die Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie. Die thermodynamische Beschreibung dieser Stabilität setzt ein reversibles Gleichgewicht zwischen nativem (gefaltetem) und denaturiertem (entfaltetem) Zustand voraus. Unter Nativbedingungen ist die Entfaltung des Nativzustands (N) über den Entfaltungsübergangszustand zum entfalteten Zustand (D) energetisch ungünstig. Die Differenzen der freien Enthalpien der Zustände beschreiben die Stabilität. Die thermodynamische Stabilität von Proteinen und Peptiden ergibt sich aus den Gleichgewichtskonzentrationen an N und D bzw. aus den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung k_u und k_f [103] (Abb. 10) und kann mittels des Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperiments bestimmt werden.

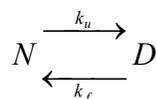


Abb. 10: Zwei-Zustandsmodell zwischen gefaltetem (N) und entfaltetem (D) Zustand eines Proteins oder Peptids. Die Entfaltung wird durch die Geschwindigkeitskonstante k_u , die Faltung durch die Geschwindigkeitskonstante k_f beschrieben.

Im Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperiment macht man sich die Tatsache zunutze, dass einige Protonen von Proteinen und Peptiden gegen Protonen des Lösungsmittels austauschen können. Es gibt unterschiedliche Arten von Protonen in Peptiden, welche gegen Protonen des Lösungsmittels austauschen können. Wie in Abb. 11 gezeigt, zählen dazu die Protonen von polaren Aminosäureseitenketten, die der terminalen Amino- und Carboxylgruppe, sowie die Amidprotonen des Peptidrückgrats.

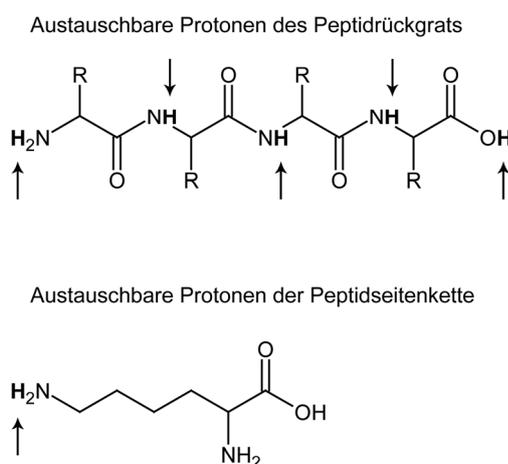


Abb. 11: Beispiele für austauschbare Protonen in Peptiden. Protonen, welche in wässrigem Medium gegen Protonen des Lösungsmittels austauschen können, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Kohlenstoff-gebundene Protonen tauschen nicht gegen Protonen des Lösungsmittels aus.

Der Austausch derartiger Protonen setzt zwei Teilschritte voraus. Dabei muss zuerst das Proton des Peptids auf einen Protonen-Akzeptor übertragen werden, so dass es dann durch das Proton eines Protonen-Donors ersetzt werden kann. Entscheidend ist hierbei anfänglich die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Protonen-Donor (hier dem Peptid) und einem Protonen-Akzeptor (hier z.B. OH^-). Die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens dieser beiden Spezies ist lediglich durch die Diffusion limitiert. Innerhalb dieser Wasserstoffbrücke ist das Proton zwischen Donor und Akzeptor frei beweglich [104, 105]. Dabei liegt die Geschwindigkeit derartiger Prozesse sehr hoch.

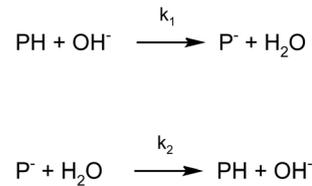


Abb. 12: Teilreaktionen der Protonen-Austauschreaktion. P=Peptid, H=austauschbares Proton. Ein Proton eines Peptids wird auf einen Protonen-Akzeptor übertragen (k_1). Protonen-Donor überträgt Proton auf das Peptid (k_2).

Ein Amidproton, welches z.B. in einer α -Helix in einer Wasserstoffbrücke gebunden ist (H_g), kann nur dann ausgetauscht werden, wenn diese sich öffnet (H_o) und das Amidproton somit Austauschkompetent wird. Mit den Ratenkonstanten für die Öffnungsreaktion (k_o), die Schließreaktion (k_g) und der chemischen Austauschrate (k_{ch}) kann nun für den Reaktionsmechanismus folgender Ablauf angenommen werden.

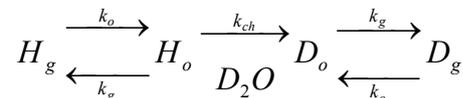


Abb. 13: Mechanismus der Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion in Peptiden und Proteinen. Ein Proton, welches in einer Wasserstoffbrücke gebunden ist (H_g) mit einer Rate für die Öffnung (k_o) und das Schließen (k_g) der Wasserstoffbrücke, kann im deuterierten Lösungsmittel (D_2O) im geöffneten Zustand (H_o) mit der chemischen Austauschrate (k_{ch}) gegen Deuterium ausgetauscht werden (D_o). Dieses Deuteron kann mit einer Rate k_g eine intramolekulare Wasserstoffbrücke eingehen, welche mit einer Rate k_o reversibel ist. Durch den Überschuss von Deuterium im Lösungsmittel kann jedoch kein Austausch von D_o nach H_o stattfinden.

Dadurch, dass die Austauschrate eines frei zugänglichen Amidprotons durch eine Protonen-Transfer-Reaktion entlang der Wasserstoffbrücke zu einem Hydroxidion bestimmt wird, ist die chemische Austauschrate (k_{ch}) abhängig vom pH-Wert. Außerdem wird diese von weiteren Faktoren, wie der Temperatur, Isotopen-Effekten oder den Einflüssen der benachbarten Atome beeinflusst. Aus den Arbeiten an unstrukturierten Peptiden, in welchen die Amidprotonen keine Wasserstoffbrücken eingehen, wurden die intrinsischen Austauschraten (k_{int}) bestimmt [106-108].

$$k_{ch} = k_{int} [\text{OH}^-] \quad (3)$$

Falls ein Amidproton in eine Wasserstoffbrücke mit einem Carbonylsauerstoff eingebunden ist, muss diese Wasserstoffbrücke vor einem Austausch erst gebrochen werden [109, 110]. Die gesamte Austauschrate (k_{ex}) kann demnach durch die in Abb. 13 definierten Parameter in (4) dargestellt werden.

$$k_{ex} = \frac{k_o \cdot k_{ch}}{k_g + k_{ch}} \quad (4)$$

Im Falle, dass das erneute Schließen der Wasserstoffbrücke innerhalb des Peptids schneller vonstatten geht als der chemische Austausch ($k_g > k_{ch}$) spricht man von einem EX2-Mechanismus und (4) vereinfacht sich zu (5).

$$k_{ex} = \left(\frac{k_o}{k_g} \right) k_{ch} = K_o \cdot k_{ch} \quad (5)$$

Falls jedoch der chemische Austausch schneller geschieht als das Schließen der Wasserstoffbrücke ($k_g < k_{ch}$), d.h. das Schließen zum Raten-limitierenden Schritt wird, so spricht man von einem EX1 Mechanismus und (4) vereinfacht sich zu (6).

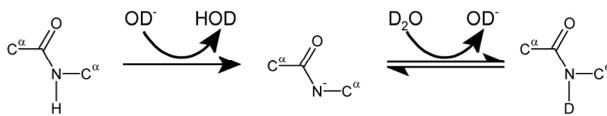
$$k_{ex} = k_o \quad (6)$$

Der Austausch der Amidprotonen der Peptidbindung kann sowohl Base-katalysiert als auch Säure-katalysiert ablaufen [109]. Damit ist die chemische Austauschrate (k_{ch}) ebenfalls abhängig von der Art und Konzentration des Katalysators (7).

$$k_{ch} = k_{kat} [Katalysator] \quad (7)$$

Der Grund hierfür ist der ampholytische Charakter der Peptidbindung. Dabei dient in wässrigem Medium bei der Base-katalysierten Reaktion ein Hydroxid-Ion als Protonen-Akzeptor, während ein Wassermolekül als Protonen-Donor fungiert. Umgekehrt dient bei der Säure-katalysierten Reaktion ein Hydronium-Ion als Protonen-Donor und ein Wassermolekül als Protonenakzeptor (Abb. 14).

Base-katalysierter Austausch



Säure-katalysierter Austausch

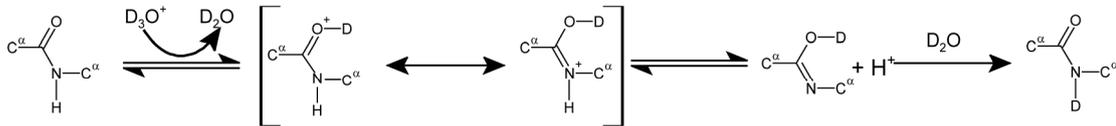


Abb. 14: Reaktionsmechanismus der Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion. Im Base-katalysierten Austausch dient ein Hydroxid-Ion als Protonenakzeptor und Wasser als Protonendonator. Im Säure-katalysierten Mechanismus dient ein Hydronium-Ion als Protonendonator und Wasser als Protonenakzeptor.

Die geschwindigkeitsbestimmenden Teilreaktionen sind im Falle des Base-katalysierten Mechanismus der Übertrag des Protons vom Peptid auf das Hydroxid-Ion und im Säure-katalysierten Mechanismus der Übertrag des Protons vom Hydronium-Ion auf das Peptid. Die anderen beiden Teilreaktionen laufen sehr schnell ab, da jeweils Wasser als Reaktionspartner (Protonen-Akzeptor oder -Donor) dient und im wässrigen Medium in einer sehr hohen Konzentration vorliegt.

Dabei läuft der Base-katalysierte Austausch in Wasser sehr viel schneller ab als der Säure-katalysierte, da die Deprotonierung der Peptidbindung durch OH^- (oder OD^-) energetisch sehr viel günstiger ist als die Protonierung dieser Peptidbindung durch H_3O^+ (oder D_3O^+).

Die Anzahl an notwendigen Molekülkollisionen, welche jeweils zu einer Übertragung der Protonen vom Protonen-Donor auf den -Akzeptor führt, ist demnach abhängig von den pK_a -Werten der jeweiligen Partner.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der beiden Austauschmechanismen (Säure- oder Base-katalysiert) ist jeweils die erste Teilreaktion. Im Base-katalysierten Mechanismus ist dies die Deprotonierung des Amids an der Peptidbindung. Der pK_a -Wert dieser Peptideinheit beträgt ca. 18,5 [108], wodurch sich ein erfolgreicher Übertrag auf OH^- ($\text{pK}_a = 15,7$ H_2O) und damit die chemische Ratenkonstante (k_{ch}) als 10^{-3} M^{-1} bestimmen lässt (also jede tausendste Kollision erfolgreich eine Deprotonierung der Peptideinheit ermöglicht). Für die Protonierung der Peptideinheit im Säure-katalysierten Mechanismus ($\text{pK}_a = -13$) durch das Hydronium-Ion (H_3O^+) ($\text{pK}_a = -1,7$) ergibt sich jedoch eine chemische Ratenkonstante von ca. 10^{-11} M^{-1} .

Theoretische Geschwindigkeiten ergeben sich für den Base-katalysierten Austausch nach (8) und für den Säure-katalysierten Austausch nach (9). Aus der jeweiligen Differenz der Protonen-Affinitäten (pK_a -Werte) zwischen Protonen-Donor und -Akzeptor und der durch die diffusionsbestimmte Zahl an Molekülkollisionen ($k_{\text{D}} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$) ergibt sich die vom pH-Wert abhängige Austauschrate (Anzahl der Molekülkollisionen, welche zu einem erfolgreichen Protonenübertrag führen).

$$k_{ex} = 10^{-3} \cdot k_D \cdot [OH^-] = 10^{(pH-Wert)-7} s^{-1} \quad (8)$$

$$k_{ex} = 10^{-11} \cdot k_D \cdot [H_3O^+] = 10^{-1-(pH-Wert)} s^{-1} \quad (9)$$

Damit wird deutlich, dass der Austausch von Amid-Protonen ab einem pH-Wert von 3,0 vorwiegend Base-katalysiert stattfinden muss.

Für die Austauschgeschwindigkeit polarer Seitenkettenprotonen durch OH^- gilt eine noch höhere Geschwindigkeit als für die Amid-Protonen. Deren Geschwindigkeitskonstante beträgt $10^{(pH-Wert)-4}$ und ist damit um den Faktor 10^3 schneller als der Base-katalysierte Austausch der Amid-Protonen.

Die Austauschrate von Amid-Protonen ist damit vom pH-Wert abhängig und besitzt durch die beiden unterschiedlich schnellen Mechanismen ein Minimum bei einem pH-Wert von ca. 2,5[109]. Aus diesem Grund erhöht sich oberhalb eines pH-Werts von 2,5 (Base-katalysiert) die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Erhöhung einer pH-Einheit um den Faktor 10. Ebenso unterhalb von 2,5 (Säure-katalysiert) (Abb. 15).

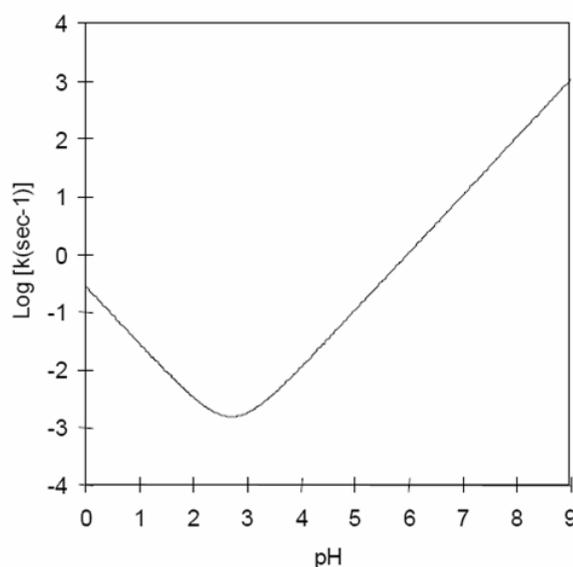


Abb. 15: Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit vom pH-Wert [106]. Die Geschwindigkeit des Austausches steigt bei einer schrittweisen Erhöhung des pH-Werts um den Faktor 10 an.

Weitere Einflüsse auf die Austauschrate k_{ex} können auch die Seitenketten der Aminosäuren in Nachbarschaft zum beobachteten Amid-Proton ausüben. Dieser Effekt kann sowohl induktiv sein, wie im Falle polarer Seitenketten, oder auch eine sterische Hinderung des Austausches bewirken. Weiterhin sind die Effekte der beiden Aminosäuren in Nachbarschaft additiv [108]. Hierbei spielt die Elektronenverteilung innerhalb des Moleküls eine tragende Rolle, welche das Deprotonieren oder Protonieren des Amids beeinflusst. Diese Effekte wurden von Bai et al. für alle 20 gencodierten Aminosäuren bestimmt[106].

Tatsächlich beobachtete Austauschgeschwindigkeiten in Peptiden und Proteinen sind jedoch häufig um den Faktor 10^3 langsamer. Grund hierfür sind die bereits erwähnten intramolekularen Wasserstoffbrücken der Amidprotonen, welche den Austausch verlangsamen und damit den Ratenlimitierenden Schritt im Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperiment darstellen. Aus diesem Grund kann die Austauschgeschwindigkeit als Maß für die Stabilität von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Peptiden oder Proteinen genutzt werden, mit der einzigen Einschränkung, dass diese auch durch sterische Effekte beeinflusst werden [111].

2 Ziel der Arbeit

Es wurde gezeigt, dass de novo kreierte Modellpeptiden sequenzspezifisch die Fusion von Liposomen *in vitro* medieren können[45]. In Abhängigkeit ihrer Aminosäurezusammensetzung deutete sich eine Korrelation der Fusogenität mit der konformationellen Flexibilität dieser Peptide an. In dieser Arbeit sollte der strukturelle Zusammenhang zwischen Fusogenität und der konformationellen Flexibilität der Peptide geklärt werden. Das Augenmerk galt der Funktion und Helixdynamik membranfusogener Peptide. Es sollten die entscheidenden konformationellen Erfordernisse von Transmembranpeptiden für den Vorgang der Membranfusion offengelegt werden.

Dabei wurde sowohl die globale Flexibilität der Peptide, welche sich aus der Entfaltung helikaler Peptide ergibt, als auch die Dynamik der α -Helix membrandurchspannender Peptide betrachtet. Durch Zirkular Dichroismus Spektroskopie sollte die konformationelle Flexibilität der Peptide untersucht werden und durch Wasserstoff/Deuterium Austausch Massenspektrometrie die Dynamik der α -helikalen Konformation der Peptide charakterisiert werden. Die experimentelle Betrachtung der Struktur sollte sowohl in Lösung als auch innerhalb der Membran von Liposomen stattfinden.

Peptide, deren hydrophobe Kernsequenz regelmäßig aus unterschiedlichen Zusammensetzungen von Leucin und Valin variiert wurde, sollten im Vergleich zu ihrer Fusogenität untersucht werden. Die strukturellen Konsequenzen von Glycin und Prolin im Zentrum eines hydrophoben Peptids aus Leucin und Valin sollten abenso ermittelt werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Valin die Dynamik helikaler Peptide erhöht, während Leucin die Stabilität dieser Peptide fördert, sollte durch gezieltes Design von Peptiden regional deren Helix-Stabilität erniedrigt bzw. erhöht werden. Die Auswirkungen von terminal oder zentral destabilisierten Peptidhelices sollten einen Aufschluss über den Mechanismus der Membranfusion liefern.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit betraf die flankierenden Regionen der Peptide. Hier sollte die Art und der Ladungszustand der flankierenden Aminosäuren auf die Konformation der Peptide betrachtet werden. N-terminal acylierte Peptide sollten klären, ob Acylketten, wie sie auch an Fusionsproteinen in der Natur gefunden werden können, einen Einfluss auf die Fusion von Liposomen ausüben. Dabei sollten ebenfalls die strukturellen Veränderungen, welche sich durch das Anfügen der Acylketten ergaben, untersucht werden.

Zusammenfassend sollte mit Hilfe dieser verschiedenen Transmembranpeptide durch die Fusion von Liposomen *in vitro* und die detaillierte strukturelle Charakterisierung eine Struktur/Funktionsbeziehung von Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteine erhalten werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Die verwendeten Peptide wurden durch tert-Butoxycarbonyl-(Boc)-Methode synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt (PSL GmbH, Heidelberg). Die gelieferten Lyophilisate wurden bei -80 °C gelagert. Die Reinheit der Peptide wurde nach Lieferung in 10 µM Lösung der Peptide in Trifluoroethanol (TFE) massenspektrometrisch bestimmt. Die Reinigung der Peptide erfolgte durch Festphasenextraktion (SPE) mittels SepPak tC₂-Säulen (Waters).

Für die Herstellung von deuterierten Peptiden wurden die Lyophilisate zu ca. 500 µM in Trifluoroethanol-d (d-TFE) gelöst und anschließend zu einer Lösungsmittelkonzentration von 40 % d-TFE (% V/V) mit deuteriertem Ammoniumacetat Puffer pD 7,0 verdünnt. Die Proben wurden für 24 h bei 50 °C inkubiert und anschließend lyophilisiert. Mit diesen Lyophilisaten wurde dieselbe Vorgehensweise wiederholt und die dann erhaltenen Lyophilisate in d-TFE gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Peptide wurde über die Intensität des Absorptionsmaximums des eingebauten Tryptophans bei 280 nm ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

Die synthetischen Lipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin (DOPE), 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoserin (DOPS), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC) und 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DLPC) wurden von der Firma Avanti (Avanti Polar Lipids, USA) bezogen. 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) wurde von der Firma Lipoid (Lipoid, Schweiz) bezogen. Diese wurden zu 10 mg/ml in CHCl₃ gelöst. Die Fluoreszenzfarbstoffe N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-dihexadecanylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) und Lissamine™ rhodamine B-dihexadecanylphosphatidylethanolamine (Rh-PE) wurden als Feststoffe von Molecular Probes bezogen. Diese wurden zu 1 mg/ml in CHCl₃ gelöst und die Konzentration der Farbstoffe mit Hilfe eines UV-Absorptionsspektrums bestimmt. Die Konzentration von NBD-PE wurde durch die Intensität des Absorptions-Maximums bei 460 nm ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und die von Rh-PE durch die Intensität im Maximum bei 530 nm ($\epsilon = 75000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Alle Lipide wurden mit Stickstoff überschichtet bei -20 °C gelagert.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wiesen Analysenqualität auf. Alle verwendeten Puffer wurden mit milliQ-Wasser angesetzt und vor der Benutzung filtriert. Deuterierte Lösungsmittel wiesen eine Reinheit von mindestens 99 % Deuterium auf.

3.2 Geräte

Die Peptidkonzentration wurde anhand eines Tryptophan-Restes am Ultrospec 3100pro UV/Vis-Spektrometer (Amersham Bioscience, USA) ermittelt. Die Messungen wurden in einer Quarzküvette (Hellma, Deutschland) durchgeführt.

Für die Lyophilisation der Peptide wurde eine Gefriertrocknungsanlage vom Typ Delta 1-20KD (Christ, Osterode, Deutschland) benutzt.

Zirkular Dichroismus Spektren wurden mit Hilfe eines J-710 Spektral-Polarimeters (Jasco, Easton, MD, USA) in einer 0,5 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) aufgezeichnet. Die Temperatur während der Messung wurde mittels eines Wasserbads auf 20 °C gehalten. Für die Datenaufzeichnung wurde die Spectra Manager Software verwendet. Zur Auswertung der CD-Daten wurde die CDNN-Software [101] mit Benutzer-definierten Referenz-Spektren (siehe 4.1) verwendet.

Zur Herstellung von Liposomen wurde zur Rehydrierung der Lipidfilme ein Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Liposomen wurde ein Branson Sonifier mit Becherresonator (Branson, USA) benutzt. Während der Beschallung der Proben wurden diese stets durch Eiswasser gekühlt.

Die Aufzeichnung von Fusionskinetiken wurde am BMG FLUOstar (BMG LabTechnologies, USA) durchgeführt. Die Messungen erfolgten dabei in 96-Loch Platten. Die Auswertung erfolgte durch die FLUOstar Galaxy Software und durch die Kalkulations-Software Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA).

Die Quantifizierung der Peptide in Liposomen wurde in einer Quarzküvette (Hellma, Deutschland) mit Schichtdicke 1 cm am Fluoreszenz-Spektrometer RF-1501 (Shimadzu, Japan) durchgeführt. Die Datenaufzeichnung erfolgte mittels Hyper-RF Software.

Die Ultrazentrifugation erfolgte in Zentrifugenröhrchen aus Polyallomer in einer LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter, USA). Als Rotor wurde ein SW60-Ti Rotor eingesetzt.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden an einem Waters (Micromass) Quadrupol-Time of Flight-(Q-ToF-) Elektrospray Ionisierungs-(ESI-) Massenspektrometer (Waters, UK) durchgeführt. Zur Injektion der Proben wurden Hamilton Gastight Spritzen (Hamilton, Schweiz) verschiedener Volumina verwendet. Für die Datenaufzeichnung wurde die MassLynx 4.0 Software (Waters, UK) benutzt.

3.3 Methoden

3.3.1 Peptidlösungen

Die Peptide wurden in lyophilisiertem Zustand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Herstellen von Peptidlösungen wurde das Lyophilisat im geschlossenen Gefäß für 30 min auf Raumtemperatur gebracht. Eine entsprechende Menge Peptid wurde dann in ein Reagiergefäß (2 ml) eingewogen und mit TFE (Trifluoroethanol) zu ca. 2 mg/ml gelöst. Der Lösungsvorgang wurde für 15 min im gekühlten Ultraschallbad unterstützt. Durch Zentrifugation (13000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) wurde ungelöstes Peptid und Partikel abgetrennt. Die exakte Menge an gelöstem Peptid wurde anhand der Absorption von Tryptophan bestimmt. Am UV/Vis-Spektrometer wurde hierfür ein Spektrum von 220 nm-320 nm aufgezeichnet. Die Peptide wurden für die Messung in TFE/DMSO (Dimethylsulfoxid) 1:1 (v/v) verdünnt und gegen TFE/DMSO 1:1 (v/v) vermessen. Die Absorption der Tryptophan-Seitenkette im Maximum bei 282 nm und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 5500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermöglicht mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes eine ausreichende Konzentrationsbestimmung. Die Lagerung von gelösten Peptiden konnte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgen.

3.3.2 Aufreinigung der Peptide

Eine Aufreinigung der Peptide wurde mittels einer Festphasenextraktionsmethode von Hofmann et al. [112] durchgeführt. Diese Art der Aufreinigung wurde bei älteren Peptidchargen benutzt, um Kresol aus der Synthese der Peptide zu entfernen. Ferner zeigte sich auch, dass kurzkettige Peptidfragmente erfolgreich entfernt wurden. Die Methode wurde standardmäßig für Rohsubstanzen aus der Peptidsynthese benutzt.

Eine SepPak tC_2 -Plus Säule wurde für die Aufreinigung verwendet. Mit Hilfe einer 1 ml Einmalkunststoffspritze wurde die Säule zunächst mit 4 ml Acetonitril (AcN) konditioniert (Fließgeschwindigkeit $\approx 2\text{-}5\text{ ml/min}$). Die Säule wurde danach mit AcN/ H_2O 5:95 (v/v) bei etwa 1-2 ml/min equilibriert. Eine ca. 400 μM Peptidlösung in AcN/ H_2O 20:80 (v/v) wurde bei einer maximalen Auftragsmenge von 2 mg Peptid langsam bei 1 ml/min über die Säule gedrückt. Der Durchfluss und die folgende Waschfraktion von 0,5 ml AcN/ H_2O 5:95 (v/v) wurden vereinigt und in einem Reagiergefäß gesammelt. Da das Peptid nicht an das Säulenmaterial bindet, befindet sich das Peptid in dieser ersten Fraktion. Die Säule wurde mit 4 ml AcN/ H_2O 5:95 (v/v) gewaschen. Danach wurden die gebundenen Verunreinigungen und kürzere Peptidfragmente mit 100 % AcN eluiert. Nach weiterem Spülen mit 4 ml 100 % AcN konnte die Säule wieder verwendet werden. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und für die weiteren Untersuchungen wieder in TFE gelöst.

3.3.3 Herstellung kleiner unilamellarer Liposomen (SUV's)

Kleine unilamellare Liposomen wurden für die Ermittlung von Fusionskinetiken, die Strukturaufklärung mittels CD-Spektroskopie (Zirkular Dichroismus), sowie die Deuterium/Wasserstoff-Austauschexperimente verwendet. Für alle drei Untersuchungsmethoden wurden Liposomen mit integrierten Peptiden hergestellt. Für die Fusionsexperimente wurden zusätzlich Liposomen ohne Peptide und Liposomen mit den Lipidfarbstoffen NBD-PE und Rh-PE benötigt.

Die in CHCl_3 gelösten Lipide POPC, DOPE und DOPS (Konzentration 10 mg/ml) wurden im Verhältnis 3:1:1 (v/v/v) in einem 2 ml Reagiergefäß gemischt. Für eine Liposomensuspension mit einem Endvolumen von 600 μl wurden dazu 90 μl POPC, 30 μl DOPE und 30 μl DOPS gemischt, was einer Lipidmenge von ca. 1,87 μmol , bei einem ungefähren Molekulargewicht der Lipide von 800 g/mol, entspricht. Daraus folgt, dass die absolute Konzentration, in 600 μl rehydrierten Liposomen 3,1 mM beträgt. Diese Mischung an Lipiden wurde standardmäßig zur Herstellung von Liposomen benutzt. Für weitere Experimente wurde diese Mischung durch Liposomen aus purem POPC bzw. DMPC oder DLPC ersetzt. Hierfür wurden die entsprechenden Mengen von DOPE und DOPS einfach durch POPC, DMPC oder DLPC ergänzt. Die zu untersuchenden Peptide wurden in unterschiedlichen molaren Peptid/Lipid-(P/L)-Verhältnissen in die Liposomen integriert. Der Arbeitsbereich für die nominellen P/L-Verhältnisse betrug 0,0025-0,01. Die zu pipettierende Menge an Peptidlösung errechnete sich aus der bestimmten Konzentration der Peptidlösung und dem angestrebten P/L-Verhältnis wie folgt: Um ein nominales P/L-Verhältnis von 0,01 in den Liposomen zu erreichen, muss, der Menge an Lipid pro Ansatz entsprechend, eine Menge von 0,0187 μmol Peptid pipettiert werden. Bei einer Konzentration der Peptidlösung von 400 μM mussten folglich 46,8 μl verwendet werden. Für die Herstellung der farbstoffmarkierten Liposomen zur Messung der Fusionskinetiken über FRET (Fluoreszenz Resonanz Energietransfer) wurden jeweils 0,8 mol-% oder 0,16 mol-% der Lipide NBD-PE ($M_R = 956,3$ g/mol) und Rh-PE ($M_R = 1333,8$ g/mol) zusätzlich in die Ansätze gebracht. Die Mischungen aus gelösten Lipiden und gelösten Peptiden bzw. Farbstofflipiden wurden gut vermischt. Durch Abdampfen der Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom und gleichzeitigem Drehen der Reagiergefäße wurde ein dünner Lipidfilm an der Wand der Gefäße erzeugt. Reste von Lösungsmittel wurden im Vakuum über Nacht aus den Lipidfilmen getrocknet. Die Lipidfilme wurden in unterschiedlichen wässrigen Puffersystemen rehydriert. Für die Fusionsexperimente wurde hierzu ein Tris-HCl Puffer verwendet (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7,4], 0,1 mM EDTA). Für die CD-Spektroskopie wurde ebenso ein Tris-HCl Puffer verwendet (20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)). Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurde ein Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat Puffersystem (10 mM - 50 mM Ammoniumacetat bzw. Ammoniumformiat mit variierenden pH-Einstellungen) eingesetzt. Dazu wurden 600 μl des entsprechenden Puffers auf den Lipidfilm pipettiert, dieser mit Stickstoff überschichtet und zur Bildung multilamellarer Vesikel bei 37 °C für 1 h geschüttelt (1400 rpm). Aus großen MLV's (multilamellaren Vesikeln) wurden durch Sonifizieren SUV's (kleine unilamellare Vesikel) hergestellt. Dazu wurden die

Proben im Becherresonator unter Eiswasserkühlung für 8 min bei einer Amplitude von 80 % (Output 35 % - 40 %) beschallt. In einem Reinigungsschritt wurden Peptid- bzw. Lipidaggregate durch Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 20 min) entfernt. Zur Herstellung von Liposomen mit deuteriertem Peptid wurden alle aufgeführten Lösungsmittel gegen deuterierte Lösungsmittel ersetzt.

Das Bleichen von NBD in Donorliposomen zur Messung der Vermischung der inneren Lipidschicht erfolgte durch 20 mM Natrium Dithionit (DTN; $M_R = 174,1$) auf Eis für 30 min. 100 μ l der farbstoffmarkierten Liposomen wurden mit 10 μ l 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 (150 mM NaCl / 20 mM 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 μ l) und 3 min zentrifugiert (1.000 rpm, 4 °C). Im Durchlauf wurden so in der äußeren Lipidschicht gebleichte Liposomen erhalten.

3.3.4 Fusionskinetik

Für die Bestimmung des fusogenen Potentials der Peptidsequenzen wurden gebleichte oder ungebleichte Donorliposomen (farbstofftragende Liposomen 0,8 mol-%) mit Akzeptorliposomen (Liposomen mit oder ohne Peptid) im Verhältnis 1:4 unter Eiskühlung gemischt und je 100 μ l dieser Mischung in eine 96-Loch Platte pipettiert. Eine mögliche Zersetzung des NBD-Farbstoffes oder eine Adsorption der Liposomen an die Wand der Platte sowie eine elektronische Schwankung des Gerätes während der Messung wurde mit Hilfe einer Drift-Kontrolle ausgeglichen. Für die Drift-Kontrolle wurden Donorliposomen 1:4 mit Puffer vermischt und gemessen. Kontrollliposomen mit 0,16 mol-% Farbstofflipiden wurden unverdünnt auf die Platte aufgetragen.

Die gekühlte Platte wurde vor Beginn der Messung im Wasserbad für 2 min auf 37 °C temperiert und die Messung im Fluoreszenz-Spektrometer anschließend sofort gestartet. Dabei wurde im Gerät die Fluoreszenz des Farbstoffes NBD bei 530 nm und einer Anregungswellenlänge von 460 nm jede Minute für jedes Loch über eine Stunde gemessen. Durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 (Endkonzentration 0,5 %) wurden die Liposomen zerstört und somit der Abstand von NBD und Rh maximiert, um die maximale Fluoreszenz zu bestimmen. Der ermittelte Wert wurde als 100 % Fusion definiert und diente zur Bestimmung der prozentualen Fusion zu jedem aufgenommenen Zeitpunkt. Die Veränderung des Fluoreszenzsignals vollständig fusionierter Liposomen nach Detergenzlyse wurde

durch die Probe mit Kontrollliposomen (0,16 mol-% Farbstofflipide) korrigiert. Der Abstand der Fluoreszenzlabel, welcher bei einer Konzentration von 0,16 mol-% vorherrscht, entspricht dem Abstand bei vollständiger Fusion aller Liposomen. Der Fluoreszenzwert der Kontrollliposomen vor Detergenzlyse dividiert durch den Wert nach Detergenzlyse ergibt den Korrekturfaktor, um welchen der Fluoreszenzwert der Proben nach Detergenzlyse korrigiert wird.

3.3.5 Zirkular Dichroismus

Die Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptide wurde sowohl in Lösung (unterschiedliche Mischungen aus TFE und wässrigem Puffer), als auch von Peptiden integriert in liposomalen Membranen durchgeführt.

Die Messungen von Peptiden in Liposomen wurden bei einer Lipidkonzentration von 1,5 mM und einem molaren P/L-Verhältnis von 0,01 durchgeführt. Die Messungen wurden in einer Quartzküvette mit 0,5 mm Schichtdicke bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 200 nm - 260 nm und mit einer Geschwindigkeit von 100 nm min⁻¹ aufgezeichnet. Das gemessene Signal wurde dabei über 10 Messungen gemittelt und die Basislinie, welche durch Liposomen ohne Peptid bestimmt wurde, von den Peptidspektren subtrahiert.

Die Bestimmung der Peptidstruktur in Lösung wurde bei einer Endkonzentration von 25 µM Peptid vorgenommen. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen einer Peptidstammlösung in ein Reagiergefäß pipettiert. Das Lösungsmittel wurde in der SpeedVac bei einem Druck von 50 mbar für ca. 20 min verdampft. Die Peptide wurden dann mit einer Mischung von TFE und 20 mM Tris HCl Puffer (von 100 % TFE bis 20 % TFE (v/v) in 20 % Schritten) und verschiedenen pH-Werten zu einer Endkonzentration von 25 µM resuspendiert und für 10 min im Ultraschallbad gelöst. Zur Einstellung eines Gleichgewichts der Sekundärstrukturelemente wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Messungen wurden in einer Quartzküvette mit 0,5 mm Schichtdicke bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 nm - 260 nm und mit einer Geschwindigkeit von 100 nm min⁻¹ aufgezeichnet. Das gemessene Signal wurde dabei über 10 Messungen gemittelt und die Basislinie, durch jeweiliges Lösungsmittel ohne Peptid definiert, von den Peptidspektren subtrahiert.

Zur Bestimmung der jeweiligen prozentualen Gehalte an Sekundärstrukturelementen wurde das Signal in mittlere Elliptizität pro Residuum (θ_{mr}) konvertiert (10).

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

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

(10)

Mit Hilfe der CDNN/Pepfit Software wurden die relativen Anteile an Sekundärstrukturelementen bestimmt. Dieser Algorithmus vergleicht hierzu das gemessene und auf molare Elliptizität umgerechnete Spektrum mit einem Satz an Peptidspektren bekannter Sekundärstruktur [102].

3.3.6 Bestimmung des P/L-Verhältnisses

Zur quantitativen Auswertung der Fusionskinetiken und der Strukturbestimmung von eingebauten Peptidfraktionen mittels Zirkular Dichroismus-Spektroskopie wurde das exakte Peptid/Lipid-(P/L)-Verhältnis in den Liposomen bestimmt. Um die Konzentration des Peptids, welches in die Membran integriert ist zu bestimmen, wurde zunächst ungebundenes Peptid mittels Ultrazentrifugation (UZ) entfernt. Dazu wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Polyallomer; 11 mm x 60 mm; Beckman) 300 µl Probe mit 700 µl 60 %-iger Saccharose (w/v) gemischt und mit 2,5 ml 30 %-iger Saccharose überschichtet. Nach Überschichten mit 0,5 ml des jeweiligen Puffers wurden die Röhrchen mit Puffer austariert. Eine Ultrazentrifugation wurde anschließend im SW60Ti Rotor bei 56000 rpm für 20 h bei 20 °C durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen von je 1 ml abgenommen. Dabei wurden die Fraktionen in der Reihenfolge von unten nach oben mit einer 1 ml Spritze abgenommen und darauf geachtet eine Vermischung der Fraktionen zu vermeiden. Liposomen schwimmen im Dichtefeld des Saccharosegradienten auf und sind demnach in der oberen Fraktion enthalten. Ungebundenes Peptid wird am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert und findet sich demnach in der unteren Fraktion.

Das in die Liposomen inkorporierte Peptid wurde über die Fluoreszenz der Seitenkette der Aminosäure Tryptophan quantifiziert. Für diesen Zweck wurden 135 µl Probe, 90 µl 10 % SDS (w/v), 90 µl abs. EtOH und 215 µl Puffer gemischt. Diese Mischung wurde zur kompletten Lyse der Liposomen unter Schütteln (1400 rpm, Eppendorff Schüttler) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese peptidhaltigen Liposomenproben wurden anschließend zu 3x 160 µl aliquottiert. Zu einem Aliquot (i) wurden 10 µl TFE hinzugefügt und gemischt. Zum nächsten Aliquot (ii) wurden 5 µl TFE und 5 µl interner Standard (Peptid 50 µM in TFE) zupipettiert und vermischt. Zum dritten Aliquot (iii) wurden 10 µl interner Standard gegeben. Zu 160 µl einer Kontrolllösung (Liposomensuspension ohne Peptid) wurden 10 µl TFE gegeben. Alle Aliquote wurden zur Gleichgewichtseinstellung für 10 min bei RT unter schütteln inkubiert. Ein Emissionsspektrum von 250 nm - 400 nm wurde am Fluoreszenz-Spektrometer bei einer Anregung von 280 nm aufgenommen. Die Emission wurde dabei im Maximum zwischen 325 nm und 330 nm ausgelesen. Hierfür wurde zuerst die Kontrolle in Form der Liposomenprobe ohne Peptid vermessen. Die Messungen der Proben i; ii; iii erfolgten unter denselben Messbedingungen nacheinander. Aus den Differenzen der gemessenen Fluoreszenzwerte (ii-i) und (iii-ii) sowie dem Wert der Probe (i) und dem Kontrollwert lässt sich nun die Konzentration des inkorporierten Peptides anhand der zugegebenen Menge an internem Standard und der damit einhergehenden Erhöhung der Fluoreszenz bestimmen.

Die Quantifizierung der Lipide erfolgte über die Bestimmung der Menge an Phosphat in den Proben. Dabei wurde ein Molybdophosphat-Komplex mit der in den Lipiden enthaltenen Phosphatgruppe gebildet. Vor Bestimmung der Menge an Lipid in den Proben wurden diese 1:4 mit Puffer verdünnt. Von dieser verdünnten Suspension wurden 75 μl in Reagenzgläser pipettiert und durch Zugabe von 400 μl 70 % Perchlorsäure bei 200 °C für ca. 2 h auf einem Heizblock aufgeschlossen. Daneben wurde die Bestimmung mit Phosphat-Standardlösungen (0, 20, 40, 60, 80 und 100 nmol) durchgeführt. Nach dem Abkühlen der aufgeschlossenen Proben und der Standards wurden zu den Ansätzen jeweils 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 Subarow Reduktionsreagenz gegeben und gut gemischt. Nach Erhitzen für 10 min in siedendem Wasser wurden die Reagenzgläser im Eisbad abgekühlt. Diese Lösung wurde in Küvetten überführt und im UV/Vis-Spektrometer die Absorption bei 820 nm gegen die Kontrolle (0 nmol Phosphat) gemessen. Durch Doppelbestimmung wurde ein Mittelwert gebildet. Mit Hilfe der Phosphat-Standardmessungen wurde eine Kalibriergerade aufgestellt, welche dazu diente die Phosphat- bzw. Lipidmenge in den Proben zu bestimmen. Durch die Quantifizierung von Peptid und Lipid in den Proben errechnete sich das P/L-Verhältnis durch Division von Peptidkonzentration und Lipidkonzentration.

3.3.7 Deuterium/Wasserstoff-Austauschreaktionen

Für Deuterium/Wasserstoff-Austauschreaktionen wurden Peptide an ihren austauschbaren Positionen deuteriert. Für die Herstellung von deuterierten Peptiden wurden Lyophilisate zu ca. 500 μM in Trifluoroethanol-d (d-TFE) gelöst und anschließend zu einer Konzentration von 40 % d-TFE (% V/V) mit deuteriertem Ammoniumacetat-Puffer pD 7,0 verdünnt. Die Proben wurden für 24 h bei 50 °C inkubiert und anschließend lyophilisiert. Mit diesen Lyophilisaten wurden die beschriebenen Schritte wiederholt und die dann erhaltenen Lyophilisate in d-TFE gelöst. Die Konzentration der Peptide wurde über die Intensität des Absorptionsmaximums des eingebauten Tryptophans bei 280 nm ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt.

Für die Aufnahme der Deuterium/Wasserstoff-Austauschkinetiken wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet.

(i) Für die Aufnahme der Kinetiken wurden Lösungen von deuteriertem Peptid (100 μM in 80 % (V/V) d-TFE, 10 mM ND_4Ac pD 6,0) 1:20 in protischem Lösungsmittel (80 % (V/V) TFE, 10 mM NH_4Ac pH 6,5) verdünnt (Endkonzentration 5 μM Peptid) und bei einer definierten Temperatur inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Austauschreaktion abgestoppt, indem ein Aliquot der Proben unter Eiskühlung mit Ameisensäure (Endkonzentration 0,5 % (V/V)) versetzt wurde, so dass der pH-Wert der Probe auf ca. 3,0 gesenkt wurde.

Austauschreaktionen von Peptiden in liposomalen Membranen wurden durch Verdünnen (1:10) der deuterierten Liposomen-Suspensionen in protisches Lösungsmittel (50 mM NH₄Ac in H₂O pH 5,5) gestartet. Diese wurden ebenfalls bei einer definierten Temperatur inkubiert (37 °C - 50 °C) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Reaktion durch Abkühlen und Zugabe von Ameisensäure (Endkonzentration 0,5 % (V/V)) gestoppt.

(ii) Für kontinuierlich vermessene Austauschkinetiken wurden Lösungen von deuteriertem Peptid (100 µM in 80 % (V/V) d-TFE, 10 mM ND₄Ac pD 6,0) 1:20 in protischem Lösungsmittel (80 % (V/V) TFE, 10 mM NH₄Ac pH 6,5) verdünnt (Endkonzentration 5 µM Peptid) und die Masse der Peptide sofort und kontinuierlich über einen Zeitraum von maximal 4 h vermessen.

