

# Dissertation

Lando Schwenen



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

**Untersuchung einzelner  
SNARE-vermittelter  
Membranfusionsereignisse auf  
planaren porenüberspannenden  
Membranen**

Dissertation  
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades  
"Doctor rerum naturalium"  
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie  
der Georg-August University School of Science (GAUSS) vorgelegt

von  
Lando Lantbert Gregor Schwenen  
aus  
Göttingen

Göttingen, 2015

### **Betreuungsausschuss**

Prof. Dr. Claudia Steinem, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie Prof.  
Dr. Tim Salditt, Institut für Röntgenphysik

### **Mitglieder der Prüfungskommission**

#### Referentin:

Prof. Dr. Claudia Steinem, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

#### Korreferent:

Prof. Dr. Tim Salditt, Institut für Röntgenphysik

#### Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Bert de Groot, Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie

Prof. Dr. Michael Meinecke, Europäisches Kompetenzzentrum  
Neurowissenschaften

Dr. Jochen Hub, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Burkhard Geil, Institut für Physikalische Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2015

Für meine Familie



## **Abstract**

Even though there are a number of different *in vitro* fusion assays to analyze neuronal SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) mediated fusion, still the essential features of the *in vivo* situation are only partially captured. In this thesis an *in vitro* fusion assay that provides a planar solvent-free pore-spanning membrane containing a ternary acceptor SNARE complex, which mimics the presynaptic membrane, to monitor fusion of single synaptobrevin containing vesicles is presented. Protein-containing pore-spanning membranes were obtained by spreading of giant unilamellar vesicles on gold covered 6-mercapto-1-hexanol functionalized porous silicon nitride substrates with pore diameters of 1.2  $\mu\text{m}$ . The mobility of Lipids and the SNAREs in the pore-spanning membranes was shown by FCS-experiments, which is prerequisite for the formation of active fusion complexes. The fusion process was highly specific with an efficiency of 50 % and was analyzed by two color confocal laser scanning fluorescence microscopy in a time resolved manner allowing to distinguish between vesicle docking, hemifusion and full fusion. A kinetics analysis revealed that two reaction steps need to take place to progress to fusion with a lifetime of the docked vesicles of about 50 s.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Mechanismus der Membranfusion . . . . .	2
1.2	SNARE-Protein vermittelte Membranfusion . . . . .	4
1.3	Modellsysteme zur Untersuchung der SNARE-vermittelten Fusion .	8
1.3.1	Vesikel-Vesikel-Fusion in Lösung . . . . .	8
1.3.2	Fusion an immobilisierten Vesikeln . . . . .	10
1.3.3	Detektion einzelner Fusionsereignisse auf festkörperunterstützten Membranen . . . . .	11
1.4	Detektion einzelner SNARE-vermittelter Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Lipidchemische Methoden . . . . .	19
3.1.1	Verwendete Lipide . . . . .	19
3.1.2	Verwendete lipidgebundene Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	20
3.1.3	Herstellung von Lipidfilmen . . . . .	22
3.1.4	Herstellung von Lipidvesikeln . . . . .	23
3.1.5	Fusionsexperimente in der Bulklösung . . . . .	26
3.2	Präparation poröser Substrate zur Erzeugung porenüberspannender Membranen . . . . .	27
3.2.1	Verwendete Substrate . . . . .	27
3.2.2	Funktionalisierung von Substratoberflächen . . . . .	28
3.2.3	Methoden zur Goldbeschichtung . . . . .	30
3.2.4	Erzeugung porenüberspannender Membranen . . . . .	33
3.3	Rekonstitution von SNARE-Proteinen in große und riesige Vesikel .	35
3.4	Proteinchemische Methoden . . . . .	38
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	38
3.4.2	Metallionenaffinitätschromatographie . . . . .	42
3.4.3	Ionenaustauschchromatographie . . . . .	43
3.5	Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen aus <i>Escherichia coli</i>	45
3.5.1	Verwendete Proteine und Proteinfragmente . . . . .	45



3.5.2	Allgemeine Vorschrift für die Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen . . . . .	48
3.6	Messtechnische Methoden . . . . .	53
3.6.1	Konfokale Laserrasterfluoreszenzmikroskopie . . . . .	53
3.6.2	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie . . . . .	56
3.7	SNARE-Protein vermittelte Membranfusion auf porenüberspannenden Membranen . . . . .	58
3.7.1	Durchführung der Fusionsexperimente . . . . .	59
3.7.2	Datenverarbeitung und Detektion der Fusionsereignisse . . .	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1	Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen aus <i>Escherichia coli</i>	64
4.1.1	Synaptobrevin-2 (1-116) . . . . .	65
4.1.2	Syntaxin-1A (183-288) . . . . .	70
4.1.3	SNAP-25a . . . . .	74
4.1.4	Synaptobrevin-2 (49-96) . . . . .	78
4.1.5	Bildung des $\Delta$ N-Akzeptorkomplexes . . . . .	81
4.2	Erzeugung und Charakterisierung proteinhaltiger porenüberspannender Membranen . . . . .	83
4.2.1	Eigenschaften der erzeugten Goldbeschichtungen . . . . .	83
4.2.2	Funktionalisierungsstrategien für offene poröse Systeme . . .	87
4.2.3	Funktionalisierungsstrategien für geschlossenporige Systeme	90
4.2.4	Diffusionsverhalten von Lipiden und Proteinen in porenüberspannenden Membranen . . . . .	93
4.3	Rekonstitution der SNARE-Proteine in große und riesige Vesikel . . .	100
4.4	Detektion SNARE-Protein vermittelter Membranfusion einzelner Vesikel . . . . .	102
4.4.1	Durchführung der Experimente . . . . .	107
4.4.2	Auswirkung der Auswerteparameter auf die Detektion der Fusionsereignisse . . . . .	109
4.4.3	Bestimmung der optimalen ROI-Größe . . . . .	110
4.4.4	Klassifizierung der beobachteten Ereignisse . . . . .	114
4.4.5	Kinetische Auswertung der beobachteten Fusionsprozesse . .	117
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>125</b>
5.1	Isolierung und Reinigung der SNARE-Proteine . . . . .	125
5.2	Erzeugung und Charakterisierung proteinhaltiger porenüberspannender Membranen . . . . .	126
5.2.1	Funktionalisierungsstrategien für poröse Systeme . . . . .	126
5.3	Rekonstitution der SNARE-Proteine in große und riesige Vesikel . . .	133

5.4	Detektion SNARE-Protein vermittelter Membranfusion einzelner Vesikel . . . . .	134
5.4.1	Interpretation der beobachteten Ereignisse . . . . .	135
5.4.2	Auswertung der beobachteten Ereignisse . . . . .	137
5.4.3	Dauer des hemifusionierten Zustands . . . . .	148
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>153</b>
	<b>Anhang</b>	<b>iii</b>



# 1 Einleitung

Biologische Membranen bilden die physische Begrenzung von Zellen sowie ihrer intrazellulären Kompartimente und ermöglichen den Aufbau von Stoffgradienten oder elektrischen Potentialen.<sup>[1]</sup> Sie bestehen in erster Linie aus amphiphilen Lipiden, die in einem wässrigen Milieu eine Doppelschicht ausbilden. Innerhalb einer Zelle erzeugen Membranen getrennte Reaktionsräume, die für den Ablauf komplexer biologischer Prozesse unerlässlich sind. Ihre Struktur und Eigenschaften werden dabei durch die Zusammensetzung der Lipide sowie eine Vielzahl an integralen und peripheren Proteinen bestimmt. Der Austausch von Stoffen zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung oder zwischen ihren verschiedenen Organellen wird durch unterschiedliche Transportmechanismen ermöglicht. Es ist dabei von größter Wichtigkeit, dass beim Stoffaustausch die Kontinuität der Lipidmembran erhalten bleibt, um eine Vermischung der separaten Kompartimente zu verhindern. Eine Möglichkeit für den Transport von Molekülen oder Ionen durch die Membran bilden hierbei *carrier*-Proteine oder Proteinkanäle, die sowohl für aktive als auch für passive Transportprozesse zum Einsatz kommen.<sup>[2]</sup>

Eine weitere Möglichkeit, die den Austausch großer Mengen komplexer Verbindungen, wie Proteine, Hormone oder Neurotransmitter, sowie der Transport membranständiger Proteine (*membrane trafficking*) ermöglicht, ist die Membranfusion. Hierbei kommt es zu einer Verschmelzung zweier Lipiddoppelschichten zu einer kontinuierlichen Membran und der Vermischung der beiden zuvor getrennten wässrigen Kompartimente. Die Fusion biologischer Membranen läuft dabei nicht spontan ab, sondern bedarf neben der Bereitstellung der für die Fusion benötigten

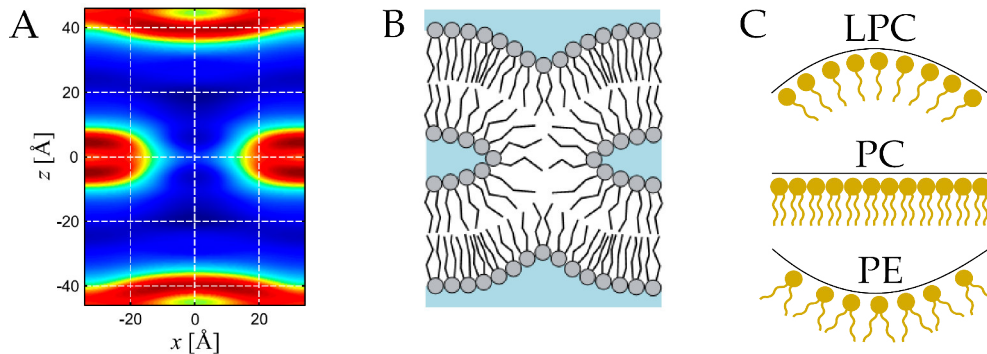
Energie einer genauen räumlichen und zeitlichen Kontrolle. Aus diesem Grund wurden im Lauf der Evolution verschiedene Fusionssysteme inklusive ihrer spezifischen Regulationsmechanismen entwickelt und sind hoch konserviert in vielen Spezies zu finden.<sup>[3]</sup> Die Membranfusion bildet somit den Schlüsselschritt für eine Vielzahl an biologischen Prozessen, wie zum Beispiel die Exozytose, die Zell-Zell-Fusion, das Eindringen eines Virus oder die Befruchtung der Eizelle.<sup>[4]</sup>

### 1.1 Mechanismus der Membranfusion

Aufgrund ihrer amphiphilen Struktur ordnen sich Lipide in wässriger Lösung spontan zu Lipiddoppelschichten zusammen. Für eine Fusion müssen zwei Membranen in engen Kontakt gebracht werden, sodass sie durch eine Umlagerung der Lipide zu einer einzigen kontinuierlichen Lipiddoppelschicht verschmelzen. Bei der Annäherung zweier Membranen erfahren sie zunächst attraktive Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie repulsive elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der geladenen Lipidkopfgruppen. Ab einem Abstand von etwa 2–3 nm der Kopfgruppen zueinander kommt eine weitere repulsive Wechselwirkung aufgrund der Hydrathüllen der Lipidkopfgruppen hinzu. Für eine weitere Annäherung muss das Wasser der Hydrathüllen verdrängt werden, wofür zusätzliche Energie aufgewendet werden muss.<sup>[5-7]</sup> In artifiziellen Membranen kann die Hydratationsenergie durch Zugabe divalenter Kationen in Anwesenheit azider Phospholipide, wie Phosphatidylserin (PS), durch trans-Interaktionen zwischen den Kopfgruppen beider Membranen herabgesetzt werden, wodurch es zur Fusion kommen kann.<sup>[8-11]</sup>

Durch Dehydratisierung von lamellaren Multimembranstackeln kann die Wasserschicht zwischen den einzelnen Membranen soweit reduziert werden, dass mittels Kleinwinkelröntgenbeugung das Auftreten einer rhomboedrischen Phase der Lipide beobachtet werden kann.<sup>[6,12,13]</sup> Es kommt hierbei zu einer Verbindung zwischen den benachbarten Lipidmonoschichten zweier Membranen. In Abbildung 1.1 A ist die Elektronendichteverteilung einer solchen Verbindungsstelle gezeigt. Die

roten Bereichen hoher Elektronendichte könne den Lipidkopfgruppen zugeordnet werden, sodass hieraus eine Anordnung der Lipide in einem sogenannten *fusion stalk*, wie sie in Abb. 1.1 B dargestellt ist, abgeleitet werden kann. Eine solche lokale Verbindung der angrenzenden Lipidmonoschichten gilt als ein Übergangszustand der Fusion und wird als Hemifusion bezeichnet.<sup>[4,14]</sup>

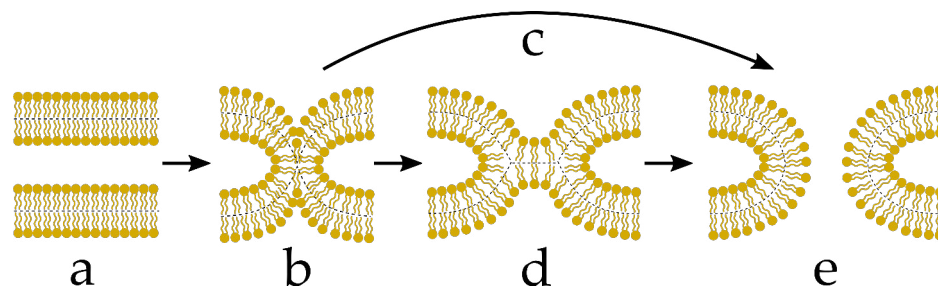


**Abbildung 1.1:** (A) Elektronendichteverteilung eines *fusion stalks* gemessen durch Kleinwinkelröntgenbeugung in multilamellaren Lipidschichten. (B) Schematische Darstellung des *fusion stalks*. (C) Schematische Darstellung der bevorzugten Krümmung einer Lipidmonoschicht in Abhängigkeit des Packungsparameters des jeweiligen Lipids. Abbildungen (A) und (B) verändert nach<sup>[12]</sup>.

Die verbundenen Lipidmonoschichten weisen in diesem Zustand eine starke negative Krümmung auf. Die Energie dieses Übergangszustands wird aus diesem Grund maßgeblich durch den Packungsparameter der beteiligten Lipide bestimmt, welcher das Verhältnis des Raumbedarfs der Kopfgruppe zu den hydrophoben Acylketten des Lipids angibt.<sup>[15]</sup> Der *fusion stalk* wird hierbei durch Lipide mit einer kleinen Kopfgruppe im Verhältnis zu den hydrophoben Seitenketten, wie im Fall von Phosphoethanolaminen (PE) stabilisiert, da sie eine negative Membrankrümmung bevorzugen (Abb. 1.1 C). Lipide mit verhältnismäßig großen Kopfgruppen, wie Lysophosphatidylcholine (LPC), bevorzugen eine positive Membrankrümmung, sodass durch sie die Bildung eines *fusion stalk* nahezu vollständig unterbunden wird.<sup>[16,17]</sup>

Der finale Schritt der Fusion ist die Öffnung einer Fusionspore durch die Verschmelzung der beiden Lipidmonoschichten auf der jeweils abgewandten Seite der Membranen, wodurch eine kontinuierliche Lipiddoppelschicht erzeugt wird

(Abb. 1.2 e). Hierbei kommt es zur Vermischung der wässrigen Kompartimente, die zuvor durch die Membranen getrennt waren. Der Mechanismus des Übergangs von der Hemifusion (Abb. 1.2 b) zur vollständigen Fusion (Abb. 1.2 e) ist noch nicht abschließend geklärt. Der Übergang könnte dabei auf direktem Weg erfolgen (Abb. 1.2 c) oder durch eine Erweiterung des initialen *fusion stalks* ein sogenanntes Hemifusionsdiaphragma (Abb. 1.2 d) gebildet werden.<sup>[18,19]</sup>



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Fusionsmechanismus. (a) Annäherung der Membranen, (b) Hemifusion, (c) direkte Öffnung einer Fusionspore, (d) Hemifusionsdiaphragma, (e) vollständige Fusion.

Die Bildung eines Hemifusionsdiaphragmas konnte bereits *in vitro*<sup>[20]</sup> sowie *in vivo*<sup>[21]</sup> beobachtet werden. Es wird jedoch diskutiert, ob es sich bei diesem Zustand um eine kinetische Sackgasse des Fusionsprozesses handelt, aus welcher keine vollständige Fusion erfolgen kann.<sup>[14,22,23]</sup>

In biologischen Prozessen wird die Membranfusion in den meisten Fällen mit Hilfe von Proteinen durchgeführt. Sie stellen die für die Fusion benötigte Energie zur Verfügung und ermöglichen eine umfassende Kontrolle der ablaufenden Fusionsprozesse. Nahezu alle intrazellulären Membranfusionen in Eukaryonten werden durch die Klasse der SNARE-Proteine vermittelt.<sup>[2]</sup>

## 1.2 SNARE-Protein vermittelte Membranfusion

SNARE-Proteine vermitteln nahezu alle intrazellulären Membranfusionsprozesse in eukaryontischen Zellen.<sup>[24]</sup> Sie spielen eine herausragende Rolle beim Transport neu gebildeter Lipide und Proteine vom endoplasmatischen Reticulum zu den

entsprechenden Organellen der Zelle, sowie bei der Fusion von Transportvesikeln mit der Plasmamembran (Exocytose).<sup>[25]</sup> Im Kontext dieser Arbeit ist dabei die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt bei der Reizweiterleitung in der Synapse besonders hervorzuheben. Hierbei handelt es sich um einen hochregulierten Prozess, bei dem die Ausschüttung des Neurotransmitters durch die Fusion eines synaptischen Vesikels mit der präsynaptischen Membran weniger als eine Millisekunde nach der Ankunft eines Aktionspotentials am synaptischen Endknöpfchen erfolgt.<sup>[26]</sup> Der Prozess der synaptischen Reizweiterleitung steht im Fokus intensiver Forschungsarbeiten, wodurch bereits viele Erkenntnisse über die beteiligten Proteine und Regulationsmechanismen gewonnen werden konnten.<sup>[27,28]</sup> Eine Entwicklung geeigneter Modellsysteme für die genaue Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen dieses, für die Funktion des Nervensystems essentiellen Prozesses, ist hierbei unerlässlich um ein detailliertes Verständnis für diesen hochkomplexen Vorgang zu erlangen. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, die Geschwindigkeit sowie die exakte Regulation in Modellsystemen nachzuahmen.

Der Name SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) ist historisch begründet und ist ein Akronym für die Bezeichnung *SNAP receptor*. Er basiert auf der Beobachtung, dass der Vesikeltransport zwischen einzelnen Kompartimenten des Golgi-Aparats in einem zellfreien System durch die Zugabe einer geringen Konzentration an N-Ethylmaleimid blockiert und durch Zugabe von Cytosol einer intakten Zelle wieder reaktiviert werden kann.<sup>[29,30]</sup> Das Protein aus dem Cytosol welches das N-Ethylmaleimid binden konnte wurde durch Block *et al.* als *N-ethylmaleimid-sensitive factor* (NSF) bezeichnet. 1990 konnten durch Clary und Rothman die Bindungspartner von NSF identifiziert werden und erhielten den Namen *soluble NSF-attachment Proteins* (SNAPs).<sup>[31]</sup> Mit Hilfe affinitätschromatographischer Verfahren konnte durch Söllner *et al.* anhand von rekombinatem NSF und SNAP wiederum die Interaktionspartner der SNAPs ermittelt werden.<sup>[32]</sup> Diese wurden SNAP receptors (SNAREs) genannt. Bei diesem Experiment wurde außerdem festgestellt, dass SNAREs einen Komplex aus den drei Proteinen Syntaxin-1A,

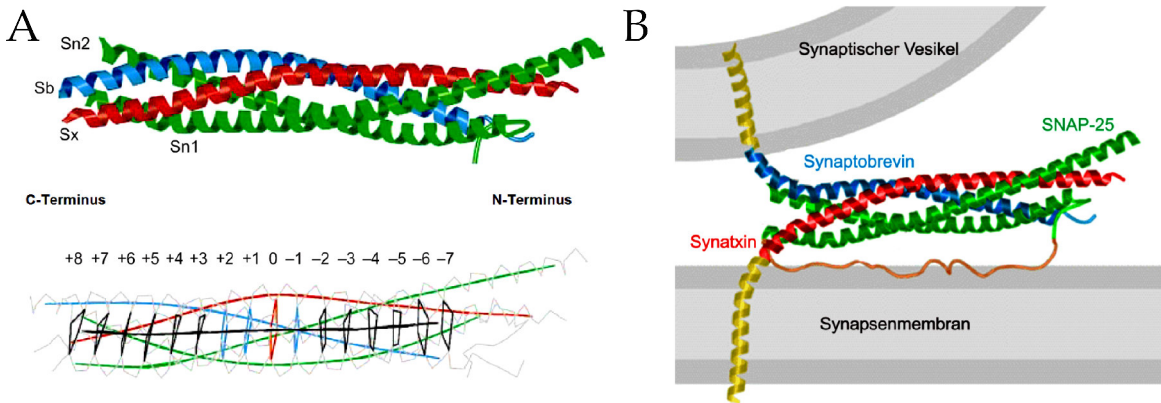


Synaptobrevin-2 und SNAP-25 (*synaptosome associated protein of 25 kDa*) mit einer Stöchiometrie von 1:1:1 ausbilden. In der Folge konnte 1998 durch Weber *et al.* gezeigt werden, dass diese drei SNARE-Proteine in der Lage sind die Fusion von Membranen *in vitro* zu vermitteln.<sup>[33]</sup>

Synaptobrevin-2, oder auch VAMP-2 (*vesicle associated membrane protein-2*), kann in der Membran synaptischer Vesikel gefunden werden und ist über eine transmembranständige  $\alpha$ -Helix in der Vesikelmembran verankert. Syntaxin-1A und SNAP-25 finden sich in der präsynaptischen Membran. Syntaxin-1A verfügt ebenfalls über eine transmembranständige  $\alpha$ -Helix, während SNAP-25 durch vier palmitoylierte Cystein-Reste an die Membran gebunden ist.<sup>[34]</sup> Syntaxin und SNAP-25 bilden gemeinsam einen Komplex in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran, an welchen die synaptischen Vesikel mit Hilfe von Synaptobrevin-2 binden können. Die Bildung dieses Komplexes setzt dabei die notwendige Energie frei, um die Fusion des Neurotransmitter-gefüllten Vesikels mit der präsynaptischen Membran einzuleiten und so die Ausschüttung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt auszulösen.

Der gebildete Komplex aus Syntaxin-1A, SNAP-25 und Synaptobrevin-2 wird SNARE-core-Komplex genannt. Er ist zusammengesetzt aus vier  $\alpha$ -Helices, die zusammen eine superhelikale (*coiled coil*) Struktur bilden.<sup>[24]</sup> Syntaxin-1A und Synaptobrevin-2 nehmen mit jeweils einer  $\alpha$ -Helix am Komplex teil, während SNAP-25 mit zwei  $\alpha$ -Helices an der Bildung beteiligt ist. Der Komplex besitzt eine außergewöhnlich hohe Stabilität. Er ist gegenüber SDS stabil und seine Zersetzungstemperatur liegt bei etwa 90 °C.<sup>[35]</sup> Eine schematische Darstellung des Komplexes ist in Abbildung 1.3 gezeigt.

