

**NEUE EINBLICKE IN DIE SNARE-VERMITTELTE FUSION:
DETEKTION EINZELNER PROTEOLIPOSOMEN MIT EINEM
KONFOKALEN MIKROSKOP**

Dissertation zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doktor rerum naturalium“

an der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

ANNA CYPIONKA

aus Göttingen

Göttingen 2009

Mitglieder des Thesis Committee:

Prof. Dr. Peter Jomo Walla (Referent)

Arbeitsgruppe Biomolekulare Spektroskopie und Einzelmolekül-Detektion,
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen
und
Abteilung für Biophysikalische Chemie,
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie,
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Prof. Dr. Reinhard Jahn (Referent)

Abteilung Neurobiologie,
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie,
Georg-August-Universität, Göttingen

Datum der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2009

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Göttingen, den 09. 11. 09

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FCCS	Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (<i>fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRET	Förster Resonanz-Energie-Transfer
GTP	
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triessigsäure
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>round per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TIRF	Interne Totalreflektion-Fluoreszenz (<i>total internal reflection fluorescence</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen/ Volumen
w/v	Masse/ Volumen (<i>weight/ volume</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Intrazelluläre Membranfusionen	1
1.1.1	Modelle der Membranfusion	1
1.1.2	SNARE-Proteine	4
1.1.3	Rabs und SM-Proteine	6
1.2	Neuronale Exozytose	7
1.2.1	Schlüsselproteine der neuronalen Exozytose	8
1.2.2	Complexine	10
1.3	Rekonstitution der Membranfusion <i>in vitro</i>	12
1.4	Detektion von Einzelpartikeln	15
1.5	Beobachtung gedockter Membranen <i>in vitro</i>	17
1.6	Motivation der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Biochemische Methoden	21
2.1.1	Material	21
2.1.2	Expression und Reinigung von Proteinen	22
2.1.3	Herstellung des ternären SNARE-Komplex	24
2.1.4	Herstellung von Liposomen	25
2.1.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.1.6	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	27
2.2	Physikalische Methoden	27
2.2.1	Konfokale Messapparatur	27
2.2.2	Photonenburst-Analyse	29
2.2.3	Fluoreszenz-(Kreuz)-Korrelations-Spektroskopie	30
2.2.4	Ermittlung der FRET-Effizienz	34
2.2.5	Dynamische Lichtstreuung	37

3	ERGEBNISSE	39
3.1	Photonenburst-Experimente	39
3.2	Validierung des FCCS-Assays	44
3.2.1	Datenanalyse	44
3.2.2	Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Farbstoffkonzentration	50
3.2.3	Vergleichbarkeit von Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzintensität	51
	Vergleich verschiedener FRET-Paare und Donor-Farbstoffkonzentrationen	52
3.2.4	Anwendbarkeit von FCS und FCCS auf Liposomen	55
3.3	Kinetik einer Fusionsreaktion	59
3.3.1	Vergleich von Docking und Fusion	59
3.3.2	Anzahl der Fusionsrunden	61
3.3.3	Kinetik von Docking und Fusion	62
3.3.4	Einfluss der Größe der Liposomen auf die Fusion	67
3.4	Einfluss von Complexin 2 auf die Fusion	68
3.5	Interaktion von Complexin 2 mit Membranen	70
4	DISKUSSION	77
4.1	Assay zur Unterscheidung von Docking und Fusion	77
4.2	Die Geschwindigkeit von Docking und Fusion	79
4.3	Ausblick: Anwendungen des Assays	82
4.4	Wie beeinflusst Complexin 2 die Fusion?	83
4.5	Complexin 2 interagiert mit Membranen	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
	LITERATURVERZEICHNIS	93
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103

1 Einleitung

1.1 Intrazelluläre Membranfusionen

Der Innenraum einer eukaryotischen Zelle ist durch Membranen in Kompartimente eingeteilt. Die räumliche Trennung verschiedener Bereiche gewährleistet, dass Konzentrationsunterschiede in der Zelle aufrecht erhalten werden können. So können z.B. pH-Gradienten und Potentialunterschiede erreicht werden, die für das Steuern von biochemischen Prozessen essentiell sind. Die einzelnen Kompartimente der Zelle stehen untereinander und mit der Plasmamembran in einem ständigen Austausch. Dabei werden Transportvesikel von einem Kompartiment abgeschnürt und zu einem Zielkompartiment transportiert, mit dem sie spezifisch verschmelzen. Verschmilzt ein Vesikel mit der Plasmamembran, so wird sein Inhalt in den extrazellulären Raum entleert und man spricht von Exozytose. Der umgekehrte Prozess, die Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran unter Aufnahme von Substanzen von außerhalb der Zelle wird als Endozytose bezeichnet. Sowohl die Kompartimente und die Plasmamembran als auch die Transportvesikel verfügen über charakteristische Zusammensetzungen von Phospholipiden und vor allem Membranproteinen, die diese komplizierten Vorgänge steuern [1, 2].

Neben diesen intrazellulären Prozessen gibt es auch Fusionen an der Außenseite der Plasmamembran: Bei der Verschmelzung zweier Zellen [3] oder der Infektion der Zelle durch membranummantelte Viren [4]. Diese Prozesse waren nicht Schwerpunkt dieser Arbeit. Viele der im Folgenden angestellten grundlegenden Betrachtungen gelten aber auch für diese Fusionen und die hier vorgestellte Methode ließe sich auch zu ihrer Untersuchung anwenden.

1.1.1 Modelle der Membranfusion

Biologische Membranen bestehen aus Phospholipiddoppelschichten, in die Transmembranproteine eingebunden sind. Wenn zwei Membranen fusionieren, so vermischen sich die Lipide der beiden Doppelschichten miteinander, wobei der genaue Verlauf der Fusion kontrovers diskutiert wird. Lipidgemische können je nach Lösungsmittel, Temperatur und Druck verschiedene Phasen ausbilden. In wässriger Lösung wird eine ther-

KAPITEL 1.1

modynamisch stabile Lipiddoppelschicht ausgebildet. Um zu fusionieren, müssen die zwei Membranen eine elektrostatische Abstoßung überwinden und wahrscheinlich kurzzeitig ein energetisch sehr ungünstiges Intermediat durchlaufen. Einen Vorschlag, wie dies im Einzelnen aussehen könnte, bietet die *stalk*-Hypothese (Abb. 1.1, [5]): Die Membranen verformen sich zunächst in einem kleinen Bereich, so dass die äußeren Lipidschichten in räumliche Nähe zueinander kommen. So tritt eine Abstoßung der Hydrathüllen der beiden Membranen nur in einem sehr begrenzten Bereich auf. Im nächsten Schritt mischen sich nur die Lipide der äußeren („proximalen“) Lipidschichten. Dieses Intermediat, in dem die Membranen eine x-förmige Struktur haben, wird als hemifusioniert oder als *fusion stalk* bezeichnet. Es wird sowohl die direkte Öffnung einer Fusionspore aus dem *stalk*-Intermediat wie auch die Erweiterung des hemifusionierten Bereiches zu einem so genannten Hemifusions-Diaphragma diskutiert. Durch das Zerreißen des Diaphragmas bildet sich dann erst in einem weiteren Schritt eine Fusionspore und die Lipide der inneren („distalen“) Lipidschicht vermischen sich.

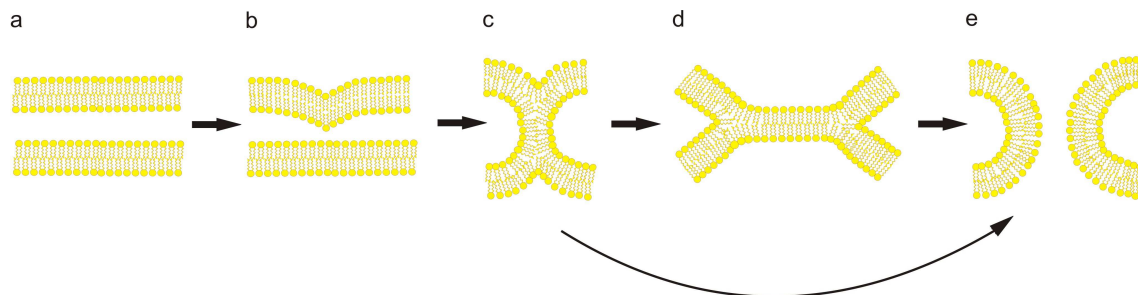


Abb. 1.1: Fusion von zwei Membranen nach dem *stalk*-Modell.

(a) Membranen vor der Fusion. (b) Lokale Verformung der Membran. (c) Hemifusion-
sintermediat, auch *fusion stalk* genannt. Die Lipide der proximalen Monoschichten sind
bereits vermischt, die distalen Lipidschichten haben noch keinen Kontakt. (d) Aus einer
Erweiterung des *fusion stalks* ergibt sich das Hemifusions-Diaphragma. (e) Die Fusi-
onspore bildet sich entweder direkt aus dem *stalk*-Intermediat (c) oder durch das Aufrei-
ßen des Hemifusions-Diaphragmas (d). Abbildung erstellt in Anlehnung an [5].

Für proteinfreie Membranen wird die *stalk*-Hypothese experimentell vor allem dadurch
gestützt, dass bestimmte Lipide die Fusionsintermediate stabilisieren. Abhängig von der
Zusammensetzung der Lipide nimmt eine Lipidmonoschicht eine bestimmte spontane

EINLEITUNG

Krümmung an. Biegt sich die Membran in Richtung der Kopfgruppen, so spricht man von positiver, im gegengesetzten Fall von negativer Krümmung. In den durch die *stalk*-Hypothese beschriebenen Intermediaten liegen die Membranen zeitweise stark verformt vor. Lipide, die durch ihre konische Form eine negative spontane Krümmung in Monoschichten induzieren, begünstigen die Bildung des *fusion stalk*, in dem die distalen Lipidschichten eine starke negative Krümmung aufweisen. Die Bildung von Fusionsporen, in denen die proximalen Lipidschichten eine stark positive Krümmung aufweisen, wird hingegen durch invertiert konische Lipide gefördert [6]. Wenn die Membranen aufgrund ihrer spontanen Krümmung nicht fusionieren, kann die Fusion dadurch induziert werden, dass die Membranen z.B. durch Dehydrierung in engen Kontakt gebracht werden [7]. In proteinfreien Membranen wurde die Hemifusion also experimentell nachgewiesen. Die Ergebnisse, vor allem der Einfluss der spontanen Krümmung, konnten durch Berechnungen mit dem Kontinuum-Modell, das die fusionierenden Membranen als elastische Schichten betrachtet, korrekt beschrieben werden [8]. Hier geht man allerdings von einer rotationssymmetrischen Form der Intermediate und einer punktförmigen Verformung der Membran als Ausgangspunkt der Fusion aus. Ganz ohne Vorannahmen über die Fusionsintermediate kommen numerische Simulationen der molekularen Dynamik in den Lipiddoppelschichten aus. In der Mehrzahl der Simulationen konnte auch hier die Bildung des *fusion stalks* bestätigt werden [9].

Proteinfreie Membranen mit einer Lipidzusammensetzung, die der natürlicher Membranen entspricht, sind stabil und fusionieren selbst nach langem Kontakt nicht. Membranfusionen in biologischen Systemen werden deshalb durch Proteine gesteuert und vermittelt, die an jedem Schritt des Prozesses beteiligt sind: Dem Herstellen des Kontaktes zwischen den Membranen, der Stabilisierung des Hemifusionszustandes und der Öffnung und Erweiterung der Fusionspore [10]. Die Hemifusion wurde für künstliche Membranen, die mit Fusionsproteinen rekonstituiert waren, indirekt nachgewiesen. In einer Untersuchung konnte eine zeitliche Verzögerung zwischen dem Vermischen der Lipide und des luminalen Inhalts der Vesikel beobachtet werden [11], in einer anderen wurde eine Verzögerung zwischen dem Vermischen der spezifisch markierten proximalen und distalen Lipidschichten gezeigt [12, 13]. In Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Einzelvesikeln konnte außerdem ein zweistufiges Signal beobachtet werden, dass auf die getrennte Fusion der beiden Lipidschichten zurückgeführt wurde [14, 15].

KAPITEL 1.1

Alternativ zur Hemifusion wird für die Membranfusion von biologischen Membranen ein Mechanismus diskutiert, der über die Bildung von Proteinassoziaten verläuft. Proteine in den fusionierenden Membranen formieren sich zu einer geschlossenen Proteinpore, die sich durch eine Konformationsänderung analog zu einem Ionenkanal oder einer *gap junction* öffnet [16]. Diese Theorie ist experimentell schwer zu belegen, zumal auch Fusionsporen in proteinfreien Membranen Eigenschaften von Ionenkanälen aufweisen [17].

1.1.2 SNARE-Proteine

Allen intrazellulären Membranfusionen mit Ausnahme der Fusion von Mitochondrien [18] und Peroxisomen [19] ist gemeinsam, dass sie durch die Familie der SNARE-Proteine vermittelt werden. Neben den Fusionen in den sekretorischen Signalwegen in *Saccharomyces cerevisiae* ist die neuronale Exozytose das meist untersuchte Beispiel einer SNARE-vermittelten Fusion. Die SNAREs funktionieren dabei als „minimale Fusionsmaschine“ [20]. Weitere wichtige, regulatorische Funktionen werden von den Rab- und SM-Proteine übernommen, die im nächsten Kapitel beschrieben werden.

Der Name der SNAREs steht für *SNAP receptor*. Sie wurden erstmals in einem Komplex mit NSF (*N-ethylmaleimid sensitive factor*) und α -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) isoliert [21]. Bis heute sind 43 SNARE-Proteine im Menschen und 24 in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben [22-24]. Allen SNAREs gemein ist eine in Heptad-Wiederholungen angeordnete, konservierte Sequenz von ca. 60 Aminosäuren, die SNARE-Motiv genannt wird. Ein Großteil der SNAREs sind Membranproteine vom Typ I und weisen an ihrem C-terminalen Ende eine Transmembrandomäne auf. Oft ist am N-terminalen Ende eine weitere unabhängig gefaltete Domänen zu finden [1]. Jeweils Sets aus vier zusammengehörigen SNARE-Motiven sind auf die beiden fusionierenden Membranen verteilt und bilden den so genannten SNARE-Komplex. Während in den monomeren SNAREs das SNARE-Motiv kaum Sekundärstruktur aufweist, bildet der Komplex eine Struktur von hoher Schmelztemperatur aus vier umeinander gewundenen α -Helices (Abb. 1.3, [25, 26]).

Ursprünglich wurden SNAREs in zwei Gruppen, die *target* (t)- und die Vesikel (v)-SNAREs eingeteilt, je nachdem auf welcher der Membranen sie zu finden sind. In manchen Fällen, z.B. bei homotypischen Membranfusionen, kann es jedoch sinnvoller

EINLEITUNG

sein, eine auf der konservierten Struktur des Komplexes beruhende Nomenklatur zu verwenden [1]. Selbst die Kristallstrukturen von nur entfernt verwandten SNARE-Komplexen zeigen eine außergewöhnliche Ähnlichkeit [27-29]. Der zentrale Teil des Komplexes wird durch die Wechselwirkungen von Seitenketten stabilisiert, die in 16 Ebenen angeordnet sind. Fast alle dieser Wechselwirkungen sind hydrophober Natur. Immer durch polare Seitenketten stabilisiert ist aber der so genannte *0-layer* in der Mitte des Komplexes. Der *0-layer* ist hochkonserviert und besteht meistens aus drei Glutaminen (Einbuchstabenkode Q) und einem Arginin (Einbuchstabenkode R). Je nachdem welche Aminosäure sie dieser Schicht beisteuern, werden SNAREs als Q- oder R-SNARE bezeichnet [30]. Die Q-SNAREs lassen sich in drei weitere Untergruppen, Q_a, Q_b und Q_c einteilen und nur ein SNARE-Komplex, der jeweils genau ein Protein aus jeder der vier Untergruppen enthält, kann Fusion vermitteln [1].

Bei der Membranfusion unterlaufen die SNARE-Proteine einen komplizierten Konformationszyklus. Als Beispiel ist in Abb.1.2 die Fusion eines Vesikels, auf dem sich das R-SNARE befindet, mit einer Membran, auf der sich die drei Q-SNAREs befinden, dargestellt. Q-SNAREs können teilweise in Clustern organisiert auf der Membran vorliegen. Dieses Phänomen wurde mehrfach beschrieben, seine Bedeutung ist jedoch ungeklärt [31, 32]. In einem ersten Schritt lagern sich die drei Q-SNAREs zu einem Akzeptor-Komplex zusammen, an den das R-SNARE von der gegenüberliegenden Membran bindet. Nach dem so genannten *zipper*-Modell bildet sich ausgehend vom N-terminalen Ende des SNARE-Motives reißverschlussartig der Komplex, wodurch die Membranen zueinander hingezogen werden. Es wird vermutet, dass die bei der Komplexbildung frei werdende Energie auf die Membranen übertragen und für ihre Deformation aufgewendet wird [33]. Die Hypothese wird durch neueste kristallographische Untersuchungen am neuronalen SNARE-Komplex unterstützt, die zeigen, dass sich die helikale Struktur bis in den Transmembranbereich der Proteine fortsetzt [34]. So lange die Proteine noch in den gegenüberliegenden Membranen verankert sind, spricht man vom *trans*-SNARE-Komplex. Durch das Verschmelzen der Phospholipidschichten relaxiert dieser in den *cis*-Komplex. Zur Wiederverwertung wird der *cis*-SNARE-Komplex durch einen Multiproteinkomplex aus der AAA⁺-ATPase NSF und α -SNAP unter ATP-Hydrolyse wieder getrennt [35]. Anschließend werden die Proteine z.B. durch Endozytose wieder in die verschiedenen Membranen zurücksortiert.

KAPITEL 1.1

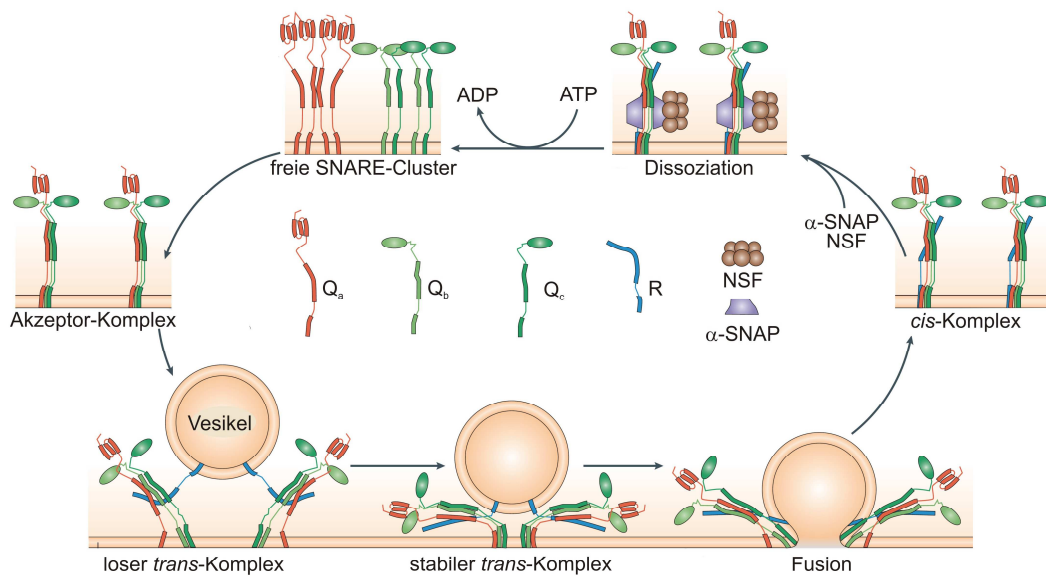


Abb.1.2: Der Konformationszyklus der SNARE-Proteine.

Die Q-SNAREs lagern sich auf der Membran zu einem Akzeptor-Komplex zusammen: Daran bindet das R-SNARE und es entsteht der *trans*-SNARE-Komplex. Bei der Fusion der beiden Membranen wird der *cis*-Komplex gebildet. Dieser wird durch α -SNAP und NSF unter Aufwendung von Energie wieder gespalten. In der Membran liegen die Q-SNAREs nicht monomer, sondern in Clustern organisiert vor. Abbildung abgewandelt aus [1].

1.1.3 Rabs und SM-Proteine

Die **Rab-Proteine**, eine Familie kleiner GTPase, sind an allen Schritten des sekretorischen Signalweges beteiligt, also der Abknospung von Vesikeln („*Budding*“), dem Abstreifen von Mantelproteinen („*Uncoating*“), dem Transport entlang des Zytoskeletts und auch der Fusion mit der Zielmembran. Sie funktionieren als molekulare Schalter, die zwischen zwei Konformationen wechseln: der GTP-gebundenen „an“-Konformation und der GDP-gebundenen „aus“-Konformation. Sie sind über einen Geranylgeranyl-Anker mit den Membranen verbunden. Die typische Aufgabe der Rab-Proteine bei der Vesikelfusion besteht in der Rekrutierung so genannter *Tethering*-Faktoren, die einen ersten Kontakt zwischen zwei fusionierenden Membranen herstellen. Bei den *Tethering*-Faktoren handelt es sich um große, längliche Proteinkomplexe wie z.B. den Exocyst-Komplex, der *trans*-Golgi-Vesikel an die Plasmamembran bindet, oder EEA1, das Kontakte zwischen endosomalen Membranen herstellt [2].

EINLEITUNG

Eine weitere Familie von zentraler Bedeutung für die intrazelluläre Membranfusion sind die **SM-Proteine**, die „Sec1p und Munc-18 homologen Proteine“. Sie bestehen aus einer konservierten, 600 Aminosäuren langen Sequenz, die eine bogen- oder klammerförmige Konformation annimmt. In dieser Klammer können die SM-Proteine ein Bündel aus vier α -Helices binden. Es wird deshalb vermutet, dass sie unter anderem die Fusion räumlich und zeitlich koordinieren, indem sie die SNAREs in fusogene Topologien arrangieren [36]. Das SM-Protein Munc-18 wird weiter unten noch genauer beschrieben.

1.2 Neuronale Exozytose

Die immense Vielfalt und Komplexität der verschiedenen Aufgaben, die vom Nervensystem übernommen werden, hängen von der Fähigkeit der Neuronen ab, auf genau definierte Weise miteinander zu kommunizieren. Die Signaltransduktion von einer Nervenzelle zur nächsten findet an der Synapse statt und wird durch Neurotransmitter vermittelt, deren Ausschüttung durch einen Ca^{2+} -Stimulus ausgelöst wird. Bei den Neurotransmittern handelt es sich um niedermolekulare Substanzen, wie z.B. dem Amin Acetylcholin, aber auch bestimmten Peptiden oder Aminosäuren, die an den Nervenendigungen der präsynaptischen Zelle abgegeben werden und auf der gegenüberliegenden Seite des synaptischen Spalts an in der postsynaptischen Membran verankerten Rezeptoren binden. Die Ausschüttung des Neurotransmitters, auch neuronale Exozytose genannt, läuft auf der Submillisekunden-Zeitskala ab [37]. Diese unmittelbare Antwort ist nur möglich, weil die mit Neurotransmittern geladenen Vesikel bereits an bestimmten Bereichen der Plasmamembran, den aktiven Zonen, gebunden sind. Sie befinden sich vermutlich in einem Zustand, in dem nur noch kleinste Konformationsänderungen notwendig sind, damit es zur Fusion der Membranen kommt. Man nennt diesen Zustand auch *primed* [38].

An dieser Stelle sei erwähnt, dass für die der Fusion vorausgehende Bindung des Vesikels an die Membran drei Begriffe verwendet werden: *Tethering*, *Docking* und *Priming*. Unter *Tethering* wird eine eher lose Assoziation der Vesikel mit der Zielmembran verstanden. Der Begriff *Docking* beschreibt die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtete Morphologie von an der Plasmamembran gebundenen Vesikeln. *Priming* ist ursprünglich eine funktionelle Beschreibung und meint Vesikel, die sich in einem

KAPITEL 1.2

hochfusogenen Zustand befinden und bei Stimulation in elektrophysiologischen Experimenten unmittelbar Neurotransmitter ausschütten. Um die Vesikel in diesen Zustand zu versetzen wird ATP benötigt [38]. Manchmal werden die drei Begriffe auch durch die räumliche Nähe unterschieden, in der sich das Vesikel zur Plasmamembran befindet bzw. durch die Stärke der Bindung, die vom *Tethering* zum *Priming* hin zunimmt [39].

Es lassen sich zwei Typen von Neurotransmitter-Ausschüttung unterscheiden. Im ersten Fall, der spontanen Ausschüttung, werden Neurotransmitter von der präsynaptischen Zelle abgegeben, ohne dass ein Aktionspotential vorausging. Im zweiten Fall wird die Ausschüttung durch ein Aktionspotential in der präsynaptischen Zelle und den dadurch hervorgerufenen Ca^{2+} -Stimulus ausgelöst. Die Bindung der Neurotransmitter an die Rezeptoren löst in der postsynaptischen Zelle zwei Typen von Signalen aus: ein schnelles, „synchrones“ und ein langanhaltendes, „asynchrones“ [38].

1.2.1 Schlüsselproteine der neuronalen Exozytose

Die zentrale Bedeutung der SNARE-Proteine in der Signaltransduktion wurde in *Knock-out*-Experimenten belegt [40-42]. Sie wurde durch den Nachweis untermauert, dass die neuronalen SNAREs spezifisch von einer Gruppe von Nervengiften, den Botulinum und Tetanus Neurotoxinen, proteolytisch gespalten werden [43-45]. Der neuronale SNARE-Komplex besteht aus drei Proteinen: Das R-SNARE Synaptobrevin 2 und das Q_a -SNARE Syntaxin 1A steuern jeweils ein SNARE-Motiv bei, das Q_{bc} -SNARE SNAP-25A liefert zwei SNARE-Motive [27]. Während Synaptobrevin 2 ein Vesikelprotein ist, befinden sich Syntaxin 1A und SNAP-25A auf der Plasmamembran. SNAP-25A weicht nicht nur dadurch vom typischen Aufbau der SNAREs ab, dass es über zwei durch eine Linker-Region verbundene SNARE-Motive verfügt, sondern auch, weil es keine Transmembrandomäne hat und stattdessen über Palmitoyl-Reste in der Membran verankert ist [1]. Syntaxin 1A verfügt an seinem N-terminalen Ende über ein Bündel aus drei α -Helices. Diese so genannte H_{abc} -Domäne kann verschiedene Konformationen annehmen. In der geschlossenen Konformation bindet das Helix-Bündel an das SNARE-Motiv, so dass die Bildung des SNARE-Komplexes verhindert wird [46, 47].

Die SNARE-Proteine sind zwar essentiell für die neuronale Exozytose, aber nicht alleine für die Regulierung dieses hochkomplexen Vorgangs zuständig. Es gibt weitere

EINLEITUNG

Proteine, die dafür unabdingbar sind. So führt z.B. auch der *Knock-out* des SM-Proteins Munc-18-1 zum völligen Verlust der neuronalen Exozytose, obwohl sich das Nervensystem normal ausbildet [48]. Munc-18 bindet sowohl die geschlossene Form des Syntaxin 1A wie auch einen Heterodimer aus Syntaxin 1A und SNAP-25A [49-51]. Eine mögliche Aufgabe von Munc-18 könnte es deshalb sein, als eine Art Schablone für die Bildung des SNARE-Komplexes zu dienen [36]. Neuste Untersuchungen lassen vermuten, dass Munc-18 multiple Funktionen während des Fusionsprozesses übernimmt und z.B. auch am *Priming* der Vesikel beteiligt ist [52, 53].

Eine Bedeutung in der neuronalen Exozytose wurde auch für Munc-13 in *Knock-out*-Experimenten nachgewiesen [54]. Es bindet an den heterodimeren SNARE-Komplex aus Syntaxin 1A und SNAP-25A [50, 51] und an ein weiteres Protein der aktiven Zonen, RIM1 α (*Rab3 interacting molecule 1 α*). RIM1 α wurde zunächst als Rab3-Effektor-Protein identifiziert [55] und bildet mit Munc-13 und Rab3 einen Komplex, der wahrscheinlich *Priming* vermittelt und maßgeblich an der Steuerung der synaptischen Plastizität beteiligt ist [56, 57].

Wie bereits einleitend erklärt, ist die neuronale Exozytose Ca²⁺-abhängig. Eine zentrale Rolle, nämlich die des Ca²⁺-Rezeptors, nimmt deshalb das Vesikelprotein Synaptotagmin-1 ein. Ein *Knock-Out* von Synaptotagmin 1 in hippokampalen Neuronen aus der Maus oder an neuromuskulären Zellen aus *Drosophila* führt zu einem Verlust der synchronen Neurotransmitter-Freisetzung [58, 59]. Mutationen, die die Ca²⁺-Affinität des Synaptotagmins ändern, rufen analoge Änderungen in der Ca²⁺-Sensitivität der Neuronen hervor [60, 61]. Das Protein verfügt über zwei aus β -Faltblättern aufgebaute C₂-Domänen, die zwei bzw. drei Ca²⁺-Ionen binden können. Man geht davon aus, dass die Bindung der Ca²⁺-Ionen zu einer Wechselwirkung von Synaptotagmin mit sauren Phospholipiden und einem Eindringen des Proteins in die Membran führt [62]. Außerdem bindet Synaptotagmin Syntaxin 1A, SNAP-25A, Heterodimere der beiden Proteine und den ternären neuronalen SNARE-Komplex. Synaptotagmin 1 koppelt also das Ca²⁺-Signal mit der Membranfusion, indem es einerseits mit SNARE-Proteinen, andererseits mit Membranen in Ca²⁺-abhängiger Weise interagiert [63, 64]. Das Zusammenspiel von Synaptotagmin 1 und dem im nächsten Abschnitt beschriebenen Complexin ist noch ungeklärt.

1.2.2 Complexine

Die Geschwindigkeit und die Spezifität der neuronalen Exozytose werden nur durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen erreicht. Diese Proteine verfügen über vielfältige Bindungsstellen und können offensichtlich mehr als eine Funktion in der Regulation des Prozesses ausfüllen. Es ist deshalb unmöglich, ihnen ausschließlich eine inhibierende oder aktivierende Rolle zuzusprechen. Dies gilt insbesondere auch für das Complexin, das Gegenstand dieser Arbeit war und deshalb im Folgenden ausführlicher beschrieben werden soll.

Complexine, auch Synaphine genannt, sind eine kleine Familie von zytosolischen Proteinen mit vier Vertretern in Säugetieren [65, 66]. Ihre Struktur aus 134-160 Aminosäuren ist hochkonserviert, wobei die weiter verbreiteten Isoformen 1 und 2 zu 97% identisch sind. Die evolutionär älteren Isoformen 3 und 4 unterscheiden sich stärker untereinander, aber vor allem von den anderen beiden. Complexin 3 und 4 verfügen an ihrem C-Terminus über ein farnesyliertes CAAX-Motiv (einen typischen Membrananker), dass in Complexin 1 und 2 in Säugetieren verloren ging [67].

Complexine sind spezifisch für die neuronale Exozytose. Ihre Bedeutung wird anschaulich durch die Vielzahl von neurologischen und psychiatrischen Krankheiten verdeutlicht, die mit einem veränderten Expressionsniveau der Complexine einhergehen, wie z.B. Schizophrenie, Huntington, Parkinson und Alzheimer [68]. Interessanterweise konnte die Bedeutung der Complexine auch für einen ganz anderen Fusionsprozess nachgewiesen werden, der Fusion von Akrosomen [69]. Diese Organellen bilden eine Art Kappe am Kopf von Spermatozoiden und steuern das Eindringen in die Eizellen. Obwohl Complexin 1 und 2 in den Spermatozoiden exprimiert werden, schränkt nur ein Verlust von Complexin 1 die Fruchtbarkeit ein [70, 71]. In hippokampalen Neuronen können die beiden Homologen sich ersetzen [72]. Nur der Doppel-*Knock-Out* führt zum Phänotyp. Es kann durch Complexin 3 und 4 die Funktion von Complexin1/2- *Knock Out* -Zellen wiederhergestellt werden [66].

Die Deletion von Complexin in Neuronen zeigt einen dem *Knock-Out* von Synaptotagmin analogen Phänotyp [73]. Da Complexin aber über keine offensichtliche Ca^{2+} -Bindungsstelle verfügt, ist es unwahrscheinlich, dass es selbst als Ca^{2+} -Rezeptor fungiert, obwohl dies kürzlich aufgrund von Liposomen-Experimenten vorgeschlagen wurde [74]. Wahrscheinlicher ist, dass ein Zusammenspiel von Complexin und Synaptotagmin die Ca^{2+} -Sensitivität der neuronalen Exozytose ausmacht.

EINLEITUNG

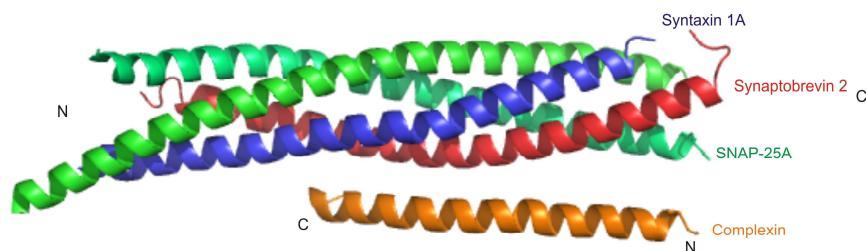


Abb. 1.3: Neuronaler SNARE-Komplex mit der zentralen Helix von Complexin.

Zu dem neuronalen SNARE-Komplex trägt SNAP-25A zwei Helices (Q_b und Q_c) und Syntaxin 1A (Q_a) und Synaptobrevin (R) jeweils eine Helix bei. Complexin bindet antiparallel an den SNARE-Komplex. Abbildung wurde aus den für [75] in der pdb-Datenbank hinterlegten Strukturdaten erstellt.