(iii) Für Messungen von Austauschreaktionen, welche direkt die gewünschte Endkonzentration von 5 µM enthielten, wurden 3,0 nmol deuterierte Peptide lyophilisiert. Im Unterschied zu Methode (i) und (ii) musste sich in diesem Ansatz kein Gleichgewicht in Lösung einstellen, da hier keine konzentrierte Stammlösung im Austauschpuffer verdünnt wurde. Das Lyophilisat wurde in 600 µl protoniertem Puffer (80 % (V/V) TFE, 10 mM NH₄Ac pH 3,0) gelöst und für 10 min unter Eiskühlung im Ultraschallbad behandelt (Endkonzentration an Peptid 5 µM). Anschließend wurde zum Starten der Reaktion ca. 0,63 % (V/V) Ammoniak (25 %) zugegeben (finaler pH-Wert 6,8) und die Reaktion sofort und kontinuierlich massenspektrometrisch vermessen.

Zur Messung der Proben wurde Elektrosprayionisations-(ESI-) Massenspektrometrie (MS) bei einer Flussrate von 2-4 µl/min betrieben. Die Spektren wurden im Positiv-Ionen-Modus bei einer Kapillarspannung von 2-3 kV aufgezeichnet. Mit Hilfe der MassLynx 4.0 Software wurden die Isotopenmuster der dreifach geladenen Peptid-Ionen durch einen Savitzky-Golay Algorithmus geglättet (50 channels, 5 iterations) und anschließend zentriert. Die Masse zu Ladung der geglätteten, zentrierten Isotopenverteilung wurde zur Berechnung der Massedifferenzen und Anzahl an geschützten Deuteronen verwendet.

Der Deuterierungsgrad der Peptide wurde mit Hilfe der aufgeführten Formel (11) berechnet. Dabei konnte für alle Peptide ein minimaler Deuterierungsgrad von ca. 95 % bestimmt werden. Ein Deuterierungsgrad von 100 % war mittels ESI-MS schwer zu bestimmen, da sehr labile Deuteronen bereits während des Spray-Prozesses durch die Luftfeuchte ausgetauscht wurden. Da diese Deuteronen im Austauschexperiment bereits ausgetauscht haben konnten die Peptide im Folgenden als zu 100% deuteriert betrachtet werden.

$$d_R = [3(m_D - m_H) - 3] \cdot \frac{100}{D_{\max}}$$

d_R =Deuterierungsgrad; m_D =Masse zu Ladung der deuterierten Peptide; m_H =Masse zu Ladung der protonierten Peptide; D_{\max} =Zahl aller labilen Deuteronen.

(11)

Die Bestimmung der geschützten Deuteronen zu einem bestimmten Zeitpunkt im Experiment in Lösung wurde durch die Verdünnung von deuterierter Lösung in protonierter Lösung, um den Faktor an Deuteronen im Lösungsmittel korrigiert (12).

$$D(t) = 3(m_X - m_H) - V_f \cdot D_{\max}$$

D(t)=Zahl geschützter Deuteronen als Funktion der Zeit; m_X =Masse zu Ladung zum Zeitpunkt t; m_H =Masse zu Ladung des protonierten Peptid-Ions; V_f =Verdünnungsfaktor (Mischungsverhältnis deuteriertes zu protoniertem Lösungsmittel); D_{\max} =Zahl aller labilen Deuteronen.

(12)

Die Korrektur der Anzahl der geschützten Deuteronen im Austauschexperiment in Liposomen wurde wegen der Abschirmung einiger Amid-Deuteronen durch die Lipidmembran mittels (13) bestimmt.

$$D(t) = 3(m_X - m_H) \cdot (1 - V_f)$$

D(t)=Zahl geschützter Deuteronen als Funktion der Zeit; m_X =Masse zu Ladung zum Zeitpunkt t; m_H =Masse zu Ladung des protonierten Peptid-Ions; V_f =Verdünnungsfaktor (Mischungsverhältnis deuteriertes zu protoniertem Lösungsmittel).

(13)

Die kinetische Analyse der Anzahlen an geschützten Deuteronen als Funktion der Zeit erfolgte durch einen Algorithmus auf Basis der Maximum Entropie Methode (MEM) und wird im folgenden Kapitel detailliert beschrieben.

Mittels der Software LAPLACE, welche von Dr. Z. Zhang entwickelt und zur Verfügung gestellt wurde [113], wurden die kinetischen Verläufe der Austauschreaktion in einheitslosen Häufigkeitsverteilungen als Funktion der Ratenkonstanten dargestellt. Da die LAPLACE Software entwickelt wurde, Austauschreaktionen von Wasserstoff nach Deuterium zu analysieren, mussten die erhaltenen Zahlen an geschützten Deuteronen in Anzahl an ausgetauschten Deuteronen umgerechnet werden (14).

$$H(t) = 19 - D(t)$$

H(t)=Zahl ausgetauschter Amid-Deuteronen als Funktion der Zeit; D(t)=Zahl geschützter Amid-Deuteronen als Funktion der Zeit.

(14)

Die Anzahl an 19 austauschbaren Deuteronen ergibt sich aus der Anzahl an 19 Wasserstoffbrücken-gebundenen Amid-Deuteronen in einer idealen α -Helix aus 23 Aminosäuren. Diese 19 Amid-Deuteronen wurden gleichzeitig als Startpunkt ($t=0$) der Reaktion angesehen, da die Austauschgeschwindigkeit von nicht Wasserstoffbrücken-gebundenen Deuteronen deutlich schneller ist. Gerechtfertigt wird dies auch dadurch, dass die Anzahl an geschützten Deuteronen auch unter Stoppbedingungen in jedem Experiment bereits unterschritten wurde. Die erhaltenen Ergebnisse und die Anzahlen der Deuteronen in definierten

Ratenkonstantenbereichen wurden durch Integration der Fläche der Häufigkeitsverteilung in diesen Bereichen mittels der Kalkulationssoftware Origin (OriginLabs Corporation, USA) erhalten.

3.3.8 Kinetische Analyse der Austauschreaktionen

Die Austauschreaktion eines einzelnen zu beobachtenden Amid-Protons folgt einer Kinetik 1. Ordnung. Dies wird in einer Austauschkinetik als die Anzahl geschützter noch nicht ausgetauschter Protonen als Funktion der Zeit ausgedrückt. Die Amid-Protonen eines Peptids oder Proteins unterscheiden sich in ihren Ratenkonstanten, weshalb eine Austauschkinetik als Verteilung von Ratenkonstanten beschrieben werden kann.

Eine gebräuchliche Methode zur Auswertung kinetischer Austauschdaten wird durch das Dreikomponentenmodell beschrieben. Hier werden allen austauschbaren Amid-Protonen drei unterschiedliche Ratenkonstanten zugeordnet und mit deren Hilfe versucht den kinetischen Verlauf der Austauschreaktion zu beschreiben. Da jedoch jedes Amid-Proton eine individuelle Austauschrate besitzt, kann eine derartige Auswertung nur eine ungenaue Näherung beschreiben.

Am genauesten kann eine Austauschkinetik von N austauschbaren Amid-Protonen demnach durch eine Summe von N Exponentialfunktionen beschrieben werden. Da jedoch in einer derartigen Auswertung keine Rücksicht auf den experimentellen Fehler genommen wird, ist hier im Gegensatz zur Gruppierung in drei Ratenkonstanten von einer Überinterpretation der Daten auszugehen.

Aus diesem Grund wurde von Z. Zhang et al. [113] eine Maximum-Entropie-Methode (MEM) zur Auswertung von Wasserstoff/Deuterium Austauschreaktionen entwickelt. Mit Hilfe dieser Methode können Austauschreaktionen als Ratenkonstantenverteilung unter Einbeziehung des experimentellen Fehlers ausgedrückt werden. Dabei stellt MEM eine statistische Methode dar, welche es erlaubt, das Ergebnis mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auf Basis der experimentellen Fehler zu liefern.

In einem Peptid mit N austauschbaren Protonen kann die Austauschkinetik durch (15) dargestellt werden.

$$D = N - \sum_{i=1}^N \exp(-k_i t) \quad (15)$$

Dabei wird die Zahl der in ein Peptid oder Protein eingebauten Deuteronen (D) als Summe von Exponentialfunktionen eines jeweiligen Deuterons (i) mit dessen spezifischer Ratenkonstante (k_i) und seiner Reaktionszeit (t) definiert.

Durch Anwenden der Laplace-Transformation kann (15) auch durch (16) ausgedrückt werden.

$$D = N - \sum_{k=k_1}^{k_2} f_k \exp(-kt) \quad (16)$$

Dabei wird die Austauschkinetik durch die Wahrscheinlichkeit (f_k) beschrieben, dass das Reaktionssystem Ratenkonstanten zwischen $\log k$ und $\log k + \Delta \log k$ aufweist. k_1 und k_2 beschreiben jeweils die niedrigste und höchste Ratenkonstante, welche im System vorkommen kann. Definiert werden kann dieser Bereich durch die Zahl und den Zeitraum der experimentellen Bedingungen.

Ziel der Darstellung von Ratenkonstanten-Wahrscheinlichkeiten ist es, ebenfalls den experimentellen Fehler mit in die Kalkulation der Verteilung einzubeziehen. Aus diesem Grund wird die Entropie, also die Unschärfe des Systems, maximiert, so dass ein Ergebnis, welches um den experimentellen Fehler bereinigt ist, vorliegt.

Aus diesem Grund geht in die MEM-Auswertung die Definition der Entropie nach Skilling mit ein [114].

$$S = - \sum_{k=k_1}^{k_2} f_k \left[\ln \left(\frac{f_k}{A} \right) - 1 \right] \quad (17)$$

Dadurch kann die Wahrscheinlichkeit (f_k) bestimmt werden, mit welcher die Ratenkonstante k erhalten wird. A spiegelt den wahrscheinlichsten Wert oder die relative Häufigkeit von f_k wieder, falls keine weiteren Bedingungen eingeführt werden können.

Der Prozess der Maximierung der Entropie unterliegt als einziger Bedingung der Einschränkung gemäß des experimentellen Fehlers, welcher durch (18) berücksichtigt wird.

$$\chi^2 = \sum_t \frac{(D_t^{calc} - D_t^{exp})^2}{\sigma_t^2} \quad (18)$$

Ohne die Einführung dieser Einschränkung wäre die Entropie dann maximal, wenn alle Wahrscheinlichkeiten (f_k) eine Ratenkonstante k zu erhalten gleich wären. Damit erhielte man eine gleichmäßig Verteilung von Ratenkonstanten in Form einer Parallele zur X-Achse. Die Bedingung der Entropiemaximierung (χ^2) ist nun an die Standardabweichung (σ_t) zum Zeitpunkt t mit der experimentell bestimmten Anzahl an ausgetauschten Deuteronen (D_t^{exp}) zum Zeitpunkt t und der aus (16) ermittelten Anzahl an Deuteronen (D_t^{calc}) geknüpft.

Dadurch erhält man eine Häufigkeitsverteilung von Ratenkonstanten als Funktion des Logarithmus der Ratenkonstanten.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden präsentiert. Verschiedene synthetische Modellpeptide wurden hinsichtlich ihrer Struktur und strukturellen Dynamik charakterisiert. Des Weiteren wurden einige der Peptide noch hinsichtlich ihrer Fusogenität untersucht.

Zunächst wird eine verbesserte Auswertung von Zirkular Dichroismus Daten kleiner Peptide gezeigt.

Weiterhin wird in den folgenden Kapiteln der Einfluss von unterschiedlichen Zusammensetzungen der beiden Aminosäuren Leucin und Valin auf die Sekundärstruktur und Dynamik fusogener Peptide genauer beleuchtet.

Ein weiteres Augenmerk gilt den flankierenden Resten derartiger Modellpeptide. Die beiden Aminosäuren Histidin und Lysin wurden hier vergleichend betrachtet.

N-terminale Acylketten an Modellpeptiden wurden ebenfalls einer detaillierten Untersuchung unterzogen.

4.1 Entwicklung des Zirkular Dichroismus-CDNN/PEPFIT Algorithmus

Die Sekundärstruktur von Proteinen bis hin zu kleinen Peptiden kann mit Hilfe der Zirkular Dichroismus-Spektroskopie schnell bestimmt werden. Für die Interpretation der CD-Spektren werden in den meisten Fällen die Spektren von strukturell gut charakterisierten, globulären Proteinen, herangezogen, mit deren Hilfe eine unbekannte Struktur eines Proteins über einen Vergleichs-Algorithmus bestimmt wird.

Eine weit verbreitete Software zur Auswertung von CD-Spektren ist der CDNN-Algorithmus, mit dessen Hilfe die Sekundärstruktur von Proteinen bestimmt werden kann. Für die Auswertung von Sekundärstrukturanteilen kleiner Peptide hat sich dieser Algorithmus jedoch als ungenügend erwiesen. Globuläre Proteine haben im Gegensatz zu Peptiden Tertiärstrukturen, wie sehr lange gedrehte β -Faltblatt-Strukturen oder auch geknickte, gepackte α -helikale Strukturen. Außerdem findet sich in globulären Proteinen eine Überrepräsentation von α -helikaler Sekundärstruktur. Dies führt häufig zu einer deutlichen Missinterpretation von CD-Daten kurzer Peptide, vor allem einer Überbewertung des Anteils an α -Helix innerhalb der Peptide.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtete sich auf die strukturelle Charakterisierung von synthetischen Peptiden, weshalb eine exakte und schnelle Methode der Auswertung von CD-Daten notwendig war.

Zur verbesserten Bestimmung der Sekundärstruktur kleiner Peptide wurde der PEPFIT-Algorithmus [115] entwickelt. In diesen PEPFIT-Algorithmus wurden künstliche Modellspektren, welche auf einer

Reihe von kleinen Homopolymeren als auch Heteropolymeren basierten, implementiert. Die Strukturen der Polymere waren aus NMR-Daten und/oder Röntgenstrukturaufklärungen bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass die PEPFIT-Software ein manuelles Angleichen der Kurven an die experimentellen Daten erfordert und somit ebenfalls nicht frei von Fehlern ist und dies außerdem eine äußerst zeitaufwendige Prozedur darstellt, wurde in dieser Arbeit eine Möglichkeit entwickelt, die Schnelligkeit und automatisierte Auswertung der CDNN-Software mit der Spezifität der PEPFIT-Software für kleine Peptide zu kombinieren.

Zuerst wurden dafür 20 virtuelle CD-Spektren mit Hilfe von PEPFIT unter Vorgabe bestimmter Sekundärstrukturgehalte rückgerechnet. Diese 20 Spektren repräsentieren einen Querschnitt über verschiedenste Kombinationen aus den Sekundärstrukturelementen α -Helix, β -Faltblatt, allgemeinem Schleifen-Motiv und unstrukturiertem Zufallsknäuel. Abb. 16 A zeigt die prozentualen Sekundärstrukturanteile der virtuellen Referenzpeptide und Abb. 16 B deren zugehörigen CD-Spektren.

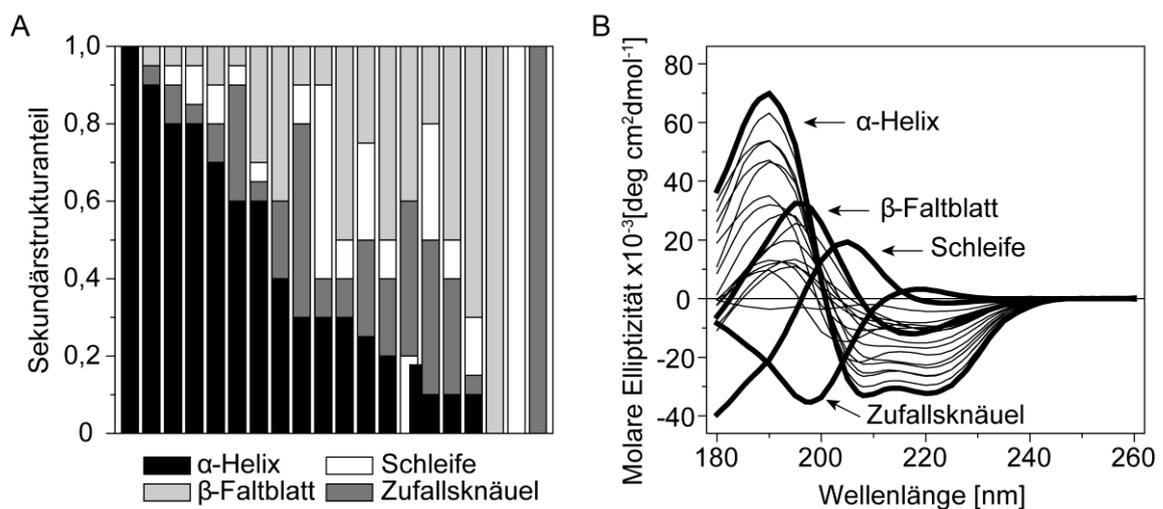


Abb. 16: Referenzspektren für den CDNN/PEPFIT-Algorithmus. A, Sekundärstrukturanteile der 20 virtuellen Referenzpeptide. B, CD-Spektren der 20 Referenzpeptide. 100% der Strukturen α -Helix, β -Faltblatt, Schleife und Zufallsknäuel sind markiert.

Die Referenzspektren wurden mit Hilfe der Kalkulationssoftware Origin in numerische Werte, welche Wellenlänge zu molarer Elliptizität darstellen, konvertiert. Ein Datenfile, welches diese numerischen Reihen aller zwanzig Peptide enthielt, wurde in ein CDNN kompatibles File konvertiert. Da der CDNN-Algorithmus auf einem künstlichen neuronalen Netzwerk beruht, wurde die Software mit den neu implementierten Spektren trainiert.

Die Funktionalität der trainierten CDNN-Software mit den Peptid-Referenzspektren wurde im Vergleich zur herkömmlichen PEPFIT-Software und der CDNN-Software mit einem Standardsatz an TMD-Peptiden evaluiert. Abb. 17 A zeigt CD-Spektren von LV16 in verschiedenen Mischungen von TFE und wässrigem Puffer. Das Peptid wurde von 100 % TFE nach 20 % TFE/ 10 mM Ammoniumacetat Puffer (v/v) titriert. Dabei zeigte sich, dass das Spektrum des Peptids in 100 % TFE einem sehr α -helikalem Muster entspricht und während der Titration hin zu wässrigem Medium in ein

β -Faltblatt Spektrum wechselt. Die Auswertung der aufgezeichneten Spektren ist in Abb. 17 B gezeigt. Dabei repräsentieren die geschlossenen Symbole die Ergebnisse des neuen CDNN/PEPFIT-Programms und die offenen Symbole zeigen die Auswertung mittels CDNN. Nur CDNN/PEPFIT offenbarte auch in der Auswertung den markanten Umschwung von α -Helix zu β -Faltblatt, während CDNN das β -Faltblatt Spektrum als sehr α -helikal interpretierte.

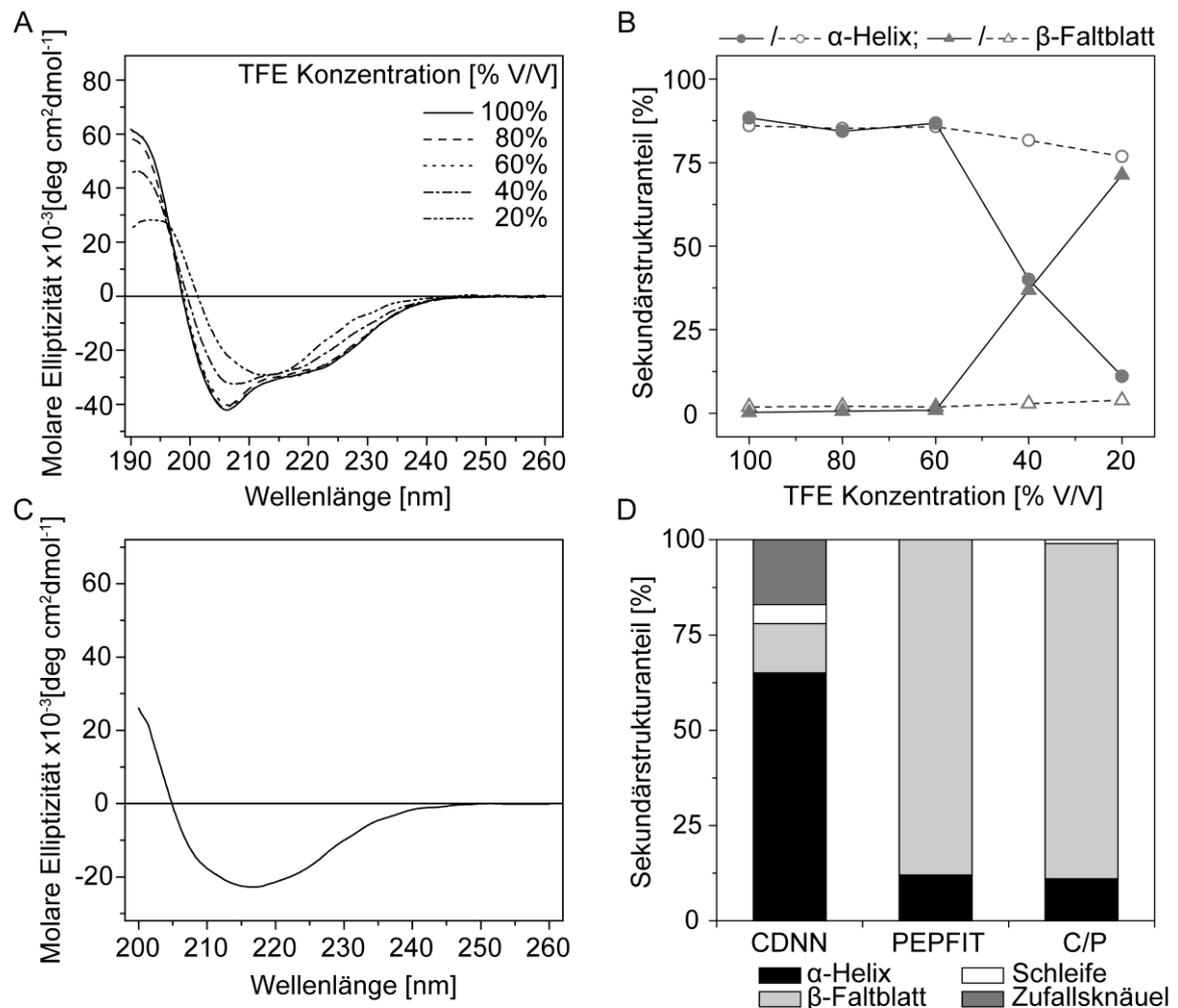


Abb. 17: Validierung von CDNN/PEPFIT: A, CD-Spektren von 20 μM LV16 in verschiedenen Mischungen von TFE und 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4. Die Prozentangaben beschreiben die Konzentration an TFE (% V/V). B, Auswertung der Spektren aus A mit Hilfe von CDNN und Protein Referenzspektren (offene Symbole), und mit Hilfe von CDNN/PEPFIT (geschlossene Symbole); kreisförmige Symbole bezeichnen die α -Helix, dreieckige Symbole das β -Faltblatt. C, CD-Spektrum von LV16 G8P9 1 mol-% in POPC/DOPE/DOPS Liposomen. D, Auswertung nach Sekundärstruktur mit Hilfe von CDNN, PEPFIT und CDNN/PEPFIT (C/P).

Als weiterer Test wurde das in Abb. 17 C gezeigte Spektrum von LV16 G8P9 in POPC/DOPE/DOPS Membranen ausgewertet. Dabei wurden für die Auswertung des Spektrums, welches die charakteristischen Merkmale eines β -Faltblatt-Spektrums aufweist, alle drei Algorithmen benutzt. CDNN/PEPFIT erkennt wie die original PEPFIT-Software den hohen Anteil an β -Faltblatt, während der CDNN-Algorithmus einen markanten α -helikalen Sekundärstrukturanteil anfittet (Abb. 17

D). Der CDNN/PEPFIT-Algorithmus zeigte in weiteren Tests eine verbesserte Auswertung im Vergleich zu CDNN und erwies sich als wesentlich einfacher in seiner Handhabung als die PEPFIT-Software.

4.2 Synthetische Modellpeptide

Eine Reihe von synthetischen Modellpeptiden wurde in vorliegender Arbeit hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften charakterisiert. Das Design dieser Peptide wurde zum Teil in früheren Arbeiten entwickelt [45]. In Anlehnung an natürlich vorkommende TMDn von SNARE-Proteinen wurden hydrophobe Kernsequenzen aus unterschiedlichen Verhältnissen von α -Helix-stabilisierenden und -destabilisierenden Aminosäuren zusammengesetzt.

Die Primärstrukturen dieser synthetischen Modellpeptide sind in Abb. 18 zusammengefasst. Nachfolgend werden diese Peptide als „LV-Peptide“ bezeichnet.

A	L16	KKKWLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLKKK	LV- Verhältnis
	LLV16	KKKWLLVLLVLLVLLVLLVLLVKKK	
	LV16	KKKWLVLVLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
	VVL16	KKKWVVLVVLVVLVVLVVLVVKKK	
B	LVL	KKKWLLLLLVVVVVLLLLLLLLKKK	unregelmäßige Varianten
	VLV	KKKWVLLLLLLLLLLLLLVVVKKK	
	L-LV-L	KKKWLLLVLVLVLVLVLLLLKKK	
	LV-L-LV	KKKWLVLLLLLLLLLVLVVKKK	
C	H6-L16	HHHWLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLHHH	His- Varianten
	H6-LV16	HHHWLVLVLVLVLVLVLVLVVHHH	
	H6-LV16 G8P9	HHHWLVLVLVLV GP VLVLVVHHH	
D	LV16	KKKWLVLVLVLVLVLVLVLVVKKK	Helix- brecher
	LV16 G8	KKKWLVLVLV L GLVVLVVLVKKK	
	LV16 P8	KKKWLVLVLV L PLVVLVVLVKKK	
	LV16 G8P9	KKKWLVLVLV L GPVVLVVLVKKK	
	LV16 P8G9	KKKWLVLVLV L PGVVLVVLVKKK	
	LV16 G6P10	KKKWLVLV L GLV L PLVVLVVLVKKK	
LV16 GPPG	KKKWLVLV GP LVLV P GLVVLVKKK		
E	LV12	KKKWLVLVLVLVLVLVVKKK	hydrophobe Länge
	LV16	KKKWLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
	LV20	KKKWLVLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
	LV24	KKKWLVLVLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
F	ac2 LV16	ac2-KKKWLVLVLVLVLVLVLVVKKK	acylierte Varianten
	ac8 LV16	ac8-KKKWLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
	ac12 LV16	ac12-KKKWLVLVLVLVLVLVLVVKKK	
	ac16 LV16	ac16-KKKWLVLVLVLVLVLVLVVKKK	

Abb. 18: Die Primärstruktur der verwendeten synthetischen Modellpeptide. A, Peptide mit unterschiedlichem Leucin/Valin (Leu/Val) Verhältnis im hydrophoben Kern. B, α -Helix-stabilisierendes Leucin (Leu) und α -Helix-destabilisierendes Valin (Val) wurden zur terminalen Stabilisierung oder Destabilisierung des hydrophoben Bereichs der Peptide genutzt. C, Peptide mit Histidin (His) als flankierenden Aminosäuren. D, Auf dem Hintergrund einer LV16 Sequenz wurde an unterschiedlichen Positionen und in unterschiedlicher Zusammensetzung Glycin (Gly) und/oder Prolin (Pro) eingefügt. E, Auf Basis einer alternierenden Leu/Val Sequenz wurde die Länge des hydrophoben Kernsegments variiert. F, Auf Basis einer alternierenden Leu/Val Kernsequenz wurde N-terminal eine Acetyl-, Octanoyl-, Lauryl- bzw. Palmitoyl-Kette gekoppelt.

Abb. 18 A zeigt Sequenzen deren hydrophober Kern eine Länge von 16 Aminosäuren aufweist. Strukturelle Unterschiede sollten mit diesen Sequenzen den Einfluss der β -verzweigten Aminosäure Valin auf eine α -Helix von Leucin-Resten klären. Valin wirkt wegen seiner Seitenkette als α -Helix-destabilisierend während Leucin die Ausbildung einer α -helikalen Struktur nicht behindert [92, 116, 117].

Um zu testen ob die unterschiedliche konformationelle Flexibilität der Peptide im Zentrum der hydrophoben Kernsequenz oder in den terminalen Bereichen dieser Kernsequenz in Korrelation zur Funktion entscheidend ist, wurden die in Abb. 18 B gezeigten Sequenzen benutzt. Sie enthalten entweder im Zentrum ihrer Sequenz einen Block aus Valin-Resten oder jeweils terminal des hydrophoben Bereichs Blöcke von Valin.

In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Ladung nicht jedoch der Art der flankierenden Aminosäuren der Peptide eine wichtige Bedeutung für die Fusion zukommt [118]. In Abhängigkeit der Ladung der flankierenden Aminosäuren konnte das fusogene Potential auf die Sequenz des hydrophoben Kerns reduziert werden. Histidin(His)-flankierte Peptide wiesen die gleiche Fusogenität auf wie Lysin(Lys)-flankierte Peptide, solange die Histidin-Seitenkette geladen war. Bei physiologischem pH ist die ϵ -Aminogruppe der Lysine sehr wahrscheinlich protoniert, während der Imidazolring der Histidine ($pK_a \approx 6$) ungeladen ist. Anhand der in Abb. 18 C gezeigten Sequenzen sollte der strukturelle Einfluss der flankierenden Aminosäuren getestet werden.

Glycin(Gly) und Prolin(Pro) sind bekannt dafür α -helikale Strukturen zu brechen. Ihr Einfluss auf die Struktur und strukturelle Dynamik wurde getestet, indem jeweils eine oder beide dieser Aminosäuren auf eine alternierende hydrophobe Kernsequenz aus Leucin und Valin aufgesetzt wurden. Abb. 18 D zeigt die verschiedenen Sequenzen mit den Helixbrecher-Motiven.

Hydrophobe Sequenzen zeigten bezüglich ihrer Fusogenität in dem verwendeten Membransystem eine Präferenz für eine bestimmte Länge ihrer hydrophoben Kernsequenz. Mittels der in Abb. 18 E dargestellten Peptide, welche eine alternierende Leu/Val Kernsequenz unterschiedlicher Länge aufwiesen, wurden strukturelle Eigenschaften in Abhängigkeit der Länge der Kernsequenz getestet.

Natürlich vorkommende, fusogene Proteine weisen zum Teil Acylierungen auf. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Satz an Peptiden mit N-terminaler Acylierung unterschiedlicher Länge genutzt (Abb. 18 F), um den Einfluss der Acylketten aus strukturellen Einflüssen heraus zu untersuchen.

Diese Peptide werden in den folgenden Kapiteln hinsichtlich ihrer strukturellen und strukturdynamischen Eigenschaften charakterisiert. Die Fusogenität einiger Peptide wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht [45, 118]. Einige neue Sequenzen wurden hier hinsichtlich ihrer Fusogenität untersucht.

4.3 Struktur-Eigenschaften der aliphatischen Varianten

Peptide mit unterschiedlichem Verhältnis an Leucin zu Valin bildeten die Basis der vorliegenden Arbeit. In früheren Arbeiten [45] wurde ein Zusammenhang zwischen Fusogenität membranintegrierter Modellpeptide und deren konformationeller Flexibilität festgestellt. Verantwortlich für die konformationelle Flexibilität dieser Peptide scheint ein sinkendes Leu/Val Verhältnis zu sein. Die β -verzweigte Aminosäure Val behindert die α -helikale Faltung und sorgt innerhalb einer α -Helix für strukturelle Flexibilität. Als Flexibilität wird im Folgenden die Tendenz bezeichnet eine bestehende α -Helix zum β -Faltblatt umzufalten bzw. lokal Wasserstoffbrückenbindungen zu öffnen ohne eine α -Helix komplett zu entfalten.

Die Tendenz der Peptide von einer α -Helix zu einem β -Faltblatt umzufalten, wurde mit Hilfe von Polaritätstitrationen und Zirkular Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) bestimmt. Das lokale Öffnen von Wasserstoffbrücken, also die lokale Dynamik einer α -Helix, wurde mit Hilfe von Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimenten (H/D-Austausch) und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht.

4.3.1 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der aliphatischen Varianten

Die Stabilität der α -helikalen Faltung wurde bestimmt, indem 20 μ M Lösungen der Peptide in Trifluoroethanol (TFE), welches die Ausbildung von α -helikalen Strukturen begünstigt [30, 119], hin zu polaren wässrigen Pufferlösungen (Ammoniumacetat, 10 mM, pH 7,4) titriert wurden. Ein Umfalten der Sekundärstruktur der Peptide im Verlauf der Titration von apolarer Lösung in Richtung wässriges Medium wird als konformationelle Flexibilität betrachtet. Die Polarität des Lösungsmittels bei der es zum Entfalten der α -helikalen Struktur der Peptide kommt, kann als Maß für die Stabilität der Helix des jeweiligen Peptids verwendet werden und beschreibt damit seine konformationelle Flexibilität.

Abb. 19 A und B zeigen die jeweiligen prozentualen Sekundärstrukturanteile an α -Helix (Abb. 19 A) und β -Faltblatt (Abb. 19 B) für die Peptide der aliphatischen Reihe in Abhängigkeit der Konzentration an TFE. Aus Abb. 19 A und B wird ersichtlich, dass die Peptide ab einem 1:1 Verhältnis von Leucin zu Valin im hydrophoben Kern dazu neigten, im polarerem Lösungsmittel ihre Struktur von einer α -Helix zu einem β -Faltblatt umzufalten. Ein hoher Anteil an Leucin dagegen stabilisierte die α -Helix der Peptide auch in polarem Lösungsmittel.

Die Sekundärstruktur der Peptide wurde ebenfalls in ihrer funktionell relevanten Umgebung, integriert in liposomalen Membranen, bestimmt. Dazu wurden die Peptide in kleine unilamellare Liposomen, welche aus den synthetischen Lipiden Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC),

Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin (DOPE) und Dioleoyl-Phosphatidylserin (DOPS) (Gewichtsverhältnis 3:1:1) bestanden, in einem Peptid/Lipid-(P/L-)Verhältnis von 0,01 integriert und mittels CD-Spektroskopie deren Sekundärstruktur bestimmt.

Abb. 19 C zeigt exemplarisch Spektren einer Messung der Peptide in liposomalen Membranen. Alle Peptide wiesen ein ausgeprägt α -helikales Spektrum auf. Lediglich das Peptid VVL16 mit einem Leu/Val Verhältnis von 0,46 zeigte in liposomalen Membranen eine Mischung aus α -Helix und β -Faltblatt. Auch in Lösung konnte für VVL16 bedingt durch die hohe Anzahl an Valin-Resten ein erniedrigter Gehalt an α -Helix bestimmt werden. Außerdem war für dieses Peptid die Polarität des Lösungsmittels bei der es zur Entfaltung der α -Helix kam am niedrigsten.

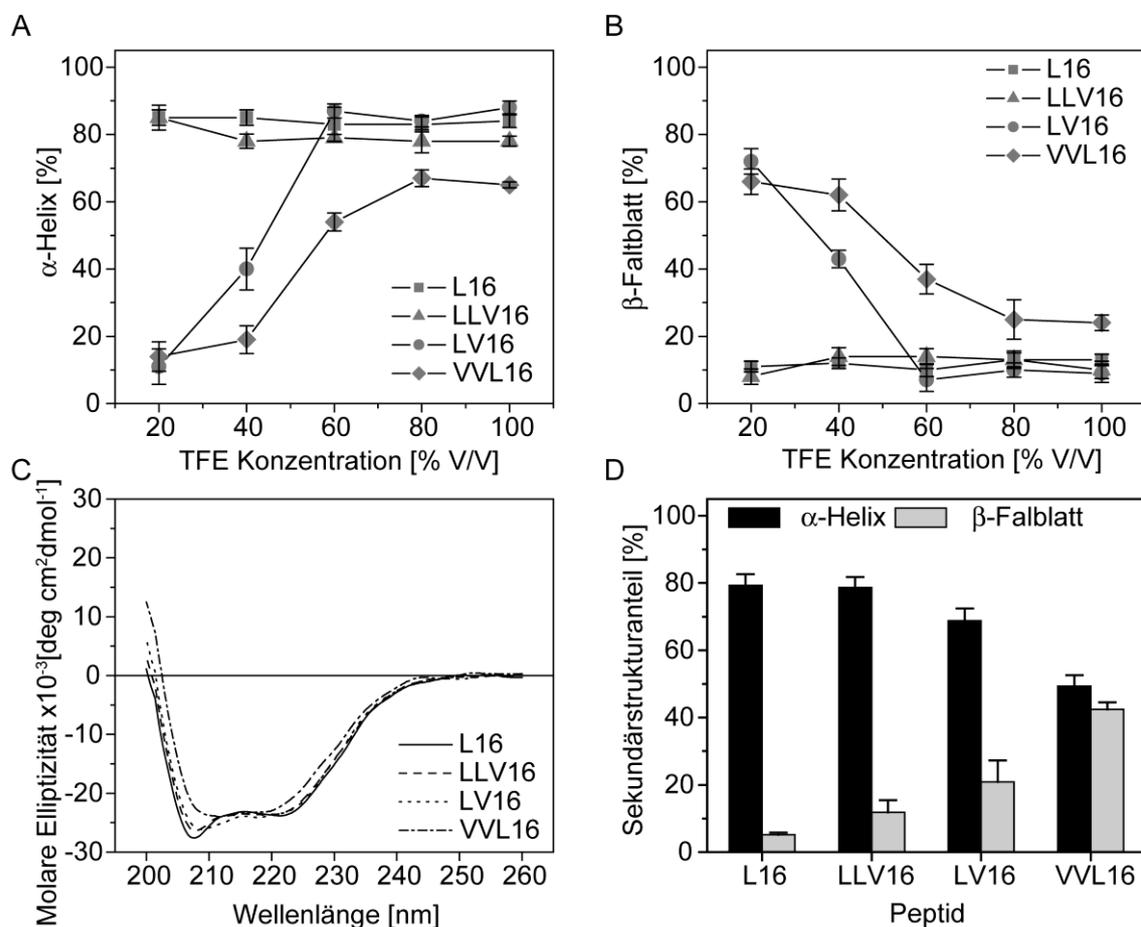


Abb. 19: Bestimmung der Sekundärstruktur der aliphatischen Varianten mittels Zirkular Dichroismus-Spektroskopie. A, Der prozentuale Anteil an α -helikaler Sekundärstruktur als Funktion der TFE-Konzentration. B, Der prozentuale Anteil an β -Faltblatt als Funktion der TFE-Konzentration. C, CD-Spektren der aliphatischen Varianten in Liposomen (1 mol-% Peptid in POPC/DOPE/DOPS 3:1:1 Membranen). D, Die Auswertung der Spektren aus C nach prozentualem Sekundärstrukturanteil (α -Helix, β -Faltblatt); Die angegebenen Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung aus $n=3-5$ Messungen.

Die Ergebnisse der Sekundärstruktur-Analyse zeigten somit, dass ein Leu/Val-Verhältnis von 1 noch vorwiegend α -helikale Faltung erlaubte, während ein niedrigeres Verhältnis schnell zum Entfallen der α -Helix führte. In hohen TFE-Konzentrationen waren auch Peptide mit einem hohen Anteil an Valin

noch überwiegend als α -Helix gefaltet. Auch hier zeigte sich jedoch der Einfluss von Valin destabilisierend auf eine α -Helix einzuwirken.

4.3.2 D/H-Austausch und Helixdynamik der aliphatischen Varianten

Die Tendenz einer α -Helix zum β -Faltblatt umzufalten drückt in Lösung die globale konformationelle Flexibilität eines Peptids aus. Da jedoch in der funktionellen Umgebung der Peptide, also integriert in Membranen, die α -Helix als dominante Struktur bestimmt wurde (Abb. 19 C, D), sollte mittels Wasserstoff/Deuterium(H/D)-Austauschreaktionen die Stabilität der α -Helix eines Peptids selbst genauer charakterisiert werden. Als Flexibilität einer helikalen Struktur kann nämlich auch der Zustand bezeichnet werden, in dem die globale Struktur makroskopisch unverändert bleibt, jedoch kleinere Änderungen, wie das Öffnen und Schließen der Wasserstoff-Brücken zwischen Carbonyl-Sauerstoff und dem Wasserstoff der Amino-Gruppe des Peptidrückgrats auftreten können. Eine normale rechtsgängige α -Helix resultiert aus intramolekularen Wasserstoff-Brücken zwischen der Carbonyl-Gruppe der ersten (i-ten) Aminosäure und dem Wasserstoff der Amino-Gruppe der 5-ten (i+4-ten) Aminosäure. Die Seitenketten der Aminosäuren ragen dabei nach außen.

Der Austausch der Amid-Deuteronen im protischen Lösungsmittel ist nur dann möglich, wenn die Amid-Deuteronen nicht Wasserstoffbrücken-gebunden sind und außerdem zugänglich sind für Wasser bzw. im Base-katalysierten Mechanismus für ein OH⁻-Ion. Dadurch ist es im H/D-Austauschexperiment möglich die Öffnung einer Wasserstoffbrücke innerhalb einer α -Helix zu messen. Die Kinetik dieser Austauschreaktion bzw. des Öffnens und Schließens von intramolekularen Wasserstoffbrücken diene als Maß für die Dynamik der helikalen Konformation der verschiedenen Peptide.

Hierfür wurden Lösungen von deuteriertem Peptid (Amid-Protonen und austauschbare Seitenketten-Protonen wurden durch Deuterium ersetzt) zu einer Endkonzentration von 5 μ M Peptid in protoniertem Puffer (Ammoniumacetat 10 mM, pH 6,5, 60 % TFE) verdünnt. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 20 °C inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen wurde ein Aliquot entnommen, durch Zugabe von Säure (Ameisensäure mit einer Endkonzentration von 1 % V/V) und durch Absenken der Temperatur (Eisbad) die Reaktion verlangsamt, und die Masse des Peptids sofort bestimmt. Durch den Masseunterschied zwischen dem protonierten Peptid und dem gemessenen Peptid nach einer definierten Reaktionszeit konnte die Anzahl an geschützten (zum gemessenen Zeitpunkt noch nicht ausgetauschten) Deuteronen bestimmt werden. Die Kinetik der Austauschreaktion wurde als direktes Maß für die Dynamik der α -Helix der unterschiedlichen Peptide betrachtet.

Abb. 20 zeigt exemplarisch die Massenspektren eines D/H-Austauschexperiments. Aus den Massenspektren wird deutlich, dass sich die deuterierten dreifach geladene Peptidionen mit der Länge der Reaktionszeit kontinuierlich hin zur Masse des protonierten Zustandes verschieben. Dem kontinuierliche Verlauf dieser Masseverkleinerung aufgrund des Austausches von Deuterium gegen

Wasserstoff liegt ein sogenannter EX2 Mechanismus, welcher auf lokalen Fluktuationen von Wasserstoffbrücken-Bindungen beruht, zugrunde.