Die an der Komplexbildung beteiligten  $\alpha$ -Helices aus 60-70 Aminosäuren besitzen eine evolutionär hochkonservierte Struktur aus einer Abfolge aus sieben sich wiederholenden Aminosäuren (*heptad repeat*), die als SNARE-Motiv bezeichnet wird.<sup>[36,37]</sup> An Position eins und vier dieser Aminosäureabfolge besitzen sie meist hydrophobe Reste, die bei der Ausbildung der Superhelix miteinander wechsel-



**Abbildung 1.3:** (A) Kristallstruktur des tetrameren coiled-coil-Motivs sowie eine schematische Darstellung der Interaktionsebenen der heptad repeat-Aminosäurenabfolge des SNARE-Komplexes. (B) Simuliertes Modell des trans-SNARE-Komplexes zwischen synaptischem Vesikel und präsynaptischer Membran. Abgewandelt nach<sup>[27]</sup>.

wirken und auf diese Weise den Komplex stabilisieren. Im tetrameren Komplex liegen jeweils vier hydrophobe Aminosäure Reste in einer Ebene zusammen und der gesamte Komplex ist aus insgesamt 16 Ebenen aufgebaut (vergl. Abb. 1.3 A). Eine Besonderheit des SNARE-Komplexes im Vergleich zu anderen superhelikalen Strukturen ist hierbei der sogenannte *zero ionic layer* in der Mitte des Komplexes. Diese Ebene besteht als einzige aus hydrophilen Aminosäureresten, die über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind. Die Guanidino-Gruppe eines Arginins von Synaptobrevin-2 wechselwirkt hier mit den Carbamoyl-Gruppen dreier Glutamine von SNAP-25 (2  $\times$ ) und Syntaxin-1A (1  $\times$ ).<sup>[36]</sup>

Im SNARE-Komplex liegen die vier  $\alpha$ -Helices in einer parallelen Anordnung vor. Die Bindung von Synaptobrevin-2 erfolgt dabei vorzugsweise vom N- zum C-Terminus in Richtung der Transmembrananker von Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1A, wobei sich die einzelnen Ebenen der *heptad repeat*-Sequenz sich Reißverschlussartig verbinden (*zippering*-Modell).<sup>[38]</sup> Hierdurch werden die beiden Membranen in räumliche Nähe zueinander gebracht, sodass die Fusion stattfinden kann. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Anhand von Kristallstrukturen konnte jedoch festgestellt werden, dass sich die gebildete Superhelix sich bis zu den transmembranständigen Sequenzen von Synaptobrevin-

2 und Syntaxin-1A fortsetzt.<sup>[39]</sup> Es wird hierbei vermutet, dass die bei der Komplexbildung freiwerdende Energie über die Verbindungssequenzen zwischen SNARE-Motiv und Transmembrananker direkt in die Membran übertragen wird und auf diese Weise die Fusion mit der anschließenden Öffnung einer Fusionspore auslöst.

### 1.3 Modellsysteme zur Untersuchung der SNARE-vermittelten Fusion

Aufgrund der hohen Komplexität biologischer Systeme werden, um die zugrunde liegenden Mechanismen detailliert aufklären zu können, Modellsysteme eingesetzt. In Modellsystemen können die beteiligten Komponenten und äußeren Bedingungen genau kontrolliert werden, sodass die beobachteten Prozesse leichter verstanden werden können. Die Membranfusion, als einer der Schlüsselschritte biologischer Prozesse steht dabei im Fokus einer Vielzahl von Forschungsarbeiten. Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Modellmembransysteme zur Untersuchung verwendet. Die prominentesten Modellsysteme für die SNARE-vermittelte Membranfusion sollen im Folgenden vorgestellt werden.

#### 1.3.1 Vesikel-Vesikel-Fusion in Lösung

Die gängigste Methode zur Untersuchung der Fusion von Vesikeln besteht in der Beobachtung der Lipidvermischung zweier Populationen von fluoreszenzmarkierten Vesikeln in Lösung mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers. Hierzu werden meist kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUVs) eingesetzt. Diese bieten den Vorteil, dass Membranständige Proteine, wie die zu untersuchenden SNARE-Proteine, sehr leicht mit Hilfe Detergenz-basierter Methoden in die Vesikelmembran rekonstituiert werden können.<sup>[40,41]</sup> Die Detektion der Lipidvermischung erfolgt anhand der zeitlich aufgelösten Beobachtung der Intensität der in die Vesikel

eingebrachten Fluoreszenzfarbstoffe. Hierzu können verschiedene Konfigurationen von lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet werden.

Im einfachsten Fall wird eine Vesikelpopulation mit einer hohen Konzentration an Farbstoff verwendet, wodurch die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe der Farbstoffmoleküle zueinander bei bestimmten Farbstoffen zum Teil selbst gelöscht wird (*self quenching*). Durch die durch die Fusion verursachte Lipidvermischung mit Vesikeln ohne eingebrachten Farbstoff wird die Konzentration in der Membran verringert, sodass das Fluoreszenzsignal ansteigt (*dequenching assay*).

Eine Erweiterung dieses Konzepts ist der Einsatz zweier Farbstoffe unterschiedlicher Anregungswellenlänge, die miteinander ein FRET (*Förster resonance energy transfer*)-Paar bilden. Der FRET-Effekt bewirkt dabei einen strahlungslosen Energietransfer vom Donor-Farbstoff auf den Akzeptor-Farbstoff, sobald sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden. Das Emissionsspektrum des Donor-Farbstoffs muss hierfür möglichst gut mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen. Wird nur die Fluoreszenz des Donors angeregt, bewirkt der Energietransfer eine Abschwächung der Intensität des Donors und eine Anregung der Akzeptor-Fluoreszenz. Durch die Verringerung der Konzentration bei der Fusion wird dieser Effekt aufgehoben, sodass die Intensität des Donors ansteigt, während die des Akzeptors sinkt ("*deFRET assay*").

Dieser Ansatz kann auch invers verwendet werden, indem beide Vesikelpopulationen nur jeweils einen der beiden Farbstoffe des FRET-Paares enthalten. Hier gelangen Donor und Akzeptor erst bei der Vermischung der Lipide in räumliche Nähe. In diesem Fall sinkt die Intensität des Donors und die des Akzeptors steigt entsprechend ("*FRET assay*").

Anhand der aufgenommenen Fluoreszenzintensitätsverläufe von Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimenten können Aussagen über die Kinetik des ablaufenden Fusionsprozesses getroffen werden. In einigen bisherigen Arbeiten konnten so Erkenntnisse über den Einfluss der Lipidzusammensetzung der Membran<sup>[42]</sup>, die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  in Abhängigkeit vom Gehalt an negativ geladenen Lipiden<sup>[43,44]</sup>,

sowie der Vesikelgröße und damit der Membrankrümmung auf die Fusion erzielt werden.<sup>[45-47]</sup> Es können dabei jedoch zunächst nur Informationen über das gesamte Ensemble der enthaltenen Vesikel erhalten werden. Eine Unterscheidung der Kinetiken verschiedener parallel ablaufender Prozesse oder das Auftreten von Zwischenstufen der Fusion ist nur schwer möglich. Durch das einbringen geeigneter wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoffe kann ein Transfer des Vesikelinhalts nachgewiesen werden und so die Kinetik der vollständigen Fusion unabhängig von Docking und Hemifusion detektiert werden.<sup>[8,33]</sup> Die erhaltenen Ergebnisse können hierbei jedoch durch das Aufreißen von Vesikeln oder Verlust des Vesikelinhalts während der Fusion verfälscht werden.

Um einen tieferen Einblick in den Ablauf der Fusion zu erhalten, wurden ausgehend von den Experimenten zur Vesikel-Vesikel-Fusion in Lösung Verfahren entwickelt, um einzelne Fusionsereignisse getrennt auflösen zu können.

### 1.3.2 Fusion an immobilisierten Vesikeln

Eine Erweiterung der Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimente hinzu einer Detektion einzelner Fusionsereignisse ist die Fusion an immobilisierten Vesikeln. Hierbei wird eine der beiden Vesikelpopulationen, wie sie auch für die Vesikelfusion in Lösung eingesetzt werden, auf einer passivierten transparenten Oberfläche immobilisiert. Die Substratoberfläche wird meist mit Polyethylenglycol (PEG) beschichtet, um ein Spreiten der Vesikel zu verhindern.<sup>[48,49]</sup> Die Immobilisierung der Vesikel erfolgt meist durch eine Avidin vermittelte Bindung zwischen biotinyliertem PEG auf der Oberfläche und einem in die Vesikelmembran eingebrachten biotinylierten Lipid.<sup>[50-52]</sup> Auf die immobilisierten Vesikel wird die zweite Vesikelpopulation gegeben und die Interaktion einzelner Vesikelpaare zeitlich aufgelöst mittels TIRF (*total internal reflection fluorescence*)-Mikroskopie verfolgt. Eine schematische Abbildung des Systems ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

Die Fusionsexperimente an immobilisierten Vesikeln sind gut geeignet um den Austausch des Vesikelinhalts zwischen den Vesikeln zu beobachten, da die Vesikel

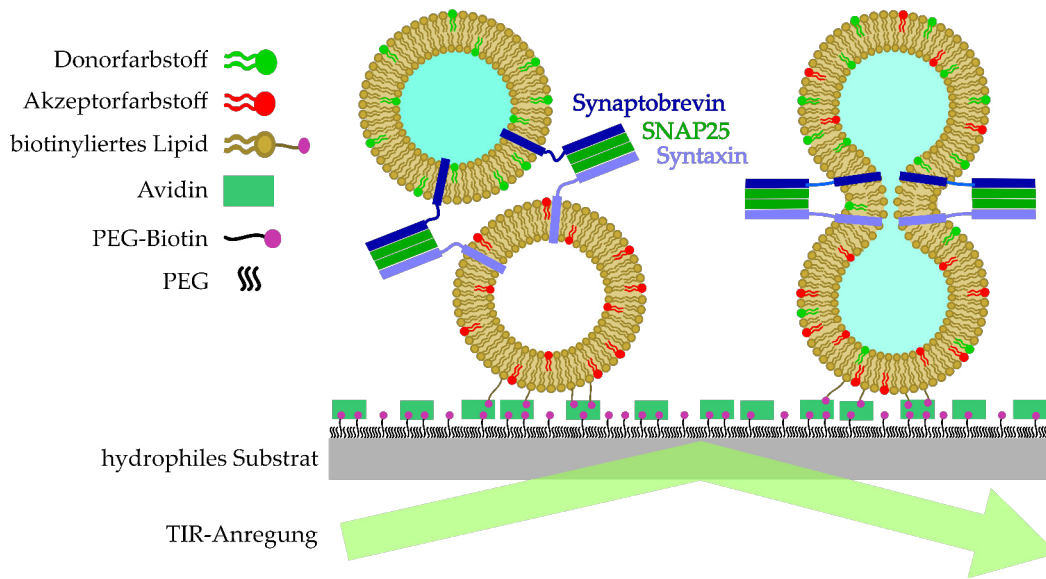


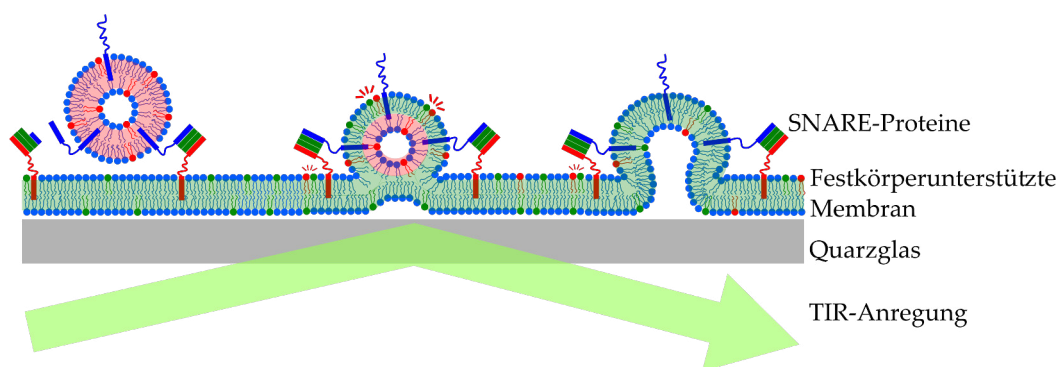
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Fusionsexperiments an immobilisierten Vesikeln.

zwei abgeschlossene wässrige Kompartimente beinhalten, die sich bei der Öffnung einer Fusionspore vermischen.<sup>[50,51]</sup> Der Nachteil dieses Modellsystems ist, dass es sich bei den Vesikeln um gekrümmte Membranen handelt. Im natürlichen System fusionieren die Vesikel im Normalfall mit einer planaren Membran. Die zusätzliche Energie, die durch den Abbau der Krümmung der Membranen bei der Fusion zweier Vesikel frei wird, könnte somit die beobachtete Kinetik der Fusion verfälschen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob die Fusion *in vivo* erst durch die Induktion einer Membrankrümmung durch Synaptotagmin-1 in Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$  eingeleitet wird.<sup>[4,53–55]</sup>

### 1.3.3 Detektion einzelner Fusionsereignisse auf festkörperunterstützten Membranen

Ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung einzelner Fusionsereignisse sind planare festkörperunterstützte Membranen. Sie ahmen die Membrantopologie der Fusion im biologischen System besser nach als dies für Vesikel-basierte Systeme der Fall ist. Festkörperunterstützte Membranen können sehr leicht durch das

Spreiten von SUVs, wie sie auch in Vesikelexperimenten verwendet werden, auf hydrophilen Substraten erzeugt werden.<sup>[56]</sup> Durch die Festkörperunterstützung besitzen sie eine sehr hohe Langzeitstabilität. Die Detektion der Fusion von SUVs mit der planaren Membran erfolgt meist mittels TIRF-Mikroskopie.<sup>[57,58]</sup> Die TIRF-Mikroskopie erlaubt außerdem den Einsatz von lichtstarken Ölimmersionsobjektiven und schnellen CCD-Kameras, die eine zeitliche Auflösung bis in den einstelligen Millisekundenbereich ermöglichen.<sup>[59]</sup> Eine Schematische Darstellung des Systems ist in Abbildung 1.5 gezeigt.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung eines Fusionsexperiments auf festkörperunterstützten Membranen.

An festkörperunterstützten Membranen wurden die bis dato schnellsten Fusionsereignisse im Bereich von 5–25 ms detektiert, wodurch zum ersten Mal Fusionsereignisse mit einer Dauer nahe der im biologischen System beobachteten Zeitskalen im Submillisekundenbereich beschrieben wurden.<sup>[60–62]</sup> Die Fusion war hierbei jedoch in den meisten Fällen unabhängig von der Anwesenheit von SNAP25. In Vesikel-basierten Systemen dagegen ist eine Fusion nur, wie im biologischen System, nur durch die Bildung des vollständigen SNARE-Komplexes möglich.

Durch den engen Kontakt der Membran zur Substratoberfläche kann die Mobilität der Lipide und rekonstituierten Proteine eingeschränkt sein. Die Einschränkung der Mobilität ist hierbei stark von den Eigenschaften des verwendeten Substrats und der verwendeten Präparationsmethode sowie von der Zusammensetzung der Lipide in der Membran abhängig.<sup>[56]</sup> Es finden daher in der Literatur variierende Werte

#### 1.4. Detektion einzelner SNARE-vermittelter Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen

für Diffusionskoeffizienten in festkörperunterstützten Membranen. Auf Glimmer (Mica) wurden zum Beispiel Diffusionskoeffizienten zwischen 1 und 4  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  in DOPC Membranen mit 30 % Cholesterin ( $1.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) und ohne Cholesterin ( $4.2 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) bestimmt.<sup>[63]</sup>

Eine Detektion der Ausschüttung des Inhalts der fusionierenden Vesikel ist durch den Substratkontakt ebenfalls nur eingeschränkt möglich. Zwischen Substratoberfläche und Membran befindet sich eine nur 2–3 nm dünne Wasserschicht, in die der Vesikelinhalt ausgeschüttet werden könnte. Im Fall einer Studie von Wang et al. war dies nicht möglich und es konnte gezeigt werden, dass der Vesikelinhalt durch Aufreißen der Vesikel in die umgebende Lösung entwich.<sup>[59]</sup>

Um die Nachteile des engen Substratkontakts zu umgehen, wird die Membran in vielen Arbeiten durch ein Polymerkissen oder das Aufbringen von *spacer*-Molekülen von der Substratoberfläche entkoppelt. Hierdurch kann die Mobilität der Membrankomponenten gesteigert werden, erreicht jedoch nicht ganz das Niveau freistehender Membranen.<sup>[64]</sup> Zusätzlich ist in diesem Fall ein größeres wässriges Kompartiment unter der Membran vorhanden, sodass die Ausschüttung des Vesikelinhalts gelingen kann.<sup>[65]</sup>

## **1.4 Detektion einzelner SNARE-vermittelter Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Assay zur Untersuchung einzelner SNARE-vermittelter Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen entwickelt werden. Hierbei handelt es sich um ein neues Modellsystem, welches bisher noch nicht für eine Untersuchung SNARE-vermittelter Membranfusion verwendet wurde. Porenüberspannende Membranen vereinen die Vorteile der hohen Stabilität festkörperunterstützter Membranen, aufgrund der Unterstützung durch das poröse

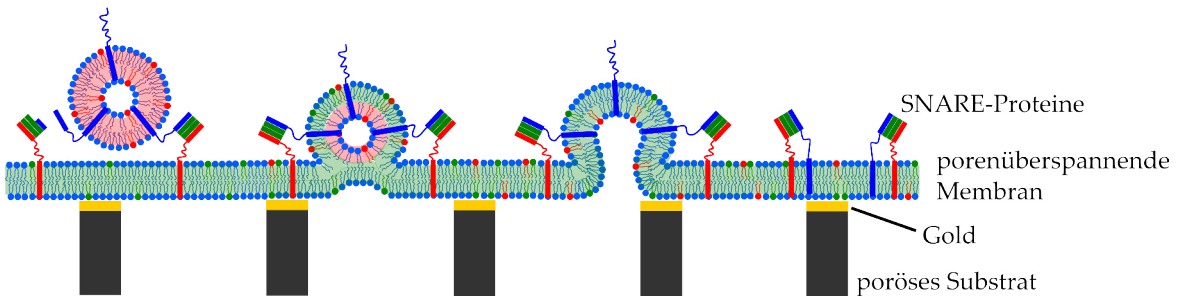


Substrat, mit denen von freistehenden Membranen mit einem wässrigen Kompartiment auf beiden Membranseiten. In einer vorhergehenden Arbeit wurde durch Höfer et al. bereits ein Assay zur Detektion von einzelnen Fusionsereignissen auf porenüberspannenden Membranen entwickelt, woran die Calcium-vermittelte Fusion großer unilamellarer Vesikel (LUVs) untersucht werden konnte.<sup>[66,67]</sup> Hierbei wurden porenüberspannende Membranen mit Hilfe der painting-Technik durch das Aufbringen von in unpolarem Lösungsmittel gelösten Lipiden auf ein hydrophob funktionalisiertes Substrat erzeugt. Die Fusion einzelner Vesikel konnte im Anschluss mittels konfokaler Rasterfluoreszenzmikroskopie durch die Beobachtung der Lipidvermischung detektiert werden. Hierzu wurde der lipidgekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 in die porenüberspannende Membran eingebracht. Die fusionierten Vesikel enthielten den lipidgekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Im Fall einer Vermischung der Lipide konnte so ein Abfall der Fluoreszenzintensität von Oregon Green 488, bei einem gleichzeitigen Anstieg der Intensität von Texas Red, durch den Förster Resonanzenergietransfer zwischen den Farbstoffen beobachtet werden.

Eine zuverlässige Rekonstitution von Membranproteinen in auf diese Weise hergestellte Membranen ist nur schwer möglich und es können Reste des organischen Lösungsmittels in der Membran verbleiben. Aus diesem Grund sollte die Präparation der porenüberspannenden Membranen lösungsmittelfrei durch das Spreiten von GUVs (giant unilamellar vesicles) erfolgen. Hierfür mussten zunächst geeignete Protokolle für eine reproduzierbare Membranerzeugung auf hydrophil funktionalisierten porösen Substraten entwickelt werden. Um die SNARE-vermittelte Fusion untersuchen zu können, sollten die Akzeptor-SNARE-Proteine Syntaxin-1A und SNAP25 in GUVs rekonstituiert werden, um diese im Anschluss zur Erzeugung porenüberspannender Membranen zu verwenden. Die Fusion von LUVs mit rekonstituiertem Synaptobrevin-2 sollte in der Folge analog zu den Experimenten von Höfer et al. mit Hilfe der konfokalen Rasterfluoreszenzmikroskopie

#### 1.4. Detektion einzelner SNARE-vermittelter Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen

detektiert werden. Eine schematische Darstellung des angestrebten Modellsystems für die SNARE-vermittelte Membranfusion ist in Abbildung 1.6 gezeigt.



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung des angestrebten Modellsystems zur Untersuchung SNARE-vermittelter Vesikelfusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen.



## 2 Zielsetzung

Die Fusion von Membranen stellt einen Schlüsselschritt in vielen Transportprozessen biologischer Systeme dar und ist die Grundlage für die Ausschüttung von Neurotransmittern zur Reizweiterleitung am synaptischen Spalt. Die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran ist ein hochregulierter Prozess und unterliegt einer genauen räumlichen und zeitlichen Kontrolle. Der exakte Mechanismus dieses Vorgangs ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit, konnte bisher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Artificielle Modellmembransysteme bieten hierbei die Möglichkeit, die ablaufenden Prozesse unter kontrollierten Bedingungen detailliert zu untersuchen. Die bisher eingesetzten Modellsysteme stützten sich hierbei auf die Vesikel-Vesikel-Fusion oder auf die Fusion von Vesikeln mit festkörperunterstützten Membranen, wodurch bereits vielfältige Erkenntnisse über den Prozess der Membranfusion erhalten werden konnten. Die Membrantopologie des biologischen Systems wird hierdurch jedoch nur unzureichend abgebildet, wodurch ein Einfluss auf den Fusionsprozess nicht ausgeschlossen werden kann.

Porenüberspannende Membranen bieten hier ein alternatives Modellsystem, welches in der Lage ist die Membrantopologie an der Synapse abzubilden. Sie kombinieren die mechanische Stabilität festkörperunterstützter Membranen, durch das unterstützende Substrat, mit den Vorteilen freitragender Membranen. Sie besitzen je ein wässriges Kompartiment auf beiden Membranseiten, wodurch Transportprozesse, wie die Ausschüttung des Vesikelinhalts bei der Fusion, adressiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Assay zur Untersuchung der SNARE-Protein-vermittelten Fusion auf porenüberspannenden Membranen entwickelt werden. Hierzu mussten zunächst die vorhandenen Protokolle für die hydrophile Funktionalisierung poröser Siliziumsubstrate optimiert werden, um eine reproduzierbare Membranbildung zu gewährleisten. Weiterhin musste eine geeignete Methode zur Rekonstitution der SNARE-Proteine in porenüberspannende Membranen entwickelt werden. Um zu überprüfen ob die Voraussetzungen für eine erfolgreiche SNARE-vermittelte Fusion gegeben sind, sollte die laterale Mobilität der Proteine in porenüberspannenden Membranen bestimmt werden. Dies sollte die Grundlage bilden, um einzelne Vesikelfusionsereignisse mit der planaren porenüberspannenden Membran mittels konfokaler Laserrastermikroskopie zeitaufgelöst zu beobachten.

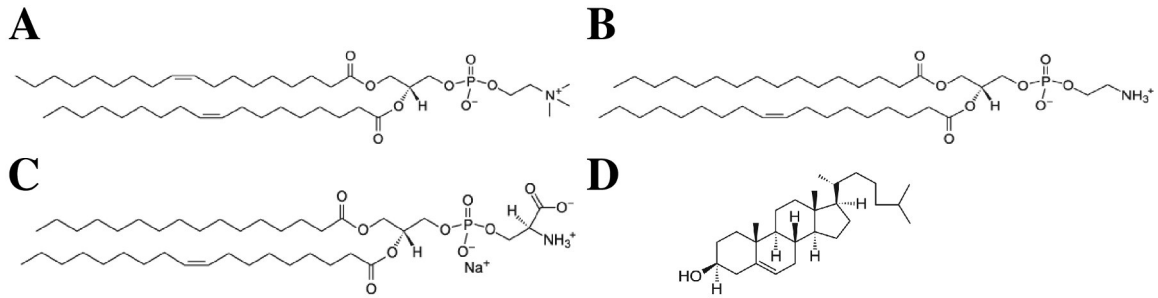
# 3 Materialien und Methoden

## 3.1 Lipidchemische Methoden

### 3.1.1 Verwendete Lipide

Die in dieser Arbeit verwendete Mischung von Lipiden zur Präparation von Vesikeln und Membranen orientiert sich an der natürlichen Lipidzusammensetzung synaptischer Vesikel. Diese enthalten Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol sowie Cholesterin in einem molaren Verhältnis von 40:32:12:5:10.<sup>[68]</sup> In der Literatur ist eine breite Variation an verschiedenen Lipidmischungen für *in vitro* Fusionsexperimente zu finden.<sup>[69-74]</sup> Deshalb wurde sich, für die Entwicklung und Etablierung des in dieser Arbeit vorgestellten Fusionssystems auf porenüberspannenden Membranen, auf eine leicht vereinfachte Lipidmischung beschränkt, die zuvor bereits erfolgreich von unseren Kooperationspartnern eingesetzt wurde.<sup>[20]</sup> Dies sichert zum einen die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und zum anderen konnten bestehende Protokolle zur Rekonstitution der SNARE-Proteine in Vesikel als Ausgangspunkt für die Rekonstitution in porenüberspannende Membranen verwendet werden.