Complexin 1 bindet mit hoher Affinität an den *cis*-SNARE-Komplex (Abb. 1.3). Wie in NMR-Versuchen und in Experimenten mit den löslichen, fluoreszenzmarkierten Proteinen sowie durch Kristallstrukturen gezeigt wurde, bindet ein α -helikaler Mittelteil des Complexin 1 an den ternären neuronalen SNARE-Komplex. Die Bindung erfolgt in antiparalleler Richtung, und zwar zwischen der Helix des Syntaxin 1A und des Synaptobrevin 2 [75-78]. Complexin 1 bindet nicht an die monomeren SNARE-Proteine [76], während es zur Bindung an Heterodimere aus Syntaxin 1A und SNAP-25A widersprüchliche Ergebnisse gibt [50, 51, 76]. Seine Bindungsaffinität für den neuronalen SNARE-Komplex wurde sowohl über Anisotropie-Messungen an fluoreszenzmarkierten, löslichen Proteinen und isothermale Titrationskalorimetrie [77] als auch durch Einzelmolekül-Mikroskopie an in Membranen verankerten SNARE-Komplexen bestimmt [79]. Dabei ergab die Messung in Lösung deutlich kleinere K_D und größere k_{on} -Werte ($K_D \approx 10$ nM, $k_{on} \approx 5 \cdot 10^7$ M⁻¹ s⁻¹), als die Einzelmolekülmessungen ($K_D \approx 60$ nM, $k_{on} \approx 7 \cdot 10^6$ M⁻¹ s⁻¹).

Aufgrund der starken und spezifischen Bindung des Complexin an den neuronalen SNARE-Komplex ließe sich nun vermuten, dass es den Komplex stabilisierte und deswegen einen aktivierenden Einfluss auf die neuronale Exozytose hätte. Aus *in vivo* Untersuchungen an verschiedenen Typen von Neuronen und neuroendokrinen Zellen ergibt sich aber ein ganz anderes Bild [67]. Sowohl das Absenken der Complexin-Konzentration durch *Knock-Out* als auch die Erhöhung durch Überexpression beein-

KAPITEL 1.3

flussen diese beiden Arten der Ausschüttung unterschiedlich und in Abhängigkeit des Zelltyps. Ein *Knock-Out* führt in den meisten Zellen zu einer Verringerung der Anzahl bzw. der Amplitude der stimulierten und auch der spontanen Ausschüttungen. Dies wurde z.B. in hippokampalen glutamatergen Neuronen aus der Maus [80] und neuromuskulären Zellen aus *Drosophila* gezeigt [81]. Andererseits führte auch die Erhöhung der lokalen Complexin-Konzentration an der aktiven Zone durch die Expression eines Synaptobrevin-Complexin-Fusionsproteins zu einer Abschwächung von stimulierter und spontaner Ausschüttung in kortikalen Neuronen [73]. Dies deckt sich mit Untersuchungen in anderen Zelltypen, z.B. den neuroendokrinen Chromaffin-Zellen, in denen eine Überexpression von Complexin 1 zu einer Verkürzung der Neurotransmitter-Ausschüttung führte [82].

1.3 Rekonstitution der Membranfusion *in vitro*

Es ist praktisch unmöglich, die Rolle der einzelnen regulatorischen Proteine, wie auch den Einfluss von z.B. der Zusammensetzung der Membran und ihrer Krümmung aus *in vivo*-Experimenten abzuleiten. Es lassen sich zwar die Konzentrationen bestimmter Proteine in der Zelle wie oben beschrieben erhöhen oder verringern, die beobachteten Effekte können aber auch immer sekundärer Natur sein. Manche Parameter, wie z.B. die Membrankrümmung, lassen sich gar nicht beeinflussen. Um verschiedene Komponenten systematisch untersuchen zu können, muss man sie isolieren. Dies ist mit Assays möglich, die Membranfusionen in rekonstituierten Systemen nachstellen und so eine große Anzahl von experimentellen Variablen ermöglichen.

Am besten etabliert ist die Untersuchung der SNARE-vermittelten Fusion zwischen zwei Proteoliposomen, also künstlichen Vesikeln. Liposomen lassen sich über unterschiedliche Verfahren in verschiedenen Größen, d.h. mit variierender Membrankrümmung herstellen, und mit Membranproteinen rekonstituieren (siehe hierzu Kap. 2.1.4 und [83]).

Die SNARE-abhängige Fusion zwischen Proteoliposomen wurde umfassend charakterisiert und spiegelt wichtige Charakteristika der biologischen Membranfusion wieder:

- Die Fusionsreaktion zwischen Liposomen, die mit den neuronalen SNAREs rekonstituiert sind, kann durch Zugabe eines löslichen Synaptobrevin-Fragments oder von Botulinum Neurotoxin D inhibiert werden [20].

EINLEITUNG

- Die SNARE-vermittelte Fusion ist durch Lysophosphatidylcholin inhibierbar. Da Lysophospholipide eine positive Krümmung induzieren, ist dies ein Hinweis auf die Tatsache, dass die Fusion über ein Hemifusionsintermediat mit stark negativer Krümmung verläuft [84].
- Werden Q-SNARE-Proteoliposomen mit synaptischen Vesikeln, also natürlichen Membranen, fusioniert, so zeigt die Fusion die gleichen Charakteristika wie die Fusion zwischen zwei Proteoliposomen [85].
- Die Fusion früher Endosomen konnte in einem rekonstituierten System Rab- und SNARE-spezifisch nachgestellt werden [86].

Allerdings bleibt als zentraler Kritikpunkt bestehen, dass die rekonstituierte Fusion um Größenordnungen langsamer ist, als biologische Membranfusionen. In den ersten Arbeiten wurden die Proteoliposomen auf Eis präinkubiert, um die Bildung von *cis*-SNARE-Komplexen zu initiieren. Trotzdem war die Fusion nach 2 h noch nicht abgeschlossen. Bei der neuronalen Exozytose läuft die Fusion hingegen auf der Submillisekunden-Zeitskala ab (siehe Kap.1.2). Teilweise konnte die langsame Fusionsgeschwindigkeit auf die speziellen Konformationen zurückgeführt werden, die die isolierten SNARE-Proteine einnehmen, wenn sie in der Membran rekonstituiert sind. So liegen einige Syntaxine in der oben beschriebenen geschlossenen Form vor, in der die N-terminale H_{abc}-Domäne an das SNARE-Motiv bindet. Für das Hefe-Homolog Sso1p führt die Deletion der Domäne zu einer 2000fachen Beschleunigung der Komplexbildung [87]. Der Effekt auf die durch neuronale SNAREs vermittelte Fusion ist aber bedeutend kleiner und die Deletion der Domäne bewirkt nur eine zehnfache Beschleunigung der Bindung von Syntaxin 1A an SNAP-25A [47]. Wichtiger ist für die neuronalen SNAREs die Tatsache, dass die Q-SNAREs einen Komplex aus zwei Syntaxinen und den beiden SNARE-Motiven des SNAP-25A bilden können. Der SNARE-Komplex mit dem auf der anderen Membran rekonstituierten Synaptobrevin kann jedoch nur gebildet werden, wenn die Bindungsstelle zwischen SNAP-25A und Syntaxin 1A frei ist. Deshalb kann die Fusion um den Faktor 20 beschleunigt werden, wenn der Komplex aus den Q-SNAREs mit einem C-terminalen Fragment des Synaptobrevin (AS 49-96) stabilisiert wird [88, 89]. Dieses Fragment lässt die anfängliche Bindungsstelle des Synaptobrevins frei, verhindert aber die Bindung des zweiten Syntaxin-Motivs und bindet schwach genug um vom Wildtyp-Syntaxin aus dem Komplex verdrängt zu werden. In den meisten Fällen wird die Fusion über das Vermischen von fluoreszenzmarkierten Lipiden in den beiden Membranen beobachtet [20, 90]. Dabei werden Farbstoffe ver-

KAPITEL 1.3

wendet, zwischen denen Förster-Resonanz-Energietransfer stattfindet. Das FRET-Paar, meist NBD und Rhodamin Lissamin, befindet sich anfänglich in derselben Membran, wodurch die Fluoreszenzintensität des FRET-Donors erniedrigt ist. Durch die Fusion mit unmarkierten Liposomen vergrößert sich die Membranfläche und damit auch der Abstand zwischen den Fluorophoren. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der FRET-Effizienz, einem *Dequenching* des Donor-Fluorophors. Alternativ können die beiden FRET-Partner auch auf die beiden Membranen verteilt sein [29]. Dann führt die Fusion zu einem Absinken der Fluoreszenzintensität des Donor-Farbstoffes.

Von Membranfusion im biologischen Sinne kann nur gesprochen werden, wenn sich nicht nur die Lipide der beiden Membranen vermischen, sondern auch der luminaler Inhalt. Nicht immer ist dabei ein Vermischen der Lipide ein Hinweis auf vollständige Fusion. An Liposomen, die mit komplementären DNA-Fragmenten rekonstituiert waren, wurde gezeigt, dass es auch ein signifikantes Vermischen der Lipide geben kann, ohne dass sich die Lumina vermischen [91]. Während der Fusion muss außerdem gewährleistet sein, dass nichts von dem luminalen Inhalt nach außen tritt. Man spricht auch davon, dass die Membranintegrität während der Fusion erhalten bleiben muss. Dass Proteoliposomen durch die Vermittlung der SNARE-Proteine vollständig fusionieren und dabei Membranintegrität gewährleistet ist, kann aus folgenden Experimenten geschlossen werden:

- In EM-Untersuchungen ist eine deutliche Größenzunahme, jedoch nicht die Bildung von hemifusionierten Liposomen zu beobachten [92].
- Werden Q- und R-SNAREs an ihrem C-Terminus fluoreszenzmarkiert, so kann die Interaktion der C-Termini nach der Fusion über FRET nachgewiesen werden. Diese Interaktion ist nur möglich, wenn die Proteine nach der Fusion in derselben Membran vorliegen und einen *cis*-Komplex bilden [92].
- Eine vollständige Zerstörung der Liposomen während der Fusion kann aufgrund einer Untersuchung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden ausgeschlossen werden [93]. Diese zeigen das Vermischen der Lumina an, treten während der Fusion jedoch nicht aus. Da es sich um relativ große Moleküle handelt, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Poren kleiner als ihr Durchmesser bei der Fusion auftreten.

EINLEITUNG

- Auch in einer Studie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluoreszein als Marker für den Vesikelinhalt waren die Proteoliposomen über zwei Stunden stabil. Allerdings inhibierte der Farbstoff auch die Fusion [84]. Die Ergebnisse entkräften damit eine Untersuchung von Dennison et al., die zu dem Schluss kommt, dass bei hohen Proteindichten, ähnlich den in dieser Arbeit eingesetzten, die Fusion auf ein Zerreißen der Membran mit einer anschließenden Neubildung des Vesikels zurückzuführen ist [94].

Aus diesen Untersuchungen kann es deshalb als gesichert angesehen werden, dass die mit den hier verwendeten Methoden hergestellten Liposomen ihre Membranintegrität während des gesamten Experimentes aufrecht erhalten und dass der größte Teil der Liposomen eine vollständige Fusion durchläuft.

1.4 Detektion von Einzelpartikeln

In einer Ensemble-Messung geht ein Großteil an mechanistischen Informationen dadurch verloren, dass über alle Moleküle oder Partikel gemittelt wird. Ist es jedoch möglich, einzelne Partikel isoliert zu beobachten, so kann die Heterogenität einer Probe offengelegt, seltene oder metastabile Intermediate des Reaktionsweges erkannt und kinetische Messungen in Systemen vorgenommen werden, in denen nicht alle Moleküle synchronisiert sind [95].

Unter dem Begriff Einzelmolekül- oder Einzelpartikel-Detektion werden diverse Methoden zusammengefasst. Meistens handelt es sich um fluoreszenz- oder kraftmikroskopische Techniken, obwohl z.B. auch die Untersuchung einzelner Ionenkanäle mit der *Patch-Clamp*-Methode in der Elektrophysiologie als Einzelmolekül-Detektion verstanden werden kann. Der Schwerpunkt soll hier auf der Fluoreszenzmikroskopie liegen, die sich besonders für die Beobachtung von intermolekularen Wechselwirkungen eignet und in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand. Kraftmikroskopische Methoden, wie z.B. Rasterkraftmikroskopie und optische Fallen, werden hingegen bei der Untersuchung von Oberflächen bzw. der Bestimmung mechanischer Eigenschaften verwendet [96].

Grundsätzlich gilt: Sollen Partikel isoliert betrachtet werden, so muss ihre Anzahl niedrig und der Detektionsbereich klein gehalten werden. Für die Fluoreszenzmikroskopie

KAPITEL 1.4

wird meist ein Auflichtmikroskop verwendet. Das heißt, dass die Probe mit Hilfe des gleichen Objektivs mit Licht bestrahlt wird, mit dem auch das Fluoreszenzlicht gesammelt wird. Anregung und Detektion erfolgen von derselben Seite und die beiden Strahlen werden durch dichroitische Spiegel hinter dem Objektiv getrennt. Der mit einem solchen Epifluoreszenzmikroskop detektierte Bereich kann durch einen konfokalen Aufbau weiter eingeschränkt werden. Hier wird der Detektionsbereich durch eine Lochblende im Detektionsstrahl oder durch die Anwendung von Zweiphotonenanregung weiter begrenzt, so dass er nur wenige Femtoliter groß ist [97, 98]. Da die zu vermessenden Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegen, müssen die für Einzelpartikel-Detektion verwendeten Farbstoffe und Detektoren hohe Quantenausbeuten aufweisen. Typischerweise finden deshalb CCD-Kameras (*charge-coupled device cameras*) und APDs (*avalanche photodiodes*) als Detektoren Anwendung.

Im einfachsten Fall werden die fluoreszierenden Partikel in Lösung beobachtet, während sie durch den Detektionsbereich diffundieren. Das während ihres Transits aufgezeichnete Fluoreszenzsignal wird als Photonenburst bezeichnet. Grundsätzlich können für die einzelnen Fluorophore oder Partikel die gleichen Parameter wie in einer Ensemble-Messung bestimmt werden. So wird in der BIFL-Mikroskopie (*burst integrated fluorescence lifetime microscopy*) [99] die Fluoreszenzlebensdauer einzelner Fluorophore bestimmt. Mit der FIDA (*fluorescence intensity distribution analysis*) sind die Konzentrationen und die Helligkeit einzelner Partikel zugänglich [100]. In der FCS (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie) wird das Fluoreszenz-Signal zeitlich autokorreliert und es sind Konzentrationen und Diffusionskonstanten bestimmbar ([101], Kap. 2.2.3). Eine zweidimensionale Abbildung der Probe ist mit einem *Laser Scanning*-Mikroskop möglich. Hier wird entweder die Probe durch den Detektionsbereich gefahren, oder der Laserstrahl mit Hilfe von Spiegeln durch die Probe bewegt. Eine 100 bis 200 nm dicke Schicht kann auch mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie (*total internal reflection microscopy*) untersucht werden. Dabei wird ausgenutzt, dass bei einer Totalreflektion an einer Oberfläche ein Teil der elektromagnetischen Schwingungen in der Richtung des eintretenden Lichts als so genanntes evaneszentes Feld exponentiell weiter in die Probe eindringt. So können vor allem auf einer Oberfläche immobilisierte Proben untersucht werden [102].

Grundsätzlich ist bei allen lichtmikroskopischen Anwendungen die Auflösung durch das Gesetz von Abbé auf ca. 200 nm begrenzt. Das heißt, dass Moleküle oder Partikel,

EINLEITUNG

die kleiner als 200 nm sind, nicht einzeln aufgelöst werden können. Neuste hochauflösende Methoden konnten diese Grenze durchbrechen. In der STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*) wird der beugungsbegrenzte Bereich verkleinert, indem der punktförmige Anregungsstrahl mit einem ringförmigen STED-Strahl überlagert wird. Dieser führt zu einer stimulierten Emission der Fluorophore in den äußeren Teilen des beugungsbegrenzten Bereichs. So ist in Abhängigkeit der photophysikalischen Eigenschaften des eingesetzten Fluorophors eine Auflösung von bis zu 20 nm möglich [103, 104]. In der PALM (*photoactivable localization microscopy*) werden sequentiell immer nur einige wenige Fluorophore angeregt. Einzeln aufgenommene Bilder werden anschließend zu einem hochaufgelösten Gesamtbild zusammengesetzt, das eine Auflösung von bis zu 10 nm haben kann [105].

1.5 Beobachtung gedockter Membranen *in vitro*

Wichtige Einblicke in die neuronale Exozytose hat der oben beschriebene Assay geliefert, in dem die SNARE-Proteine in Liposomen rekonstituiert werden. Die Membranfusion wird als das Vermischen der Lipide der fluoreszenzmarkierten Liposomen gemessen [20, 90]. Die Geschwindigkeit, mit der sich die fusionierten Liposomen bilden, hängt aber nicht nur davon ab, wie schnell sich die Lipide mischen. Die beobachtete Fusionsgeschwindigkeit wird auch von dem Diffusionsverhalten der Liposomen beeinflusst, also davon wie schnell sie sich treffen. Ganz besonders entscheidend ist außerdem, wie schnell die Membranen einen stabilen Kontakt herstellen können, also docken, so dass die SNARE-Proteine miteinander interagieren können. Um diese einzelnen Schritte mechanistisch auflösen zu können, bedarf es Methoden, mit denen die vor der Fusion liegenden Schritte beobachtet werden können.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Versuche in dieser Richtung unternommen, die hier kurz vorgestellt werden sollen:

Fusion zwischen Liposom und immobilisiertem Liposom. Der große Nachteil des Liposomen-Assays liegt darin, dass die Fusion nur in Ensemble-Messungen verfolgt wird. Dadurch gehen wichtige Informationen über die einzelnen Zwischenstufen der Fusion verloren. Der Assay wurde deshalb so abgewandelt, dass eine mit Biotin-markierte Liposomen-Population auf einem mit PEG und Neutravidin beschichteten Quarzplättchen immobilisiert wird. Das Plättchen wird in einer Durchflusskammer

KAPITEL 1.5

platziert, in der sich die zweite Liposomen-Population in Lösung befindet. Die beiden Liposomen-Populationen sind mit den Fluorophoren DiI und DiD markiert, bei denen es sich um ein FRET-Paar handelt. Die Fusion einzelner Liposomen wird über die Fluoreszenzintensität mittels TIRF-Mikroskopie verfolgt. Nach dem Docken eines Liposoms aus der Lösung an ein immobilisiertes Liposom wurde eine Vielzahl von verschiedenen Fluoreszenz-Signalen beobachtet. Diese wurden von den Autoren auf unterschiedliche Fusionsintermediate, wie hemifusionierte Membranen und transiente Fusionsporen, zurückgeführt. Die Analysen beschränken sich jeweils auf wenige hundert Fluoreszenzspuren [14, 74]. Dies bedeutet bei der Vielfalt der beobachteten Fusionswege eine geringe statistische Aussagekraft.

Fusion zwischen Liposomen und planaren Membranen. Bezüglich der Membranspannung gibt die Fusion von zwei stark gekrümmten Liposomen die Situation bei der neuronalen Exozytose schlecht wider. Hier fusioniert ein Vesikel mit einer fast planaren Membran. Es wurden deshalb in der Vergangenheit Versuche unternommen, die SNARE-vermittelte Fusion in einem System aus Oberflächen-unterstützten Membranen und Vesikeln zu rekonstituieren. Die Fusion war jedoch entweder nicht SNARE-abhängig [15, 106, 107] oder benötigte Ca^{2+} -Ionen [108], was die Aussagekraft der Studien stark in Frage stellt. Erst in einer ganz aktuellen Arbeit gelang erstmals die SNARE-abhängige Fusion von Vesikeln mit planaren, unterstützten Membranen [109]. Grundsätzlich stellt sich die Frage, inwiefern die unterstützende Oberfläche die Eigenschaften der Membran verfälscht. Außerdem ist die „Rückseite“ der Membran experimentell nicht zugänglich. Klassische, zwischen zwei Fixpunkten frei hängenden Membranen, so genannte *black lipid membranes* (BLM), sind aber sehr instabil. Ein Ausweg könnten hier in Zukunft porenüberspannende Membranen bieten, die ähnliche physikalische Eigenschaften wie die BLMs aufweisen, aber sehr viel stabiler sind [110, 111].

Fusion zwischen zwei Zellen. Außerdem soll hier kurz ein Assay Erwähnung finden, das die SNARE-Proteine in einem natürlichen System rekonstituiert. Hier werden SNARE-Proteine auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran von kultivierten COS-, CHO- oder MEF-Zellen exprimiert [112, 113]. Mit verschiedenen Fluoreszenz-Markern können sowohl die Membran als auch der Zellkern und das Zytoplasma markiert werden. Nach einer Inkubation von t-SNARE- mit v-SNARE-exprimierenden Zellen sind diese Marker dann unterschiedlich verteilt, je nachdem, ob es zu vollständ-

EINLEITUNG

iger Fusion, Hemifusion oder transienter Fusion kam. Aufgrund der Größe der Zellen lässt sich die Verteilung der Farbstoffe leicht über Fluoreszenzmikroskopie beobachten. Bei den Membranen handelt es sich um natürliche Systeme. Allerdings haben sie in ihrer Zusammensetzung wenig mit der der aktiven Zonen der Synapse oder der des synaptischen Vesikels gemeinsam. Auch die Krümmung eines synaptischen Vesikels wird von der praktisch flachen Membran der Zellen nicht imitiert. Es ist kaum zu erwarten, dass die Zeitskala auf der die Fusion von zwei ganzen Zellen stattfindet, die der neuronalen Exozytose widerspiegelt. Zudem sind auf den Membranen die intrinsischen Membranproteine und Zucker der Zellen zu finden, wobei ungeklärt bleibt, wie diese evtl. spezifisch oder unspezifisch mit SNARE-Proteinen und den untersuchten Regulatoren interagieren. Die Aussagekraft des Assays bleibt also fraglich. Das zeigt sich auch in einer niedrigen Fusionseffizienz. Nach sechsständiger Inkubation haben nur 23 % der Zellen vollständig fusioniert.

1.6 Motivation der Arbeit

Die intrazelluläre Fusion von Membranen wird durch eine Vielzahl von Proteinen gesteuert und von den SNARE-Proteinen angetrieben. Ein komplexes Beispiel für eine intrazelluläre Membranfusion ist die neuronale Exozytose, die zur Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt führt. Sie wird von einer besonders großen Anzahl von Regulatoren kontrolliert. Obwohl die Forschung zum aktuellen Zeitpunkt noch weit von einem vollständigen Bild entfernt ist, wird vermutet, dass in der fein abgestimmten Steuerung der neuronalen Exozytose der Schlüssel für die Neuroplastizität und damit für das Lernen liegt. Daneben ist eine Aufklärung des Mechanismus von großer Bedeutung für das Verständnis und die gezielte Behandlung von neurologischen und psychiatrischen Krankheiten.

Die Erforschung der neuronalen Exozytose erfolgt mit sich ergänzenden Methoden. In Tiermodellen lässt sich die Morphologie von Nervengewebe von *Knock-Out*-Organismen beobachten. Einzelne Zellen aus transgenen Tieren werden elektrophysiologisch untersucht. Die Funktion einzelner Regulatoren wird in Protein-Interaktionsstudien auf molekularer Ebene erforscht. Um die rekombinanten Proteine in dem Kontext einer Membran zu untersuchen, werden sie in Liposomen rekonstituiert. Liposomen-Assays bieten die Möglichkeit, die Membranfusion unter kontrollierten Bedingun-

KAPITEL 1.6

gen ablaufen zu lassen und so einzelne Faktoren isoliert zu studieren. So lassen sich die Membranproteine, Membranzusammensetzung, Membrankrümmung und das umgebende Medium bestimmen. Die Fusion verläuft wahrscheinlich über mehrere bisher schlecht charakterisierte Intermediate. Bis jetzt wurde das Verschmelzen der Proteoliposomen meist über die Fluoreszenzintensität der sich vermischenden fluoreszenzmarkierten Lipide beobachtet. Die gemessene Fusionsgeschwindigkeit ist aber auch abhängig von den vor der Fusion liegenden Schritten, insbesondere von der Geschwindigkeit, mit der die Liposomen stabile Kontakte ausbilden können. Diese können mit dem herkömmlichen Ansatz aber nicht beobachtet werden.

In dieser Arbeit sollte deshalb der Liposomen-Assay durch Einzelpartikeldetektion so weiterentwickelt werden, dass der vor der Fusion liegende Schritt, das Docking der Liposomen, detektiert werden kann. Ziel war es, die Bildung der einzelnen Intermediate (frei, gedockt, fusioniert, mehrfach fusioniert) quantitativ zu verfolgen und eine genaue Charakterisierung des Mechanismus der Liposomenfusion vorzunehmen. Nur ein grundlegendes Verständnis dieses Mechanismus erlaubt es, den Einfluss von wichtigen Regulatoren der neuronalen Exozytose auf die Fusionsintermediate der Liposomenfusion aufzuschlüsseln und daraus Schlussfolgerungen für die biologische Membranfusion zu ziehen. Complexin ist eines der Schlüsselproteine der neuronalen Exozytose, aber bisher noch unvollständig verstanden. Die Untersuchung des Einfluss dieses Proteins auf die Fusion von Liposomen war Ziel des zweiten Teils der Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.1 Material

Standardchemikalien von analytischem Reinheitsgrad wurden von den Firmen Biorad, Sigma, Merck, Roth, Serva, Boehringer und Fluka bezogen. Detergenzien kamen von Anatrace (CHAPS), Glycon (Octyl- β -D-glucoopyranosid) oder Sigma (Natriumcholat). Lipide waren von Avanti Polar Lipids mit Ausnahme von Oregon Green-PE und Texas Red-PE, die von Invitrogen/ Molecular Probes bezogen wurden.

Die verwendeten Vektoren (pET28a und pET-Duet-1) stammten von Novagen. Die zur Klonierung verwendeten Reagenzien (Pfu-Polymerase, Restriktionsendonucleasen, T4 Ligase und alkalische Phosphatase) waren von New England Biolabs. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Kits von Machery&Nagel verwendet. Die Klonierungen wurden im *E. coli*-Stamm XL1-Blue von Stratagene durchgeführt, die Proteinexpressionen im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) von Novagen.

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte stammten alle aus *rattus norvegicus* und sind in Tab. 2.1 zusammengefasst. Die Klonierung wurde nach Standardprotokollen der Molekularbiologie durchgeführt [114] und ist den meisten Fällen bereits beschrieben worden (siehe Tab. 2.1). Die Expression der hier erstmals beschriebenen Complexin 2-Mutanten erfolgte analog zu [77]. Ein Teil der Konstrukte und/ oder Proteine wurde freundlicherweise von Dr. Alexander Stein und Ursel Ries zur Verfügung gestellt.

KAPITEL 2.1

Protein	Aminosäuresequenz	Vektor	Restriktionsenzyme	Beschreibung
Hergestellte Konstrukte:				
Complexin 2	1-83	pET28a	NdeI/XhoI	in dieser Arbeit
	26-83	pET28a	NdeI/XhoI	in dieser Arbeit
	26-134	pET28a	NdeI/XhoI	in dieser Arbeit
	K69AY70A	pET28a	NdeI/XhoI	in dieser Arbeit
Zur Verfügung gestellte Konstrukte:				
SNAP-25A	1-206, C84,85,90,92S	pET28a	NheI/XhoI	[115]
Synaptobrevin 2	1-96	pET28a	NdeI/XhoI	[116]
ΔN-Komplex	Syntaxin 1A: 183-288	pET Duet-1	NcoI/HindII	[117]
	Synaptobrevin 2: 49-96		NdeI/XhoI	
Konstrukte von zur Verfügung gestellten Proteinen:				
Syntaxin 1A	183-288	pET28a	NdeI/XhoI	[92]
Synaptobrevin 2	1-116	pET28a	NdeI/XhoI	[117]
Complexin 1	1-134	pET28a	NdeI/XhoI	[77]
Complexin 2	1-134	pET28a	NdeI/XhoI	[77]
	1-69	pGEX-KG	EcoRI/BamHI	[76]
	21-97	pGEX-KG	EcoRI/BamHI	[76]
	41-97	pGEX-KG	EcoRI/BamHI	[76]
	70-134	pGEX-KG	EcoRI/BamHI	[76]
	21-117	pGEX-KG	EcoRI/BamHI	[76]

Tab. 2.1: DNA-Konstrukte zu in den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen.

2.1.2 Expression und Reinigung von Proteinen

Die Proteine wurden nach in der Abteilung Neurobiologie etablierten Protokollen hergestellt [77, 115-117]. Für die Expression wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten Vektoren durch Elektrottransformation in die Zellen des Stammes *E. coli* BL 21 (DE3) eingebracht und die Zellen anschließend auf einer Agarplatte vereinzelt. Als Startkultur wurde eine einzelne Kolonie über Nacht bei 37°C in 100 ml LB-Medium mit 40µg/ml Kanamycin geschüttelt (180 rpm). Diese Startkultur wurde 1:30 in TB-Medium/40µg/ml Kanamycin verdünnt und für 3-4 h inkubiert, bis die optische Dichte bei 600

MATERIAL UND METHODEN

nm ca. 1.0 betrug. Die Expression wurde dann mit 500 μ M IPTG induziert. Nach vierstündiger Expression wurden die Zellen sedimentiert, in Extraktionspuffer (1 ml pro 30 ml Bakterienkultur, 20 mM Tris, pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Die aufgetauten Zellen wurden mit 1 mg/ml Lysozym, 1 mM PMSF, 1 mM MgCl_2 und einer Spatelspitze DNaseI versetzt und für 30 min bei 4°C (oder 15 min bei RT) auf einem Rollinkubator aufgeschlossen. Bei Proteinen mit Transmembrandomäne wurde außerdem nochmal das gleiche Volumen Extraktionspuffer mit 10 % (w/v) Natriumcholeat zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen 4 Mal 30 s durch Ultraschall zertrümmert. Proteine, die zur Bildung von Einschlusskörpern neigen (SNAP-25A, Δ N-Komplex, Synaptobrevin 2) wurden anschließend zusätzlich mit 4 M Harnstoff inkubiert (RT, 15 min). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden dann in zwei Zentrifugationsschritten (1. 30 min, 4°C , 11000 x g, Rotor SLA-1500, 2. 30 min, 4°C , 14000 x g, Rotor SS34) abgetrennt.

Alle Proteine wurden mit einem Hexa-Histidin (His_6)-tag exprimiert [118] und konnten deshalb über eine Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigt werden. Dabei wurden alle Schritte bei 4°C bzw. auf Eis ausgeführt. Zum Binden der His_6 -tag-Proteine an das Säulenmaterial wurde der klare Überstand aus dem Zellaufschluss mit 6 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose pro 200 ml Extraktionspuffer versetzt und 2 h auf dem Rollinkubator inkubiert. Das beladene Säulenmaterial wurde durch Filtration vom Bakterienlysat abgetrennt und mit mindestens 200 ml Waschlösung (20mM Tris, pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution mit 20 mM Tris/ 500 mM NaCl/ 400 mM Imidazol/ pH = 7.4 erfolgte in 2 ml Schritten und wurde über einen Bradford-Proteintest verfolgt. Für den Δ N-Komplex enthielt der Waschlösung zusätzlich 2% CHAPS und der Elutionspuffer 3 % CHAPS. Bei Proteinen, deren Sequenz ein Cystein enthielt, wurde direkt nach der Elution 1 mM DTT zugegeben.

Die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen wurden zur Entfernung des His_6 -tags mit 1 μ l/ml Thrombin (5 mg/ml in 5% (w/v) Glycerin) versetzt und über Nacht gegen den für die folgende Ionenaustausch-Chromatographie verwendeten Puffer dialysiert. Die vollständige Entfernung des His_6 -tags wurde durch SDS-PAGE überprüft. Die einzelnen Proteine wurden folgendermaßen weiter aufgereinigt:

KAPITEL 2.1

- Die Complexin 2-Mutanten 1-83, 26-134 und K69AY70A wurden gegen 20 mM Tris/ 1 mM DTT/ 1 mM EDTA/ pH = 8 (Puffer A) dialysiert und über eine Mono Q-Säule (Anionenaustauscher, Pharmacia/ GE Healthcare) aufgereinigt, wobei Puffer B 1 M NaCl enthielt. Anschließend wurden die Proteine durch eine Gelfiltration über eine Superdex-75-Säule (Pharmacia/ GE Healthcare) in den für die Liposomenpräparation verwendeten Puffer überführt.
- Das Fragment Complexin 2 26-83 wurde gegen 20 mM Tris/ 1 mM EDTA/ pH = 6 (Puffer A) dialysiert und über eine MonoS-Säule (Kationenaustauscher, Pharmacia/ GE Healthcare) aufgereinigt, wobei Puffer B 1 M NaCl enthielt. Das Protein wurde über eine PD-10-Säule (Pharmacia/ GE Healthcare) in den für die Liposomenpräparation benötigten Puffer überführt.
- SNAP-25A (alle Cysteine mutiert zu Serinen) wurde gegen 20 mM Hepes/ 50 mM NaCl/ 1mM EDTA (Puffer A) dialysiert und über eine MonoQ-Säule gereinigt. Puffer B enthielt 1 M NaCl.
- Der Δ N-Komplex wurde gegen 20 mM Hepes/ 500 mM NaCl/ 2 % CHAPS/ 1 mM EDTA/ 1mM DTT/ pH = 7.4 dialysiert, die Leitfähigkeit auf 25 mS/ cm eingestellt und der Komplex über eine MonoQ-Säule gereinigt. Puffer A enthielt hierbei 250 mM NaCl und Puffer B 1M NaCl.