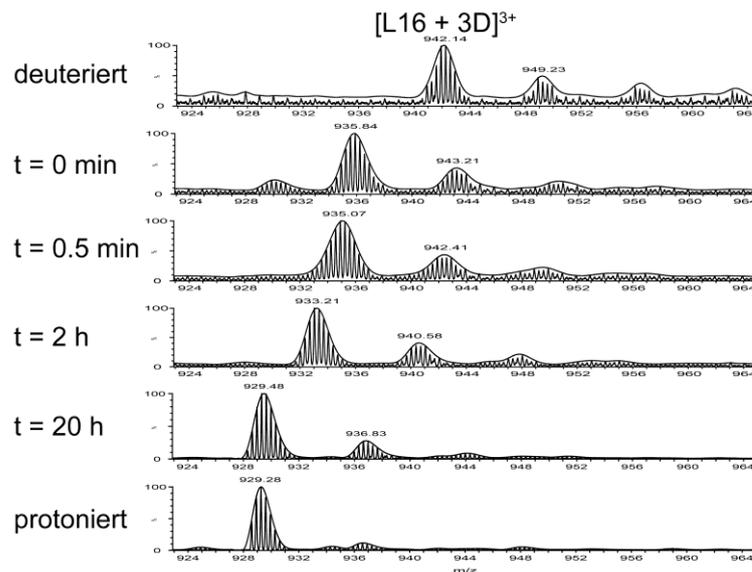


Abb. 20: Repräsentative Massenspektren des L16 Peptids aus einem D/H-Austauschexperiment. Massenspektren zeigen das Peptid zu verschiedenen Austausch-Zeitpunkten (komplett deutertiert, t=0 min (in sauren protonierten Puffer verdünnt), t=0,5 min, t=2 h, t=20 h und im protonierten Zustand).

Die Kinetik dieses Verlaufes konnte also im Folgenden dazu dienen die Dynamik des Öffnens und Schließens von Wasserstoffbrücken in α -Helices zu charakterisieren.

Abb. 21 zeigt für die Peptide der aliphatischen Reihe die Anzahl der verbleibenden Deuteronen als Funktion der Zeit.

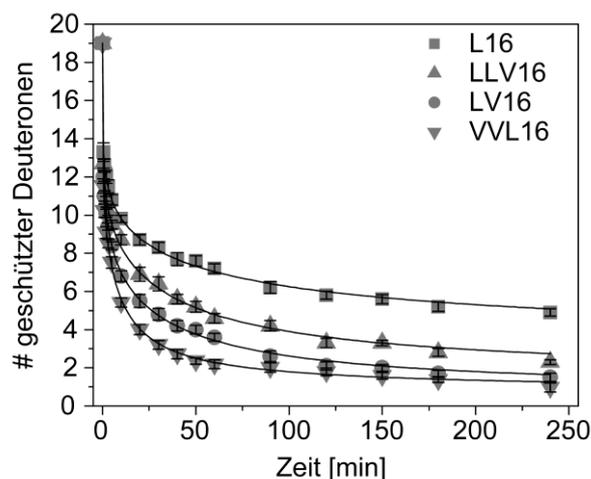


Abb. 21: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 (% V/V) bei 20 °C. Die Standardabweichungen ergaben sich aus 3 Messungen und sind als Fehlerbalken angegeben. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels der MEM-Analyse.

Alle Peptide wiesen in 80% TFE eine α -helikale Struktur auf (Abb. 19). Der Unterschied in der Kinetik des D/H-Austausches spiegelt demnach die unterschiedliche Dynamik der α -Helix wider. Dies bedeutet, dass sich die Wasserstoffbrücken zwischen Carbonyl-Sauerstoff und Amid-Wasserstoff in den schnell austauschenden Peptiden häufiger öffnen bzw. länger geöffnet bleiben als in den langsam austauschenden. Durch Anpassen von mehrfachen Exponentialfunktionen und Auswerten der Ergebnisse mittels Maximum-Entropie-Methode (MEM) [113] konnte jedem Amid-Deuteron eine individuelle Austauschgeschwindigkeit zugeordnet werden. Als Ergebnis erhält man eine Wahrscheinlichkeitsverteilung von Ratenkonstanten, welche bereinigt auf die experimentelle Ungenauigkeit das genaueste Resultat liefert. Um den Vergleich der Peptide auf Basis der kinetischen Parameter zu vereinfachen, wurden die ausgetauschten Amid-Deuteronen in Bereiche verschiedener Ratenkonstanten gruppiert. Dabei wurde zwischen stabilen Deuteronen ($k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), welche innerhalb der Messzeit nicht austauschten, langsam austauschenden Amid-Deuteronen ($1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$), Deuteronen mittlerer Geschwindigkeit ($5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$) und schnell austauschenden Deuteronen ($1,7 \text{ min}^{-1} < k$) differenziert. Dabei repräsentiert die stabile und schnell austauschende Gruppe Deuteronen, welche innerhalb des Experiments nicht messbar waren.

Abb. 22 und Abb. 23 zeigen zum Einen das Ergebnis der MEM-Analyse und zum Anderen die Populationsgröße innerhalb der definierten Gruppen. Hier konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Valin-Gehalt die Anzahl der stabilen Deuteronen abnahm und hin zu schneller austauschenden Bereichen wanderte. Bei gleichem Gehalt an α -helikaler Sekundärstruktur in 80% TFE wiesen die Peptide demnach abhängig von ihrer Primärstruktur eine unterschiedlich stark ausgeprägte Helixdynamik auf.

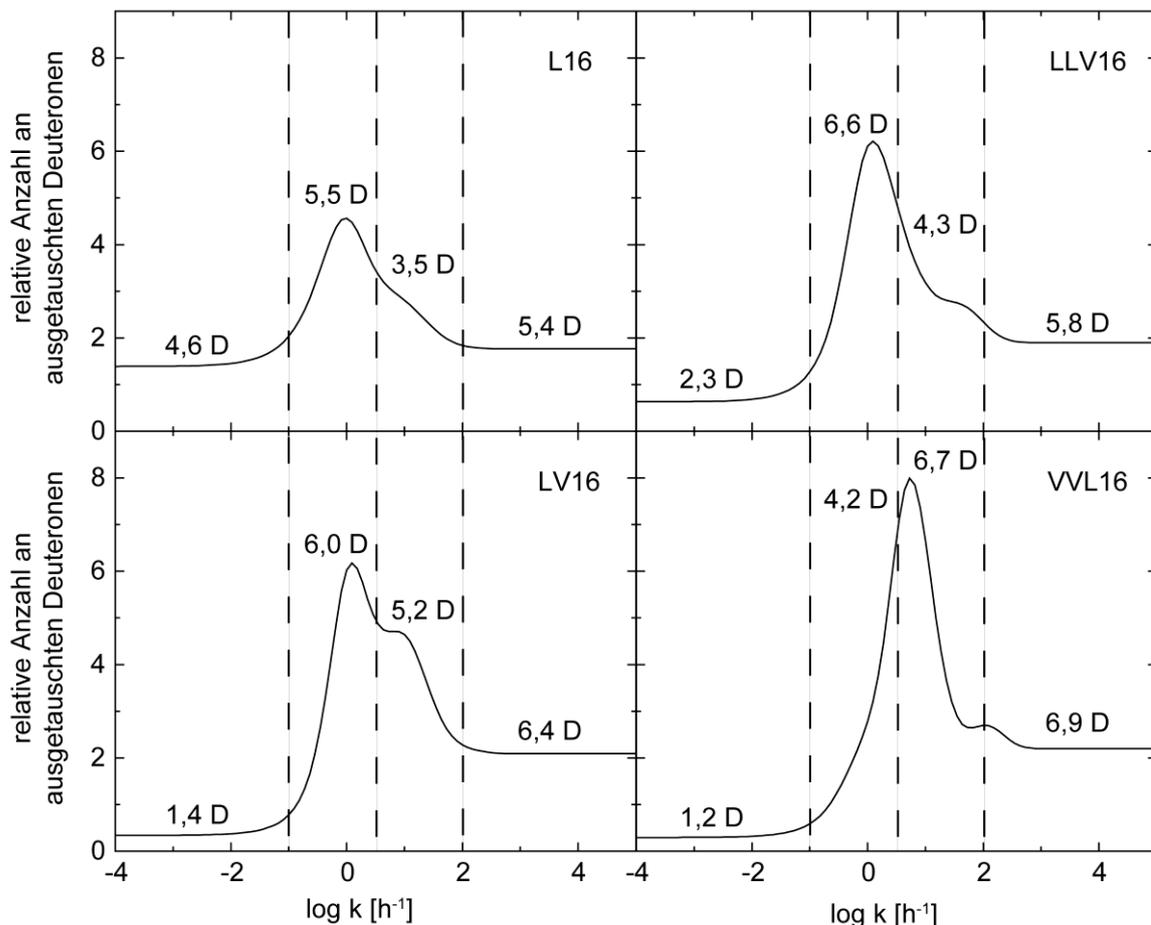


Abb. 22: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Die Häufigkeit (relative Anzahl an ausgetauschten Deuteronen für einen definierten Ratenkonstantenbereich) als Funktion des Logarithmus der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuteronen der Peptide, L16, LLV16, LV16 und VVL16. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, langsam, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind mit gestrichelten Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

Weiterhin konnte offengelegt werden, dass die Geschwindigkeit im Maximum, d.h. die Spitze der Verteilung der Ratenkonstanten, mit einem Leu/Val-Verhältnis von <1 (VVL16) hin zu schnelleren Ratenkonstanten wanderte. Das unterschiedliche Verhalten von VVL16 im Vergleich zu den anderen Peptiden der aliphatischen Reihe könnte in seiner leicht unterschiedlichen Sekundärstruktur begründet sein. In der Betrachtung der Anzahlen der Deuteronen innerhalb der Ratenkonstantenbereiche (Abb. 23) wurde jedoch eine klare Abhängigkeit der jeweiligen Populationsgröße vom Leu/Val Verhältnis gesehen.

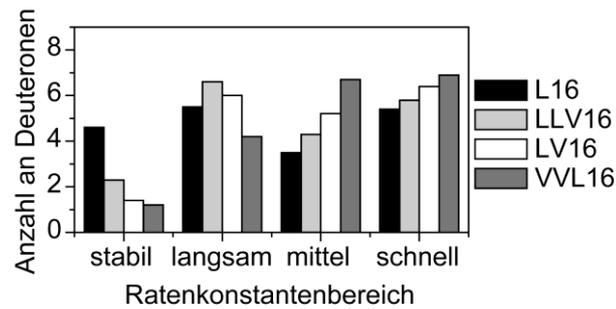


Abb. 23: Die Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Um die Aussagen der punktuell vermessenen Kinetiken zu verbessern, wurden im Folgenden kontinuierlich vermessene Austausch-Kinetiken ausgewertet. Hierbei wurde die Austauschreaktion nach deren Start sofort und kontinuierlich massenspektrometrisch analysiert. Diese Methode bot den Vorteil, dass sie neben ihrer Schnelligkeit auch eine sehr geringe Standardabweichung zwischen den einzelnen Experimenten aufwies. In Abständen von 5 s wurden über 2 h kontinuierlich Massenspektren der Austauschreaktion aufgezeichnet und diese anschließend wie die punktuell aufgezeichneten Kinetiken ausgewertet. Abb. 24 zeigt die Kinetiken für die aliphatischen Varianten über einen Zeitbereich von 2 h.

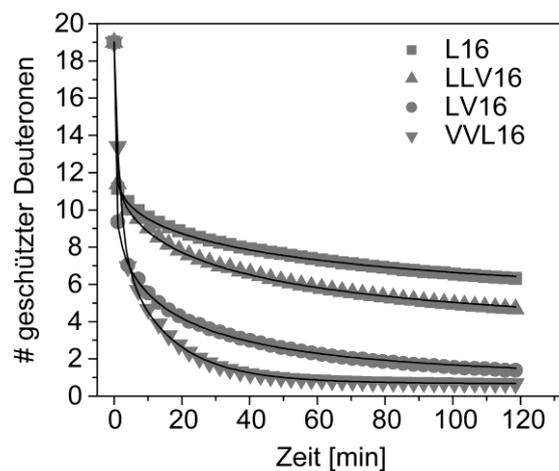


Abb. 24: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 (% V/V) bei 20 °C mittels der kontinuierlichen Messmethode. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels der MEM-Analyse. Die Standardabweichung von $< 0,31$ Deuteronen ergaben sich aus $n=2-3$ Messungen.

Auch in diesem Fall konnte, wie in der zuvor gezeigten Kinetik (Abb. 21), eine sequenzabhängige Austauschgeschwindigkeit der helikalen Peptide festgestellt werden. Abb. 25 zeigt die ermittelte Häufigkeit aus der Auswertung der kontinuierlich vermessenen Kinetiken als Funktion der Ratenkonstanten der verschiedenen Peptide.

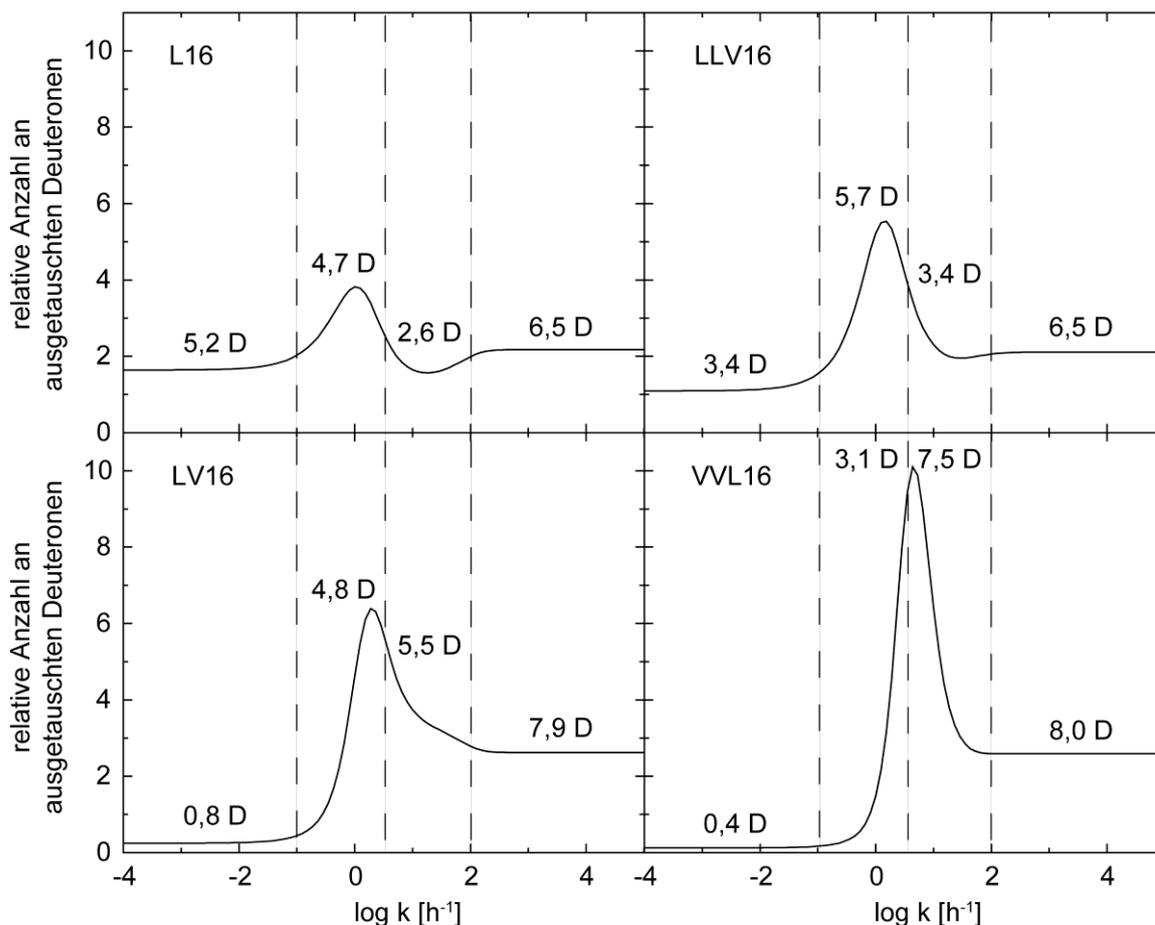


Abb. 25: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Die relative Anzahl an ausgetauschten Amid-Deuteronen der Peptide, L16, LLV16, LV16 und VVL16 aus den kontinuierlich vermessenen Kinetiken. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, langsam, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind durch die gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße ist angegeben.

Auch die jeweiligen Populationsgrößen innerhalb des kontinuierlich vermessenen Experiments (Abb. 26) waren zu denen der ursprünglichen Messmethode (Abb. 23) vergleichbar.

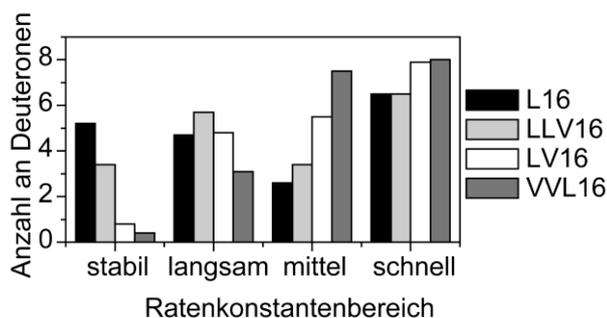


Abb. 26: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass die Dynamik der α -Helix in Lösung mit einer zunehmenden Zahl an β -verzweigtem Valin anstieg. Demnach fördert Valin die konformationelle Flexibilität und strukturelle Dynamik der α -Helix der LV-Peptide. Außerdem kann aufgrund des regelmäßigen Musters der LV-Peptide davon ausgegangen werden, dass der Austausch der Amid-Deuteronen und damit die Stabilität der α -Helix der Peptide von den terminalen Bereichen hin zum Zentrum der Sequenz voranschreitet.

Die Arbeitsumgebung membranfusogener Peptide ist der Phospholipidbilayer. Eine Lipidmembran weist im Unterschied zu Lösungsmitteln ein Polaritätsprofil auf, welches von den polaren Kopfgruppen der Lipide bis zur apolaren Acylkettenregion reicht. Eine membrandurchspannende α -Helix könnte demnach in unterschiedlichen Regionen eines Lipidbilayers einer unterschiedlichen Polarität ausgesetzt sein. Dieser Effekt könnte lokal die Stabilität der α -Helix beeinflussen. Da Aussagen zur Struktur/Funktionsbeziehung fusogener Peptide getroffen werden sollten, war es notwendig ebenfalls Austauschreaktionen im membranintegrierten Zustand durchzuführen. Geht man von einer membrandurchspannenden α -Helix aus könnte der Polaritätsgradient des Lipidbilayers die Stabilität von terminalen Bereichen der Peptide verringern und die der zentralen Bereiche erhöhen. Damit könnte die Helixdynamik innerhalb der liposomalen Membran stark verändert sein.

Für die Messungen wurden deuterierte Peptide in liposomale Membranen aus POPC/DOPE/DOPS (Gewichtsverhältnis 3:1:1) integriert, deuterierte Suspensionen dieser Proteoliposomen 1:10 in protoniertem Puffer (50 mM Ammoniumacetat, pH 7,4) verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, die Reaktion durch Zugabe von Ameisensäure (Endkonzentration 1 %, v/v) und durch Abkühlen verlangsamt und im Massenspektrometer der progressive Austausch bestimmt. Abb. 27 zeigt die Austausch-Kinetik der Amid-Deuteronen der Peptide in Liposomen. Unter den experimentellen Bedingungen war in Liposomen ein Austausch von mindestens 10 Amid-Deuteronen unmöglich. Auch über einen Zeitraum von einer Woche blieben diese 10 Deuteronen vor einem Austausch geschützt. Ausgehend von einem membrandurchspannenden Einbau der Peptide, sind diese geschützten Deuteronen mit hoher Wahrscheinlichkeit den zentralen Resten der α -Helix zuzuordnen. Dies kann auf die niedrige Membrangängigkeit der katalytischen OH⁻-Ionen zurückgeführt werden. Weiterhin könnte jedoch auch eine sehr hohe Stabilität der α -Helix eine Ursache hierfür sein. Die niedrige Polarität der zentralen Region eines Lipidbilayers könnte so die α -Helix stabilisieren. Damit waren jedoch die zentralen Wasserstoffbrücken der Peptide nicht für Aussagen über ihre Dynamik greifbar.

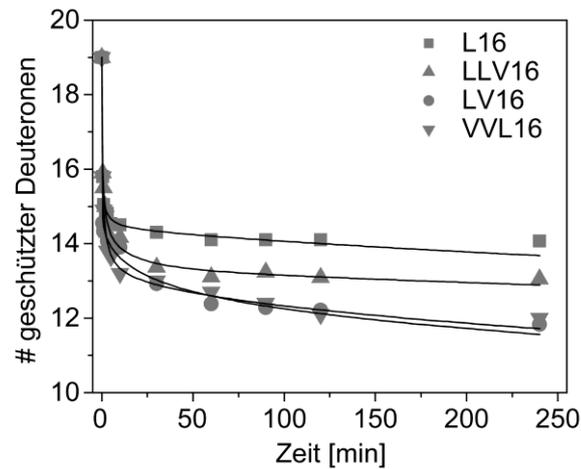


Abb. 27: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in POPC/DOPE/DOPS Membranen bei 37 °C. Peptide wurden zu 1 mol-% im Verhältnis zum Lipid eingebaut. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von < 0,48 Deuterone ergaben sich aus n=2-3 Messungen.

Es konnten dennoch sequenzspezifische Unterschiede im Falle der membrandurchspannenden α -Helices bestimmt werden. Mit steigendem Valin-Gehalt konnte auch für die Peptide in liposomalen Membranen eine höhere Geschwindigkeit im Austausch gemessen werden (Abb. 28 und Abb. 29). Zusätzlich zeigte sich auch, dass der Austausch der verschiedenen Peptide bei einer unterschiedlichen Anzahl an geschützten Deuterone zum Erliegen kam. Dies könnte auf eine unterschiedliche Insertion der Peptide in die Membran zurückzuführen sein oder aber auf eine stark unterschiedliche Helixdynamik am Rande der hydrophoben Acylkettenregion. Die Anzahl der stabilen Deuterone sank in derselben Reihenfolge wie in Lösung, während die Anzahl der mittel und schnell austauschenden Deuterone anstieg (Abb. 29). Nachdem die hydrophobe Kernsequenz der aliphatischen Varianten eine Länge von 16 Aminosäuren aufweist, wurden mindestens 5 Amid-Deuterone (für LV16 und VVL16) dieser hydrophoben Region ausgetauscht. Auch in diesem Bereich weisen die Peptide demnach eine Helixdynamik auf. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Protektion der stabilen Deuterone durch die mangelnde Anwesenheit der katalytischen OH^- -Ionen verursacht wird.

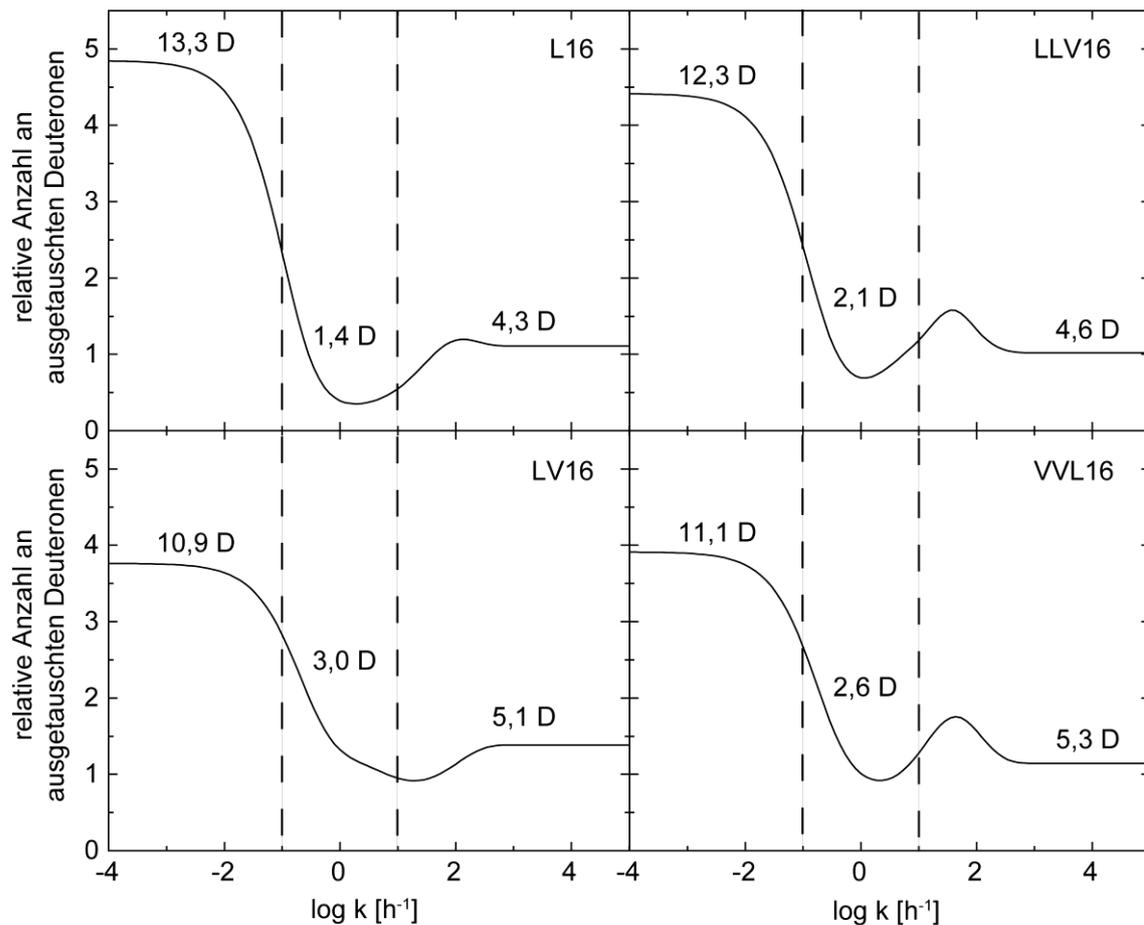


Abb. 28: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Die relative Anzahl an ausgetauschten Amid-Deuteronen der Peptide, L16, LLV16, LV16 und VVL16. Die Datenanalyse der in liposomalen Membranen aus POPC/DOPE/DOPS Lipiden vermessenen Kinetik. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

Ausgehend von der Hypothese, dass ein Austausch von Amid-Deuteronen im Kern eines Lipid-Bilayers nicht begünstigt ist, zeigt Abb. 29, dass die terminale Flexibilität der Valin-reichen VVL16 Sequenz am höchsten war. Die Peptide L16 und LLV16 zeigten im Vergleich zu LV16 und VVL16 eine höhere Stabilität ihrer α -Helix.

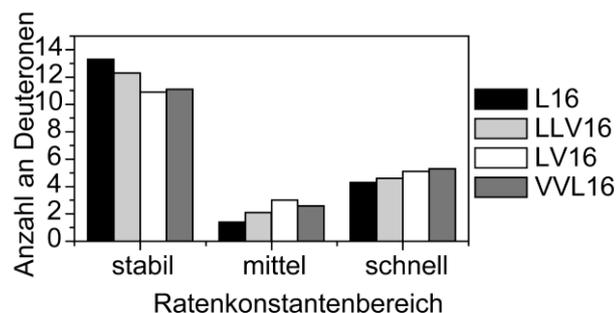


Abb. 29: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1} < k$.

Um Aussagen über die zentralen Reste der membranintegrierten Peptid-Helices zu treffen, wurde versucht durch Verkürzen der Acylketten der Lipide eine höhere Anzahl an Deuteronen innerhalb der liposomalen Membran austauschkompetent zu machen. Peptid-Helices könnten sich bei gleichbleibender Länge ihrer hydrophoben Kernsequenz durch einen steileren Einbauwinkel in eine dünnere Lipidmembran integrieren oder aber mit ihren terminalen Bereichen weiter in polarere Regionen des Lipid-Bilayers ragen. Beide Effekte sollten einen höheren Austausch an Amid-Deuteronen zur Folge haben und damit die Möglichkeit schaffen die Dynamik der α -Helix in einem weiteren Bereich zu messen. Dafür wurden Austausch-Kinetiken in Liposomen aus purem POPC, DMPC und DLPC miteinander verglichen. Abb. 30 zeigt die Kinetik in den unterschiedlichen Lipid-Membranen für die Peptide L16, LLV16 und LV16. Um die kinetische Analyse und die Messung der α -Helix-Dynamik hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Peptiden weiter zu optimieren, wurden die folgenden Experimente in 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5 und bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt. Die hohe Temperatur sollte die Membran-Fluidität erhöhen und damit für eine erhöhte Wasserzugänglichkeit bzw. der katalytischen OH⁻-Ionen sorgen, während der niedrige pH-Wert die Reaktion selbst verlangsamen sollte, so dass Unterschiede zwischen den Peptiden besser detektiert werden konnten.

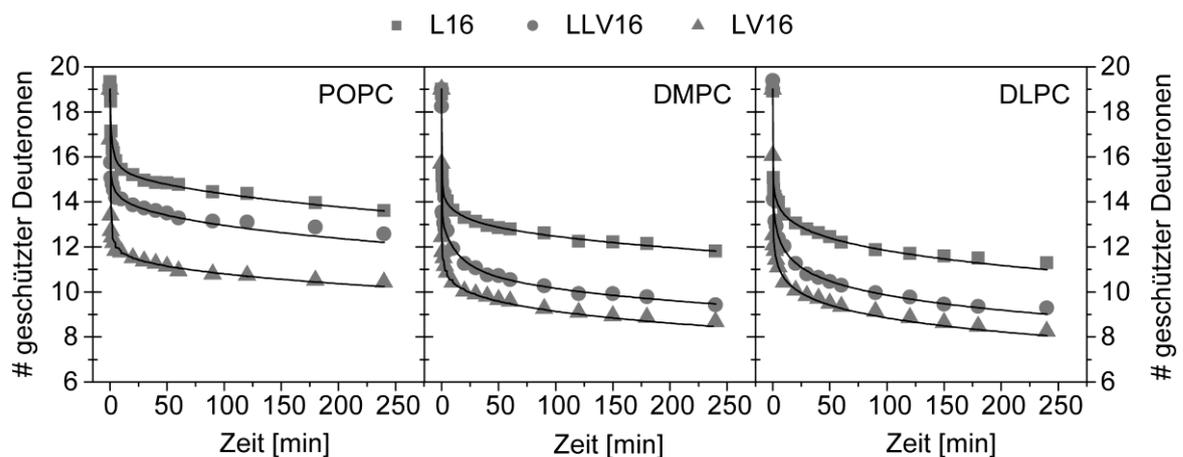


Abb. 30: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in verschiedenen Lipid-Membranen bei 50 °C. Die Peptide wurden zu 1 mol-% im Verhältnis zum Lipid eingebaut. Zur Herstellung der Liposomen wurde entweder POPC (C16:0, C18:1), DMPC (C14:0) oder DLPC (C12:0) verwendet. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels der MEM-Analyse. Die Standardabweichung von < 0,37 Deuteronen ergab sich aus n=2-3 Messungen.

Während die Acylketten von POPC aus einer C16:0 und einer C18:1 Kette besteht, verkürzen sich die Ketten von DMPC (C14:0) und DLPC (C12:0). Im Maximum konnten hierbei ≈ 2 Deuterone mehr ausgetauscht werden. Dies konnte nicht zur entscheidenden Verfeinerung der Messung von Unterschieden in der α -Helix-Stabilität der Peptide beitragen und war somit nur als weiteres Indiz der Membranabschirmung zu werten. Weiterhin blieben somit ca. 8 Deuterone des Peptidrückgrats der

Peptide für eine strukturelle Betrachtung unsichtbar. Abb. 31 zeigt die erhaltenen Ratenkonstanten-Verteilungen.

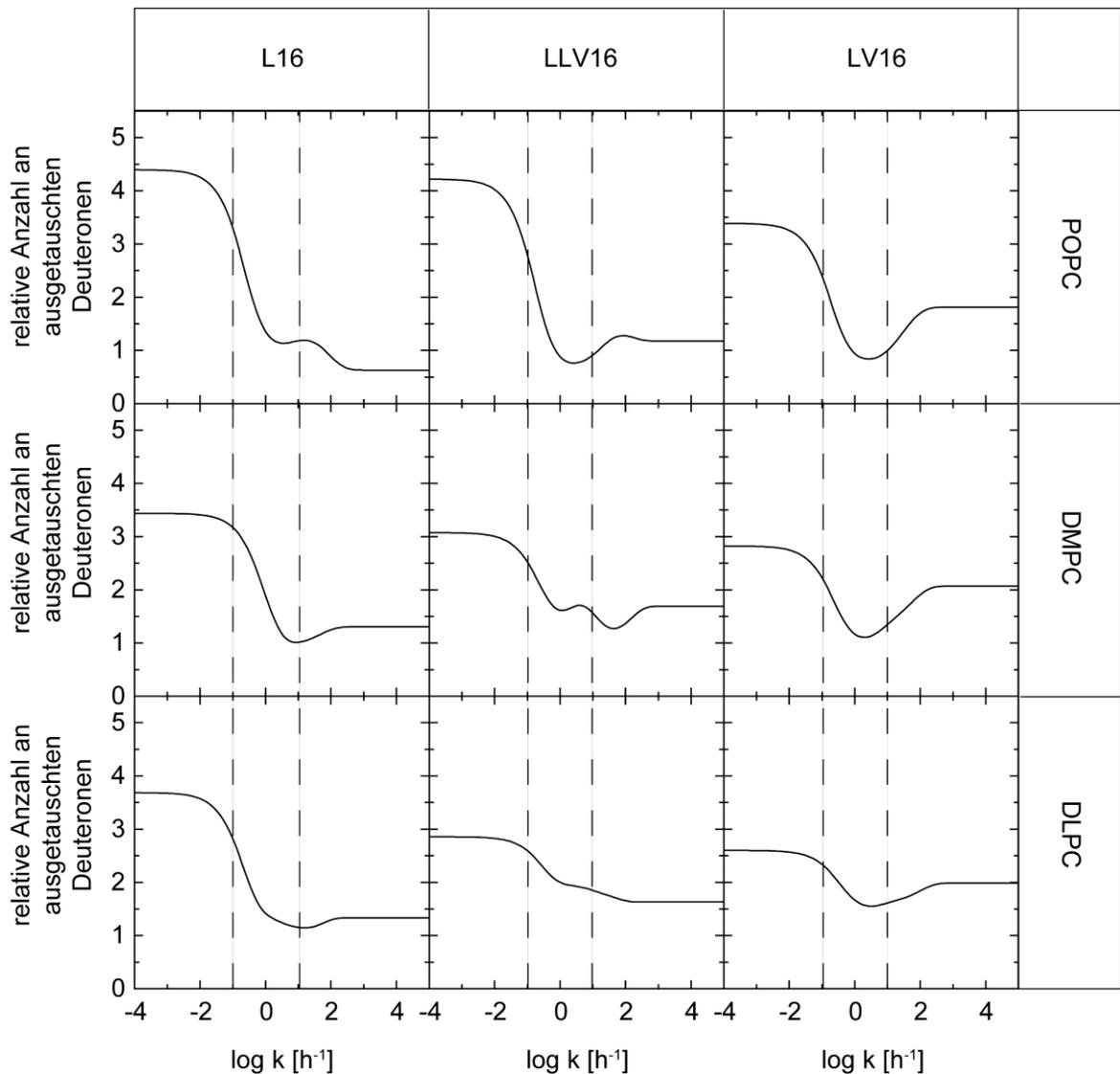


Abb. 31: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuteronen der Peptide, L16, LLV16 und LV16. Datenanalyse der in liposomalen Membranen aus reinem POPC, DMPC und DLPC Lipiden vermessenen Kinetiken. Die definierte Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind durch gestrichelte Linien markiert.

Mit sinkender Acylkettenlänge wurden lediglich die Anzahlen der stabilen Deuteronen zu langsam und schnell austauschenden Deuteronen verschoben, jedoch für alle drei vermessenen Peptide in einem ähnlich hohen Ausmaß. Abb. 32 zeigt, dass die Unterschiede zwischen den Peptiden durch die Änderung der experimentellen Bedingungen (Erhöhung der Temperatur und Senken des pH-Werts) leicht erhöht werden konnten.

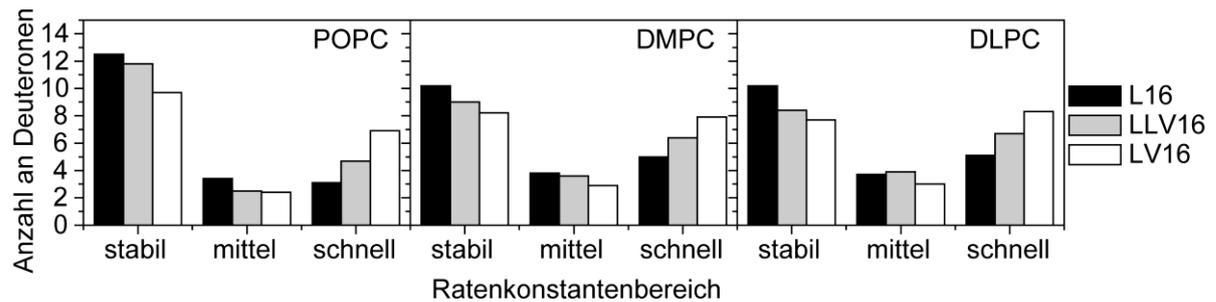


Abb. 32: Anzahl an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1} < k$.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass die β -verzweigte Aminosäure Valin maßgeblich die Stabilität der α -Helix der Peptide beeinflusst. Neben der konformationellen Flexibilität fördert Valin auch die Dynamik der α -Helix selbst, sowohl in Lösung als auch im membranintegrierten Zustand. Durch die Unterschiede in der Helixdynamik der Modellpeptide kann nun versucht werden die Unterschiede in der Fusogenität dieser Peptide und den Mechanismus der Membranfusion zu erklären. Es musste jedoch geklärt werden ob die Helixdynamik im Falle fusogener Peptide die alleinige Triebkraft für den gesamten Ablauf der Fusion darstellt.

4.3.3 Induzierte Fusion der aliphatischen Varianten

Nachdem übereinstimmend zu früheren Arbeiten [39, 45] detailliert geklärt werden konnte, dass konformationelle Flexibilität mit der Fusogenität von Peptiden, welche Transmembrandomänen von Fusionsproteinen nachahmen, verknüpft ist, sollte mit folgenden Experimenten der Zeitpunkt bestimmt werden an welchem diese Flexibilität während der verschiedenen Phasen der Fusion eine Rolle spielt bzw. ob die Helixdynamik die einzige Triebkraft für die Fusion von Membranen darstellt. Eine Oligo-Leucin Sequenz war nicht in der Lage in markantem Ausmaß eine Fusion von Liposomen in vitro zu bewirken und konnte außerdem als sehr stabile α -Helix charakterisiert werden. Falls Flexibilität nur im initialen Schritt der Fusion vom Andocken zweier Vesikel bis hin zur Bildung der „Stalk“-Struktur eine Rolle spielt, so müsste das Fusions-Defizit von L16 durch Präaggregation der Liposomen überwunden werden können.

Aus diesem Grund wurden Fusionsexperimente unter Zugabe verschiedener Mengen an divalenten Ca^{++} -Ionen durchgeführt. Ca^{++} kann mit der Kopfgruppe des Phosphatidylserins, welche durch die Phosphatgruppe netto negativ geladen ist, eine Ladungsinteraktion eingehen und somit Liposomen miteinander verbinden und in engen Kontakt bringen. Abb. 33 A zeigt Fusionskinetiken von L16 und LV16 jeweils mit und ohne 5 mM CaCl_2 . Es konnte gezeigt werden, dass eine Präaggregation der Liposomen die Fusogenität von L16 erhöhen kann.

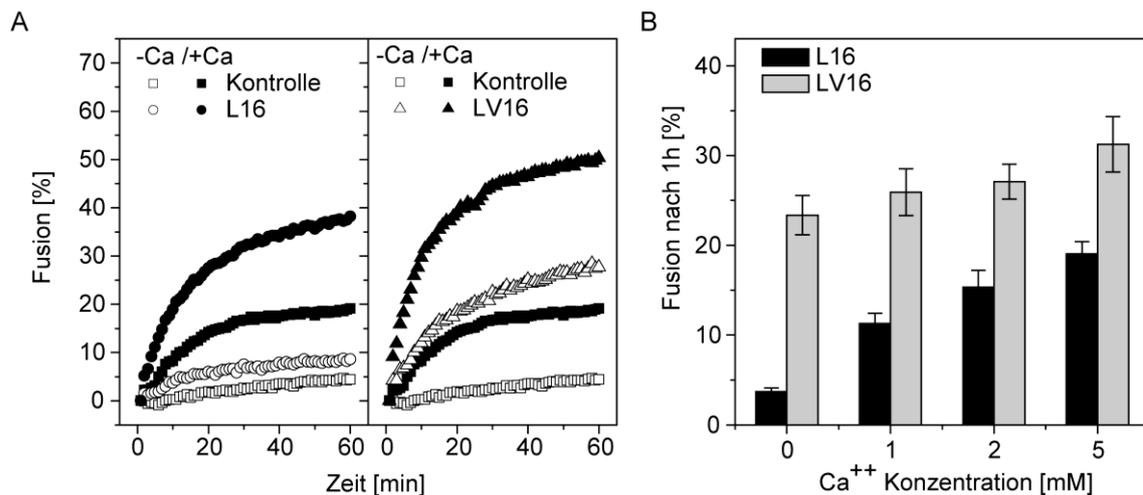


Abb. 33: Durch Präaggregation induzierte Fusion. A, Repräsentative Fusionskinetiken von L16 und LV16 Peptid mit und ohne 5 mM CaCl_2 . Peptid 0,5 mol-% in POPC/DOPE/DOPS (3:1:1) Liposomen. Die Kontrolle entspricht Liposomen ohne integriertes Peptid. B, Fusion nach 1 h abzüglich Leerkontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus $n=4$ Experimenten.

Abb. 33 B zeigt die Ergebnisse der Fusion nach 1 h abzüglich der Werte der Kontrollen. Das Ausmaß der Fusion von L16 erreichte nicht das des fusogenen LV16 Peptids, stieg jedoch mit Erhöhung der CaCl_2 Konzentration stärker an als dies bei LV16 der Fall war und erreichte ein deutlich höheres Ausmaß an Fusion im Vergleich zu Experimenten ohne CaCl_2 in denen L16 als nicht-fusogen betrachtet werden kann. Damit konnte eine entscheidende Bedeutung des Zustands der Membran für eine initiale Phase der Fusion gezeigt werden. Demnach hängt die Fusogenität des stabilen Peptides L16 vom Zustand der Membran ab. Präaggregierte Membranen führen dazu, dass auch L16 zu einem gewissen Maß fusogen wirkt. Dies zeigte auch, dass fusogene Peptide in einem initialen Schritt der Fusion bis zur Vermischung der äußeren Schichten der Membranen eine Rolle spielen. Spätere Phasen der Fusion scheinen jedoch ebenfalls ein gewisses Maß an Flexibilität zu erfordern, da die Fusogenität von LV16 nicht durch L16 erreicht werden konnte.

4.4 Funktion und Struktur-Eigenschaften der unregelmäßigen Varianten

Nachdem im vorangehenden Kapitel der strukturelle Einfluss des Gehalts der β -verzweigten Aminosäure Valin auf eine Peptidsequenz aus α -Helix-stabilisierenden Leucin-Resten getestet wurde, sollte im Folgenden die sequenzspezifische Position von Valin und deren Einfluss auf die Fusogenität und Struktur der Peptide genauer untersucht werden. Unterschiede der Dynamik der aliphatischen Varianten der Peptide, vor allem im membranintegrierten Fall, und eine induzierbare Fusion von L16 legten die Vermutung einer Bedeutung von Flexibilität für initiale Schritte der Fusion nahe. Deshalb sollte das gezielte Einbringen von Flexibilität in terminalen oder zentralen Peptiddomänen die Frage klären, welche dieser Bereiche einen entscheidenden Einfluss auf die Fusogenität der Peptide ausüben.