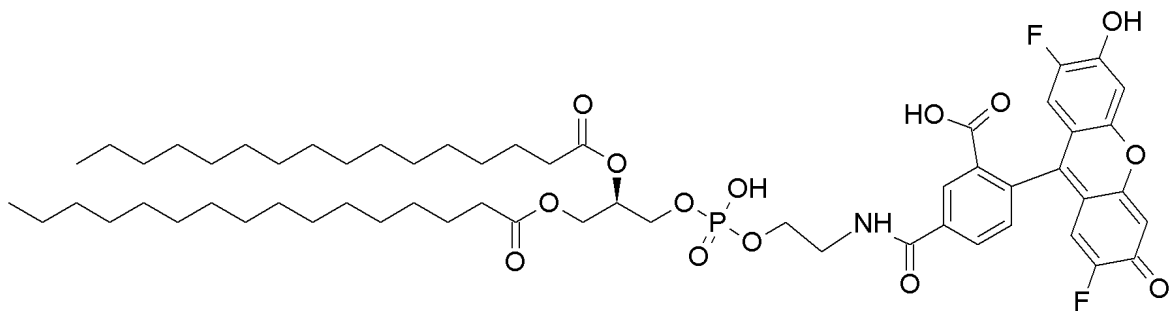
Die eingesetzte Lipidmischung bestand aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (POPE), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (POPS) und Cholesterin (CH) in einem molaren Verhältnis von 5:2:1:2 (Abb. 3.1).



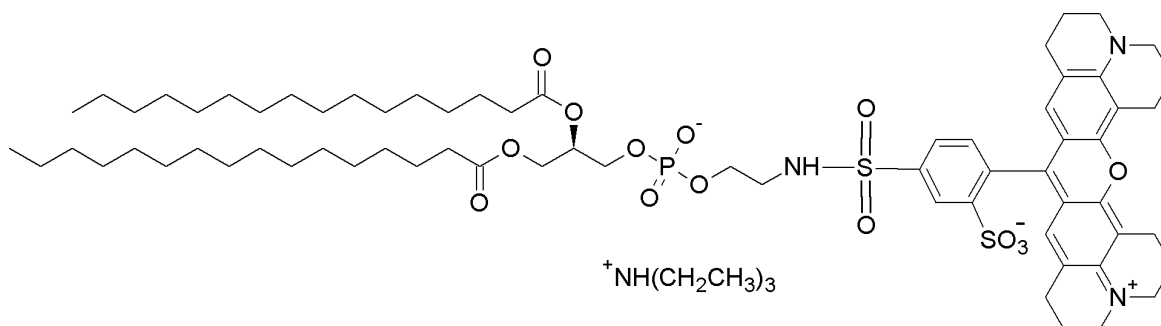
**Abbildung 3.1:** Strukturformeln der verwendeten Lipide. (A) DOPC,  $C_{44}H_{84}NO_8P$ , MW 786.1 g/mol. (B) POPE,  $C_{39}H_{76}NO_8P$ , MW 718.0 g/mol. (C) POPS,  $C_{40}H_{75}NO_{10}PNa$ , MW 784.0 g/mol. (D) Cholesterin,  $C_{27}H_{46}O$ , MW 386.7 g/mol

### 3.1.2 Verwendete lipidgebundene Fluoreszenzfarbstoffe

Um eine Untersuchung der in der dieser Arbeit verwendeten Membransysteme mittels Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurden den hergestellten Lipidmischungen lipidgebundene Fluoreszenzsonden zugesetzt. Es handelte sich dabei um das synthetische Phospholipid DHPE (1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin), an dessen Kopfgruppe das jeweilige Farbstoffmolekül gebunden war. Es wurden zum einen Oregon Green 488 DHPE mit einem Absorptionsmaximum von 501 nm und einem Emissionsmaximum von 526 nm eingesetzt (Abb. 3.2). Zum anderen wurde Texas Red DHPE mit einem Absorptions- und Emissionsmaximum von 595 und 615 nm verwendet (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.2:** Strukturformel des lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffs Oregon Green 488 DHPE, MW 1086.25 g/mol.



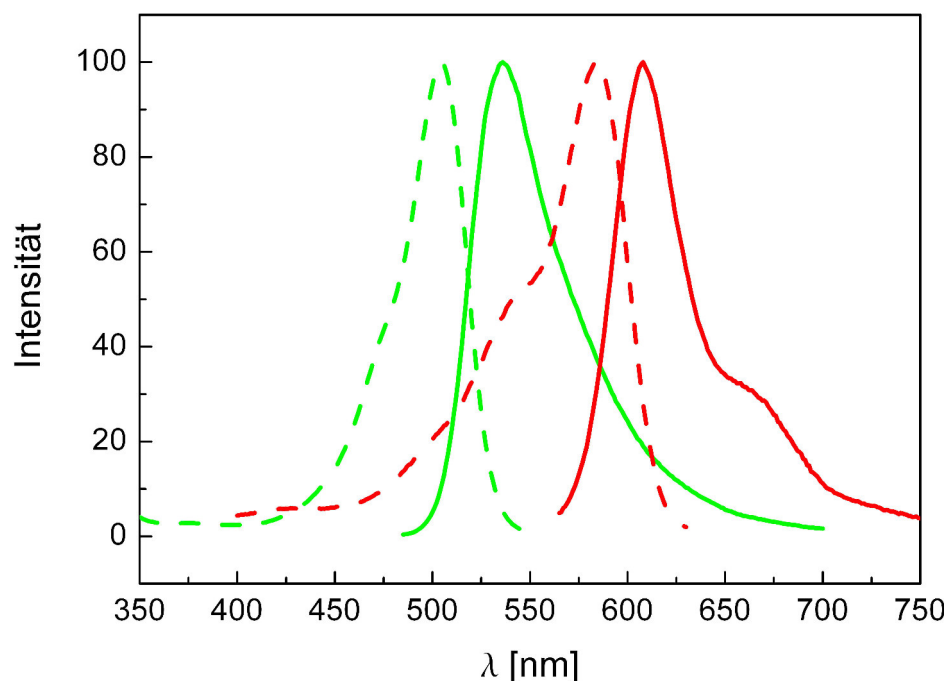
**Abbildung 3.3:** Strukturformel des lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red DHPE (Triethylammonium-Salz), MW 1381.84 g/mol.

Die Fluoreszenzsonden wurden, wenn nicht anders angegeben, standardmäßig mit einer Konzentration von 1 mol% eingesetzt. Aufgrund der Ethanamin-Kopfgruppe der Fluoreszenzsonden wurde die Menge an POPE in der Lipidmischung entsprechend der Menge an eingesetztem Farbstoff reduziert.

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden gewählt, da sie ein FRET (Förster Resonanz Energie Transfer)-Paar bilden. Der FRET-Effekt bewirkt dabei einen strahlungslosen Energietransfer vom Donor-Farbstoff (Oregon Green) auf den Akzeptor-Farbstoff (Texas Red), sobald sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden. Das Emissionsspektrum des Donor-Farbstoffs muss hierfür möglichst gut mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen (Abb. 3.4). Wird nur die Fluoreszenz des Donors angeregt, bewirkt der Energietransfer eine Abschwächung der Intensität des Donors und eine Anregung der Akzeptor-Fluoreszenz. Die FRET-Effizienz nimmt dabei mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor ab. Der für jedes FRET-Paar charakteristische Förster-Radius, der Abstand bei welchem die Effizienz 50% beträgt, wurde für Oregon Green und Texas Red auf 6.27 nm bestimmt.<sup>[75]</sup>

Der FRET-Effekt wurde in dieser Arbeit dazu genutzt, um eine Vermischung der Lipide während der Fusion zweier Membranen anhand ihrer Fluoreszenz nachzuweisen. Hierzu ist die eine Membran mit Oregon Green, die jeweils andere mit Texas Red dotiert. Vermischen sich die Lipide beider Membranen treten die Fluorophore





*Abbildung 3.4: Absorptions- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Oregon Green (grün) und Texas Red (rot). Abbildung nach Höfer.<sup>[66]</sup>*

in räumliche Nähe und es kann zum FRET kommen. Die daraus resultierenden Intensitätsänderungen der beiden Farbstoffe werden fluoreszenzspektroskopisch sowie -mikroskopisch untersucht.

#### 3.1.3 Herstellung von Lipidfilmen

Für die Herstellung von Lipidvesikeln wurden Lipidfilme mit einer Gesamtmasse von 0.465 mg Lipid pro Ansatz verwendet. Es wurden jeweils 200  $\mu$ L Chloroform in Reagenzgläsern vorgelegt. Die entsprechenden Volumina der Lipidstammlösungen (5 mg/mL) wurden in die Reagenzgläser gegeben und das organische Lösungsmittel durch Verblasen im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur entfernt. Hierdurch bildete sich an den Glaswänden durch spontane Selbstorganisation ein multilamellarer Lipidfilm aus. Zum vollständigen Entfernen des Lösungsmittels wurden die Li-

pidfilme für 1 h im Vakuum getrocknet. Die Reagenzgläser wurden mit Parafilm® verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.4 Herstellung von Lipidvesikeln

Lipidvesikel stellen ein einfaches Modellsystem für freistehende Membranen dar. Sie bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, welche ein wässriges Kompartiment einschließt. Mit Hilfe von Vesikeln lassen sich besonders Membrantransportprozesse, die zwei voneinander getrennte Kompartimente erfordern, untersuchen. Je nach Größe des Vesikels können Analogien zu verschiedenen Strukturen in biologischen Systemen gezogen werden. Man unterscheidet im Allgemeinen drei verschiedene Größenbereiche von Lipidvesikeln: Kleine (20–50 nm), große (100–1000 nm), sowie riesige (bis ca. 150 µm) Vesikel. Die in dieser Arbeit für die Herstellung der verschiedenen Vesikelgrößen verwendeten Methoden werden im Folgenden vorgestellt. Als Ausgangspunkt für die Herstellung von lösungsmittelfreien, unilamellaren Vesikeln diente ein zuvor hergestellter Lipidfilm.

#### Kleine unilamellare Vesikel

Kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUVs) mit einem Durchmesser von 20–50 nm ähneln in ihrer Struktur besonders kleinen Zellorganellen wie Transportvesikeln (z. B. Endo- bzw. Exosomen). Ein prominentes Beispiel im Kontext dieser Arbeit sind hierbei die synaptischen Vesikel. Aufgrund ihrer geringen Größe besitzen SUVs eine starke Membrankrümmung. Für mikroskopische Untersuchungen eignen sich SUVs nicht, da ihre Größe unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegt.

Die Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel erfolgte nach einer Methode basierend auf der Solubilisierung der Lipide mit Hilfe von Detergenzien, welche im Anschluss sukzessive entfernt werden.<sup>[41]</sup> Ein Lipidfilm (0.465 mg) wurde dabei in 50 µL Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM DTT) mit einer

Konzentration von 29.2 mg/mL (100 mM) *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucosid (*n*OG) vollständig gelöst. Die Detergenskonzentration muss bei dieser Methode oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration*, CMC) von 17 mM für *n*OG liegen, bei welcher die Detergensemoleküle beginnen Mizellen zu bilden. Die Lipid- und Detergensemoleküle liegen dann in gemischten Mizellen und somit vollständig in der wässrigen Phase solubilisiert vor. Das Detergens wurde durch Größenausschlusschromatographie auf einer Sephadex G25-Säule (Illustra NAP-25, GE Healthcare) aus der Lösung entfernt, wodurch sich die Mizellen zu größeren Aggregaten verbinden, welche sich in einem Selbstorganisationsprozess zu SUVs umformen. Hierzu wurde die Säule in Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM DTT) äquilibriert und die detergensehaltige Lipidlösung aufgegeben. Durch Schrittweise Zugabe von Puffer zu je 200  $\mu$ L (ges. 5 mL) wurden einzelne Fraktionen aufgefangen und mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie der Elutionszeitpunkt der Vesikel anhand des enthaltenen lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt. Es ergab sich eine Vorlaufmenge von 2.7 mL, welche bei den folgenden Präparationen verworfen wurde. Es wurde eine Eluatmenge von 900  $\mu$ L aufgefangen.

Die detergensvermittelte Bildung von SUVs stellt eine gute Methode zur Rekonstitution von Membranproteinen dar, da diese selbst aufgrund ihrer hydrophoben membranständigen Domänen nur unter Verwendung von Detergenzien in Lösung gehalten werden können. Durch Inkubation in der mizellaren Lipidlösung können sich gemischte Mizellen aus Lipid, Protein und Detergens ausbilden, sodass die Proteinmoleküle direkt in die gebildeten Vesikel inkorporiert werden können. Eine genauere Betrachtung der in dieser Arbeit entwickelten Rekonstitutionsmethode für die verwendeten Proteine in SUVs und ihrer Durchführung erfolgt im Abschnitt 3.3.

#### **Große unilamellare Vesikel**

Große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUVs) mit Durchmessern von 100–1000 nm besitzen die Ausmaße von Zellorganellen wie z.B. Lyso- oder Peroxisomen. Sie unterscheiden sich von SUVs vor allem durch ihre geringere Mem-

brankrümmung und dem größeren eingeschlossenen Volumen, wodurch Transportprozesse über die Membran wie der Auf- bzw. Abbau von Gradienten leichter untersucht werden können. Die Vesikel lassen sich auch durch klassische Fluoreszenzmikroskopie als einzelne Objekte detektieren.

Die am weitesten verbreitete und auch hier verwendete Methode zur Herstellung von LUVs ist die Extrusion. Hierzu wurde ein Lipidfilm (0.465 mg) mit 500  $\mu$ L Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM DTT) versetzt und für 30 min inkubiert. Dabei dringt Wasser zwischen die einzelnen Lipidschichten, sodass der Lipidfilm quillt und sich multilamellare vesikuläre Strukturen bilden. Dieser Vorgang wird als *natural swelling* bezeichnet. Durch anschließendes Aufschütteln (Vortexen  $3 \times 30$  s im Abstand von 5 min) lösen sich multilamellare Vesikel (MLVs) von der Oberfläche ab. Die MLVs werden durch eine poröse Membran mit bekannter Porengröße gepresst und so in unilamellare Vesikel überführt. Es wurde ein Mini-Extruder (*LiposoFast-Basic*, Avestin, Ottawa, Kanada) mit Polycarbonatmembranen, die eine mittlere Porengröße von 1000 nm besaßen, eingesetzt. Die MLV-Lösung wurde 31 mal durch die Membran gepresst. Dies führte bei der verwendeten Lipidmischung zu einer mittleren Vesikelgröße von  $325 \pm 20$  nm (bestimmt durch dynamische Lichtstreuung).

#### **Riesige unilamellare Vesikel**

Die sogenannten riesigen unilamellaren Vesikel (*giant unilamellar vesicles*, GUVs) können in ihrer Ausdehnung der einer gesamten Zelle entsprechen. Sie erreichen einen Durchmesser von einem bis ca. 150  $\mu$ m. Damit sind sie sehr gut zur Untersuchung mit mikroskopischen Methoden geeignet, wobei mit Hilfe konfokaler Mikroskopie auch optische Schnitte abbildbar sind. Hierdurch ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Moleküle, wie Peptide oder Proteine, im Bereich der Membran direkt zu lokalisieren.

GUVs können durch *natural swelling* eines Lipidfilms in einer Pufferlösung erhalten werden. Jedoch bilden sich bei diesem Prozess vorwiegend multilamellare

Vesikel aus. Für fluoreszenzmikroskopische Experimente an einzelnen GUVs eignet sich diese Methode, da sie sehr schonend für eventuell eingebrachte Proteine ist.

Eine bedeutend höhere Ausbeute an unilamellaren Vesikel kann durch die Elektroformation (*electroswelling*) erhalten werden. Dabei wird ein Lipidfilm auf einen mit leitfähigem Indiumzinnoxid (ITO) beschichteten Glasträger (ITO-Gläschen) aufgebracht. Die Rehydratisierung des Lipidfilms erfolgt unter Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes, wodurch vorwiegend GUVs gebildet werden. Aufgrund der elektrischen Spannung reagiert diese Methode empfindlich auf in der Lösung enthaltene Salze, sodass sie nahezu ausschließlich in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt werden kann. Um die gebildeten Vesikel in Pufferlösungen überführen zu können, wird zum Ausgleich des osmotischen Drucks häufig Sucrose oder Glucose zugesetzt.

Die Herstellung von GUVs erfolgte in dieser Arbeit stets nach dem gleichen Protokoll. Jeweils zwei ITO-Gläschen mit dem aufgetragenen Lipidfilm (Kapitel 3.6.2 bzw. 3.3) wurden mit Hilfe einer Silikon-Dichtung zu einer Kammer zusammengesetzt und mit Sucrose-Lösung befüllt (2 mL, 200 mM). An die leitfähigen Oberflächen der ITO-Gläschen wurde über Kupferbänder eine Sinusspannung ( $1.6 V_{p-p}$ ) für 3 h angelegt. Die gebildeten Vesikel wurden durch vorsichtiges Schwenken der Kammer von der Glasoberfläche gelöst und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Der Erfolg der Vesikelbildung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft und die Vesikellösung bis zur zeitnahen Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

#### 3.1.5 Fusionsexperimente in der Bulklösung

Fusionsexperimente in der Bulklösung wurden in dieser Arbeit als Kontrollexperiment für den Erfolg der Rekonstitution der SNARE-Proteine in Vesikel verwendet. Hierzu wurde ein Experiment mit den zunächst gebildeten SUVs durchgeführt. Im Anschluss konnten auch die aus den SUVs hergestellten GUVs und LUVs auf ihre Fusogenität hin untersucht werden. Die Detektion der Fusion erfolgte anhand des FRET-Effekts zwischen Oregon Green und Texas Red (Kapitel 3.1.2, S. 20). Die Vermischung der Lipide von zwei verschiedenen Vesikelpopulationen, als Folge

der Fusion, wird dabei durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität des Akzeptor-Farbstoffs (Texas Red) verfolgt.

Die Durchführung der Experimente erfolgte im Fluoreszenzspektrometer (JASCO FP 6500, JASCO, Easton, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 501 nm (Anregungsmaximum von Oregon Green). Detektiert wurde die Intensität des Akzeptors (Texas Red, 607 nm) über einen Zeitraum von 30 min. Es wurden 600  $\mu\text{L}$  Puffer (20 mM HEPES/KOH, 100 mM KCl, pH 7.4) in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) unter ständigem Rühren vorgelegt und auf 37 °C temperiert. Die Vesikel mit dem Donor-Farbstoff (Oregon Green, 1 mol%) wurden zugefügt (100  $\mu\text{L}$ ) und die Messung gestartet. Nach Erreichen einer konstanten Fluoreszenzintensität wurden 100  $\mu\text{L}$  der Vesikel mit dem Akzeptor-Farbstoff (Texas Red, 1 mol%) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die erhaltenen Intensitätsverläufe wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die Ausgangsintensität nach Zugabe der zweiten Vesikelpopulation normiert.

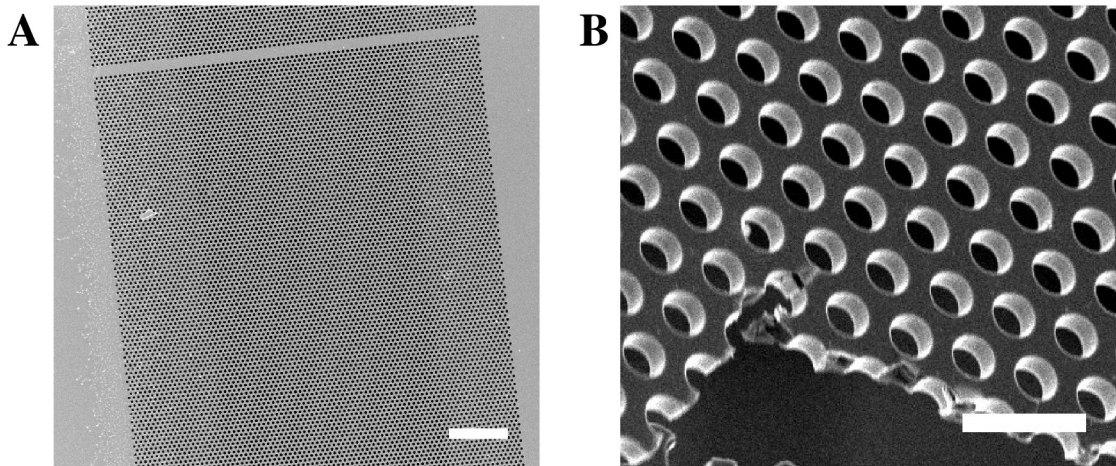
## 3.2 Präparation poröser Substrate zur Erzeugung porenüberspannender Membranen

### 3.2.1 Verwendete Substrate

Die in dieser Arbeit verwendeten porösen Substrate zur Erzeugung porenüberspannender Membranen werden mit Hilfe fotolithographischer Verfahren aus Silicium hergestellt. Diese Technik wird vorwiegend in der Halbleiterindustrie verwendet und ist gut geeignet für die Herstellung hochgeordneter Strukturen im einhundert-Nanometer-Maßstab.

Die für die Experimente zur Detektion einzelner Fusionsereignisse verwendeten Substrate besitzen eine offenporige Struktur, bei der eine 800 nm dünne Schicht Siliciumnitrid über einem Träger aus Silicium liegt. Die Siliciumnitridschicht besitzt Poren mit einem Durchmesser von 1.2  $\mu\text{m}$ , die von beiden Seiten zugänglich sind

(Abb. 3.5). Hergestellt wurden diese Substrate von der Firma Fluxxion (Eindhoven, Niederlande).

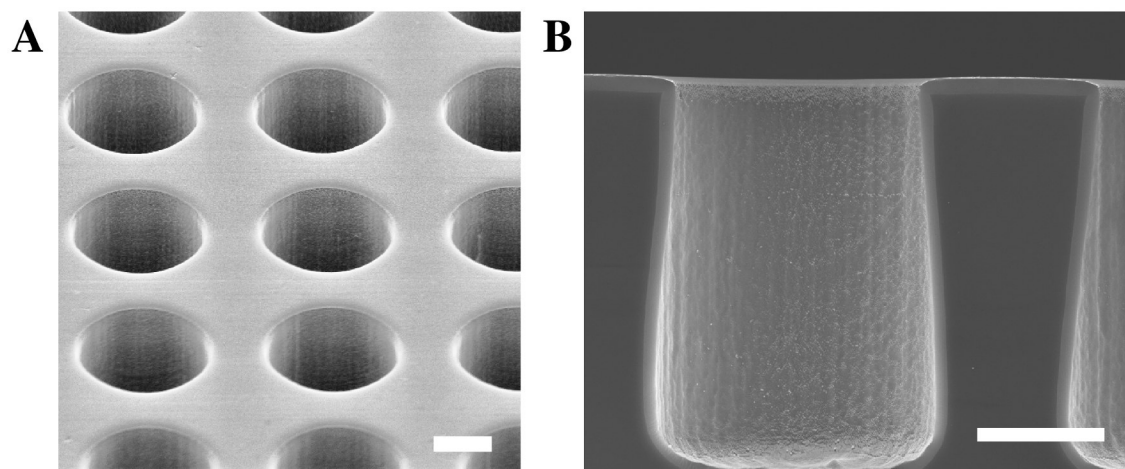


**Abbildung 3.5:** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines porösen Siliciumsubstrats mit offener Porenstruktur. Maßstab  $20\ \mu\text{m}$ . (B) Nahaufnahme der offenen Poren in der Siliciumnitridschicht (Durchmesser  $0.8\ \mu\text{m}$ ). Maßstab  $3\ \mu\text{m}$ .