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde ein Äkta-System (Pharmacia/ GE Healthcare) verwendet. Die Elution erfolgte bei einem linearen Salzgradienten. Das Ergebnis der einzelnen Reinigungsschritte wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung überprüft. Reine Fraktionen wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.3 Herstellung des ternären SNARE-Komplex

Zur Herstellung eines ternären SNARE-Komplexes, der drei vollständige SNARE-Motive enthielt, wurden Syntaxin 1A 183-288, SNAP-25A 1-206 und Synaptobrevin 2 1-116 im Verhältnis 1: 1.5 : 1.5 in der Gegenwart von 50 mM Octylglucosid gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Monomere wurden durch Anionenaustausch über eine MonoQ-Säule vom Komplex abgetrennt. Die Leitfähigkeit der Proteinlösung wurde hierzu auf 21 mS eingestellt. Puffer A enthielt 20 mM Tris/ 1 mM EDTA/ 1 mM

MATERIAL UND METHODEN

DTT/ 50 mM Octylglucosid (pH = 8.5), Puffer B zusätzlich 1 M NaCl. Über eine PD-10-Säule wurde der Komplex in den für die Liposomenpräparation verwendeten Puffer (20 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM DTT) überführt, der zusätzlich 2 % CHAPS enthielt.

2.1.4 Herstellung von Liposomen

In dieser Arbeit wurden unilamellare Proteoliposomen nach zwei verschiedenen Protokollen hergestellt:

- Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 30 nm wurden hergestellt, indem einem Gemisch aus Lipiden und Proteinen in mizellärer Lösung über eine Gelfiltration das Detergens entzogen wurden [119].
- Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 100 nm wurden hergestellt, indem zunächst proteinfreie Liposomen erzeugt wurden. In diese können Membranproteine rekonstituiert werden, wenn die Membran durch den Einsatz einer genau definierten Menge Detergens zwischenzeitlich destabilisiert wird [83].

2.1.4.1 Herstellung kleinerer Proteoliposomen (30 nm Durchmesser)

Für die Herstellung der Proteoliposomen durch Entfernung des Detergens wurden Lipid-Stammlösungen bereit gehalten. Zu ihrer Herstellung wurden die lyophilisierten Lipide (Avanti Polar Lipids und Molecular Probes/ Invitrogen) zunächst in Chloroform / Methanol (2:1) aufgenommen und im gewünschten Molverhältnis gemischt. Die Standardmischung enthielt 5 Teile Phosphatidylcholin (PC), 2 Teile Phosphatidylethanolamin (PE), 1 Teil Phosphatidylserin (PS), 1 Teil Phosphatidylinositol (PI) und 1 Teil Cholesterin. Bei den Phospholipiden handelte es sich um Extrakte aus Rinderhirn mit gemischten Fettsäureresten und die Zusammensetzung wurde so gewählt, dass sie in etwa der Lipidzusammensetzung synaptischer Vesikel entsprach [120]. PI war bei einigen Experimenten nicht enthalten, was keine Auswirkung auf die Ergebnisse hatte. Zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten Membranen wurde ein Teil des PE durch das entsprechend markierte PE-Derivat ersetzt. Das Gemisch wurde unter Stickstoff getrocknet, der Lipidfilm mit Hilfe von Ultraschall in Puffer gelöst (20 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % (w/v) Natriumcholat) und über Nacht bei 4°C inkubiert, so dass

KAPITEL 2.1

die Lipid-Lösung eine Konzentration von 13.5 mM Gesamtlipid hatte. Die Stammlösung wurde schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung der Liposomen wurden 50 µL der Lipid-Stammlösung mit 50 µL Proteinlösung gemischt, so dass sich ein Konzentrationsverhältnis von ca. 1:200-300 von Proteinen zu Lipiden ergab. Aggregate und Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Liposomen wurden durch Entfernung des Detergens über eine PC 3.2/10 Fast Desalting Säule in einem SMART-System (beides Pharmacia/ GE Healthcare) gebildet. Die Säule war mit 20 mM HEPES/ 150 mM KCl/ 1 mM DTT/ pH = 7.4 equilibriert. Die Liposomen wurden bei einer konstanten Flussrate von 50 µl/min in einem Volumen von 100 µl aufgefangen.

2.1.4.2 Herstellung größerer Proteoliposomen (100 nm Durchmesser)

Die Herstellung der größeren Liposomen erfolgte nach einem von Matias Hernandez (Abt. Neurobiologie) optimierten Protokoll. Die in Chloroform/ Methanol (2:1) gelösten Lipide wurden jeweils direkt gemischt und in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Die Zusammensetzung der Lipide war analog zu der der kleineren Liposomen. Der Lipidfilm wurde in einem Gemisch aus drei Teilen Diethylether gelöst und mit einem Teil Puffer (20 mM HEPES/ 150 mM KCl/ 1 mM DTT/ 1 mM EDTA/ pH = 7.4) versetzt. Dann wurde das Gemisch dreimal für 45 s mit einer Ultraschallsonde beschallt. Aus der so entstandenen Emulsion wurde der Diethylether am Rotationsverdampfer entfernt. Die in Lösung zurückbleibenden multilamellaren Vesikel wurden in zwei Extrusionsschritten in unilamellare überführt, indem die Liposomen zunächst mit Hilfe eines Extruders (Avanti Polar Lipid) 25 Mal durch eine Polycarbonatmembran von 400 µm Durchmesser, dann durch eine Membran von 100 µm Durchmesser gedrückt wurden. Zur Rekonstitution der Proteine wurden die Liposomen mit den Proteinen gemischt und so viel Octylglucosid zugesetzt, dass das Konzentrationsverhältnis Detergens/ freies Lipid 2.0 betrug. Dabei ist die kritische Mizellenkonzentration des Detergens bei der Berechnung des tatsächlich verfügbaren Detergens einzubeziehen. Das Gemisch wurde in einer Dialysekammer (Porendurchmesser der Membran:2000 MWCO, Thermo Scientific) gegen Hepes 20 mM/ KCl 150 mM/ DTT 1mM/ EDTA 1mM/ pH = 7.4 über Nacht dialysiert. Zur Bindung des Detergens wurde ein Löffel Biobeads (SM-2, Biorad) zugesetzt. Am folgenden Tag wurde eine weitere Dialyse ohne Zusatz der Biobeads durchgeführt.

2.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit von Proteinen wurde die Gelelektrophorese nach Schägger durchgeführt [121]. Die Konzentration des Acrylamids betrug 15 % (w/v). Zum Anfärben der Proteine wurden die Acrylamid-Gele kurz in der Mikrowelle in der Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka) in 50%(v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) erhitzt. Nach 5 min wurden sie zunächst für 15 min in 50% (v/v) Ethanol/ 10% (v/v) Essigsäure und dann zwei Tage in 10% (v/v) Ethanol/ 5% (v/v) Essigsäure auf dem Schüttler entfärbt.

2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch über die Extinktion bei 280 nm bestimmt und mit denen bei SwissProt angegebenen Extinktionskoeffizienten berechnet [122-124]. Die Messung wurde in einer 120 µl Küvette (Weglänge 1 cm) mit einem Standard-UV-Spektrometer (Shimadzu UV-2601) oder mit einem Nonodrop-Spektrometer 1000 (Probenvolumen 2 µL, Thermo Scientific) vorgenommen. Alternativ wurden die Konzentrationen mit kommerziellen Kits nach Bradford (Biorad) oder mit der BCA-Methode (Pierce) bestimmt [125, 126].

2.2 Physikalische Methoden

2.2.1 Konfokale Messapparatur

Photonenburst- und FCS-Messungen wurden an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt (Abb. 2.1) [127]. Zur Anregung wurde ein selbstgebauter Titan:Saphir-Laser im gepulsten Modus (Zentralwellenlänge 790 nm, 90 MHz, 100 fs, 250 mW) verwendet, der mit einem kontinuierlichen Laser des Typs Verdi ($\lambda = 532$ nm, 5 W, Coherent) gepumpt wurde. Die Leistung wurde durch ein Filterrad auf 30 -50 mW abgeschwächt. Der über ein Teleskop aufgeweitete Anregungsstrahl wurde über einen dichroitischen Spiegel (715 DCSPXR, AHF Analysetechnik) von unten in ein hochauflösendes Mikroskopobjektiv (Uplan Apo Wasserimmersion, 40x/ 1.15, Olympus) reflektiert, auf dem sich ein Deckglas mit der Probe befand.

KAPITEL 2.2

Das durch einen Interferenzfilter (E700sp-2p, AHF Analystechnik) von Streulicht gereinigte Fluoreszenzlicht wurde von dem dichroitischen Spiegel transmittiert und durch ein System aus einer speziellen Tubuslinsen-System kollimiert. Ein zweiter dichroitischer Spiegel (590DCXR, AHF Analystechnik) trennte das Fluoreszenzlicht spektral auf. Mit Hilfe einer weiteren Linse (Achromat, $f = 100 \text{ mm}$) wurden die Strahlen auf zwei Detektoren (Avalanche-Photodioden AQR-13, Perkin Elmer) fokussiert und durch entsprechende Interferenzfilter gereinigt (grün: HQ535/ 50, rot: HQ645/ 70, AHF Analystechnik, Tübingen). Die Messsignale von beiden Detektoren wurden gleichzeitig über einen Router (PRT400, Picoquant GmbH) vom Einzelphotonenzählwerk Time Harp 200 (Picoquant GmbH) aufgezeichnet.

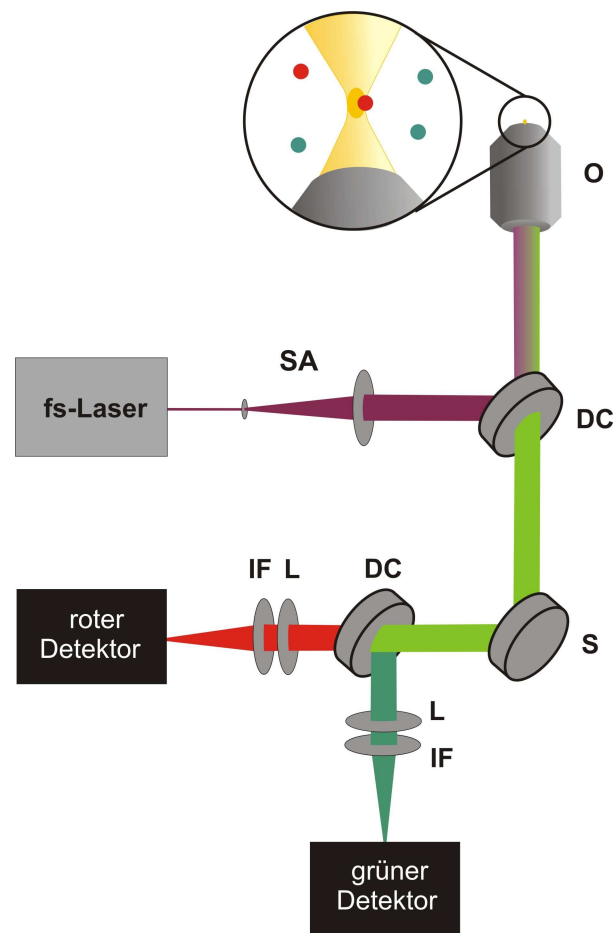


Abb. 2.1: Konfokale Messapparatur. Lichtquelle für die Anregung ist ein Femtosekunden-Laser. Ein konfokales Mikroskop fokussiert das Anregungslicht auf die Probe und sammelt gleichzeitig das emittierte Fluoreszenzlicht, das auf die Detektoren gelenkt wird. SA: Strahlaufweitung, DC: Dichroitischer Spiegel, O: Mikroskopobjektiv, P: Deckglas mit Proben tropfen, S: Spiegel, L: Linse, IF: Interferenzfilter.

2.2.2 Photonenburst-Analyse

Ist die Probe stark genug verdünnt, so können mit dem oben beschriebenen Aufbau Durchgänge einzelner fluoreszierender Teilchen durch den Fokus verfolgt werden. Man beobachtet eine Gaußsche Verteilung der Anzahl der Photonen über die Zeit des Durchgangs. Dieses Signal nennt man einen Photonenburst (Abb. 2.2).

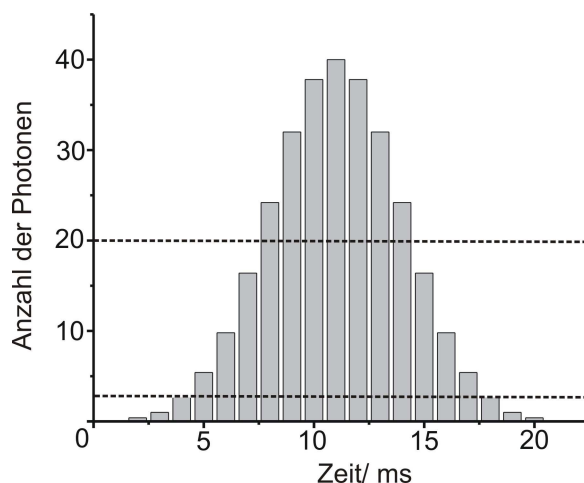


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Photonenbursts. Das Histogramm ergibt sich durch das Aufsummieren der gezählten Photonen in Intervallen von 1 ms. Die gestrichelten Linien markieren den Schwellenwert zur Erkennung von Dunkelrauschen und den Grenzwert für die Mindesthöhe des Photonenbursts.

Für die Detektion von Photonenbursts wurde die Probe auf etwa 0.1 Teilchen pro Fokalvolumen verdünnt, so dass die Wahrscheinlichkeit mehrere Teilchen gleichzeitig zu beobachten gering war. Die Zeitspur, die man für eine solche Probe misst, besteht größtenteils aus Dunkelrauschen, nur an einzelnen Stellen treten Photonenbursts auf. Es müssen deshalb zunächst die Bereiche ausgewählt werden, in denen sich ein Teilchen in dem Detektionsbereich befunden hat und die für die Auswertung interessant sind. Es wurden hierzu zunächst die gezählten Photonen in 1 ms Intervallen in einem Histogramm aufsummiert und die so erhaltene Zeitspur geglättet. In dieser Zeitspur wurden alle Bereiche ausgewählt, die über einem für die Messung spezifischen Schwellenwert lagen, der das Dunkelrauschen berücksichtigte. Die ausgewählten Bereiche wurden jedoch nur dann als Photonenburst gewertet, wenn die Anzahl der Photonen in dem ausgewählten Bereich mindestens 200 und die Höhe des Photonenbursts mindestens 20 Photonen betrug. Für Proben, die verschieden markierte Liposomen enthielten, wurde

KAPITEL 2.2

zunächst die beschriebene Bursterkennung für die Zeitspuren jedes Detektors einzeln durchgeführt und dann analysiert, ob die detektierten Bereiche überlappten, d.h. ob die Photonenbursts auf beiden Detektoren zeitlich korreliert waren. Für korrelierte Photonenbursts wurde dann das Verhältnis der Photonen auf beiden Detektoren berechnet. Eine ausführliche Beschreibung der Software sowie ihr Quellcode befinden sich in [128].

2.2.3 Fluoreszenz-(Kreuz)-Korrelations-Spektroskopie

Mit herkömmlichen spektroskopischen Methoden beobachtet man ein Ensemble von Molekülen, dabei stellt der Messwert einen Mittelwert für alle Moleküle dar. Viele auf mikroskopischer Ebene ablaufende Prozesse gehen dabei in der Gesamtheit unter und sind nicht zu beobachten. In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie werden anstelle der Gesamtintensität des emittierten Lichts die zeitlichen Schwankungen der Intensität beobachtet [129-131]. Es sind damit alle physikalischen Parameter zugänglich, die eine Fluktuation, also eine Abweichung vom thermodynamischen Gleichgewicht, hervorrufen. Die Fluktuationen können auf ganz verschiedenen Zeitskalen, von Nanosekunden bis Sekunden ablaufen. Sie können durch ganz verschiedene Prozesse hervorgerufen werden, z.B.:

- Förster-Resonanz-Energie-Transfer zwischen zwei Fluorophoren [132, 133]
- die Besetzung von Triplettzuständen [134-136]
- Rotationsdiffusion [137] oder translatale Diffusion [131] des fluoreszierenden Teilchens
- Reaktionen und chemische Wechselwirkungen zwischen mehreren Teilchen [101, 127, 138, 139]

Die Verwendung von zwei oder mehr Detektoren ermöglicht eine Kreuzkorrelation (Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie, FCCS) und die Detektion von Interaktionen zweier mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Moleküle oder Teilchen [140-142].

Da die relativen Schwankungen des Messsignals mit steigender Anzahl der Moleküle kleiner werden, müssen möglichst kleine Konzentrationen der zu bestimmenden Spezies

MATERIAL UND METHODEN

eingesetzt werden und der Detektionsbereich muss stark begrenzt sein. Durchschnittlich können nicht mehr als ca. 1 bis 100 Teilchen gleichzeitig detektiert werden. Das bedeutet, dass bei subnanomolare Konzentrationen ein Detektionsvolumen von ca. 1 fL erforderlich ist. Der Durchbruch für die FCS kam deshalb erst durch den Einsatz von konfokalen Mikroskopen [98]. Eine weitere Begrenzung des Detektionsbereiches in der Ebene kann entweder durch ein *Pinhole* oder, wie in dieser Arbeit, durch die Anwendung von Zwei-Photonen-Anregung erzielt werden [143, 144]. Bei der Zwei-Photonen-Anregung erfolgt die Anhebung des Moleküls in den S_1 -Zustand durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen, deren Energien in der Summe der Energie des Übergangs entsprechen. Die Fluoreszenzintensität (Gl.[2.1]) verhält sich dabei proportional zum Quadrat der Anregungsintensität:

$$F(t) \propto I^2 \quad [2.1] \quad .$$

Die quadratische Abhängigkeit führt dazu, dass die Laserintensität selbst eines gepulsten Lasers nur in einem sehr eng begrenzten Bereich ausreichend groß ist, um die Fluoreszenz anzuregen. Nach außen hin fällt die Intensität sowohl in horizontaler wie auch in axialer Richtung stark ab. Weitere Vorteile der Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der Ein-Photonen-Anregung in der FCS sind die leichtere Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenz, die für biologische Systeme weniger schädliche Wellenlänge des Anregungslichts im IR-Bereich und der kleinere Bereich, in dem *Photobleaching* auftreten kann [145, 146].

Aus der Blauverschiebung des Absorptionsmaximum bei Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der doppelten Wellenlänge des Ein-Photonen-Absorptionsmaximums [147] ergibt sich außerdem ein Vorteil für die FCCS. Für die Kreuzkorrelation müssen bei Ein-Photonen-Anregung zwei Laser verschiedener Wellenlänge auf das exakt gleiche Anregungsvolumen justiert werden. Es gibt hier keine zwei Farbstoffe, die bei der gleichen Wellenlänge absorbieren, deren Emissionsspektren jedoch ausreichend weit getrennt sind, um sie einzeln zu detektieren. Aufgrund der Verschiebung ihrer Absorptionsspektren können für Zwei-Photonen-Anregung hingegen geeignete Farbstoffpaare gefunden werden [148].

Die Stärke und Dauer der Schwankungen, die im Messsignal durch die Teilchen in dem begrenzten Detektionsbereich hervorgerufen werden, werden durch Autokorrelation quantifiziert. Es wird ein Messwert zur Zeit t mit dem Messwert zur Zeit $(t+\tau)$ vergli-

KAPITEL 2.2

chen (Gl. [2.2]). Die Autokorrelation der Messwerte liefert ein Maß für die Ähnlichkeit, die das Signal über eine bestimmte Zeit mit sich selbst aufweist. Informationen die sich daraus ergeben sind die Teilchenzahl und die Diffusionszeit und damit auch Teilchengröße und -helligkeit. Genauso können die Signale zweier Detektoren durch Kreuzkorrelation miteinander verglichen werden, woraus sich der Anteil an verschiedenen markierten Teilchen ergibt, die miteinander interagieren.

2.2.3.1 Autokorrelation

Für FCS-Messungen wurden die Proben in dem entsprechenden Probenpuffer so verdünnt, dass die Teilchenzahl bei ca. 1-100 Teilchen pro Fokalvolumen lag und die Zählrate $5 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^5$ Photonen pro Sekunde betrug. Die von den Photodetektoren aufgezeichneten Zeitspuren wurden in $5 \mu\text{s}$ Intervallen aufsummiert und jeweils nach Gleichung [2.2] autokorreliert [101, 130]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad [2.2] \quad ,$$

wobei $G(\tau)$ die Autokorrelations-Amplitude zur Korrelationszeit τ und $F(t)$ bzw. $F(t+\tau)$ die Photonenzählrate zur Zeit t sind. $\langle F(t) \rangle$ ist der Mittelwert des Fluoreszenzsignals für alle Zeiten 0 bis T einer Messung und $\delta F(t)$ ist die Abweichung des Fluoreszenzsignals vom Mittelwert zum Zeitpunkt t :

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad [2.3] \quad ,$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad [2.4] \quad .$$

Für die frei diffundierende Liposomen wurde dreidimensionale Brownsche Bewegung angenommen und die Autokorrelationskurve mit der folgenden Gleichung gefittet [101]:

$$G(\tau) = G_0 \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + z^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad [2.5] \quad .$$

Freie Variablen beim Fitten waren G_0 , die Amplitude der Autokorrelationskurve bei der Korrelationszeit $\tau = 0$, und die Diffusionszeit τ_D , die der mittleren Zeit entspricht, die ein Liposom benötigt, um durch das Fokalvolumen zu diffundieren. Der Größenparameter z , der die Geometrie des Fokalvolumens beschreibt, wurde auf 0.25 festgesetzt.

Für eine steigende Anzahl von fluoreszierenden Partikel werden die Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität relativ gesehen kleiner. Es sinkt deshalb die Autokorrelationsamplitude. Die Teilchenzahl N einer fluoreszierenden Spezies konnte deshalb aus dem Kehrwert der Autokorrelationsamplitude G_0 berechnet werden [101]:

$$N = \frac{1}{G_0} \quad [2.6] \quad .$$

Die Helligkeit ε eines Liposoms, also die Photonen pro Sekunde und Teilchen, wurde aus der Gesamtzählrate eines Detektors Q und der Teilchenzahl N berechnet:

$$\varepsilon = \frac{Q}{N} \quad [2.7] \quad .$$

2.2.3.2 Kreuzkorrelation

Zur Bestimmung der Anzahl von doppeltmarkierten Liposomen wurden die Signale von grünem und rotem Detektor nach Gleichung [2.8] kreuzkorreliert [101, 140]:

$$G_{RG}(\tau) = \frac{\langle \delta F_G(t) \cdot \delta F_R(t + \tau) \rangle}{\langle F_G \rangle \cdot \langle F_R \rangle} \quad [2.8] \quad .$$

$G_{RG}(\tau)$ ist die Kreuzkorrelationsamplitude und $F_G(t)$ und $F_R(t)$ sind die Photonenzählraten des grünen und roten Detektors. Die Kreuzkorrelationskurven wurden ebenfalls mit Gleichung [2.5] gefittet. Der Zusammenhang zwischen der Kreuzkorrelationsamplitude

KAPITEL 2.2

und der Anzahl doppelmarkierter Teilchen ist in diesem Fall jedoch komplizierter. Aus Gleichung [2.8] ergibt sich [141]:

$$G_{\text{RG},0} = \frac{N_{\text{RG}}}{(N_{\text{G}} + N_{\text{RG}}) \cdot (N_{\text{R}} + N_{\text{RG}})} \quad [2.9] \quad .$$

$(N_{\text{G}} + N_{\text{RG}})$ ist die Gesamtzahl aller einfach (N_{G}) - und doppelmarkierten (N_{RG}) grünen Teilchen und $(N_{\text{R}} + N_{\text{RG}})$ ist die Gesamtzahl aller roten Teilchen, die sich ebenfalls aus der Anzahl der einfachmarkierten roten (N_{R}) und doppelmarkierten (N_{RG}) Teilchen zusammensetzt. Diese Zahlen konnten aus der Autokorrelationsamplitude ($G_{\text{G},0}$ und $G_{\text{R},0}$) bestimmt werden (siehe Kap. 2.2.3.1, Gl. [2.6]). Gleichung [2.9] lässt sich umformen in:

$$G_{\text{RG},0} = N_{\text{RG}} \cdot G_{\text{G},0} \cdot G_{\text{R},0} \quad [2.10] \quad .$$

Die Zahl der doppelmarkierten Teilchen N_{RG} wurde deshalb mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$N_{\text{RG}} = \frac{G_{\text{RG},0}}{G_{\text{G},0} \cdot G_{\text{R},0}} \quad [2.11] \quad .$$

2.2.4 Ermittlung der FRET-Effizienz

Beim Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) gibt ein angeregtes Donor-Fluorophor seine Energie an ein Akzeptor-Fluorophor ab [149]. Dabei handelt es sich nicht um Reabsorption eines vom Donor emittierten Photons durch den Akzeptor, sondern um einen resonanten Prozess, der nur zwischen Molekülen auftritt, die etwa 10 – 100 Å voneinander entfernt sind. Der Transfer ist nur möglich, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt [150].

Die Effizienz des Energietransfers E zwischen einem Donor und einem Akzeptor in einem eindimensionalen System wird durch die Förster-Gleichung angegeben [151]:

MATERIAL UND METHODEN

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad [2.12] \quad .$$

R ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Förster-Abstand R_0 ist der Abstand, bei der die Transfereffizienz 50 % beträgt. R_0 lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}} \quad [2.13] \quad .$$

Q_D ist hier die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, n der Brechungsindex des Mediums, N_{AV} die Avogadro-Konstante und J der Überlapp von Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionsspektrum. Durch den Orientierungsfaktor κ wird der Winkel zwischen Donor- und Akzeptor-Übergangsdipolmoment berücksichtigt. Für frei rotierende Moleküle beträgt κ^2 2/3.

Die Energietransfereffizienz E lässt sich experimentell aus der Fluoreszenzintensität (I_{DA} und I_D) oder Fluoreszenzlebensdauer (τ_{DA} und τ_D) des Donor-Farbstoffs in An- und Abwesenheit des Akzeptor-Farbstoffs bestimmen [151]:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad [2.14]$$

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad [2.15] \quad .$$

Komplizierter wird der Zusammenhang für ein zweidimensionales System, wie es eine Membran darstellt. Hier ist ein Donor-Fluorophor von mehreren Akzeptor-Moleküle umgeben. Diese Verteilung muss bei der Berechnung der Energietransferrate berücksichtigt werden [152]:

KAPITEL 2.2

$$E = 1 - \frac{1}{\tau_D} \int \frac{I_D(t)}{I_D^0} dt \quad [2.16] \quad .$$

Hier ist t die Zeit nach Eintreffen des Anregungspulses, $I_D(t)$ die Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors in einer Ebene zum Zeitpunkt t und I_D^0 die Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors zum Zeitpunkt null.

Aus Gleichung [2.12] ergibt sich, dass sich der Abstand zweier Fluorophore aus der Effizienz des Förster-Resonanz-Energietransfers bestimmen lässt. Der Förster-Radius der hier verwendeten Farbstoffe Oregon Green und Texas Red sowie NBD und Rhodamin-Lissamin liegt bei ca. 5 nm. Das bedeutet, dass FRET nur stattfinden kann, wenn die Lipid-verankerten Fluorophore sich in derselben Membran befinden. Durch FRET kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors. Das Fortschreiten einer Fusionsreaktion, bei der verschieden markierte Membranen miteinander verschmelzen, lässt sich deshalb über diese beiden Parameter beobachten.

2.2.4.1 Fluoreszenzlebensdauer

Die hier verwendeten Photonenzählwerke erlaubten die Aufzeichnung von Fluoreszenzlebensdauer-Histogrammen. Zur Bestimmung des Fluoreszenzlebensdauer τ_{Fl} wurde der abfallende Bereich der Histogramme des FRET-Donors Oregon Green mit Hilfe der selbstprogrammierten Software mit einer monoexponentiellen Abklingkurve angepasst:

$$I_D(t) = I_D^0 \cdot e^{-t/\tau_{Fl}} \quad [2.17] \quad .$$

$I_D(t)$ ist die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t nach Eintreffen des Laserpulses, I_D^0 ist die Amplitude der Abklingkurve.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_{Fl} des Donor-Fluorophors ergibt sich aus der Geschwindigkeitskonstante k_{ET} des Resonanz-Energie-Transfers und den Konstanten aller anderen Prozesse, durch die der angeregte Zustand Energie abgibt, hier zusammengefasst als k_i :

$$1/\tau_{\text{FI}} = k_{\text{ET}} + k_i \quad [2.18] \quad .$$

Je höher die FRET-Effizienz, desto kürzer wird die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors. Da k_{ET} linear von der Akzeptor-Farbstoffkonzentration abhängt, ist $1/\tau_{\text{FI}}$ linear abhängig von der Anzahl der fusionierten Liposomen [151].

2.2.4.2 Fluoreszenzintensität

Die FRET-Effizienz kann auch über die Fluoreszenzintensität gemessen werden (Gl. [2.14]). Befinden sich die Donor- und Akzeptor-Fluorophore zu Beginn der Fusion in unterschiedlichen Membranen, so kann in einer Ensemble-Messung beobachtet werden, wie die Donor-Fluoreszenz abnimmt und die Akzeptor-Fluoreszenz zunimmt [29]. Weiter verbreitet für die Fusion von Liposomen ist der umgekehrte Ansatz [20, 90]: Man bringt beide Farbstoffe (üblicherweise NBD und Rhodamin-Lissamine) in dieselbe Membran ein und lässt diese mit einer nicht markierten Membran fusionieren. Die Fluorophore werden dadurch verdünnt, ihr Abstand vergrößert sich und man beobachtet ein *Dequenching*. Die Donor-Fluoreszenzintensität nimmt deshalb zu, die des Akzeptor-Fluorophors ab.

Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde an einem Fluorolog (FL 3-22, Yvon Jobin) vorgenommen. Das Probenvolumen betrug 1.2 mL und die Verdünnung der Liposomen 1:100. Die Probe wurde auf 30°C temperiert und während der ganzen Messung mit einem Magnetrührer gerührt. Die Anregungswellenlänge für Oregon Green/Texas Red betrug 490 nm, detektiert wurde bei 534 nm und 608 nm. Das Farbstoffpaar NBD/ Rhodamin-Lissamin wurde bei 460 nm angeregt und bei 530 nm und 590 nm detektiert.

2.2.5 Dynamische Lichtstreuung

Die Größenverteilung von Liposom-Aggregaten wurde mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt [84]. Das Prinzip der Messung ist zu dem der FCS analog [96]. Eine monochromatische, kollimierte Lichtquelle wird an der Probe gestreut. Durch die Diffusion der Teilchen fluktuiert die detektierte Streuintensität. Durch eine Autokorrelations-

KAPITEL 2.2

analyse (siehe Gl. [2.2]) kann dann die Diffusionszeit und daraus die Größe der streuenden Teilchen bestimmt werden.

Die Messung wurde an einem DynaPro System (Wyatt Technology) durchgeführt. Die Liposomen wurden 1:40 in Probenpuffer verdünnt, so dass sich eine Zählrate von ca. 10^6 s^{-1} ergab. 15 μL der Probe wurden auf 25°C temperiert und 15 Mal für 4 s vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der Dynamics V6 Software (Wyatt Technolgy).

3 Ergebnisse

3.1 Photonenburst-Experimente

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Konfokalmikroskop hat einen Detektionsvolumen mit einem Radius von ca. 400 nm und einem Volumen von ca. einem Femtoliter. Wird eine Probe ausreichend stark verdünnt, so befindet sich im Mittel weniger als ein fluoreszierendes Teilchen im Messvolumen. Dies ermöglicht, die Eigenschaften einzelner Partikel zu bestimmen.

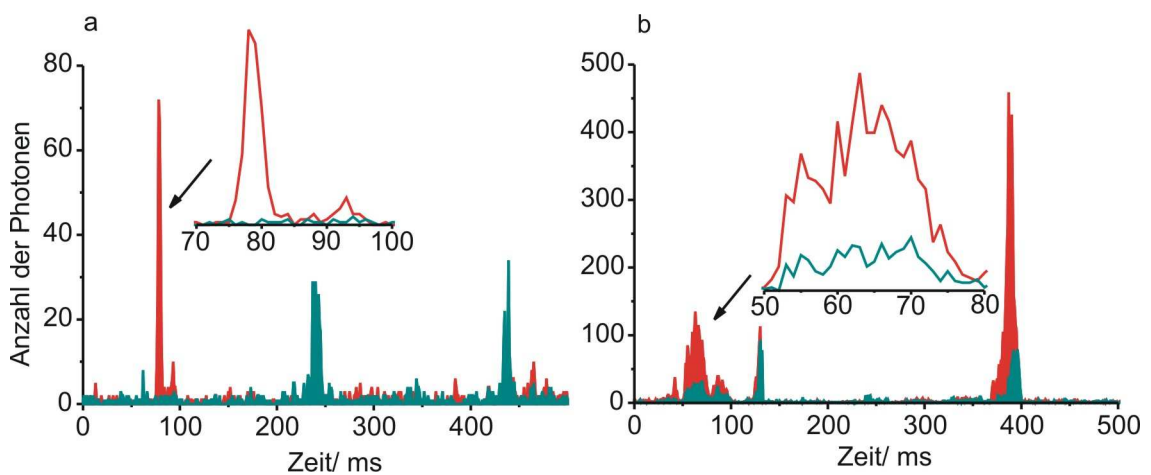


Abb. 3.1: Typische Zeitspuren von fluoreszenzmarkierten Liposomen.