Alle unregelmäßigen Varianten besitzen ein Leu/Val-Verhältnis von 11:5, welches dem der LLV16 Sequenz entspricht. Damit sollte durch ein lokales Einfügen von Valinblöcken die Stabilität und Flexibilität in definierten Bereichen modifizierbar sein ohne die α -helikale Grundstruktur der Peptide komplett zu destabilisieren.

4.4.1 Fusion der unregelmäßigen Varianten

Die Fusions-Experimente der unregelmäßigen Peptide LVL, VLV, L-LV-L und LV-L-LV wurden jeweils in verschiedenen Peptid/Lipid-Verhältnissen durchgeführt. Abb. 34 A zeigt die gemittelten Fusions-Kinetiken bei einem nominellen P/L-Verhältnis von 0,005. Die Auswertung der Kinetiken zeigte, dass LVL und L-LV-L nicht fusogen waren, während VLV und LV-L-LV eine höhere Fusogenität aufwiesen als LLV16. Dennoch wurde die Fusogenität von LV16 durch keine der unregelmäßigen Varianten erreicht. Dadurch wurde deutlich, dass Flexibilität bzw. das Destabilisieren der Peptide durch Valin in den terminalen hydrophoben Bereichen der Peptide ein Erfordernis für den Fusionsvorgang darstellte, da sowohl L16, als auch die terminal stabilisierten Peptide (LVL, L-LV-L), keine Fusogenität bewirken konnten. Flexibilität in den zentralen Bereichen dagegen konnte lediglich das Ausmaß der Fusion steigern, da die unregelmäßigen Varianten mit der Zusammensetzung von LLV16 höhere Fusogenität als LLV16 aufwiesen, jedoch nicht das von LV16 erreichen konnten.

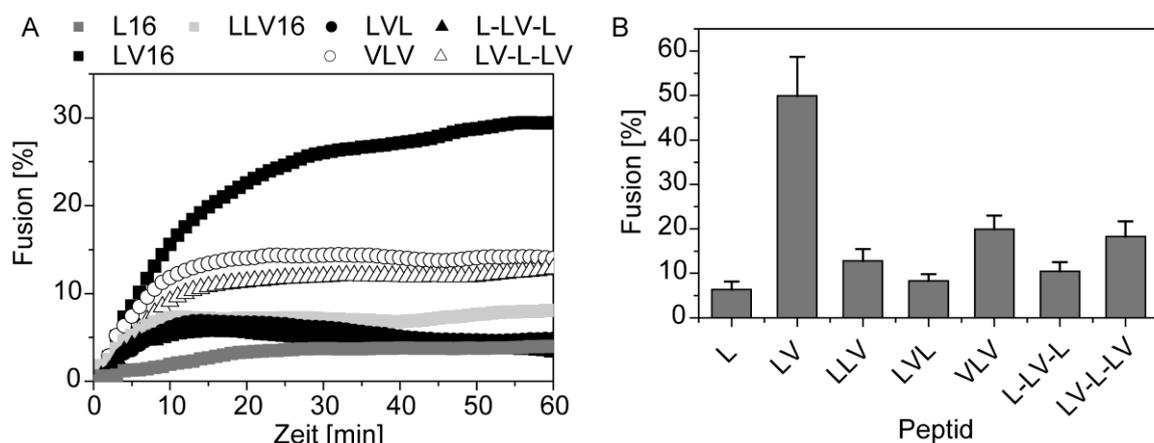


Abb. 34: Fusogenität der unregelmäßigen LV-Varianten. A, Gemittelte Fusions-Kinetik von Peptiden bei einem nominelle P/L-Verhältnis von 0,005 in POPC/DOPE/DOPS (3:1:1) Liposomen. B, Fusion nach einer Stunde normiert auf ein P/L-Verhältnis von 0,0075. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler aus 8 unabhängigen Experimenten.

Abb. 34 B zeigt die Fusogenitäten der Peptide normiert auf ein P/L-Verhältnis von 0,0075. Hierbei wird deutlich, dass die Peptide VLV und LV-L-LV bei gleichem Leu/Val Verhältnis eine höhere Fusogenität als LLV16 besitzen, während LVL und L-LV-L eine niedrigere Fusogenität als das LLV16 Peptid aufwiesen. Dennoch konnte das Fusogenitäts-Maximum von LV16 durch keine der unregelmäßigen Varianten erreicht werden, was ein Erfordernis eines flexiblen Kernbereichs der Peptide

für die Fusion nahelegt. Alleine aus den Fusionsexperimenten konnte jedoch nicht geklärt werden in welchen Stadien der Fusion die unterschiedlich flexiblen Domänen der Peptide notwendig sind.

4.4.2 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der unregelmäßigen Varianten

Die konformationelle Flexibilität im Sinne der Umfaltung von einer α -Helix zu einem β -Faltblatt wurde durch Polaritätstitrationen und Zirkular Dichroismus Messungen bestimmt. Um eine Korrelation zwischen Fusogenität und Sekundärstruktur-Dynamik aufstellen zu können, war eine α -helikale Grundstruktur aller Peptide in apolarem Medium in ähnlich hoher Ausprägung erforderlich.

Abb. 35 A zeigt CD-Spektren der unregelmäßigen Peptid-Varianten im Vergleich zum LLV16 Peptid. Alle Peptide wiesen ein hohes Maß an α -Helix auf. Keines der Peptide zeigte analog zu LLV16 im Verlauf der Polaritätstitration von 100% TFE zu 20% TFE eine deutliche Tendenz auf seine α -Helix zu entfalten. Damit ist die globale Sekundärstruktur aller Peptide ähnlich stabil, was bedeutet, dass nur ein geringes Maß an konformationeller Flexibilität durch die Blöcke an Valin-Resten in die Peptide eingebracht wurde. Abb. 35 B zeigt den prozentualen Anteil an α -helikaler Struktur als Funktion der TFE-Konzentration. Abnahmen im Gehalt an α -Helix wurden zu ähnlich hohen Teilen durch β -Faltblatt und Zufallsknäuel-Struktur kompensiert. Damit zeigte sich in allen Peptiden eine ähnlich stark ausgeprägte schwache Tendenz zur Umfaltung zum β -Faltblatt.

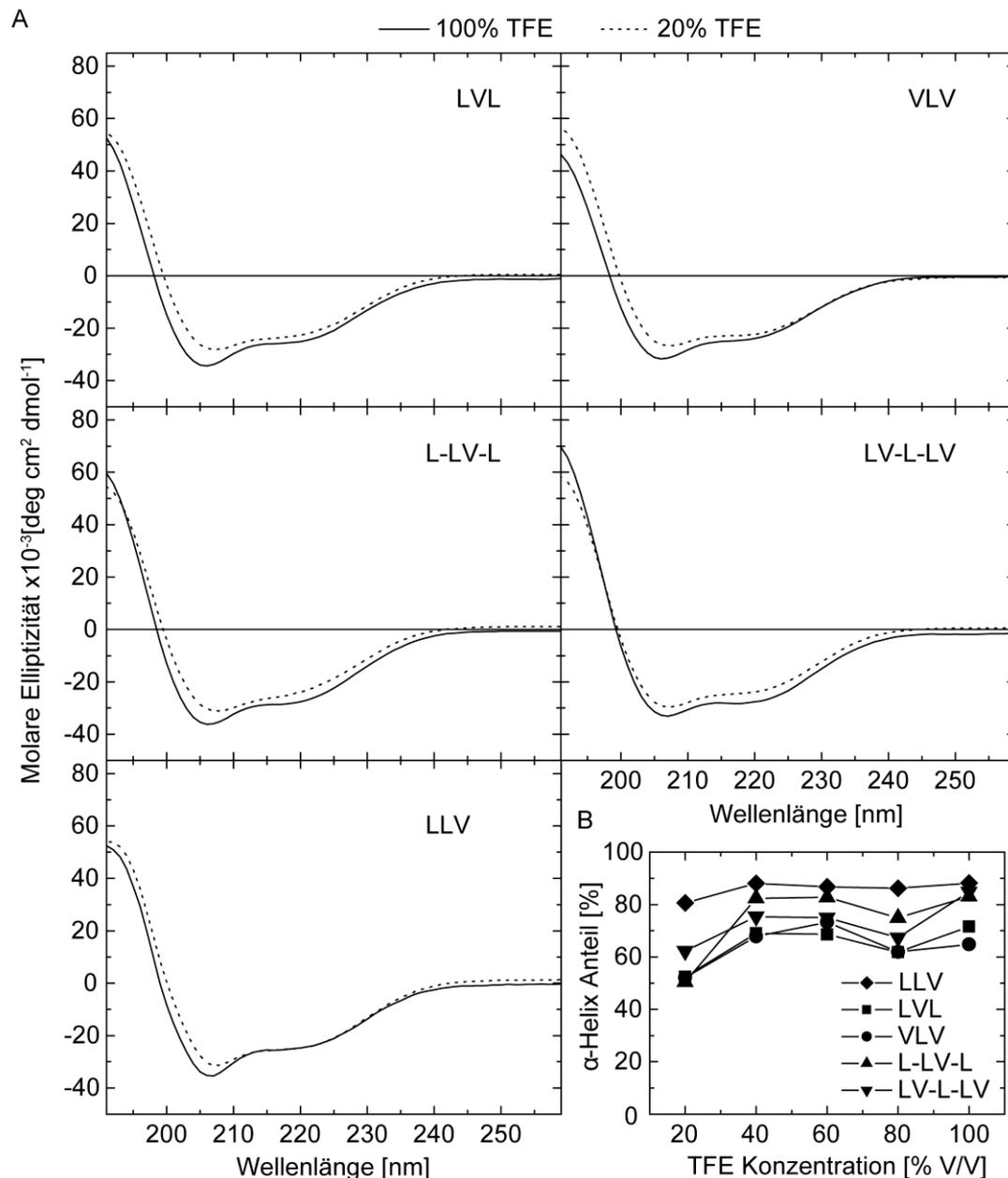


Abb. 35: Bestimmung der Sekundärstruktur der unregelmäßigen Varianten mittels Zirkular Dichroismus Spektroskopie. A, CD-Spektren der Peptide in 100 % TFE und 20 % TFE/10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4. B, Auswertung des Gehalts an α -Helix als Funktion der TFE-Konzentration.

Aus Abb. 35 wird ersichtlich, dass sich lediglich ein leichtes Maximum an Stabilität für LLV16 zeigte, was auf die gleichmäßige Verteilung der α -Helix-stabilisierenden Aminosäure Leucin zurückzuführen ist. Hingegen kann die Anhäufung der destabilisierenden Aminosäure Valin in verschiedenen Bereichen der unregelmäßigen Varianten den leichten Unterschied zu LLV16 erklären. Für die Peptide VLV und LVL wurde der geringste Anteil an α -Helix detektiert, dennoch war die Struktur aller Peptide überwiegend helikal.

Auch die Sekundärstruktur im membranintegrierten Zustand zeigte für alle unregelmäßigen Varianten ebenso wie für LLV16 einen hohen und ähnlich stark ausgeprägten Anteil an α -helikaler Faltung. Abb. 36 A zeigt exemplarisch CD-Spektren der Peptide zu 1 mol-% in POPC/DOPE/DOPS

Liposomen. Abb. 36 B gibt den prozentualen Gehalt der Sekundärstrukturmotive α -Helix und β -Faltblatt wider.

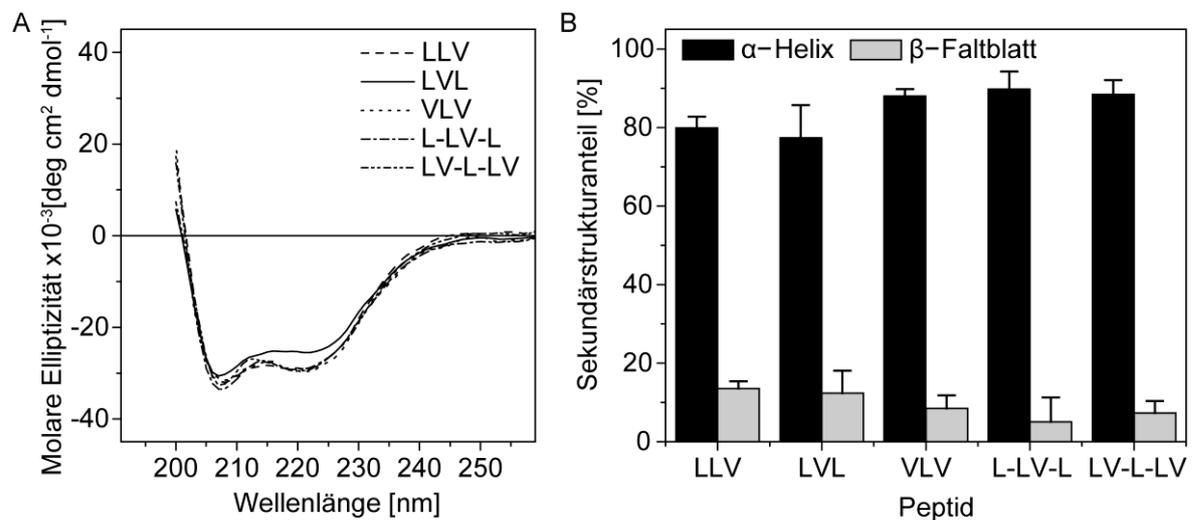


Abb. 36: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der unregelmäßigen LV-Peptide in Membranen. A, CD-Spektren der unregelmäßigen Varianten der Peptide in Liposomen (1 mol-% Peptid in POPC/DOPE/DOPS 3:1:1 Membranen). B, Auswertung nach prozentualen Sekundärstrukturanteil (α -Helix, β -Faltblatt) der Peptide in Liposomen; Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung aus n=3-4 Messungen.

Unterschiede im α -Helix- und β -Faltblatt-Gehalt zwischen den verschiedenen Peptiden bewegten sich innerhalb der Standardabweichung und wurden deshalb als nicht signifikant angesehen.

Da hier ein unterschiedlich ausgeprägtes fusogenes Potential in den unregelmäßigen Varianten der LV-Peptide festgestellt wurde, welches jedoch nicht durch globale konformationelle Flexibilität erklärt werden konnte, war die strukturelle Ursache für diesen Unterschied in der Dynamik der α -Helix der Peptide zu suchen.

4.4.3 D/H-Austausch und Helixdynamik der unregelmäßigen Varianten

Es konnte nur eine sehr geringe konformationelle Flexibilität der unregelmäßigen Varianten festgestellt werden. Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente sollten die Unterschiede in der Dynamik der α -Helix offenlegen. Abb. 37 zeigt die kontinuierlich vermessene Austauschkinetik der unregelmäßigen Varianten der LV-Peptide. Dabei wurde ersichtlich, dass die im Zentrum des hydrophoben Kerns destabilisierte Variante LVL in Lösung den schnellsten Austausch aller Amid-Deuteronen vollzog, während VLV ca. 8 Amid-Deuteronen deutlich langsamer austauschte. Die Varianten L-LV-L und LV-L-LV unterschieden sich nicht, tauschten jedoch insgesamt schneller aus als LLV16. L16 diente hier als stabile Kontrolle und zeigte den langsamsten kinetischen Verlauf.

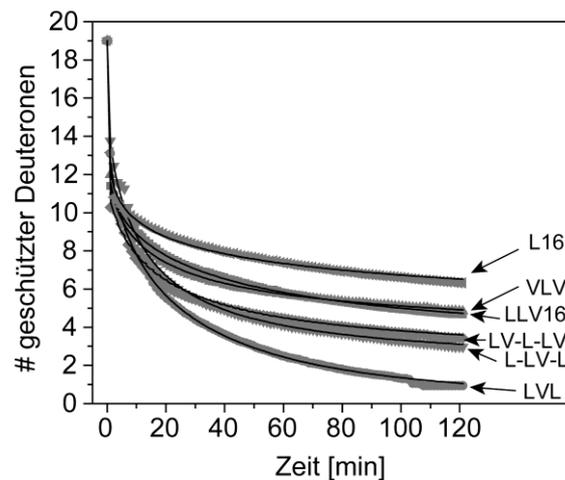


Abb. 37: Die DHX-Kinetik der unregelmäßigen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels der MEM-Analyse. Die Standardabweichung von <0,32 Deuteronen ergaben sich aus n=3 Messungen.

Nach Auswertung der Kinetiken und Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der Ratenkonstanten (Abb. 38) wurde ersichtlich, dass bei den Peptiden LVL und L-LV-L eine höhere Anzahl an langsam und mittel austauschenden Deuteronen auftrat. Diese sind wahrscheinlich den destabilisierten Kernregionen der Peptide zuzuordnen, welche im vorliegenden Falle mit hoher Wahrscheinlichkeit vor einigen Amid-Deuteronen der terminalen Regionen austauschten. Weiterhin war die Anzahl der schnell austauschenden Deuteronen in den terminal mit Valin angereicherten Peptiden (VLV, LV-L-LV) leicht erhöht, was eine gesteigerte Flexibilität der ohnehin flexiblen terminalen Bereiche verdeutlichte. Die stabilen Deuteronen der VLV und der LV-L-LV Sequenz konnten so den zentralen Leucinen zugeordnet werden. Einem dem L16 sehr ähnlich hohe Stabilität wurde den zentralen Bereich der VLV Sequenz zugesprochen. Der experimentelle Beleg für die Lokalisierung der Austauschorte und Zuordnung der Deuteronen verschiedener Austauschgeschwindigkeit, wie sie hier vorgenommen wurde, wird in 4.4.4 gezeigt.

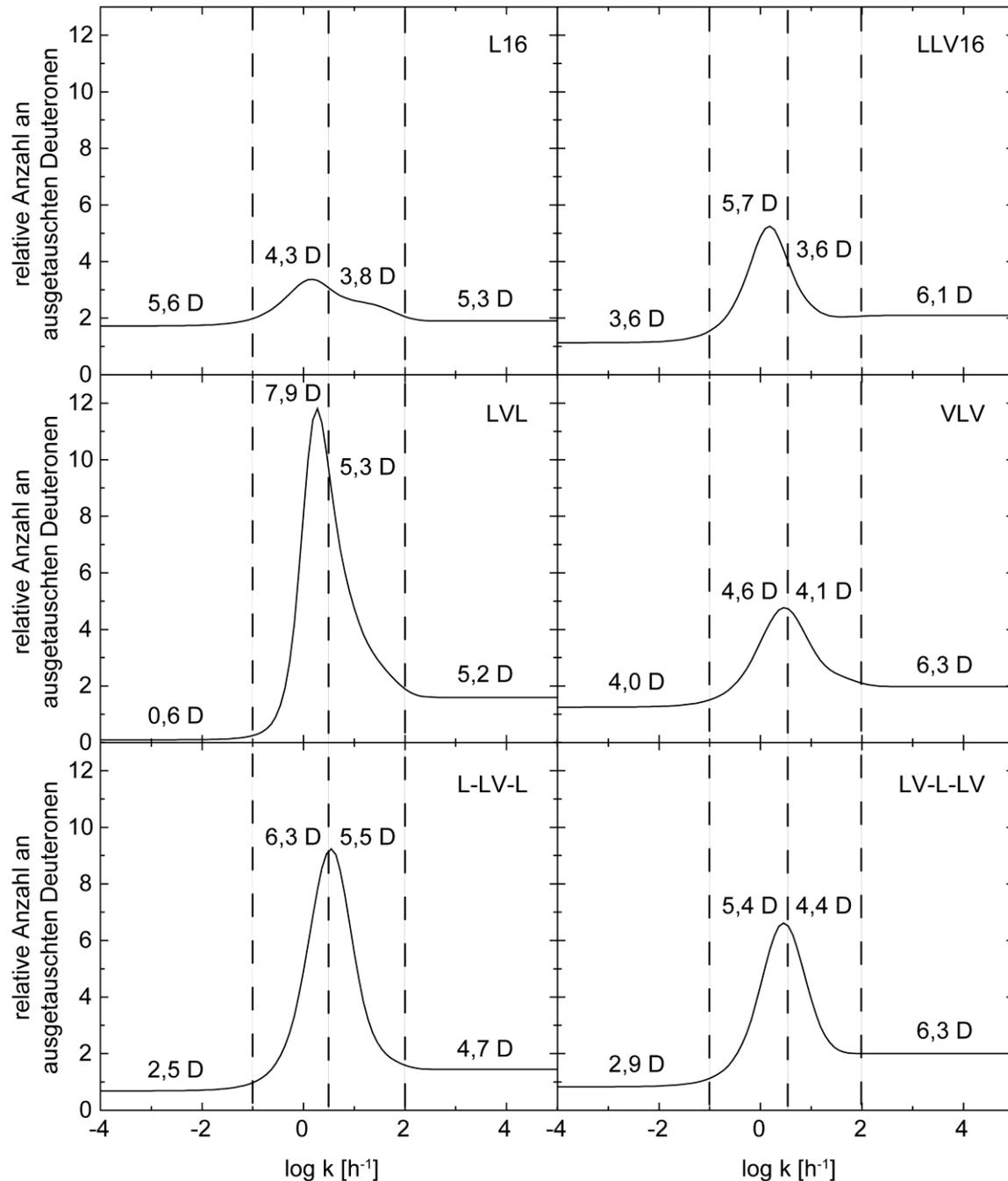


Abb. 38: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuterone der Peptide, L16, LLV16, LVL, VLV, L-LV-L und LV-L-LV aus den kontinuierlich vermessenen Kinetiken. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuterone, langsam, mittel und schnell austauschende Deuterone sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

Demnach konnte aus der Verteilung der Häufigkeiten für spezifische Ratenkonstanten die regionale Flexibilität innerhalb einer Peptid-Helix genauer charakterisiert werden. Aus Abb. 38 wird ebenfalls ersichtlich, dass ein ausgeprägtes Maximum im Falle der zentral destabilisierten Varianten die Ratenkonstanten-Verteilung der Peptide beschreibt. Somit könnte ein zentrales Destabilisierungsmotiv ein kurzes α -helikales Peptid in Lösung über einen weiteren Bereich der α -Helix gleichmäßig dynamisch

machen, während eine Oligo-Leucin-Sequenz von den Termini zum Zentrum hin immer stabiler wird. Dies würde auch für die VLV Sequenz zutreffen, welche an den Termini noch instabiler wäre als L16, aber ebenfalls in Richtung Kern-Sequenz stabiler würde.

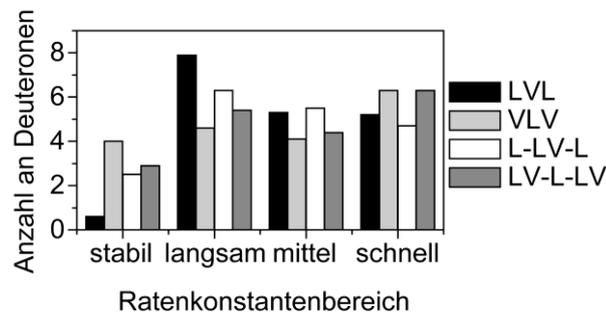


Abb. 39: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Durch die gleichmäßige Polarität und Lösungsmittelzugänglichkeit der Peptide in 80% TFE konnte der Austausch der Amid-Deuteronen der zentralen Valin-Reste mit gleich hoher Wahrscheinlichkeit stattfinden wie der der terminalen Reste. Der ratenlimitierende Schritt in Lösung ist nämlich hauptsächlich das Öffnen der intramolekularen Wasserstoffbrücke. Damit kann in den unregelmäßigen Varianten nicht mehr von einem sukzessiven Voranschreiten der Austauschreaktion von den terminalen Bereichen hin zum Zentrum ausgegangen werden. Es scheinen sich hier die jeweiligen Austauschgeschwindigkeiten von terminalen Amid-Deuteronen und zentralen zu überlagern, was die Auswertung hinsichtlich der Lokalisierung der Stabilität der α -Helix erschwert. Eine Abschirmung des zentralen Bereichs der Peptide durch die hydrophobe Acylkettenregion des Lipid-Bilayers sollte eine tatsächlich relevante Dynamik von terminalen Peptid-Bereichen offenlegen. Abb. 40 zeigt die Austausch-Kinetik für die unregelmäßigen Peptid-Varianten im membranintegrierten Zustand.

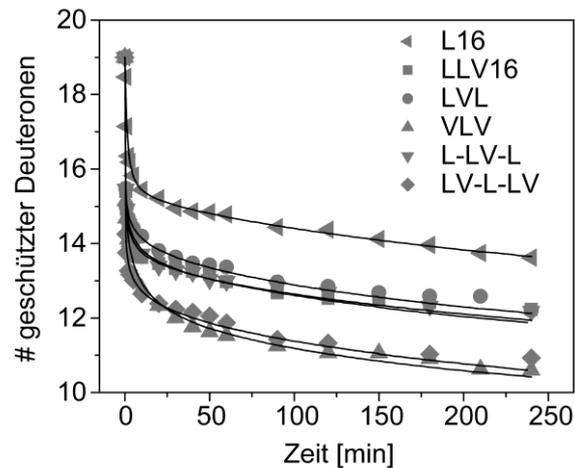


Abb. 40: DHX-Kinetik der unregelmäßigen Varianten in Lipid-Membranen bei 50 °C in 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5. Die Peptide wurden zu 1 mol-% im Verhältnis zum Lipid eingebaut. Es wurden Liposomen bestehend aus POPC/DOPE/DOPS (3:1:1) verwendet. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels der MEM-Analyse. Die Standardabweichung von <0,37 Deuteronen ergab sich aus n=2-3 Messungen.

Mit Hilfe der Austausch-Kinetiken konnte gezeigt werden, dass die reine terminale Flexibilität der Peptide gemessen wurde, da die austauschbaren Regionen der Peptide in ihrer Kinetik nach dem Gehalt an destabilisierenden Valin-Resten in den terminalen Bereichen (in der Reihenfolge: $VLV \geq LV-L-LV-L > LLV16 = L-LV-L \geq LVL > L16$) an Geschwindigkeit zunahm. Stabile Deuteronen nahmen im Falle der terminal destabilisierten Peptide (VLV, LV-L-LV) zu Gunsten von Amid-Deuteronen, welche schnell und/oder mit mittlerer Geschwindigkeit austauschten (Abb. 41 und Abb. 42), ab.

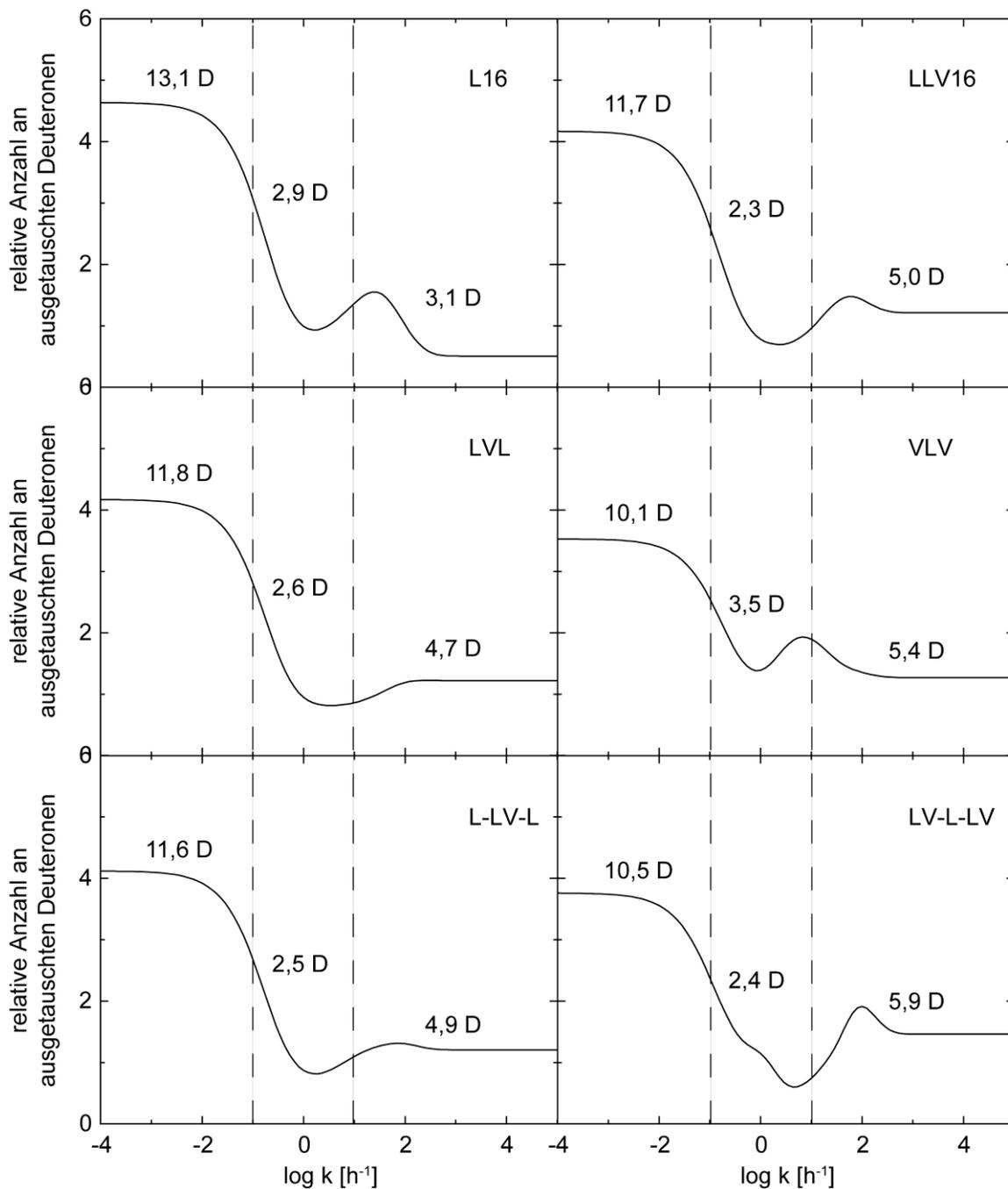


Abb. 41: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuteronen der Peptide, L16, LLV16, LVL, VLV, L-LV-L und LV-L-LV. Datenanalyse der in liposomalen Membranen aus POPC/DOPE/DOPS vermessenen Kinetik. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

Abb. 41 zeigt ebenfalls, dass sich die Peptide LVL und L-LV-L nicht von der regelmäßigen Muttersequenz LLV16 unterscheiden. Damit konnte eine terminale Flexibilität im Falle der membranintegrierten Peptide, welche terminal destabilisierte Sequenzen aufweisen, gezeigt werden und im Unterschied zu den Austauschreaktionen in Lösung entkoppelt von der jeweiligen Stabilität im zentralen Bereich der Peptide gemessen werden.

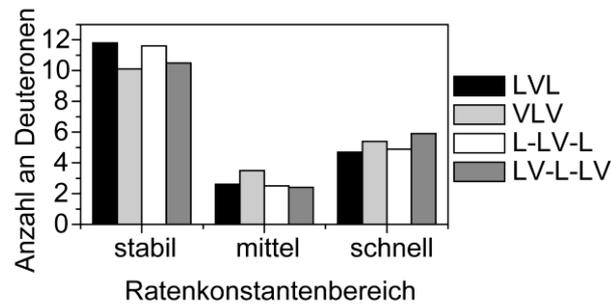


Abb. 42: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1} < k$.

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 42), dass lokal destabilisierende Muster einen starken Einfluss auf die Stabilität und Flexibilität einer α -Helix in Lösung ausüben. Dahingegen konnte eine Lipid-Membran zentrale Bereiche einer Peptid- α -Helix sehr gut abschirmen und die Flexibilität der terminalen Reste der membranintegrierten α -Helix definieren. Obwohl in Lösung die Kinetik des Austausches für LVL gesamt schneller verlief als für VLV, konnte auch hier festgestellt werden, dass die Population der schnell austauschenden Amid-Deuteronen für VLV höher war als für LVL. Dies scheint zum einen zu bestätigen, dass die terminalen Bereiche sehr instabil sind und weiter durch Blöcke aus Valin destabilisiert werden. Zum anderen jedoch auch, dass die Flexibilität einer α -Helix von den Randbereichen her zum Zentrum zunimmt und dort ebenfalls durch die Aminosäurezusammensetzung beeinflusst wird. Demnach spiegelt das Verhalten einer α -Helix in Lösung sehr genau die Stabilität wieder, welche in der Membran vorherrschen kann. Die Austauschkinetiken müssen jedoch differenziert nach Populationen von Deuteronen betrachtet werden, welche mit einer definierten Geschwindigkeit austauschen, um diese den jeweiligen Bereichen einer α -Helix zuordnen zu können. Ein weiterer Hinweis auf die Lokalisierung der Austauschorte wird im folgenden Kapitel angeführt.

4.4.4 Lokalisierung der Austausch-Orte in den unregelmäßigen Varianten

Um zu demonstrieren, dass der Austausch der unregelmäßigen Varianten der LV-Peptide nicht graduell von den Termini her stattfindet, sondern im Extremfall des LVL-Peptids der zentrale Valin-Block schneller austauscht als einige terminale Leucin-Reste und damit dynamischer ist als die Randbereiche, wurden weitere Experimente durchgeführt. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass bei der im zentralen hydrophoben Kern sehr stark destabilisierten Sequenz LVL ein Austausch im Falle der Membranintegration bei ca. 10 geschützten Deuteronen zum Erliegen kommt (Abb. 40), konnte für nachfolgendes Experiment eine dauerhafte und starke Protektion einiger zentraler Reste angenommen werden. Die im Text erwähnten Zeitpunkte sind in Abb. 43 als die jeweilige Anzahl an geschützten (am Peptid vorhandenen) Amid-Deuteronen gekennzeichnet. Die Peptide LVL, VLV und LLV16 wurden

einer standardmäßigen Austauschreaktion in 80 % TFE unterzogen. Zum jeweiligen Zeitpunkt, an dem ca. 8 Amid-Deuterone noch nicht ausgetauscht hatten, wurde der Austausch durch Säurezugabe verlangsamt und die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (Zeitpunkt 1). Die Peptid-Proben wurden über Nacht lyophilisiert, so dass jedes der lyophilisierten Peptide an 8 Amid-Positionen noch Deuterium trug. Die Lyophilisate wurden in Acetonitril gelöst, welches nicht in der Lage ist, während der Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktionen als Donor bzw. Akzeptor zu fungieren. Mit diesen Peptiden wurden Liposomen nach Protokoll in deuteriertem 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5 hergestellt. Diese Liposomen wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert, so dass alle zugänglichen Amid-Protonen wieder gegen Deuterone austauschen konnten (Zeitpunkt 2), und anschließend massenspektrometrisch vermessen. Weiterhin wurden diese Proben 1:10 in protonierten Puffer verdünnt und für jeweils definierte Zeiten bei 50°C inkubiert (normale Deuterium/Wasserstoff-Austauschreaktion; Zeitpunkte 3-5).

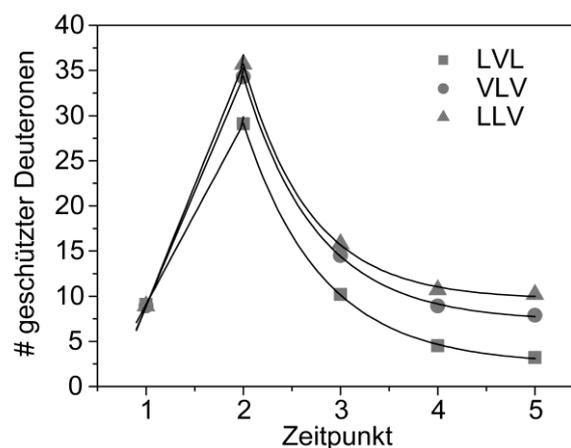


Abb. 43: Lokalisation der Austauschorte der unregelmäßigen Varianten. Die angegebenen Zeitpunkte beschreiben jeweils die im Text beschriebene Prozedur. 1. Stoppzeitpunkt des Austausches der Peptide in Lösung. 2. Peptide in Liposomen aus reinem POPC bei einem nominellen P/L-Verhältnis von 0,01 nach Inkubation in deuteriertem 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5 für 24 h. 3. Die deuterierten Proben wurden in protonierten 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5 verdünnt und der Austausch nach einer Reaktionszeit von 1 min vermessen. 4. Wie 3. jedoch nach einer Reaktionszeit von 30 min. 5. Wie 3. jedoch nach einer Reaktionszeit von 4 h. Die gezeigten Linien stellen keine mathematisch korrekte Auswertung dar und dienen der besseren Darstellung.

Abb. 43 zeigt, dass für die Peptide LLV16 und VLV über Nacht ein nahezu komplett deuterierter Zustand erreicht werden konnte. Nahezu alle 38 austauschbaren Wasserstoffatome wurden durch Deuterium ersetzt. 8 Deuterone waren in den eingesetzten Peptiden zu Beginn noch enthalten, somit wurden 30 Positionen durch Inkubation in deuteriertem Puffer innerhalb von 24 h neu besetzt. Für das LVL-Peptid konnten von den 30 verbleibenden noch durch Deuterium zu ersetzenden Positionen jedoch lediglich ca. 21 für Deuterone zugänglich gemacht werden. Auch nach weiterer Inkubation für 24 h blieb die Zahl der Deuterone bei ca. 29. Im folgenden Austauschexperiment konnte beobachtet werden, dass LLV16 und VLV über die Zeit ihre zugänglichen Deuterone gegen Protonen austauschten und diese Reaktion wiederum bei ca. 10 verbleibenden Deuteronen abstoppte. Im Gegensatz dazu zeigte das LVL-Peptid einen Austausch, welcher bei einer Anzahl von ca. 3-4 geschützten Deuteronen zum

Erliegen kam. Aus den Ergebnissen dieses Versuches kann demnach gefolgert werden, dass das zentrale Valin-Motiv des LVL Peptids in Lösung schneller austauscht als einige Leucin-Amid-Deuterone an den terminalen Bereichen. Die 8 geschützten Deuterone zu Anfang des Experiments konnten sich nicht im Zentrum des LVL Peptids befinden, da am Ende des Experiments in Liposomen weniger als 8 Deuterone vor einem Austausch geschützt waren. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass durch Einsatz von Lipid-Membranen eine Möglichkeit besteht, den Ort, an dem ein Wasserstoff/Deuterium-Austausch in Peptid-Helices stattfindet, qualitativ zu beschreiben. Es war möglich mit Hilfe der liposomalen Membran die terminalen Bereiche strukturell genauer zu charakterisieren und im Abgleich mit den Ergebnissen in Lösung dadurch die konformationelle Dynamik des gesamten Peptids zu beschreiben.

4.5 Struktur-Eigenschaften der Glycin/Prolin-Varianten

In früheren Arbeiten [45] wurde bereits gezeigt, dass α -Helix-brechende Motive wie Gly/Pro-Paare die fusogene Wirkung einer alternierenden Leu/Val-Sequenz weiter steigern können. Die strukturellen Konsequenzen eines α -Helix-Brecher-Motivs sollten im nachfolgenden Kapitel genauer untersucht werden.

4.5.1 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Glycin/Prolin-Varianten

Die Sekundärstruktur der Peptide wurde über Zirkular Dichroismus Spektroskopie untersucht. In polarem Medium (20 % TFE, 80 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4) zeigten alle Peptide einen nur noch sehr geringen Anteil an α -helikaler Struktur, welcher zu einem markanten Anteil in eine Zufallsknäuel-Faltung und β -Faltblatt-Struktur übergegangen war. Damit konnte gezeigt werden, dass LV-Peptide mit Helix-Brecher-Motiv ebenso dazu neigen ihre α -Helix in polarem Medium zu entfalten. In den Glycin/Prolin-Varianten wurden Glycin und/oder Prolin auf die Sequenz von LV16 aufgesetzt. Es erfolgte eine geringer ausgeprägte Umfaltung zum β -Faltblatt als bei LV16. Es ist bekannt, dass Prolin aus sterischen Gründen die Bildung einer β -Faltblatt-Struktur ebenso wenig begünstigt wie die Bildung einer α -Helix, welche durch das Fehlen des Amidprotons beeinträchtigt ist. Abb. 44 zeigt den Gehalt an Sekundärstrukturanteilen für die Gly/Pro-Varianten in 100 % TFE und 20 % TFE. In 100 % TFE waren alle Peptide ähnlich helikal, jedoch war der Gehalt an α -Helix deutlich niedriger als in allen anderen Peptiden der LV-Serie. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das dominante Sekundärstruktur-Motiv neben der α -Helix eine Zufallsknäuel-Faltung war, was ebenfalls im Kontrast zur gesamten Reihe der LV-Peptide steht. In polarem Medium (20 % TFE 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4) falteten sich

in den meisten Gly/Pro-Varianten Teile der α -Helix und Teile der Zufallsknäuel-Faltung zu β -Faltblatt Strukturen um.

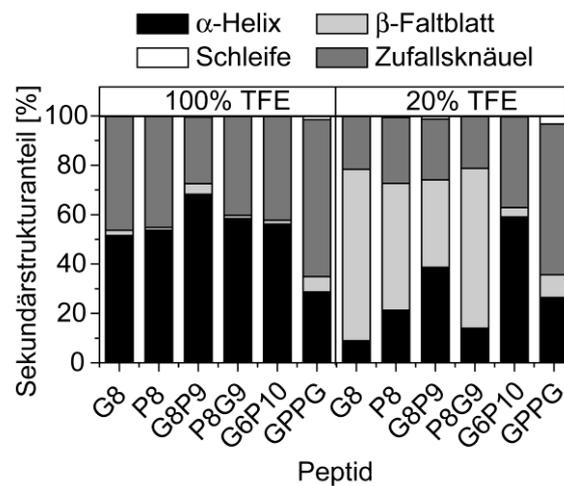


Abb. 44: Bestimmung der Sekundärstruktur der Helix-Brecher-Varianten mittels Zirkular Dichroismus Spektroskopie. Es wurde der Gehalt an α -Helix, β -Faltblatt, Schleifen- und Zufallsknäuel-Motiven in 100 % TFE und 20 % TFE 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4 ermittelt.

Wie Abb. 45 zeigt, konnte im Falle der membranassoziierten Peptide LV16 P8, LV16 G8P9, LV16 P8G9 und LV16 GPPG ein sehr niedriger Gehalt an α -Helix bestimmt werden, während ein einzelnes Glycin bzw. isolierte Gly oder Pro Reste (G6P10) den Peptiden erlaubten, sich als α -Helix in die Membran von Liposomen zu integrieren. Im Falle von LV16 GPPG konnte ebenfalls ein sehr hoher Anteil an ungefalteter Peptid-Struktur gemessen werden. Im Gegensatz zu den meisten Peptiden der LV-Reihe war bei den Gly/Pro-Varianten im membranintegrierten Zustand die α -Helix nicht die dominante Struktur.