Zusätzlich wurden auch Versuche mit geschlossenporigen Substraten durchgeführt. Diese besitzen Poren mit einem Durchmesser von  $3.5\text{--}5.5\ \mu\text{m}$  und einer Tiefe von  $6\ \mu\text{m}$  (Abb. 3.6). Gefertigt wurden sie von Dr. Siegfried Steltenkamp (Micro System Technologies, Center of Advanced European Studies and Research, CAESAR, Bonn). Die Oberfläche der Substrate wurde im Anschluss an die Strukturierung mit Siliciumdioxid oder Siliciumnitrid beschichtet.

### 3.2.2 Funktionalisierung von Substratoberflächen

Die Präparation von Membranen auf einem Festkörper erfordert eine Adhäsion der Lipide auf dessen Oberfläche. Aufgrund des amphiphilen Charakters der Lipide kann die Oberfläche dafür sowohl hydrophil als auch hydrophob beschaffen sein. Während bei hydrophilen Substraten eine vollständige Lipiddoppelschicht durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Kopfgruppen an die Oberfläche adhärirt, binden bei hydrophoben Funktionalisierungen die Alkylgruppen der Lipide an die



**Abbildung 3.6:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines porösen Siliciumsubstrats mit geschlossener Porenstruktur. Die Aufnahmen wurden von Martin Gleisner angefertigt. (A) Aufsicht, Porenradius  $4\ \mu\text{m}$ . (B) Querschnitt einer geschlossenen Pore. Maßstab  $2\ \mu\text{m}$ .

Oberfläche, sodass eine Monoschicht der Membran vollständig oder nur zum Teil durch die hydrophoben Moleküle der Funktionalisierung ersetzt wird.

Eine einfache Möglichkeit zur Hydrophilisierung von Siliciumdioxid oder -nitrid sowie Glas besteht in der Aktivierung der Oberfläche durch ein Niederdrucksauerstoffplasma. Die energiereichen Ionen des Plasmas zerstören auf der Oberfläche adsorbierte Verunreinigungen, wie Kohlenwasserstoffe, Fette oder Öle, deren Spaltprodukte mit dem Reaktandgasstrom entfernt werden. Zusätzlich werden Atome aus der Oberfläche herausgeschlagen, wodurch reaktive Bindungsstellen entstehen, an die im Anschluss an den Plasmaprozess Wasser aus der Umgebungsluft chemisorbieren kann. Das Ergebnis ist eine stark hydrophile Oberfläche mit einer hohen Dichte an Hydroxylgruppen. Das gleiche Ziel kann durch chemische Behandlung in heißer  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28 %)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %)/ $\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (1:1:6, (v/v/v),  $85\ ^\circ\text{C}$ , 20 min) erhalten werden.<sup>[76]</sup>

Eine weitere Methode zur hydrophilen oder hydrophoben Funktionalisierung von Substraten ist die Chemisorption von Thiolen an eine Goldoberfläche. Hierzu wird eine dünne Goldschicht auf das Substrat aufgebracht und anschließend in einer Thiollösung inkubiert. Die Ausbildung von Au–S-Bindungen führt durch spontane



Selbstorganisation zu einer hochgeordneten, monomolekularen Schicht (*self assembled monolayer*, SAM) auf der Oberfläche.<sup>[77]</sup> Bei Verwendung von Alkanthiolen kann auf diese Weise eine hydrophobe Oberfläche erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde für eine hydrophobe Funktionalisierung die Verbindung (Cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3) verwendet, welche eine terminale Cholesterylgruppe trägt (Abb. 3.7). Eine hydrophile Funktionalisierung wurde durch die Anbindung von 1-Mercaptohexan-6-ol erreicht. Die Bildung des SAMs wurde in *n*-Propanol (3 mL, 1 mM Thiol) über Nacht bei 4 °C durchgeführt, wobei die Substrate direkt im Anschluss an die Goldbeschichtung in die Inkubationslösung überführt wurden.

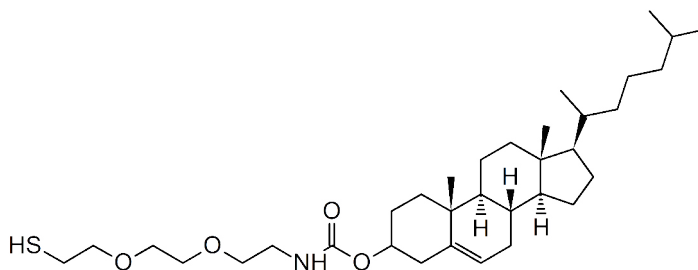


Abbildung 3.7: Strukturformel von (Cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3).

### 3.2.3 Methoden zur Goldbeschichtung

Für die Beschichtung der verwendeten Substrate mit Gold standen zwei verschiedenen Verfahren der physikalischen Gasphasenabscheidung (*physical vapor deposition*, PVD) zur Verfügung. Bei diesen Verfahren werden Goldatome in die Gasphase überführt, welche sich dann auf der zu beschichtenden Oberfläche niederschlagen (kondensieren). Die verwendeten Methoden und ihre unterschiedlichen Eigenschaften werden im Folgenden vorgestellt.

#### Kathodenstrahlzerstäubung

Bei der Kathodenstrahlzerstäubung, auch Sputtern genannt, werden Atome durch Beschuss mit energiereichen Ionen aus einem Festkörper (*Target*) herausgeschlagen

und so in die Gasphase überführt.<sup>[78]</sup> Die Ionen werden durch eine Glimmentladung in der Prozesskammer erzeugt. Als Prozessgas wird für die Deposition von Edelmetallen meist Argon bei niedrigen Drücken eingesetzt. Um eine möglichst effiziente Ionisation des Gases zu erreichen, kann ein Magnetfeld hinter dem *Target* (Kathode) angeordnet werden, sodass die Elektronen sich nicht geradlinig, sondern durch die Lorentz-Kraft abgelenkt, in einer Spiralbahn in Richtung der Anode bewegen (Magnetronspattern). Die aus dem *Target* austretenden Teilchen sind zum überwiegenden Teil ungeladen und werden weder durch das elektrische Feld, noch durch das Magnetfeld beeinflusst. Sie durchqueren die Prozesskammer und treffen auf das Substrat, auf dem sie sich in einer dünnen Schicht niederschlagen (*sputterdeposition*).

Die Eigenschaften der erzeugten Schicht hängen maßgeblich von den gewählten Prozessparametern ab. Die Variation des Sputterstroms kontrolliert dabei die Geschwindigkeit des Schichtwachstums. Höhere Sputterströme führen zu einem schnelleren Wachstum, wodurch jedoch eine geringere Homogenität der aufbrachten Schicht erhalten wird.

Besonders wichtig in Bezug auf die Beschichtung dreidimensionaler Strukturen, wie im Falle eines porösen Substrats, ist der Druck in der Prozesskammer während der Beschichtung. Entscheidend ist die mittlere freie Weglänge der aus dem *Target* herausgeschlagenen Atome. Im Idealfall wird der Prozessgasdruck so gering gewählt, dass die zerstäubten Atome auf direktem Weg vom *Target* auf das Substrat gelangen, ohne durch Stöße mit dem Gas abgelenkt zu werden. Hierdurch ist eine selektive Beschichtung der dem *Target* zugewandten Substratoberfläche möglich. Die mittlere freie Weglänge  $\lambda$  eines Teilchens bei einem bestimmten Druck lässt sich unter Annahme einer Maxwell'schen Geschwindigkeitsverteilung der Gasteilchen nach folgender Formel abschätzen:<sup>[79]</sup>

$$\lambda = \frac{k_B T}{\sqrt{2} \pi d^2 p} \quad (3.1)$$

Hierbei ist  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die Temperatur,  $p$  der Druck in Pa und  $d$  der Durchmesser der Gasteilchen in m. Das in dieser Arbeit eingesetzte Gerät (Cressington Sputter Coater 108auto) erreicht Drücke im Bereich von 0.1 – 0.06 mbar. Dies entspricht nach Gleichung 3.1 einer mittleren freien Weglänge der gesputterten Atome von 1 – 2 mm. Der Abstand zwischen *Target* und Substrat beträgt etwa 5 cm, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nur sehr wenige Atome die Substratoberfläche auf direktem Weg erreichen. Die Stöße mit den Prozessgasteilchen führen dazu, dass sie zufälligen Trajektorien folgend aus verschiedenen Richtungen auf das Substrat treffen. Hierdurch werden auch Flächen erreicht, welche nicht direkt dem *Target* zugewandt sind.

#### **Hochvakuum-Metallverdampfung**

Ein weiteres Verfahren zur Beschichtung einer Oberfläche mit Metallen ist das thermische Verdampfen im Hochvakuum. Hierbei wird das aufzubringende Material erhitzt um es in die Gasphase zu überführen. Der Prozess wird bei Drücken von  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  bar durchgeführt, sodass auch hochsiedende Stoffe verdampft werden können. Als Verdampferquelle wurde, bei dem hier eingesetzten Gerät (MED 020, Bal-Tec AG, Liechtenstein), ein durch Stromdurchgang (4 V, 60 – 70 A) beheiztes Wolframschiffchen verwendet. Die durch die thermische Energie aus der Oberfläche herausgeschleuderten Atome werden radial in alle Richtungen vom Metall abgegeben. Ihre mittlere freie Weglänge liegt bei den verwendeten Drücken im Bereich von Metern und es kann somit davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Teil der Atome auf direktem Weg von der Quelle auf das Substrat gelangen, ohne durch Stöße abgelenkt zu werden.

Bei der Anwendung dieser Methode wurde das zu beschichtende Substrat mit einem Abstand von 10 cm senkrecht unterhalb der Verdampferquelle platziert. Durch den niedrigen Druck und den Abstand zur Quelle konnte sichergestellt werden, dass die Goldatome nahezu ausschließlich senkrecht von oben auf die Substratoberfläche trafen.

### 3.2.4 Erzeugung porenüberspannender Membranen

Für die Erzeugung porenüberspannender Membranen haben sich im Wesentlichen zwei Präparationsmethoden etabliert.<sup>[80]</sup> Zum einen die *painting*-Methode, bei der die Lipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst auf das Substrat aufgetragen werden. Durch intensives Spülen mit einer wässrigen Pufferlösung wird das Lösungsmittel ausgedünnt, sodass eine Lipiddoppelschicht zurück bleibt.<sup>[81]</sup> Diese Methode wurde bereits vor beinahe 50 Jahren entwickelt und wird, wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit auch in kommerziellen Systemen zur Membranerzeugung eingesetzt.<sup>[82]</sup> Problematisch bei dieser Methode ist das mögliche Zurückbleiben von Lösungsmittelmolekülen in der gebildeten Membran. Dies könnte Auswirkungen auf eingebrachte Proteine sowie die mechanischen Eigenschaften der Membran haben, wie von Kocun *et al.* für 2-Propanol gezeigt werden konnte. Durch den Einsatz hydrophober Funktionalisierungen besteht die Gefahr, dass das Lösungsmittel in die Poren des Substrats eindringt und durch die Wechselwirkung mit der Funktionalisierung nur sehr schwer entfernt werden kann. Dies macht zusätzliche Maßnahmen zur Entfernung des Lösungsmittels, wie das Ausfrieren, notwendig.<sup>[83]</sup>

Da in dieser Arbeit Proteine in die Membran eingebracht werden sollten und die Membranfusion möglicherweise stark abhängig von ihren mechanischen Eigenschaften ist<sup>[84,85]</sup>, wurde auf die Lösungsmittel-freie Technik des Spreitens von riesigen Vesikeln (*giant unilamellar vesicles*, GUVs) zur Erzeugung von porenüberspannenden Membranen zurückgegriffen. Hierbei werden mittels Elektroformation erzeugte GUVs auf die Oberfläche des Substrates gegeben, wo sie aufreißen und sich über mehrere Poren hinweg ausbreiten. Durch die Adhäsion der Lipide auf der funktionalisierten Substratoberfläche wird die Membran über den Poren unter Spannung gehalten. Mit Hilfe der Rasterkraftspektroskopie kann anhand von Indentationsexperimenten diese Spannung gemessen werden.<sup>[86,87]</sup> Auf hydrophilen Oberflächen beträgt sie  $1 - 3.5 \text{ mN m}^{-1}$ , unter anderem abhängig vom eingesetzten Lipid. Kuhlmann *et al.* konnten zeigen, dass bei zunehmendem Anteil hydrophober CPEO3-Moleküle im SAM einer ansonsten hydrophilen Funktionalisierung die Ad-

häsion der Membran und damit einhergehend die Membranspannung ansteigt.<sup>[88]</sup> Die Stabilität der erzeugten Membranen sank dabei durch die hohe Spannung ab einer Oberflächenkonzentration von 40 mol% CPEO3 so rapide, dass davon auszugehen ist, dass die Präparation von porenüberspannenden Membranen durch Vesikelspreiten auf rein hydrophob funktionalisierten Substraten nicht praktikabel ist.

Essentiell für die Ausbildung von porenüberspannenden Membranen durch das Spreiten von Vesikeln sind zudem unterschiedliche Eigenschaften der Substratoberfläche im Vergleich zur Poreninnenseite. Bei einer homogenen Oberflächenbeschaffenheit des gesamten Substrats folgt die Lipidschicht vorzugsweise der dreidimensionalen Struktur und kleidet die Poren vollständig aus (Abb.4.20 A, linke Seite). Eine Ausnahme bildet hier die Verwendung kleiner Porendurchmesser in Kombination mit einer geringen Porosität.<sup>[89]</sup> Die hier verwendeten porösen Substrate bedürfen jedoch einer Funktionalisierung, die ein Auskleiden der Poren durch die Membran verhindert. Einige mögliche Funktionalisierungsstrategien für offene und geschlossene Porensysteme wurden im Verlauf der Arbeit in Zusammenarbeit mit anderen Abteilungsmitgliedern entwickelt oder verbessert und werden in Kapitel 4.2 vorgestellt.

Das Spreiten porenüberspannender Membranen verlief in allen Fällen nahezu identisch, indem auf das in Puffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.4) eingebrachte Substrat eine Menge von 20  $\mu$ L GUV-Lösung gegeben wurde. Durch die Sucrose innerhalb der GUVs sowie in der GUV-Lösung sinkt diese durch die erhöhte Dichte auf das Substrat, wo die GUVs durch die Adhäsion auf der Oberfläche spreiten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min konnte der Spreiterfolg mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft werden.

## 3.3 Rekonstitution von SNARE-Proteinen in große und riesige Vesikel

Zentraler Bestandteil der Entwicklung eines Modellsystems auf Basis porenüber-spannender Membranen ist die funktionelle Rekonstitution der zu untersuchenden Proteine. In der Literatur waren zum Zeitpunkt der Arbeit (nach Wissen des Autors) zwei verschiedene Protokolle für die Rekonstitution bekannt, welche sich im Kern auf ähnliche Ansätze reduzieren lassen.

In beiden Fällen wurde das/die entsprechende/n Protein/e zunächst in kleine unilamellare Vesikel (SUVs) rekonstituiert, um diese im Anschluss in GUVs zu überführen. Da die Elektroformation die zuverlässigste und erfolgreichste Methode der GUV-Herstellung ist, wurden die SUVs durch das Eintrocknen der Vesikellösung (0.465 mg Lipid) auf ITO-Gläschen (ITOs) in multilamellare Lipidmembranstapel umgewandelt, aus welchen sich GUVs durch Anlegen einer Sinus-Spannung bildeten. Für eine funktionelle Rekonstitution der Proteine wurde die SUV-Bildung in einem Puffer mit geeigneter Ionenstärke (mind. 100 mM KCl) durchgeführt. Da die Elektroformation jedoch sehr sensibel auf Ionen reagiert, mussten Maßnahmen getroffen werden, um möglichst wenige Ionen in die Elektroformationskammer einzubringen.

Bacia et al.<sup>[71]</sup> nutzten zu diesem Zweck eine Ultrazentrifuge (200000 × g, 1.5 h, 4 °C) um die SUVs zu pelletieren und im Anschluss in einem sehr geringen Volumen (10 µL) an Puffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol (DTT)) zu resuspendieren, bevor sie auf die ITOs aufgetragen und im Vakuum getrocknet wurden. Dies begrenzt die eingebrachten Ionen auf ein Mindestmaß.

Dieses Konzept wurde durch Malsam *et al.* erweitert, indem die SUV-Lösung (20 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 400 mM KCl, 1 mM DTT) im Anschluss an die Rekonstitution in einen Niedrigsalzpuffer (1 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 20 mM Trehalose, 1 % Glycerin, 1 mM DTT) überführt wurde.<sup>[90]</sup> Hierzu wurde eine Größenausschlusschromatographiesäule (PD10, GE Healthcare) verwendet, die zuvor in

Niedrigsalzpuffer äquilibriert wurde. Um die Trocknung der Vesikel auf dem ITO-Gläschen möglichst schonend für die enthaltenen Proteine zu gestalten, wurde Trehalose zugesetzt. Trehalose (1- $\alpha$ -Glucopyranosyl-1- $\alpha$ -Glucopyranosid) ist ein Disaccharid, welches in vielen Organismen als Schutz vor der Denaturierung von Proteinen durch Trockenheit oder Frost vorkommt. Vor dem Auftragen auf ITO-Gläschen wurde die SUV-Lösung auch hier durch Zentrifugation ( $186000 \times g$ , 2 h, 4 °C) aufkonzentriert. Die SUVs wurden in 15  $\mu$ L Puffer resuspendiert und auf ITO-Gläschen im Vakuum getrocknet.

Die beschriebenen Protokolle konnten in dieser Arbeit nachvollzogen werden. Bei der Präparation porenüberspannender Membranen mit den erhaltenen GUV-Lösungen ergab sich jedoch, dass in der Lösung sehr viele kleinere Vesikel sowie aggregiertes Lipidmaterial vorhanden war. Die Substratoberfläche wurde dadurch sehr schnell bedeckt, wodurch ein Spreiten der GUVs verhindert wurde. Das Protokoll wurde daher im Folgenden angepasst, um die Menge an kleinen Vesikeln und Lipidaggregaten zu minimieren.

Die Rekonstitution der SNARE-Proteine in SUV erfolgte nach einem literaturbekanntem Protokoll durch Größenausschlusschromatographie.<sup>[38]</sup> Die erhaltene Vesikellösung wurde in einem weiteren Chromatographieschritt entsalzt. Hierzu wurde die Lösung zunächst mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingeeengt, um die Verdünnung während der Chromatographie möglichst gering zu halten. Die Entsalzung erfolgte in MilliQ-Wasser, um die Menge an Ionen bei der folgenden Elektroformation zu minimieren. Vor dem Auftragen auf ITO-Gläschen wurde die Lösung ein weiteres mal in der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

Als entscheidender Schritt für eine erfolgreiche Bildung von GUVs erwies sich hierbei die Trocknung des Lipidfilms auf den ITO-Gläschen. Geschieht dies zu schnell, durch Anlegen eines Vakuums, wurde kein multilamellarer Lipidfilm erhalten. Die Vesikel behielten ihre ursprüngliche Form und die Lösung enthielt nach der Elektroformation nahezu ausschließlich kleine Vesikel. Die Trocknung wurde deshalb im Exsikkator über gesättigter NaCl-Lösung bei 4 °C über Nacht

durchgeführt. Über der gesättigten Lösung bestand dabei eine Atmosphäre mit einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 75.5 %<sup>[91]</sup> (relative Luftfeuchtigkeit), hierdurch verdampfte das enthaltene Wasser nur sehr langsam aus der, in kleinen Tropfen aufgetragenen, Vesikellösung. Diese Methode hatte zudem den Vorteil, dass die lamellaren Lipidschichten stets ausreichend hydratisiert vorlagen, wodurch eine Denaturierung der enthaltenen Proteine vermieden werden sollte.

#### **Protokoll für die Rekonstitution von SNARE-Proteinen**

Es wurden zunächst Proteo-SUVs nach der in Kapitel 3.1.4 (S. 23) beschriebenen Methode hergestellt. Hierzu wurde ein Lipidfilm (DOPC/POPE/POPS/Cholesterin, 5:2:1:2, 0.465 mg, Kapitel 3.1.3) in 50  $\mu$ L detergenzhaltigem Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 100 mM *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucosid) solubilisiert und für 15 min auf Eis gelagert. Es wurde Proteinlösung (Synaptobrevin 1–116 bzw.  $\Delta$ N-Akzeptorkomplex) hinzugegeben, sodass ein Protein zu Lipidverhältnis von 1:1000 erhalten wurde. Die Mischung wurde für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Eine Sephadex G25-Säule (Illustra NAP25, GE Healthcare) wurde in Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM DTT) äquilibriert. Die Lipid/Protein-Lösung wurde auf die Säule aufgetragen. Es wurde eine Menge von 2.7 mL Puffer langsam aufgegeben und der Durchlauf verworfen. Durch Zugabe von 900  $\mu$ L Puffer wurden die gebildeten SUVs von der Säule eluiert. Die Säule wurde im Anschluss mit 100 mL MilliQ-Wasser (MilliQ) gespült. Die SUV-Lösung wurde in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf (Hamburg)) für 2 h auf ein Volumen von 50–100  $\mu$ L eingengt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Vesikellösung auf Eis gelagert.

Die eingengte Lösung wurde auf die in MilliQ äquilibrierte Säule aufgetragen und der Vorlauf von 2.7 mL MilliQ verworfen. Es wurde mit 900  $\mu$ L MilliQ eluiert und die erhaltene Lösung in der Vakuumzentrifuge (2 h) auf 50–100  $\mu$ L Volumen eingengt. Die Vesikellösung wurde in Tropfen von 2  $\mu$ L auf zwei ITO-Gläschen aufgetragen und im Exsikkator über gesättigter NaCl-Lösung bei 4 °C über Nacht



getrocknet. Die ITO-Gläschen mit dem getrockneten Lipidfilm wurden für die Herstellung von GUVs nach der in Kapitel 3.1.4 (S. 25) beschriebenen Methode mit Hilfe der Elektroformation verwendet.

Für die Herstellung von großen Vesikeln (*large unilamellar vesicles*, LUVs) wurde das gleiche Protokoll verwendet. Die Vesikellösung wurde hierbei anstatt auf ITO-Gläschen in einem Reagenzglas getrocknet. Aufgrund der kleinen Oberfläche der wässrigen Lösung im Reagenzglas, reichte die Trocknung über gesättigter NaCl-Lösung jedoch nicht aus. Sie wurde deshalb im Anschluss noch für weitere 3 h im Vakuum getrocknet. Der erzeugte proteinhaltige Lipidfilm konnte im Folgenden zur Herstellung von LUVs durch Extrusion (Kapitel 3.1.4, S. 24) verwendet werden.

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung und Analyse von elektrisch geladenen Makromolekülgemischen beruhend auf ihrer Wanderung im elektrischen Feld. Sie wird in erster Linie bei DNA-, Peptid- und Proteingemischen eingesetzt. Die Moleküle werden dazu in ein Gel eingebracht, über das ein elektrisches Feld angelegt wird. In Abhängigkeit von ihrer Ladung wandern sie in Richtung der Anode bzw. Kathode. Die Geschwindigkeit der Wanderung durch das engmaschige Gel wird bestimmt durch die Nettoladung sowie die dreidimensionale Struktur der einzelnen Moleküle. Die Strecke, die die Moleküle in einer bestimmten Zeit zurücklegen können, wird demnach durch das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) bestimmt.

Proteine hingegen besitzen je nach Aminosäureabfolge eine unterschiedliche Nettoladung, welche außerdem stark pH-Wert abhängig ist. Zusätzlich bilden sie komplexe räumliche Strukturen aus, sodass eine systematische Trennung zunächst nicht möglich ist. Um dies zu ermöglichen, wird bei der SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese (SDS-PAGE) das negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulphat (SDS) hinzugegeben. Durch die Solubilisierung der Proteine wird einerseits eine vollständige Entfaltung der Moleküle erreicht und andererseits ihre Nettoladung durch die große Anzahl an SDS-Molekülen in den gebildeten Mizellen maskiert. Außerdem können so auch in Wasser unlösliche Proteine (z.B. membranständige Proteine) untersucht werden. Eventuell enthaltene Disulfidbrücken werden durch Zugabe von Thiolen gespalten. Diese Maßnahmen führen dazu, dass die Proteine ausschließlich anhand ihrer Molmasse getrennt werden können.