In (a) wurden grüne (1.5 % Oregon Green-PE) und rote (1 % Texas Red-PE) Liposomen gemischt, die nur mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren. In (b) wurden mit Synaptobrevin 2 rekonstituierte Liposomen vermessen, die mit beiden Farbstoffen markiert waren (0.75 % Oregon Green-PE und 0.5 % Texas Red-PE) und so den Farbstoffgehalt von fusionierten Liposomen simulierten. Rote Linie: Anzahl der Photonen auf dem roten Detektor, grüne Linie: Anzahl der Photonen auf dem grünen Detektor.

Es wurden mit Oregon Green und Texas Red fluoreszenzmarkierte Liposomen so verdünnt, dass sich durchschnittlich 0.1 Teilchen im Detektionsbereich befanden. Das entspricht einer Konzentration von weniger als 1 nM. Abb. 3.1 zeigt Ausschnitte aus typischen Zeitspuren, die sich dadurch ergeben, dass die auf dem grünen und roten Detektor gezählten Photonen über bestimmte Zeitintervalle (hier 1 ms) aufsummiert werden. Man nennt dieses Verfahren auch *Binning*. Die Größe des gewählten Intervalls

KAPITEL 3.1

ist von zentraler Bedeutung für die spätere Auswertung und hängt von der Art der Probe ab. Wird das Intervall zu klein gewählt, so lassen sich die Photonenbursts, die von fluoreszierenden Partikeln hervorgerufen werden, wenn sie durch den Detektionsbereich diffundierenden, nicht vom Dunkelrauschen unterscheiden. Sind die Intervalle hingegen größer als die typische Aufenthaltsdauer eines Partikels in dem Detektionsbereich, so gehen die Information über die charakteristischen Eigenschaften des Partikels verloren. In den hier gezeigten Experimenten wurden zwei verschiedene Fluoreszenz-Marker verwendet, die spektral getrennt detektiert werden können. So kann analysiert werden, ob eine Korrelation zwischen den Fluoreszenzsignalen besteht. In den Zeitspuren in Abb. 3.1 ist dies bereits mit bloßem Auge zu erkennen. Während für ein Gemisch aus roten und grünen Liposomen die Photonenbursts unabhängig voneinander gemessen werden (Abb. 3.1 a), treten in der Probe mit doppeltmarkierten Liposomen die Photonenburst grundsätzlich gleichzeitig auf (Abb. 3.1 b).

Aus dem Vergleich der beiden Zeitspuren in Abb. 3.1 ergibt sich noch ein weiterer, für diese Arbeit wichtiger Sachverhalt. Im Vergleich zu den einzelmarkierten wurde genau die halbe Farbstoffkonzentration für die Herstellung der doppeltmarkierten Liposomen verwendet. Dies entspricht der Farbstoffkonzentration, die nach einer Fusionsrunde zu erwarten wäre. Wenn die beiden fusionierenden Liposomen genau gleich groß sind, so verdoppelt sich die Membranfläche durch die Fusion. Die Konzentration jedes einzelnen Farbstoffs bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration halbiert sich dabei. Während in Abb. 3.1 a jedoch die Größe der Photonenbursts auf dem grünen und dem roten Detektor vergleichbar ist, ist für die korrelierten Photonenbursts in Abb. 3.1 b die Größe des grünen Photonenbursts im Vergleich zum roten reduziert. Dass sich das Verhältnis der Photonen auf grünem und rotem Detektor in den doppeltmarkierten gegenüber den einfachmarkierten Liposomen verschiebt, obwohl die Farbstoffkonzentrationen relativ zueinander gleich bleiben, ist auf FRET zurückzuführen. Nur wenn sich grüne und rote Fluorophore auf derselben Membran befinden, ist der Abstand zwischen den Fluorophoren ausreichend kurz für den resonanten Energietransfer zwischen ihnen.

ERGEBNISSE

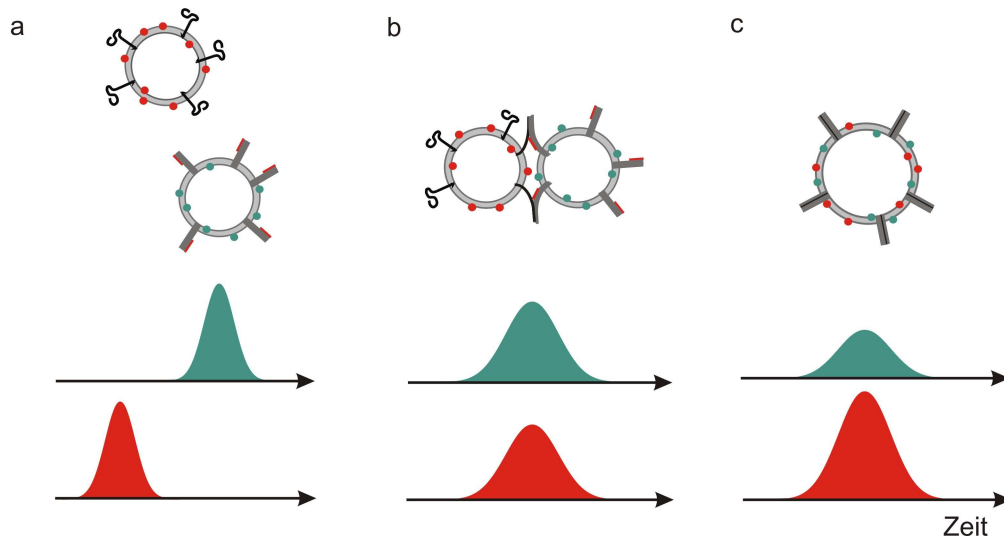


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Photonenbursts für verschiedene Intermediate einer Fusionsreaktion.

Photonenbursts von (a) freien, (b) gedockten und (c) fusionierten Liposomen.

Genau auf diesen beiden Parametern, der Korrelation des Fluoreszenzsignals von grünem und rotem Detektor einerseits und der FRET-Effizienz andererseits, beruht das Konzept des in dieser Arbeit entwickelten Assays. Die FRET-Effizienz wird routinemäßig zur Beobachtung des Vermischens der Lipide bei der Fusion von fluoreszenzmarkierten Proteoliposomen herangezogen [20, 90]. Hier sollte aber auch ein vor der Fusion liegender Schritt, das Docking, beobachtet werden. Unter Docking soll im Folgenden das Herstellen eines engen Kontakts zwischen den Membranen verstanden werden, bei dem es jedoch zu keinerlei Austausch von Lipiden kommt. Abb. 3.2 erklärt, wie durch einen Vergleich von Korrelation und FRET-Effizienz die verschiedenen Spezies unterschieden werden können. Nur in einem fusionierten Liposom ist die Fluoreszenzintensität und damit die Größe des Photonenbursts aufgrund von FRET verändert. Sowohl für gedockte als auch für fusionierte Liposomen sind die Signale auf beiden Detektoren korreliert. Hier wird auch klar, warum die beiden Fluorophore auf zwei Liposomenpopulationen verteilt sein müssen. Mit dem im Dequenching-Assay verwendeten Ansatz, eine Population mit Donor- und Akzeptor-Farbstoff zu markieren, während die zweite Population unmarkiert bleibt, wäre die Korrelationsanalyse nicht möglich. Wird nun eine Analyse aller korrelierten Photonenbursts vorgenommen, so lassen sich gedockte und fusionierte Liposomen anhand der unterschiedlichen Photonenverhältnisse zwischen den beiden Detektoren unterscheiden.

KAPITEL 3.1

Eine solche Analyse ist in Abb. 3.3 zunächst für Modellpopulationen von Liposomen vorgenommen worden. Es wurden die Photonenbursts von Proben untersucht, die einfachmarkierte rote (schwarze Kurve) und doppeltmarkierte Liposomen (rote Kurve) enthielten und das Verhältnis der Photonen auf dem grünen Detektor zu den Photonen auf dem roten Detektor (I_G/I_R) in einem Histogramm aufgetragen. Es wurden die Bereiche der Zeitspur analysiert, die auf dem roten Detektor als Photonenburst erkannt wurden. Für die freien Liposomen ist das Verhältnis nicht größer als das des Übersprechens des roten Farbstoffs in den grünen Detektor. Das Maximum der Verteilung liegt bei unter 0.1. Bei den doppeltmarkierten Liposomen hingegen sind grüne und rote Photonenbursts korreliert und es sind deutlich höhere Werte für (I_G/I_R) zu erwarten. Wie aber bereits in Abb. 3.1 b dargestellt, ist die Intensität des grünen Farbstoffs aufgrund von FRET stark herabgesetzt. Es ergeben sich deshalb für das Photonenverhältnis Werte kleiner eins und das Maximum der Verteilung liegt bei ca. 0.5. Leider stand für die gedockten Liposomen kein definiertes Modellsystem zur Verfügung. Die Verteilung der „gedockten“ Liposomen wurde deshalb theoretisch berechnet, indem zufällig Photonenbursts von freien grünen Liposomen durch Photonenbursts von freien roten geteilt wurden. Für diese hypothetische Population von Liposomen ergibt sich eine Verteilung mit einem Maximum von ca. 1 (blaue Kurve in Abb. 3.3). Dies entspricht der Beobachtung aus Abb. 3.1 a, dass die Photonenbursts von freien grünen und roten Liposomen in etwa gleich groß sind.

Die Verteilungen der Modellpopulationen wurden dann mit der Verteilung einer Population von Liposomen verglichen, die tatsächlich fusioniert waren (grüne Kurve in Abb. 3.3). Es wurden Oregon Green-markierte Liposomen, die mit einem stabilisierten Akzeptor-Komplex (dem ΔN -Komplex) rekonstituiert waren mit Texas Red-markierten Liposomen, die mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren, fusioniert. Der ΔN -Komplex enthält neben den beiden Q-SNAREs SNAP-25A und Syntaxin 1A ein Fragment von Synaptobrevin 2 (AS 49-96), das an den C-terminalen Teil des SNARE-Komplexes bindet. So lässt es die Bindungsstelle für das Membran-rekonstituierte Synaptobrevin frei, blockiert aber die Bildung eines inerten Komplexes aus SNAP-25A und zwei Syntaxin 1A-Molekülen.

ERGEBNISSE

Die fusionierten Proben wurden nach 2 h Inkubation, einer Zeit nach der die Fusion abgeschlossen ist, analog zu den Modellpopulationen vermessen. Es ergibt sich eine Verteilung, deren Maximum auf das der Verteilung der doppeltmarkierten Liposomen fällt. Die Verbreiterung des Histogramms im Vergleich zu dem der Modellpopulation in Richtung der kleineren Werte lässt auf eine Population von Liposomen schließen, die weder gedockt noch fusioniert sind. Die Verbreiterung in Richtung größerer Werte kann sowohl auf mehrfachfusionierte wie auch auf gedockte, aber unfusionierte Liposomen zurückzuführen sein.

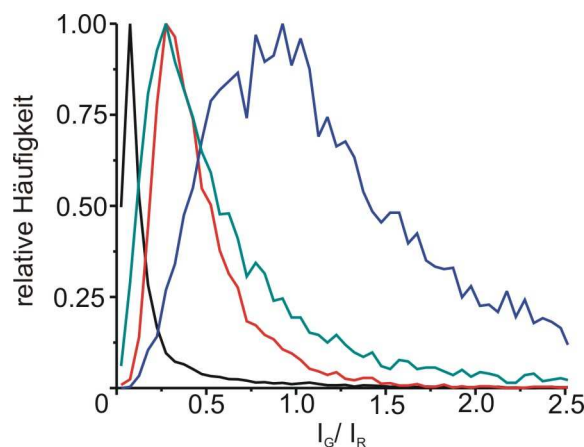


Abb. 3.3: Verteilungen von relativen Intensitäten für verschiedene Liposomen-Spezies.

Für Bereiche, die auf dem roten Detektor als Burst identifiziert wurden, wurde die Summe der Photonen auf dem grünen Detektor durch die Summe der Photonen auf dem roten Detektor geteilt. Schwarz: nicht fusionierende Liposomen, die nur mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren. Rot: Doppeltmarkierte Liposomen, rekonstituiert mit Synaptobrevin 2. Blau: Eine hypothetische Verteilung von gedockten Liposomen wurde aus einer nicht fusionierenden Probe errechnet, indem die Summe der Photonen von Photonenbursts auf dem grünen Detektor zufällig durch die Summe der Photonen von einem unabhängigen Photonenburst auf dem roten Detektor geteilt wurde. Grün: Verteilung einer Probe von fusionierenden Liposomen 2 h nach Beginn der Fusion. Oregon Green-markierte Liposomen waren mit dem ΔN -Komplex und Texas Red-markierte Liposomen mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert.

Mit Hilfe der aus den Modellpopulationen errechneten Verhältnisse lassen sich nun Photonenbursts verschiedenen Spezies zuordnen. Da die Histogramme der Spezies sich überlappen, ist die Zuordnung allerdings nie eindeutig. Typische

KAPITEL 3.2

Photonenbursts aus einer Fusionsreaktion sind in Abb. 3.4 dargestellt. Während sich zu Beginn der Fusion Beispiele von korrelierten Photonenbursts finden, die einem gedockten Liposomenpaar zuzuordnen sind (Abb. 3.4 b), deuten die Werte für Photonenbursts nach zweistündiger Fusion auf fusionierte Liposomen hin.

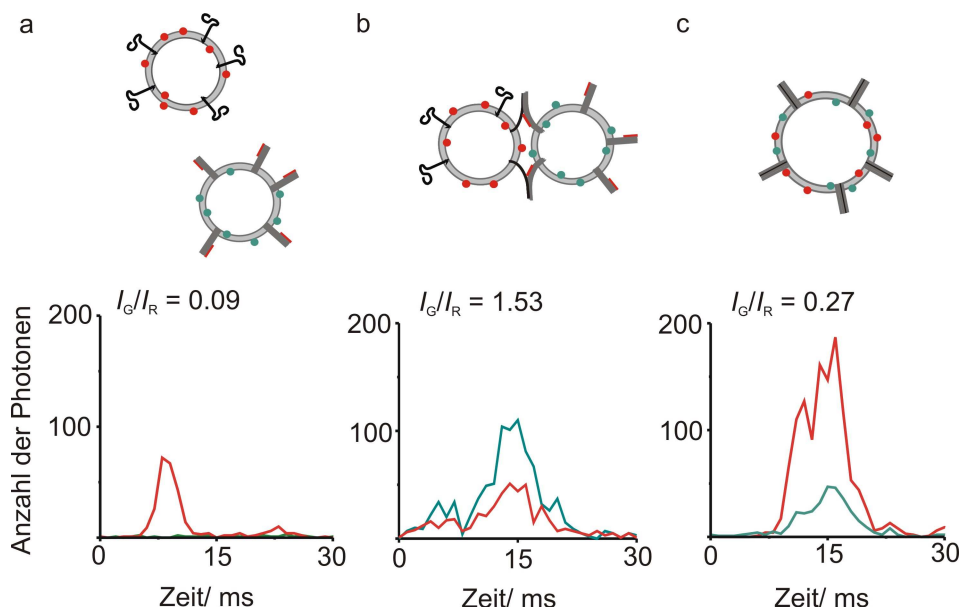


Abb. 3.4: Beispiele für einzelne Photonenbursts.

Photonenburst einer Probe mit nicht fusionierten Liposomen (a) und fusionierenden Liposomen 2 min (b) und 2 h (c) nach Beginn der Reaktion. Liposomen enthielten 1.5 % Oregon-Green oder 1 % Texas Red. In a waren alle Liposomen mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert, in b und c waren grüne Liposomen mit dem ΔN -Komplex und rote Liposomen mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert. Die angegebenen Verhältnisse I_G/I_R geben die Summe aller Photonen auf dem grünen Detektor (grüne Linie) geteilt durch die Summe aller Photonen auf dem roten Detektor an (rote Linie).

3.2 Validierung des FCCS-Assays

3.2.1 Datenanalyse

In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass eine Analyse einzelner Photonenbursts grundsätzlich die Unterscheidung von gedockten und fusionierten Liposomen ermöglicht. Die Analyse setzt jedoch sehr verdünnte Proben voraus. Um aussagekräftige Verteilungen zu ermitteln, müssen die Daten über mehrere Minuten gesammelt werden. Dies steht im

ERGEBNISSE

Widerspruch zu der Kinetik der Liposomen-Fusion. Für die Fusion von Liposomen, die mit dem ΔN -Komplex rekonstituiert sind, mit Liposomen, die Synaptobrevin 2 enthalten, beträgt die Halbwertszeit nur wenige Minuten [89]. Die Kinetik einer solchen Reaktion kann mit einer Photonenburst-Analyse nicht ermittelt werden.

Es wurde deshalb in dieser Arbeit Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) angewendet. Für die FCCS müssen die Teilchenzahlen zwar auch niedrig sein (bis zu 100 Teilchen im Detektionsbereich), aber es kann mehr als ein Teilchen simultan analysiert werden. Die Methode stellt somit eine Zwischenstufe zwischen der Einzelmolekül-Detektion und einer Ensemble-Messung dar.

Statt einzelne Bereiche der gemessenen Zeitspur zu analysieren, wie es bei der Photonenburst-Detektion und -Analyse geschieht, wird in der FCCS die gesamte Zeitspur eines Detektors mit der Zeitspur des anderen Detektors kreuzkorreliert (siehe Gleichung [2.8]). Aus dieser Korrelation ergibt sich eine typische Kurve, so wie sie in Abb. 3.5 dargestellt ist. Die Höhe der Kurve für kurze Korrelationszeiten, die so genannte Korrelationsamplitude, spiegelt die Anzahl der doppeltmarkierten, also gedockten oder fusionierten, Liposomen wider.

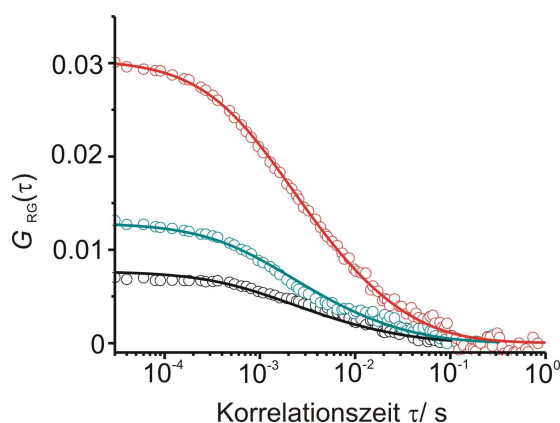


Abb. 3.5: Fluoreszenz-Kreuzkorrelation-Kurven einer Fusionsreaktion.

Die Kurven wurden 30 s (schwarz), 3 min (grün) und 60 min (rot) nach Beginn der Fusionsreaktion gemessen. Es wurden Liposomen, die 1,5 % Oregon Green-PE und den ΔN -Komplex enthielten, mit Liposomen gemischt, die 1 % Texas Red und Synaptobrevin 2 enthielten. Die Messdauer betrug 10s.

KAPITEL 3.2

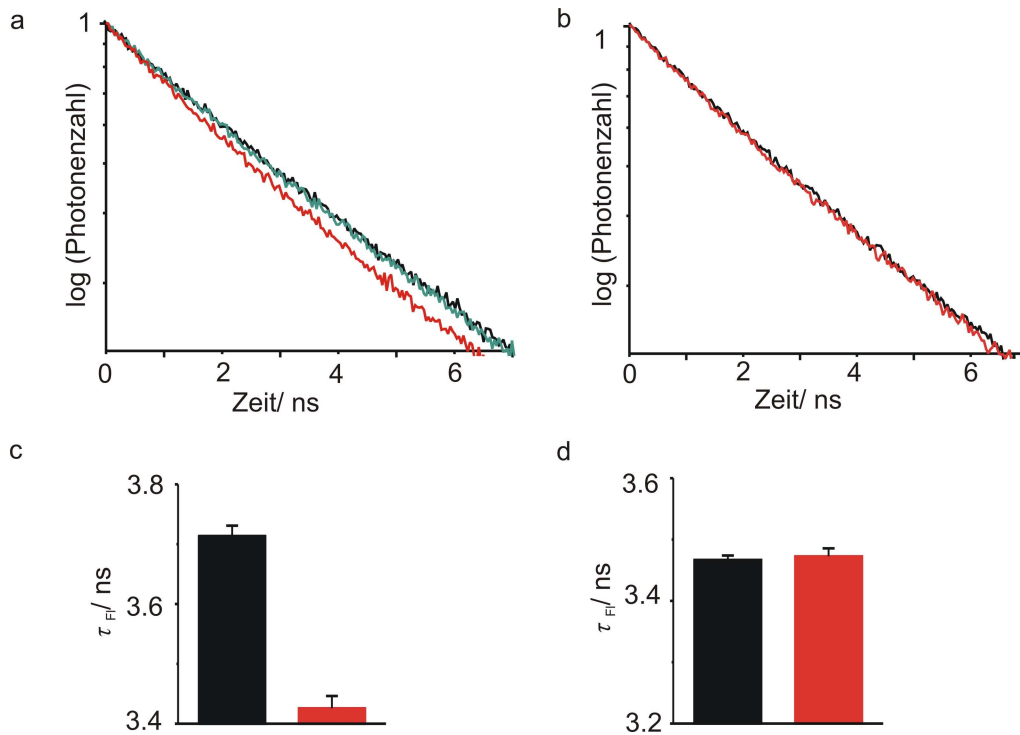


Abb. 3.6: Fluoreszenzlebensdauer-Analyse.

(a) Fluoreszenzabklingkurven in logarithmischer Auftragung. Die Kurven wurden 30 s (schwarz), 3 min (grün) und 60 min (rot) nach Beginn der Fusionsreaktion gemessen. In (a) wurden Liposomen gemischt, die den ΔN -Komplex und Synaptobrevin 2 enthielten. In (b) wurden die ΔN -Komplex-Liposomen vor dem Mischen mit einem löslichen Synaptobrevin 2-Fragment (1-96) als kompetitivem Inhibitor inkubiert. In (c) und (d) sind die Mittelwerte von neun 10 s Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer nach 30 s (schwarz) und nach 60 min (rot) aufgetragen. Der Fehlerbalken ist die Standardabweichung vom Mittelwert.

In dem hier verwendeten Aufbau wird mittels eines gepulsten Lasers angeregt. Dies ermöglicht die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer der markierten Liposomen. Anstatt wie oben beschrieben die gezählten Photonen fortlaufend in Intervallen zusammenzufassen, wird der zeitliche Abstand der Photonen zum nächsten Laserpuls in einem Histogramm aufgetragen. So ergibt sich eine Fluoreszenzabklingkurve mit einem exponentiellen Verlauf, dessen Zeitkonstante der Lebensdauer des angeregten Zustands der Fluorophore entspricht. Genauso wie die Fluoreszenzintensität wird auch die Fluoreszenzlebensdauer eines FRET-Donors durch Energietransfer herabgesetzt. Das Vermischen der Lipide lässt sich in dem hier beschriebenen Experiment also auch über die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer verfolgen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abb. 3.6 Fluoreszenzabklingkurven logarithmisch aufgetragen, so dass sich ein linearer

ERGEBNISSE

Abfall ergibt. Es handelt in Abb. 3.6 a. um dieselben Messungen wie in Abb. 3.5. Die Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten der Fusion (Abb. 3.6 a) sowie zwischen der Fusionsreaktion und einer durch einen lösliches Proteinfofragment kompetitiv inhibierten Reaktion (Abb. 3.6 b) erscheinen zunächst gering. Die Fluoreszenzlebensdauer lässt sich jedoch bis auf 0.01 ns genau bestimmen, so dass der Unterschied zwischen 3.4 ns zu Beginn der Fusion und 3.75 ns nach 2 h signifikant ist (Abb. 3.6 c und d).

Grundsätzlich wäre es möglich, die Helligkeit der Liposomen aus einer Autokorrelationsanalyse (FCS) zu bestimmen und so die FRET-Effizienz zu berechnen. Allerdings hängt die Fluoreszenzintensität auch immer von äußeren Faktoren, wie z.B. der Anregungsintensität und der variierenden Farbstoffkonzentrationen sowie dem Durchmesser der Liposomen ab. Die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer ist deshalb zuverlässiger.

Auch in der kombinierten FCCS-/ Fluoreszenzlebensdauer-Analyse kann der Anteil der gedockten Liposomen bestimmt werden. Dazu muss die Anzahl N_X der interagierenden (gedockten und fusionierten) direkt mit der Anzahl N_{fus} der fusionierten Liposomen verglichen werden. Zunächst wurde der Anteil der fusionierten Liposomen aus der Fluoreszenzlebensdauer bestimmt. Wie bereits im Methodenteil ausgeführt (siehe Kap. 2.1.4) ist die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer τ_{FL} umgekehrt proportional zur Summe der Energietransferrate k_{ET} und der Ratenkonstante in Abwesenheit von FRET k_i :

$$1/\tau_{FI} = k_{ET} + k_i \quad [2.18] \quad .$$

k_i lässt sich leicht aus der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors in Abwesenheit des Akzeptors berechnen, also in diesem Fall aus der Fluoreszenzlebensdauer τ_D der reinen mit Oregon Green markierten Liposomen:

$$k_i = 1/\tau_D \quad [3.1] \quad .$$

Die Energietransferrate bei FRET kann deshalb folgendermaßen berechnet werden:

$$k_{ET} = 1/\tau_{FI} - 1/\tau_D \quad [3.2] \quad .$$

Da die Energietransferrate k_{ET} jedes einzelnen Donor-Fluorophors linear von der Konzentration der Akzeptor-Fluorophore in seiner Umgebung abhängt, ist die mittlere Energietransferrate einer 10s-Messung proportional zu der durchschnittlichen Akzeptor-

KAPITEL 3.2

Fluorophor-Konzentration in allen fusionierten Membranen. Damit ist k_{ET} auch proportional zu der Anzahl der fusionierten Liposomen, N_{fus} (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.2). Im Folgenden wird N_{fus} angegeben als der Prozentsatz der fusionierten Liposomen relativ zur Anzahl der fusionierten Liposomen nach 60 min Fusion:

$$N_{fus} = \frac{k_{ET}(t)}{k_{ET}(60\text{min})} \cdot 100 \quad [3.3] \quad .$$

Zu diesem Zeitpunkt kann die Fusionsreaktion als abgeschlossen betrachtet werden.

Um nun die Anzahl der fusionierten und der gedockten Liposomen zu vergleichen, wird die relative Anzahl der doppeltmarkierten Teilchen N_X eingeführt. N_X ist der Anteil der doppeltmarkierten Liposomen an der Anzahl N_G aller Liposomen, die eine grüne Markierung tragen:

$$N_X = \frac{N_{RG}}{N_G} \quad [3.4] \quad .$$

N_G kann aus einer Autokorrelationsanalyse bestimmt werden (siehe Kapitel 2.2.3.1). Es hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse, wenn anstelle der Anzahl der grünen Liposomen die Anzahl der roten Liposomen für die Normierung verwendet wird.

Es ist notwendig den normierten Wert N_X und nicht die absolute Anzahl der doppeltmarkierten Teilchen, N_{RG} , für die weitere Analyse zu verwenden, da die Liposomen auch mehr als eine Fusionsrunde unterlaufen können (siehe Kapitel 3.3.2). Wenn z.B. ein doppeltmarkiertes Liposom mit einem weiteren grünen Liposom interagiert, so führt das zu keiner Änderung in der Anzahl der doppeltmarkierten Teilchen N_{RG} , die normierte Zahl N_X steigt aber an. Auch N_X wird im Folgenden auf den Endwert der Fusion nach 60 min bezogen:

$$N_X = \frac{N_X(t)}{N_X(60\text{min})} \cdot 100 \quad [3.5] \quad .$$

Das Übersprechen der Detektoren wurde dabei berücksichtigt, indem von allen Werten der Wert der inhibierten Reaktion abgezogen wurde.

ERGEBNISSE

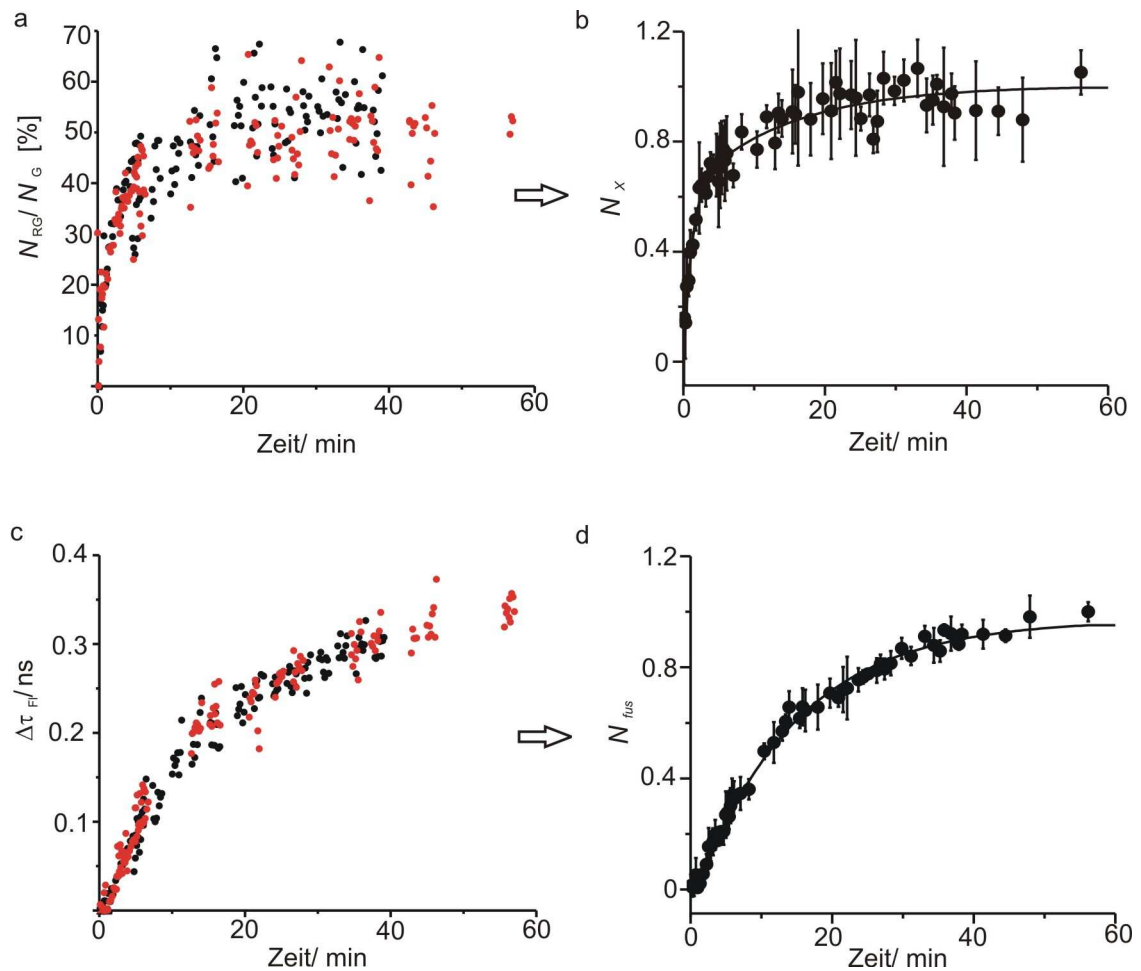


Abb. 3.7: Verarbeitung und Normierung der FCCS- und Fluoreszenzlebensdauer-Daten.

Fusionsreaktion von Liposomen, die mit 1.5 % Oregon Green und 1 % Texas Red markiert waren und den ΔN -Komplex bzw. Synaptobrevin 2 enthielten. Schwarze und rote Punkte stellen die Messung zweier unabhängiger Liposomen-Präparationen dar.

(a) Die Kreuzkorrelation wurde berechnet, indem die Anzahl der doppeltmarkierten Liposomen durch die Gesamtanzahl der grünen Liposomen geteilt wurde ($N_{RG}/N_G \cdot 100$). Der durch Übersprechen der Detektoren verursachte Hintergrund wurde berücksichtigt, indem der Mittelwert der Kreuz-Korrelation gemessen für eine inhibierte Probe (ΔN -Komplex präinkubiert mit einem löslichen Synaptobrevin 2-Fragment) von den Werten abgezogen wurde. In (b) wurden die Daten aus (a) gemittelt und normiert. (c) Änderung der Fluoreszenzlebensdauer $\Delta\tau_{Fl}$. Da die Fluoreszenzlebensdauer zwischen einzelnen Liposomenpräparationen leicht variiert, wurde die Fluoreszenzlebensdauer der reinen grünen Liposomen der entsprechenden Präparation von allen Werten abgezogen, um so Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In (d) wurden die Daten aus (c) gemittelt und normiert.

KAPITEL 3.2

Abb. 3.7 zeigt die Rohdaten (Abb. 3.7 a und c) aus denen die gemittelten und normierten Werte für N_X und N_{fus} berechnet wurden. Jeder Punkt in Abb. 3.7 a und c wurde aus der FCCS- bzw. Fluoreszenz-Abklingkurve einer 10 s-Messung bestimmt (Abb. 3.5 und Abb. 3.6 a). Dazu wurden entsprechende Funktionen (Gleichung [2.5] bzw. [2.17]) mittels einer nichtkommerziellen Software [128] an die Kurven angepasst.

3.2.2 Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Farbstoffkonzentration

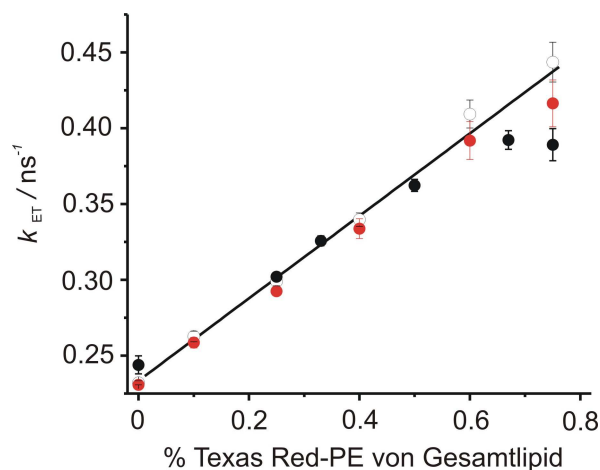


Abb. 3.8: Lineare Abhängigkeit der Energietransferrate k_{ET} von der Konzentration des Akzeptor-Farbstoffs Texas Red.