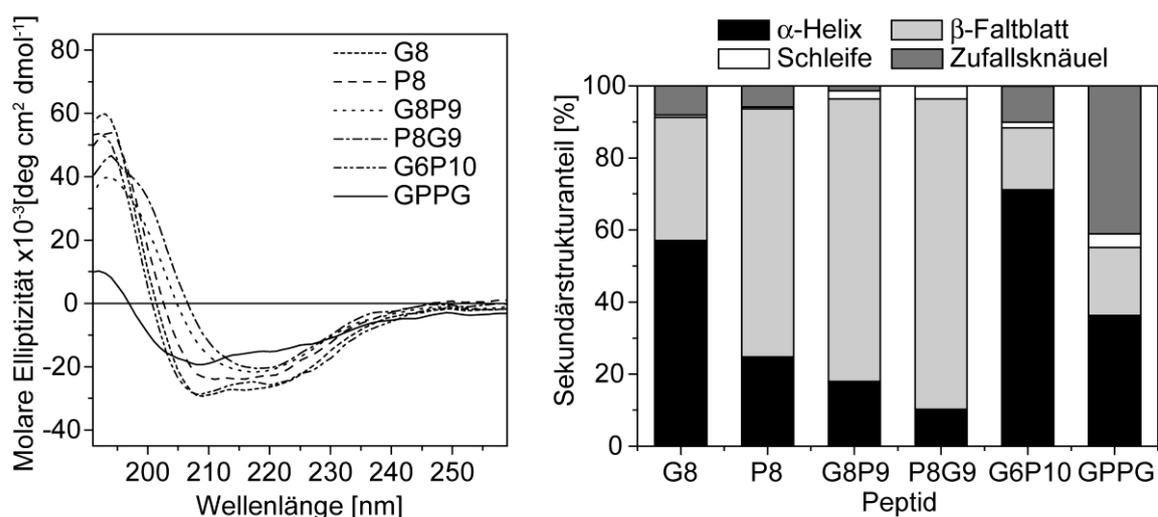


Abb. 45: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der Gly/Pro-Varianten der LV-Peptide in liposomalen Membranen. A, Repräsentative CD-Spektren der Peptide in Liposomen (1 mol-% Peptid in POPC/DOPE/DOPS 3:1:1 Membranen). B, Auswertung nach prozentualem Sekundärstrukturanteil (α -Helix, β -Faltblatt, Schleife und Zufallsknäuel) der Peptide in Liposomen. Die dargestellten Werte wurden aus n=3-5 Messungen bestimmt.

Die Auswirkungen dieser globalen Flexibilität sollten im Folgenden mittels H/D-Austauschexperimenten genauer untersucht werden.

4.5.2 D/H-Austausch und Helixdynamik der Glycin/Prolin-Varianten

Die konformationelle Flexibilität der Gly/Pro-Varianten, welche durch Polaritätstitrations und Zirkular Dichroismus Spektroskopie bestimmt werden konnte, erwies sich geringer als für LV16. Die Gly/Pro-Varianten können als Derivate von LV16 betrachtet werden. Auf dem Hintergrund einer LV16-Sequenz wurde jeweils Glycin und/oder Prolin eingefügt. Der Unterschied in der konformationellen Flexibilität der Peptide kann deshalb direkt auf den Einfluss der Glycin- und Prolin-Reste zurückgeführt werden. In 80 % TFE konnte ein, im Vergleich zu den restlichen LV-Peptiden, erniedrigter Gehalt an α -Helix bestimmt werden. Dies könnte auf eine verringerte Präferenz eine helikale Struktur einzugehen deuten. Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktionen sollten die Charakteristik der helikalen Struktur der Gly/Pro-Varianten näher beleuchten.

Abb. 46 A zeigt den kinetischen Verlauf des Austausches der Amid-Deuteronen der Helix-Brecher-Varianten der LV-Peptide. Es zeigte sich, dass das Einfügen von Gly und/oder Pro zu einer hohen dynamischen α -Helix-Flexibilität in den Peptiden führte. Dies bestätigten ebenfalls die Ergebnisse aus der Polaritätstiteration und Sekundärstruktur-Bestimmung. Bereits das Einführen eines einzelnen Glycin-Restes anstelle eines zentralen Leucin-Restes erhöhte die Geschwindigkeit des D/H-Austausches stark. Weiter beschleunigt wurde diese Reaktion durch das Einbringen eines Gly/Pro-Paares und maximal durch das Einführen von 2 Paaren. Damit wurde bestätigt, dass Glycin und/oder Prolin in der Lage sind α -Helices stark zu destabilisieren und ihr Vorkommen in Peptid-Sequenzen dieser Länge die Bildung einer stabilen α -Helix erschwert. Polaritätstitrations zeigten jedoch auch, dass die Bildung von β -Faltblättern durch Glycin und Prolin erschwert wird. Hier wird deutlich, dass die Dynamik der α -Helix nicht notwendigerweise mit der Tendenz zur Umfaltung zum β -Faltblatt gekoppelt sein muss.

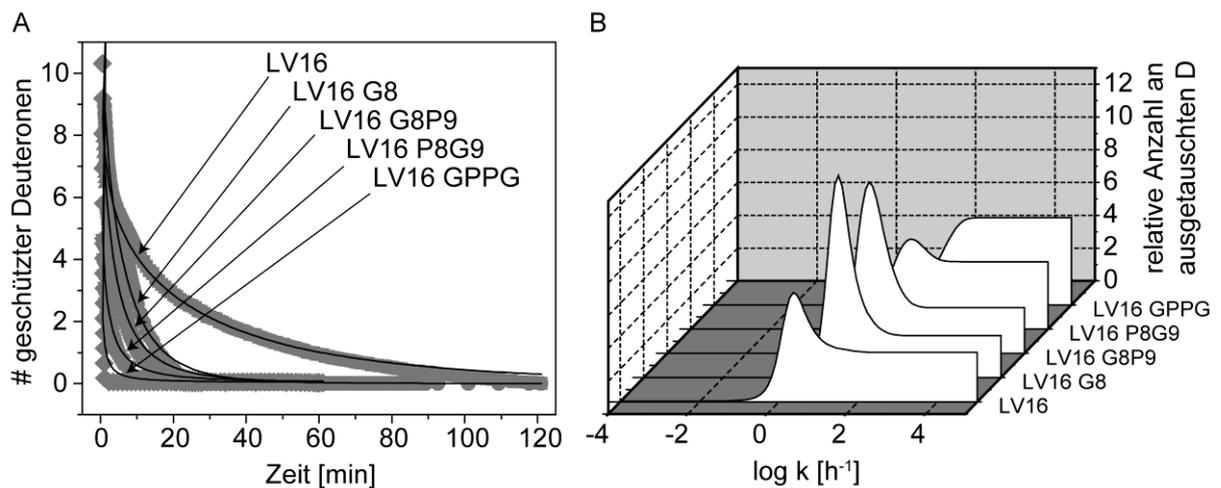


Abb. 46: DDX-Experimente der Helix-Brecher-Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C mittels „online“-Messmethode. A, Kinetik der Austauschreaktion der Amid-Deuteronen. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von $<0,38$ Deuteronen ergaben sich aus $n=2-4$ Messungen. B, Häufigkeitsverteilung der Ratenkonstanten.

Die Anzahl an ausgetauschten Deuteronen, welche einem bestimmten Ratenkonstantenbereich zugeordnet werden konnten, stieg im Vergleich zur reinen LV16 Sequenz mit dem Einführen eines Gly und/oder Pro für die schnell und mit mittlerer Geschwindigkeit austauschenden Deuteronen stark an (Abb. 47). Abb. 46 B zeigt die Häufigkeit der austauschenden Deuteronen als Funktion der Ratenkonstante. Die Ergebnisse der Untersuchung der Helixdynamik der Gly/Pro-Varianten zeigten die Unterschiede zwischen einer dynamischen α -Helix und konformationeller Flexibilität.

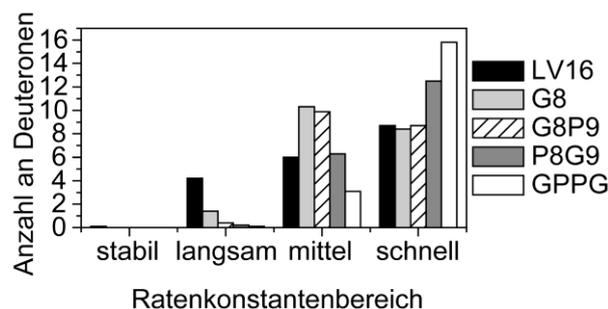


Abb. 47: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Abb. 47 zeigt, dass die Population der langsam austauschenden Deuteronen des LV16-Peptides in den Helix-Brecher-Varianten in Richtung der intermediär und schnell austauschenden Deuteronen verschoben wurde. Aus diesen Ergebnissen konnte auf eine deutlich instabilere α -Helix als im Falle des LV16-Peptides geschlossen werden.

In ihrer Sekundärstruktur waren Peptide mit gekoppelten Gly/Pro-Motiven als Sonderfall zu betrachten. Sobald ein derartiges Motiv in die Sequenz der Peptide eingeführt wurde, zeigten diese im

membranintegrierten Zustand einen hohen Gehalt an β -Faltblatt. Dies spiegelte sich ebenfalls in D/H-Austauschexperimenten in Liposomen wider. Während die Peptide LV16 und LV16 G8 als α -Helices einen sehr vergleichbaren Austausch zeigten, war die Austauschkinetik von LV16 G8P9 sehr schnell und erreichte eine deutlich größere Anzahl an Amid-Deuteronen (Abb. 48).

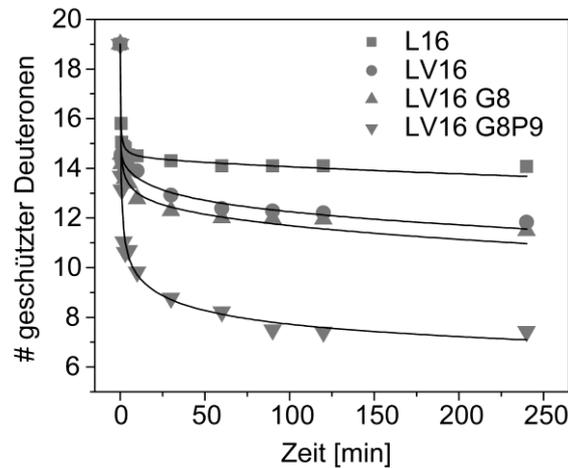


Abb. 48: D/H-Austausch-Kinetik der Gly/Pro-Varianten in POPC/DOPE/DOPS Membranen bei 37 °C. Peptide wurden zu 1 mol-% im Verhältnis zum Lipid eingebaut. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von < 0,41 Deuteronen ergaben sich aus n=2-3 Messungen.

Die kinetische Auswertung nach Häufigkeit der Ratenkonstanten spiegelte den Verlauf wider und zeigte für LV16 G8P9 ein deutlich anderes Profil der Verteilung wie für die Peptide L16, LV16 und LV16 G8 (Abb. 49).

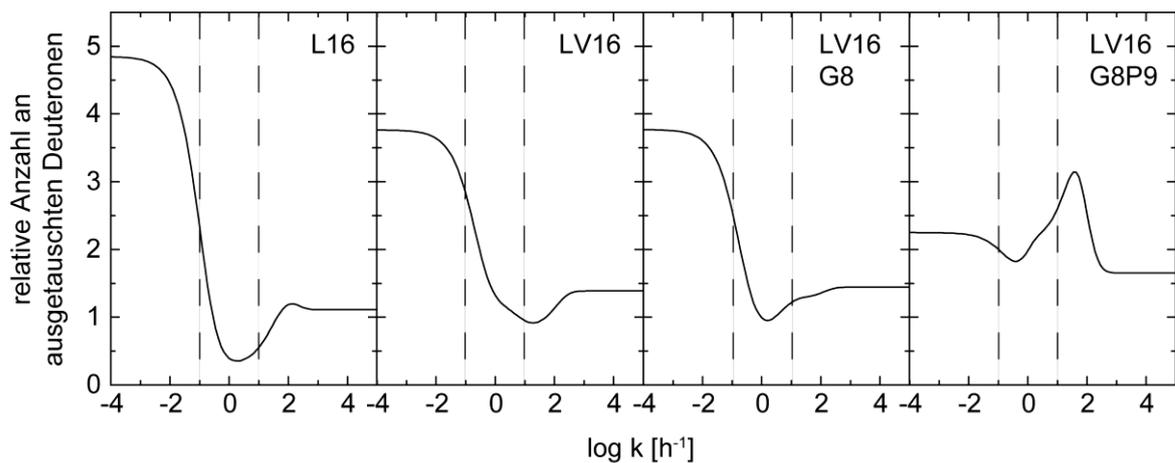


Abb. 49: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuterone der Peptide, L16, LV16, LV16 G8 und LV16 G8P9. Datenanalyse der in liposomalen Membranen aus POPC/DOPE/DOPS Lipiden vermessenen Kinetik. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuterone, mittel und schnell austauschende Deuterone sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

Die Anzahl der Amid-Deuterone, welche im Falle von LV16 G8P9 zusätzlich (im Vergleich zu LV16 und LV16 G8) austauschen, werden sowohl schnellen als auch mittlerer Geschwindigkeit austauschenden Population zugeführt (Abb. 50).

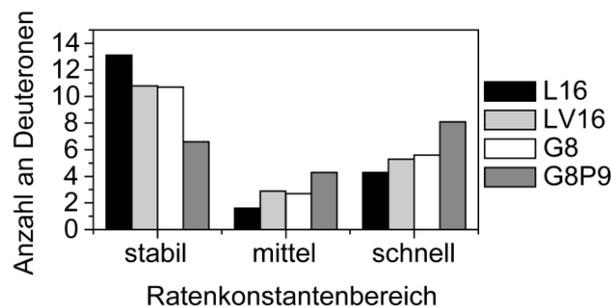


Abb. 50: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuterone bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuterone den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuterone den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1} < k$.

Damit zeigte sich, dass sich die unterschiedliche Konformation der Peptide in der Membran im D/H-Austauschexperiment wiederfinden, während die unterschiedliche Dynamik der Peptide in Lösung keinen Einfluss auf die Dynamik der α -Helix in Membran ausübte. LV16 und LV16 G8 zeigten unterschiedliche Dynamik in Lösung während in der Membran der Austausch vergleichbar war. Bei der Betrachtung der Dynamik von LV16 G8P9 muss miteinbezogen werden, dass helikale und β -Faltblattstrukturen vorliegen, so dass Vergleiche dieses Peptids im membranintegrierten Zustand mit den helikal gefalteten der LV-Serie nicht uneingeschränkt angestellt werden können. Nachdem auch in einem β -Faltblatt die Amid-Protonen in Wasserstoffbrücken eingebunden sind und damit nicht austauschkompetent vorliegen, könnte der schnelle Austausch im Falle von LV16 G8P9 auf ein Peptid, welches als β -Strang vorliegt, hinweisen.

4.6 Struktur-Eigenschaften der Histidin-Varianten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Funktion der synthetischen Modellpeptide die Ladung der terminalen Reste von entscheidender Bedeutung ist [118]. Lysin liegt bei einem neutralen pH-Wert positiv geladen vor, Histidin dagegen erst bei einem pH-Wert von ca. 5,5. Nur in positiv geladenem Zustand zeigten His-flankierte Peptide ein vergleichbares Maß an Fusogenität, während die Peptide in ungeladenem Zustand kein fusogenes Potential entwickeln konnten. Der Einfluss der terminal-flankierenden Reste His und Lys sollte im Folgenden strukturell charakterisiert werden. Des Weiteren wurde der Einfluss der Ladung der Seitenkette auf die Struktur der Peptide einer genaueren Untersuchung unterzogen.

4.6.1 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Histidin-Varianten

Polaritätstitrationen und Zirkular Dichroismus Spektroskopie bei unterschiedlichen pH-Werten sollten klären ob die Ladung der Seitenketten einen Einfluss auf die Struktur der Peptide ausübt. Nachdem die drei N-terminalen Histidine ohnehin nicht zur Bildung einer α -Helix beitragen können, besteht lediglich die Möglichkeit, dass die C-terminalen Histidin-Reste einen Unterschied zur α -Helix-Stabilität gegenüber den Lysin-Resten beitragen. Des Weiteren ist bekannt, dass α -Helices von Peptiden speziell an den Enden wenig Stabilität aufweisen, was als sogenanntes „Helix-Fraying“ bezeichnet wird. Demzufolge wurde primär der Einfluss der Ladung auf die Stabilität der Peptid-Helices untersucht. Abb. 51 A zeigt den Gehalt an α -helikaler Struktur als Funktion der TFE-Konzentration für His- und Lys- flankierte Peptide sowohl im geladenen Zustand (+) als auch im ungeladenen Zustand (0). Hier wurde ersichtlich, dass das Verhalten hinsichtlich konformationeller Flexibilität von His- und Lys-flankierten Peptiden jeweils in ihrem geladenen Zustand und ihrem ungeladenen Zustand vergleichbar ist. Konformationelle Flexibilität ist demnach nicht von der Art der terminalen Aminosäure beeinflusst, jedoch von ihrem Ladungszustand. CD-Spektren der His-flankierten Peptide bei verschiedenen pH-Werten im membranintegrierten Falle (Abb. 51 B) legten offen, dass keine strukturelle Umfaltung zugrunde lag, welche die funktionellen Unterschiede je nach Ladungszustand verursachte. Wie Abb. 51 C zeigt, blieb die globale Sekundärstruktur der Peptide in POPC/DOPE/DOPS Liposomen bei verschiedenen pH-Werten weitgehend erhalten.

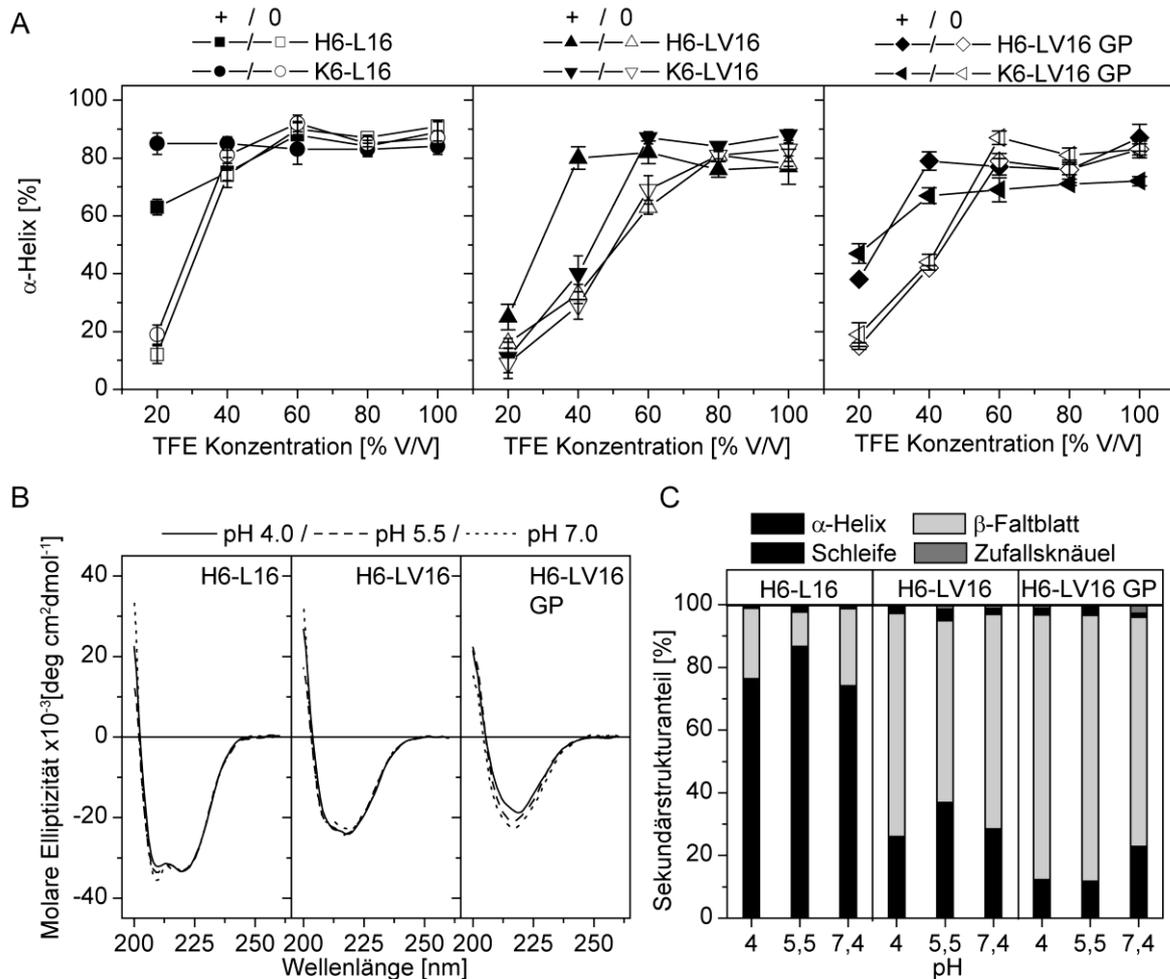


Abb. 51: Sekundärstruktur der Histidin-flankierten Peptide. A, Polaritätstiteration der His-flankierten Peptide im Vergleich zu Lys-flankierten Peptiden im geladenen (+) und ungeladenen (0) Zustand. α -Helix-Sekundärstrukturanteil als Funktion der TFE-Konzentration. His-flankierte Peptide bei pH 7,4 10 mM Ammoniumacetat Puffer (ungeladene Seitenkette (0)) und pH 4,5 10 mM Ammoniumformiat Puffer (geladene Seitenkette (+)). Lys-flankierte Peptide bei pH 7,4 10 mM Ammoniumacetat Puffer (geladene Seitenkette (+)) und pH 12,5 10 mM Hydroxid-Chlorid Puffer (ungeladene Seitenkette (0)). B, CD-Spektren der His-flankierten Peptide in POPC/DOPE/DOPS Membranen 1 mol-% Peptid bei pH 4,0 (10 mM Natriumcitrat Puffer), pH 5,5 (10 mM Tris-Maleat Puffer) und pH 7,0 (10 mM Tris-HCl Puffer). C, Sekundärstrukturanteile der His-flankierten Peptide bei unterschiedlichen pH-Werten.

Der Unterschied in der konformationellen Flexibilität in Lösung zwischen ungeladenem und geladenem Zustand, welcher im membranintegrierten Falle nicht zum Tragen kam, könnte in Lösung durch kooperative Umfaltung der Peptide aufgrund von verminderter Ladungsabstoßung der Peptide zu Stande kommen. D/H-Austauschexperimente sollten diesen Sachverhalt anhand der Dynamik der α -helikalen Struktur der Peptide offenlegen.

4.6.2 D/H-Austausch und Helixdynamik der Histidin-Varianten

Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente wurden in 80 % TFE durchgeführt. Unabhängig von der Art der flankierenden Aminosäure (His oder Lys) und Ladung der Seitenkette, zeigten alle Peptide

einen hohen Anteil an α -helikaler Sekundärstruktur in Lösung. Abb. 52 zeigt die kinetischen Verläufe der Austauschreaktion der His-flankierten Peptide im Vergleich zu den Lys-Varianten bei einem pH-Wert von 6,5. In jedem Falle zeigte sich ein Einfluss der flankierenden Reste auf die Dynamik der α -Helix, welcher jedoch ladungsabhängig oder aminosäurespezifisch sein konnte. Unter den experimentellen Bedingungen waren die His-flankierten Varianten langsamer in ihrer Austauschkinetik als die Lys-flankierten Derivate.

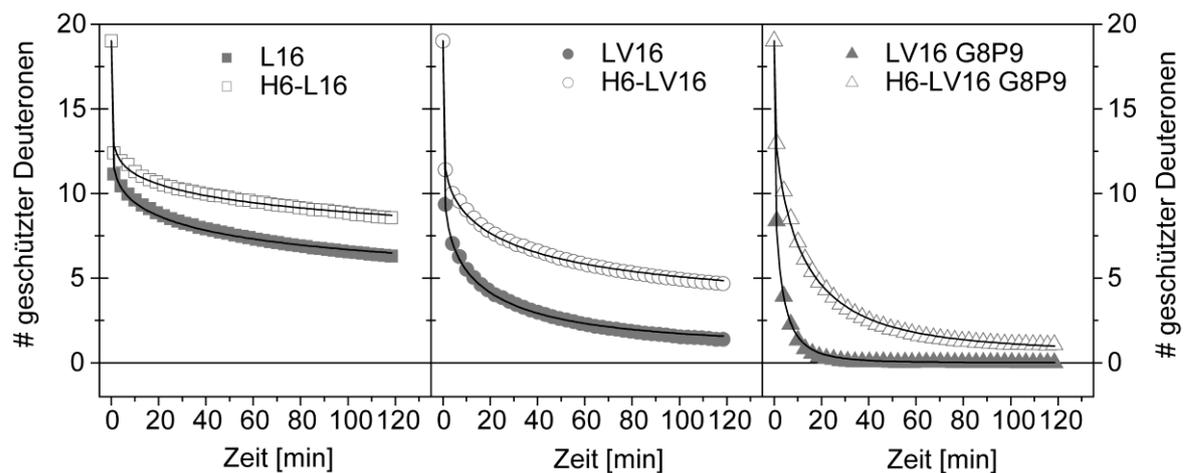


Abb. 52: DHX-Experimente der Histidin-Varianten in 80 %/TFE 20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C mittels kontinuierlicher Messungen. Austauschkinetik der Amid-Deuterone von His-flankierten im Vergleich zu Lys-flankierten Peptiden. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von <0,27 Deuterone ergab sich aus n=2-4 Messungen.

Abb. 53 und Abb. 54 zeigt, dass die Anzahl der in einem bestimmten Ratenkonstantenbereich austauschenden Amid-Deuterone im Falle der His-flankierten Peptide hin zu langsameren Ratenkonstantenbereichen verschoben waren. Dies könnte im Hinblick auf die unterschiedliche Ladung der Seitenkette der Lys-Peptide gegenüber der His-Peptide bei pH 6,5 auf eine erhöhte Oligomerisierung- bzw. Aggregatbildung der His-flankierten Peptide hinweisen. Die flankierenden Ladungen könnten jedoch auch die Stabilität der α -Helix direkt beeinträchtigen. Die Abstoßung der geladenen Seitenketten könnte dafür sorgen, dass eine helikale Faltung erschwert wird, welche bei ungeladenen Seitenketten nicht beeinträchtigt würde.

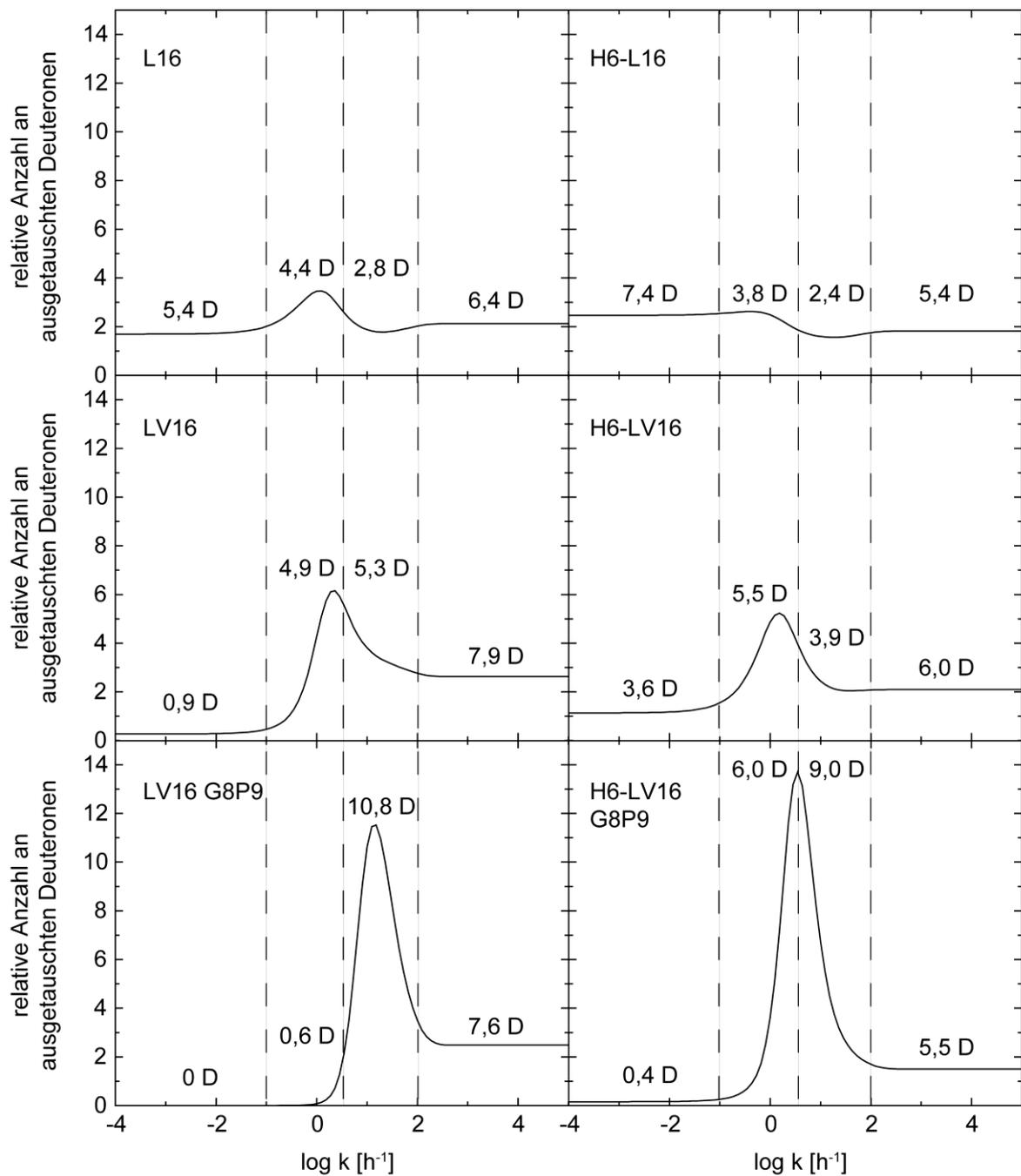


Abb. 53: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuterone der His- und Lys-flankierten Peptide aus den kontinuierlich vermessenen Kinetiken. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuterone, langsam, mittel und schnell austauschende Deuterone sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

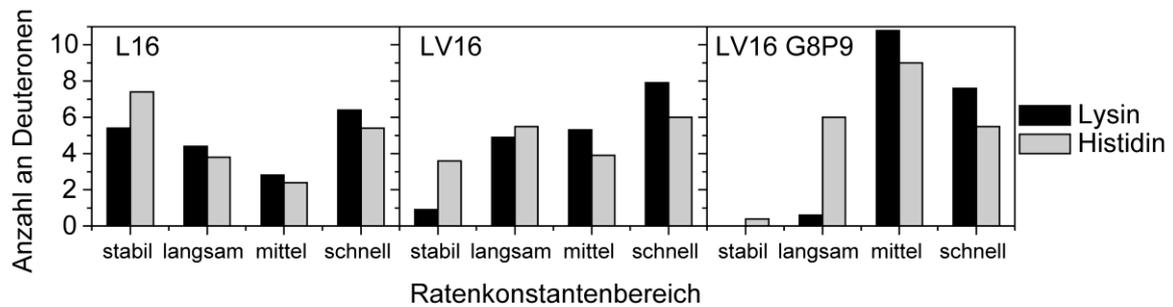


Abb. 54: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Da Austauschexperimente in Lösung in 80 % TFE und bei einem pH-Wert $< 6,0$ sehr langsam ablaufen, wurde mit folgenden Experimenten versucht zu klären ob der verlangsamte Austausch der His-Varianten auf eine erhöhte Oligomerisierung zurückzuführen ist. Das initialen Gleichgewicht zwischen Oligomeren und Monomeren bei den Lys- und His-Varianten wäre zudem beeinflusst durch die experimentellen Bedingungen. In den bisherigen Experimenten wurde eine Lösung von $100 \mu\text{M}$ deuteriertem Peptid 1:20 in protonierten Puffer verdünnt, so dass eine Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ erreicht wurde. Falls das Peptid in der konzentrierten Lösung in ungeladenem Zustand zur Oligomerisierung neigt, könnte eine Gleichgewichtseinstellung in der verdünnten Lösung länger dauern und einen Austausch der Amid-Deuteronen verlangsamen, was die langsamere Kinetik der His-flankierten Peptide erklären würde. In den folgenden Experimenten wurde deshalb eine bestimmte Menge an deuteriertem Peptid lyophilisiert und in protoniertem 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat pH 3,0 zu $5 \mu\text{M}$ gelöst. Bei einem pH-Wert von 3,0 ist die His-Seitenkette geladen und die Abstoßung sollte ähnlich hoch sein wie bei den Lys-flankierten Peptiden. Damit sollte sich ein Gleichgewicht zwischen Monomer und Oligomer einstellen, welches dem der Lys-Varianten entspricht. Die Austauschreaktion läuft bei diesem pH-Wert extrem langsam ab. Zum Start der Reaktion wurde zu den Proben 0,63 % Ammoniak (Endkonzentration) gegeben, was den pH-Wert auf ca. pH 6,8 erhöhte. Anschließend wurde die Kinetik sofort massenspektrometrisch vermessen.

Abb. 55 zeigt die Verläufe der Austauschreaktionen unter den genannten Bedingungen. Hierbei wird deutlich, dass sowohl Ladung, als auch Art der flankierenden Aminosäure in Lösung keinen Einfluss auf die Dynamik der α -Helix ausübten, da nahezu identische Austauschkinetiken für die His-flankierten Peptide im Vergleich zu ihren Lys-Derivaten beobachtet wurden.

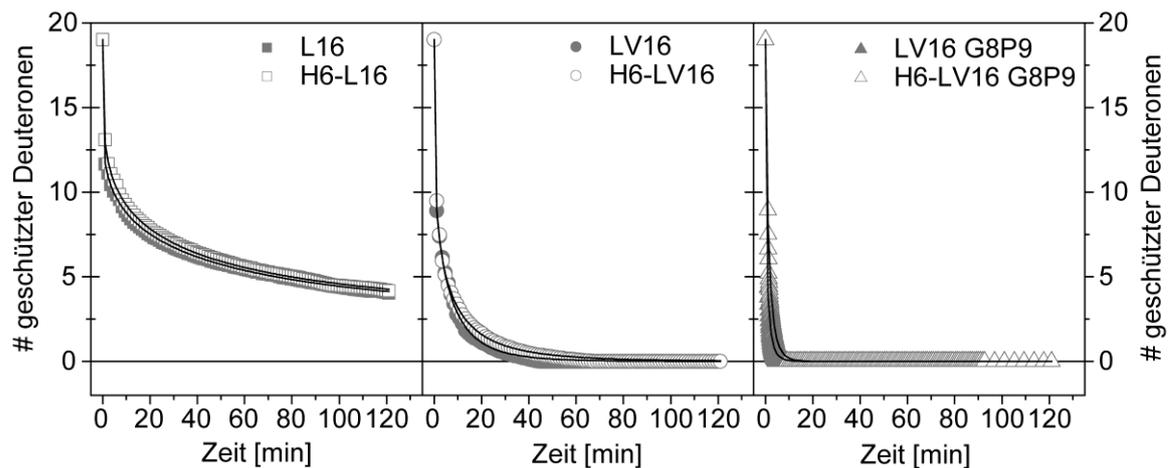


Abb. 55: DHX-Experimente der Histidin-Varianten in 80 % TFE 20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,8 bei 20 °C mittels „online“-Messmethode durch Base Start. Kinetik der Austauschreaktion der Amiddeuterone von His-flankierten im Vergleich zu Lys-flankierten Peptiden. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von $<0,31$ Deuterone ergab sich aus $n=2$ Messungen.

Dieses Bild wurde ebenfalls durch die kinetische Auswertung der gemessenen Daten bestätigt (Abb. 56 und Abb. 57). Die ermittelte Anzahl der in den verschiedenen Ratenkonstantenbereichen austauschenden Amid-Deuterone ergab keinen Unterschied zwischen den His-flankierten und den Lys-flankierten Peptiden. Lediglich die ausgeprägte Sequenzspezifität des hydrophoben Kernsegments blieb in den Austauschkinetiken erhalten. Damit war der Effekt des verlangsamten Austausches der His-Varianten (Abb. 52) allein auf die erhöhte Oligomerisierung, welche durch die experimentellen Bedingungen gegeben war zurückzuführen.

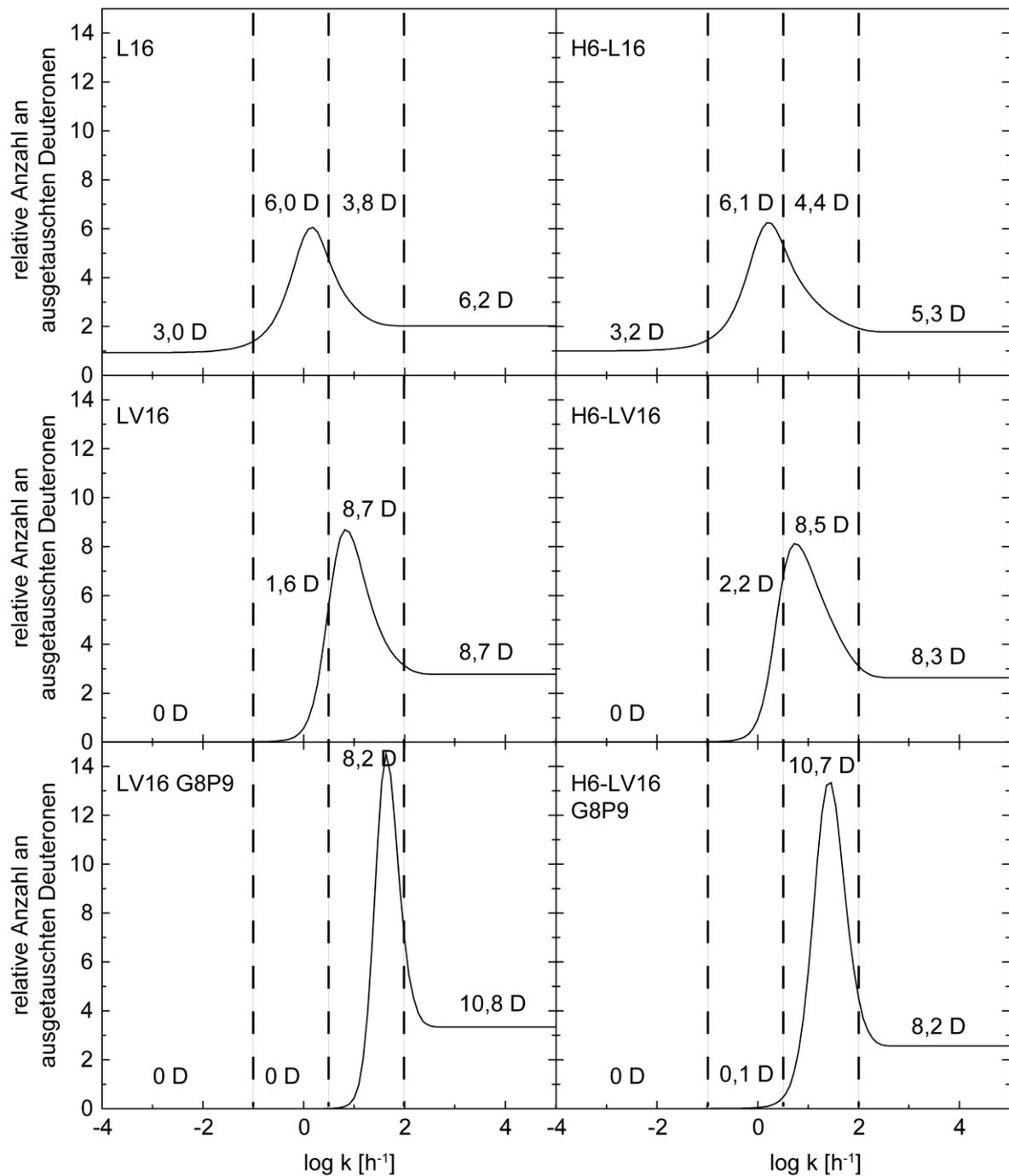


Abb. 56: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuteronen der His- und Lys-flankierten Peptide aus kontinuierlich vermessenen und durch Base-Zugabe gestarteten Kinetiken. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuteronen, langsam, mittel und schnell austauschende Deuteronen sind durch gestrichelte Linien markiert und deren Populationsgröße angegeben.

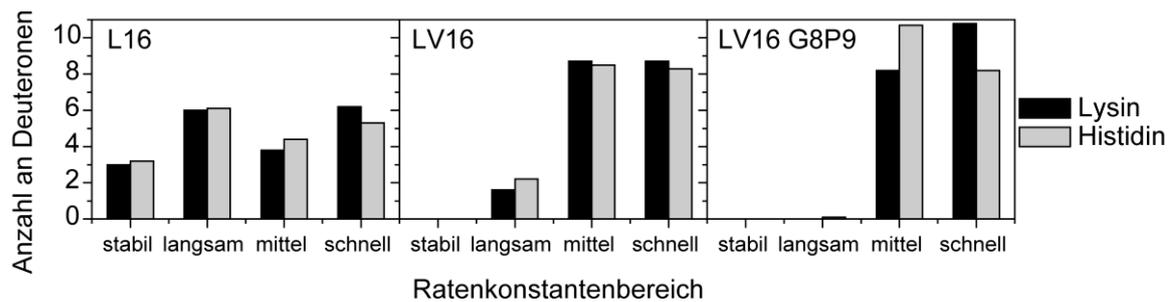


Abb. 57: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Ein Einfluss der Art der Seitenketten auf die α -Helix-Dynamik in den flankierenden Bereichen konnte mit den Experimenten ausgeschlossen werden. Ein kooperatives Umfalten der Peptide in ihrem ungeladenen Zustand kann ebenfalls nicht für die funktionellen Unterschiede der Peptide maßgeblich sein, wohl aber für deren Verhalten in Lösung. Dennoch könnte auch innerhalb der Membran ein unterschiedliches Maß an Oligomerisierung in Abhängigkeit vom Ladungszustand der Seitenketten für einen Unterschied in der Fusogenität verantwortlich sein. Dies scheint jedoch keine strukturellen Konsequenzen zu haben.

4.7 Struktur-Eigenschaften der Längen-Varianten

Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine Variation der Länge einer alternierenden Leu/Val-Sequenz strukturelle Konsequenzen hat. Für *in vitro*-Messungen von Liposomenfusion durch Peptide in POPC/DOPE/DOPS Membranen konnte gezeigt werden, dass eine hydrophobe Kernsequenz von 16 Aminosäuren das höchste Ausmaß an Fusion bewirkte. Strukturelle Unterschiede wurden im Folgenden durch das Messen der konformationellen Flexibilität bestimmt.

4.7.1 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der Längen-Varianten

Durch Verlängerung der hydrophoben Kernsequenz durch ein alternierendes Muster an Leucin und Valin erhöht sich gleichzeitig der relative Anteil an Valin in den Peptid-Sequenzen, bezogen auf die gesamte Länge inklusive der Lys-Triplets. Dieser erhöhte Anteil an Valin könnte die konformationelle Flexibilität bzw. die generell vorherrschende Sekundärstruktur maßgeblich beeinflussen. Abb. 58 A zeigt CD-Spektren der Peptide unterschiedlicher hydrophober Länge bei verschiedenen TFE-Konzentrationen in Lösung. Aus diesen Spektren und der Auswertung nach der Sekundärstruktur in Abb. 58 B wurde ersichtlich, dass eine nur kurze LV12-Sequenz eine stabile α -helikale Struktur ausbildete, welche mit

zunehmender Kettenlänge in eine konformationell flexible α -Helix für LV16 wechselte, bis hin zu einem ausgeprägten Anteil an β -Faltblatt für die Peptide LV20 und LV24.