Für die Elektrophorese können verschiedene Gel-Matrizen eingesetzt werden. Üblich sind hierbei Agarose- sowie durch Polymerisation von Acrylamid hergestellte Gele. Agarosegele besitzen eine relativ großporige Struktur (150 nm, 1 % Agarose) und werden hauptsächlich zur Trennung von DNA und hochmolekularen Proteinen ab etwa 200 kDa verwendet. Polyacrylamidgele weisen eine wesentlich kleinere Porengröße auf und eignen sich daher besser für die Trennung von Proteinen. Die Porengröße kann über die Acrylamidkonzentration sowie den Vernetzungsgrad der Polymere durch Zugabe von Bisacrylamid kontrolliert werden. Um kleinere Proteine mit guter Auflösung zu trennen, muss eine höhere Konzentration an Acrylamid gewählt werden.

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels wird eine Acrylamid und Bisacrylamid enthaltende Lösung mit dem verwendeten Puffer versetzt. Als Radikalstarter wird Ammoniumperoxydisulfat (APS) in Kombination mit *N,N,N',N'*-Tetramethyletan-1,2-diamin (TEMED) zugegeben und die Lösung zur Polymerisation in die gewünschte Form gegossen. Zur Analyse von Proteingemischen hat sich zudem die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli durchgesetzt.<sup>[92]</sup> Hierbei wird das Trenngel mit einem weitmaschigen Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel hat einen neutralen pH-Wert, das Trenngel jedoch einen basischen. Die unterschiedliche Porengröße in Kombination mit dem pH-Gradienten führt dazu, dass die Proteine an der Grenze zum Trenngel aufkonzentriert werden. Das Ergebnis ist eine bessere Auflösung durch definiere Banden der einzel-

nen Proteine. Um die Auflösung im Falle sehr kleiner Proteine weiter zu verbessern, kommt in dieser Arbeit ein Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminoethan)-Tricin (*N*-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin)-Puffersystem nach Schägger anstelle des üblichen Tris-Glycin-Systems zum Einsatz.

Die Analyse des getrennten Gemisches erfolgt im einfachsten Fall durch Anfärben der Proteinbanden mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Hierfür existieren eine Vielzahl an Protokollen, die sich unter Anderem durch ihre Sensitivität und der für die Färbung benötigten Zeit unterscheiden. Um die Molmasse der einzelnen Proteinbanden abschätzen zu können, wird ein Gemisch aus Proteinen bekannter Molmassen als Marker mit auf das Gel aufgetragen.

Bei der Proteinisolierung wurden Gele mit einer Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration von 10 % verwendet. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Dem Trenngel wurde hierbei Glycerin zugesetzt, sodass das Sammelgel direkt im Anschluss auf das Trenngel aufgebracht werden konnte, da der so erzeugte Dichteunterschied eine Durchmischung verhindert. Die eingesetzten Mengen der einzelnen Komponenten für ein Gel, die sich je nach verwendeter Gel-Apparatur unterscheiden können, sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem Probenpuffer versetzt. Es wurde zunächst eine Spannung von 60 V für 15–20 min für das Durchlaufen des Sammelgels angelegt. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Im Anschluss wurde das Gel mit salzsaurer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (80 mg/L Coomassie G-250, 3 mL konz. HCl) gefärbt. Hierzu wurde das Gel zunächst in Wasser (MilliQ, 20 mL), danach in der Färbelösung (20 mL) bis kurz unterhalb der Siedetemperatur erhitzt und 5 min inkubiert. Zuletzt wurde überschüssiger Farbstoff durch erneutes zweimaliges Erhitzen in Wasser entfernt.

**Tabelle 3.1:** Zusammenfassung der bei der SDS-PAGE verwendete Puffer und Lösungen.

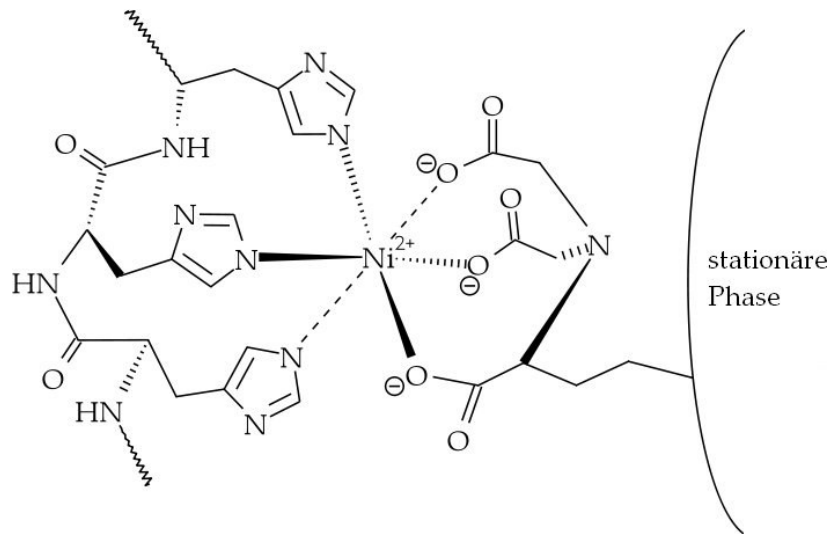
	Substanz	Menge
Kathodenpuffer (10fach konzentriert)	Tris	1 M
	Tricin	1 M
	SDS	1 % (w/v)
Anodenpuffer (10fach konzentriert)	Tris/HCl	2 M pH 8.9
Gelpuffer	Tris/HCl	3 M pH 8.45
	SDS	0.3 % (w/v)
Probenpuffer	Tris/HCl	175 mM pH 6.8
	SDS	5 % (w/v)
	Glycerin	15 % (w/v)
	DTT	0.3 M
	Bromphenol Blau	0.02 % (w/v)
Acrylamidlösung (Rotiquant®)	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	30 %

**Tabelle 3.3:** Zusammensetzung eines 10 %igen Acrylamidgels nach Schägger.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	200 $\mu$ L	1.66 mL
Gelpuffer	375 $\mu$ L	1.675 mL
H <sub>2</sub> O	925 $\mu$ L	570 $\mu$ L
Glycerin (50 %)	–	1.06 mL
APS (10 %)	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L	25 $\mu$ L

#### 3.4.2 Metallionenaffinitätschromatographie

Die Metallionenaffinitätschromatographie stellt eine einfache und schnelle Methode zur Isolierung von Proteinen dar. Sie beruht auf der Affinität basischer Gruppen von Proteinen zu Metallionen durch Ausbildung koordinativer Bindungen. Die Metallionen werden dazu durch die Bildung eines Chelatkomplexes mit Nitrilotriessigsäure (*nitrilotriacetic acid*, NTA), welches an eine stationäre Matrix kovalent gebunden ist, immobilisiert. Da besonders Histidin sehr spezifisch an Metallionen binden kann, werden rekombinante Proteine mit einem Polyhistidin-Tag versehen, wodurch eine starke Bindung an die immobilisierten Metallionen erreicht werden kann (vergl. Abb. 3.8). Hierzu werden vor allem Cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ )-, Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ )- oder Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ )-Ionen verwendet. Die Elution der gebundenen Proteine bzw. Peptide erfolgt durch Zugabe hoher Konzentrationen von Imidazol, das die gebundenen Histidinreste kompetitiv verdrängt. Die Isolierung kann säulenchromatographisch im Durchfluss oder im Batch-Verfahren durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kombination beider Verfahren verwendet. Die Bindung des Proteins an die mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladene NTA-Agarose erfolgte im Batch, während das Waschen sowie die Elution im Durchfluss erfolgten. Bei diesem Verfahren kann es zu unspezifischer Bindung von Proteinen kommen, die durch ihre dreidimensionale Struktur exponierte Histidinreste besitzen. Daher sind zumeist weitere Reinigungsschritte für eine ausreichende Reinheit der erhaltenen Proteine notwendig. Die Anwendung dieser Methode ist Teil der Isolierung der SNARE-Proteine und wird in Kapitel 3.5.2 genauer beschrieben.



**Abbildung 3.8:** Oktaedrischer Chelatkomplex des an der NTA-Gruppe immobilisierten Nickelions und dem Polyhistidin-Tags des Zielproteins.

### 3.4.3 Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie können Moleküle aufgrund ihrer Oberflächenladung getrennt werden. Die stationäre Phase besitzt dabei geladene funktionelle Gruppen, an die die entsprechenden Gegenionen reversibel binden können. Die Elution erfolgt durch Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase, wodurch die Zielmoleküle von den Bindungsstellen verdrängt werden. Alternativ kann der pH-Wert der mobilen Phase variiert werden, um durch De-/protonieren die Ladung des Zielmoleküls zu ändern, bis keine Bindung mehr möglich ist.

Bei Proteinen wird die Oberflächenladung durch die Anzahl an schwach sauren und basischen Aminosäureresten mit ihren verschiedenen  $pK_s$ -Werten in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt. Somit besitzt jedes Protein einen individuellen pH-Wert, bei dem es in ungeladener Form vorliegt (isoelektrischer Punkt, PI). Bei einem pH-Wert oberhalb des PI besitzt das Protein demnach eine negative Nettoladung, darunter eine positive. Aus diesem Grund ist es möglich ein Gemisch aus Proteinen bei konstantem pH-Wert durch Ändern der Ionenstärke in der mobilen Phase zu trennen. Da für die Stabilität von Proteinen ein physiologischer pH-Wert von 7.4

meist gut geeignet ist, können je nach PI des Zielproteins anionisch oder kationisch funktionalisierte stationäre Phasen verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ionenaustauschsäulen der Firma GE-Healthcare in Kombination mit einem *ÄKTA Protein Purification System* verwendet. Es wurden MonoQ Anionenaustauschersäulen mit einem Matrixvolumen von 1 mL (5/50) und 8 mL (10/100) eingesetzt. Sie bestehen aus einer Matrix aus monodispersen, porösen Polystyrol/Divinylbenzol-Partikeln funktionalisiert mit einem quartären Ammonium-Liganden ( $\text{O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ). Als Kationentauscher kam eine MonoS-Säule (5/50) mit gleicher Matrix, funktionalisiert mit einem Methylsulfonat ( $\text{O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-SO}_3^-$ ) zum Einsatz.

Alle verwendeten Puffer, sowie die zu reinigenden Proteinlösungen wurden vor dem Aufgeben auf die Säule mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von  $0.2\ \mu\text{m}$  von unlöslichen Bestandteilen befreit. Für die Reinigung der Proteine wurde die jeweilige Säule zunächst mit einem Puffer einer niedrigen Salzkonzentration (Puffer A, siehe Kapitel 4.1) äquilibriert. Im Anschluss wurde die Proteinlösung aufgetragen, wobei sie zuvor bei Bedarf auf eine, für die Bindung des Proteins an die Säulenmatrix erforderliche, Ionenstärke mit dem Nidrigsalzpuffer verdünnt wurde. Der Durchfluss wurde zur Analyse aufgehoben. Nach vollständiger Beladung wurde ein eingestellter Konzentrationsgradient von 0–100 % an Puffer mit hoher Salzkonzentration (Puffer B) abgefahren und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Durch die sich graduell erhöhende Ionenstärke im Eluenten werden die gebundenen Proteine nach und nach von der Matrix gelöst. Die Elution der Proteine konnte durch einen UV/vis-Detektor ( $\lambda = 280\ \text{nm}$ ) in Echtzeit verfolgt werden. Die Fraktionen der Elutionsmaxima wurden zur Identifikation des Zielproteins mittels SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse der Reinigung der SNARE-Proteine werden in Kapitel 4.1 vorgestellt.

## 3.5 Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen aus *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Proteine wurden in *Escherichia coli* (*E. coli*) heterolog exprimiert. Ihre Sequenzen stammen aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*). Die klonierten pET28a-Vektoren wurden von der Abteilung Jahn am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung enthalten alle Plasmide einen Hexahistidin ( $\text{His}_6$ )-Tag, der durch eine Thrombinschnittstelle entfernt werden kann. Die beschriebenen Protokolle wurden in der Abteilung Jahn entwickelt und optimiert.<sup>[38]</sup>

### 3.5.1 Verwendete Proteine und Proteinfragmente

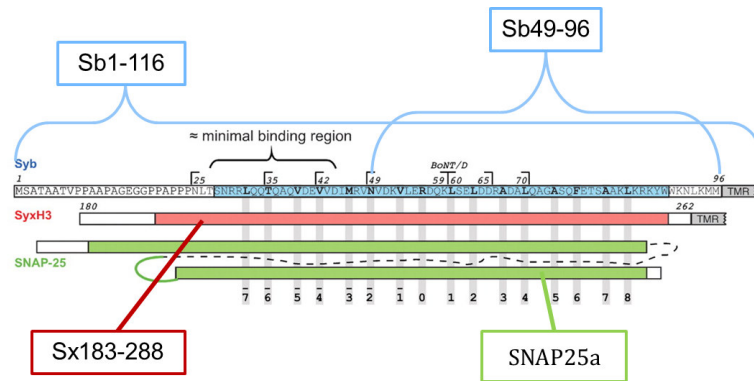
Die in dieser Arbeit untersuchte Fusion wurde durch die Bindung von Synaptobrevin-2 an den  $\Delta\text{N49}$ -Akzeptorkomplex vermittelt (Kapitel ??). Der  $\Delta\text{N49}$ -Komplex wird aus Syntaxin-1A (183–288), SNAP25a und einer Teilsequenz von Synaptobrevin-2 (AS 49–96) gebildet. Zusätzlich wurde eine Teilsequenz von Synaptobrevin mit den Aminosäuren 1–96, welche das gesamte in Wasser lösliche SNARE-Bindungsmotiv beinhaltet, für die Durchführung von Blindexperimenten verwendet.

#### Synaptobrevin-2 (Syb 1–116)

Synaptobrevin-2 wurde in seiner vollen Länge von 116 Aminosäuren verwendet und besaß eine Molmasse von 12.691 kDa. Es besteht aus einem cytoplasmatischen (AS 1–94) sowie einem transmembranständigen Bereich (AS 95–114), durch den es in der Membran verankert ist. Der cytoplasmatische Teil beinhaltet die SNARE-Bindungssequenz (AS 31–91), durch die das Protein in der Lage ist an den Akzeptorkomplex, unter Bildung einer tetrameren coiled-coil-Struktur, zu binden. Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen, liegt es zum größten Teil in einer  $\alpha$ -helicalen

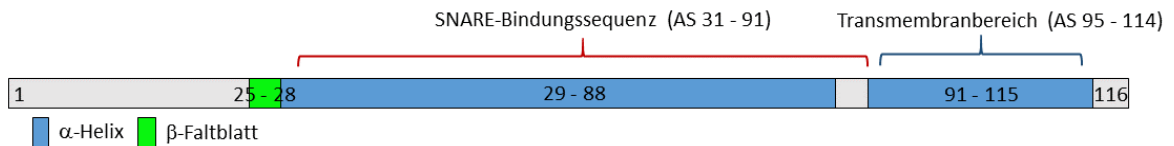


### 3. Materialien und Methoden



**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung der verwendeten Proteinkonstrukte anhand einer Blockdarstellung des SNARE-Komplexes. Synaptobrevin 1–116 (Syb 1–116) und Synaptobrevin-2 49–96 (Syb 49–96) (blau), Syntaxin 183–288 (Sx 183–288) (rot), SNAP25a (grün). Abbildung verändert nach Pobbati et al..<sup>[38]</sup>

Sekundärstruktur vor. Durch seinen hydrophoben, transmembranständigen Bereich kann es nur durch Zugabe von Detergenzien (1 % (w/v) CHAPS) in Lösung gehalten werden.



**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von Synaptobrevin-2 1-116.<sup>[38]</sup>

#### Synaptobrevin-2 (Syb 49–96)

Die Teilsequenz von Synaptobrevin-2 (AS 49–96) wurde zur Bildung des  $\Delta$ N49-Akzeptorkomplexes verwendet. Es besitzt eine Molmasse von 5.627 kDa und beinhaltet einen Teil der SNARE-Bindungssequenz (AS 31–91). Hierdurch ist es in der Lage an den Komplex aus Syntaxin-1A und SNAP25a zu binden und so die Bindung eines zweiten Syntaxins an den Komplex zu verhindern. Wegen der verkürzten Bindungssequenz kann das Fragment von Synaptobrevin-2 durch das

vollständige Proteine aus dem Komplex verdrängt werden. Durch das Fehlen des transmembranständigen Bereichs ist das Fragment vollständig in Wasser löslich.

### Synaptobrevin-2 (Syb 1 – 96)

Für die Durchführung von Blindexperimenten wurde eine wasserlösliche Teilstrecke von Synaptobrevin-2 mit den Aminosäuren 1 – 96 ( $M = 10.517$  kDa) verwendet. Da sie die gesamte SNARE-Bindungssequenz enthält, kann auch sie das kleinere Fragment (49 – 96) aus dem Akzeptorkomplex verdrängen und diesen so für eine weitere Bindung von Synaptobrevin-2 blockieren. Das Protein wurde dankenswerter Weise von Matthias Hernandez aus der Abteilung Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) zur Verfügung gestellt.

### Syntaxin-1A (Sx 183 – 288)

Von Syntaxin-1A wurde eine gekürzte Variante (AS 183 – 288,  $M = 12.021$  kDa) verwendet, bei welcher ein Großteil des cytoplasmatischen Bereichs (AS 1 – 265) entfernt worden ist. Das verwendete Protein besteht damit fast ausschließlich aus der SNARE-Bindungssequenz (AS 192 – 254), sowie dem Transmembrananker (AS 266 – 288). Die Sekundärstruktur ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt. Aufgrund des Transmembranbereichs ist das Protein nur durch Zugabe von Detergenz (1 % (w/v) CHAPS) löslich.

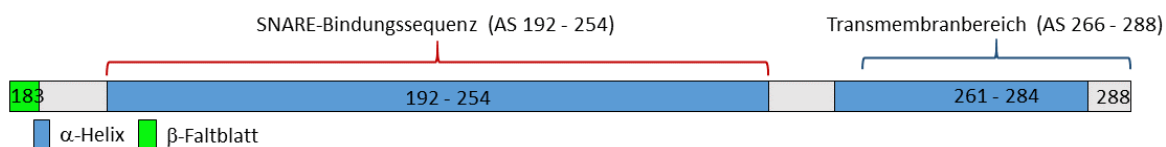


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von Syntaxin-1A 183 – 288. [38]

#### SNAP-25a

SNAP-25 wurde mit vollständiger Sequenz (206 AS) in einer mutierten Variante (SNAP-25a) eingesetzt. Im natürlichen System ist SNAP-25 über vier palmitoylierte Cysteine an den Positionen 85, 88, 90 und 92 in der präsynaptischen Membran verankert. Da jedoch bei der Expression in *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen stattfinden, wurden die vier Cysteine, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, im SNAP-25a durch Alanine ersetzt. SNAP-25a ( $M = 23.336$  kDa) besitzt zwei  $\alpha$ -helicale Bereiche (AS 7–82 und 142–201, Abb. 3.12), die jeweils eine SNARE-Bindungssequenz (AS 19–81 und 140–202) bilden. Es nimmt mit zwei  $\alpha$ -Helices an der Bildung des tetrameren *coiled-coil*-Komplexes teil. Durch die fehlende Palmitoylierung ist das Protein vollständig in Wasser löslich.

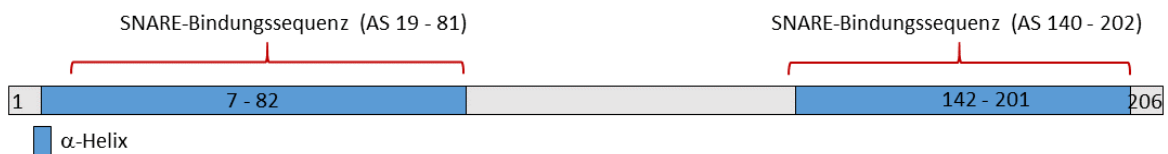


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von SNAP-25a.<sup>[38]</sup>

#### 3.5.2 Allgemeine Vorschrift für die Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen

Im Folgenden soll die generelle Vorgehensweise der Isolierung der SNARE-Proteine vorgestellt werden. Die Protokolle der einzelnen Proteine ähneln sich dabei sehr stark, sodass an dieser Stelle zunächst ein allgemeines Protokoll beschrieben wird. Die Abweichungen von diesem Protokoll sowie die jeweils verwendeten Puffer werden in Kapitel 4.1 angegeben.

## Transformation

Die Expression der rekombinanten SNARE-Proteine erfolgte in hitzekompetenten *E. coli* Zellen (BL21 (DE3)). Zur Transformation wurden die Zellen (1 Aliquot, 50  $\mu$ L) auf Eis aufgetaut (10 min). Zu der Zellsuspension (70  $\mu$ L) wurden 100 ng des Plasmids gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für exakt 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und im Anschluss 2 min auf Eis gelagert. Es wurden 2 mL auf 42 °C temperiertes SOC-Medium (siehe Tab. 3.5) zugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1 min bei 4500 rpm (Rotor Sx4250, Allegra X-22R, Beckman Coulter) zentrifugiert und 900  $\mu$ L des Überstands verworfen. Die resuspendierten Zellen wurden zur Vereinzelung auf Selektionsnährböden (LB-Medium, Kanamycin 50  $\mu$ g/mL) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C vermehrt.

*Tabelle 3.5: Zusammensetzung SOC-Medium (100 mL).*

---

	Tryptone	2 g
	Hefeextrakt	0.5 g
	NaCl	0.05 g
nach Autoklavieren	Sucrose	1 mL, 2 M
(steril gefiltert)	MgCl <sub>2</sub>	1 mL, 1 M
	MgSO <sub>4</sub>	1 mL, 1 M

---

## Expression

Für die Expression der transformierten Zellen wurde zunächst eine Vorkultur herangezogen. Hierzu wurde eine Kolonie vom Selektionsnährboden aufgenommen und in 100 mL LB-Medium (Tab. 3.7) mit 30  $\mu\text{g/mL}$  Kanamycin bei 37 °C unter Schütteln über Nacht vermehrt.

Die Expression erfolgte in 12  $\times$  1 L Erlenmeyerkolben mit je 250 mL TB (*terrific broth*)-Medium (Tab. 3.7). Dazu wurden pro Kolben 225 mL Medium mit der getrennt autoklavierten TB-Salzlösung (25 mL) und Kanamycin (30  $\mu\text{g/mL}$ , finale Konz.) versetzt und mit 5 mL Vorkultur inokuliert. Es wurde bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0.9 bei 37 °C inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, 0.25 mM finale Konz.) induziert und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde für 20 min bei 4500 rpm (Rotor Sx4250, Allegra X-22R, Beckman Coulter) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die pelletierte Zellmasse wurde in Puffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 8 mM Imidazol, pH 7.4) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

*Table 3.7: Zusammensetzungen der verwendeten Expressionsmedien.*

Terrific Broth (TB)-Medium (4500 mL)	Tryptone	60 g
	Hefeextrakt	120 g
	Glycerin	20 g
Terrific Broth (TB)-Salz (500 mL)	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	82 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	11.55 g
Lysogeny Broth (LB)-Medium (500 mL)	Tryptone	5 g
	Hefeextrakt	2.5 g
	NaCl	5 g

#### Extraktion und Reinigung

Die Isolierung des Zielproteins wurde mit Hilfe der Metallionenaffinitätschromatographie durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2). Die gefrorene Zellmasse wurde aufgetaut und mit gleichem Volumen an Extraktionspuffer (Tab. 3.9) versetzt. Es wurde Lysozym (4 mg pro Liter Zellkultur), eine Spatelspitze DNase I,  $\text{MgCl}_2$  (1 mM finale Konz.) sowie Proteaseinhibitor (cOmplete<sup>®</sup>, EDTA-frei, Roche, 1 Tablette pro 50 mL) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Die Lösung wurde  $4 \times 30$  s unter Eiskühlung mit Ultraschall (Microtip sonifier) behandelt und weitere 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Harnstoff bis zu einer Konzentration von 6 M zugegeben und gerührt bis dieser vollständig gelöst war.

Das Lysat wurde 45 min bei 16000 rpm (Rotor 19776-H, 3K30, Sigma) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Agarose (Qiagen, 3 mL pro Liter Zellkultur) versetzt. Zur Anbindung des Proteins an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Agarosematrix wurde die Lösung 2.5 h unter ständigem Schwenken bei 4 °C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt.