Aufgetragen wurde die aus der Fluoreszenzlebensdauer berechnete Energietransferrate gegen die Konzentration des Akzeptor-Fluorophors. Die Konzentration des Donor-Fluorophors variierte zwischen 0.13 und 0.50. Die Daten zeigen zwei unabhängige Liposomen-Präparationen (rote und schwarze Punkte) bei Anregungsintensitäten von 10 mW (offene Symbole) und 25 mW (gefüllte Symbole) gemessen.

Die oben beschriebene Berechnung der Anzahl der fusionierten Liposomen N_{fus} aus der Energietransferrate k_{ET} ist nur zulässig, wenn k_{ET} auch tatsächlich linear von der Konzentration des Akzeptor-Farbstoffs abhängt. Um dies zu überprüfen, wurden doppelt-markierte Liposomen mit verschiedenen Konzentrationen von Donor- und Akzeptor-Farbstoff hergestellt. Die Konzentrationen entsprechen dabei denen, die sich ergeben, wenn die Liposomen ein bis drei Fusionsrunden durchlaufen. Wie zu erwarten, hängt

ERGEBNISSE

die ermittelte Energietransferrate ausschließlich und linear von der Konzentration des Akzeptor-Fluorophors ab. Die Konzentration des Donor-Fluorophors, die ebenfalls zwischen den einzelnen Liposomen-Präparationen variiert, sowie die Anregungsintensität haben keinen Einfluss (Abb. 3.8).

3.2.3 Vergleichbarkeit von Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzintensität

In dem gut etablierten so genannte *Dequenching*-Assay wird das Vermischen der Lipide bei der Fusion von fluoreszenzmarkierten Proteoliposomen über die Fluoreszenzintensität beobachtet. Da sowohl die Änderung der Fluoreszenzintensität wie auch der Fluoreszenzlebensdauer auf eine Änderung der FRET-Effizienz zurückzuführen sind, sollte sich mit beiden Parametern die gleiche Fusions-Kinetik ergeben.

Um dies zu überprüfen, wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität des Donor-Farbstoffs während der Fusion von Oregon Green- und Texas Red-markierten Liposomen in einer Ensemble-Messung bestimmt. Die Kurve wurde dann mit der Anfangsintensität normiert und der Endwert bei 60 min auf eins normiert. Durch die Normierung ergibt sich eine ansteigende Kurve, obwohl die absolute Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors in dem Experiment abfällt. Die Änderung der normierten Fluoreszenzintensität korreliert mit der aus der Energietransferrate berechneten Anzahl der fusionierten Liposomen, N_{fus} (Abb. 3.9). Die mittels FCCS bestimmte Anzahl von interagierenden Liposomen, N_{x} , steigt hingegen deutlich schneller als die normierte Fluoreszenzintensität und N_{fus} . Alle Messungen wurden an derselben Liposomen-Präparation vorgenommen.

KAPITEL 3.2

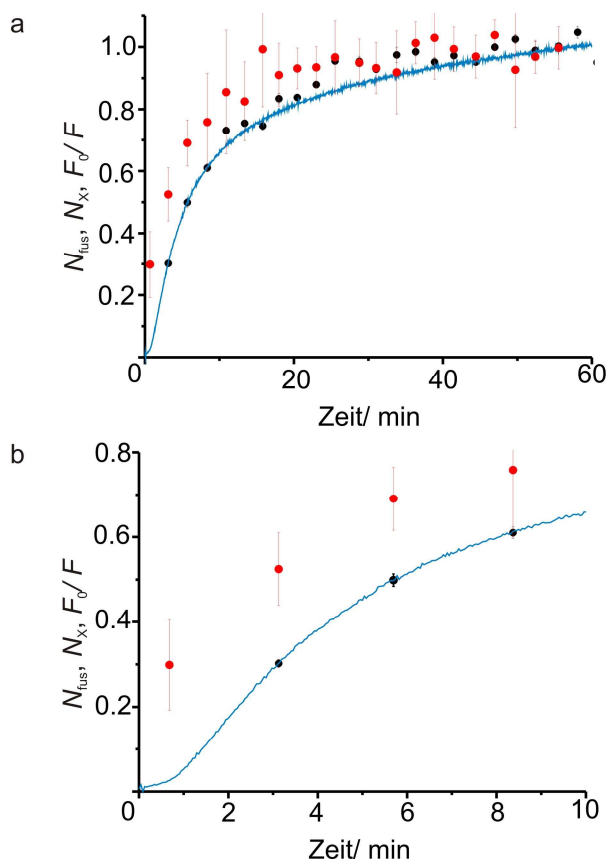


Abb. 3.9: Vergleich von Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer für eine Fusionsreaktion von Oregon Green- und Texas Red-markierten Liposomen.

(a) Änderung der Fluoreszenzintensität (blaue Linie), gemessen in einer Ensemble-Messung mit einem Standard-Fluoreszenz-Spektrometer, Anzahl der fusionierten Liposomen (N_{fus} , schwarze Punkte), bestimmt über Fluoreszenz-Lebensdauer-Analyse (aus einer Einzelpartikel-Messung), Anzahl der doppelmarkierten Liposomen (N_X , rote Punkte) bestimmt über FCCS. Die Liposomen enthielten den ΔN -Komplex und 1.5 % Oregon-PE bzw. Synaptobrevin 2 und 1 % Texas Red-PE. N_{fus} und N_X wurden wie in Kapitel 3.2.1 berechnet. Der Kehrwert der Fluoreszenzintensität F_0/F wurde für 60 min Fusionszeit auf 1 normiert. (b) ist eine Vergrößerung der ersten 10 min der Fusionsreaktion.

3.2.4 Vergleich verschiedener FRET-Paare und Donor-Farbstoffkonzentrationen

Meistens wird das Vermischen der Lipide bei der SNARE-vermittelten Liposomen-Fusion mit dem so genannten *Dequenching*-Assay beobachtet. Hier werden Donor- und Akzeptor (normalerweise NBD und Rhodamin Lissamin) in eine Liposomen-Population rekonstituiert, während die andere unmarkiert bleibt. Durch die Fusion nimmt die

ERGEBNISSE

FRET-Effizienz ab und es erhöht sich die Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors, während die des Akzeptor-Fluorophors abfällt.

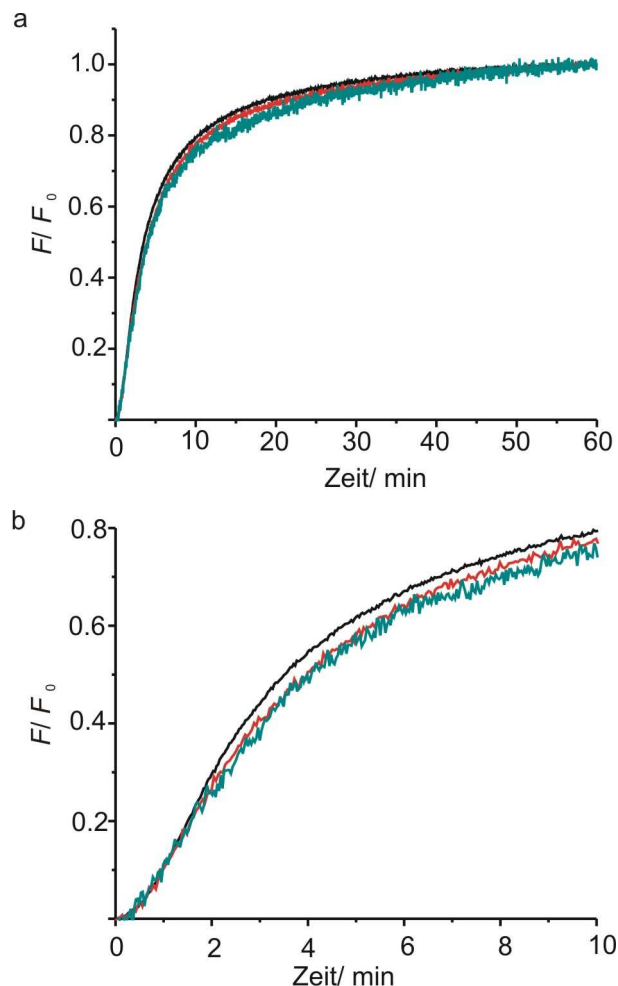


Abb. 3.10: Vergleich der beiden FRET-Paare NBD/ Rhodamin Lissamine und Oregon Green/ Texas Red.

(a) Die normierte Fluoreszenzintensität (F/F_0) wurde gemessen für eine Fusionsreaktion von NBD (1.5%)/ Rhodamin Lissamin (1.5 %) –markierten mit unmarkierten Liposomen (schwarz), Oregon Green (0.5 %)– mit Texas Red (1 %)–markierten Liposomen (rot) und NBD (1.5%)– mit Rhodamin Lissamin (1.5 %)–markierten Liposomen (grün). Die Liposomen waren jeweils mit dem ΔN -Komplex und Synaptobrevin 2 rekonstituiert. Die Temperatur (22°C), die Verdünnung der Liposomen (1:100) und das Verhältnis von Proteinen zu Lipiden (1:200) waren bei allen Messungen gleich. Alle Messungen wurden als Ensemble-Messung mit einem Standard-Fluoreszenz-Spektrometer durchgeführt. (b) zeigt eine Vergrößerung der ersten 10 min der Messung.

KAPITEL 3.2

Wie der in Abb. 3.10 dargestellte Vergleich zwischen NBD/Rhodamin Lissamin- und Texas Red/ Oregon Green-markierten Liposomen zeigt, ist die gemessene Fusionskinetik unabhängig von dem verwendet FRET-Paar. Auch macht es keinen Unterschied, ob der *Dequenching*-Ansatz gewählt wird und beide Fluorophore sich zunächst in derselben Liposomen-Population befinden, oder die Fluorophore in getrennten Populationen rekonstituiert sind und sich erst durch die Fusion mischen.

Energietransfer ist nicht nur zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophoren möglich, sondern auch zwischen gleichartigen Fluorophoren. Dieser Homotransfer senkt die Fluoreszenzintensität ebenfalls ab [151]. Seine Effizienz ist, genauso wie beim Transfer zwischen zwei verschiedenen Fluorophoren, abhängig vom Abstand der Farbstoffmoleküle. Ist die Konzentration der Fluorophore auf den Proteoliposomen also hoch genug, so könnte dies zu einem Homotransfer und damit einer Selbstausschöpfung der Fluorophore führen. Durch die Fusion vergrößert sich die Membranfläche und es wäre analog dem Dequenching-Assay eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dieser Effekt sollte vor allem für die Oregon Green-markierten Liposomen ausgeschlossen werden. Denn die Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Aufhebung der Selbstausschöpfung würde das eigentlich beobachtete Absinken der Fluoreszenzintensität bei der Fusion teilweise aufheben und somit die beobachtete Fusionskinetik verfälschen. Es wurden deshalb Liposomen mit verschiedenen Konzentrationen von Oregon Green hergestellt (0.25%, 0.5%, 0.75%) und mit Liposomen fusioniert, die 1 % Texas Red enthielten. Eine Abhängigkeit der Fusionsgeschwindigkeit von der Donor-Farbstoffkonzentration konnte nicht beobachtet werden. Die Halbwertszeit der Kurven lag im gleichen Bereich wie für Liposomen mit 1.5 % Oregon Green (Abb. 3.9). Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Selbstausschöpfung des Donor-Fluorophors kann deshalb für den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden.

ERGEBNISSE

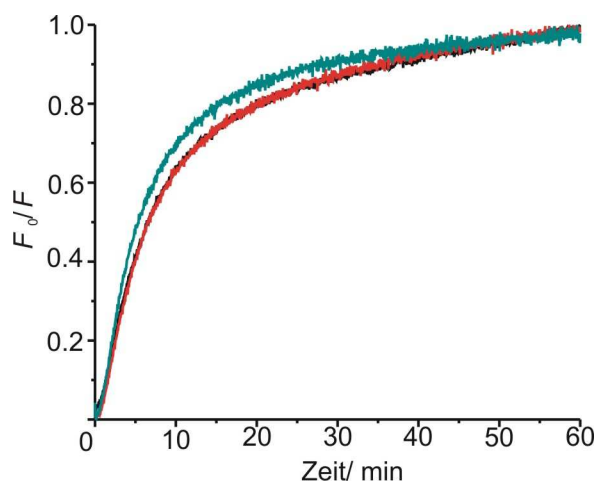


Abb. 3.11: Einfluss der Konzentration des Donor-Fluorophors auf die gemessene Fusionsgeschwindigkeit.

Liposomen, die den Δ N-Komplex und 0.75% (schwarz), 0.5 % (rot) und 0.25% (grün) Oregon Green-PE enthielten, wurden mit Liposomen fusioniert, die mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert und mit 1% Texas Red markiert waren. Gezeigt wird die relative Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors Oregon Green bezogen auf den Anfangswert. Der Endpunkt der Kurven ist auf eins normiert.

3.2.5 Anwendbarkeit von FCS und FCCS auf Liposomen

Streng genommen, gilt die hier zum Anpassen der FCS- und FCCS-Kurven verwendete Formel (Gleichung [2.5]) nur für monodisperse Teilchen von gleicher Helligkeit:

$$G(\tau) = G_0 \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + z^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad [3.6] \quad .$$

Die Liposomen weisen aber eine gewisse Größenverteilung des Durchmessers von ca. 20-40 nm auf [117]. Außerdem treten bei der Fusion gleichzeitige freie, gedockte und fusionierte Liposomen auf, die unterschiedlich hell sind.

Um sicher zu stellen, dass diese Variationen die mit FCS und FCCS bestimmten Zahlen nicht beeinflussen, wurden zunächst verschiedene Verdünnungen (1:50 – 1:400) von einzelmarkierten grünen und roten Liposomen hergestellt. Es ergaben sich Teilchenzahlen zwischen ca. 2 und 35. Diese Verdünnungen decken den Konzentrationsbereich ab, der für die Experimente zu erwarten ist, bei denen die Anfangsverdünnung jeweils 1:100 bezogen auf jede Liposomen-Population betrug.

KAPITEL 3.2

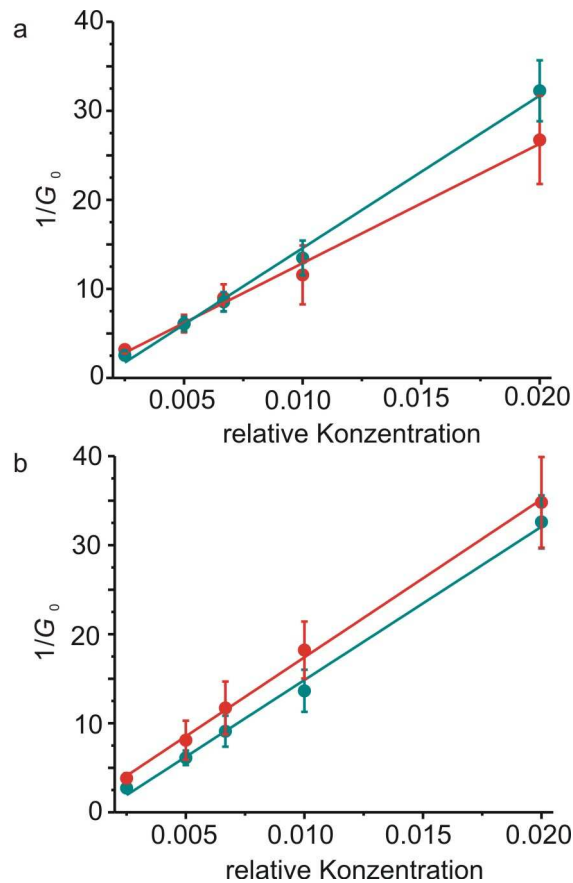


Abb. 3.12: Teilchenzahlen als Funktion der Verdünnung der Liposomen.

Um zu überprüfen, ob G_0 linear von der Liposomen-Konzentration abhängt, wurden verschiedene Verdünnungen von (a) grünen (grüne Punkte) und roten (rote Punkte) Liposomen und (b) einem Gemisch aus grünen und roten Liposomen vermessen. Die Verdünnungen lagen zwischen 1:50 bis 1:400 und damit in dem Konzentrationsbereich der in unseren Experimenten zu erwarten war. Die Liposomen enthielten 1.5% Oregon Green oder 1% Texas Red.

Sowohl für die einzeln verdünnten roten und grünen Liposomen (Abb. 3.12 a) wie auch für eine Verdünnung eines Gemischs aus beiden (Abb. 3.12 b), verhält sich die ermittelte Korrelationsamplitude über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Der durch die Größenverteilung hervorgerufene Fehler ist also kleiner als die Messgenauigkeit. Die Anwendung der Gleichungen [3.7] und [3.8] zur Bestimmung der Anzahl von Liposomen, die grün (N_G) bzw. rot (N_R) markiert sind, ist damit gerechtfertigt:

$$N_G = \frac{1}{G_{0/G}} \quad [3.7] \quad .$$

ERGEBNISSE

$$N_R = \frac{1}{G_{O/R}} \quad [3.8] \quad .$$

Um zu überprüfen, wie Variationen in der Helligkeit die berechnete Anzahl an doppeltmarkierten Liposomen beeinflussen, wurden Liposomen hergestellt, die Oregon Green und Texas Red in solchen Konzentrationen enthielten, dass die resultierende Helligkeit in etwa der von fusionierten und gedockten Liposomen entsprach. Es wurden zunächst doppeltmarkierte Liposomen, die die Helligkeit von gedockten Liposomen simulieren, in verschiedenen Verhältnissen mit einfachmarkierten Liposomen gemischt. Die für diese Probe nach Gleichung [3.4] berechnete Anzahl N_X der doppeltmarkierten Liposomen hing linear von ihrem tatsächlichen Anteil in der Probe ab (Abb. 3.13 a).

Außerdem wurden Gemische von unterschiedlich hellen, doppeltmarkierten Liposomen hergestellt, um eine Situation zu simulieren, in der fusionierte und gedockte Liposomen gleichzeitig in der Probe zugegen sind. Für all diese Gemische wurde 100 % Kreuzkorrelation gemessen. Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass die Fehler, die durch unterschiedliche Helligkeit der Liposomen hervorgerufen werden, klein sind im Vergleich zur Messgenauigkeit. Es ist deshalb eine zulässige Näherung die Anzahl N_X der doppeltmarkierten Liposomen nach Gleichung [3.4] zu berechnen, obwohl es sich nicht um völlig gleichartige Teilchen handelt.

KAPITEL 3.2

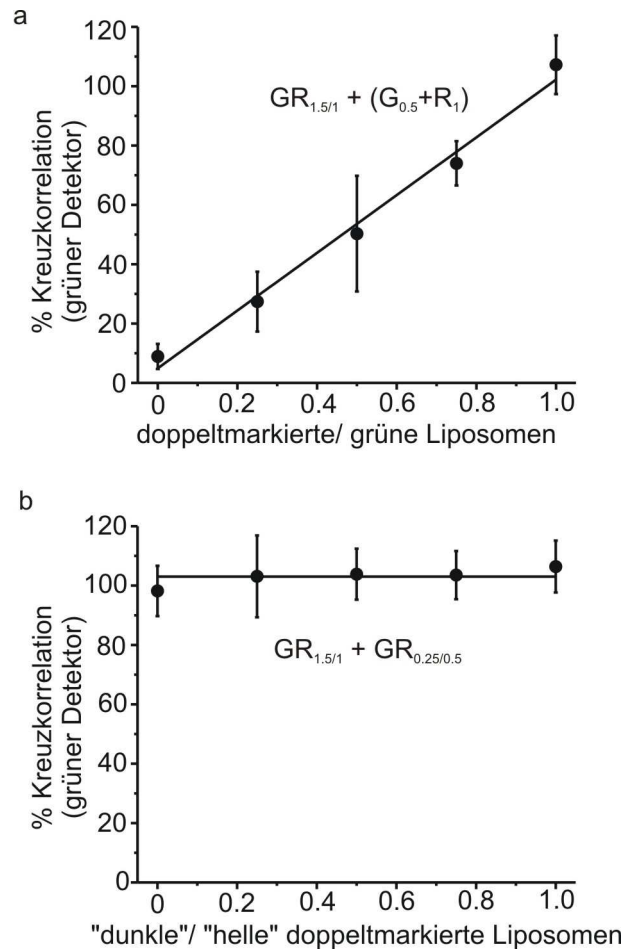


Abb. 3.13: Kreuzkorrelation für Gemische mit Liposomen von variierender Helligkeit.

Es wurden Liposomen mit den folgenden Farbstoffkonzentrationen hergestellt: einfachmarkierte Liposomen mit 0.5 % Oregon Green-PE ($G_{0.5}$), einfachmarkierte Liposomen mit 1 % Texas Red-PE (R_1), doppeltmarkierte Liposomen mit 0.25% Oregon Green-PE und 0.5 % Texas Red-PE ($GR_{0.25/0.5}$, „dunkel“, simulieren die Helligkeit von fusionierten Liposomen nach einer Fusionsrunde) und doppeltmarkierte Liposomen mit 1.5 % Oregon Green-PE und 1 % Texas Red-PE ($GR_{1.5/1}$, „hell“, simulieren die Helligkeit von gedockten Liposomen).

Der Anteil der doppeltmarkierten Teilchen wurde berechnet nach Gleichung [3.4] für:

(a) Gemische von doppeltmarkierten ($GR_{1.5/1}$) mit einfachmarkierten grünen ($G_{0.5}$) und roten (R_1) Liposomen. Die Abhängigkeit der berechneten Anzahl von dem experimentell

eingestellten Anteil der doppeltmarkierten Teilchen in der Probe $\frac{[GR_{1.5/1}]}{([GR_{1.5/1}] + [G_1])}$

war in etwa linear.

(b) Gemische von zwei Typen von doppeltmarkierten Liposomen, die fusionierte ($GR_{0.25/0.5}$) und gedockte ($GR_{1.5/1}$) Liposomen simulieren.

3.3 Kinetik einer Fusionsreaktion

3.3.1 Vergleich von Docking und Fusion

Im vorangehenden Abschnitt 3.2.5 wurde gezeigt, dass N_X , so wie es in Abb. 3.7 b berechnet wurde, tatsächlich dem Anteil der doppeltmarkierten Liposomen entspricht. N_{fus} hingegen ist eine lineare Funktion der Anzahl der fusionierten Liposomen (Abb. 3.8). Aufgrund der in beiden Fällen geltenden Proportionalität ist es deshalb zulässig, die normierten Werte für doppeltmarkierte und fusionierte Liposomen, so wie in Abb. 3.14 a und b geschehen, direkt zu vergleichen. Die in Abb. 3.14 gezeigten Kurven stammen von demselben Datensatz, der auch in Abb. 3.7 gezeigt wird, also aus einer Reaktion in der die Liposomen mit dem ΔN -Komplex und Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren.

Der direkte Vergleich von N_X und N_{fus} zeigt deutliche Unterschiede. Während der Anteil der doppeltmarkierten Liposomen N_X (rote Kurve in Abb. 3.14) direkt nach dem Mischen der Liposomen ansteigt, ist der Anstieg von N_{fus} (schwarze Kurve in Abb. 3.14), dem Anteil der fusionierten Liposomen, verzögert. Dieser Unterschied weist auf eine Population N_{doc} von Liposomen hin, die bereits miteinander interagieren, aber deren Lipide noch nicht miteinander vermischt sind und die hier als gedockte Liposomen bezeichnet werden:

$$N_{doc} = N_X - N_{fus} \quad [3.9] \quad .$$

Der Anteil der gedockten Liposomen steigt ca. 2 min nach Mischen der Liposomen auf bis zu 50% und fällt dann auf 0 ab (Abb. 3.14 c und d). Dies lässt sich als Hinweis auf die Existenz eines metastabilen gedockten Zustandes unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen werten. Die Verzögerung der Docking-Kurve im Vergleich zur Fusionskurve spiegelt sich auch in den Zeitkonstanten wider, die sich für biexponentielle Anpassungen an die Kurven ergeben. Für das Docking beträgt die Konstante 70 s, für die Fusion 840 s.

Die hier gezeigten Ergebnisse werden durch die Ergebnisse der Photonenburstanalyse gestützt. Hier sind 2 min nach Mischen der Liposomen ebenfalls korrelierte Photonenbursts zu beobachten, die die typischen Photonenverhältnisse von gedockten Liposomen aufweisen (Abb. 3.4 b). Die Verzögerung zwischen Docking und Fusion ist auch im Vergleich von Abb. 3.5 und Abb. 3.6 erkennbar. Während in Abb. 3.5 bereits ein deutli-

KAPITEL 3.3

cher Anstieg der Kreuzkorrelationsamplitude erkennbar ist, ist die Fluoreszenzabklingkurve in Abb. 3.6 unverändert.

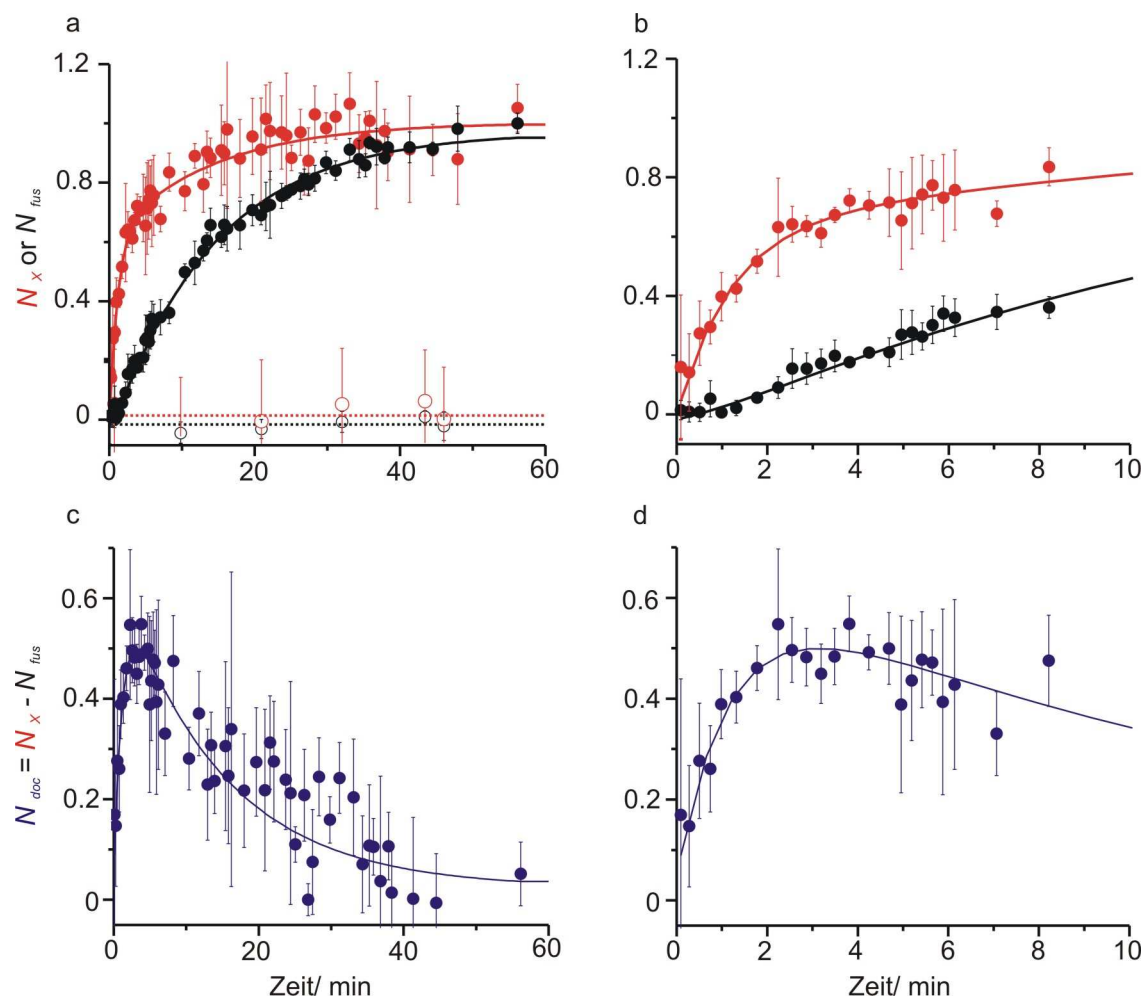


Abb. 3.14: Kinetik von Docking und Fusion.

Es wurden Oregon Green (1.5%)-markierte Liposomen, die mit dem ΔN -Komplex rekonstituiert waren, mit Texas Red (1%)-markierten Liposomen fusioniert, die mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren.

Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung über 90s und von zwei unabhängigen Messungen an (siehe auch Abb. 3.7). (a) Vergleich der normierten Anzahl an fusionierten Liposomen (N_{fus} , schwarze Punkte) mit der Anzahl an gedockten und fusionierten Liposomen (N_x , rote Punkte). Kreise stehen für Experimente, in denen die Fusion durch Präinkubation mit einem löslichen Synaptobrevin 2-Fragment inhibiert wurde. (b) ist eine Vergrößerung der ersten 10 min der Daten in (a). (c) Der Unterschied in der Kinetik der Bildung von doppelmarkierten Liposomen N_x , und fusionierten Liposomen kann durch das Auftreten einer intermediären Population von gedockten Liposomen N_{doc} erklärt werden. (d) zeigt die ersten 10 min von (c) als Vergrößerung.

3.3.2 Anzahl der Fusionsrunden

Es ist aus Untersuchungen mit dem *Dequenching*-Assay bekannt, dass die Liposomen bei der SNARE-vermittelten Fusion mehrere Fusionsrunden durchlaufen können. Die Anzahl der Fusionsrunden wurde dabei aber nur indirekt durch den Vergleich mit Kalibrationsmessung bestimmt [153]. Mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist die Anzahl der Fusionsrunden hingegen direkt zugänglich. Die Anzahl der grünen und roten Liposomen wird unabhängig davon bestimmt, ob sie einfach- oder doppeltmarkiert sind (vgl. Gleichungen [3.7],[3.8] und Abb. 3.12). Deshalb ändert sich die Anzahl der auf einem Detektor gezählten Teilchen nicht, wenn ein rotes und ein grünes Liposom interagieren. Das resultierende doppeltmarkierte Teilchen wird immer noch als ein grünes auf dem grünen Detektor und ein rotes auf dem roten Detektor gezählt. Zu einer Änderung in der Anzahl der Liposomen kommt es nur, wenn ein bereits gedocktes oder fusioniertes Liposomenpaar mit einem oder mehreren weiteren Liposomen interagiert. In Abb. 3.15 a interagieren insgesamt zwei grüne und zwei rote Liposomen miteinander. Ursprünglich wurden also je zwei Teilchen auf jedem der Detektoren gezählt. Durch die mehrfache Interaktion der Liposomen reduziert sich diese Zahl auf eins. Aus der Verringerung der Anzahl der Liposomen während der Fusion lässt sich also abschätzen, wie viele Liposomen jeweils miteinander interagieren. In Abb. 3.15 b reduziert sich die Anzahl der Liposomen um 40-50%. Das heißt, dass im Mittel 3-4 Liposomen interagieren. Die Zahlen auf dem grünen und roten Detektor fallen gleich stark ab. Dies deutet daraufhin, dass grüne und rote Liposomen gleichermaßen an den Interaktionen beteiligt sind.

Aus dem Vergleich von Abb. 3.14 und Abb. 3.15 ergibt sich, dass die Bildung von mehrfach interagierenden Liposomen ca. sechsmal schneller ist als die Fusion. Aufgrund der in Abb. 3.3 gezeigten Photonenburstanalyse darf geschlossen werden, dass ein Großteil der gedockten Liposomen später auch fusioniert. Damit ergibt sich aus dem hier beobachteten Absinken der Teilchenzahlen, dass die Liposomen im Schnitt 1.8- 2 Fusionsrunden durchlaufen.

KAPITEL 3.3

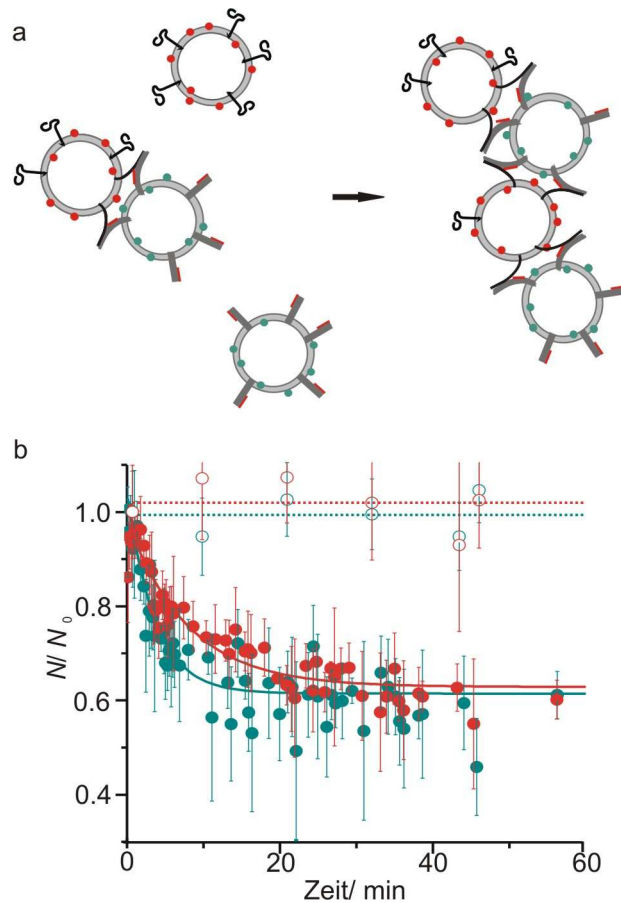


Abb. 3.15: Mehrfach interagierende Liposomen.