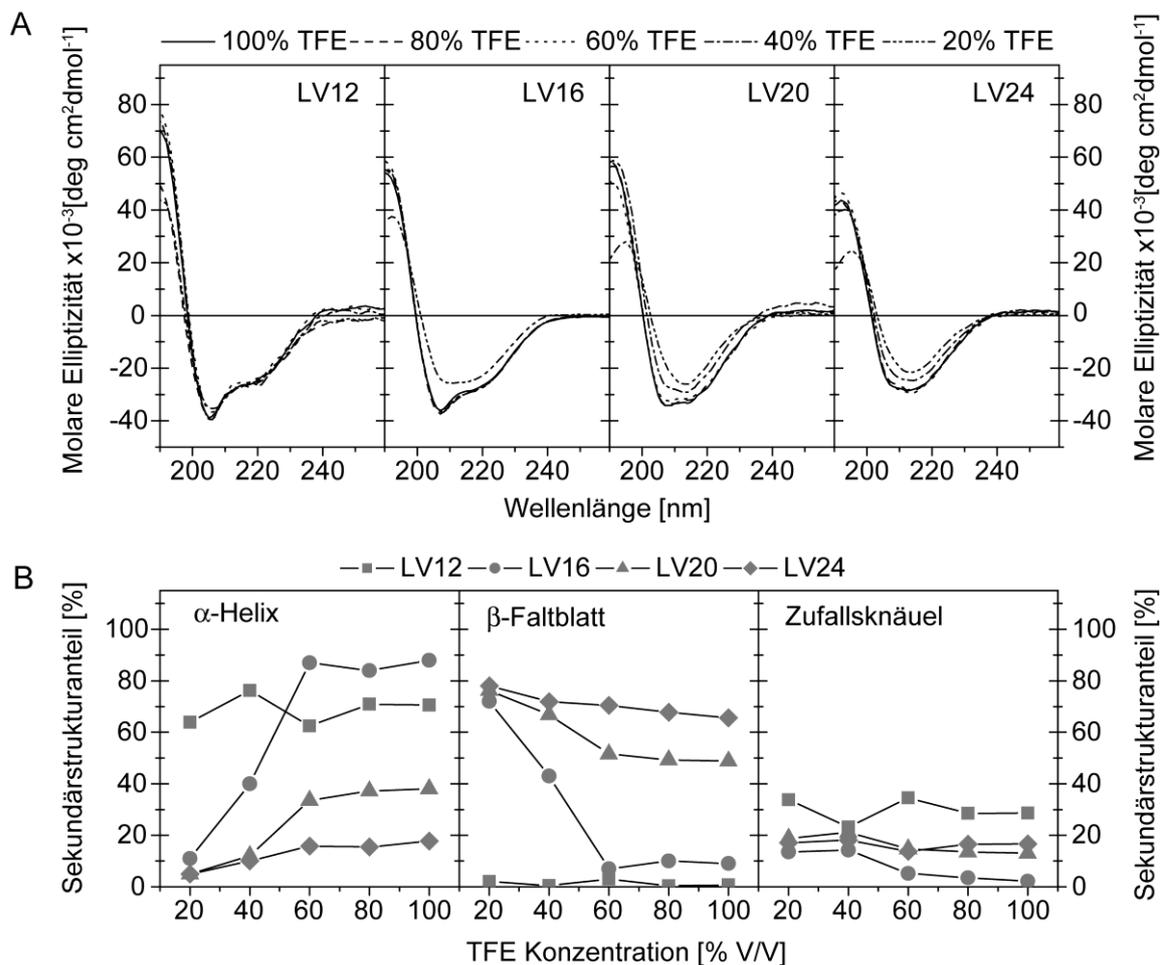


Abb. 58: Sekundärstruktur der Längen-Varianten. A, Polaritätstitration und zugehörige CD-Spektren der Längen-Varianten bei verschiedenen TFE-Konzentrationen, 25 μM Peptid in TFE/10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4 B, Auswertung der Sekundärstrukturanteile α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel-Motiv als Funktion der TFE-Konzentration.

In den langen Sequenzen konnte sich auch in sehr apolarer Lösung keine α -Helix bilden, was auf die erhöhte relative Anzahl an hydrophoben Aminosäuren und auch der β -verzweigten Aminosäure Valin zurückzuführen ist. Im Falle der Integration in liposomale Membranen kamen weitere Faktoren zum Tragen, welche die Struktur beeinflussen konnten, wie die Interaktion der geladenen flankierenden Aminosäuren mit der Phosphatidylserin Kopfgruppe oder dem Phosphat-Rest der Phospholipide. Abb. 59 zeigt CD-Spektren und die Auswertung dieser Spektren. Die Peptide, welche mindestens eine Länge von 16 Aminosäuren ihrer hydrophoben Kernsequenz aufwiesen, falteten sich in der apolaren Umgebung der Membran zur α -Helix um, während LV12 in liposomalen Membranen dazu gezwungen wurde seine α -helikale Struktur aufzugeben und sich in Form eines β -Faltblatts durch die Membran zu strecken.

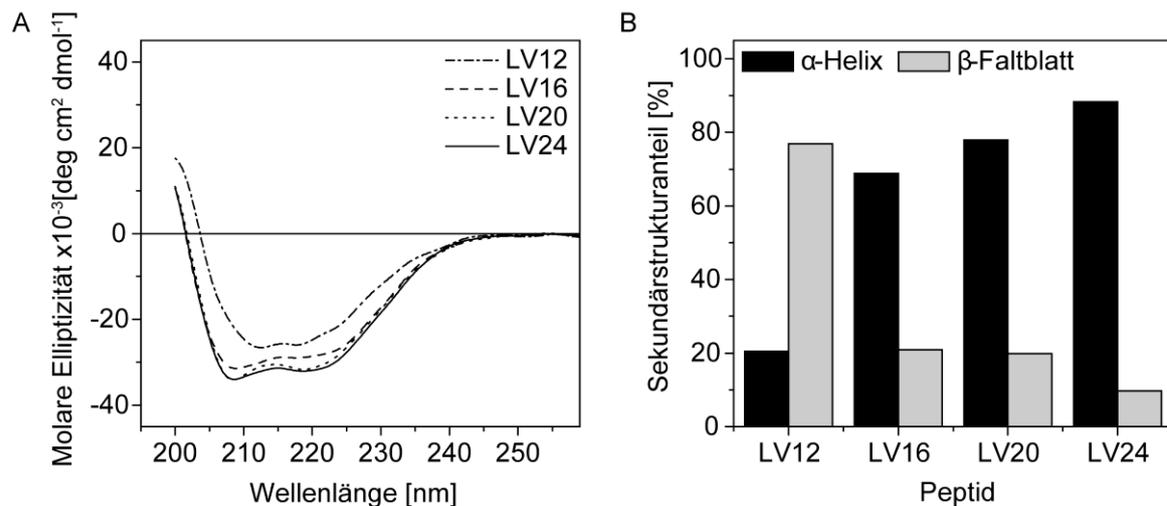


Abb. 59: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der Längen-Varianten in Membranen. A, CD-Spektren der Peptide in Liposomen (1 mol-% Peptid in POPC/DOPE/DOPS 3:1:1 Membranen). B, Auswertung nach prozentualem Sekundärstrukturanteil (α -Helix, β -Faltblatt) der Peptide in Liposomen. Versuche wurden in n=2-5 Messungen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Messungen in Lösung alle Peptide als α -Helix in die Liposomen-Membran integriert wurden, mit Ausnahme der LV12-Sequenz, welche einen sehr hohen Anteil an β -Faltblatt aufwies. Die Länge einer hydrophoben Peptidsequenz hat demnach neben ihrer spezifischen Sequenz einen hohen Einfluss auf die Sekundärstruktur-Stabilität der Peptid α -Helices. Die Struktur der Peptide und deren Präferenz in Lösung kann damit entscheidend durch die Lipide einer Membran verändert werden. Hier könnte nicht nur die Polarität der Membran eine Rolle spielen, sondern auch Interaktionen der Peptide mit den Lipiden der Membran.

4.8 Funktion und Struktur-Eigenschaften der acylierten Varianten

Natürliche Fusionsproteine tragen bisweilen Acylketten. Die Funktion und der Einfluss derartiger Acylierungen sind weitgehend unbekannt. Hier sollte anhand der Modellpeptide getestet werden, welche Auswirkungen Acylketten unterschiedlicher Länge auf die Funktion und die Struktur der Modellpeptide haben.

4.8.1 Fusion der acylierten Varianten

Die Fusogenität der Modellpeptide wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in Liposomen getestet. Dazu wurden Peptide in einem P/L-Verhältnis von 0,003, 0,005 und 0,01 in Liposomen (POPC/DOPE/DOPS; 3:1:1) eingebaut und sowohl die Fusion nach einer Stunde als auch der Anteil an Hemifusion bestimmt.

Die Ergebnisse der Fusogenität der acylierten Modellpeptide entstammen der Master-Arbeit von Konrad Fischer unter meiner Anleitung. Abb. 60 A zeigt exemplarische Fusionskinetiken der acylierten Peptide bei einem nominellen P/L-Verhältnis von 0,005 im Vergleich zum nicht acylierten LV16-Peptid. Das vom P/L-Verhältnis abhängige Ausmaß der Fusion nach einer Stunde ist in Abb. 60 B dargestellt. Abhängig von der Länge der Acylkette konnte ein vermindertes Ausmaß an Fusogenität festgestellt werden. Demnach behinderte die Acylkette das Mischen der beiden Bilayer, welches die Voraussetzung für komplette Fusion darstellt.

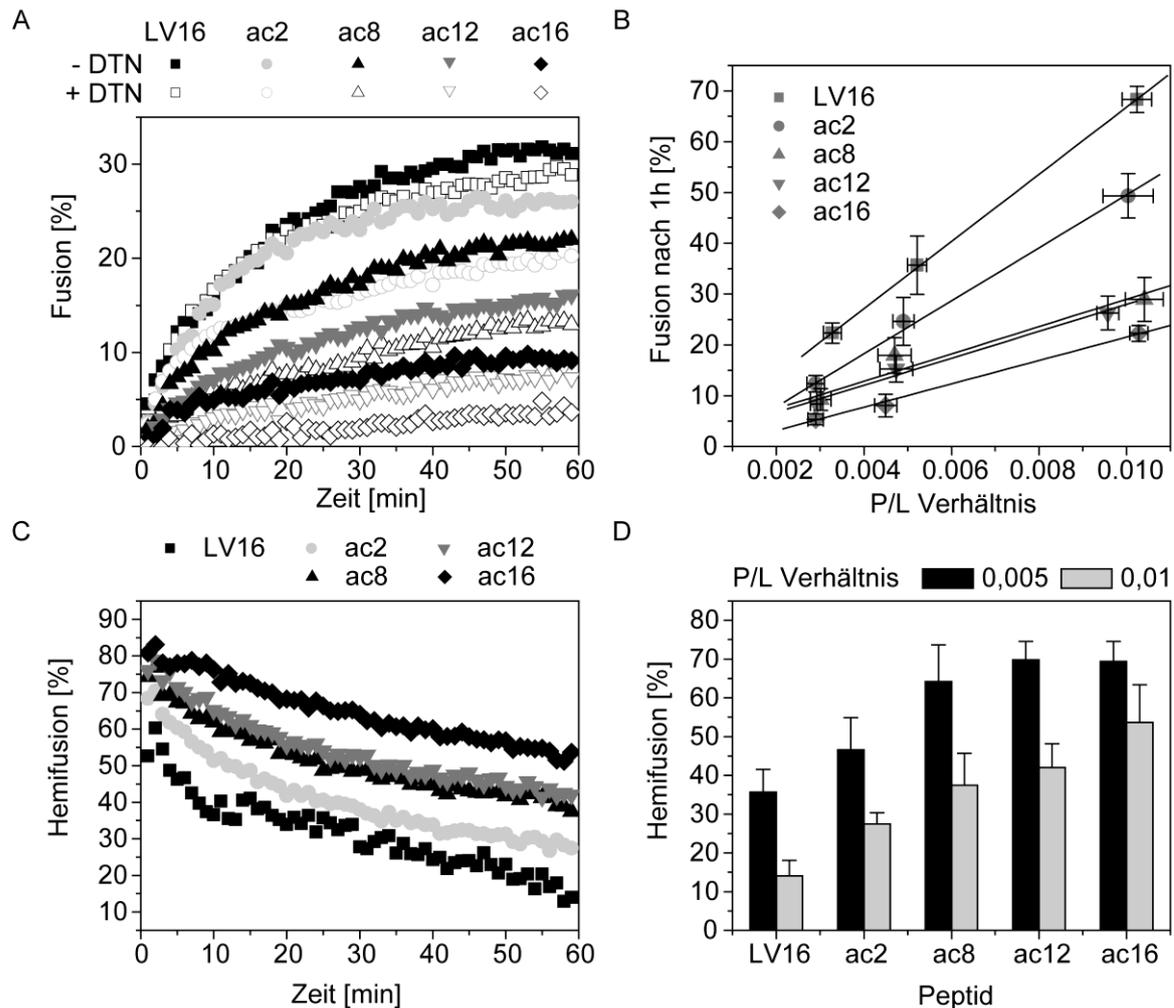


Abb. 60: Fusion der acylierten Peptide. A, Fusionskinetik bei einem nominellen P/L-Verhältnis von 0,005. Sowohl die Kinetik des Standardassays (geschlossene Symbole) als auch die Kinetik des DTN- (Natrium-Dithionit-) Assays sind aufgetragen (offene Symbole). B, Fusion nach einer Stunde von nominell eingesetzten P/L-Verhältnissen von 0,003, 0,005 und 0,01. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens n=4-5 Experimenten (Y-Fehler entspricht Abweichung in den Fusionsraten, X-Fehler entspricht der Abweichung in den experimentell bestimmten P/L-Verhältnissen). C, Hemifusion als Funktion der Zeit bei einem nominellen P/L-Verhältnis von 0,01. D, Anteilige Hemifusion der acylierten Peptide nach einer Stunde bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 und 0,005.

Der Anteil an Hemifusion für ein P/L-Verhältnis von 0,005 und 0,01 ist in Abb. 60 D dargestellt. Es wurde festgestellt, dass in Abhängigkeit der Länge der Acylkette nicht nur das Ausmaß der Fusion sank, sondern ebenfalls der Anteil an Hemifusion anstieg. Demzufolge beeinträchtigte die Acylkette den

Übergang von der Hemifusion zum komplett fusionierten Vesikel, während der erste Schritt vom Andocken der Vesikel bis zum Eintritt in die Hemifusion ebenfalls durch die Anwesenheit einer Acylkette beeinträchtigt wurde. Der durch die Acylkette vermittelte Arrest in der Hemifusion wird auch durch den in Abb. 60 C aufgezeigten zeitlichen Verlauf der Hemifusion verdeutlicht. Während das LV16-Peptid über die Zeit seinen Anteil an Hemifusion nahezu komplett in voll fusionierte Zustände umwandelte, verblieb in den acylierten Peptiden selbst über längere Zeit ein markanter Anteil an Hemifusionszuständen erhalten.

Abb. 61 zeigt den zeitlichen Verlauf der Vermischung der äußeren Lipidschichten, welcher sich durch Subtraktion der Fusionskinetik der Vermischung der inneren Schichten (DTN-Assay) von der Fusionskinetik der Vermischung beider Schichten (Standard-Assay) ergab. Hier wurde offensichtlich, dass die Anwesenheit einer Acylkette (mit Ausnahme von ac2) bereits den Eintritt in die Hemifusion, also die Vermischung der äußeren Schichten behindert.

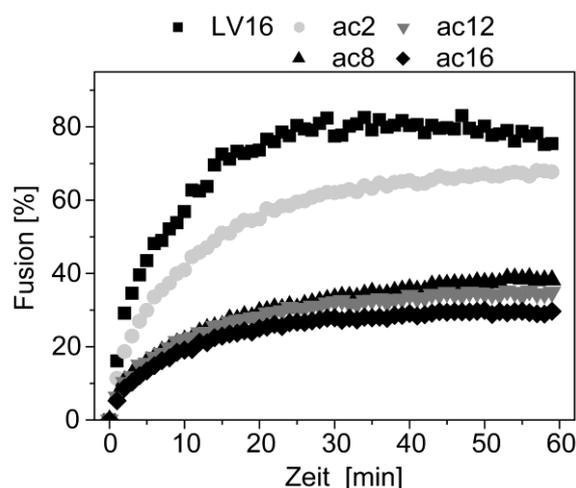


Abb. 61: Kinetik der Vermischung der äußeren Lipidschichten während der Fusion. Die Werte wurden durch Subtraktion der Daten des DTN-Assays von den Ergebnissen des Standardassays erhalten. Die Kinetik repräsentiert Mittelwerte aus n=3-4 Messungen.

Nachdem deutlich wurde, dass die Abnahme der Fusion sowohl in einem erhöhten Arrest in der Hemifusionsphase begründet ist als auch in einem Schritt vom Andocken zum Eintritt in die Hemifusion, sollten strukturelle Einflüsse der Acylketten auf die-LV16 Sequenz charakterisiert werden.

4.8.2 Sekundärstruktur und konformationelle Flexibilität der acylierten Varianten

Die konformationelle Flexibilität anhand der Umfaltung von einer α -Helix zum β -Faltblatt im polaren Medium wurde mittels Zirkular Dichroismus Spektroskopie bestimmt. Abb. 62 A zeigt die Ergebnisse der Sekundärstruktur-Analyse in Lösung bei 100 % TFE und 20 % TFE. Es wurde ersichtlich, dass eine Acylkette in der Lage war die α -helikale Sekundärstruktur der Peptide zu stabilisieren.

Ebenso wiesen alle Peptide in liposomaler Membran einen hohen Anteil α -helikaler Struktur auf. In jedem Fall lag der Gehalt an α -Helix noch über dem des LV16 Peptides ohne Acylkette. Die CD-Spektren der Peptide in liposomalen Membranen (Abb. 62 B) wiesen keine markanten Unterschiede auf. Die Auswertung der Spektren zeigte, dass die Acylierung der Peptide (Abb. 62 C) zu einem leicht erhöhten Anteil an α -Helix führte. Demnach war die Acylkette in der Lage, sowohl in Lösung als auch in liposomalen Membranen die α -Helix zu stabilisieren.

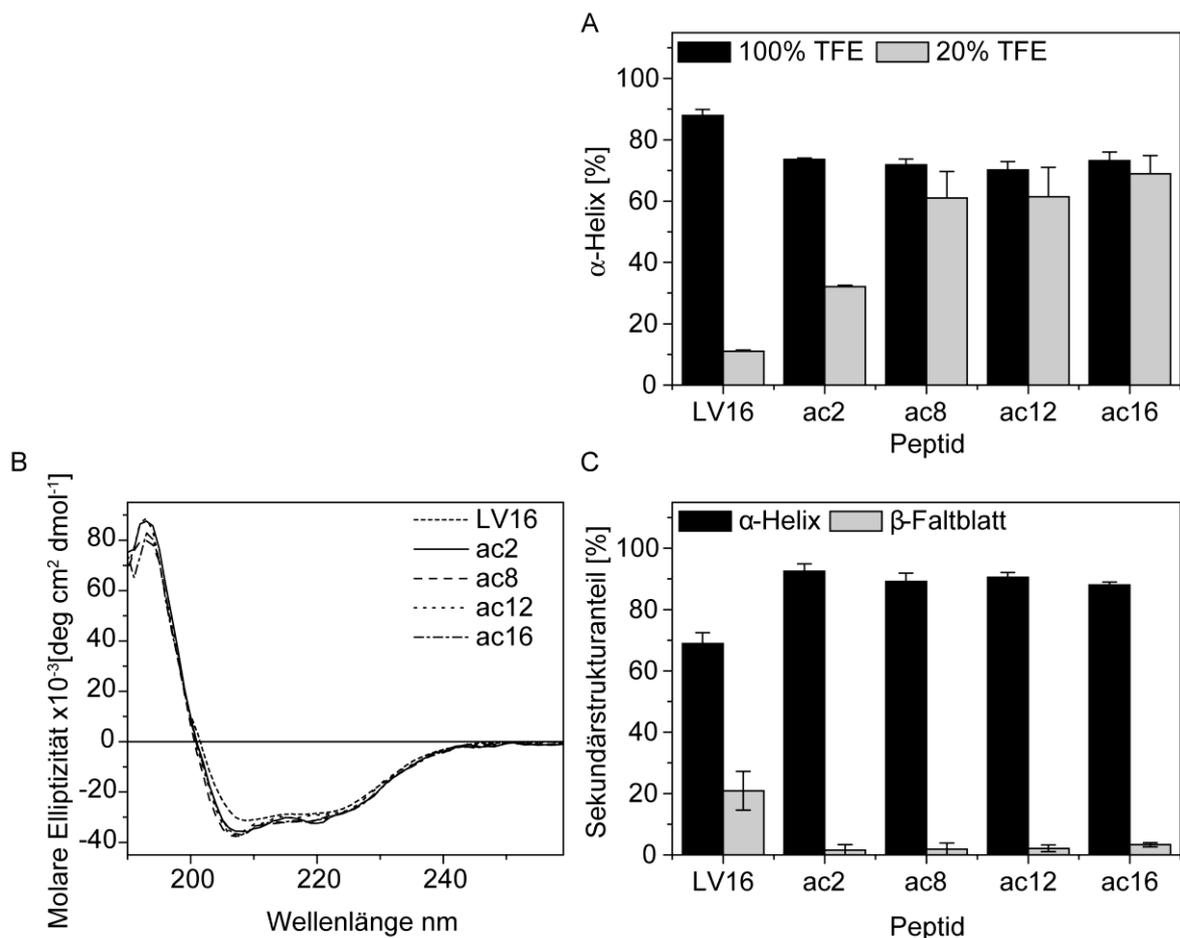


Abb. 62: Sekundärstruktur der acylierten Peptide. A, Gehalt an α -Helix in 100 % TFE und 20 % TFE/10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 7,4. B, CD-Spektren der acylierten Peptide in Liposomen aus POPC/DOPE/DOPS (3:1:1). C, Gehalt an α -Helix und β -Faltblatt in liposomalen Membranen.

Über D/H-Austauschexperimente sollte des Weiteren geklärt werden, ob die Acylketten einen direkten Einfluss auf die Dynamik der α -Helix ausübten oder ob sie indirekt über die Verschiebung eines Monomer/Oligomer-Gleichgewichts Einfluss ausübten. Ähnlich wie im Falle der His-flankierten Peptide, jedoch im umgekehrten Sinne, könnte hier ein Verschieben des Monomer/Oligomer-Gleichgewichts in Richtung Monomer ein kooperatives Auffalten der Peptide verhindern und damit zu einer erhöhten α -Helix Stabilität beitragen.

4.8.3 D/H-Austausch und Helixdynamik der acylierten Varianten

Die acylierten Peptide wurden in Lösung ebenfalls mit der bei den Histidin-flankierten Peptiden beschriebenen Methode vermessen, so dass eine längere Zeit zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen monomeren und oligomeren Populationen bis zur Messung möglich war. Abb. 63 A zeigt die Austauschkinetiken der acylierten Peptide im Vergleich zur nicht acylierten Sequenz LV16, welche einen sehr ähnlichen Verlauf nahmen. Aus diesem Grund konnte auch in der kinetischen Auswertung (Abb. 63 B) kein Unterschied in der Anzahl der ausgetauschten Deuterone für einen jeweiligen Ratenkonstantenbereich festgestellt werden.

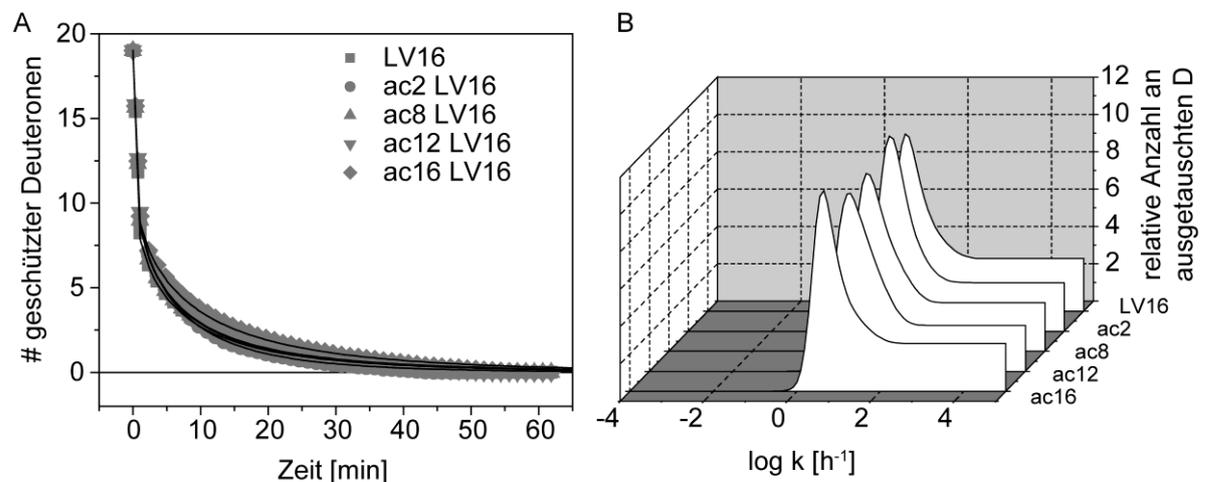


Abb. 63: DHX-Experimente der acylierten Varianten in 80 % TFE/20% 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,8 bei 20 °C mittels kontinuierlich vermessener Methode. A, Kinetik der Austauschreaktion der Amid-Deuterone. Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung durch MEM-Analyse. Die Standardabweichung von $<0,29$ Deuterone ergab sich aus $n=2$ Messungen. B, Verteilung der Häufigkeiten von Ratenkonstanten.

Sowohl die Verteilung der austauschenden Amid-Deuterone als auch das Maximum der am häufigsten auftretenden Austauschgeschwindigkeit waren bei allen untersuchten Peptiden sehr ähnlich. Die Anzahl der Deuterone in den jeweiligen Bereichen unterschieden sich innerhalb der Standardabweichung nicht (Abb. 64).

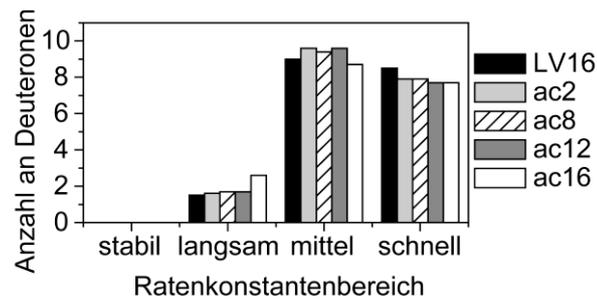


Abb. 64: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuteronen bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, langsam austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $5,3 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuteronen den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \text{ min}^{-1} < k$.

Um Aussagen über die α -Helix Dynamik im Zustand der Membran-Integration zu treffen, wurden die Peptide in POPC/DOPE/DOPS Membranen und in DMPC Membranen vermessen (Abb. 65). Sowohl in DMPC als auch in POPC/DOPE/DOPS Liposomen zeigten die Peptide eine vergleichbare Austauschkinetik.

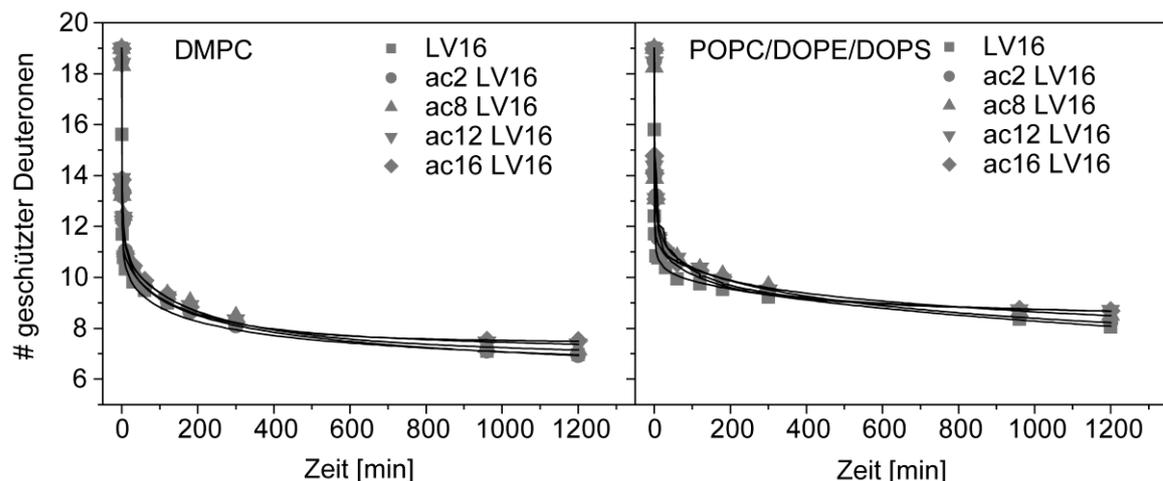


Abb. 65: DHX-Kinetik der acylierten Varianten in Lipid-Membranen bei 50 °C in 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5. Die Peptide wurden zu 1 mol-% im Verhältnis zu Lipid eingebaut. Es wurden Liposomen bestehend aus POPC/DOPE/DOPS (3:1:1) oder DMPC für die Experimente verwendet. Die Linien bezeichnen den exponentiellen Fit der Auswertung mittels MEM-Analyse. Die Standardabweichung von $< 0,33$ Deuteronen ergab sich aus $n=2-3$ Messungen.

Die sehr ähnliche α -Helix-Dynamik der Peptide in Membranen wurde ebenfalls bestätigt durch die kinetische Auswertung mittels MEM-Analyse. Lediglich LV16 schien terminal im Gegensatz zu den acylierten Peptiden eine leicht erhöhte Flexibilität aufzuweisen (Abb. 66 und Abb. 67).

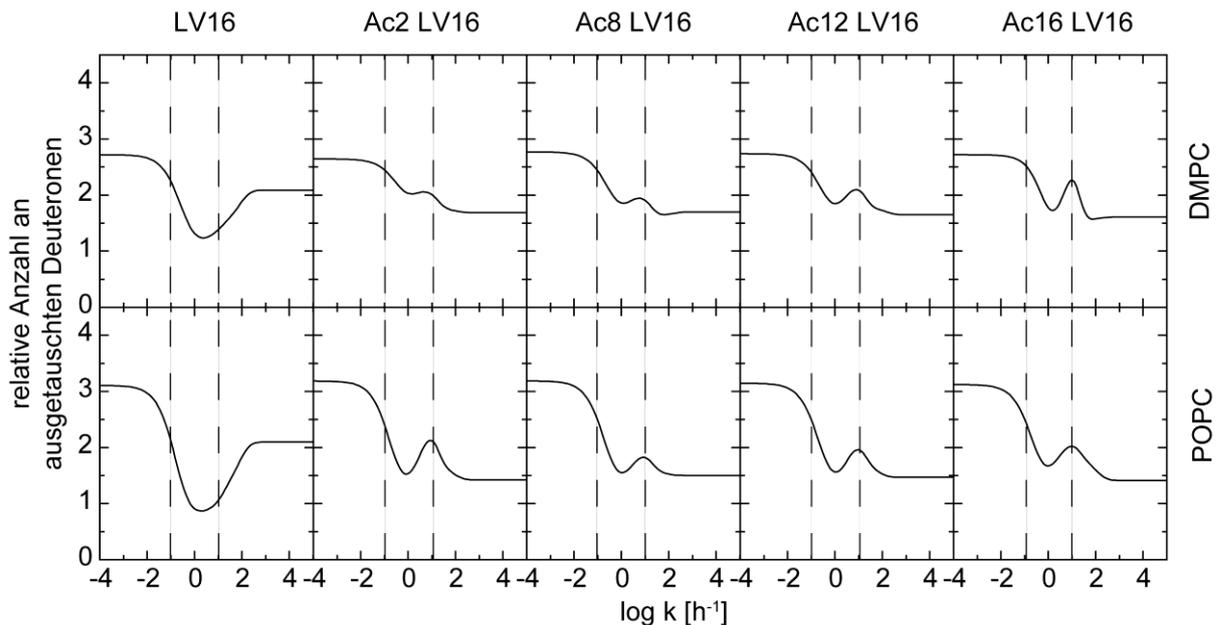


Abb. 66: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse. Häufigkeit der Ratenkonstanten für den Austausch der Amid-Deuterone der acylierten Peptide in POPC/DOPE/DOPS und DMPC Liposomen. Die definierten Bereiche für stabile Amid-Deuterone, mittel und schnell austauschende Deuterone sind durch gestrichelte Linien markiert.

Damit konnte ein direkter Einfluss der Acylketten auf eine α -helikale Struktur ausgeschlossen werden, so dass die erniedrigte konformationelle Flexibilität der Peptide auf einem erniedrigten kooperativen Effekt in Lösung beruhen könnte bzw. indirekt in Membranen durch Lipidinteraktion hervorgerufen werden könnte.

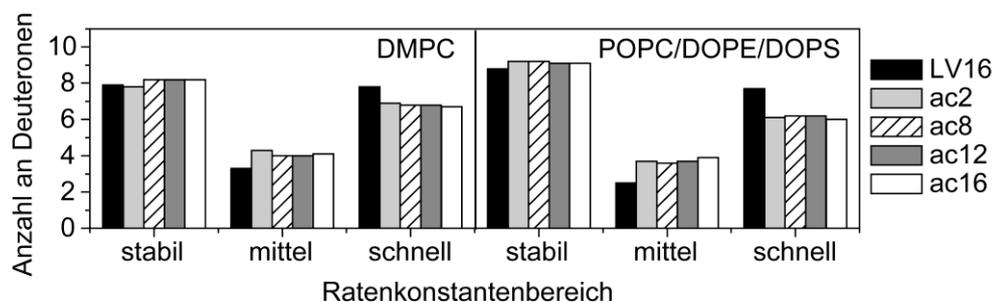


Abb. 67: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode. Stabile Deuterone bezeichnen den Bereich der Ratenkonstanten $k < 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, mittel austauschende Deuterone den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1} < k < 1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und schnell austauschende Deuterone den Bereich der Ratenkonstanten $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1} < k$.

Die Anzahl der Deuterone, welche mit schneller oder mittlerer Geschwindigkeit im Membranfall austauschten, gab lediglich Aufschluss über die terminalen Bereiche der Peptide, während die Dynamik im Kern sehr unterschiedlich sein könnte. Damit wäre ein mögliches Fusionsdefizit, im Sinne des Eintritts in die Hemifusion, in einer verminderten Flexibilität der zentralen Reste der acylierten Peptide zu suchen. Dies scheint jedoch im Hinblick auf die Ergebnisse des Austausches in Lösung sehr unwahrscheinlich zu sein.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es fusogene, membrandurchspannende Peptide strukturell hinsichtlich globaler Flexibilität und lokaler Helixdynamik zu charakterisieren. Es sollten strukturelle Merkmale mit der spezifischen Fusogenität unterschiedlicher Peptide korreliert werden.

5.1 Die Helixdynamik kurzer Modellpeptide

Ergebnisse aus Untersuchungen an den TMD neuronaler SNARE-Proteine [39] und viraler Fusionsproteine [90] zeigten eine klare Bedeutung der Transmembrandomänen für den Vorgang der Membranfusion auf. In diesen Experimenten war es möglich, *in vitro* Membranfusion durch Peptide zu mediieren, welche den jeweiligen Transmembrandomänen der natürlichen Proteine entsprachen.

Für die Initiation der Fusion, den Übergang von getrennten Lipidschichten zur Vermischung der äußeren Lipidschichten, deutete sich eine Korrelation zwischen Fusogenität und konformationeller Flexibilität dieser Peptide an. Peptide, welche den Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteinen entsprachen, waren in der Lage, *in vitro* die Fusion von Liposomen zu ermöglichen, obwohl keine extrazellulären Domänen vorhanden waren, welche für die direkte Apposition der Liposomen sorgten [39]. Damit erhöhen membrandurchspannende Peptide die Wahrscheinlichkeit mit der zufällig kollidierende Liposomen in einen Fusionsvorgang eintreten. Hier wurde die Korrelation von Flexibilität und Eintritt in die initiale Phase der Fusion verdeutlicht. Es konnte gezeigt werden, dass Peptide, welche eine sehr hohe Fusogenität aufwiesen, in micellären Lösungen als Mischungen bestehend aus α -Helix und β -Faltblatt vorlagen [89]. Diese Tendenz zur Umfaltung der Sekundärstruktur wurde als konformationelle Flexibilität bezeichnet und wurde auf den hohen Anteil an β -verzweigten Aminosäuren zurückgeführt. Eine Reduktion dieser α -Helix-destabilisierenden Reste führte gleichzeitig zu einer Reduktion der Fusogenität.

In weiteren Experimenten zeigte sich eine sequenzspezifische Fusogenität von artifiziellen Peptiden [45], welche unterschiedliche strukturelle Präferenzen aufwiesen. Die detaillierte strukturelle Charakterisierung dieser *de novo* kreierte Peptide wurde in dieser Arbeit in Abhängigkeit von ihrer Primärstruktur vorgenommen.

5.2 Rolle der hydrophoben Kernsequenz

De novo kreierte Modellpeptide dienten als einfaches System zur Bestimmung struktureller Eigenschaften membrandurchspannender α -Helices. Hier sollten die für den Vorgang der

Membranfusion wichtigen strukturellen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Primärstruktur der Peptide charakterisiert werden. De novo kreierte Peptide zeigten ähnliches Verhalten hinsichtlich Fusogenität und konformationeller Flexibilität wie Peptide, welche der Sequenz der Transmembrandomäne natürlich vorkommender SNARE-Proteine entsprechen. Damit konnten künstlich erzeugte Peptidsequenzen als Modellsystem für natürlich vorkommende Transmembrandomänen von Fusionsproteinen verwendet werden. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass natürliche Sequenzen ein Optimum an Fusogenität darstellen. Mutationen, welche die Stabilität der Peptide förderten, führten zu einer Reduktion des fusogenen Potentials. Dieser Sachverhalt wurde nun mit Modellpeptiden und der Variation der Sequenzen aus den beiden Aminosäuren Leucin und Valin genauer untersucht. Die Peptide waren dabei immer nach ähnlichem Muster aufgebaut. Die flankierenden Aminosäuren bestanden aus Triplets von Lysin-Resten, welche primär für die bessere Löslichkeit und Membranintegration sorgen sollten. Die strukturellen Einflüsse sollten deshalb lediglich durch die Variation der 16 zentralen Aminosäuren zustande kommen. Damit sollte der hydrophobe Kern die strukturellen Eigenschaften der Peptide bestimmen.

5.2.1 Die Dynamik der aliphatischen Peptid-Varianten

Durch das gleichmäßige Einbringen von α -Helix-destabilisierenden Resten auf eine Oligo-Leucin-Sequenz kann von einer gleichmäßigen Destabilisierung der Peptid-Helices ausgegangen werden. Obwohl nicht direkt geklärt werden kann in welchen Teilen die α -Helix flexibel ist, so ist wegen des regelmäßigen Musters und aufgrund der Tatsache, dass α -Helices zu den terminalen Bereichen hin flexibler sind [120], davon auszugehen, dass die Stabilität der Peptide von Außen nach Innen sukzessive zunimmt. Durch Zirkulardichroismus-Messungen sollte die globale Struktur bestimmt werden und durch Polaritätstitrationen die Tendenz der verschiedenen Peptide zur globalen Entfaltung gemessen werden. Dies kann als Maß für Helixstabilität gesehen werden. Aus diesem Grund war es jedoch notwendig die Auswertung von CD-Spektren, speziell dieser kurzen Peptide, zu optimieren.

Da gängige Auswertelgorithmen die Sekundärstruktur einer unbekannt Probe unter Abgleich bekannter Strukturen auf Basis von Proteinen nutzen, wurde hier ein Referenzsatz an künstlichen Peptidspektren zur verbesserten Auswertung von Zirkular Dichroismus Daten entwickelt. Die Zirkular Dichroismus-Spektroskopie beschreibt die Summe aller Konformationen, welche von einem Protein oder Peptid während eines Experiments beobachtet werden können. Aus diesem Grund können quantitative Daten aus CD-Spektren keine absolute Strukturaussage liefern. Im Vergleich zu NMR oder Röntgenkristallstrukturanalyse stellt die Zirkular Dichroismus-Spektroskopie jedoch eine schnelle und einfache Methode zur Abschätzung der Sekundärstruktur dar. Eine Vielzahl von Methoden wurde entwickelt, um eine genaue Interpretation der Sekundärstruktur anhand von CD-Spektren im Fern-UV-Bereich zu ermöglichen. Diese Methoden wurden jedoch in der Hauptsache entwickelt, um

Strukturinformationen globulärer Proteine zu erhalten [98, 99, 101]. Der Sekundärstruktur speziell von Peptiden wurde dabei wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Mit der Erkenntnis, dass selbst kurze Peptide Sekundärstrukturen einnehmen können [121-123], wuchs das Interesse der Sekundärstrukturanalyse von kurzen Peptiden mittels Zirkular Dichroismus-Spektroskopie. Kurze Helices, wie sie häufig innerhalb von Proteinen vorkommen, geben in der CD-Spektroskopie kein quantitatives Signal, während diese durch andere Methoden bestimmt werden können [124]. Deshalb findet sich in der Auswertung der CD-Spektren kurzer Peptide unter Verwendung von Protein-Referenzspektren eine Überrepräsentation helikaler Strukturen. Aus diesem Grund wurde der PEPFIT-Algorithmus speziell zur Auswertung von CD-Daten kurzer Peptide entwickelt [115]. Die Software benötigt jedoch manuelles Anpassen der Daten und ist somit schwierig in der Handhabung und das Ergebnis des Fits ist abhängig von der optischen Begutachtung des jeweiligen Nutzers, wodurch sehr unterschiedliche Ergebnisse entstehen können. Die in dieser Arbeit entwickelte Kombination aus CDNN und PEPFIT war nötig, um CD-Daten von Peptiden akkurat auszuwerten. CDNN/PEPFIT erwies sich als schnelle und einfach anzuwendende Alternative zu PEPFIT und zeigte in allen Tests ein vergleichbares Ergebnis. Mit Hilfe des künstlichen neuronalen Netzwerks von CDNN und dem Referenzsatz an Peptiden aus PEPFIT wurde hier eine Möglichkeit geschaffen, benutzerunabhängig speziell die CD-Daten von Peptiden akkurat und schnell auszuwerten.