Zur Elution der Proteine von der  $\text{Ni}^{2+}$ -Agarosematrix wurde die Lösung in eine Glassäule mit Fritte (Econo-column, BioRad,  $3 \times 13$  cm) gefüllt und der Durchfluss für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.4.1) aufgefangen. Die in der Säule verbleibende  $\text{Ni}^{2+}$ -Agarose wurde mit Waschpuffer gespült (siehe Tabellen im Abschnitt 4.1). Am Ende des Waschschriffs wurde eine Probe genommen um die vollständige Entfernung ungebundener Proteine zu überprüfen. Zuletzt wurde das Zielprotein langsam durch Zugabe von Elutionspuffer ( $3-4 \times 10$  mL) eluiert. Die Fraktionen wurden mit DTT (Dithiotreitol, 10 mM finale Konz.) versetzt. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (siehe Abschnitt 4.1).

*Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Extraktionspuffers*

Extraktionspuffer	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Natriumcholat	10 %

#### **Entfernung des Hexahistidin-Tags**

Der für die Isolierung des Zielproteins verwendete Hexahistidin-Tag wurde durch Verdau mit dem Enzym Thrombin entfernt. Der Verdau wurde zeitgleich mit einer Dialyse durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass das entfernte Proteinfragment direkt aus der Lösung entfernt werden konnte. Weiterhin wurde gegen einen Puffer mit geringerer Salzkonzentration dialysiert, wodurch auch das vorhandene Imidazol entfernt wurde.

Hierzu wurden die Elutionsfraktionen mit hohem Proteingehalt vereinigt und in einen Dialyseschlauch mit geeigneter Molekülmassengrenze eingefüllt (Synaptobrevin/Syntaxin: 4–6 kDa, SNAP25: 12–14 kDa, Synaptobrevin 49-96: 1 kDa). Es wurden 100  $\mu$ L Thrombinlösung (5 mg/mL in 50 % Glycerin/Puffer (20 mM HEPES/KOH, 100 mM KCl, pH 7.4)) pro 5 mL Elutionsfraktion hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C gegen 1 L Dialysepuffer dialysiert (siehe Abschnitt 4.1). Die Vollständigkeit des Thrombinverdaus wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

#### **Reinigung und Konzentrierung**

Zum Entfernen von in der Lösung verbliebenen Fremdproteinen, unvollständig synthetisierten Proteinfragmenten, sowie des hinzugefügten Thrombins wurde eine abschließende Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie vorgenom-

men. Dies führt zusätzlich zu einer Konzentrierung des Zielproteins durch eine schmalbandige Elution, sodass die erhaltene Proteinlösung direkt für die durchzuführenden Experimente verwendet werden kann. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer können den jeweiligen Tabellen in Abschnitt 4.1 entnommen werden.

Die erhaltene Lösung aus der Dialyse wurde durch Filtration durch einen  $0.2\ \mu\text{m}$  Sterilfilter von ausgefallenen Partikeln befreit und durch Zugabe von Puffer A im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die entsprechende Säule (MonoQ/S, Äkta purifying System, GE Healthcare) wurde in Puffer A äquilibriert und im Anschluss mit der Proteinlösung beladen. Zur Elution wurde ein vorher im Steuerungsprogramm festgelegter Konzentrationsgradient durch Mischung von Puffer A und B automatisch abgefahren und das Eluat mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen (vergl. Abschnitt 4.1). Je nach Größe der verwendeten Säule wurde ein Volumen von 1 mL (MonoQ/S 5/50) bzw. 2 mL (MonoQ 10/100) pro Fraktion gesammelt. Die durch eine erhöhte Absorption im UV/vis-Spektrum indizierten Proteinbanden wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Konzentrationen der das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden durch UV/vis-Spektroskopie bestimmt. Die Fraktionen mit hoher Proteinkonzentration wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 3.6 Messtechnische Methoden

### 3.6.1 Konfokale Laserrasterfluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Laserrasterfluoreszenzmikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) ist eine Weiterentwicklung klassischer Mikroskopie-Techniken und verbindet die Fluoreszenzmikroskopie mit einer konfokalen Detektion des Lichtes sowie der punktförmigen Beleuchtung der Probe durch einen Laser.

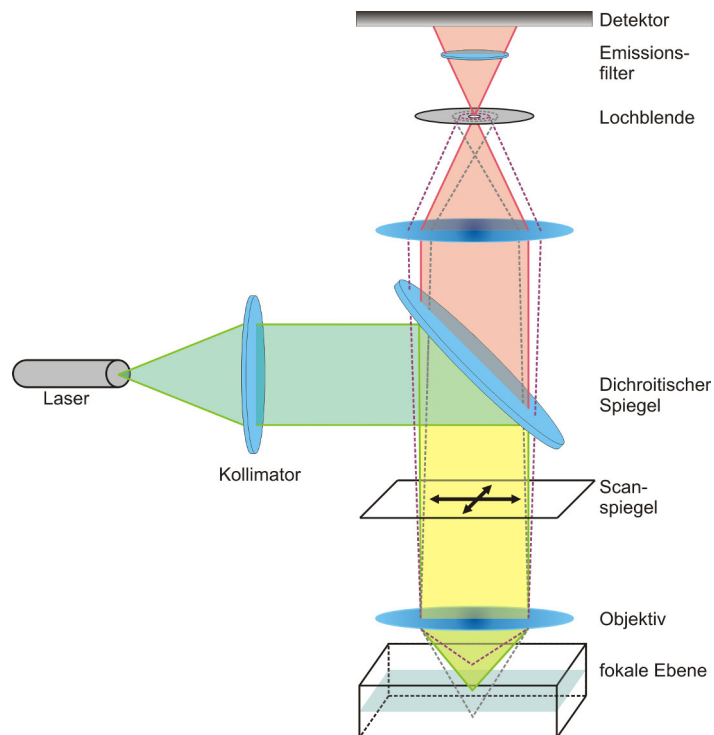


Die Fluoreszenzmikroskopie nutzt die bei der Fluoreszenz auftretende Stokesverschiebung, um Anregungslicht und Emissionslicht, durch Einbringen eines dichroitischen Spiegels in den Strahlengang, spektral zu trennen. Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt demnach ausschließlich die fluoreszierenden Anteile der Probe. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, können so gezielt bestimmte Strukturen sichtbar gemacht werden. Um die in dieser Arbeit untersuchten künstlichen Membransysteme abbilden zu können, wurden ihnen Lipidgebundene Fluoreszenzsonden zugesetzt.

Die konfokale Mikroskopie unterscheidet sich von der Weitfeldmikroskopie durch den Einsatz von Lochblenden vor der Anregungslichtquelle, sowie vor dem Detektor. Durch diese Anordnung wird einerseits das Anregungslicht auf eine Ebene in der Probe fokussiert und andererseits vornehmlich das Licht, welches aus der Fokusebene ausgestrahlt wird, detektiert (Abb. 3.13). Das Licht aus Ebenen oberhalb und unterhalb der Fokusebene wird ausgeblendet, was zu einer deutlich gesteigerten Detailwiedergabe führt. Zusätzlich werden optische Schnitte durch die Probe möglich, sodass durch wiederholte Bildaufnahme entlang der Z-Achse eine dreidimensionale Darstellung von Objekten konstruiert werden kann (Z-Stapel).

Eine weitere Verbesserung der Abbildungseigenschaften kann durch das Ab-rastern der Probe mit einem Laserstrahl erreicht werden. Hierdurch wird zu einem Zeitpunkt nur ein kleiner Teil der Abbildungsfläche illuminiert (idealerweise ein beugungsbegrenzter Lichtfleck). Dies erhöht wiederum die Detailschärfe, da umgebende Fluorophore nicht mit angeregt werden. Zusätzlich ermöglicht dies den Einsatz bestimmter Detektoren, da nicht das gesamte Bild sondern nur die Intensität einzelner Punkte aufgezeichnet werden muss, wie zum Beispiel Photoelektronenvervielfacher (engl. *photomultiplier tube*, PMT) oder Lawinenphotodioden (engl. *avalanche photodiode*, APD).

Ein konfokales Laserrasterfluoreszenzmikroskop wurde in dieser Arbeit zur zeitlich aufgelösten Visualisierung einzelner Fusionsereignisse von Vesikeln mit porenüberspannenden Membranen eingesetzt (Kapitel 3.7). Es wurde ein Wasserimmer-



**Abbildung 3.13:** Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops. Zeichnung nach Orth.<sup>[93]</sup>

sionsobjektiv (W Plan-Apochromat 63 x) mit einer numerischen Apertur von 1.0 verwendet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch einen Argonionenlaser (488 nm, 25 mW, 5 % der Maximalleistung). Die Detektion erfolgte spektral getrennt in einen grünen (503 nm – 545 nm) sowie einen roten Kanal (612 nm – 671 nm) mit Hilfe einer PMT. Bei einem Experiment wurde jeweils eine Serie von 2500 Bildern mit einer Auflösung von  $256 \times 256$  Bildpunkten und 16 bit Farbtiefe auf einer Fläche von  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  aufgenommen. Die Aufnahme eines Bildes nahm 120 ms in Anspruch, was der maximalen Rastergeschwindigkeit des Mikroskops bei den gewählten Parametern entsprach.

### 3.6.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Untersuchung der Mobilität der membranständigen SNARE-Proteine in den porenüberspannenden Membranen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Bei dieser handelt es sich um eine optische Messmethode, die die Intensitätsfluktuationen von gering konzentrierten fluoreszierenden Teilchen für die Bestimmung ihrer Diffusionskonstanten nutzt.<sup>[94]</sup> Hierzu wird meist ein konfokales Laserfluoreszenzmikroskop eingesetzt, bei dem die Anregung des Fluorophors im Idealfall nur im fokalen Volumen, das heißt im Fokus des Objektivs, erfolgt, wobei durch die Lochblende vor dem Detektor nur das Licht aus der fokalen Ebene erfasst wird (siehe oben). Der Detektor sollte dabei in der Lage sein einzelne Photonen aufzulösen, weshalb meist Lawinenphotodioden (APDs) verwendet werden. Aufgenommen wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit (Zeitspur  $F(t)$ ). Diffundieren nun fluoreszierende Teilchen durch das fokale Volumen äußert sich dies in einer Fluktuation der Intensität. Die Teilchen benötigen für das Durchqueren des Volumens eine bestimmte Zeit, wodurch eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass zu aufeinanderfolgenden Zeiten Photonen vom selben Teilchen detektiert werden und die gemessenen Intensitäten somit zeitlich korreliert sind. Zur Auswertung werden die aufgezeichneten Zeitspuren mit sich selbst korreliert (autokorreliert). Dies erfolgt anhand der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$

$$G(\tau) := \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.2)$$

mit der Fluktuation  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  als Abweichung der Intensität zum Zeitpunkt  $t$  vom Mittelwert.

Da in diesem Fall die Diffusion innerhalb einer Membran betrachtet wird, wurde ein zweidimensionales Diffusionsmodell angepasst<sup>[95]</sup>:

$$G(\tau) = \left( \frac{1}{N \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}} \right) \left( 1 + \frac{p}{1-p} \right) e^{-\frac{\tau}{\tau_D}} \quad (3.3)$$

wobei  $N$  die mittlere Anzahl an fluoreszierenden Teilchen im detektierten Volumen und  $p$  der Anteil an Teilchen darstellt, die in einen nicht-strahlenden Triplet-Zustand übergehen.  $\tau_D$  ist die mittlere Zeit, die ein Teilchen benötigt um das fokale Volumen zu durchqueren, und  $\tau_T$  die Zeit, die ein Molekül im Triplet-Zustand verweilt. Der Diffusionskoeffizient  $D$  kann aus  $\tau_D$  berechnet werden:

$$\tau_D = \frac{L^2}{\ln(2) \cdot 8 \cdot D} \quad (3.4)$$

mit  $L$  als dem lateralen Durchmesser des Detektionsvolumens bei halbem Intensitätsmaximum der Fluoreszenz.

Die Bestimmung der Mobilität der SNARE-Proteine wurde anhand eines fluoreszenzmarkierten synthetischen Analogons von Syntaxin 1A (259–288, Transmembrandomäne) durchgeführt. Das Peptid wurde von Karsten Meyenberg aus der Abteilung von Prof. Diederichsen zur Verfügung gestellt<sup>[69]</sup> und war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto647N markiert. Für die Präparation der porenüberspannenden Membranen wurden GUVs mit der bekannten Lipidzusammensetzung hergestellt. Sie enthielten die Fluoreszenzsonde Atto488 DHPE in einem Verhältnis von 1:10000 (Farbstoff / Lipid) sowie das markierte Peptid im Verhältnis von 1:18000. Die Rekonstitution erfolgte direkt durch Mischung der Komponenten im organischen Lösungsmittel (vergl. Kapitel 3.1.4). Das Peptid war in Trifluoroethanol gelöst und wurde zur Lipidlösung in Chloroform hinzugegeben. Für die GUV-Herstellung wurde die erhaltene Lösung auf zwei ITO-Gläschen ausgestrichen bis das Lösungsmittel verdampft war und anschließend für 30 min im Vakuum getrocknet. Die ITO-Gläschen wurden mit Hilfe eines Silikonrings zu einer Kammer zusammengesetzt und mit Sucrose-Lösung (210 mOsm) gefüllt. Es wurde für 3 h ein elektrisches Wechselfeld mit einer Spannung von 1.6 V und einer Frequenz von 12 Hz angelegt. Die porenüberspannenden Membranen wurden wie in 4.2.2 beschrieben präpariert. Da jedoch ein inverser Messaufbau verwendet wurde mussten die Substrate nach der

Membranbildung in der Messkammer umgedreht werden, wodurch ein Großteil der Membranen zerstört wurde.

Die Messungen wurden an einem konfokalen Laserrastermikroskopaufbau mit einem 100× Ölimmersionsobjektiv (NA = 1.42, Leica, Wetzlar, Deutschland) und einem Einzelphotonendetektor (APD, SPCM-AQR-13-FC, Perkin Elmer Optoelectronics) durchgeführt. Für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wurden gepulste Diodenlaser (PicoQuant, Berlin, Deutschland) mit Wellenlängen von 488 und 633 nm (Pulsdauer 80 ps) eingesetzt. Die Detektion erfolgte in einem Spektralbereich von  $540 \pm 20$  nm (grüner Kanal) und  $670 \pm 30$  nm (roter Kanal). Der laterale Durchmesser des Detektionsvolumens  $L$  betrug dabei für Atto488  $L = 200$  nm und für Atto647  $L = 250$  nm. Die Bestimmung der Diffusionskonstanten wurde an mindestens 20 porenüberspannenden Membranen aus drei unabhängigen Präparationen durchgeführt.

## 3.7 SNARE-Protein vermittelte Membranfusion auf porenüberspannenden Membranen

Für die Experimente zur Membranfusion wurden GUVs mit dem rekonstituierten  $\Delta N49$ -Akzeptorkomplex (Kapitel 3.3, S. 37) auf hydrophil funktionalisierten, offenporigen Substraten (Kapitel 4.2.2, S. 87) gespreitet. Die Bildung porenüberspannender Membranen wurde mit Hilfe eines konfokalen Laserrasterfluoreszenzmikroskops (CLSM) (Kapitel 3.6.1) überprüft und im Anschluss mit Synaptobrevin-2 dotierte LUVs hinzugegeben. Die porenüberspannende Membran war hierbei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green, die LUVs mit Texas Red in einer Konzentration von 1 mol% markiert. Durch Aufnahme einer Zeitserie konnte die Fusion der Vesikel mit der Membran verfolgt werden. Im Folgenden soll die Durchführung der Experimente sowie die Verarbeitung der erhaltenen Daten genauer beschrieben werden.

### 3.7.1 Durchführung der Fusionsexperimente

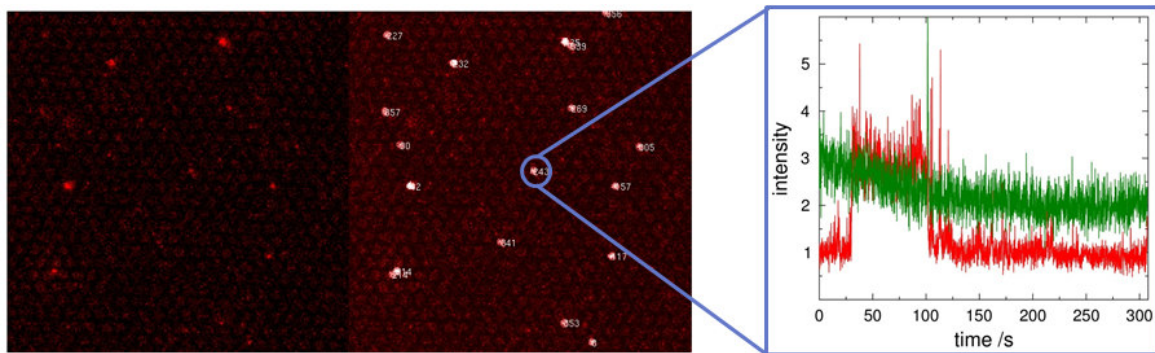
Zunächst wurde die Oberfläche des Substrats mit Hilfe des Okulars auf porenüberspannende Membranbereiche (*Membran-Patches*) untersucht. Für die Aufnahme einer Zeitserie wurde ein *Patch* mit ausreichender Fläche ausgewählt, sodass die abzubildende Fläche von  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  vollständig innerhalb des *Patches* lag. Das Objektiv wurde aus der Lösung gehoben und eine Menge von  $0.5 - 1 \mu\text{L}$  LUV-Lösung mit der Pipette manuell direkt über die Substratoberfläche an der Position des *Patches* gegeben. Das Objektiv wurde vorsichtig in die Lösung abgesenkt. Konnten im abzubildenden Bereich Vesikel beobachtet werden, wurde möglichst zeitnah die Aufnahme der Zeitserie, mit den in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Parametern, gestartet. Eine Zeitserie umfasste eine Dauer von 306 s mit einer zeitlichen Auflösung von 120 ms. Im Anschluss konnten weitere Zeitserien auf *Membran-Patches* in anderen Bereichen des Substrats aufgenommen werden. Bedingung hierfür war, dass die Membran noch nicht mit Vesikeln aus vorherigen Messungen in Kontakt gekommen waren. Auf diese Weise konnten auf einem Substrat bis zu sechs Experimente durchgeführt werden.

### 3.7.2 Datenverarbeitung und Detektion der Fusionsereignisse

Die Auswertung der Zeitserien erfolgte mit Hilfe eines von Prof. Dr. Burkhard Geil in der Software MatLab programmierten Skripts. Das Programm detektierte die einzelnen Vesikel und verfolgte ihre Bewegungen durch einen *particle tracking*-Algorithmus über der Substratoberfläche. Die beiden Kanäle für die grüne (Oregon Green 488, porenüberspannende Membran) und die rote Fluoreszenz (Texas Red, Vesikel) wurden nebeneinander in Einzelbilder exportiert (2500 Bilder pro Zeitserie, grün links, rot rechts). Die Detektion der Vesikel wurde durch Subtraktion eines globalen Grenzwerts von der Fluoreszenzintensität des roten Kanals realisiert. Da das Signal zu Rausch Verhältnis in jedem Experiment unterschiedlich ausfiel, musste dieser Grenzwert zur Vermeidung von Fehldetektionen für jede Zeitserie

manuell angepasst werden. Um eine Detektion von Pixelrauschen zu unterdrücken, wurde eine Mindestgröße von 2 Pixeln für einen Vesikel definiert. Jedem Partikel wurde eine eindeutige Zahl zur Identifizierung zugewiesen (Partikel-ID). Nach der Vesikeldetektion in jedem einzelnen Bild einer Zeitserie, wurde, zur Verfolgung der Bewegungen der Vesikel, jedes Bild mit dem darauffolgenden verglichen. Es wurde dabei für jede Partikel-ID ein "Nachfolger" gesucht und dessen ID entsprechend geändert, sodass jede ID eindeutig einem Vesikel über den Verlauf einer Zeitserie zugeordnet werden konnte. Als maximal zurückgelegte Strecke eines Vesikels zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen wurden 7 Pixel ( $1.1 \mu\text{m}$ ) angenommen. Partikel-IDs ohne "Nachfolger", sowie überschriebene IDs wurden verworfen. Zusätzlich wurde ein Korrekturmechanismus eingesetzt. Dieser berücksichtigte Partikel, deren Intensität zeitweise unterhalb des Intensitätsgrenzwerts lag, weshalb sie in einzelnen Aufnahmen nicht detektiert wurden, sodass sie ihre ursprüngliche ID beibehielten. Da eine Vielzahl von Vesikeln nur kurz durch die beobachtete Bildfläche diffundierten, musste, zur Begrenzung der erforderlichen Rechenzeit, eine Mindestanzahl an Bildern definiert werden, in welchen der jeweilige Vesikel vorhanden sein musste. Es wurde hier ein Wert von 25 Bildern (3 s) für alle Zeitserien verwendet. Da die Vesikel, nachdem sie an die Membran gebunden hatten, ihre Position nicht mehr oder nur geringfügig änderten, wurde an dieser Stelle eine ortsfeste *region of interest* (ROI) mit einem Radius von 3 Pixeln (470 nm) erzeugt. Zur weiteren Auswertung wurden die Intensitäten des roten und des grünen Fluoreszenzkanals innerhalb der ROIs für jedes Bild integriert. Abbildung 3.14 zeigt beispielhaft ein Fluoreszenzbild einer Zeitserie, sowie das selbe Bild mit den in diesem Bild detektierten Partikeln. Weiterhin sind die Graphen der ausgelesenen Fluoreszenzintensitäten in einer ROI für einen Vesikel dargestellt.

Die Intensitätsverläufe aller detektierten Vesikel wurden in der Folge mit einem weiteren Skript, programmiert von Dr. Ingo Mey, manuell auf Anzeichen einer Fusion überprüft (Kapitel 4.4.4).



**Abbildung 3.14:** Graphische Darstellung der Auswertung der Fluoreszenzdaten einer Zeitserie. Links: Fluoreszenzbild des roten Kanals. Mitte: Detektierte Partikel (weiß) mit individueller Partikel-ID. Rechts: Fluoreszenzintensitätsverläufe innerhalb des für einen Vesikel definierten ROI des roten und grünen Kanals.





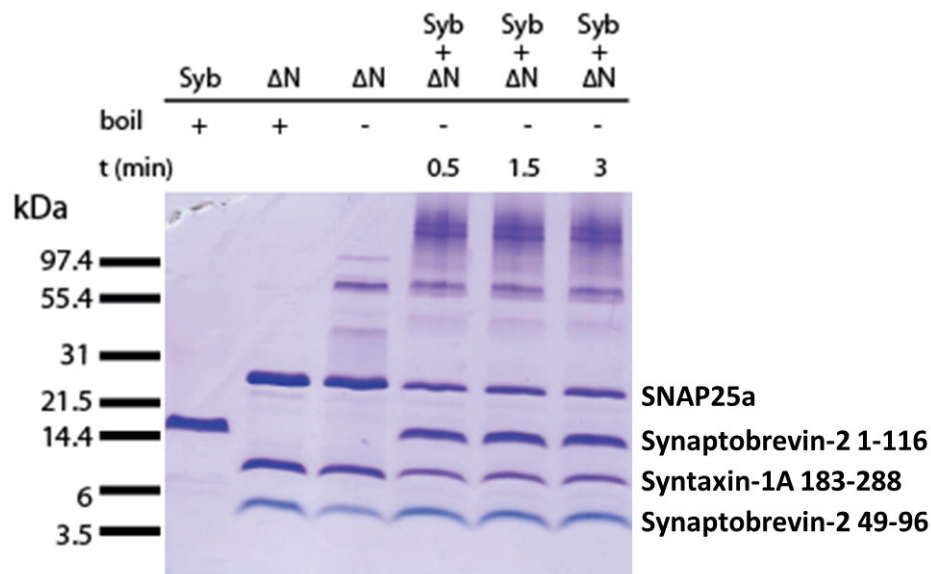
## 4 Ergebnisse

Die SNARE-vermittelte Membranfusion ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Es wurden im Laufe der Zeit verschiedene *in vitro*-Assays zur Untersuchung dieses Prozesses entwickelt. Eine vollständige Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus konnte jedoch bisher noch nicht erbracht werden. In dieser Arbeit sollte, als Beitrag zu den bereits bestehenden Methoden, ein Fusionsassay auf porenüberspannenden Membranen entwickelt werden, um die SNARE-vermittelte Fusion einzelner Vesikel zu untersuchen. Hierdurch sollten die Nachteile der bisher verwendeten Modellmembransysteme durch den Einsatz porenüberspannender Membranen als Zielfolien für die Fusion vermieden werden.