(a) Schematische Darstellung von einzelnen Liposomen und einem gedockten Liposomenpaar, die sich zu einem Liposomen-Aggregat zusammenlagern.

(b) Zeitliche Veränderung der Teilchenzahl N auf dem grünen (grüne Punkte) und roten (rote Punkte) Detektor während einer typischen Fusionsreaktion. Die Teilchenzahl N normiert mit der Teilchenzahl N_0 der Liposomen zu Beginn der Fusionsreaktion nimmt ab und weist deshalb auf mehrfach interagierende Liposomen hin. Die gezeigten Daten stammen aus denselben Messungen wie auch Abb. 3.14. Kreise zeigen die Teilchenzahlen für ein Experiment, in dem die Fusion durch Präinkubation mit einem löslichen Synaptobrevin 2-Fragment inhibiert wurde. Die Daten wurden mit einer monoexponentiellen Abklingkurve angepasst. Es ergab sich dabei eine Zeitkonstante von $\tau \approx 240\text{-}480$ s, was zeigt, dass die Liposomen schneller Mehrfachinteraktionen eingehen als fusionieren (Abb. 3.14, $\tau_2 = 840$ s).

3.3.3 Kinetik von Docking und Fusion

Um die Geschwindigkeit von Docking und Fusion quantitativ vergleichen zu können, wurden in Abb. 3.14 zunächst biexponentielle Funktionen an die Kurven angepasst. Es ergaben sich Konstanten von $\tau_1 = 70$ s für das Docking und $\tau_2 = 840$ s für die Fusion.

ERGEBNISSE

Diese Konstanten sind als eine Abschätzung zu verstehen. Die Funktionen wurden ohne Annahmen über den zugrundeliegenden Mechanismus gewählt.

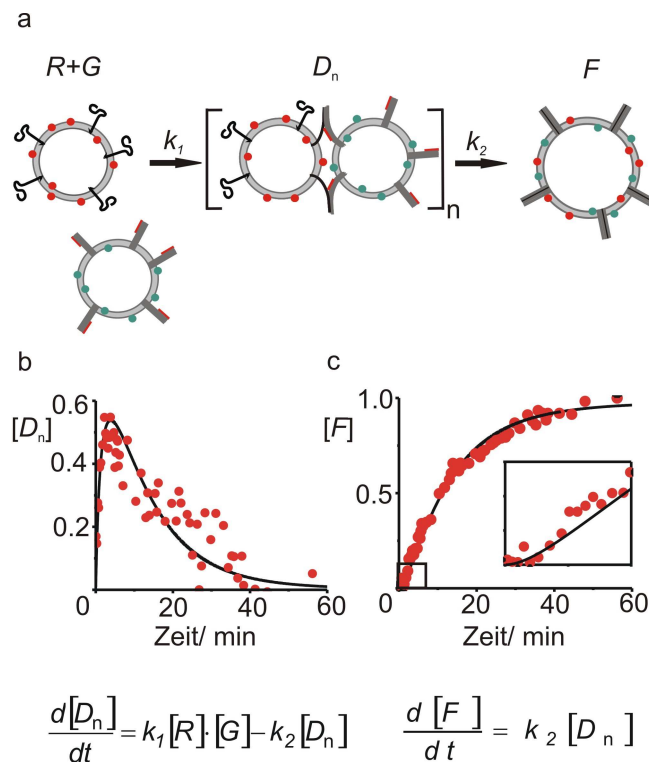


Abb. 3.16: Kinetisches Modell für eine Fusionsreaktion von Liposomen rekonstruiert mit einem stabilisierten SNARE-Akzeptor-Komplex (ΔN-Komplex) und Synaptobrevin 2.

(a) Reaktionsschema für einen zweistufigen Fusionsmechanismus. Einzelne grüne (G) und rote (R) Liposomen interagieren und bilden eine intermediäre Zwischenstufe (D_n) mit einer Geschwindigkeitskonstante $k_1 = 1/\tau_1$. D_n schließt alle einfach- und mehrfach interagierenden Liposomen ein. Aus dem Intermediat D_n werden dann die fusionierten Liposomen (F) mit der Geschwindigkeitskonstante $k_2 = 1/\tau_2$ gebildet. (b) und (c): Schwarze Linien: Numerische Lösungen der Differentialgleichung mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 100\text{s}$ und $\tau_2 = 600\text{s}$. Rote Punkte: Experimentelle Werte für gedockte (b) und fusionierte Liposomen (c).

Die Daten lassen sich jedoch auch nach einem zweistufigen Kinetik-Modell interpretieren. Hierzu wurde das am einfachsten vorstellbare Modell gewählt: Es wird angenommen, dass sich jeweils ein grünes und ein rotes Liposom („G“ und „R“) zu einem gedockten, metastabilen Intermediat („D“) zusammenfinden, aus dem sich dann ein fusioniertes Liposom („F“) bildet (Abb. 3.16 a). Das Differentialgleichungssystem, das sich für dieses Modell ergibt, ist analytisch nicht lösbar:

KAPITEL 3.3

$$\frac{d[G]}{dt} = -k_1[G] \cdot [R] \quad [3.10]$$

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_1[G] \cdot [R] \quad [3.11]$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_1[G] \cdot [R] - k_2[D] \quad [3.12]$$

$$\frac{d[F]}{dt} = k_2[D] \quad [3.13] \quad .$$

Numerische Lösungen der Gleichungen wurden an die experimentellen Daten angepasst (Abb. 3.16 b und c). Sie beschreiben den für die Fusionskurve beobachteten verzögerten Anstieg besser als die biexponentielle Funktion. Für die beiden Zeitkonstanten ergeben sich Werte von $\tau_1 = 100$ s und $\tau_2 = 600$ s. Sie liegen damit in einem sehr ähnlichen Bereich, wie auch die aus der biexponentiellen Anpassung bestimmten Konstanten. Aus den hier bestimmten Zeitkonstanten für das Docking $\tau_1 = 100$ s lässt sich nach der Theorie von Smoluchowski berechnen, dass die Liposomen ca. 10^5 Mal kollidieren, bevor sie einen gedockten Zustand eingehen [154].

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Werte der Konstanten von den verwendeten SNARE-Proteinen, der Liposomen-Konzentration, der SNARE-Dichte und dem Protein: Lipid-Verhältnis abhängig sind und der ganz spezielle Kinetik der hier betrachtete Fusionsreaktion entsprechen. Die Abhängigkeit von der Liposomen-Größe wird im nächsten Kapitel noch genauer betrachtet.

In den hier gezeigten Experimenten ist ein stabilisierter Q-Akzeptor-Komplex zum Einsatz gekommen. Der Komplex besteht aus den beiden Q-SNAREs SNAP-25A und Syntaxin-1A, sowie dem Fragment (AS 49-96) aus Synaptobrevin 2. Dieses Fragment muss zunächst aus dem Komplex verdrängt werden, bevor der Komplex vollständig assemblieren und die Fusion initiieren kann [89]. Die Stelle des Komplexes, an die das Synaptobrevin der gegenüberliegenden Membran bindet, ist jedoch frei. So können die Liposomen mittels dieser Bindung docken. Die Verzögerung der Fusion gegenüber dem Docking ist also vermutlich auf die Verdrängung des stabilisierenden Fragments zurückzuführen.

ERGEBNISSE

In Kapitel Abb. 3.15 wurde gezeigt, dass die Liposomen ca. zwei Fusionsrunden durchlaufen und dass während der Reaktion mehrfach gedockte Liposomen („ D_n “) auftreten (Abb. 3.15). Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Anwendbarkeit von Gleichungen [3.10]-[3.13], wie im Folgenden gezeigt werden soll. Die intermediäre Spezies wird dazu so definiert, dass sie alle mehrfachinteragierenden Liposomen miteinschließt („ D_n “). Außerdem werden folgende Annahmen gemacht:

1. Docking tritt immer vor der Fusion auf, d.h. fusionierte Liposomen docken nicht mehr. Diese Annahme ist gerechtfertigt, weil gezeigt wurde, dass das Docking sehr viel schneller als die Fusion ist (Vergleiche Abb. 3.14 und Abb. 3.15)
2. Die Liposomen gehen einfache und mehrfache Interaktionen gleich schnell ein.
3. Die Geschwindigkeitskonstante der Fusion k_2 hängt nicht von der Art des gedockten Intermediates ab (mehrfach oder einfachgedockt).

Wenn von maximal zwei Docking-Runden ausgegangen wird, so können die folgenden Intermediate auftreten:



Hier sind G grüne und R rote Liposomen. Mit D ist ein gedocktes Paar aus genau einem grünen und einem roten Liposom gemeint.

Die Bildungs- und Zerfalls-Kinetik der einzelnen intermediären Spezies kann mit den folgenden Differentialgleichungen beschrieben werden. Hier ist k_1 die Ratenkonstante des Dockings und k_2 die Ratenkonstante der Fusion:

$$\frac{d[D]}{dt} = k_1[R][G] - k_1[R][D] - k_1[G][D] - k_1[D]^2 - k_2[D] \quad [3.18]$$

KAPITEL 3.3

$$\frac{d[GD]}{dt} = k_1[G][D] - k_2[GD] \quad [3.19]$$

$$\frac{d[RD]}{dt} = k_1[R][D] - k_2[RD] \quad [3.20] \quad .$$

$$\frac{d[DD]}{dt} = k_1[D]^2 - k_2[DD] \quad [3.21] \quad .$$

Das Intermediat D_n schließt alle gedockten Spezies ein:

$$D_n = D + RD + GD + DD \quad [3.22] \quad .$$

Die Bildung und der Zerfall von D_n kann dann folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{d[D_n]}{dt} = \frac{d[D]}{dt} + \frac{d[GD]}{dt} + \frac{d[RD]}{dt} + \frac{d[DD]}{dt} \quad [3.23] \quad .$$

Unter Berücksichtigung von Gleichungen [3.18]-[3.21] ergibt sich so:

$$\frac{d[D_n]}{dt} = k_1[R][G] - k_2[D_n] \quad [3.24] \quad .$$

Diese Gleichung ist völlig analog zu [3.12].

Der Beweis wurde hier für zwei Docking-Runden geführt, weil dies auch die durchschnittliche Anzahl von Interaktionsrunden in Abb. 3.15 war. Er lässt sich aber auf eine beliebige Anzahl von Runden erweitern.

ERGEBNISSE

3.3.4 Einfluss der Größe der Liposomen auf die Fusion

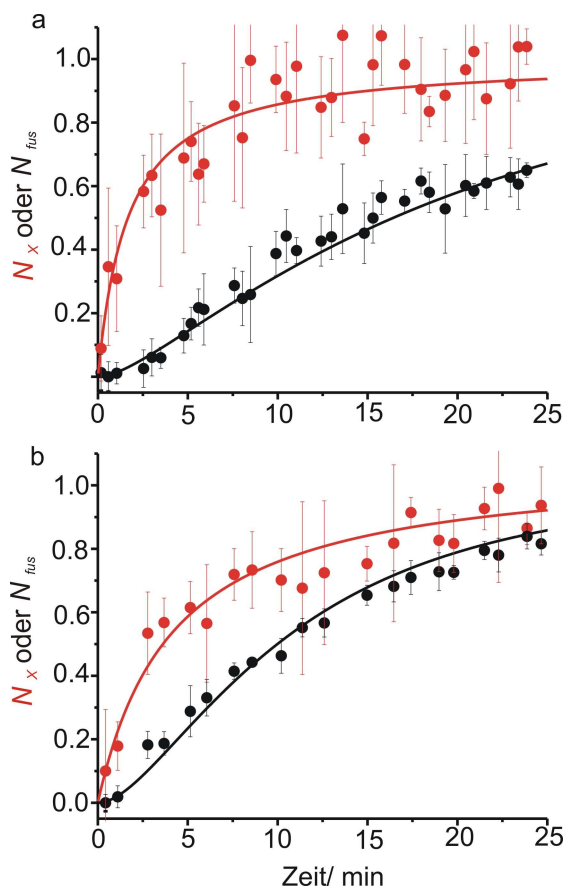


Abb. 3.17: Vergleich von Liposomen verschiedener Größe.

Normierte Anzahl der fusionierten (N_{fus} , schwarz) und gedockten Liposomen (N_x , rot) einer Fusion von Liposomen, die den ΔN -Komplex enthielten (markiert mit 0.5 % Oregon Green), mit Liposomen, die mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren (markiert mit 1 % Texas Red). Das Verhältnis von Proteinen zu Lipiden betrug 1:500, die Reaktion wurde bei 35°C durchgeführt. Die Durchmesser der Liposomen betrug in (a) ca. 100 nm und in (b) ca. 30 nm. Die Linien sind Anpassungen nach dem in Abb. 3.16 vorgestellten kinetischen Modell.

Die Krümmung einer Membran und die daraus resultierende Membranspannung kann die Geschwindigkeit der Membranfusion maßgeblich beeinflussen [5]. Um diesen Einfluss für die hier untersuchte Fusion von Proteoliposomen zu bestimmen, wurde die Fusion von Liposomen mit einem Durchmesser von 30 nm (so wie so auch in Abb. 3.14 Verwendung fanden) mit der Fusion von Liposomen mit einem Durchmesser von 100 nm verglichen (Abb. 3.17). In diesen Reaktionen wurden niedrigere Proteinkon-

KAPITEL 3.4

zentrationen verwendet als in Abb. 3.14, weil die Rekonstitution des ΔN -Komplexes in die größeren Liposomen zu sehr breiten Größenverteilungen führt. Während die Geschwindigkeit des Dockings für beide Fälle vergleichbar ist, ist ein deutlicher Unterschied in der Fusionskurve zwischen kleinen und großen Liposomen zu erkennen. Die Anfangsphase, in der die Fusionskurve zunächst nicht ansteigt, ist bei den größeren Liposomen ca. zwei- bis dreimal länger als bei den kleinen. Dies lässt vermuten, dass die Stabilität des gedockten Intermediates durch die Größe der Liposomen beeinflusst wird. Der Vergleich ist an dieser Stelle qualitativer Natur. Für einen quantitativen Vergleich müsste sicher gestellt werden, dass die Liposomen tatsächlich mit derselben Konzentration an Proteinen rekonstituiert waren. Dies ist hier jedoch ausgeblieben.

3.4 Einfluss von Complexin 2 auf die Fusion

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass mit dem hier vorgestellten Assay die Detektion eines gedockten Zustandes möglich ist und, dass für die speziellen, in dieser Arbeit verwendeten Proteine ein solcher Zustand als metastabiles Intermediat vor der Fusion auftritt. Membranen in einem gedockten Zustand sind auch ein Schlüsselintermediat in der neuronalen Exozytose. Wie bereits in diversen Arbeiten einschließlich der vorliegenden gezeigt, sind die SNARE-Proteine allein ausreichend, um Membranen zu fusionieren. Bei der neuronalen Exozytose kommt es aber nicht nur darauf an, dass das Neurotransmitter-geladene Vesikel mit der Plasmamembran verschmilzt, sondern dieser Prozess muss auch schnell und vor allem zum richtigen Zeitpunkt ablaufen. Es wird deshalb vermutet, dass die Fusionsmaschine zu einem Zeitpunkt knapp vor der Fusion gestoppt wird und das Vesikel in einem hochfusogenen Zustand darauf wartet, dass das Ca^{2+} -Signal eintrifft. Zu den regulatorischen Proteinen, die den Prozess zu diesem späten Zeitpunkt beeinflussen, gehört neben dem Synaptotagmin auch das Complexin. Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung, auch in Experimenten mit Proteoliposomen [155], wurde Complexin als *fusion clamp* diskutiert. Damit ist gemeint, dass es an den SNARE-Komplex bindet und so seine vollständige Assemblierung verhindert, wodurch die Fusion bis zum Eintreffen des Ca^{2+} -Signals aufgehalten wird. Ein Einfluss des Complexins auf den gedockten Zustand sollte mit dem hier präsentierten Assay gut zugänglich sein.

ERGEBNISSE

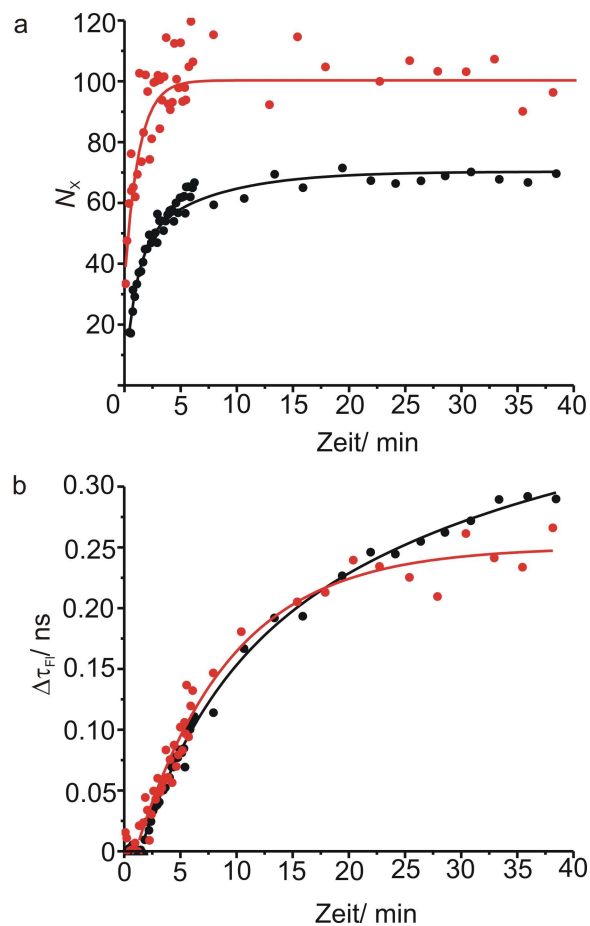


Abb. 3.18: Einfluss von Complexin 2 auf die Kinetik von *Docking* und Fusion. Gemischt wurden Oregon Green-markierte Liposomen rekonstituiert mit dem ΔN -Komplex mit Texas Red-markierten Liposomen rekonstituiert mit Synaptobrevin 2 unter Zugabe von Complexin (rot) und ohne Complexin (schwarz, 1 μM). (a) Anteil der interagierenden (doppeltmarkierten) Liposomen an der Gesamtzahl der grün markierten Liposomen. (b) Änderung der Fluoreszenzlebensdauer durch Fusion.

Einer Fusionsreaktion von Liposomen, die den ΔN -Komplex enthielten mit Liposomen, die mit Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren, wurde Complexin 2 zugesetzt. Es wurde die Anzahl der doppeltmarkierten Teilchen sowie die Fluoreszenzlebensdauer der Probe mit und ohne Complexin 2 verglichen. Wie Abb. 3.18 a zeigt, erhöht die Zugabe von Complexin 2 die Geschwindigkeit, mit der doppeltmarkierte Teilchen gebildet werden, wie auch die Gesamtzahl der doppeltmarkierten Teilchen. Während der Wert für die Reaktion ohne Complexin nur ca. 60 % erreicht, steigt er für die Reaktion unter Zugabe von Complexin auf 100%. Erstaunlich ist, dass trotz dieses deutlichen Effekts in der Kreuzkorrelationsanalyse, die Zugabe von Complexin praktisch keinen Einfluss auf die

KAPITEL 3.5

Fluoreszenzlebensdauer hat. Allenfalls ist eine leichte Verringerung der Geschwindigkeit für Fusionszeiten länger als 30 min zu erkennen.

Dies spricht gegen den direkten Einfluss von Complexin auf ein Fusionsintermediat. Eine Erklärung für den großen Anstieg der Kreuzkorrelation liefert das durch Complexin induzierte Clustering der Liposomen, wie im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben wird.

3.5 Interaktion von Complexin 2 mit Membranen

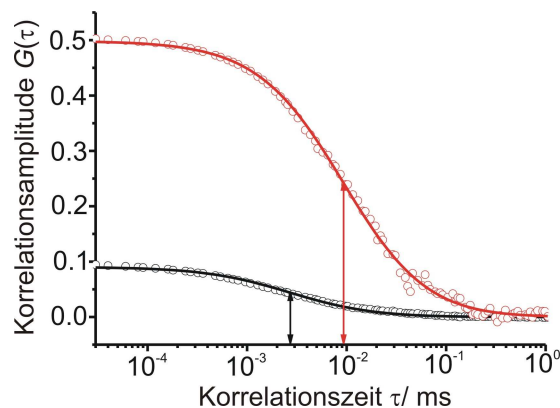


Abb. 3.19: Autokorrelationskurven für fluoreszenzmarkierte Proteoliposomen.

Typische Autokorrelationskurve für Oregon Green- markierte Liposomen rekonstituiert mit dem ΔN -Komplex (schwarz) und einer Probe derselben Liposomen-Präparation nach Zugabe von 1 μM Complexin 2 (rot). Die Interaktion der Liposomen führt zu einer Abnahme der Teilchenzahl, die eine Erhöhung der Autokorrelationsamplitude hervorruft. Außerdem erhöht sich die Diffusionszeit der Partikel, hier durch die Pfeile markiert. Aus der Gesamtanzahl der gezählten Photonen und der Teilchenzahl lässt sich die Teilchenhelligkeit berechnen. Linien sind nach Gleichung [2.5] gefittete Kurven. Die Messzeit betrug 10 s.

Aufgrund der Untersuchung des Einflusses von Complexin auf die Fusion von Proteoliposomen (Abb. 3.18) wurde vermutet, dass Complexin auch unabhängig von SNARE-induzierten Fusionsintermediaten zu einer Interaktion der Liposomen führen kann. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Liposomen-Präparationen in An- und Abwesenheit von Complexin 2 mit FCS untersucht. Es wurden in einer Autokorrelations-

ERGEBNISSE

Analyse alle Parameter ausgewertet, die die Anzahl und die Größe der detektierten Teilchen widerspiegeln: die Korrelationsamplitude, die Helligkeit der Teilchen und die Diffusionszeit (Abb. 3.19). All diese Parameter werden durch ein Clustering der fluoreszierenden Teilchen beeinflusst.

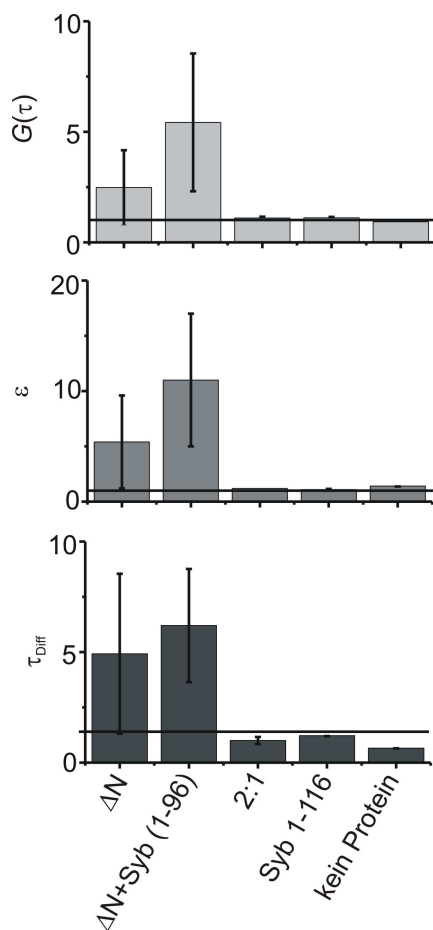


Abb. 3.20: Vergleich von Parametern, die Clustering zeigen.

Liposomen, die mit den angegebenen Proteinen rekonstituiert waren, wurden mindestens 10 min bei Raumtemperatur mit 1 μM Complexin 2 inkubiert. Nur die Liposomen, die einen teilweisen oder vollständig assemblierten ternären SNARE-Komplex enthielten, zeigten einen signifikanten Anstieg der Autokorrelationsamplitude, der Teilchenhelligkeit und der Diffusionszeit. Die Werte sind Mittelwerte aus 18-25 Einzelmessungen (je 10 s) und normiert auf den entsprechenden Wert des Parameters ohne Complexin. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert.

Die untersuchten Liposomen enthielten:

- Den ΔN -Komplex, und damit einen Teil des assemblierten SNARE-Komplexes,

KAPITEL 3.5

- den Δ N-Komplex präinkubiert mit dem Fragment Synaptobrevin 1-96 und damit ein vollständig assembliertes SNARE-Motiv,
- einen Komplex aus SNAP-25A und Syntaxin 1A (2:1-Komplex),
- Synaptobrevin 2 oder
- kein Protein.

Nur die beiden Proben, die Liposomen mit dem Δ N-Komplex oder dem ganzen assemblierten SNARE-Motiv enthalten, zeigt einen Effekt bei Zugabe von Complexin. Zu beobachten war ein Anstieg der Korrelationsamplitude und damit ein Abfall der Teilchenzahl, sowie eine Erhöhung von Teilchenhelligkeit und der Diffusionszeit (Abb. 3.20), beides Hinweise für eine Vergrößerung der Teilchen. Insgesamt lässt sich für diese beiden Proben schließen, dass die Zugabe von Complexin zu der Bildung von Liposomen-Clustern führt. Die hohen Fehlerbalken für geclusterte Proben sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass durch das Clustering eine sehr polydisperse Mischung von Teilchen entsteht.

Dass der Clustering-Effekt nur in Anwesenheit des assemblierten SNARE-Motivs zu beobachten ist, erstaunt nicht. Offensichtlich ist die gut charakterisierte Bindung von Complexin an den ternären SNARE-Komplex Voraussetzung für das Clustering. Damit es zu einem Clustering kommt, muss Complexin jedoch noch eine zweite Interaktion mit den Liposomen eingehen können. Als Bindungspartner bleiben hier eigentlich nur die Phospholipide. Complexin 2 muss also eine Domäne haben, die Membranen binden kann. Da es sich um ein recht kurzes Protein handelt, können die in Frage kommenden Bereiche leicht eingegrenzt werden. Der Mittelteil des Proteins (ca. AS 26- 83) ist die SNARE-Bindungsdomäne. Für eine mögliche Interaktion mit Membranen bleiben deshalb nur die beiden ca. 30 und 50 Aminosäuren langen Domänen am N- und C-Terminus des Proteins.

Es wurden verschiedene Deletions-Mutanten von Complexin 2 hergestellt, die entweder nur die N-terminale Domäne und den mittleren Teil (AS 1-83), die C-terminale Domäne und den mittleren Teil (AS 26-134) oder nur den mittleren Teil (AS 26-83) enthielten. Außerdem wurde eine Doppelpunktmutation eingeführt (K69AY70A), von der aus der Literatur bekannt war, dass sie die SNARE-Bindung unterbricht (Abb. 4.1, [156]).

ERGEBNISSE

Auch für diese Complexin-Fragmente wurde der Einfluss auf das Clustering von Liposomen, die mit einem teilweise oder vollständig assemblierten SNARE-Komplex rekonstituiert waren, mit FCS untersucht. Das Experiment wurde etwas anders durchgeführt als in Abb. 3.23. Es wurden Oregon-Green markierte Proteoliposomen mit proteinfreien, Texas Red-markierten Liposomen gemischt. In einer Autokorrelationsanalyse wurden wie oben für sowohl für den grünen als auch den roten Detektor die Korrelationsamplitude, die Teilchenhelligkeit und die Diffusionszeit bestimmt. Es zeigt sich, dass neben dem Wildtyp-Complexin (AS 1-134) das Fragment mit der C-terminalen Domäne (AS 26-134) das einzige ist, das diese Parameter beeinflusst. Auch für die Punktmutante wurde kein Effekt beobachtet. Dies deckt sich mit der Beobachtung aus Abb. 3.20, dass die Bindung von Complexin an den ternären SNARE-Komplex notwendig für das Clustering ist.

Aus den Experimenten lässt sich außerdem schließen, dass Complexin 2 tatsächlich über eine Membraninteraktion die Liposomen verbindet. Denn die Effekte sind gleichermaßen auf dem grünen und roten Detektor zu sehen. Dies ist nur durch eine Beteiligung der roten, proteinfreien Liposomen an den Clustern zu erklären. Außerdem wurde in Abb. 3.21 d die Anzahl der doppeltmarkierten Teilchen bestimmt. Auch hier zeigt sich, dass grüne und rote Liposomen an den Clustern beteiligt sind. Ein Anstieg der Anzahl doppeltmarkierter Teilchen ist ausschließlich für die Proben zu beobachten, die auch einen Effekt in der Autokorrelations-Analyse hervorrufen.

In den Experimenten wurden sowohl Liposomen getestet, die mit dem ΔN -Komplex rekonstituiert waren (offene Balken) als auch Liposomen, die einen ternären SNARE-Komplex enthielten (gefüllte Balken). Der ternäre Komplex enthält alle vier SNARE-Motive und die beiden Transmembrandomänen von Syntaxin 1A und Synaptobrevin 2. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben ist nicht zu erkennen.

KAPITEL 3.5

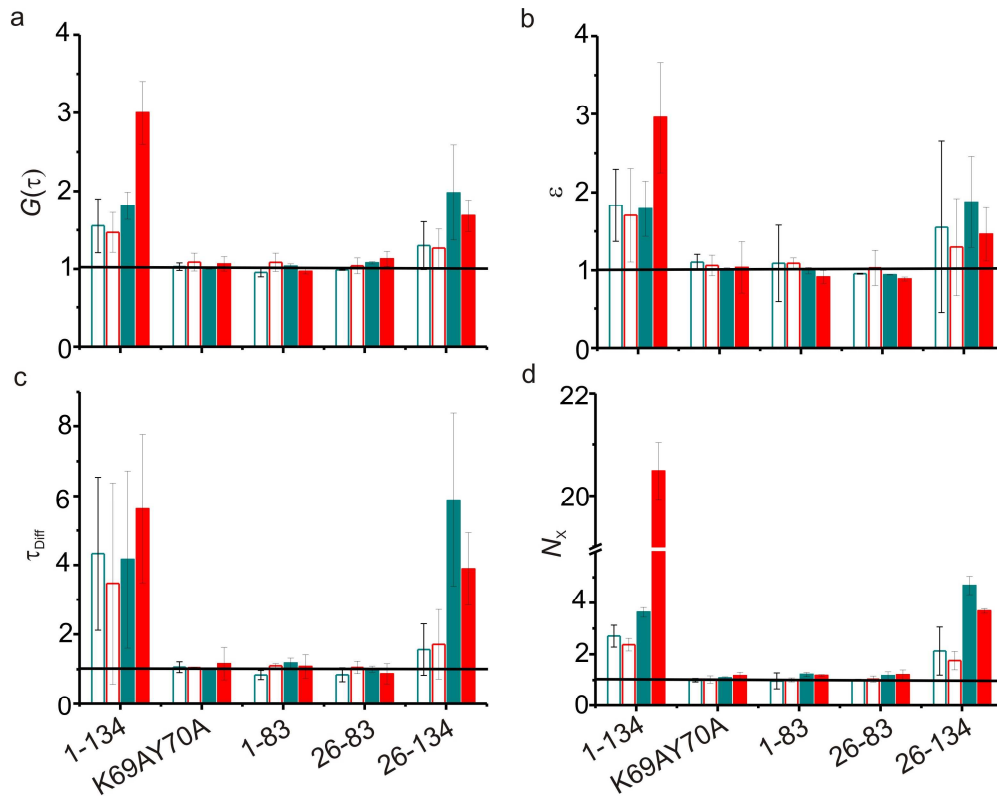


Abb. 3.21: Complexin 2 kann Membranen quervernetzen.

Oregon Green-markierte Liposomen, die entweder mit dem ΔN -Komplex (offene Balken) oder mit einem ternären SNARE-Komplex, der Synaptobrevin 2 1-116 enthielt (geschlossene Balken), rekonstituiert waren, wurden mit proteinfreien, Texas Red-markierten Liposomen inkubiert. Den Liposomen wurde Wildtyp-Complexin 2 (1-134) sowie die Complexin 2 –Fragmente AS 1-83, 26-83, 26-134 und eine Mutante, die den SNARE-Komplex nicht bindet (K69AY70A) zugesetzt. Parameter, die Aggregation anzeigen (Korrelationsamplitude (a), Teilchenhelligkeit (b), Diffusionszeit (c), Kreuzkorrelation (d)) wurden für den roten (rote Balken) und grünen (grüne Balken) Detektor bestimmt.

Um auszuschließen, dass eine hydrophobe Interaktion der Fluoreszenzmarker das Clustering verursacht, wurde außerdem der Einfluss der verschiedenen Complexin-Mutanten auf das Clustering von unmarkierten Liposomen, die mit dem ΔN -Komplex rekonstituiert waren, untersucht (Abb. 3.22). Es wurden hierzu die Größenverteilungen der Proben mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Auch hier war eine Verschiebung der Größenverteilung zu größeren Radii nur für Wildtyp-Complexin (AS 1-134) und das C-terminale Fragment (AS 26-134) zu beobachten.