Die synthetischen Modellpeptide der aliphatischen Reihe konnten mit Hilfe der neuen Software hinreichend strukturell charakterisiert werden. Veränderungen in den Spektren spiegelten sich nun ebenso in den erhaltenen Sekundärstrukturanteilen wider. In der Polaritätstitration zeigte sich ein Auffalten der hydrophoben Modellpeptide in polarem Medium (Abb. 19). Obwohl die Solvatisierung der α -Helices aufgrund der hydrophoben Seitenketten nicht begünstigt ist, zeigt sich für die valinhaltigen Sequenzen (LV16, VVL16) eine Tendenz zur Faltung zum β -Faltblatt. Es ist anzunehmen, dass die Peptide im wässrigen Medium Oligomere aus α -Helices oder β -Faltblättern bilden. Somit könnten das Auffalten und die Bildung von β -Faltblättern über einen kooperativen Effekt begünstigt sein. Die Unterschiede in der Fusogenität von L16 (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 ca. 8 %) und LLV16 (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 ca. 26 %) lassen sich jedoch nicht allein durch Polaritätstitrationen rationalisieren, da bei beiden Peptiden kein Auffalten der α -Helix beobachtet wurde. Das Auffalten der α -Helix, bzw. deren Umfalten zum β -Faltblatt, wird im Folgenden als globale Flexibilität bezeichnet. Dahingegen spiegeln sich die Unterschiede in der Polaritätstitration und damit in der globalen Flexibilität nicht in den Fusogenitäten der beiden Peptide LV16 (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 ca. 64 %) und VVL16 (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 ca. 61 %) wider (siehe 4.3.1). Ein deutlicher Unterschied in der globalen Flexibilität von LV16 und VVL16 konnte jedoch gezeigt werden. Dennoch ist die Fusogenität von VVL16 gegenüber LV16 nicht erhöht. Globale Flexibilität korreliert damit nicht perfekt mit der jeweiligen Fusogenität.

Eine α -Helix, welche nur aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut ist, zeichnet zudem eine hohe Stabilität aus. In Helices aus hydrophoben Aminosäuren liegt die energetische Barriere höher, welche ein Entfalten dieser Helices zulässt [125]. Ist eine Peptidsequenz fortlaufend aus hydrophoben Aminosäuren

zusammengesetzt, können sich sogar β -verzweigte Aminosäuren innerhalb einer relativ stabilen α -helikalen Struktur befinden. Dieser Effekt lässt sich auf eine kooperative Packung der hydrophoben Seitenketten zurückführen. Dabei haben die für die Bildung einer α -Helix verantwortlichen intramolekularen Wasserstoffbrücken relativ unabhängig vom umgebenden Medium eine lokale hydrophobe Umgebung, was diese Bindungen stärkt und somit die α -Helix stabilisiert. Um nun die Entfaltung einer derartigen α -Helix zu ermöglichen, müssen die Interaktionen zwischen den hydrophoben Seitenketten unterbrochen werden. Aus diesem Grund hat eine α -Helix aus hydrophoben Aminosäuren eine sehr hohe Energiebarriere für die Entfaltung, während diese bei löslichen Helices deutlich niedriger liegt [126]. Häufig führt die Entfaltung derartiger α -Helices dann zu einer sehr schnellen Aggregation der Peptide. Aus diesem Grund wird angenommen, dass auch Peptide, welche eine hohe Anzahl an β -verzweigten Aminosäuren tragen und zudem sehr hydrophob sind, eine relativ stabile α -Helix bilden können. Am Beispiel des „Surfactant Associated Polypeptide C“ (SP-C) wurde jedoch auch gezeigt, dass eine derartige stabile α -Helix innerhalb von Wochen irreversible β -Faltblatt-Aggregate bildet [127]. Außerdem stützen NMR-Daten, dass die helikale Konformation dieses hydrophoben Valin-reichen Peptids in Lösung nicht in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen alternativen nicht-helikalen Konformationen vorliegt, sondern vielmehr einem kooperativen Entfaltungs- und Aggregationsprozess unterliegt. Auch Simulationsstudien untermauern diese hohe Entfaltungsbarriere von SP-C [128]. Demnach tolerieren Helices aus hydrophoben Aminosäuren in einer entsprechend unpolaren Umgebung eine hohe Anzahl an β -verzweigten Aminosäuren ohne zu entfalten. Damit ist für die Mehrzahl der Transmembrandomänen die α -Helix das zentrale Strukturmotiv, während das β -Faltblatt eine strukturelle Sackgasse des Peptids darstellt, welche als Seitenreaktion durch zu hohe Anteile an Valin-Resten entstehen kann. Nachdem auch für die meisten hier untersuchten Peptide gezeigt wurde, dass innerhalb der Membran die α -Helix als stabile Konformation vorherrscht, könnte die lokale Dynamik dieser Helices die unterschiedliche Fusogenität erklären. Nachdem eine sehr hohe Energiebarriere für die Entfaltung der α -Helix angenommen wird, würde dies den Bereich innerhalb dessen diese Helix dynamisch sein kann weiter vergrößern. Damit wäre eine lokale Flexibilität einer membrandurchspannenden α -Helix die entscheidende Triebkraft für eine fusogene Wirkung. Isoleucin und Valin können demnach dazu dienen die lokale Flexibilität einer membrandurchspannenden α -Helix stark zu modulieren [93]. Die hydrophobe Umgebung der Membran sorgt dennoch dafür, dass die α -Helix als Konformation bestehen bleibt. Das β -Faltblatt wäre demnach eine nicht funktionelle Konformation. Alle bekannten Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteine weisen helikale Struktur auf. Im Peptidsystem könnte das β -Faltblatt als Seitenreaktion von zu hohen Anteilen an α -Helix-destabilisierenden Aminosäuren auftreten.

Für die aliphatischen Varianten zeigte sich im Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperiment ein klarer Zusammenhang zwischen Valin-Gehalt und Austauschgeschwindigkeit (L16<LLV16<LV16<VVL16) (siehe 4.3.2). Im Folgenden wird im Zusammenhang mit den

Austauschgeschwindigkeiten von Peptiden von lokaler Flexibilität gesprochen. Lokale Flexibilität einer α -helikalen Konformation bedingt sich demnach in durchgehend, gleichmäßigen Mischungen aus Leucin und Valin aus der Anzahl an Valin-Resten. Die Fusionsexperimente zeigen, dass ein Leu/Val-Verhältnis von 1 sowohl notwendig als auch ausreichend, ist die Fusion von Liposomen in vitro vergleichbar zu natürlichen Sequenzen (Synaptobrevin 2 (syb) und Syntaxin 1a (syx)) zu ermöglichen. In Lösung korrelierten für die aliphatischen Varianten der Peptide deren Austauschverhalten, damit die Stabilität der intramolekularen Wasserstoffbrücken und lokale Flexibilität, mit ihrer Fusogenität (L16<LLV16<LV16). Lediglich VVL16 zeigte die höchste lokale Flexibilität, konnte jedoch in der Fusogenität keine Steigerung im Vergleich zu LV16 bewirken. Wie jedoch oben angesprochen, zeigt sich für VVL16 ein deutlich schnelleres Umfalten in der Polaritätstitration als dies für LV16 der Fall ist. Desweiteren ist die Sekundärstruktur von VVL16 in membranintegriertem Zustand durch einen deutlichen Anteil an β -Faltblatt gekennzeichnet, was nach obiger Hypothese einem nicht-fusogenen Seitenprodukt entsprechen könnte und damit die zu LV16 vergleichbare Fusogenität trotz erhöhter Flexibilität erklären könnte. VVL16 besitzt mehr als 50 % Valin während Transmembrandomänen von Fusionsproteinen in der Natur lediglich ~50 % β -verzweigte Aminosäuren aufweisen. Viele Transmembrandomänen in der Natur weisen zudem einen sehr hohen Anteil an Isoleucin auf. Im Vergleich zu Valin besitzt jedoch Isoleucin in apolarer Umgebung kein derartig hohes Potential zur Destabilisierung einer α -Helix wie dies durch Valin geschieht. Demnach können im Vergleich zu den synthetischen Modellpeptiden, welche als einzige β -verzweigte Aminosäure Valin enthalten, in der Natur Transmembranhelices durch Isoleucin ein höheres Maß an β -verzweigten Aminosäuren tolerieren und durch den Gebrauch von Isoleucin unter Umständen die lokale Flexibilität von Transmembranhelices feiner regulieren [12]. Demnach könnte die α -Helix die funktionale Struktur fusogener Peptide sein, während das fusogene Potential sich aus der Destabilisierung dieser α -Helix ergibt. Zu starke Destabilisierung könnte jedoch Entfalten der Peptide und zum Arrest im β -Faltblatt führen, wodurch Fusogenität effektiv nicht länger mediiert werden kann.

Peptide mit einer alternierenden hydrophoben Kernsequenz aus Leucin und Valin unterschiedlicher Länge (siehe 4.7.1) zeigten, dass die konformationelle Stabilität der α -Helix abhängig ist von der Länge des Peptids. Es muss mit berücksichtigt werden, dass das Valin zu Leucin und Lysin Verhältnis mit der Länge der Peptide ansteigt, was die erniedrigte Stabilität der längeren Peptidvarianten erklären könnte. Außerdem erhöht sich die Länge des hydrophoben Bereichs der Peptide, was diesen eine höhere Möglichkeit zur Interaktion und Umfaltung gewährt. Die LV16-Sequenz stellte innerhalb des artifiziellen Liposomensystems die fusogenste Variante dieser Peptide dar. Innerhalb der Membran zeigte sich jedoch, dass mit Ausnahme von LV12 alle Peptide eine α -Helix bilden konnten. LV12 lag als β -Faltblatt-Struktur vor. Daraus wird ersichtlich, dass die Membran gezielt Konformationen stabilisieren kann. Die längeren Varianten können sich dabei wahrscheinlich über einen veränderten Einbauwinkel in den hydrophoben Bereich integrieren, während die kurze Variante wegen ihrer terminalen Lysin-Reste innerhalb der Membran gestreckt und umgefaltet wird. Die Diskrepanz zwischen hydrophober Länge von

TMD-Peptiden und Dicke einer Membran kann demnach ebenso die Stabilität einer α -Helix beeinflussen.

Diese Peptide konnten als Modellsysteme für Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteine betrachtet werden, da die α -Helix auch in Liposomen das zentrale Strukturmotiv dieser Peptide bildete (siehe 4.3.1). In Übereinstimmung zu Polaritätstitrationen der Peptide in Lösung deutete ein leicht erhöhter β -Faltblatt-Anteil der Peptide mit steigendem Valin-Gehalt in Zirkular-Dichroismus Untersuchungen auf konformationelle Flexibilität hin. Bestärkt wurde dieses Bild durch die beschleunigten Austauschkinetiken der Peptide (in Liposomen) im D/H-Austauschexperiment mit steigendem Anteil an Valin-Resten. Eine lokale Entfaltung der helikalen Konformation konnte durch eine Erhöhung des Anteils an Valin-Resten gesteigert werden. Auch die beobachtete globale Entfaltung, welche über das Messen der Sekundärstruktur innerhalb der Polaritätstitration bestimmt wurde, weist auf eine Destabilisierung der α -Helix durch Einbringen von Valin-Resten hin. Damit ist für LV16 der beste Kompromiss zwischen Flexibilität in der Membran und dem Aufrechterhalten einer membrandurchspannenden α -Helix gefunden.

Das fusogene Potential eines Peptids (syb-wt), welches der Transmembrandomäne von Synaptobrevin 2 entspricht, war vergleichbar mit dem des LV16 Peptids. Mutationen, welche die Stabilität der Helix förderten, reduzierten die Fusogenität des Peptids (syb-L8) [129]. Dieses Bild bestätigte sich auch in der Betrachtung der Helix-Stabilität mittels DHX-Experimenten in denen die fusogenen Sequenzen einen schnelleren Austausch und damit eine flexiblere α -Helix zeigten.

Durch gezieltes Destabilisieren der α -helikalen Struktur der Peptide unter Beibehaltung der globalen Konformation einer α -Helix sollte versucht werden die Dynamik und damit die Fusogenität der membrandurchspannenden Peptide weiter zu steigern.

5.2.2 Der Einfluss von Glycin und Prolin auf die Helixdynamik

Es zeigte sich, dass das Einbringen der Helixbrecher-Motive Gly/Pro einen starken Effekt auf die Fusogenität der Peptide hatte. Glycin und Prolin im Zentrum einer alternierenden Sequenz aus Leucin und Valin konnte die Fusogenität dieser Peptide weiter steigern, während ein einzelnes Glycin oder Prolin dazu nicht in der Lage war (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 für LV16 G8 ca. 58 %, für LV16 P8 ca. 59 %, für LV16 G8P9 ca. 102 %).

Die strukturellen Konsequenzen waren, dass Gly/Pro-Paare in der Polaritätstitration eine scheinbar stabilere α -Helix als LV16 zeigten (siehe 4.5.1). Jedoch war mit einem deutlich erhöhten Anteil an Zufallsknäuel und der Tatsache, dass Prolin die Bildung von β -Faltblättern sehr stark beeinträchtigt, nicht von einer direkt stabileren α -Helix, sondern einer indirekt durch Destabilisierung des β -Faltblatts stabilisierten α -Helix auszugehen [17]. Dies zeigte sich auch in den H/D-Austauschexperimenten in Lösung, in denen die Helices mit Gly/Pro-Motiven deutlich schneller austauschten (siehe 4.5.2). Hier

kann also ein stark α -Helix-destabilisierender Effekt durch Gly/Pro angenommen werden, welcher sich jedoch wegen der verminderten Neigung von Prolin sich innerhalb eines β -Faltblatts zu befinden, nur in einer erhöhten lokalen Flexibilität geäußert hat. Dieser könnte durch einen zentralen Bruch der α -Helix und der daraus resultierenden zweigeteilten Helix zu Stande kommen. Dadurch wäre eine α -Helix in ihrer Faltung begünstigt und dennoch durch Gly/Pro stark destabilisiert. Diese Ergebnisse spiegeln auch wider, dass die Neigung zur globalen Entfaltung nicht notwendigerweise direkt mit lokaler Stabilität verknüpft ist. Damit muss für die Betrachtung der maximal möglichen lokalen Flexibilität auch die Energiebarriere zur Entfaltung der α -Helix in Betracht gezogen werden. Aber auch die Stabilität anderer Konformationen beeinflusst die Stabilität der α -Helix. Während die Stabilität einer α -Helix in den aliphatischen Varianten für LV16 ihr Minimum erreichte, bei der eine Peptidhelix noch existieren kann, jedoch sehr flexibel ist, führte weiteres Einfügen von Valin-Resten zur Entfaltung der α -Helix (VVL16). In Lösung zeigte sich für die Gly/Pro-Varianten eine erhöhte Flexibilität der helikalen Konformation. Außerdem zeigte sich, dass die gemessene lokale Flexibilität der Peptide in Lösung gut mit der gemessenen Fusogenität korreliert. Dennoch wurde auch hier beobachtet, dass die erhöhte Helixdynamik von LV16 G8 und LV16 P8 nicht direkt das Ausmaß der Fusion widerspiegelte.

Jedoch konnte ebenfalls festgestellt werden, dass gerade im Falle der Membranintegration die dominierende Sekundärstruktur dieser Peptide das β -Faltblatt darstellte. Hier könnte die beobachtete starke Destabilisierung terminaler Bereiche von α -Helices in liposomalen Membranen und das zusätzliche Einfügen eines zentralen Helixbruchs zum Umfallen dieser Peptide zum β -Faltblatt führen. Anders als in Lösung stehen innerhalb der Membran keine Wassermoleküle als Partner für die Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats zur Verfügung. Demzufolge ist es den Peptiden nicht möglich als Zufallsknäuel in die Membran zu inserieren, sondern neben der α -Helix nur als β -Faltblatt in der liposomalen Membran zu existieren. Für die Peptide LV16 G8 und LV16 P8 zeigte sich eine vergleichbare Fusogenität zu LV16. Die erhöhte lokale Flexibilität dieser Peptide könnte ähnlich wie bei VVL16 dafür sorgen, dass markante Anteile von β -Faltblatt in membranintegriertem Zustand eine nicht funktionelle Sackgasse darstellen und aus diesem Grund die Fusogenität dieser Peptide im Vergleich zu LV16 nicht gesteigert werden konnte. Die Anwesenheit eines Gly/Pro-Paares im Zentrum des hydrophoben Kerns dagegen könnte es dem Peptid ermöglichen eine Schleife im Zentrum zu bilden und dadurch beide Enden des Peptids in eine Richtung zu strecken. Dadurch könnte das Peptid nur in einer Schicht der Membran integriert sein. FTIR Daten [130] und die Auswertung der CD-Spektren in Liposomen (siehe 4.5.1) legen dies nahe, da speziell für die Peptide mit Paaren von Glycin und Prolin ein Anteil an Schleifen-Motiv gemessen werden konnte. Diese Tatsache könnte ebenso durch die Kinetiken der Austauschexperimente erklärt werden, in denen Peptide, welche als derartiges β -Faltblatt in der Membran vorliegen deutlich schneller austauschten (siehe 4.5.2). Dagegen hat der relativ hohe Gehalt an β -Faltblatt bei VVL16 und LV16 G8 innerhalb der Membran nicht zu einem erhöhten Austausch geführt, was die Tatsache eines einzelnen β -Faltblatts im Falle der Gly/Pro-Variante weiter bestätigt. In einem

regulären β -Faltblatt sind ebenso alle Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats zwischen den Strängen des β -Faltblatts verknüpft, wodurch der Austausch dieser Protonen ebenso erschwert sein sollte. Ein β -Faltblatt ist im Austausch seiner Amidprotonen des Peptidrückgrats meist deutlich langsamer als eine α -Helix, da die Helix einfacher lokal Wasserstoffbrücken öffnen kann. Demnach scheint der schnellere Austausch der Gly/Pro-Variante im membranintegrierten Zustand, wo diese als β -Faltblatt vorliegt, ein Widerspruch zu sein. Diese Tatsache kann also nur mit dem Vorliegen eines Peptides als einzelner β -Strang erklärt werden, welcher wesentlich schneller austauschen könnte. Hier würde ein einzelnes Peptid über ein Schleifen-Motiv ein β -Faltblatt bilden und nur in eine Schicht der Membran inserieren. Über die bewegliche Schleife wäre ein Öffnen und Schließen des Faltblatts gegeben, was den schnellen Austausch von LV16 G8P9 innerhalb der Membran erklären könnte.

Für das Fusionsprotein des Humanen Immundefizienz Virus konnte beispielsweise kürzlich gezeigt werden, dass dieses in einer teilweisen α -helikalen und β -Faltblatt Struktur vorliegt [131]. In vorliegendem Fall jedoch ist bedingt durch die regelmäßige Primärstruktur von einer einheitlichen Faltung auszugehen, wenngleich die Umgebung der Membran für eine Teilfaltung sorgen könnte. Alle Peptide mit Ausnahme der Gly/Pro-Varianten und VVL16 zeigten einen hohen Anteil an α -Helix in der Membran von Liposomen. Das Peptid LV16 G8P9 könnte demzufolge als „Hairpin“-Struktur in die Membran von Liposomen integriert sein. Demnach würde der Fusionsmechanismus des LV16 G8P9 Peptides mit fusogenen amphipatischen Peptiden oder viralen Fusionspeptiden zu vergleichen sein.

Auch diese Ergebnisse zeigten, dass die Dynamik einer α -Helix in Lösung über die Dynamik des LV16-Peptides gesteigert werden konnte. Berücksichtigt man jedoch das Aufrechterhalten der helikalen Konformation innerhalb der liposomalen Membran, so stellt LV16 nach wie vor das Maximum einer dynamischen α -Helix dar. Dadurch, dass Transmembrandomänen von Fusionsproteinen in der Natur eine helikale Struktur aufweisen, stellt LV16 das beste Modell einer Transmembrandomäne von Fusionsproteinen dar. LV16 G8P9 zeigte zwar eine stark erhöhte Fusogenität, kann jedoch aufgrund seiner Konformation im membranintegrierten Zustand nicht als Modell für natürlich vorkommende Transmembrandomänen von Fusionsproteinen fungieren. Nachdem hier also gezeigt wurde, dass lokale Flexibilität von Peptiden wichtig für deren Fusogenität ist und LV16 das Maximum an Helixdynamik erreicht, sollte weiterhin geklärt werden ob es spezifische Regionen innerhalb der Peptide und damit Bereichen der Membran gibt in denen eine membrandurchspannende α -Helix flexibel sein muss, um Fusion von Liposomen bewirken zu können.

5.2.3 Die Helixdynamik lokaler Peptid-Domänen

Durch Einfügen von Blöcken aus Valin in die Sequenz eines Oligo-Leucin-Peptides wurde versucht spezifische Regionen der Peptide zu destabilisieren und deren Relevanz für die Fusion zu testen. In der Zusammensetzung ihrer hydrophoben Kernsequenz stellten diese Varianten Derivate der LLV16-

Sequenz dar, indem sie dessen Leu/Val-Verhältnis beibehalten. LLV16 zeigte sich mäßig fusogen (Fusion nach 1 h bei einem P/L-Verhältnis von 0,01 ca. 26 %) und besitzt im Vergleich zu natürlichen Transmembrandomänen von Fusionsproteinen einen erniedrigten Gehalt an α -Helix-destabilisierenden Aminosäuren. Durch die unregelmäßigen Peptide konnte den terminalen Bereichen dieser Peptide eine wichtige Rolle für den Vorgang der Fusion zugeordnet werden. Terminale Flexibilität war im Hinblick auf Fusogenität ein wichtiges Strukturmerkmal. Nur VLV und LV-L-LV waren in der Lage Fusion von Liposomen zu vermitteln, während LVL und L-LV-L keine Fusion bewirken konnten (siehe 4.4.1). Die Fusogenität von VLV und LV-L-LV war im Vergleich zu LLV16 außerdem erhöht. Allerdings zeigte sich auch die Bedeutung zentraler Flexibilität, da eine lokale Destabilisierung einer α -Helix in den terminalen Bereichen alleine die im Vergleich zu LV16 verminderte Fusogenität nicht kompensieren konnte. Demnach könnte die terminale Flexibilität dieser Peptide in liposomalen Membranen direkt in den Fusionsprozess eingreifen und damit in einem früheren Stadium der Fusion wichtig sein als die zentrale Flexibilität oder aber auch dafür sorgen, dass eine gewisse Flexibilität des hydrophoben Zentrums erst ermöglicht wird. Demzufolge wäre das entscheidende Kriterium für Fusogenität eine flexible innere Region von Transmembrandomänen, welche nur möglich wäre, wenn flexible Randbereiche von Helices destabilisierend auf den zentralen Bereich von α -Helices einwirken. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass im Fall der unregelmäßigen Varianten die Ergebnisse der Polaritätstitration (siehe 4.4.2) und der Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente (siehe 4.4.3) in Lösung nicht direkt mit der Fusogenität korreliert werden können. Lediglich die Populationsgröße der schnell austauschenden Deuterone spiegelte die terminale Dynamik der Peptidhelices von VLV und LV-L-LV wider und korreliert damit mit deren Fusogenität. Der schnellere gesamte Austausch des LVL-Peptids jedoch steht im Kontrast zu dessen Fusogenität. Dies scheint aber hauptsächlich darin begründet zu sein, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit und auch die Stabilität der α -Helix in Lösung anders waren als im membranintegrierten Fall. In Lösung zeigt sich die zentral durch Valin destabilisierte Variante LVL als sehr schnell im Austausch. Die 5 Valin-Reste könnten in Lösung die α -Helix komplett destabilisieren und, wie sich gezeigt hat (siehe 4.4.4), sogar noch vor den Amidprotonen der terminalen Leucin-Reste austauschen. Die zentrale Destabilisierung dieser α -Helix in Lösung wäre also vergleichbar mit der beschleunigten Austauschkinetik der Gly/Pro-Varianten. Im Falle der Membranintegration sind die zentralen Valin-Reste vor dem Austausch geschützt und/oder bilden eine stabilere α -Helix. Tatsächlich reflektieren die Ergebnisse der H/D-Austauschexperimente in diesem Fall die Fusogenität dieser Peptide. Der zentrale hydrophobe Kern ist vom Austausch abgeschirmt und deshalb für das Experiment in Membranen nicht sichtbar. Aus den Ergebnissen kann jedoch gefolgert werden, dass terminale Flexibilität für den Vorgang der Fusion wichtig ist. Ob dies nun das Einbringen von Flexibilität Richtung hydrophobem Kern, welche ebenso entscheidend ist für Fusion, oder aber direkt mechanistisch wichtig ist, kann hier nicht erschöpfend geklärt werden.

Der Versuch durch die unregelmäßigen Varianten regionsspezifisch Flexibilität in die Peptide einzuführen, wurde ebenfalls in der von mir betreuten Masterarbeit von Stefan Quint über Molekular

Dynamik (MD) Simulationen untersucht. Dabei wurde innerhalb von Peptiden in 80 % TFE das Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster in den Peptiden beobachtet. Die intramolekularen Wasserstoffbrücken bestimmen massgeblich die Stabilität der Peptid-Helix. Bei den Peptiden LLV16, LVL und VLV war dabei die Besetzung der Wasserstoffbrückenbindungen im Verlauf der untersuchten Molekular Dynamik (MD) Simulation niedriger. L16 zeigte über die gesamte Sequenz innerhalb der Simulation ein gleichmäßig hohes Besetzungsmuster (Abb. 68). Damit konnten die Ergebnisse der Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente über die MD-Simulation rationalisiert werden, dadurch, dass auch in der Simulation das Einbringen von Valin-Resten die Stabilität einer α -Helix beeinträchtigt hat.

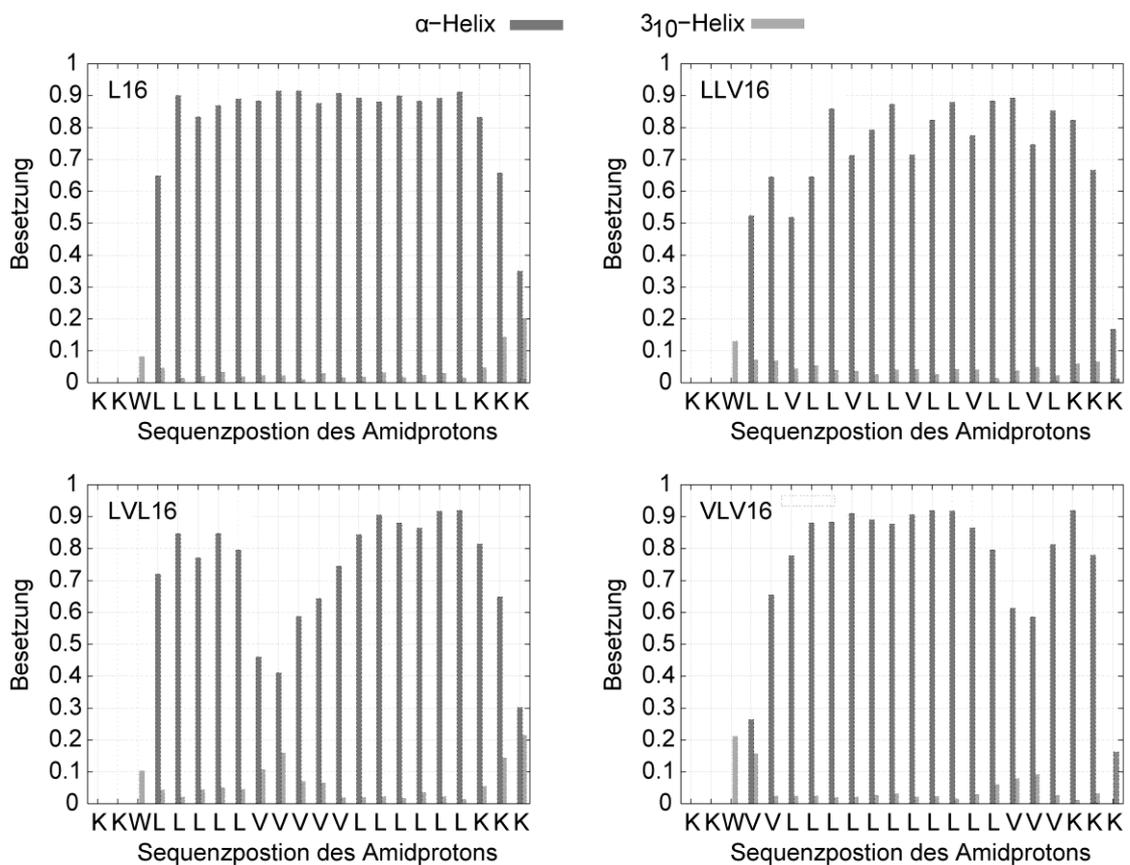


Abb. 68: Besetzung der Wasserstoffbrücken als Funktion der Sequenzposition. Die relative Besetzung der Wasserstoffbrücken wurde aus den Molekulardynamik-Simulationen über die zeitliche Besetzung während der Simulationsdauer kalkuliert.

Weiterhin wurde aus den Ergebnissen der MD-Simulation ersichtlich, dass die Valin-Seitenkette aufgrund ihrer β -Verzweigung sterisch sehr ungünstig mit den Carboxysauerstoffatomen des Peptidrückgrats in ihrer Umgebung wechselwirken. Dadurch wurde eine Torsion der Dihedralwinkel im Peptidrückgrat sichtbar. Am Beispiel des LVL zeigt Abb. 69, dass bei dieser Torsion die Ausrichtung der Carboxygruppen von Leucin 6 und Leucin 7, sowie die der Amidgruppe von Leucin 7 direkt beeinflusst werden. Eine verminderte Stabilität der Wasserstoffbrücken kann damit für die Positionen an denen sich

Valin in der Sequenz befindet gezeigt werden. Dadurch, dass sich mehrere Valin-Reste in den Peptiden befinden, können sich derartige Effekte überlagern und damit die Besetzung der Wasserstoffbrücken über einen weiten Bereich der Peptid-Helices beeinträchtigen.

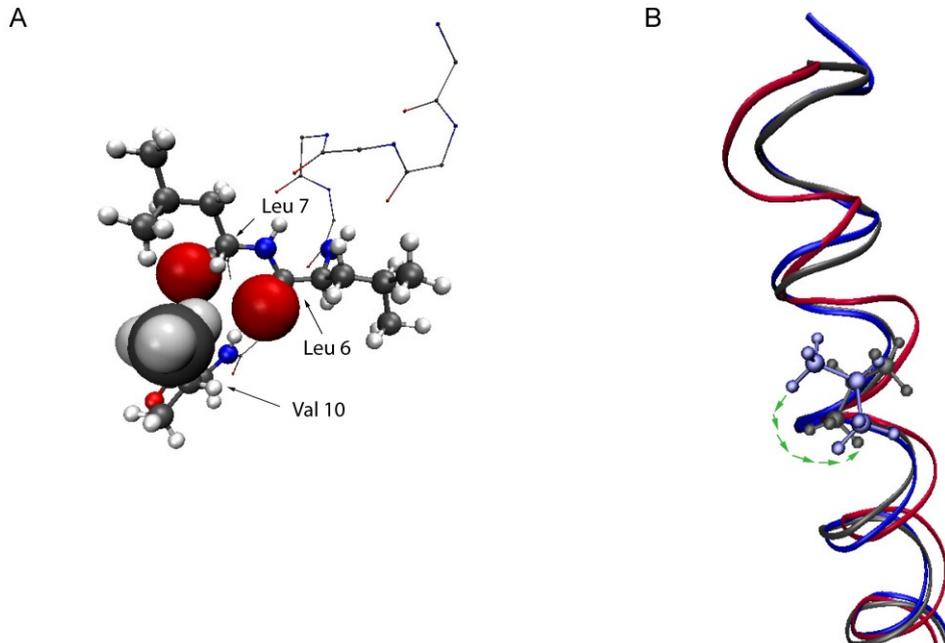


Abb. 69: Der Einfluss sterischer Effekte auf die Peptidstruktur. A. Ausschnitt der α -Helix des Peptids LVL aus der MD-Simulation. Die Seitenkette von Valin 10 bewirkt durch abstoßende van der Waals Kräfte auf die Carboxy-Sauerstoffe von Leucin 6 und 7 eine Verbiegung der helikalen Struktur. B. Effekt der Verbiegung durch die Valin-Seitenkette auf die Struktur des Peptidrückgrats. Es sind verschiedene helikale Strukturen während der Simulation dargestellt. Blau ist die Ausgangsposition der α -Helix. Die Seitenkette von Valin befindet sich in der in A beschriebenen ungünstigen Position. Dies verursacht eine Verbiegung der α -Helix (rot). Nach einer Rotation der Valin-Seitenkette (grüne Pfeile) kann die α -Helix in ihre Ausgangslage zurückkehren (grau).

Für die Auswertung der Daten wurden die Peptide in drei Bereiche unterteilt, wobei der N-terminale Bereich die Aminosäuren 1-6, der zentrale Bereich die Aminosäuren 7-17 und der C-terminale Bereich die Aminosäuren 18-23 umfasste. Anschließend wurde die Standardabweichung (σ) der „root mean square deviation“ (RMSD) σ_{RMSD} der Atompositionen des Peptidrückgrats für die jeweiligen Bereiche berechnet (Tabelle 1). Dazu wurde jeweils die Veränderung der Position jedes C_{α} -Atoms bestimmt.

Tabelle 1: σ_{RMSD} der verschiedenen Sequenzregionen der LV-Peptide

	N-terminal	Zentrum	C-terminal
L16	0,114	0,075	0,176
LV16	0,201	0,137	0,292
LVL	0,082	0,141	0,117
VLV	0,167	0,106	0,293

Die Standardabweichung der RMSD kann in diesen Experimenten direkt als Maß für Flexibilität des jeweiligen Peptids gewertet werden. L16 zeigt die niedrigsten Standardabweichungen. Im Vergleich dazu erwies sich LVL als deutlich flexibler im Zentrum der Sequenz. VLV zeigte im Gegensatz dazu in den

terminalen Bereichen eine hohe Flexibilität während der Kern der Sequenz vergleichbar zu LV16 stabiler war. Die höchsten Standardabweichungen traten bei LV16 auf, was jedoch aufgrund des hohen Anteils an Valin über die ganze Sequenz erklärt werden kann.

Es zeigte sich, dass durch das Einbringen der β -verzweigten Aminosäure Valin direkt destabilisierende lokale Effekte erzeugt wurden. Im Hinblick auf die experimentellen Ergebnisse kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Korrelation von Fusion und regional eingebrachter Flexibilität Gültigkeit besitzt.

5.3 Die Rolle der flankierenden Regionen der Peptide

Nachdem die detaillierte Charakterisierung der hydrophoben Kernbereiche der Peptide erfolgt war, sollten nun die flankierenden Bereiche der Peptide einer strukturellen Betrachtung unterzogen werden. In der Betrachtung der flankierenden Regionen der Peptide wurden hier zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum Einen wurde die Rolle der flankierenden Aminosäuren hinsichtlich Art und Ladung der Seitenkette untersucht und zum Anderen die Auswirkungen von N-terminal gekoppelten Acyl-Ketten betrachtet.

5.3.1 Der Effekt der flankierenden Aminosäuren

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass den flankierenden Aminosäuren neben der Sequenz des hydrophoben Kerns der Peptide für die Fusion eine entscheidende Bedeutung zukommt [118]. So zeigte sich, dass His-flankierte LV-Peptide bei neutralem pH-Wert keine Fusion von Liposomen *in vitro* bewirken konnten. Im Sauren bei ca. pH 4,0 zeigten die His-flankierten Peptide jedoch in Abhängigkeit ihrer hydrophoben Kernsequenz unterschiedliche Fusogenitäten auf. Dabei wurde deutlich, dass das Ausmaß an Fusion der His-Varianten bei pH 4,0 vergleichbar mit den entsprechenden Lys-Derivaten bei pH 7,4 war. Man kann weiter davon ausgehen, dass die Seitenkette von Histidin bei Neutral-pH ungeladen vorliegt, während Lysin bei Neutral-pH geladen vorliegen sollte. Durch Senken des pH-Werts auf 4,0 ist es nun äußerst wahrscheinlich, dass auch die His-Seitenkette geladen vorliegt. Demzufolge wurde gezeigt, dass flankierende Ladungen entscheidend für die Fusion von Liposomen *in vitro* sind, die Fusogenität jedoch auch von der hydrophoben Kernsequenz abhängt. Die durchgeführten Polaritätstitrationen verdeutlichten, dass ungeladene Peptide schneller dazu neigen zum β -Faltblatt umzufalten als geladene (siehe 4.6.1). In Lösung ist die Interaktion der Peptide vermutlich für ein kooperatives Umfalten in polarer Lösung verantwortlich. Die höhere konformationelle Stabilität der Peptide mit geladenen flankierenden Resten scheint im Widerspruch mit der Tatsache zu stehen, dass Helixstabilität isolierter Helices durch sich abstoßende intramolekulare Ladungen beeinträchtigt wird. Demnach müssten die α -Helices in ungeladenem Zustand stabiler sein als in

geladenem. Jedoch kann in diesem Fall von einem kooperativen Auffalten durch Interaktion ausgegangen werden, da die ungeladenen Histidin-Seitenketten nicht in der Lage sind die Interaktion der Peptide untereinander zu behindern und diese aufgrund ihres hydrophoben Charakters dazu neigen sich in der Polaritätstitration in wässrigem Medium gegenseitig durch Oligomerisierung zu schützen. Auch im H/D-Austauschexperiment zeigte sich ein derartiger Effekt in Lösung (siehe 4.6.2). Die His-flankierten Peptide tauschten bei pH 6,8, im Experiment bei dem konzentrierte Lösungen der deuterierten Peptide in protischem Puffer verdünnt wurden, langsamer aus als die Lys-Varianten (Abb. 52). Dies könnte auf eine höhere Stabilität der α -Helix der His-Varianten hinweisen, da sich die Seitenketten in ihrem ungeladenen Zustand nicht abstoßen würden, während die geladenen Seitenketten der Lysine die α -Helix beeinträchtigen würden. Jedoch zeigte sich im Experiment, in welchem den His- und Lys-Peptiden ermöglicht wurde in gleichem Ladungszustand ein Gleichgewicht einzustellen ein vergleichbar schneller Austausch für beide Varianten bei verschiedenen Ladungszuständen (Abb. 55). Der verlangsamte Austausch der His-Varianten unter den ersten experimentellen Bedingungen kam folglich durch Interaktion und Abschirmung der Peptide vor einem Austausch zustande. Ähnliches konnte auch in konzentrationsabhängigen Wasserstoff/Deuterium Austauschreaktionen festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt). Demnach spielen die terminalen Histidin- bzw. Lysin-Reste keine direkte Rolle für die Flexibilität des hydrophoben Kerns, sondern innerhalb der Polaritätstitration lediglich für die Interaktion der Peptide untereinander, welche im Falle der Membranintegration weiter durch die hohe lokale Konzentration gesteigert werden könnte. In Lösung äußert sich die Interaktion der Peptide durch kooperatives Umfalten. Innerhalb der Membran, in welcher die lokale Konzentration der Peptide weiter erhöht ist, zeigte sich dennoch kein derartiges kooperatives Umfalten, da die Sekundärstruktur der His-flankierten Peptide pH-Wert unabhängig war.. Das Behindern der Fusion der His-Varianten bei neutralem pH-Wert hat demnach keinen direkten strukturellen Einfluss. Dies lässt vermuten, dass die Struktur der Peptide in der Membran durch die apolare Umgebung stabilisiert ist. Ein Einfluss der Ladung auf die Dynamik und Helikalität wird hier ausgeschlossen, da in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen den His- und Lys-Varianten festgestellt werden konnte.

Eine mögliche Erklärung der Notwendigkeit von geladenen terminalen Bereichen ist eine Ladungsinteraktion mit den Lipiden der Membran, beispielsweise der Phosphatidylserin-Kopfgruppe der Lipide, bzw. mit der negativ geladenen Phosphatgruppe. Für Fusionsexperimente wurde standardmäßig eine Zusammensetzung von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamine (PE) und Phosphatidylserin (PS) verwendet. PC und PE tragen aufgrund ihrer Zwitterionenstruktur keine Nettoladung. PS dagegen besitzt zusätzlich eine negative Ladung an der Kopfgruppe. Es zeigte sich, dass für die Fusogenität von Liposomen ein Anteil an PE notwendig war. Um nun den Einfluss der Ladung der flankierenden Bereiche der Peptide im Hinblick auf eine mögliche Interaktion von Peptiden mit Lipiden zu diskutieren, konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PS für den Fusionsvorgang von Liposomen keine Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Fusion nach einer Stunde nicht durch die Abwesenheit von PS beeinflusst wurde. Damit scheint der Effekt, welchen

die Ladung der flankierenden Peptidregionen auf den Vorgang der Fusion ausüben nicht von einer Ladungsinteraktion der Peptide mit der negativen Ladung der Serin-Kopfgruppe der Lipide herzurühren.

Damit kann eine Ladungsinteraktion der Lipide mit den Peptiden nur noch auf die negative Phosphatgruppe zurückgeführt werden. In biologischen Membranen können eine Vielzahl von Interaktionen zwischen Lipiden und membrandurchspannenden Proteindomänen gefunden werden. Diese beeinflussen sowohl die Protein- als auch die Lipideigenschaften. Einen Beitrag dazu kann sowohl der hydrophobe Acylkettenbereich der Membranen als auch die polarere Umgebung der Lipidkopfgruppen leisten [132, 133]. Membranproteine können einen Lipidbilayer durchspannen, dadurch, dass hydrophobe Seitenketten mit der Acylkettenregion der Membran interagieren. Im Normalfall passt die hydrophobe Länge der Transmembrandomänen zur hydrophoben Dicke der Membran. Dennoch können Länge der Domänen und Dicke der Membran auch abweichen und dadurch spezifische Effekte auf die Membran oder die Proteine ausüben, wie z.B. eine Änderung der Lipidstruktur oder -organisation [134]. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich geladene Reste bevorzugt in der Kopfgruppenregion von Lipidbilayern aufhalten [135]. Es zeigten sich bereits Hinweise darauf, dass die ϵ -NH₃ Gruppe von Lysin eine spezifische Interaktion mit der Phosphatgruppe von Phospholipiden eingeht. Dadurch, dass Lysin eine geladene Aminosäure ist, bevorzugt diese lediglich eine relativ polare Umgebung und tendiert deshalb sich innerhalb der Kopfgruppenregion der Membran zu befinden und ist dadurch kolokalisiert zur Phosphatgruppe. Außerdem wurde gezeigt, dass sich Lysin-Reste sogar noch weiter außerhalb der Membran aufhalten können als in der Region der Phosphatgruppe [136]. Diese Lokalisierung könnte lediglich leicht durch die Interaktion zwischen ϵ -NH₃ eines flexiblen Peptids und Phosphat stabilisiert werden, indem die elektrostatische Interaktion das Peptid in die Membran zieht. All diese Effekte scheinen jedoch keinen Einfluss auf die lokale Dynamik der α -Helix der Peptide zu haben, was in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Aus diesem Grund scheint eine Peptid/Lipid-Interaktion eine gewisse Rolle für die Fusion zu haben. Terminal flexible Peptide könnten eine Ladungsinteraktion zwischen den Peptiden und der Phosphatgruppe begünstigen, bzw. die Dauer der Interaktion erhöhen. Flexible Peptide könnten durch ihre vergrößerte Beweglichkeit mit mehreren Phosphatgruppen in Nachbarschaft wechselwirken. Damit wäre eine Peptid/Lipid-Interaktion auch eine Voraussetzung für den Eintritt in die Fusion.

5.3.2 Der Einfluss N-terminaler Acylketten

Auch im Falle von Peptiden, welche N-terminal mit einer Acylkette versehen waren, zeigte sich ein Effekt auf deren Fusogenität (siehe 4.8.1). Die Acylkette bewirkte einen erhöhten Arrest in der Hemifusion, welcher jedoch mit höherer Konzentration der Peptide geringer wurde. Dies könnte somit auf ein verringertes Maß an Interaktion der Peptide innerhalb der Membran zurückzuführen sein. Obwohl die lokale Flexibilität der α -Helix der acylierten Peptide nicht beeinträchtigt ist, könnte die

stabilere globale Flexibilität, wie in den Polaritätstitrationsen gesehen, auf eine verminderte Fähigkeit zur Interaktion der Peptide untereinander hinweisen. Dadurch würde sich der Arrest in der Hemifusion, wie er speziell für die acylierten Varianten beobachtet wurde, ähnlich wie für die Peptide Vam3p aus Hefe SNARE-Proteinen erklären [94].