Für die Entwicklung des Fusionsassays musste zunächst die Isolierung und Reinigung der SNARE-Proteine in der Arbeitsgruppe etabliert und im Anschluss eine Methode für die Rekonstitution der Proteine in porenüberspannende Membranen entwickelt werden. Zusätzlich wurden die Protokolle zur Funktionalisierung poröser Substrate in Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe überarbeitet, um eine zuverlässige Präparation porenüberspannender Membranen zu gewährleisten. Um die Diffusion der SNARE-Proteine in der Membran zu charakterisieren, wurden Mobilitätsstudien mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie durchgeführt.

## 4.1 Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen aus *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Proteine wurden mit Hilfe von Plasmiden aus der Abteilung Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) hergestellt. Es wurde nach dem in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Protokoll verfahren, wobei Abweichungen vom Protokoll im Text und die verwendeten Puffer am Ende des jeweiligen Abschnitts angegeben werden. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden in geeignete Mengen im Hinblick auf die folgenden Experimente aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Interpretation der SDS-PAGE-Gele wurde ein Gel aus der Literatur als Vergleich herangezogen.<sup>[20]</sup> Das in Abbildung 4.1 gezeigte SDS-PAGE Gel stammt aus einer Veröffentlichung unseres Kooperationspartners, in welcher die auch hier eingesetzten Plasmide verwendet wurden. Es wurde lediglich ein anderer Molmassenstandard eingesetzt.



**Abbildung 4.1:** SDS-PAGE Analyse der verwendeten SNARE-Proteine aus der Literatur. Analysiert wurde hierbei die Bildung eines SDS-resistenten core-Komplexes durch Bindung von Synaptobrevin-2 (Syb) an den  $\Delta\text{N}$ -Akzeptorkomplex ( $\Delta\text{N}$ ). Abbildung verändert nach Hernandez et al..<sup>[20]</sup>

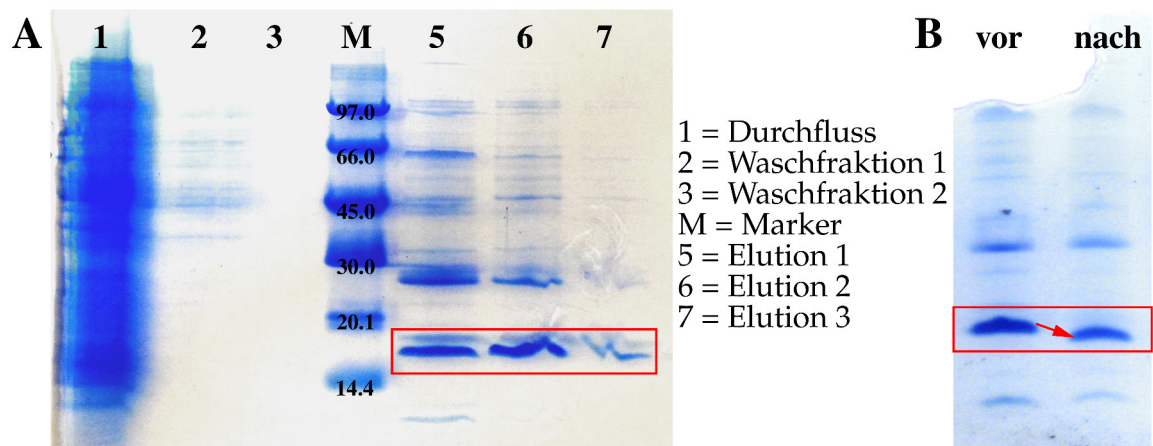
### 4.1.1 Synaptobrevin-2 (1-116)

Die Reinigung von Synaptobrevin-2 erfolgte größtenteils nach dem in 3.5.2 (S. 48) beschriebenen Protokoll. Eine Besonderheit war die Verwendung von zwei verschiedenen Waschpuffern während der Isolierung, wodurch ein Wechsel des Detergens (Waschpuffer 1: Natriumcholat 1 %, Waschpuffer 2: CHAPS 1 %, vergl. Tabelle 4.1 S. 69) zwischen den Waschschritten der Metallionenaffinitätschromatographie erfolgte. Die Ni<sup>2+</sup>-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde dabei zunächst mit 4 × 50 mL Waschpuffer 1 und anschließend mit 2 × 50 mL Waschpuffer 2 gespült.

Die SDS-PAGE-Analyse aus der Literatur zeigt, dass das Zielprotein Synaptobrevin-2 (12.69 kDa) nicht im zu erwartenden Molmassenbereich im Gel zu finden ist, sondern leicht zu höheren Molmassen hin verschoben gefunden werden kann (Abb. 4.1). Die Bande befand sich in diesem Fall zwischen den Banden des Molmassenstandards von 14.4 und 21.5 kDa. Das SDS-Gel mit den Elutionsfraktionen (Abb. 4.2 A, 5–7) aus der Affinitätschromatographie zeigt, dass hier das gleiche Verhalten beobachtet werden konnte. Im aufgrund des Literaturvergleichs erwarteten Bereich sind deutliche Proteinbanden zu erkennen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Zielprotein (14.14 kDa mit His<sub>6</sub>-Tag) in hoher Konzentration exprimiert und isoliert werden konnte. Weiterhin zeigen sich einige höhermolekulare Verunreinigungen, welche trotz intensiven Spülens der Ni<sup>2+</sup>-Agarosematrix nicht entfernt werden konnten. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich um Fremdprotein handelt, welches unspezifisch an das Säulenmaterial binden kann.

Im Durchfluss (Abb. 4.2 A, 1) ist, neben den allgemein vorhandenen Proteinen des Zellaufschlusses, keine hervortretende Bande im Molmassenbereich des Zielproteins erkennbar. Dies weist darauf hin, dass das Zielprotein nahezu vollständig an die Ni<sup>2+</sup>-Agarosematrix gebunden wurde. Die Banden der Waschfraktionen bestätigen, dass nach dem 1. Waschschriff immer noch Fremdprotein vorhanden war (Abb. 4.2 A, 2). Die 2. Waschfraktion jedoch enthielt kein weiteres Fremdmaterial, sodass

#### 4. Ergebnisse



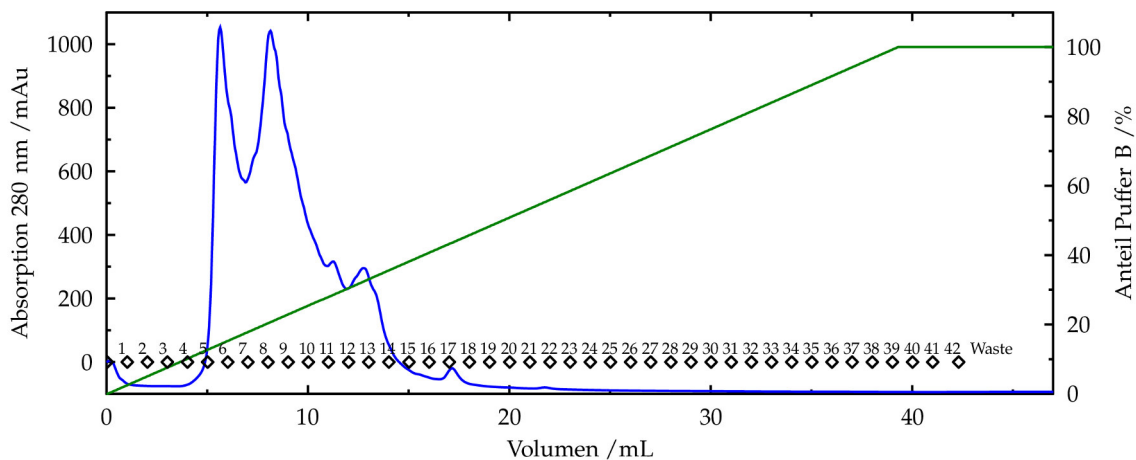
**Abbildung 4.2:** (A) SDS-PAGE Analyse der Isolierung von Synaptobrevin 1-116 nach der Metallionenaffinitätschromatographie (roter Kasten). (B) SDS-PAGE der vereinigten Elutionsfraktionen vor und nach dem Thrombinverdau (roter Kasten, theoretische Molmasse: vorher 14.14 kDa, nachher 12.69 kDa).

von einer vollständigen Entfernung von ungebundenen Proteinen ausgegangen werden kann (Abb. 4.2 A, 3).

Anhand des Ergebnisses der SDS-PAGE-Analyse wurden die Elutionsfraktionen 1 und 2 vereinigt und nach Zugabe von Thrombin über Nacht gegen 1 L Dialysepuffer (Tab. 4.1, S. 69) dialysiert (vergl. Kapitel 3.5.2, S. 52). In Abbildung 4.2 B ist die SDS-PAGE-Analyse der Proteinlösung vor und nach dem Verdau durch Thrombin dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass sich die Bande von Synaptobrevin-2 mit His<sub>6</sub>-Tag (14.14 kDa) durch den Verdau zu einer niedrigeren Molmasse (Synaptobrevin-2 ohne His<sub>6</sub>-Tag, 12.69 kDa) verschoben hatte. Die Banden der vorhandenen Verunreinigungen zeigten keine Verschiebung. Dies weist auf eine vollständige Entfernung des His<sub>6</sub>-Tag durch den Verdau hin.

Da der isoelektrische Punkt von Synaptobrevin 7.84 beträgt, besitzt es bei pH 7.4 eine positive Nettoladung, sodass bei der abschließenden ionenaustauschchromatographischen Reinigung ein Kationentauscher (MonoS 5/50) zum Einsatz kam (Kapitel 3.5.2, S. 52). Die Rezepturen der verwendeten Puffer können der Tabelle 4.1 (S. 69) entnommen werden. Abbildung 4.3 zeigt das Chromatogramm der Reinigung, sowie die Fraktionierung des Eluats. Die Fraktionen, in denen eine

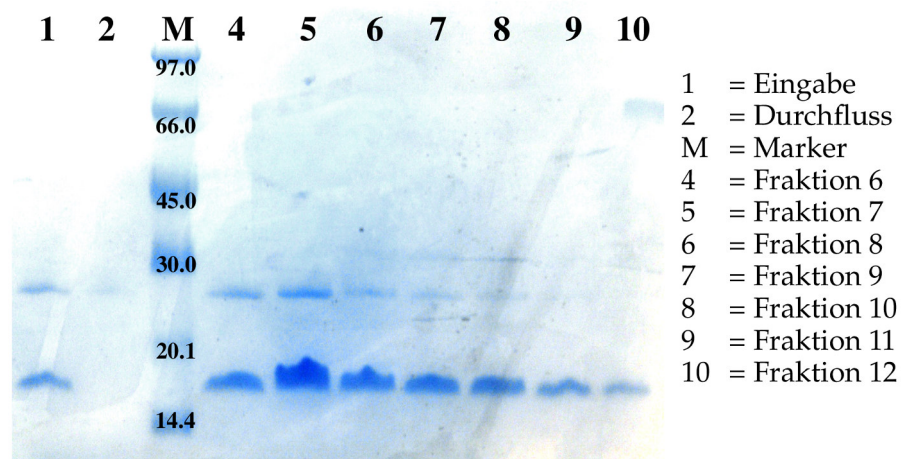
erhöhte Proteinkonzentration detektiert wurde, wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen 6–12 (Abb. 4.4) zeigte dabei eine starke Bande im dem für Synaptobrevin-2 erwarteten Bereich (vergl. Abb. 4.1). Der Durchfluss zeigt keine Banden, sodass von einer vollständigen Bindung des Zielproteins an die Ionenaustauschmatrix ausgegangen werden kann. Weiterhin ist in den Fraktionen 6–10 eine höhermolekulare Bande zu erkennen, die in allen durchgeführten Reinigungsschritten nicht entfernt werden konnte. Da sie jedoch in weitaus geringerer Konzentration enthalten ist wurde von einer zusätzlichen Reinigung abgesehen. Nach Vereinigung der Fraktionen 6–10 wurde die Gesamtausbeute mittels UV/vis-Spektroskopie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (Extinktionskoeffizient (berechnet):  $\epsilon = 13980 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). Es wurden insgesamt 6 mg Synaptobrevin-2 (1.2 mg/mL, 5 mL) aus 2.5 L Kulturmedium erhalten.



**Abbildung 4.3:** Ionenaustauschchromatogramm der Reinigung von Synaptobrevin-2 1-116. Aufgetragen sind die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau), der Anteil an Puffer B (grün) sowie die Fraktionierung (Rauten).

#### 4. Ergebnisse

---



*Abbildung 4.4: SDS-PAGE Analyse der angegebenen Fraktionen der ionenaustauschchromatographischen Reinigung von Synaptobrevin-2 1-116 (12.69 kDa).*

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzungen der bei der Isolierung von Synaptobrevin verwendeten Pufferlösungen.

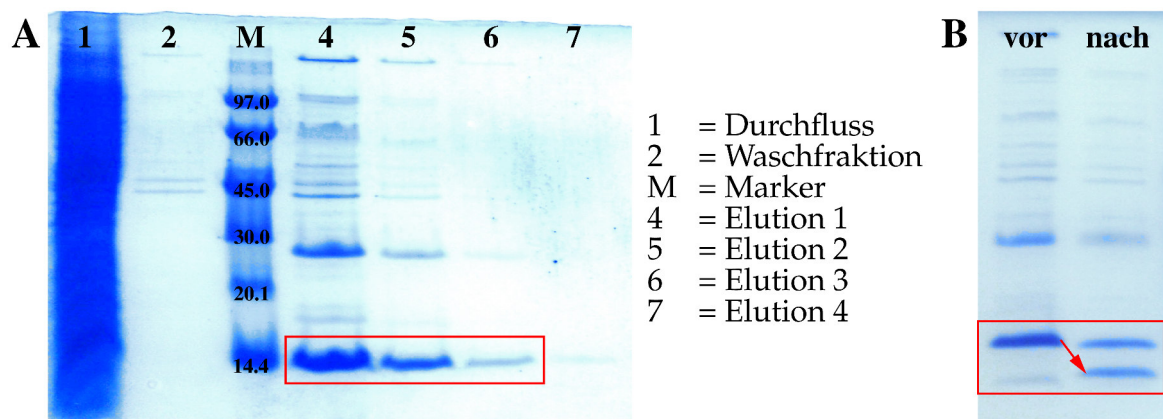
	Substanz	Menge
Waschpuffer 1	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Natriumcholat	1 %
Waschpuffer 2	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	CHAPS	1 %
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	400 mM
	CHAPS	1 %
Dialysepuffer	HEPES/KOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	CHAPS	1 %
Äkta-Puffer A	HEPES/KOH	20 mM pH 7.4
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
	CHAPS	1 %
Äkta-Puffer B	HEPES/KOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	1 M
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
	CHAPS	1 %



### 4.1.2 Syntaxin-1A (183-288)

Die Isolierung von Syntaxin-1A wurde entsprechend dem Protokoll aus Kapitel 3.5.2 (S. 48) durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 4.3 (S. 73) aufgeführt.

Die SDS-PAGE-Analyse des Eluats der Affinitätschromatographie von Syntaxin-1A (Abb. 4.5 A, 4 und 5) zeigen eine starke Bande des Zielproteins im erwarteten Molmassenbereich (13.47 kDa). Durch die hohe Konzentration des Proteins in den vereinigten Elutionsfraktionen (1–3) war es erforderlich, die Dialyse schrittweise durchzuführen, da andernfalls das Protein während der Dialyse ausfallen würde. Der Elutionspuffer enthielt eine hohe Konzentration an Detergens (Natriumcholat, 3%) sowie Harnstoff (6 M). Bei der Dialyse wurde die Konzentration an Harnstoff in zwei Schritten verringert (Dialysepuffer 1: 2 M Harnstoff, Dialysepuffer 2: kein Harnstoff, vergl. Tab. 4.3, S. 73). Durch die schrittweise Entfernung des Harnstoffs wurde ein Ausfallen des Proteins verhindert. Die im SDS-Gel sichtbaren höhermolekularen Verunreinigungen konnten während der folgenden Ionenaustauschchromatographie entfernt werden.

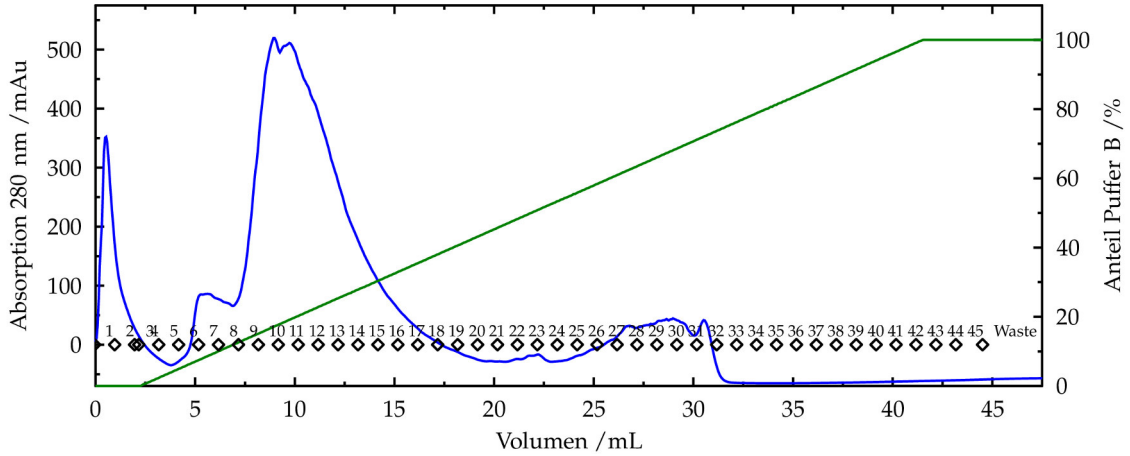


**Abbildung 4.5:** (A) SDS-PAGE Analyse der Isolierung von Syntaxin-1A (183-288) nach der Metallionenaffinitätschromatographie (13.47 kDa, roter Kasten). (B) SDS-PAGE der vereinigten Elutionsfraktionen vor und nach dem Thrombinverdau (roter Kasten, Molmassen: vorher 13.47 kDa, nachher 12.04 kDa). Die zwei prominenten Banden des Zielproteins (nach) weisen auf einen unvollständigen Verdau hin.

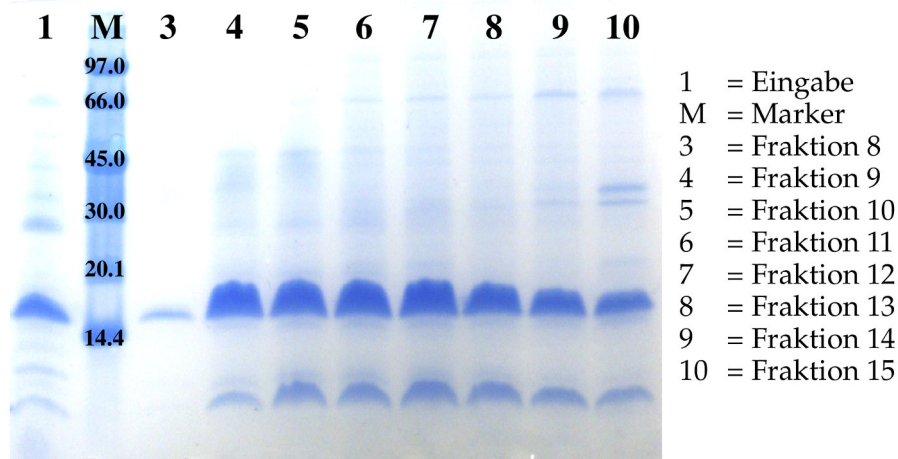
Das Thrombin zur Entfernung des His<sub>6</sub>-Tag wurde bereits im ersten Dialyseschritt hinzugefügt (Kapitel 3.5.2, S. 52). Der Erfolg des Verdau wurde parallel zum zweiten Dialyseschritt überprüft. Abbildung 4.5 B zeigt das SDS-Gel einer Probe vor und nach dem Thrombinverdau. Es fiel dabei auf, dass in der Probe nach der Thrombinzugabe, neben den in beiden Proben vorhandenen Verunreinigungen, zwei prominente Banden zu finden waren (roter Kasten). Dies wies darauf hin, dass zum Zeitpunkt der Analyse der Verdau des Proteins noch nicht vollständig abgeschlossen war. Aus diesem Grund wurde der Verdau vor der weiteren Reinigung bei Raumtemperatur fortgesetzt (3 h).

Die abschließende ionenaustauschchromatographische Reinigung erfolgte mit Hilfe eines starken Anionentauschers (MonoQ 5/50). Die hierfür verwendeten Puffer (Äkta-Puffer A und B) können der Tabelle 4.3 entnommen werden. Die SDS-PAGE-Analyse der entsprechenden Fraktionen zeigt eine sehr starke Bande, die im Vergleich zum Gel in Abb. 4.5 leicht zu höheren Molmassen verschoben war (Abb. 4.7). Der Grund für diese Verschiebung konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Es wurde dennoch davon ausgegangen, dass es sich um das gesuchte Protein handelte. Zusätzlich war eine niedermolekulare Verunreinigung enthalten, die nach der Reinigung zurückblieb. Da sie im SDS-Gel der Isolierung (Abb. 4.5, 4–6) nicht zu erkennen war, jedoch bei ähnlicher Ionenstärke von der Ionenaustauschmatrix eluierte, muss von einer beginnenden Zersetzung des Proteins während der zeitintensiven Dialyseschritte ausgegangen werden. Nach Vereinigung der Fraktionen 9–15 wurde eine Gesamtausbeute von 13.4 mg (1.9 mg/mL, 7 mL) aus 2.5 L Kultur mittels UV/vis-Spektroskopie (Extinktionskoeffizient (berechnet):  $\epsilon = 4470 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) bestimmt.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.6:** Ionenaustauschchromatogramm der Reinigung von Syntaxin 1A (183–288). Aufgetragen sind die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau), der Anteil an Puffer B (grün) sowie die Fraktionierung (Rauten).



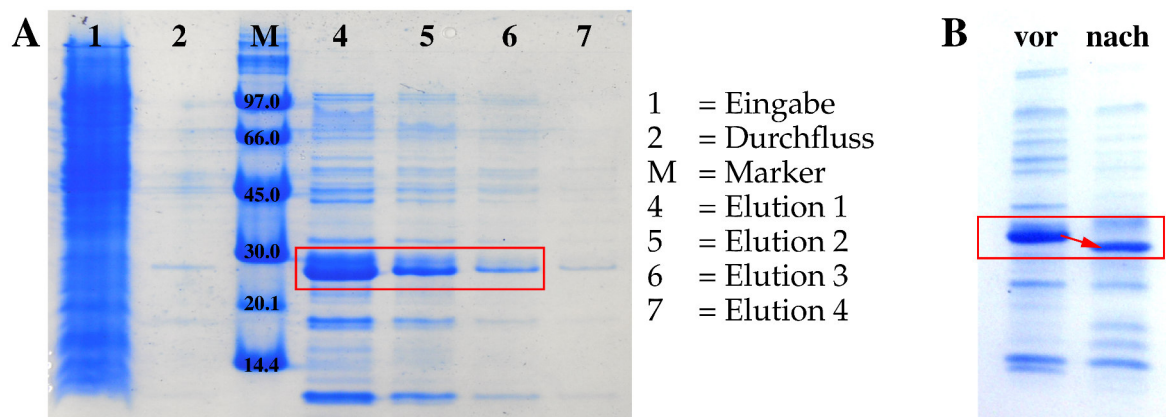
**Abbildung 4.7:** SDS-PAGE Analyse der angegebenen Fraktionen der ionenaustauschchromatographischen Reinigung von Syntaxin 1A (183–288, 12.04 kDa).