ERGEBNISSE

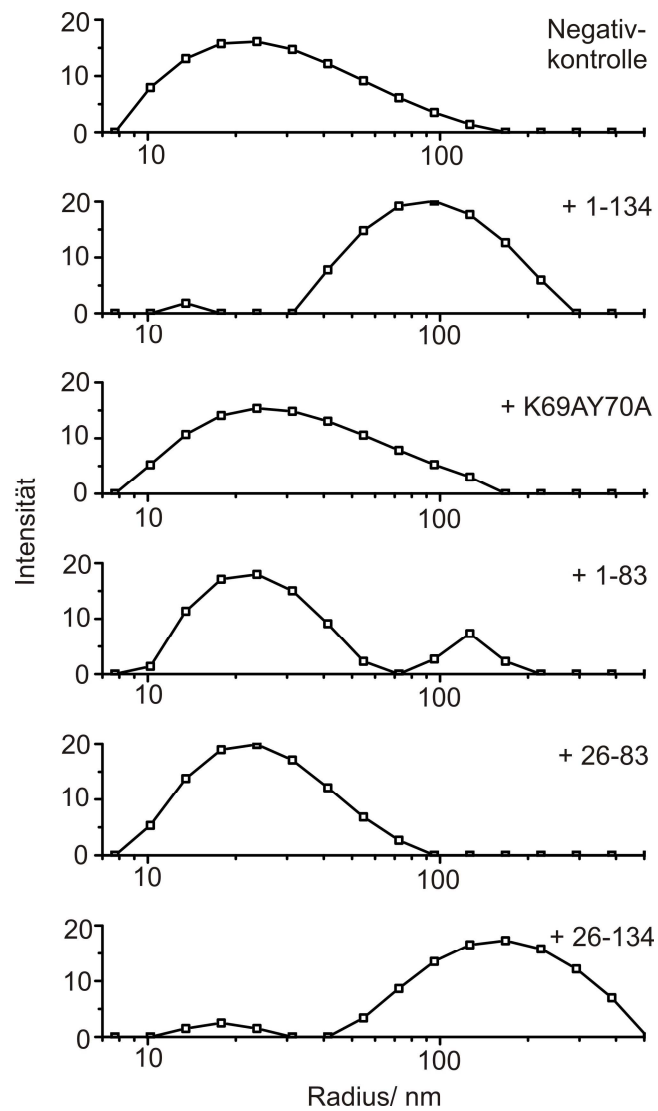


Abb. 3.22: Nachweis von Liposomen-Clustern durch dynamische Lichtstreuung.

Unmarkierte Liposomen, die mit dem ΔN -Komplex rekonstituiert waren, wurden mit dem Wildtyp und unterschiedlichen Mutanten von Complexin 2 inkubiert. Die Konzentration von Complexin 2 war $1 \mu\text{M}$, mit der Ausnahme von Complexin 2 26-134 ($0.2 \mu\text{M}$). Die Histogramme sind typische Intensitätsverteilungen von je 15 Einzelmessungen (4 s).

4 Diskussion

4.1 Assay zur Unterscheidung von Docking und Fusion

Seit langer Zeit werden Studien an Proteoliposomen zur SNARE-vermittelten Membranfusion durchgeführt. Dabei wird bei der üblichen Methode die Fusionsgeschwindigkeit über die Veränderung der FRET-Effizienz zwischen Lipid-verankerten Fluorophoren gemessen. Die vor der eigentlichen Fusion liegenden Schritte, vor allem das Ausbilden eines stabilen Kontaktes zwischen den Membranen, sind schlecht untersucht. Nur ein tieferes Verständnis dieser Intermediate erlaubt aber den Einfluss von regulatorischen Proteinen auf die Fusion richtig zu interpretieren und Aussagen zu treffen, die auch auf biologische Systeme zu übertragen sind.

Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode wurde auf diesen gut etablierten Liposomen-Assay zurückgegriffen. Wie beim ursprünglichen Ansatz wurde die Fusion über die Änderung der FRET-Effizienz zwischen den Lipid-verankerten Fluorophoren gemessen. Darüber hinaus wurde mit der FCCS eine Technik verwendet, die die Bestimmung der Eigenschaften einzelner Partikel und damit auch die Detektion der Interaktion von nicht fusionierten, „gedockten“ Liposomen erlaubt.

Um eine Grundlage für weitere Anwendungen des Assays sowie seine Weiterentwicklung zu schaffen, wurde eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals systematisch der Einfluss der verwendeten Fluorophore untersucht. Es wurde gezeigt, dass die bestimmte Fusionsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration des Donor-Fluorophors (Abb. 3.11), der Verteilung der beiden Fluorophore auf den Membranen (Dequenching oder FRET-Ansatz) und der Art des FRET-Paares war (Abb. 3.10). Es wurde überprüft, dass die verwendeten Gleichungen zur Bestimmung der Teilchenzahlen von einfach- und doppelmarkierten Liposomen anwendbar sind, obwohl es sich bei den Liposomen um Teilchen mit einer nicht monodispersen Größenverteilung handelt (Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl die Fluoreszenzlebensdauer, als auch die berechnete Kreuzkorrelation linear von der Anzahl der fusionierten bzw. doppelmarkierten Liposomen abhängt (Abb. 3.8 und Abb. 3.13). Damit ist der direkte Vergleich der beiden Parameter, bzw. der aus ihnen berechneten Zahlen N_{fus} und N_X zulässig und kann zur Berechnung der Anzahl der gedockten Liposomen herangezogen werden.

KAPITEL 4.1

In der Einleitung wurden bereits mehrere Methoden vorgestellt, die die Beobachtung von gedockten Membranen bei der SNARE-vermittelten Membranfusion *in vitro* möglich machen. Zwei von ihnen beruhen ebenfalls auf der Verwendung von fluoreszenzmarkierten, mit SNARE-Proteinen rekonstituierten Proteoliposomen: die Fusion eines immobilisierten Liposoms mit einem in Lösung befindlichen, sowie die Fusion von Liposomen mit Festkörper-unterstützten Membranen. In beiden Fällen wird die Fusion einzelner Liposomen mittels TIRF-Mikroskopie verfolgt. Die Methoden können deshalb ebenso als Einzelpartikeldetektion verstanden werden, wie die in der vorliegenden Arbeit angewendete Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie. Die kombinierte Fluoreszenzlebensdauer/FCCS-Analyse weist ihnen gegenüber jedoch einige grundsätzliche Vorteile auf:

- Es kann auf gut etablierte Protokolle zur Herstellung der Liposomen zurückgegriffen werden. Die nach diesen Protokollen hergestellten Liposomen sind umfassend charakterisiert worden. Es kann eine große Anzahl verschiedener Membranproteine rekonstituiert werden. Die Membrankrümmung der Liposomen kann durch die Herstellung von Liposomen mit verschiedenem Durchmesser variiert werden. Die Rekonstitution von Proteinen in Membranen, die durch Oberflächen unterstützt werden, ist nicht notwendig. Daher sind keine Artefakte durch die Immobilisierung Liposomen oder durch die Interaktion einer der Membranen mit Oberflächen zu erwarten.
- Durch die Detektion von bis zu 100 Teilchen gleichzeitig ist es möglich, Docking- und Fusionsgeschwindigkeit mit hoher statistischer Genauigkeit und gleichzeitig hoher Zeitauflösung zu bestimmen. Bei den anderen beiden Methoden werden hingegen einzelne Fluoreszenzspuren fusionierender Liposomen ausgewertet. Die Ergebnisse stützen sich auf die aufwendige Analyse von wenigen hundert dieser Fusionsereignisse.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode stellt damit ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung der einzelnen Schritte der Liposomenfusion dar. Das Prinzip, die Kombination von FCCS und Lebensdauer-Analyse, lässt sich grundsätzlich auch auf die Detektion eines weiteren möglichen Fusionsintermediates, den hemifusionierten Zustand, übertragen. Hierzu müsste das Farbstoffsystem um einen weiteren Marker für den Inhalt des Vesikel ergänzt werden. Insgesamt stellt die vorliegende Arbeit einen Startpunkt für eine Reihe von interessanten möglichen Anwendungen und

DISKUSSION

technischen Weiterentwicklungen dar. Dabei kann auf die sorgfältig abgesicherte und kalibrierte Technik zurückgegriffen werden.

4.2 Die Geschwindigkeit von Docking und Fusion

Wodurch wird nun der genaue Verlauf der Docking- und Fusionskurve (Abb. 3.16) bestimmt? Zunächst einmal befinden sich die Liposomen in Lösung. Geht man von unmittelbarer und idealer Durchmischung der beiden Fusionspartner aus, so müssen sie trotzdem erst einmal in der Lösung aufeinander stoßen. Dieser Prozess wird durch Diffusion kontrolliert. Von Schütte et al. wurde der Diffusionskoeffizient mit Hilfe von FCS zu $33 \cdot 10^9 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt [92]. Dieser Wert liegt in etwa in der Größenordnung der Diffusionskonstante, die sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung für ein 40 nm großes, kugelförmiges Teilchen ergibt. Aus dem Vergleich mit den in Abb. 3.16 bestimmten Zeitkonstanten für das Docking ergibt sich dann aber, dass ein Liposom durchschnittlich ca. 10^5 Mal mit einem anderen Liposom kollidiert, bevor die Kollision produktiv ist, also zu einer Interaktion führt. Dass sich bei Schütte et al. eine Zahl von 10^7 Kollisionen ergibt, kann auf die Verwendung eines anderen Q-SNARE-Komplexes zurückgeführt werden, wie im Folgenden noch erläutert wird. In jedem Fall ist die Diffusion der Liposomen nicht geschwindigkeitsbestimmend.

In den ersten Experimenten zur SNARE-vermittelten Fusion war die Bindung des Synaptobrevins an den Q-SNARE-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Da Synaptobrevin aktiv in den Proteoliposomen vorliegt [157], hängt die Geschwindigkeit, mit der der Kontakt hergestellt werden kann, maßgeblich von der Bildungsgeschwindigkeit des Q-SNARE-Akzeptor-Komplexes und von der Verfügbarkeit einer Bindungsstelle für das Synaptobrevin an diesem Komplex ab. Die Bindung von SNAP-25A an die geschlossene Form des Syntaxin verläuft sehr langsam [47]. Wenn die H_{abc} -Domäne des Syntaxin entfernt wird, ist die Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes stark erhöht [87]. Aber auch in diesem Fall ist die Bindung des Synaptobrevins blockiert. Es bildet sich aus den in der Membran rekonstituierten Q-SNAREs ein Komplex aus SNAP-25A und zwei Syntaxin 1A, bei dem das überzählige Syntaxin 1A die Bindungsstelle des Synaptobrevin einnimmt. Die Fusionsgeschwindigkeit kann deshalb stark erhöht werden, wenn der Q-SNARE-Komplex durch ein Synaptobrevin-Fragment stabilisiert wird, das an den C-terminalen Teil des SNARE-Motivs bindet. So

KAPITEL 4.2

bleibt die Bindungsstelle für das zweite Syntaxin blockiert. Synaptobrevin kann aber schnell am N-terminalen Ende mit dem SNARE-Komplex wechselwirken und eine Interaktion zwischen den beiden Liposomen herstellen, die sich in der FCCS-Analyse in einem Anstieg der Anzahl an doppeltmarkierten Teilchen, N_x , zeigt. Da das stabilisierende Fragment nur an einen Teil des SNARE-Komplexes bindet, ist seine Bindung schwach und es kann von dem auf der anderen Membran rekonstituierten Wildtyp-Synaptobrevin verdrängt werden [158].

Durch die Verwendung des stabilisierten Q-SNARE-Akzeptor-Komplexes (ΔN -Komplex) ergibt sich nun jedoch, dass ein neuer Schritt geschwindigkeitsbestimmend wird. Wie die Analyse in Abb. 3.16 zeigt, ist es nun die Verdrängung des stabilisierenden Synaptobrevin-Fragments, die am langsamsten verläuft. So kommt es zu einer Verzögerung der Fusion im Vergleich zum Docking. Diese Verzögerung ist hier natürlich rein künstlich herbeigeführt. Sie ist aber trotzdem aus mehreren Gründen bedeutsam:

- Es war durch die Verwendung des stabilisierten Akzeptor-Komplexes möglich, zu zeigen, dass mit dem hier vorgestellten Assay ein gedockter Zustand detektiert werden kann.
- Auch wenn es sich hier um eine künstliche Stabilisierung handelt, ist es gut möglich, dass *in vivo* ein Regulator in ganz ähnlicher Weise an den SNARE-Komplex bindet und so die Membranen in einem hochfusogenen Zustand festhält. Diese Möglichkeit wird im folgenden Kapitel noch ausführlicher besprochen.

Zu ganz anderen Ergebnissen bezüglich der Zeitkonstanten für Docking und Fusion und einer anderen Interpretation der Verzögerung zwischen diesen beiden Schritten kommt eine neue Untersuchung der Fusion von Liposomen mit planaren Membranen. Auch in dieser Arbeit wurde der stabilisierte Q-SNARE-Akzeptor-Komplex eingesetzt. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Konstante (600 s) liegt die berechnete Fusionsgeschwindigkeit bei 10-100 ms. Dies stellt die Ergebnisse grundsätzlich in Frage, denn allein die Halbwertszeit für die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments beträgt ca. 20 s [159]. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die Liposomen zwar SNARE-spezifisch docken, dann aber über einen SNARE-unabhängigen Mechanismus mit der Membran fusionieren. Die Autoren passen die Kinetik durch ein

DISKUSSION

Modell an, das von 6-9 elementaren Reaktionsschritten zwischen dem Docking und der Fusion ausgeht. Sie interpretieren diese Schritte als die Bildung mehrerer SNARE-Komplexe und folgen damit einem seit langer Zeit diskutierten Modell. Nach diesem Modell sind mehrere SNARE-Proteine ringförmig um die sich bildende Fusionspore angeordnet und nur die Bildung mehrerer SNARE-Komplexe gleichzeitig liefert genug Energie, um die Membranfusion anzutreiben [160]. Die Autoren lassen bei ihrer Interpretation die Verdrängungen des stabilisierenden Fragments völlig außer acht. Dies steht damit im Widerspruch zu der hier präsentierten Interpretation (Abb. 3.16), bei der die Verzögerung gerade auf diese Verdrängung zurückgeführt wird.

Dass die Bildung mehrerer SNARE-Komplexe für die Fusion von Proteoliposomen keine Rolle spielt, wurde in Experimenten gezeigt, in denen die Proteindichte der Liposomen auf bis zu 1:16 000 Protein:Lipid gesenkt wurde. Die Liposomen fusionierten, obwohl durchschnittlich weniger als ein SNARE-Protein auf einem Liposom verfügbar war [161]. Die Ergebnisse stützen damit die hier entwickelte Interpretation der Fusionskinetik (Abb. 3.16). Da die Fusionsgeschwindigkeit bei Verwendung des ΔN -Komplexes immer von der Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments als langsamsten Reaktionsschritt bestimmt wird, lässt sich daraus allerdings keine Aussage darüber treffen, ob durch die gleichzeitige Bildung mehrerer SNARE-Komplexe die Fusionsgeschwindigkeit erhöht werden kann. Insbesondere mag die synchrone Bildung mehrerer SNARE-Komplexe für die sehr schnelle Fusion bei der neuronalen Exozytose nötig sein.

Um den Einfluss der Membrankrümmung auf die Fusionskinetik zu bestimmen, wurde in Abb. 3.17 die im größten Teil der Arbeit verwendeten kleinen, 30-40 nm großen Liposomen mit ca. 100 nm großen verglichen. Dabei war die Kinetik des Dockings vergleichbar, während die Fusion für die größeren Liposomen verlangsamt war, insbesondere verlängerte sich die Anfangsphase, in der das Fusionssignal nicht steigt. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang mit Untersuchungen von PEG-induzierten Fusionen von Liposomen [162]. Hier führte die Vergrößerung des Radius der Liposomen zu einer deutlichen Verringerung der Geschwindigkeit der Fusion, gemessen als Vermischen der Inhalte der Liposomen. Auf das Vermischen der Lipide hatte der Liposomendurchmesser hingegen nur einen geringen Einfluss. Dies konnte später mit Berechnungen der Energiebarrieren zwischen den einzelnen Zuständen erklärt werden. Diese zeigen, dass vor allem der Übergang zwischen dem *fusion stalk*, also dem hemifusio-

KAPITEL 4.3

nierten Zustand, zur Öffnung der Fusionspore durch eine starke Krümmung bevorzugt ist. Der Effekt der Krümmung auf die Bildung des *fusion stalk* ist hingegen klein [163]. Ein größerer Einfluss wäre in unseren Experimenten also zu erwarten gewesen, wenn statt der Lipid-Marker ein Marker für den Inhalt der Liposomen verwendet worden wäre. Insgesamt unterstützen die in Abb. 3.17 gezeigten Experimente die These, dass die Membrankrümmung die Fusionsgeschwindigkeit entscheidend beeinflusst. Die Abschätzung der genauen Größenordnung des Effekts ist nicht trivial. Der Einfluss der Krümmung ist nur indirekt. Eigentlicher Grund für eine höhere oder niedrigere Fusionsgeschwindigkeit ist eine veränderte Membranspannung [164]. Diese ist aber stark von der spontanen Krümmung des eingesetzten Lipidgemisches abhängig. Eine quantitative Aussage ginge weit über die Aussagekraft der hier gezeigten Experimente und den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

4.3 Ausblick: Anwendungen des Assays

Die Fusion von Proteoliposomen bietet als Modellsystem weitreichende Möglichkeiten für die Untersuchung von biologischen Membranfusionen. Grundsätzlich können alle membrangebundenen Fusionsproteine in dieses System rekonstituiert und untersucht werden. Um tatsächlich Aussagen über den Mechanismus von biologischen Membranen machen zu können, muss zunächst das rekonstituierte System selber verstanden werden. Dazu reicht es nicht aus, den allerletzten Schritt der Fusionsreaktion, das Verschmelzen der Membranen, zu beobachten. Auch die davorliegenden Schritte müssen aufgeschlüsselt werden. Dies wird durch den hier vorgestellten Assay ermöglicht.

Die Erweiterung des Assays um ein zweites Farbstoffsystem würde ein weiteres Fusionsintermediat zugänglich machen, den Hemifusionszustand. Es wäre so möglich, gedockte, hemifusionierte, fusionierte, und mehrfach fusionierte Liposomen gleichzeitig zu beobachten und das in dieser Arbeit vorgestellte kinetische Modell weiter zu verfeinern. In Zukunft können mit dem Assay die Faktoren untersucht werden, die einzelne Fusionsintermediate fördern. Darunter sind bestimmte regulatorische Proteine, wie das Complexin und das Synaptotagmin, die Zusammensetzung der Membran und ihre Krümmung, aber auch Art und Länge der Transmembrandomänen der SNARE-Proteine. So wird es möglich sein, isoliert den Einfluss von Parametern zu studieren, die auch bei der neuronalen Exozytose eine Rolle spielen könnten. Vielleicht wird es auch

DISKUSSION

gelingen, die neuronale Exozytose *in vitro* als zweistufigen Mechanismus nachzustellen: Durch die Zugabe der richtigen Regulatoren wird die Fusion der SNARE-rekonstituierten Liposomen aufgehalten, erst die Zugabe von Ca^{2+} führt zu einem plötzlichen Verschmelzen der Membranen. Außerdem lässt sich der Assay auch für alle anderen SNARE- und nicht SNARE-vermittelten Fusionen anwenden.

4.4 Wie beeinflusst Complexin 2 die Fusion?

Der Phänotyp des Complexin-*Knock-Outs* und die Tatsache, dass es mit dem assemblierten SNARE-Komplex interagiert, weisen darauf hin, dass Complexin zu einem späten Zeitpunkt als Regulator der neuronalen Exozytose auftritt. Gerade ein solcher Zustand, in dem die Membranen bereits einen stabilen Kontakt ausgebildet, aber nicht fusioniert haben, sollte mit dem im ersten Teil Arbeit entwickelten Assay gut zu beobachten und zu untersuchen sein.

Die vorliegende Arbeit stellt dabei nicht die erste Untersuchung des Einfluss des Complexins auf die Fusion von Proteoliposomen dar. Frühere Experimente zeigten, dass Complexin einen hemifusionierten Zustand stabilisiert. Daraus entwickelte sich die Idee, dass es als so genanntes *fusion clamp* wirken könnte, also die Fusion zu einem Zeitpunkt nach dem Docking der Vesikel aufhält und diesen „geklammerten“ Zustand stabilisiert [155]. Einen inhibierenden Effekt hat Complexin auch im Zell-Zell-Fusionsassay. Hier wurden GPI-verankerte Mutanten der neuronalen SNAREs an der Außenseite von CHO-Zellen exprimiert und die Fusion von „Q“- und „R“-Zellen über Fluoreszenzmarker beobachtet [112]. Die gleichzeitige Expression von GPI-verankertem Complexin blockiert die Fusion vollständig [165].

Eine Rolle des Complexins als *fusion clamp* wird durch die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Daten, sowie der zeitgleichen Arbeiten der Söllner-Gruppe nicht bestätigt [166, 167]. Wäre Complexin tatsächlich der zentrale Regulator für das Aufhalten der Fusion bis zum Eintreffen des Ca^{2+} -Signals, so müsste sich dies auch in einer deutlich verringerten Geschwindigkeit der Fusion von Proteoliposomen zeigen bzw. diese ganz inhibieren. In dem hier entwickelten Assay sollte sich eine solche Funktionsweise des Complexins in einer deutlichen Akkumulation von gedockten Liposomen bei gleichzeitiger Unterbindung der Bildung von fusionierten zeigen. Der Effekt des Complexins auf die Fusionsgeschwindigkeit ist jedoch schwach beschleunigend. Dies stimmt mit den

KAPITEL 4.4

Arbeiten von Malsam et al. überein, die zeigen, dass alle vier Homologe des Complexins aus dem Menschen beschleunigende Wirkung auf die Fusion haben. Nur das Complexin-Homolog aus *Drosophila*, das auch in der Studie Verwendung fand, die zur Definition des *fusion clamp* führte, wirkte inhibierend [166].

Seiler et al. untersuchten außerdem verschiedene Fragmente des Complexins bezüglich ihres Einflusses auf die Fusion. Die Fragmente entsprachen ungefähr den in dieser Arbeit eingesetzten, die in Abb. 4.1 b dargestellt sind. In Übereinstimmung mit im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten (Daten nicht gezeigt), haben nur die Fragmente einen Einfluss auf die Fusion, die den C-Terminus des Proteins einschließen. Wird der C-Terminus entfernt, so zeigt Complexin keinerlei Einfluss, weder beschleunigend noch inhibierend. Bei Entfernung des N-Terminus beeinflusst das Fragment die Fusion hingegen gleichermaßen wie das Wildtyp-Complexin. Genau die Fragmente, die in den Arbeiten von Seiler et al. die Fusion beschleunigten, sind es auch die in der vorliegenden Arbeit das Clustering der Liposomen hervorriefen.

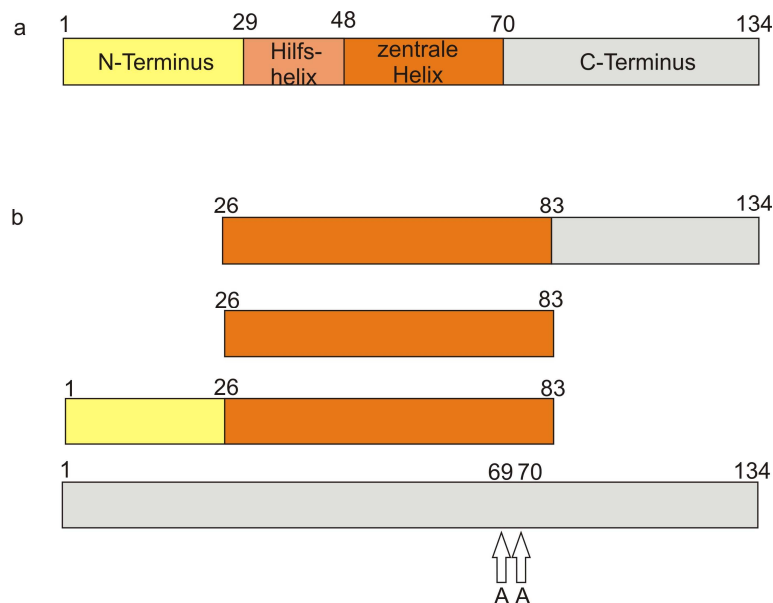


Abb. 4.1: Domänen von Complexin.

Einteilung der Domänen nach [156]. (b) In der vorliegenden Arbeit verwendete Konstrukte. Der orangefarbene Bereich entspricht dem α -helikalen Mittelteil von Complexin der gebunden an den SNARE-Komplex kristallisiert werden konnte (Abb. 1.3).

DISKUSSION

Zu einer ganz anderen Beschreibung der Domänen des Complexins gelangte hingegen eine Studie, die die Fähigkeit einzelner Domänen des Complexins untersuchte, die Funktion in Complexin1/2-Doppel-*Knock-Out*-Neuronen wiederherzustellen. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die SNARE-Bindungsdomäne notwendig, aber nicht ausreichend für die Funktion ist. Andererseits ließen sich am N-terminalen Ende des Proteins zwei Bereiche unterscheiden. Die Deletion der ersten 26 Aminosäuren führt zu einem stärker inhibierenden Effekt als die Deletion der ersten 47. Es wurde deshalb vermutet, dass die Aminosäuren 1-26 einen aktivierenden und die als Hilfshelix bezeichnete Sequenz (AS 26-47) einen inhibierenden Effekt auf die neuronale Exozytose haben (Abb. 4.1 a, [156]).

Eine duale Rolle des Complexins, aktivierend einerseits und als *fusion clamp* andererseits, wird durch neueste Untersuchungen an kortikalen Neuronen unterstützt. Hier wurde für Complexin-*Knock-Out*-Neuronen eine erhöhte Anzahl von spontanen Ausschüttungen gezeigt, während für die stimulierte Ausschüttung zwei Fälle unterschieden werden: Das schnell auf einen einzelnen Stimulus folgende synchrone Signal wird in seiner Amplitude erniedrigt, die asynchrone Komponente aber verstärkt. Experimente mit verschiedenen Complexin-Fragmenten zur Wiederherstellung der Funktion zeigten, dass ein Fragment, das nur die Hilfshelix nicht aber den unstrukturierten N-Terminus enthielt (AS 27-134), ausreichend war um die spontane Ausschüttung zu unterdrücken. Um die Amplitude des synchronen Signals von *Knock-Out*-Neuronen wiederherzustellen reichte dieses Fragment jedoch nicht aus, sondern es musste das Wildtyp-Protein eingesetzt werden. Die Autoren interpretierten aus den Ergebnissen, dass die Hilfshelix als *fusion clamp* wirkt, während der N-Terminus aktivierenden Einfluss auf die Fusion hat. Die aktivierende Wirkung des N-Terminus könnte darauf beruhen, dass die im *fusion clamp* gespeicherte Energie auf die fusionierenden Membranen übertragen wird. Die Idee wird durch Experimente gestützt, in denen gezeigt wird, dass eine Punktmutation in Synaptobrevin in der Nähe der Membran die Bindung des Complexins in diesem Bereich unterbindet und den Phänotyp des Complexin-*Knock Outs* imitierte [168]. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus dem oben beschriebenen Zell-Zell-Fusionsassay. Hier konnte durch Mutationen, die die Bindung der Hilfshelix an den SNARE-Komplex verstärkten, die Anzahl der „geklammerten“ Zellen vergrößert werden [169].

Warum werden in den einzelnen Assays so unterschiedliche Einflüsse des Complexins beobachtet? Dass sich die Funktion des Complexins als *fusion clamp* in dem Liposo-

KAPITEL 4.5

men-Assay nicht beweisen lässt, mag darauf zurückzuführen sein, dass seine Rolle sehr empfindlich von äußeren Parametern abhängt. Sørensen diskutierte, dass für die Fusion der verschiedenen Vesikeltypen, die spontane und stimulierte Fusion durchlaufen, unterschiedliche Energieprofile vorliegen [170]. Für die stimulierte Fusion wird durch die Priming-Faktoren ein tiefes Energietal geschaffen, das die Vesikel in einem *primed* Zustand festhält. Sowohl das „*Unpriming*“ des Vesikels von der Membran wie auch die Fusion bedürfen hoher Aktivierungsenergien. Durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration wird die Aktivierungsenergie für die Fusion herabgesetzt. Bei der spontanen Fusion wirken die *Priming*-Faktoren wahrscheinlich nicht, das Energietal zwischen dem Docken der Vesikel und ihrer Fusion ist flach oder nicht vorhanden. An dieser Stelle ist die inhibierende Wirkung von Complexin von Bedeutung, weil die Vesikel durch Complexin in einem gedockten Zustand festgehalten werden. Wahrscheinlich ließen sich viel mehr als diese zwei Extremfälle unterscheiden. Die einzelnen Energieprofile hängen ganz empfindlich von kleinsten Unterschieden bei den Regulatoren und den Membranen ab. Es ist gut möglich, dass im Liposomen-Assay die Energiebarrieren für den Übergang von einem gedockten Zustand zur Fusion dergestalt sind, dass Complexin seine inhibierende Wirkung nicht entfaltet.

Dies kann jedoch ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Experimente sein. Dass Complexin nicht inhibierend wirkt, kann an einer Vielzahl der gewählten Parameter liegen: der Membrankrümmung, der Membranzusammensetzung oder der Art des verwendeten Q-SNARE-Akzeptorkomplexes. Möglicherweise lässt sich in Experimenten, in denen genau diese Parameter variiert werden, in Zukunft ein genaueres Bild der Energieprofile bei der neuronalen Exozytose entwerfen.

4.5 Complexin 2 interagiert mit Membranen

Die Untersuchungen mit dem FCCS-Assay wiesen eine erhöhte Anzahl an doppeltmarkierten, also interagierenden Liposomen (Abb. 3.18) auf. Mit den nachfolgenden FCS-Experimenten konnte gezeigt werden, dass dies nicht auf einen Einfluss des Complexins auf ein Fusionsintermediat zurückzuführen ist. Vielmehr sind die Liposomen-Cluster damit zu erklären, dass Complexin über seinen C-Terminus Interaktionen mit Membranen eingehen kann. So kann es zu einem Clustering der Liposomen kommen, wenn entweder durch den Einsatz des Synaptobrevin-stabilisierten Akzeptor-Komplexes oder

DISKUSSION

durch die erste Fusionsrunde ein ternärer SNARE-Komplex auf den Liposomen zugegen ist.

Die Interaktion des C-Terminus mit Phospholipiden wurde zeitgleich für Complexin 1 von Seiler et al. nachgewiesen [167]. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus eindeutig gezeigt werden, dass es über diese Interaktion dem Complexin möglich ist, gegenüberliegende Membranen quer zu vernetzen. Dass die Interaktion bis jetzt unentdeckt blieb, ist ihrer schwachen Affinität zu schulden. So ist sie mit klassischen biochemischen Methoden nur schwer zu fassen. Der Nachweis über den von Seiler et al. angewandte Koflotations-Assay ist beispielweise in einer älteren Arbeit nicht gelungen [50]. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Methode ist besonders gut geeignet, eine solch schwache Bindung zu detektieren, weil das Clustering direkt in Lösung gemessen werden kann und FCCS sehr empfindlich gegenüber Inhomogenitäten wie den Clustern ist.

Die hier beschriebene Membraninteraktion ist damit sehr viel schwächer, als die von Synaptotagmin [117, 171, 172]. Sie ist aber möglicherweise trotzdem von biologischer Relevanz. Die beiden evolutionär jüngeren Isoformen Complexin 3 und 4, sind nicht zytosolisch, sondern tragen an ihrem C-Terminus einen Farnesyl-Rest, der sie in Membranen verankert [66]. Es wurde vorgeschlagen, dass dieser Anker dazu dient, die lokale Konzentration der Proteine an spezifischen Membranen zu erhöhen. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, weil Complexin 3 und 4 ein sehr viel niedrigeres Expressionsniveau aufweisen, als die beiden anderen Isoformen. Es ist also gut möglich, dass Complexin 1 und 2 ebenfalls durch eine Membraninteraktion an der entscheidenden Stelle angereichert werden. Der Argumentation des vorhergehenden Kapitels folgend könnte man außerdem vermuten, dass diese Bindung tatsächlich für die Stabilisierung der Bindung der Vesikel mit der Membran von Bedeutung ist, wenn dies nicht von den *Priming*-Faktoren geleistet wird. Wenn Complexin tatsächlich die Vesikel in dem Fall der spontanen Fusion stabilisiert, so bewirkt die schwache Bindung möglicherweise eine gewisse Erhöhung der Energiebarriere für den umgekehrten Prozess, das Wiederablösen der Vesikel von der Membran.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Interaktion für die im Liposomen-Assay erzielten Ergebnisse eine große Rolle spielt. Wahrscheinlich wird die Herstellung der Bindung zwischen den SNAREs dadurch erleichtert, dass die Liposomen durch das Complexin in

KAPITEL 4.5

räumliche Nähe gebracht und gehalten werden. Dies erhöht letztendlich die Fusionsgeschwindigkeit.

Aus den widersprüchlichen Ergebnissen, die hier diskutiert wurden, lässt sich zusammenfassen, dass Complexin wahrscheinlich einen Schritt in der neuronalen Exozytose kontrolliert, der nach dem *Priming* der Vesikel stattfindet. Es hat sowohl inhibierende als auch aktivierende Kontrolle über den Prozess, wahrscheinlich in starker Abhängigkeit von äußeren Faktoren. Das oben erklärte *fusion clamp*-Modell kann die unterschiedlichen Erkenntnisse nicht umfassend miteinander in Einklang bringen und wird durch die hier gezeigten Ergebnisse nicht gestützt. Für ein vollständiges Verständnis der Rolle des Complexins bedarf es deshalb weiterer differenzierter Analysen seiner einzelnen Domänen sowie der Charakterisierung der Interaktionen, die es mit anderen Proteinen eingeht.

5 Zusammenfassung

Unter der Vielzahl von intrazellulären Membranfusionen, die in einer eukaryotischen Zelle ablaufen, zieht die neuronale Exozytose das ganz besondere Interesse der Wissenschaft auf sich. Das Wissen darüber, wie das Neurotransmitter-geladene Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusioniert und seinen Inhalt in den synaptischen Spalt entleert, ist entscheidend für die Aufklärung von Erkrankungen des Nervensystems und für das Verständnis von Lernprozessen.