Ähnliches Verhalten konnte am SP-C beobachtet werden. Dieses hydrophobe Peptid trägt an zwei benachbarten Cystein-Resten eine Palmitoylkette. Dieses Peptid kann von einer monomeren helikalen Form in eine β -Faltblatt-Konformation umfalten und schließlich zu Amyloiden Fibrillen aggregieren. Es wurde gezeigt, dass der Prozess der Aggregation deutlich schneller abläuft, wenn eine oder beide Cystein-Seitenketten depalmitoyliert werden. Ein erhöhter Level an nicht-palmitoyliertem SP-C wird speziell für das Krankheitsbild der pulmonaren Alveolarproteinose verantwortlich gemacht. Dadurch wurde eine erhöhte Stabilität der helikalen Konformation in Anwesenheit der Acylketten angenommen. Dennoch zeigte sich, dass die helikale Konformation selbst nicht in ihrer Flexibilität beeinträchtigt war, dadurch, dass kein Unterschied innerhalb der lokalen Dynamik der Helix beobachtet werden konnte. Lediglich die globale Stabilität hinsichtlich einer Entfaltung wurde durch die Anwesenheit der Acylketten verstärkt. Dadurch zeigte sich, dass die Acylketten eine kooperative Umfaltung der Peptide verhindern konnten [125]. Jedoch zeigte sich für die acylierten LV-Peptide auch ein Defekt in der Fusion der äußeren Lipidschicht, was eine Beeinträchtigung der initialen Phase der Fusion durch die Acylketten impliziert. Auch dies könnte in der Ladung der Peptide begründet sein. Dadurch, dass die acylierten Peptide einen blockierten N-Terminus besitzen, fehlt diesen Peptiden terminal eine Ladung, welche die Möglichkeit zur Interaktion dieser Peptide mit den Phosphatgruppen der Lipide einschränkt.

5.4 Wasserstoff/Deuterium-Austausch in Liposomen

Im Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperiment von Peptiden in liposomalen Membranen konnten nicht alle Amidpositionen austauschkompetent gemacht werden. Dies wurde auf eine geringe Membrangängigkeit der katalytischen OH⁻-Ionen zurückgeführt. Lipidmembranen bilden eine Barriere für polare Substanzen. Neben einer geringen Menge an Wasser, welches in die Membranen eindringen kann, ist die Dissoziation von Wasser wahrscheinlich noch deutlich schlechter. Dadurch ist ein Austausch von Amiddeuteronen innerhalb der Lipidmembran sehr unwahrscheinlich.

Um die zentralen Windungen der α -Helix hinsichtlich ihrer Dynamik zu charakterisieren ist jedoch ein Austausch notwendig. Aus diesem Grund wurde durch mehrere Ansätze versucht die Amid-Deuteronen der zentralen Reste austauschkompetent zu machen.

Durch Temperaturerhöhung sollte die Membranfluidität verbessert werden und ein tieferes Eindringen von Wasser in die Membran oder durch die Membran erreicht werden.

Ultraschall oder das Anlegen eines sehr hohen Drucks sollte ebenso den Anteil an Wasser innerhalb der Membran erhöhen.

Außerdem wurde versucht durch hydrophobere alternative Austauschpartner den Austausch der zentralen Amiddeuteronen zu bewirken. Hier wurden Benzoesäure und Ubiquinol getestet.

Keine der Ansätze bewirkte jedoch einen Austausch der zentralen Amiddeuteronen, welche noch nach Wochen vor einem Austausch geschützt waren.

Damit wäre ein weiteres Ziel den Austausch dieser geschützten Deuteronen innerhalb von liposomalen Membranen zu erreichen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die LV-Peptide wurden als Modellsysteme von Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteine charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Peptide in Abhängigkeit ihrer Sequenz ein ähnliches Maß an Fusion induzieren konnten, wie dies Peptide erreichten, welche der Transmembrandomänen natürlicher Fusionsproteine entsprachen [39, 45, 90]. Durch strukturelle Analyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Korrelation von Fusogenität mit der konformationellen Flexibilität dieser Peptide besteht.

Der Vorgang der Membranfusion erfordert einen beträchtlichen Energieaufwand. Dieser ist notwendig die elektrostatische Abstoßung der hydratisierten Lipidschichten zu überwinden, diese Schichten zu deformieren und letztendlich zu vermischen [79, 80]. Eine Vielzahl hoch-konservierter integraler Membranproteine wurde bis heute identifiziert, welche alleine dazu in der Lage sind diese Energie aufzubringen [137]. Weiterhin wurde jedoch auch demonstriert, dass die Regulation dieser Energiebarriere durch die Zusammensetzung der Lipide einer Membran geschieht. Bestimmte Lipide können diese Barriere erhöhen bzw. senken [138, 139]. Damit müssen für den Vorgang der Membranfusion sowohl die möglichen Energiebeiträge durch die Proteine als auch die Zusammensetzung der Lipidmembran betrachtet werden. Neben der Notwendigkeit von Protein/Protein-Interaktionen [75] werden aus diesem Grund ebenso spezifische Protein/Lipid-Interaktionen von Fusionsproteinen diskutiert [140].

Innerhalb dieser Arbeit wurde nun die Betrachtung alleine auf membranfusogene Peptide als Modellsystem für die Transmembrandomänen von Fusionsproteinen gerichtet. Die Rolle dieser Peptide für den Vorgang der Fusion kann nun anhand der „Stalk“-Hypothese an den einzelnen Stadien der Fusion diskutiert werden. In der „Stalk“-Hypothese werden die Zwischenzustände der Lipidschichten der fusionierenden Membran während des Fusionsvorganges beschrieben. Gemäß dieser Arbeitshypothese und einiger experimenteller Evidenzen ist die Membranfusion durch einen Zwischenzustand gekennzeichnet in welchem lediglich die äußeren, proximalen Lipidschichten vermischt sind. Erst die Umsetzung dieses Fusionsintermediats, welches als Hemifusion bezeichnet wird, führt zur vollständigen Fusion [51, 53, 58].

Im initialen Schritt der Fusion, der Annäherung der beiden Membranen, muss die Abstoßung der hydratisierten Bilayer überwunden werden. In der Natur können lösliche Domänen von Fusionsproteinen für diesen Vorgang verantwortlich gemacht werden. In vitro wird diese Annäherung vermutlich durch Zufallskollisionen von Liposomen erreicht. Eine Rolle der Peptide für diesen Prozess kann als äußerst unwahrscheinlich erachtet werden. Diesen Peptiden fehlen extrazelluläre, lösliche Domänen. Außerdem könnten die positiv geladenen Lysin-Seitenketten bei der Annäherung von Liposomen eher als hinderlich betrachtet werden.

Die Bildung der „Stalk“-Struktur erfordert nur wenig Energie, während im nächsten Schritt, der Erweiterung des „Stalks“ zum Hemifusionsintermediate, ein höherer Energiebeitrag notwendig wird. Lipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) können durch ihre intrinsische Struktur negative spontane Krümmung von Membranen bewirken und dadurch den Übergang zur „Stalk“-Struktur und Hemifusion energetisch begünstigen. Wie auch beobachtet wurde, führte das Präaggregieren von Liposomen mit Hilfe von Ca^{++} dazu, dass ein nicht fusogenes, terminal ebenfalls sehr stabiles, L16 Peptid ein gewisses Ausmaß an Fusion bewirken konnte (siehe 4.3.3). Damit könnte erklärt werden, dass terminale Flexibilität zeitlich in einem früheren Stadium der Fusion notwendig ist. Die Ladungsinteraktion flexibler Peptide mit der Phosphatgruppe von PE könnte spezifisch die Lipide rekrutieren, welche die extreme Krümmung der Membran an der Kontaktstelle des Hemifusionsdiaphragmas unterstützen und damit die Energiebarriere zum Eintritt in die Hemifusion senken. Demzufolge könnte eine Ladungsinteraktion terminal flexibler Peptide begünstigt sein, indem diese Peptide mit mehreren Phosphatgruppen in einer weiteren Umgebung wechselwirken können, bzw. eine länger andauernde Wechselwirkung aufrechterhalten können. Auch SNARE-Proteine weisen hoch-konservierte polybasische Regionen auf, welche sich in unmittelbarer Nähe der Transmembrandomänen befinden. In diesen Bereichen wurde bereits eine Ladungsinteraktion mit negativ geladenen Phospholipiden gezeigt [140]. Ein Minimalerfordernis für die Entscheidung, ob ein Peptid fusogen ist oder nicht, stellen flexible terminale Bereiche dar. Anhand des Verlaufs der Fusionskinetiken des in vitro Liposomensystems wird außerdem klar, dass nicht direkt die Geschwindigkeit der Fusion durch die Flexibilität der Peptide gesteuert wird, sondern Fusogenität die Fähigkeit der Peptide beschreibt, bis zu welcher Liposomengröße diese Peptide in der Lage sind Vesikel zu fusionieren. Dies begründet sich dadurch, dass der kinetische Verlauf bei allen Peptiden langsamer wird und spätestens innerhalb der Messzeit zum Erliegen kommt. Die negative Krümmung am Diaphragma des „Stalks“ steigt mit der Größe zweier Vesikel an. Flexibilität und Fusogenität korrelieren damit mit dem Ausmaß an negativer Krümmung an der Kontaktstelle zweier fusionierender Vesikel. Dieser Effekt terminal flexibler Peptide würde demnach die Energiebarriere der „Stalk“-Struktur für ihre Erweiterung senken.

Die Erweiterung der „Stalk“-Struktur zur Hemifusion erfordert, wie angesprochen ein hohes Maß an Energie. Dies ist auch bedingt dadurch, dass während der Erweiterung des „Stalks“ das Verhältnis der Fläche der äußeren Schicht zur inneren Schicht sinkt. Dadurch wird es notwendig, dass eine gewisse Anzahl an Phospholipiden der äußeren Schicht in die innere gebracht wird. Dies wird als Lipid-„Flip“

bezeichnet. Es wurde bereits gezeigt, dass Transmembranpeptide diesen Prozess ermöglichen können [143, 144], jedoch ist bis jetzt die mechanistische Erklärung dafür nicht geliefert. Eine zentral dynamische, membrandurchspannende α -Helix könnte nun für einen erleichterten Transport der Lipide durch die Membran sorgen, dadurch, dass die Packungsdichte der Membran entlang der gesamten Helix in Abhängigkeit seiner Flexibilität gestört ist.

Nach der „Stalk“-Bildung und Hemifusion ist es zum Erreichen der vollen Fusion notwendig durch das Anlegen lateraler Spannung das Hemifusionsdiaphragma aufzureißen, so dass sich eine Fusionspore bildet. Diese Fusionspore muss schließlich expandieren, um letztendlich in der kompletten Fusion der Membranen zu resultieren. Es wird angenommen, dass diese Schritte der Membranfusion den höchsten Energieaufwand erfordern [79, 80]. Deshalb könnte auch hier die Peptid/Lipid-Interaktion zwischen den Phosphatgruppen der Phospholipide innerhalb des Hemifusionsdiaphragmas und den geladenen Seitenketten der Peptide, welche nicht in das Hemifusionsdiaphragma eindringen können, dafür sorgen, dass eine laterale Spannung innerhalb des Diaphragmas erzeugt wird und es so zur Ausbildung einer Fusionspore kommt. Eine verbesserte Interaktion flexibler Peptide und deren Energiebeitrag wären hier hilfreich. Die Interaktion der Transmembranpeptide untereinander, welche sich dadurch als Ring um das Hemifusionsdiaphragma anordnen könnten, würde diesen Effekt zusätzlich verstärken, was den Arrest in der Hemifusion im Falle von Peptiden erklären würde, welche ein geringes Ausmaß zur Oligomerisierung zeigten.

Zusammenfassend wäre demnach die Flexibilität der Transmembrandomänen von Fusionsproteinen für viele Einzelprozesse des Fusionsvorganges entscheidend. Das Einbringen von Defekten in der Packungsdichte der Membranen, die optimale Interaktion mit Lipiden und den verbesserten Transport von Lipiden durch die Membran. Die Ladung der Seitenketten der flankierenden basischen Aminosäuren der Transmembrandomänen wäre notwendig eine effektive Interaktion mit den spezifischen Lipiden zu gewährleisten. Diese Ladungsinteraktion könnte sowohl den Übergang zur Hemifusion als auch die laterale Ausbildung und Expansion der Fusionspore begünstigen.

In weiteren Arbeiten wäre es jedoch notwendig die Interaktion von Peptid und Lipid experimentell zu belegen, um die Stärke derartiger Interaktionen festzustellen oder eine Präferenz für spezifische Lipide zu erkennen. Weiterhin wäre es von großer Bedeutung den Zusammenhang von zentraler Flexibilität und der „Flip“-Rate von Phospholipiden experimentell zu überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. and White, F. H., Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 1309-1314
 - 2 Pauling, L., Corey, R. B. and Branson, H. R. (1951) The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**, 205-211
 - 3 Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**, 95-99
 - 4 Scholtz, J. M., Marqusee, S., Baldwin, R. L., York, E. J., Stewart, J. M., Santoro, M. and Bolen, D. W. (1991) Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2854-2858
 - 5 Yang, A. S. and Honig, B. (1995) Free energy determinants of secondary structure formation: I. alpha-Helices. *J Mol Biol* **252**, 351-365
 - 6 Aurora, R., Creamer, T. P., Srinivasan, R. and Rose, G. D. (1997) Local interactions in protein folding: lessons from the alpha-helix. *J Biol Chem* **272**, 1413-1416
 - 7 Nemethy, G. and Scheraga, H. A. (1989) Free energy of hydration of collagen models and the enthalpy of the transition between the triple-helical coiled-coil and single-stranded conformations. *Biopolymers* **28**, 1573-1584
 - 8 Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* **14**, 1-63
 - 9 Hermans, J., Anderson, A. G. and Yun, R. H. (1992) Differential helix propensity of small apolar side chains studied by molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **31**, 5646-5653
 - 10 Luque, I., Mayorga, O. L. and Freire, E. (1996) Structure-based thermodynamic scale of alpha-helix propensities in amino acids. *Biochemistry* **35**, 13681-13688
 - 11 Go, M., Go, N. and Scheraga, H. A. (1970) Molecular theory of the helix-coil transition in polyamino acids. II. Numerical evaluation of s and σ for polyglycine and poly-L-alanine in the absence (for s and σ) and presence (for σ) of solvent. *J Chem Phys* **52**, 2060-2079
 - 12 Pace, C. N. and Scholtz, J. M. (1998) A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys J* **75**, 422-427
 - 13 Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **47**, 45-148
 - 14 Creamer, T. P. and Rose, G. D. (1992) Side-chain entropy opposes alpha-helix formation but rationalizes experimentally determined helix-forming propensities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5937-5941
-

-
- 15 Dao-Pin, S., Baase, W. A. and Matthews, B. W. (1990) A mutant T4 lysozyme (Val 131----Ala) designed to increase thermostability by the reduction of strain within an alpha-helix. *Proteins* **7**, 198-204
 - 16 Woolfson, D. N. and Williams, D. H. (1990) The influence of proline residues on alpha-helical structure. *FEBS Lett* **277**, 185-188
 - 17 Li, S. C., Goto, N. K., Williams, K. A. and Deber, C. M. (1996) Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6676-6681
 - 18 Piela, L., Nemethy, G. and Scheraga, H. A. (1987) Proline-induced constraints in alpha-helices. *Biopolymers* **26**, 1587-1600
 - 19 Blaber, M., Zhang, X. J., Lindstrom, J. D., Pepiot, S. D., Baase, W. A. and Matthews, B. W. (1994) Determination of alpha-helix propensity within the context of a folded protein. Sites 44 and 131 in bacteriophage T4 lysozyme. *J Mol Biol* **235**, 600-624
 - 20 McGregor, M. J., Islam, S. A. and Sternberg, M. J. (1987) Analysis of the relationship between side-chain conformation and secondary structure in globular proteins. *J Mol Biol* **198**, 295-310
 - 21 Hol, W. G. (1985) The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure. *Prog Biophys Mol Biol* **45**, 149-195
 - 22 Shoemaker, K. R., Fairman, R., Schultz, D. A., Robertson, A. D., York, E. J., Stewart, J. M. and Baldwin, R. L. (1990) Side-chain interactions in the C-peptide helix: Phe 8 ... His 12+. *Biopolymers* **29**, 1-11
 - 23 Barlow, D. J. and Thornton, J. M. (1983) Ion-pairs in proteins. *J Mol Biol* **168**, 867-885
 - 24 Marqusee, S. and Baldwin, R. L. (1987) Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8898-8902
 - 25 Wang, L., O'Connell, T., Tropsha, A. and Hermans, J. (1995) Thermodynamic parameters for the helix-coil transition of oligopeptides: molecular dynamics simulation with the peptide growth method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10924-10928
 - 26 Arvinte, T. and Drake, A. F. (1993) Comparative study of human and salmon calcitonin secondary structure in solutions with low dielectric constants. *J Biol Chem* **268**, 6408-6414
 - 27 Muga, A., Neugebauer, W., Hirama, T. and Surewicz, W. K. (1994) Membrane interaction and conformational properties of the putative fusion peptide of PH-30, a protein active in sperm-egg fusion. *Biochemistry* **33**, 4444-4448
 - 28 Deber, C. M. and Li, S. C. (1995) Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* **37**, 295-318
 - 29 Liu, Y. and Bolen, D. W. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* **34**, 12884-12891
-

-
- 30 Luo, P. and Baldwin, R. L. (1997) Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**, 8413-8421
- 31 Hirota, N., Mizuno, K. and Goto, Y. (1998) Group additive contributions to the alcohol-induced alpha-helix formation of melittin: implication for the mechanism of the alcohol effects on proteins. *J Mol Biol* **275**, 365-378
- 32 Hirota-Nakaoka, N. and Goto, Y. (1999) Alcohol-induced denaturation of beta-lactoglobulin: a close correlation to the alcohol-induced alpha-helix formation of melittin. *Bioorg Med Chem* **7**, 67-73
- 33 Hirota, N., Mizuno, K. and Goto, Y. (1997) Cooperative alpha-helix formation of beta-lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein Sci* **6**, 416-421
- 34 Nishi, N., Takahashi, S., Matsumoto, M., Tanaka, A., Muraya, K., Takamuku, T. and Yamaguchi, T. (1995) Hydrogen-Bonded Cluster Formation and Hydrophobic Solute Association in Aqueous Solutions of Ethanol. *J. Phys. Chem.* **99**, 462-468
- 35 Zhong, L. and Johnson, W. C., Jr. (1992) Environment affects amino acid preference for secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4462-4465
- 36 Deber, C. M., Brandl, C. J., Deber, R. B., Hsu, L. C. and Young, X. K. (1986) Amino acid composition of the membrane and aqueous domains of integral membrane proteins. *Arch Biochem Biophys* **251**, 68-76
- 37 Landolt-Marticorena, C., Williams, K. A., Deber, C. M. and Reithmeier, R. A. (1993) Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J Mol Biol* **229**, 602-608
- 38 Jennings, M. L. (1989) Topography of membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 999-1027
- 39 Langosch, D., Crane, J. M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L. K. and Reed, J. (2001) Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *J Mol Biol* **311**, 709-721
- 40 Henry, G. D. and Sykes, B. D. (1990) Structure and dynamics of detergent-solubilized M13 coat protein (an integral membrane protein) determined by ¹³C and ¹⁵N nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Cell Biol* **68**, 318-329
- 41 Williams, K. A. and Deber, C. M. (1991) Proline residues in transmembrane helices: structural or dynamic role? *Biochemistry* **30**, 8919-8923
- 42 Vogel, H., Nilsson, L., Rigler, R., Meder, S., Boheim, G., Beck, W., Kurth, H. H. and Jung, G. (1993) Structural fluctuations between two conformational states of a transmembrane helical peptide are related to its channel-forming properties in planar lipid membranes. *Eur J Biochem* **212**, 305-313
- 43 Lesk, A. M. and Chothia, C. (1984) Mechanisms of domain closure in proteins. *J Mol Biol* **174**, 175-191
-

-
- 44 Sinha, N., Kumar, S. and Nussinov, R. (2001) Interdomain interactions in hinge-bending transitions. *Structure* **9**, 1165-1181
- 45 Hofmann, M. W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J. and Langosch, D. (2004) De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14776-14781
- 46 Zhang, Y. and Shin, Y. K. (2006) Transmembrane organization of yeast syntaxin-analogue Sso1p. *Biochemistry* **45**, 4173-4181
- 47 Chen, E. H. and Olson, E. N. (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* **308**, 369-373
- 48 Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
- 49 Stryer, L. (2003) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag
- 50 Jahn, R. and Grubmuller, H. (2002) Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 488-495
- 51 Kozlovsky, Y., Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2002) Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J* **83**, 2634-2651
- 52 Szule, J. A. and Coorsen, J. R. (2003) Revisiting the role of SNAREs in exocytosis and membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 121-135
- 53 Kozlovsky, Y. and Kozlov, M. M. (2002) Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophys J* **82**, 882-895
- 54 Shillcock, J. C. and Lipowsky, R. (2005) Tension-induced fusion of bilayer membranes and vesicles. *Nat Mater* **4**, 225-228
- 55 Yang, L. and Huang, H. W. (2002) Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, 1877-1879
- 56 Hofmann, M. W. (2005) Design und funktionelle Charakterisierung neuartiger membranfusogener Peptidsequenzen. In Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Technische Universität München
- 57 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**, 7235-7240
- 58 Malinin, V. S. and Lentz, B. R. (2004) Energetics of vesicle fusion intermediates: comparison of calculations with observed effects of osmotic and curvature stresses. *Biophys J* **86**, 2951-2964
-

-
- 59 Haque, M. E. and Lentz, B. R. (2004) Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: studies of lipid perturbant effects. *Biochemistry* **43**, 3507-3517
- 60 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**, 4340-4348
- 61 Colman, P. M. and Lawrence, M. C. (2003) The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 309-319
- 62 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**, 627-661
- 63 Tamm, L. K. (2003) Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 14-23
- 64 Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911
- 65 Ungermann, C. and Langosch, D. (2005) Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* **118**, 3819-3828
- 66 Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* **272**, 28036-28041
- 67 Otto, H., Hanson, P. I. and Jahn, R. (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6197-6201
- 68 Rothman, J. E. (1994) Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**, 81-96
- 69 Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418
- 70 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**, 15781-15786
- 71 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**, 347-353
- 72 Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (1998) Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* **94**, 841-849
-

-
- 73 Nicholson, K. L., Munson, M., Miller, R. B., Filip, T. J., Fairman, R. and Hughson, F. M. (1998) Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nat Struct Biol* **5**, 793-802
- 74 Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R. J. and Scheller, R. H. (1999) SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem* **274**, 5649-5653
- 75 Rizo, J. and Sudhof, T. C. (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* **3**, 641-653
- 76 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**, 759-772
- 77 Fasshauer, D. (2003) Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 87-97
- 78 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**, 107-111
- 79 Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**, 175-207
- 80 Cohen, F. S. and Melikyan, G. B. (2004) The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol* **199**, 1-14
- 81 Kemble, G. W., Danieli, T. and White, J. M. (1994) Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* **76**, 383-391
- 82 Nussler, F., Clague, M. J. and Herrmann, A. (1997) Meta-stability of the hemifusion intermediate induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin. *Biophys J* **73**, 2280-2291
- 83 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**, 3765-3775
- 84 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**, 425-437
- 85 Grote, E., Baba, M., Ohsumi, Y. and Novick, P. J. (2000) Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *J Cell Biol* **151**, 453-466
- 86 Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H. and Hofmann, K. (1998) A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol* **8**, 260-262
-

-
- 87 de Haro, L., Ferracci, G., Opi, S., Iborra, C., Quetglas, S., Miquelis, R., Leveque, C. and Seagar, M. (2004) Ca²⁺/calmodulin transfers the membrane-proximal lipid-binding domain of the v-SNARE synaptobrevin from cis to trans bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1578-1583
- 88 Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S. C. and Walz, T. (2005) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* **438**, 633-638
- 89 Dennison, S. M., Greenfield, N., Lenard, J. and Lentz, B. R. (2002) VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion. *Biochemistry* **41**, 14925-14934
- 90 Langosch, D., Brosig, B. and Pipkorn, R. (2001) Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J Biol Chem* **276**, 32016-32021
- 91 Cleverley, D. Z. and Lenard, J. (1998) The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3425-3430
- 92 Street, A. G. and Mayo, S. L. (1999) Intrinsic beta-sheet propensities result from van der Waals interactions between side chains and the local backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9074-9076
- 93 Li, S. C. and Deber, C. M. (1992) Glycine and beta-branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments. *FEBS Lett* **311**, 217-220
- 94 Hofmann, M. W., Peplowska, K., Rohde, J., Poschner, B. C., Ungermann, C. and Langosch, D. (2006) Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J Mol Biol* **364**, 1048-1060
- 95 Montecucco, C., Schiavo, G. and Pantano, S. (2005) SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci* **30**, 367-372
- 96 Hua, Y. and Scheller, R. H. (2001) Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8065-8070
- 97 Woody, R. W. (1995) Circular dichroism. *Methods Enzymol* **246**, 34-71
- 98 Hennessey, J. P., Jr. and Johnson, W. C., Jr. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry* **20**, 1085-1094
- 99 Provencher, S. W. and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37
- 100 Greenfield, N. and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4116
- 101 Bohm, G., Muhr, R. and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**, 191-195
-

-
- 102 Poschner, B. C., Reed, J., Langosch, D. and Hofmann, M. W. (2007) An automated application for deconvolution of circular dichroism spectra of small peptides. *Anal Biochem* **363**, 306-308
- 103 Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 14-17
- 104 Eigen, M. (1964) Proton Transfer, Acid-Base Catalysis, and Enzymatic Hydrolysis. Part I: ELEMENTARY PROCESSES. *Angewandte Chemie International Edition in English* **3**, 1-19
- 105 Berger, A. and Linderstrom-Lang, K. (1957) Deuterium exchange of poly-DL-alanine in aqueous solution. *Arch Biochem Biophys* **69**, 106-118
- 106 Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75-86
- 107 Connelly, G. P., Bai, Y., Jeng, M. F. and Englander, S. W. (1993) Isotope effects in peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 87-92
- 108 Molday, R. S., Englander, S. W. and Kallen, R. G. (1972) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Biochemistry* **11**, 150-158
- 109 Englander, S. W. and Kallenbach, N. R. (1983) Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q Rev Biophys* **16**, 521-655
- 110 Hvidt, A. and Nielsen, S. O. (1966) Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* **21**, 287-386
- 111 Milne, J. S., Xu, Y., Mayne, L. C. and Englander, S. W. (1999) Experimental study of the protein folding landscape: unfolding reactions in cytochrome c. *J Mol Biol* **290**, 811-822
- 112 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**, 144-146
- 113 Zhang, Z., Li, W., Logan, T. M., Li, M. and Marshall, A. G. (1997) Human recombinant [C22A] FK506-binding protein amide hydrogen exchange rates from mass spectrometry match and extend those from NMR. *Protein Sci* **6**, 2203-2217
- 114 Skilling, J. and Bryan, R. K. (1984) Maximum entropy image reconstruction general algorithm. *Mon Not R Astr Soc* **211**, 111-124
- 115 Reed, J. and Reed, T. A. (1997) A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* **254**, 36-40
- 116 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**, 23645-23648
- 117 Minor, D. L., Jr. and Kim, P. S. (1994) Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* **367**, 660-663
-

-
- 118 Hofmann, M. W., Poschner, B. C., Hauser, S. and Langosch, D. (2007) pH-Activated fusogenic transmembrane LV-peptides. *Biochemistry* **46**, 4204-4209
- 119 Luo, P. and Baldwin, R. L. (1999) Interaction between water and polar groups of the helix backbone: an important determinant of helix propensities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4930-4935
- 120 Wand, A. J., Roder, H. and Englander, S. W. (1986) Two-dimensional ¹H NMR studies of cytochrome c: hydrogen exchange in the N-terminal helix. *Biochemistry* **25**, 1107-1114
- 121 Blanco, F. J., Rivas, G. and Serrano, L. (1994) A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat Struct Biol* **1**, 584-590
- 122 Kemmink, J. and Creighton, T. E. (1993) Local conformations of peptides representing the entire sequence of bovine pancreatic trypsin inhibitor and their roles in folding. *J Mol Biol* **234**, 861-878
- 123 Waltho, J. P., Feher, V. A., Merutka, G., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (1993) Peptide models of protein folding initiation sites. 1. Secondary structure formation by peptides corresponding to the G- and H-helices of myoglobin. *Biochemistry* **32**, 6337-6347
- 124 Hirst, J. D. and Brooks, C. L., 3rd (1994) Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J Mol Biol* **243**, 173-178
- 125 Gustafsson, M., Griffiths, W. J., Furusjo, E. and Johansson, J. (2001) The palmitoyl groups of lung surfactant protein C reduce unfolding into a fibrillogenic intermediate. *J Mol Biol* **310**, 937-950
- 126 Zangi, R., Kovacs, H., van Gunsteren, W. F., Johansson, J. and Mark, A. E. (2001) Free energy barrier estimation of unfolding the alpha-helical surfactant-associated polypeptide C. *Proteins* **43**, 395-402
- 127 Szyperski, T., Vandenbussche, G., Curstedt, T., Ruyschaert, J. M., Wuthrich, K. and Johansson, J. (1998) Pulmonary surfactant-associated polypeptide C in a mixed organic solvent transforms from a monomeric alpha-helical state into insoluble beta-sheet aggregates. *Protein Sci* **7**, 2533-2540
- 128 Kovacs, H., Mark, A. E., Johansson, J. and van Gunsteren, W. F. (1995) The effect of environment on the stability of an integral membrane helix: molecular dynamics simulations of surfactant protein C in chloroform, methanol and water. *J Mol Biol* **247**, 808-822
- 129 Stelzer, W., Poschner, B. C., Stalz, H., Heck, A. J. and Langosch, D. (2008) Sequence-specific conformational flexibility of SNARE transmembrane helices probed by hydrogen/deuterium exchange. *Biophys J* **95**, 1326-1335
- 130 Ollesch, J., Poschner, B. C., Nikolaus, J., Hofmann, M. W., Herrmann, A., Gerwert, K. and Langosch, D. (2008) Secondary structure and distribution of fusogenic LV-peptides in lipid membranes. *Eur Biophys J* **37**, 435-445
-

-
- 131 Li, Y. and Tamm, L. K. (2007) Structure and plasticity of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain in lipid micelles and bilayers. *Biophys J* **93**, 876-885
- 132 White, S. H. and Wimley, W. C. (1998) Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 339-352
- 133 White, S. H., Wimley, W. C., Ladokhin, A. S. and Hristova, K. (1998) Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions. *Methods Enzymol* **295**, 62-87
- 134 Killian, J. A. (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1376**, 401-415
- 135 Heijne, G. V. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *Embo J* **5**, 3021-3027
- 136 de Planque, M. R., Kruijtzter, J. A., Liskamp, R. M., Marsh, D., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., 2nd, de Kruijff, B. and Killian, J. A. (1999) Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J Biol Chem* **274**, 20839-20846
- 137 Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643
- 138 Chernomordik, L., Kozlov, M. M. and Zimmerberg, J. (1995) Lipids in biological membrane fusion. *J Membr Biol* **146**, 1-14
- 139 Zimmerberg, J. and Gawrisch, K. (2006) The physical chemistry of biological membranes. *Nat Chem Biol* **2**, 564-567
- 140 Lam, A. D., Tryoen-Toth, P., Tsai, B., Vitale, N. and Stuenkel, E. L. (2008) SNARE-catalyzed Fusion Events Are Regulated by Syntaxin1A-Lipid Interactions. *Mol Biol Cell* **19**, 485-497
- 141 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
- 142 Noguchi, H. and Takasu, M. (2002) Structural changes of pulled vesicles: a Brownian dynamics simulation. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **65**, 051907
- 143 Epanand, R. F., Raguse, T. L., Gellman, S. H. and Epanand, R. M. (2004) Antimicrobial 14-helical beta-peptides: potent bilayer disrupting agents. *Biochemistry* **43**, 9527-9535
- 144 Liu, D. and DeGrado, W. F. (2001) De novo design, synthesis, and characterization of antimicrobial beta-peptides. *J Am Chem Soc* **123**, 7553-7559
-

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Torsionswinkel am Peptidrückgrat.....	3
Abb. 2: Neigung der unterschiedlichen Aminosäuren sich in einer α -helikalen Faltung wiederzufinden...	5
Abb. 3: Übergangszustände der Membranfusion nach der „Stalk-Hypothese“.....	10
Abb. 4: Struktur des SNARE-Komplexes.....	12
Abb. 5: Der hypothetische Mechanismus der Membranfusion.....	14
Abb. 6: Fusogenität von synthetischen Modellpeptiden mit hydrophoben Kernsequenzen aus Leucin und Valin unterschiedlicher Zusammensetzung.....	18
Abb. 8: Zirkular Dichroismus Spektren der Hauptkomponenten.....	20
Abb. 9: Klassischer Aufbau eines Massenspektrometers.....	22
Abb. 10: Zwei-Zustandsmodell zwischen gefaltetem (N) und entfaltetem (D) Zustand eines Proteins oder Peptids.....	23
Abb. 11: Beispiele für austauschbare Protonen in Peptiden.....	23
Abb. 12: Teilreaktionen der Protonen-Austauschreaktion.....	24
Abb. 13: Mechanismus der Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion in Peptiden und Proteinen.....	24
Abb. 14: Reaktionsmechanismus der Wasserstoff/Deuterium-Austauschreaktion.....	26
Abb. 15: Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit vom pH-Wert.....	27
Abb. 16: Referenzspektren für den CDNN/PEPFIT-Algorithmus.....	44
Abb. 17: Validierung von CDNN/PEPFIT:.....	45
Abb. 18: Die Primärstruktur der verwendeten synthetischen Modellpeptide.....	46
Abb. 19: Bestimmung der Sekundärstruktur der aliphatischen Varianten mittels Zirkular Dichroismus-Spektroskopie.....	49
Abb. 20: Repräsentative Massenspektren des L16 Peptids aus einem D/H-Austauschexperiment.....	51
Abb. 21: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 (% V/V) bei 20 °C.....	51
Abb. 22: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.....	53
Abb. 23: Die Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.....	54
Abb. 24: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 (% V/V) bei 20 °C mittels der kontinuierlichen Messmethode.....	54
Abb. 25: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.....	55
Abb. 26: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.....	55
Abb. 27: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatische Varianten in POPC/DOPE/DOPS Membranen bei 37 °C.....	57

Abb. 28: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	58
Abb. 29: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	58
Abb. 30: D/H-Austausch-Kinetik der aliphatischen Varianten in verschiedenen Lipid-Membranen bei 50 °C.....	59
Abb. 31: Die kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	60
Abb. 32: Anzahl an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	61
Abb. 33: Durch Präaggregation induzierte Fusion.....	62
Abb. 34: Fusogenität der unregelmäßigen LV-Varianten.	63
Abb. 35: Bestimmung der Sekundärstruktur der unregelmäßigen Varianten mittels Zirkular Dichroismus Spektroskopie.....	65
Abb. 36: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der unregelmäßigen LV-Peptide in Membranen.	66
Abb. 37: Die DHX-Kinetik der unregelmäßigen Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C.....	67
Abb. 38: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	68
Abb. 39: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	69
Abb. 40: DHX-Kinetik der unregelmäßigen Varianten in Lipid-Membranen bei 50 °C in 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5.....	70
Abb. 41: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	71
Abb. 42: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	72
Abb. 43: Lokalisation der Austauschorte der unregelmäßigen Varianten.....	73
Abb. 44: Bestimmung der Sekundärstruktur der Helix-Brecher-Varianten mittels Zirkular Dichroismus Spektroskopie.....	75
Abb. 45: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der Gly/Pro-Varianten der LV-Peptide in liposomalen Membranen.....	75
Abb. 46: DHX-Experimente der Helix-Brecher-Varianten in 80 % TFE/20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C mittels „online“-Messmethode.	77
Abb. 47: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	77
Abb. 48: D/H-Austausch-Kinetik der Gly/Pro-Varianten in POPC/DOPE/DOPS Membranen bei 37 °C.	78
Abb. 49: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	78
Abb. 50: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	79

Abb. 51: Sekundärstruktur der Histidin-flankierten Peptide.....	81
Abb. 52: DHX-Experimente der Histidin-Varianten in 80 %/TFE 20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,5 bei 20 °C mittels kontinuierlicher Messungen.	82
Abb. 53: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	83
Abb. 54: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	84
Abb. 55: DHX-Experimente der Histidin-Varianten in 80 % TFE 20 % 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,8 bei 20 °C mittels „online“-Messmethode durch Base Start.....	85
Abb. 56: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	86
Abb. 57: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	87
Abb. 58: Sekundärstruktur der Längen-Varianten.	88
Abb. 59: Zirkular Dichroismus und Sekundärstruktur der Längen-Varianten in Membranen.....	89
Abb. 60: Fusion der acylierten Peptide.	90
Abb. 61: Kinetik der Vermischung der äußeren Lipidschichten während der Fusion.	91
Abb. 62: Sekundärstruktur der acylierten Peptide.....	92
Abb. 63: DHX-Experimente der acylierten Varianten in 80 % TFE/20% 10 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,8 bei 20 °C mittels kontinuierlich vermessener Methode.....	93
Abb. 64: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	94
Abb. 65: DHX-Kinetik der acylierten Varianten in Lipid-Membranen bei 50 °C in 50 mM Ammoniumformiat Puffer pH 5,5.....	94
Abb. 66: Kinetische Auswertung durch MEM-Analyse.	95
Abb. 67: Anzahlen an Deuteronen in den definierten Ratenkonstantenbereichen aus der Auswertung mit Hilfe der MEM-Methode.	95
Abb. 68: Besetzung der Wasserstoffbrücken als Funktion der Sequenzposition.	105
Abb. 69: Der Einfluss sterischer Effekte auf die Peptidstruktur.	106

Abkürzungen

AcN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butoxycarbonyl
CD	Circular Dichroism (Zirkular Dichroismus)
CHCl ₃	Chloroform
CID	collision induced dissociation
D/H	Deuterium/Wasserstoff
DLPC	Dilaurylphosphatdidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	Diolelylphosphatidylethanolamin
DOPS	Diolelylphosphatidylserin
DTN	Natriumdithionit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrosprayionisierung
EtOH	Ethanol
FAB	fast atom bombardment
FTIR	Fourier Transformation Infrarot
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Influenza Hämagglutinin
H/D	Wasserstoff/Deuterium
HIV	Human Immunodeficiency Virus
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MD	Molekular Dynamik
MEM	Maximum Entropie Methode
MLV	multilamellar vesicle
MS	Massenspektrometrie
NBD	7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol
NSF	N-Ethylmaleimid sensitive factor
P/L	Peptid/Lipid
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
POPC	Palmitoylolelylphosphatidylcholin

PS	Phosphatidylserin
Q-ToF	Quadrupole time of flight
Rh	Lissamin-Rhodamin B sulfonsäure
RMSD	root mean square deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	synaptosome associated protein
SNARE	soluble NSF protein receptor
SP-C	Surfactant associated polypeptide C
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SUV	small unilamellar vesicle
Syb	Synaptobrevin
Syx	Syntaxin
TFA	Trifluoacetat
TFE	Trifluorethanol
TMD	Transmembrandomäne
ToF	time of flight
UV	Ultraviolet
UZ	Ultrazentrifuge
VSV	vesikulärer Stomatitis Virus

Aminosäuren:

A (Ala) Alanin	M (Met) Methionin
C (Cys) Cystein	N (Asn) Asparagin
D (Asp) Aspartat	P (Pro) Prolin
E (Glu) Glutamat	Q (Gln) Glutamin
F (Phe) Phenylalanin	R (Arg) Arginin
G (Gly) Glycin	S (Ser) Serin
H (His) Histidin	T (Thr) Threonin
I (Ile) Isoleucin	V (Val) Valin
K (Lys) Lysin	W (Trp) Tryptophan
L (Leu) Leucin	Y (Tyr) Tyrosin

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Publikationen im Rahmen der Dissertation:

Hofmann, M. W., Peplowska, K., Rohde, J., Poschner, B. C., Ungermann, C., and Langosch, D. (2006) Self-interaction of a SNARE transmembrane domain promotes the hemifusion-to-fusion transition. *J Mol Biol* 364, 1048-1060.

Poschner, B. C., Reed, J., Langosch, D., and Hofmann, M. W. (2007) An automated application for deconvolution of circular dichroism spectra of small peptides. *Anal Biochem* 363, 306-308.

Hofmann, M. W., Poschner, B. C., Hauser, S., and Langosch, D. (2007) pH-Activated fusogenic transmembrane LV-peptides. *Biochemistry* 46, 4204-4209.

Ollesch, J., Poschner, B. C., Nikolaus, J., Hofmann, M. W., Herrmann, A., Gerwert, K., and Langosch, D. (2008) Secondary structure and distribution of fusogenic LV-peptides in lipid membranes. *Eur Biophys J* 37, 435-445.

Stelzer, W., Poschner, B. C., Stalz, H., Heck, A. J., and Langosch, D. (2008) Sequence-specific conformational flexibility of SNARE transmembrane helices probed by hydrogen/deuterium exchange. *Biophys J* 95, 1326-1335.

Posterbeiträge im Laufe der Promotion:

Hofmann, M. W., Poschner, B. C., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stelzer, W., Hulsbergen, F., Schrader, T., deGroot, H., Gerwert, K., Reed, J. and Langosch, D.

Fusogenic activity of conformationally flexible de novo designed transmembrane peptides

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

Poschner, B. C., Hofmann, M. W. and Langosch, D.

Structure and dynamics of de novo designed membrane fusogenic peptides assessed by D/H exchange reactions

2nd Workshop on biophysics of membrane-active peptides 2007, Lissabon, Portugal.

Poschner, B. C., Hofmann, M. W. and Langosch, D.

Mass spectrometry and de novo peptide design as tools to understand structure/function relationship of membrane fusogenic proteins

INTERACT – Munich PhD symposium 2007, Martinsried

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Bernhard Christian Poschner
Geburtsdatum/-ort: 06.04.1979, Traunstein
Wohnsitz: Freisinger Str.3, 85354 Freising

Schulische Ausbildung

09/85 - 07/89 Grundschule Taching am See
09/89 - 06/98 Chiemgau Gymnasium Traunstein, Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/99 - 10/02 Grundstudium Biologie
Vordiplom in Biologie
10/02 - 11/04 Hauptstudium der Biologie
Schwerpunkt Technische Biologie
Nebenfächer Immunologie und Humangenetik
Diplom Biologe univ.
seit 11/04 Promotion an der Technischen Universität München,
Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere Prof. Dr. D. Langosch

Sonstige Tätigkeiten

07/98 - 04/99 Wehrdienst Gebirgsjägerbataillon Strub bei Berchtesgaden
01/99 - 06/99 Praktikum Dragenopharm GmbH, Tittmoning
06/03 - 09/03 Praktikum University of Virginia, Charlottesville, VA, USA
Institute of Molecular Physiology and Biological Physics
Prof. Dr. L. Tamm
10/03 - 12/03 Praktikum Munich Biotech AG, Martinsried