Allen intrazellulären Membranfusionen ist gemein, dass sie durch die konservierte Proteinfamilie der SNAREs angetrieben werden. Diese Proteinen haben eine etwa 60 Aminosäuren lange, in Heptad-Wiederholungen angeordnete Sequenz, das SNARE-Motiv. Jeweils vier verschiedene SNARE-Motive sind auf die fusionierenden Membranen verteilt. Bei der Fusion lagern sie sich vom N-terminalen Ende des Motivs aus zusammen und bilden einen *coiled coil*-Komplex, wobei die beiden Membranen aneinander gezogen werden und schließlich fusionieren. Die vor der Fusion liegenden Schritte, insbesondere das spezifische Herstellen eines Kontakts zwischen den fusionierenden Membranen, auch *Priming* oder Docking genannt, werden je nach Prozess von ganz verschiedenen Proteinen kontrolliert. Bei der neuronalen Exozytose stabilisieren die *Priming*-Faktoren das Vesikel in einem hochfusogenen Zustand und binden es eng an die Plasmamembran. So kann das Vesikel beim Eintreffen des Ca^{2+} -Signals in weniger als 100 μs mit der Membran verschmelzen und den Neurotransmitter ausschütten.

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf diesen komplizierten Mechanismus zu verstehen, ist es sinnvoll, einzelne Regulatoren isoliert in einem artifiziellen System zu untersuchen. Dafür werden seit vielen Jahren SNARE-Proteine in fluoreszenzmarkierte Liposomen rekonstituiert und die Membranfusion über die Änderung der Fluoreszenzintensität beim Vermischen der Lipide beobachtet. In diesem Assay ist aber nur der letzte Schritt des Fusionsprozesses, das Verschmelzen der Membranen, zu beobachten. Davorliegende Schritte, vor allem das Herstellen eines stabilen Kontaktes zwischen den Liposomen, können nicht detektiert werden. Es fehlt also ein grundsätzliches Verständnis für die Intermediate, die bei dieser Fusionsreaktion auftreten. Ohne dieses Verständnis ist es aber unmöglich, den Einfluss verschiedener Faktoren, wie z.B. der zugesetzten

KAPITEL 5

regulatorischen Proteinen, der Membranzusammensetzung und -krümmung oder der Art der Transmembrandomänen der Fusionsproteine zu klären.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Liposomen-Assay mit Hilfe von Einzelpartikeldektion weiterentwickelt. Die zur Markierung der Liposomen verwendeten FRET-Farbstoffe wurden auf die beiden zu fusionierenden Liposomen-Populationen verteilt. Die Liposomen wurden mit einem Konfokalmikroskop vermessen, was sowohl eine Fluoreszenzlebensdauer- wie auch eine FCCS (Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie)-Analyse erlaubt. So kann das Verschmelzen der Membranen als ein Absinken der Fluoreszenzlebensdauer des FRET-Donors beobachtet werden, während die Korrelation zwischen grünen und roten Fluoreszenzsignalen eine Aussage darüber zulässt, ob die Liposomen miteinander interagieren. Aus der simultanen Messung von Fluoreszenzlebensdauer und Kreuzkorrelation-Amplitude lässt sich so die relative Anzahl an interagierenden und fusionierten Teilchen messen, und daraus die relative Zahl der gedockten Liposomen bestimmen. Aus der Bestimmung der Teilchenzahlen in einer Autokorrelationsanalyse kann außerdem die Anzahl der Fusionsrunden berechnet werden.

Hier wurde die Fusion von Liposomen untersucht, die mit den neuronalen Q-SNAREs SNAP-25A und Syntaxin 1A bzw. dem neuronalen R-SNARE Synaptobrevin 2 rekonstituiert waren. Der Q-SNARE-Komplex war mit einem Fragment des Synaptobrevin 2 stabilisiert, um die Bildung eines inerten Komplexes aus SNAP-25A und zwei Syntaxin 1A-Molekülen zu unterbinden. Die Ergebnisse zeigen, dass am Anfang der Fusionsreaktion bis zu 50 % der Liposomen einen gedockten Zustand eingehen. Dies ist im Einklang mit einem kinetischen Modell, bei dem der Übergang vom gedockten Zustand zu den fusionierten Membranen geschwindigkeitsbestimmend ist. In der hier vorliegenden Arbeit ist dies wahrscheinlich auf die Verdrängung des stabilisierenden Synaptobrevin 2-Fragmentes zurückzuführen. Für Liposomen mit einem größeren Durchmesser ist eine deutlich reduzierte Membranspannung zu erwarten. Bei Verwendung dieser Liposomen ist in den hier gezeigten Experimenten die Fusionsgeschwindigkeit deutlich herabgesetzt, während die Docking-Geschwindigkeit vergleichbar bleibt. Im Durchschnitt durchlaufen die hier verwendeten Liposomen zwei Fusionsrunden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss eines wichtigen Regulators der neuronalen Exozytose, des Complexin, auf die Fusion von Liposomen untersucht. Complexin wird als Stabilisator für ein spätes Fusionsintermediat der neuronalen Exozytose, den

ZUSAMMENFASSUNG

primed Zustand, diskutiert. Ein solch stabilisierender Effekt konnte mit dem hier entwickelten Assay nicht gezeigt werden. Der zu erwartende Anstieg der Anzahl von gedockten Liposomen und das Absinken der Fusionsgeschwindigkeit konnten nicht beobachtet werden. Der Einfluss des Complexins war eher schwach beschleunigend. Dies wurde auf die Fähigkeit des Complexins zurückgeführt, die fusionierenden Membranen über eine Interaktion seines C-Terminus zu vernetzen.

KAPITEL 5

Literaturverzeichnis

- [1] Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 631-43.
- [2] Stenmark, H., *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 513-525.
- [3] Chen, E.H., et al., *Cell-cell fusion*. FEBS Letters, 2007. **581**(11): p. 2181-2193.
- [4] Harrison, S.C., *Viral membrane fusion*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 690-698.
- [5] Chernomordik, L.V. and M.M. Kozlov, *Mechanics of membrane fusion*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 675-683.
- [6] Chernomordik, L.V. and M.M. Kozlov, *Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 175-207.
- [7] Yang, L. and H.W. Huang, *A Rhombohedral Phase of Lipid Containing a Membrane Fusion Intermediate Structure*. 2003. **84**(3): p. 1808-1817.
- [8] Kozlovsky, Y. and M.M. Kozlov, *Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis*. Biophys J, 2002. **82**(2): p. 882-95.
- [9] Knecht, V. and S.-J. Marrink, *Molecular Dynamics Simulations of Lipid Vesicle Fusion in Atomic Detail*. 2007. **92**(12): p. 4254-4261.
- [10] Chernomordik, L.V., J. Zimmerberg, and M.M. Kozlov, *Membranes of the world unite!* J. Cell Biol., 2006. **175**(2): p. 201-207.
- [11] Reese, C., Heise, F. and Mayer, A., *Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion*. Nature, 2005. **436**: p. 410-414.
- [12] Xu, Y., et al., *Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 417-422.
- [13] Lu, X., et al., *Membrane fusion induced by neuronal SNAREs transits through hemifusion*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30538-41.
- [14] Yoon, T.Y., et al., *Multiple intermediates in SNARE-induced membrane fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19731-6.
- [15] Liu, T., et al., *Productive Hemifusion Intermediates in Fast Vesicle Fusion Driven by Neuronal SNAREs*. 2008. **94**(4): p. 1303-1314.
- [16] Jackson, M.B. and E.R. Chapman, *The fusion pores of Ca²⁺-triggered exocytosis*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(n7): p. 684-689.
- [17] Chanturiya, A., L.V. Chernomordik, and J. Zimmerberg, *Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14423-8.
- [18] Chan, D.C., *Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1241-1252.
- [19] Titorenko, V.I. and R.A. Rachubinski, *The life cycle of the peroxisome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 357-68.

- [20] Weber, T., et al., *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion*. Cell, 1998. **92**(6): p. 759-72.
- [21] Sollner, T., et al., *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 318-24.
- [22] Kloepper, T.H., C. Nickias Kienle, and D. Fasshauer, *An Elaborate Classification of SNARE Proteins Sheds Light on the Conservation of the Eukaryotic Endomembrane System*. Mol Biol Cell, 2007.
- [23] Kienle, N., T. Kloepper, and D. Fasshauer, *Phylogeny of the SNARE vesicle fusion machinery yields insights into the conservation of the secretory pathway in fungi*. BMC Evolutionary Biology, 2009. **9**(1): p. 19.
- [24] Kienle, N., T.H. Kloepper, and D. Fasshauer, *Differences in the SNARE evolution of fungi and metazoa*. Biochemical Society Transactions, 2009. **037**(4): p. 787-791.
- [25] Fasshauer, D., et al., *SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(2): p. 144-51.
- [26] Sorensen, J.B., et al., *Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles*. Embo J, 2006. **25**(5): p. 955-66.
- [27] Sutton, R.B., et al., *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 347-53.
- [28] Antonin, W., et al., *Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(2): p. 107-11.
- [29] Zwilling, D., et al., *Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies*. EMBO J, 2007. **26**(1): p. 9-18.
- [30] Fasshauer, D., et al., *Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15781-6.
- [31] Lang, T., et al., *SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis*. Embo J, 2001. **20**(9): p. 2202-13.
- [32] Low, S.H., et al., *Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 977-89.
- [33] Fasshauer, D., *Structural insights into the SNARE mechanism*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1641**(2-3): p. 87-97.
- [34] Stein, A., et al., *Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 525-528.
- [35] Zhao, C., J.T. Slevin, and S.W. Whiteheart, *Cellular functions of NSF: Not just SNAPs and SNAREs*. FEBS Letters, 2007. **581**(11): p. 2140-2149.
- [36] Sudhof, T.C. and J.E. Rothman, *Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins*. Science, 2009. **323**(5913): p. 474-477.
- [37] Sabatini, B.L. and W.G. Regehr, *Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 170-2.

- [38] Sudhof, T.C., *The synaptic vesicle cycle*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 509-47.
- [39] Verhage, M. and J.B. Sorensen, *Vesicle docking in regulated exocytosis*. Traffic, 2008. **9**(9): p. 1414-24.
- [40] Schoch, S., et al., *SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1117-22.
- [41] Littleton, J.T., et al., *Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly*. Neuron, 1998. **21**(2): p. 401-13.
- [42] Borisovska, M., et al., *v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion*. Embo J, 2005. **24**(12): p. 2114-26.
- [43] Schiavo, G., et al., *Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 832-5.
- [44] Blasi, J., et al., *Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25*. Nature, 1993. **365**(6442): p. 160-3.
- [45] Blasi, J., et al., *Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin*. Embo J, 1993. **12**(12): p. 4821-8.
- [46] Dulubova, I., et al., *A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18*. Embo J, 1999. **18**(16): p. 4372-82.
- [47] Margittai, M., et al., *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15516-21.
- [48] Verhage, M., et al., *Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion*. Science, 2000. **287**(5454): p. 864-9.
- [49] Zilly, F.E., et al., *Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes*. Plos Biology, 2006. **4**(10): p. 1789-1797.
- [50] Guan, R., H. Dai, and J. Rizo, *Binding of the Munc13-1 MUN Domain to Membrane-Anchored SNARE Complexes*. Biochemistry, 2008. **47**(6): p. 1474-1481.
- [51] Weninger, K., et al., *Accessory Proteins Stabilize the Acceptor Complex for Synaptobrevin, the 1:1 Syntaxin/SNAP-25 Complex*. 2008. **16**(2): p. 308-320.
- [52] Gulyas-Kovacs, A., et al., *Munc18-1: Sequential Interactions with the Fusion Machinery Stimulate Vesicle Docking and Priming*. J. Neurosci., 2007. **27**(32): p. 8676-8686.
- [53] Tareste, D., et al., *SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(7): p. 2380-2385.
- [54] Rosenmund, C., J. Rettig, and N. Brose, *Molecular mechanisms of active zone function*. Current Opinion in Neurobiology, 2003. **13**(5): p. 509-519.
- [55] Wang, Y., et al., *Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 593-598.

- [56] Dulubova, I., et al., *A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?* EMBO J, 2005. **24**(16): p. 2839-2850.
- [57] Kaeser, P.S. and T.C. Südhof, *RIM function in short- and long-term synaptic plasticity.* Biochem. Soc. Trans., 2005. **33**(Pt 6): p. 1345-1349.
- [58] Geppert, M., et al., *Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse.* Cell, 1994. **79**(4): p. 717-27.
- [59] Yoshihara, M. and J.T. Littleton, *Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release.* Neuron, 2002. **36**(5): p. 897-908.
- [60] Fernandez-Chacon, R., et al., *Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 41-9.
- [61] Rhee, J.S., et al., *Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca²⁺ affinity of synaptotagmin I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18664-9.
- [62] Fernandez, I., et al., *Three-dimensional structure of the synaptotagmin I C2B-domain: synaptotagmin I as a phospholipid binding machine.* Neuron, 2001. **32**(6): p. 1057-69.
- [63] Brunger, A.T., *Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins.* Q Rev Biophys, 2005. **38**(1): p. 1-47.
- [64] Rizo, J. and C. Rosenmund, *Synaptic vesicle fusion.* Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 665-74.
- [65] McMahon, H.T., et al., *Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function.* Cell, 1995. **83**(1): p. 111-9.
- [66] Reim, K., et al., *Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses.* J. Cell Biol., 2005. **169**(4): p. 669-680.
- [67] Brose, N., *For Better or for Worse: Complexins Regulate SNARE Function and Vesicle Fusion.* Traffic, 2008. **9**(9): p. 1403-1413.
- [68] Brose, N., *Altered Complexin Expression in Psychiatric and Neurological Disorders: Cause or Consequence?* Mol. Cells, 2008. **25**(1): p. 7-19.
- [69] Redecker, P., et al., *Brain Synaptic Junctional Proteins at the Acrosome of Rat Testicular Germ Cells.* J. Histochem. Cytochem., 2003. **51**(6): p. 809-819.
- [70] Zhao, L., K. Reim, and D.J. Miller, *Complexin-I-deficient sperm are subfertile due to a defect in zona pellucida penetration.* Reproduction, 2008. **136**(3): p. 323-334.
- [71] Zhao, L., et al., *Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis.* Developmental Biology, 2007. **309**(2): p. 236-244.
- [72] Reim, K., et al., *Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release.* Cell, 2001. **104**(1): p. 71-81.
- [73] Tang, J., et al., *A complexin/synaptotagmin I switch controls fast synaptic vesicle exocytosis.* Cell, 2006. **126**(6): p. 1175-87.
- [74] Yoon, T.-Y., et al., *Complexin and Ca²⁺ stimulate SNARE-mediated membrane fusion.* Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 707-713.
- [75] Chen, X., et al., *Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex.* Neuron, 2002. **33**(3): p. 397-409.

- [76] Pabst, S., et al., *Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions.* J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19808-18.
- [77] Pabst, S., et al., *Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7838-48.
- [78] Bracher, A., et al., *X-ray structure of a neuronal complexin-SNARE complex from squid.* J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26517-23.
- [79] Li, Y., G.J. Augustine, and K. Weninger, *Kinetics of Complexin Binding to the SNARE Complex: Correcting Single Molecule FRET Measurements for Hidden Events.* 2007. **93**(6): p. 2178-2187.
- [80] Xue, M., et al., *Complexins facilitate neurotransmitter release at excitatory and inhibitory synapses in mammalian central nervous system.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(22): p. 7875-7880.
- [81] Huntwork, S. and J.T. Littleton, *A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth.* Nat Neurosci, 2007. **10**(10): p. 1235-1237.
- [82] Archer, D.A., M.E. Graham, and R.D. Burgoyne, *Complexin Regulates the Closure of the Fusion Pore during Regulated Vesicle Exocytosis.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(21): p. 18249-18252.
- [83] Rigaud, J.L. and D. Levy, *Reconstitution of membrane proteins into liposomes.* Methods Enzymol, 2003. **372**: p. 65-86.
- [84] Chen, X., et al., *SNARE-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicles.* Biophys J, 2006. **90**(6): p. 2062-74.
- [85] Holt, M., et al., *Synaptic Vesicles Are Constitutively Active Fusion Machines that Function Independently of Ca²⁺.* 2008. **18**(10): p. 715-722.
- [86] Ohya, T., et al., *Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes.* Nature, 2009. **459**(7250): p. 1091-1097.
- [87] Nicholson, K.L., et al., *Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p.* Nat Struct Biol, 1998. **5**(9): p. 793-802.
- [88] Melia, T.J., et al., *Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins.* J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 929-40.
- [89] Pobbati, A.V., A. Stein, and D. Fasshauer, *N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion.* Science, 2006. **313**(5787): p. 673-6.
- [90] Struck, D.K., D. Hoekstra, and R.E. Pagano, *Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion.* Biochemistry, 1981. **20**(14): p. 4093-9.
- [91] Chan, Y.-H.M., B. van Lengerich, and S.G. Boxer, *Effects of linker sequences on vesicle fusion mediated by lipid-anchored DNA oligonucleotides.* 2009. p. 979-984.
- [92] Schütte, C.G., et al., *Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2858-63.

- [93] Nickel, W., et al., *Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12571-6.
- [94] Dennison, S.M., et al., *Neuronal SNAREs do not trigger fusion between synthetic membranes but do promote PEG-mediated membrane fusion*. Biophysical Journal, 2006. **90**(5): p. 1661-1675.
- [95] Walter, N.G., et al., *Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit*. Nat Meth, 2008. **5**(6): p. 475-489.
- [96] Walla, P.J., *Modern Biophysical Chemistry*. 1st ed. 2009: Wiley VCH.
- [97] Hilbert, M., Hippchen, H, Wehling, A. ,Walla, P. J., *Correlational analysis of proteins and non-metallic nano particles in a deep-nulling microscope*. J. Chem Phys. B, 2005. **109**: p. 18162-18170.
- [98] Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. Europ J Biophys, 1993. **22**(3): p. 169-175.
- [99] Eggeling, C., et al., *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(4): p. 1556-1561.
- [100] Kask, P., et al., *Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(24): p. 13756-13761.
- [101] Hausteil, E. and P. Schwille, *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2007. **36**(1): p. 151-169.
- [102] Axelrod, D., *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology*. Methods Enzymol, 2003. **361**: p. 1-33.
- [103] Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Opt. Lett., 1994. **19**(11): p. 780-782.
- [104] Willig, K.I., et al., *STED microscopy with continuous wave beams*. Nat Meth, 2007. **4**(11): p. 915-918.
- [105] Betzig, E., et al., *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.
- [106] Bowen, M.E., et al., *Single molecule observation of liposome-bilayer fusion thermally induced by soluble N-ethyl maleimide sensitive-factor attachment protein receptors (SNAREs)*. Biophys J, 2004. **87**(5): p. 3569-84.
- [107] Liu, T., Tucker, W.C., Bhalla, A., Chapman, E.R., and Weisshaar, J.C., *SNARE-driven, 25-Millisecond Vesicle Fusion In Vitro*. Biophys. J., 2005. **89**: p. 2458-2472.
- [108] Fix, M., et al., *Imaging single membrane fusion events mediated by SNARE proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7311-6.
- [109] Domanska, M.K., et al., *Single vesicle millisecond fusion kinetics reveals number of SNARE complexes optimal for fast SNARE-mediated membrane fusion*. Journal of Biological Chemistry, 2009: p. -.

- [110] Hennesthal, C., J. Drexler, and C. Steinem, *Membrane-Suspended Nanocompartments Based on Ordered Pores in Alumina*. ChemPhysChem, 2002. **3**(10): p. 885-889.
- [111] Mey, I., et al., *Local Membrane Mechanics of Pore-Spanning Bilayers*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(20): p. 7031-7039.
- [112] Giraud, C.G., et al., *SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes*. J. Cell Biol., 2005. **170**(2): p. 249-260.
- [113] Hu, C., et al., *Fusion of Cells by Flipped SNAREs*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1745-1749.
- [114] Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [115] Fasshauer, D., et al., *Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15440-6.
- [116] Fasshauer, D., et al., *Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 28036-41.
- [117] Stein, A., et al., *Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca(2+)-dependent trans interaction with phospholipids*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 904-11.
- [118] Hochuli, E., et al., *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Nat Biotech, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
- [119] Schubert, R., *Liposome preparation by detergent removal*. Methods Enzymol, 2003. **367**: p. 46-70.
- [120] Takamori, S., et al., *Molecular anatomy of a trafficking organelle*. Cell, 2006. **127**(4): p. 831-46.
- [121] Schagger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 16-22.
- [122] Edelhoch, H., *Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins*. Biochemistry, 1967. **6**(7): p. 1948-54.
- [123] Gasteiger E., H.C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M.W. (ed):, Editor. 2005, Humana Press, Springer: Heidelberg.
- [124] Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
- [125] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- [126] Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
- [127] Pohl, W., Hellmuth, H., Hilbert, M., Seibel, J., Walla, P.J., *A two-photon fluorescence correlation study of lectins interacting with carbohydrate 20 nm beads*. ChemBioChem, 2006. **7**: p. 268-274.

- [128] Hippchen, H., *Konfokale Einzelpartikel-Detektion von Fluoreszenz-kodierten Nanospheres*. 1st ed. 2008, Göttingen: Cuvillier Verlag.
- [129] Madge, D., Elson, E. and Webb, W.W., *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Phys. Rev. Lett., 1972. **29**: p. 705-708.
- [130] Elson, E.L., Madge, D, *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 1-27.
- [131] Madge, D. and E.L. Elson, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. III. Uniform Translation and Laminar Flow*. Biopolymers, 1978. **17**: p. 361-376.
- [132] Widengren, J., et al., *Two New Concepts to Measure Fluorescence Resonance Energy Transfer via Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Experimental Realizations*. The Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**(28): p. 6851-6866.
- [133] Torres, T. and M. Levitus, *Measuring Conformational Dynamics: A New FCS-FRET Approach*. The Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(25): p. 7392-7400.
- [134] Widengren, J. and P. Schwille, *Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(27): p. 6416-6428.
- [135] Blom, H., et al., *Triplet-State Investigations of Fluorescent Dyes at Dielectric Interfaces Using Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(19): p. 5554-5566.
- [136] Davis, L.M. and G. Shen, *Accounting for Triplet and Saturation Effects in FCS Measurements*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2006. **7**: p. 287-301.
- [137] Ehrenberg, M. and R. Rigler, *Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations*. Chemical Physics, 1974. **4**(3): p. 390-401.
- [138] Grunwald, D., et al., *Diffusion and Binding Properties Investigated by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2005. **6**: p. 381-386.
- [139] Gösch, M. and R. Rigler, *Fluorescence correlation spectroscopy of molecular motions and kinetics*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **57**(1): p. 169-190.
- [140] Schwille, P., Meyer-Almes, Franz-Josef, Rigler, Rudolf, *Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution*. Biophys. J., 1997. **72**: p. 1878-1886.
- [141] Rigler, R., Földes-Papp, Z, Meyer-Almes, F-J, Sammet C, Völcker, M, Schnetz A, *Fluorescence cross-correlation: A new concept for polymerase chain reaction*. J Biotech, 1998. **63**: p. 97-109.
- [142] Schwille, P., Heinze, K G, *Two-Photon Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*. ChemPhysChem, 2001. **2**(5): p. 269-272.
- [143] Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. Science, 1990. **248**: p. 73-76.

- [144] Berland, K.M., P.T.C. So, and E. Gratton, *Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy: Methods and Application to the Intracellular Environment*. Biophys J, 1995. **68**: p. 694-701.
- [145] Schwille, P., et al., *Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation*. Biophys J, 1999. **77**: p. 2251–2265.
- [146] Dittrich, P.S. and P. Schwille, *Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one-and two-photon excitation*. Appl Phys B 2001. **73**: p. 829-837.
- [147] Xu, C. and W.W. Webb, *Measurements of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. J Opt Soc Am B, 1996. **13**: p. 481-491.
- [148] Heinze, K.G., Koltermann, A. and Schwille, P., *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000. **97**: p. 10377-10382.
- [149] Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann Physik, 1948. **6**: p. 55-75.
- [150] Van der Meer, W.B., G. Coker, and S.-Y.S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*. 1994, New York: Wiley VCH.
- [151] Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum.
- [152] Kwok-Keung F.B. and S. L., *Surface Density Determination in Membranes by Fluorescence Energy Transfer*. Biochemistry, 1978. **17**(24): p. 5241–5248.
- [153] Parlati, F., et al., *Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12565-70.
- [154] v. Smoluchowski, M., *Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen*. Z. Phys.Chem., 1917. **92**: p. 129-168.
- [155] Schaub, J.R., et al., *Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(8): p. 748-50.
- [156] Xue, M., et al., *Distinct domains of complexin I differentially regulate neurotransmitter release*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 949-58.
- [157] Siddiqui, T.J., et al., *Determinants of synaptobrevin regulation in membranes*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 2037-46.
- [158] Wiederhold, K. and D. Fasshauer, *Is Assembly of the SNARE Complex Enough to Fuel Membrane Fusion?* Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(19): p. 13143-13152.
- [159] Stein, A., *Untersuchungen zur Rekonstitution der SNARE-vermittelten Membranfusion, Dissertation*. 2007, Göttingen.
- [160] Montecucco, C., Schiavo, G., and Pantano, S., *SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close?* Trends Biochem. Sci., 2005. **30**: p. 367-372.
- [161] van den Bogaart, G., et al., *One SNARE complex is sufficient for membrane fusion*. Nat Struc Mol Biol, 2009. *in press*.

- [162] Malinin, V.S., P. Frederik, and B.R. Lentz, *Osmotic and Curvature Stress Affect PEG-Induced Fusion of Lipid Vesicles but Not Mixing of Their Lipids*. 2002. **82**(4): p. 2090-2100.
- [163] Malinin, V.S. and B.R. Lentz, *Energetics of Vesicle Fusion Intermediates: Comparison of Calculations with Observed Effects of Osmotic and Curvature Stresses*. 2004. **86**(5): p. 2951-2964.
- [164] Grafmüller, A., J. Shillcock, and R. Lipowsky, *The Fusion of Membranes and Vesicles: Pathway and Energy Barriers from Dissipative Particle Dynamics*. 2009. **96**(7): p. 2658-2675.
- [165] Giraudo, C.G., et al., *A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis*. Science, 2006. **313**(5787): p. 676-80.
- [166] Malsam, J., et al., *The carboxy-terminal domain of complexin I stimulates liposome fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.
- [167] Seiler, F., et al., *A role of complexin-lipid interactions in membrane fusion*. FEBS letters, 2009.
- [168] Maximov, A., et al., *Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion*. Science, 2009. **323**(5913): p. 516-521.
- [169] Giraudo, C.G., et al., *Alternative zippering as an on-off switch for SNARE-mediated fusion*. Science, 2009. **323**(5913): p. 512-6.
- [170] Sorensen, J.B., *Conflicting Views on the Membrane Fusion Machinery and the Fusion Pore*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2009. **25**(1): p. 513-537.
- [171] Kuo, W., et al., *The Calcium-Dependent and Calcium-Independent Membrane Binding of Synaptotagmin I: Two Modes of C2B Binding*. Journal of Molecular Biology, 2009. **387**(2): p. 284-294.
- [172] Chapman, E.R. and A.F. Davis, *Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13995-4001.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Fusion von zwei Membranen nach dem <i>stalk</i> -Modell.	2
Abb.1.2: Der Konformationszyklus der SNARE-Proteine.	6
Abb. 1.3: Neuronaler SNARE-Komplex mit der zentralen Helix von Complexin.	11
Abb. 2.1: Konfokale Messapparatur.	28
Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Photonenbursts.	29
Abb. 3.1: Typische Zeitspuren von fluoreszenzmarkierten Liposomen.	39
Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Photonenbursts für verschiedene Intermediate einer Fusionsreaktion.	41
Abb. 3.3: Verteilungen von relativen Intensitäten für verschiedene Liposomen-Spezies.	43
Abb. 3.4: Beispiele für einzelne Photonenbursts.	44
Abb. 3.5: Fluoreszenz-Kreuzkorrelation-Kurven einer Fusionsreaktion.	45
Abb. 3.6: Fluoreszenzlebensdauer-Analyse.	46
Abb. 3.7: Verarbeitung und Normierung der FCCS- und Fluoreszenzlebensdauer-Daten.	49
Abb. 3.8: Lineare Abhängigkeit der Energietransferrate k_{ET} von der Konzentration des Akzeptor-Farbstoffs Texas Red.	50
Abb. 3.9: Vergleich von Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer für eine Fusionsreaktion von Oregon Green- und Texas Red-markierten Liposomen.	52
Abb. 3.10: Vergleich der FRET-Paare NBD/ Rhodamin Lissamine und Oregon Green/ Texas Red.	53
Abb. 3.11: Einfluss der Konzentration des Donor-Fluorophors auf die gemessene Fusionsgeschwindigkeit.	55
Abb. 3.12: Teilchenzahlen als Funktion der Verdünnung der Liposomen.	56
Abb. 3.13: Kreuzkorrelation für Gemische mit Liposomen von variierender Helligkeit.	58
Abb. 3.14: Kinetik von Docking und Fusion.	60
Abb. 3.15: Mehrfach interagierende Liposomen.	62
Abb. 3.16: Kinetisches Modell für eine Fusionsreaktion von Liposomen rekonstituiert mit einem stabilisierten SNARE-Akzeptor-Komplex (ΔN -Komplex) und Synaptobrevin 2.	63
Abb. 3.17: Vergleich von Liposomen verschiedener Größe.	67
Abb. 3.18: Einfluss von Complexin 2 auf die Kinetik von <i>Docking</i> und Fusion.	69
Abb. 3.19: Autokorrelationskurven für fluoreszenzmarkierte Proteoliposomen.	70
Abb. 3.20: Vergleich von Parametern, die Clustering zeigen.	71
Abb. 3.21: Complexin 2 kann Membranen quervernetzen.	74
Abb. 3.22: Nachweis von Liposomen-Clustern durch dynamische Lichtstreuung.	75
Abb. 4.1: Domänen von Complexin.	84

Publikationen

Zwilling, D., **Cypionka, A.**, Pohl, W.H., Walla, P.J., Wahl, M.C., Jahn, R., *Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies*. EMBO J, 2007. 26(1): p. 9-18.

Cypionka, A., Stein, A., Hernandez, J.M., Hippchen, H., Jahn, R., Walla, P.J., *Discrimination between docking and fusion of liposomes reconstituted with neuronal SNARE-proteins using FCS*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(44): p. 18575-18580.*

*Ergebnisse aus dieser Publikation sind in die vorliegende Arbeit eingeflossen.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 16. Dezember 1981

Geburtsort: Göttingen

Schulen:

08/ 1987 – 07/ 1991	Teggingerschule Radolfzell am Bodensee
08/ 1991 – 01/ 1993	Gymnasium Radolfzell am Bodensee
01/ 1993 – 06/ 1993	Orientierungsstufe Friedrichsfehn
08/ 1993 – 07/ 2000	Cäcilienchule Oldenburg
08/ 1997 – 01/ 1998	Brevard High School, North Carolina, USA
07/ 2000	Abitur

Studium:

10/ 2000 - 06/ 2006	Chemie (Diplom) an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
01/ 2004 – 06/ 2004	Studienaufenthalt (Erasmus) in Zaragoza, Spanien
11/ 2005 – 06/ 2006	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Titel: „Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zur Untersuchung von SNA-RE-Protein-Wechselwirkungen“
Seit 09/ 2006	Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Neurobiologie (Prof. Reinhard Jahn) und Arbeitsgruppe Biomolekulare Spektroskopie und Einzelmolekül-Detektion (Prof. Peter Jomo Walla)
Seit 11/ 2008	Promotion im Rahmen der IMPRS Physics of Biological and Complex Systems, Georg-August-Universität Göttingen

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinen beiden Doktorvätern Jomo Walla und Reinhard Jahn für ihre Anleitung und Unterstützung und dafür, dass sie mir die Möglichkeit geboten haben, die Arbeit in zwei Abteilungen gleichzeitig anzufertigen. Meine „Patchwork-Familie“ hat mich zwar immer wieder vor Herausforderungen gestellt, die Arbeit aber auch besonders spannend und lehrreich gestaltet, so dass ich diese Erfahrung letztendlich nicht missen möchte.

Prof. Steinem als drittem Mitglied des Thesis Committees möchte ich für ihre konstruktive fachliche Begleitung danken.

Dem Koordinationsteam des GGNB und Antje Erdmann als Koordinatorin der IMPRS danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, mit der sich mich durch die Richtlinien der neu entstandenen Graduiertenschule navigiert haben.

Von den vielen Arbeitskollegen, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, gebührt Alexander Stein mein ganz besonderer Dank. Er hat mir im Laboralltag die Richtung gewiesen und viele wichtige Denkanstöße gegeben.

Matias Hernandez danke ich für die gute Zusammenarbeit bei dem Liposomen-Projekt und die Gelegenheit mein Spanisch zu üben. Hilfsbereite Diskussionspartner waren auch Geert van den Bogaart und Aliaksandr Kandratsenka. Hendrik Hippchen hat freundlicherweise die in der Arbeit verwendete Software entwickelt, angepasst und zur Verfügung gestellt. Von Christian Reichardt habe ich gelernt, die Tücken des Lasers zu überwinden. Gottfried Mieskes danke ich für die ständige Einsatzbereitschaft bei Problemen aller Dimensionen.

Wenn die Arbeit soviel Lebenszeit einnimmt, wie es bei dieser Doktorarbeit manchmal der Fall war, dann ist das eigentlich nur in einem angenehmen Umfeld auszuhalten. Für gute Stimmung danke ich deshalb allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Abteilung Neurobiologie und den AGs Walla und Schwarzer, ganz besonders Janina Boyken und Wensi Gao.

Auch denen, die nicht unmittelbar am Gelingen dieser Doktorarbeit beteiligt waren, gilt mein Dank. Meine Familie und viele Freunde haben mich in den letzten Jahren unterstützt, und war es auch nur dabei, den Kopf einmal frei zu machen.