**Tabelle 4.3:** Zusammensetzungen der bei der Isolierung von Syntaxin 1A verwendeten Pufferlösungen.

	Substanz	Menge
Waschpuffer	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Natriumcholat	3 %
	Harnstoff	6 M
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	400 mM
	Natriumcholat	3 %
	Harnstoff	6 M
Dialysepuffer 1	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	1 M
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Natriumcholat	3 %
	Harnstoff	2 M
Dialysepuffer 2	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Natriumcholat	1.5 %
Äkta-Puffer A	HEPES/KOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	250 mM
	TCEP	0.1 mM
	CHAPS	1 %
Äkta-Puffer B	HEPES/KOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	1 M
	TCEP	0.1 mM
	CHAPS	1 %

### 4.1.3 SNAP-25a

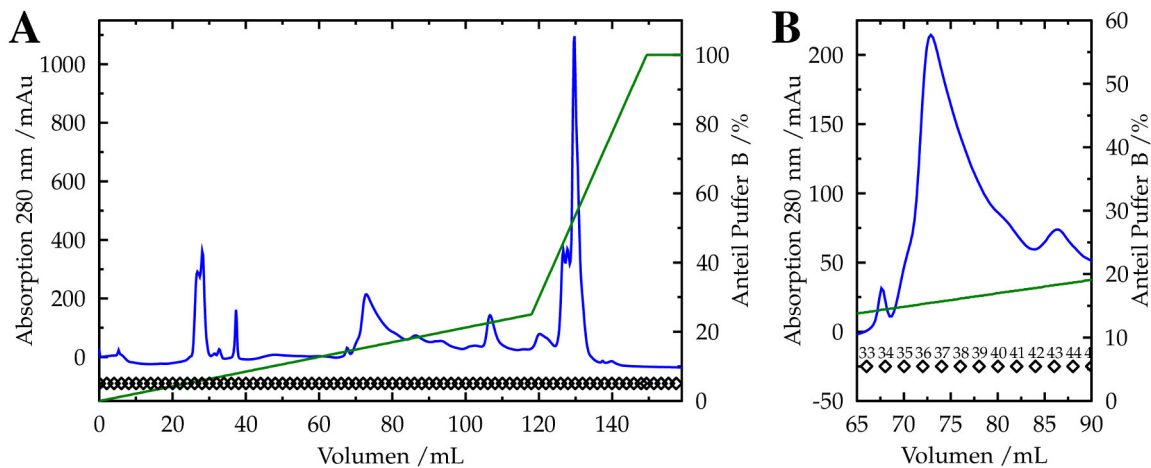
Abweichend von den zuvor behandelten Proteinen wird bei der Isolierung und Reinigung von SNAP-25a, mit Ausnahme des Extraktionspuffers, kein Detergens benötigt, da es vollständig in Wasser löslich ist. Die Isolierung erfolgte nach dem in Kapitel 3.5.2 (S. 48) beschriebenen Protokoll. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 4.5 (S. 77) aufgeführt. Das SDS-PAGE-Gel nach der Affinitätschromatographie zeigte viele Verunreinigungen unterschiedlicher Molmasse (Abb. 4.8 A). Es lässt sich ausserdem erkennen, dass die Bande im erwarteten Molmassenbereich des Zielproteins (24.79 kDa) weniger stark ausgeprägt war, sodass für die folgenden Isolierungen die Zellmasse aus zwei Zellkulturen (5 L) eingesetzt wurde. Es wurden die Elutionsfraktionen 1–3 vereinigt. Der Thrombinverdau konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 4.8 B). Die prominente Bande des Zielproteins war nach dem Verdau vollständig zu einer niedrigeren Molmasse (23.34 kDa) verschoben.



**Abbildung 4.8:** (A) SDS-PAGE Analyse der Isolierung von SNAP-25a nach der Metallionenaffinitätschromatographie (24.79 kDa, roter Kasten). (B) SDS-PAGE der vereinigten Elutionsfraktionen vor und nach dem Thrombinverdau (vor: 24.79 kDa, nach: 23.34 kDa).

Aufgrund der starken Verunreinigung musste bei der Ionenaustauschchromatographie ein sehr flacher Konzentrationsgradient verwendet werden, um eine möglichst breite Aufspreizung der Elutionsmaxima zu erhalten (Abb. 4.9). Weiterhin musste eine Säule mit großem Matrixvolumen (MonoQ 10/100, 8 mL) eingesetzt werden, wodurch eine bessere Trennleistung erzielt werden konnte. Die im Chro-

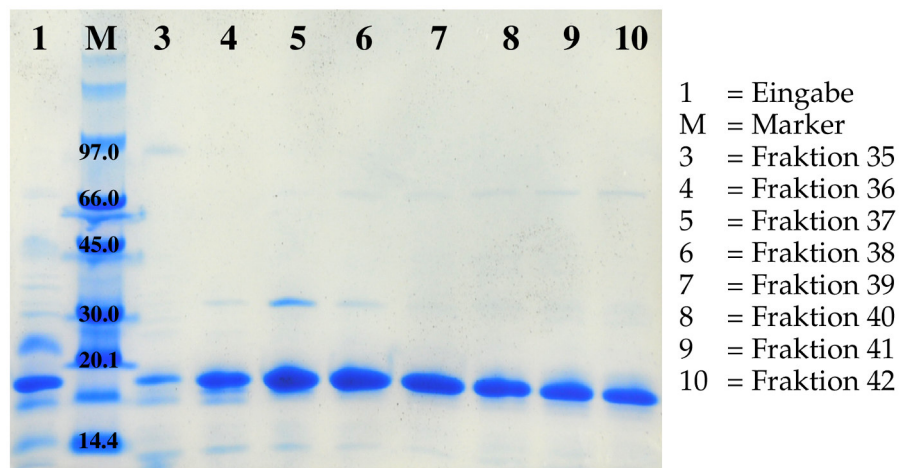
matogramm zu erkennenden Elutionspeaks wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um den *Peak* des gesuchten Proteins zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Fraktionen des Elutionspeaks von SNAP-25a zeigt, dass der Großteil der Verunreinigungen entfernt wurde (Abb. 4.10, 4–10). Die Banden sind in diesem Gel zu niedrigeren Momassen verschoben. Ein Grund für dieses Verhalten konnte nicht ermittelt werden. Es wurden die Fraktionen 36–42 vereinigt und die enthaltene Proteinkonzentration mittels UV/vis-Spektroskopie (Extinktionskoeffizient (berechnet):  $\epsilon = 7240 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) bestimmt. Die Ausbeute aus 5 L Kultur betrug 16 mg (0.8 mg/mL, 20 mL).



**Abbildung 4.9:** (A) Ionenaustauschchromatogram der Reinigung von SNAP25a. Aufgetragen sind die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau), der Anteil an Puffer B (grün) sowie die Fraktionierung (Rauten). (B) Vergrößerung des Elutionsmaximums des Zielproteins.

#### 4. Ergebnisse

---



*Abbildung 4.10: SDS-PAGE Analyse der Ionenaustauschchromatographischen Reinigung von SNAP25a (23.34 kDa).*

#### 4.1. Isolierung und Reinigung von SNARE-Proteinen aus *Escherichia coli*

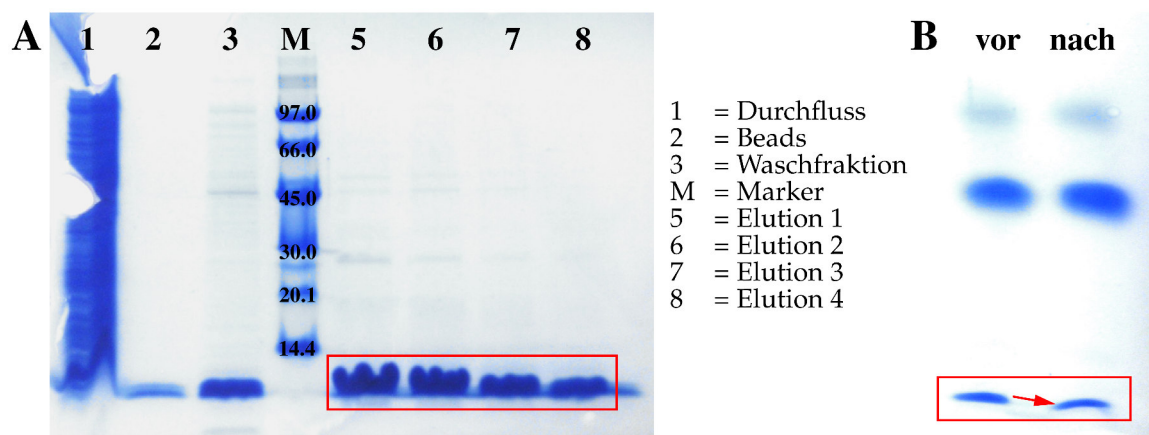
**Tabelle 4.5:** Zusammensetzungen der bei der Isolierung von SNAP25a verwendeten Pufferlösungen.

	Substanz	Menge
Waschpuffer 1	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	Tris/HCl	20 mM pH 7.4
	NaCl	500 mM
	Imidazol	400 mM
	DTT	1 mM
Dialysepuffer 1	HEPES/NaOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	50 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
Äkta-Puffer A	HEPES/NaOH	20 mM pH 7.4
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
Äkta-Puffer B	HEPES/NaOH	20 mM pH 7.4
	NaCl	1 M
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM



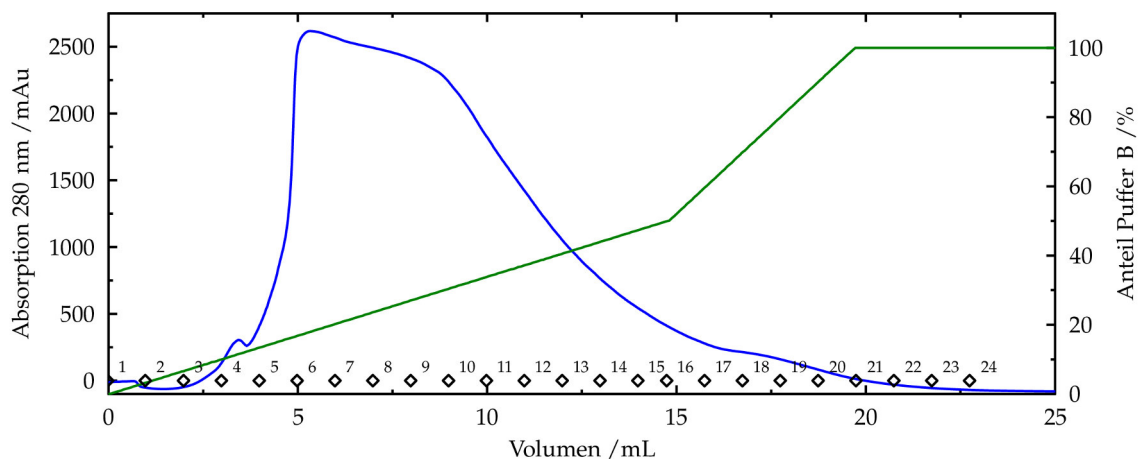
#### 4.1.4 Synaptobrevin-2 (49-96)

Die Reinigung des Fragments von Synaptobrevin erfolgte analog zu der Reinigung des vollständigen Proteins. Da es sich um einen Teil der cytosolischen SNARE-Bindungsdomäne von Synaptobrevin handelt, ist es in Wasser löslich, sodass die Pufferlösungen aus Tabelle 4.1 (S. 69) ohne Detergens eingesetzt werden konnten. Das SDS-Gel der Isolierung zeigt eine sehr starke Bande im erwarteten Molmassenbereich mit nur geringen Verunreinigungen (Abb. 4.11 A 5–8). Sowohl im Durchfluss als auch in der Waschfraktion ist noch verbliebenes Protein zu erkennen (Abb. 4.11 A 1,3). Dies deutet auf eine unvollständige Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-Agarosematrix aufgrund der hohen Konzentration hin, wodurch ein Teil des Zielproteins verloren wurde. Es wurden alle Elutionsfraktionen vereinigt. Die vollständige Verschiebung der Bande des Zielproteins im SDS-Gel nach dem Thrombinverdau bestätigt, dass die Entfernung des His<sub>6</sub>-Tags erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 4.11 B). Durch die hohe Konzentration an Zielprotein musste eine große Menge Thrombin zugegeben werden, sodass im SDS-Gel eine Bande im höher molekularen Bereich sichtbar wird, welche zuvor noch nicht vorhanden war.



**Abbildung 4.11:** (A) SDS-PAGE Analyse der Isolierung von Synaptobrevin-2 (49–96) nach der Metallionenaffinitätschromatographie (7.08 kDa, roter Kasten). (B) SDS-PAGE der vereinigten Elutionsfraktionen vor und nach dem Thrombinverdau (vor: 7.08 kDa, nach: 5.63 kDa).

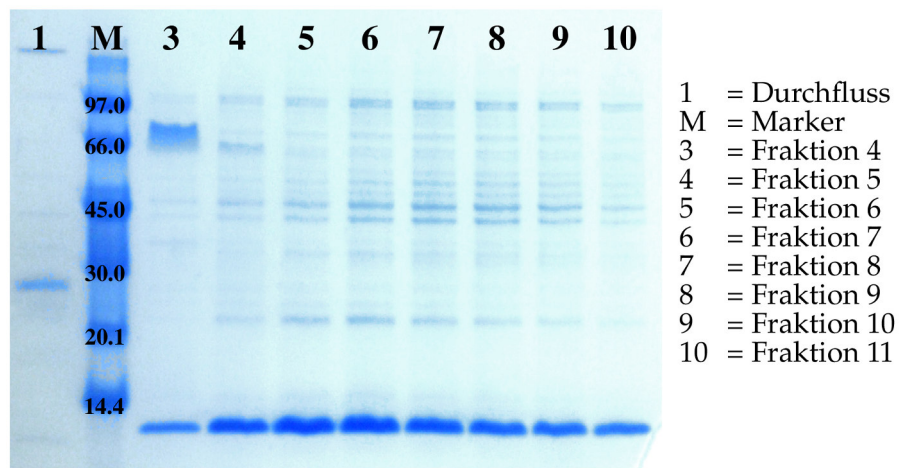
Die ionenaustauschchromatographische Reinigung musste, aufgrund der hohen Konzentration, in mehreren Portionen durchgeführt werden. Die verwendeten Puffer können der Tabelle 4.1 entnommen werden, wobei kein Detergenz benötigt wurde. Durch die starke Beladung der Säule erfolgte die Elution in einem breiten Maximum (Abb. 4.12). Die Analyse der entsprechenden Fraktionen zeigte einige höhermolekulare Verunreinigungen, die bei gleicher Ionenstärke eluierten und daher nicht entfernt werden konnten (Abb. 4.13). Das Thrombin hingegen konnte vollständig entfernt werden. Es wurden keine zusätzlichen Reinigungsschritte durchgeführt. Die Fraktionen 5–11 wurden vereinigt und die Proteinkonzentration mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmt (Extinktionskoeffizient (berechnet):  $\epsilon = 5627 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). Die Gesamtausbeute aus 5 L Kultur betrug 88.7 mg (Pool 1: 4.0 mg/mL, 8 mL, Pool 2: 3.6 mg/mL, 8 mL, Pool 3: 3.47 mg/mL, 8 mL).



**Abbildung 4.12:** Ionenaustauschchromatogramm der Reinigung von Synaptobrevin-2 (49–96). Aufgetragen sind die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau), der Anteil an Puffer B (grün) sowie die Fraktionierung (Rauten).

#### 4. Ergebnisse

---



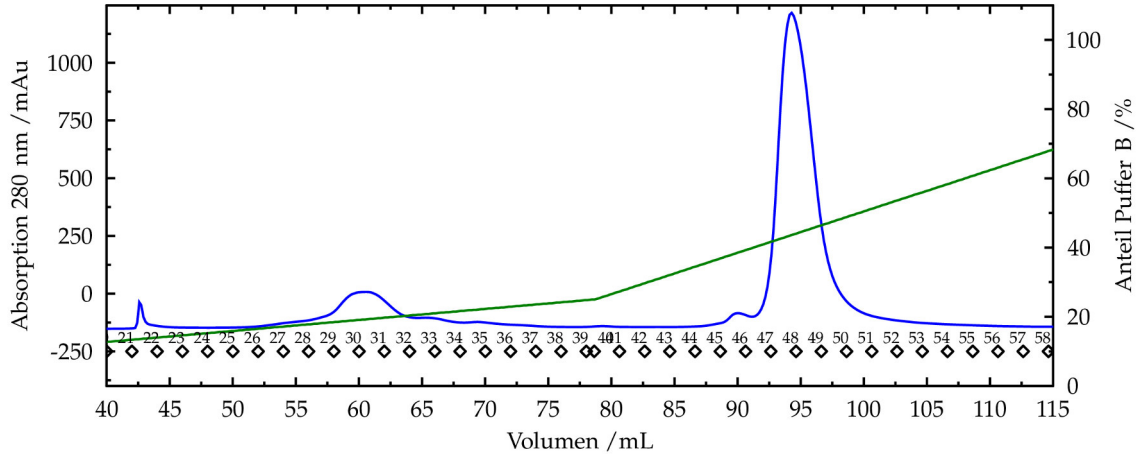
*Abbildung 4.13: SDS-PAGE Analyse der angegebenen Fraktionen der ionenaustauschchromatographischen Reinigung von Synaptobrevin-2 (49–96) (5.63 kDa).*

### 4.1.5 Bildung des $\Delta$ N-Akzeptorkomplexes

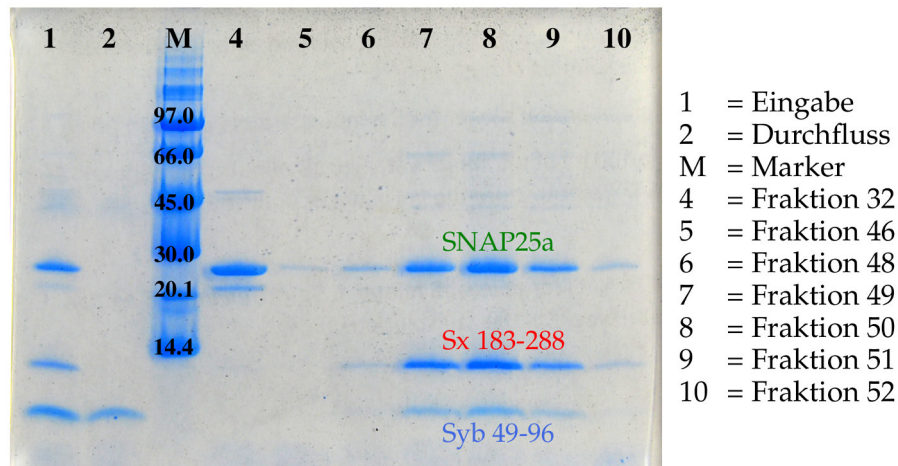
Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurde die Membranfusion durch die Bindung von Synaptobrevin in der Vesikelmembran an den  $\Delta$ N-Komplex in der Zielmembran vermittelt. Aufgrund der sehr starken Bindung der Proteine im SNARE-Komplex konnte der Akzeptorkomplex aus Syntaxin-1A, SNAP-25a und dem Fragment von Synaptobrevin-2 (49–96), welches die Bildung eines 2:1 Komplexes aus Syntaxin-1A und SNAP-25a verhindert, bereits vor der Rekonstitution assembliert werden. Um die Bildung des 2:1-Komplexes während der Herstellung zu unterbinden, wurde SNAP25a im Überschuss (1.5 $\times$ ) eingesetzt. Für die Komplexbildung wurden SNAP-25a (16 mg, 0.8 mg/mL, 20 mL) und Synaptobrevin-2 (49–96) (10.41 mg, 3.47 mg/mL, 3 mL) vermischt und Detergens zugegeben (CHAPS 1% (w/v), finale Konz.). Nach Zugabe von Syntaxin-1A (183–288) (9.5 mg, 1.9 mg/mL, 5 mL) wurde die Mischung über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Es folgte die ionenaustauschchromatographische Reinigung (MonoQ 10/100) (Abb. 4.14). Hierzu wurden die gleichen Puffer wie für die Reinigung von Synaptobrevin-2 (Tab. 4.1, S. 69) verwendet. Die Analyse der Elutionsmaxima im Chromatogramm (Abb. 4.14) zeigte eine erfolgreiche Abtrennung des überschüssigen SNAP25a (Abb. 4.15 4), da es bereits in Fraktion 32 eluierte. Im Durchfluss ist zu erkennen, dass ungebundenes Synaptobrevin-2 (49–96) nicht an die Ionenaustauschmatrix binden kann (Abb. 4.15 2). Da in den Elutionsfraktionen 48–51 alle drei Proteine enthalten waren (Abb. 4.15, 6–9), muss hier von einer Bindung von Synaptobrevin-2 (49–96) an die anderen beiden Proteine ausgegangen werden. Dies ist ein Beweis für die Bildung des  $\Delta$ N-Komplexes. Ein Vergleich mit der Literatur (4.1, S. 64) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der gefundenen Banden. Nach Vereinigung der Fraktionen 49 und 50 konnte eine Ausbeute von 12 mg des Akzeptorkomplexes (3 mg/mL, 4 mL) mittels UV/vis-Spektroskopie (Extinktionskoeffizient (berechnet):  $\epsilon = 24325 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) bestimmt werden.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.14:** Ionenaustauschchromatogramm der Reinigung des  $\Delta N$ -Komplexes. Aufgetragen sind die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (blau), der Anteil an Puffer B (grün) sowie die Fraktionierung (Rauten).



**Abbildung 4.15:** SDS-PAGE Analyse der ionenaustauschchromatographischen Reinigung des  $\Delta N$ -Komplexes (SNAP25a 23.34 kDa, Sx 183-288 12.04 kDa, Sb 49-96 5.63 kDa).

## 4.2 Erzeugung und Charakterisierung proteinhaltiger porenüberspannender Membranen

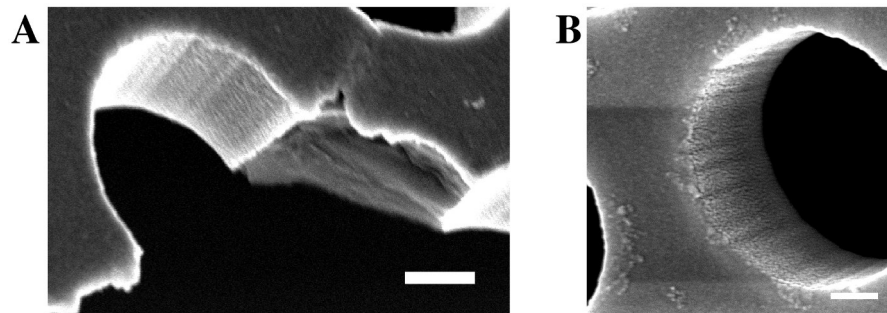
Da die zu Beginn und im Vorfeld dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Präparation porenüberspannender Membranen nur schlecht reproduzierbar waren und zu keiner sicheren Membranbildung führten, mussten die Protokolle in Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern der Abteilung (Jan Kuhlmann, Henrik Neubacher, Dr. Ingo Mey) überarbeitet werden. Es wurden verschiedene Funktionalisierungsstrategien für die verwendeten Porensysteme entwickelt, welche im Folgenden vorgestellt werden sollen. Um die Eigenschaften der erzeugten porenüberspannenden Membranen im Hinblick auf die geplanten Experimente zur Membranfusion näher zu charakterisieren, wurden Mobilitätsmessungen an Lipiden sowie rekonstituierten Proteinen mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy* (FCS)) durchgeführt.

### 4.2.1 Eigenschaften der erzeugten Goldbeschichtungen

Als besonders wichtig für die Bildung porenüberspannender Membranen stellte sich die Wahl einer geeigneten Beschichtungsmethode für das Aufbringen der Goldschicht auf das Substrat heraus. Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, sind für eine erfolgreiche Membranbildung unterschiedliche Eigenschaften der Substratoberfläche im Vergleich zur Poreninnenseite essentiell. Um eine solche Oberflächentopologie zu erreichen, wurde zum einen die Kathodenstrahlzerstäubung (Kapitel 3.2.3, S. 30) und zum anderen die Hochvakuummetallverdampfung (Kapitel 3.2.3, S. 3.2.3) zur Goldbeschichtung verwendet und im Anschluss eine geeignete Funktionalisierung auf die Goldschicht aufgebracht. Die mit Hilfe der beiden Methoden erhaltenen Goldschichten werden im Folgenden genauer charakterisiert.

### Kathodenstrahlzerstäubung

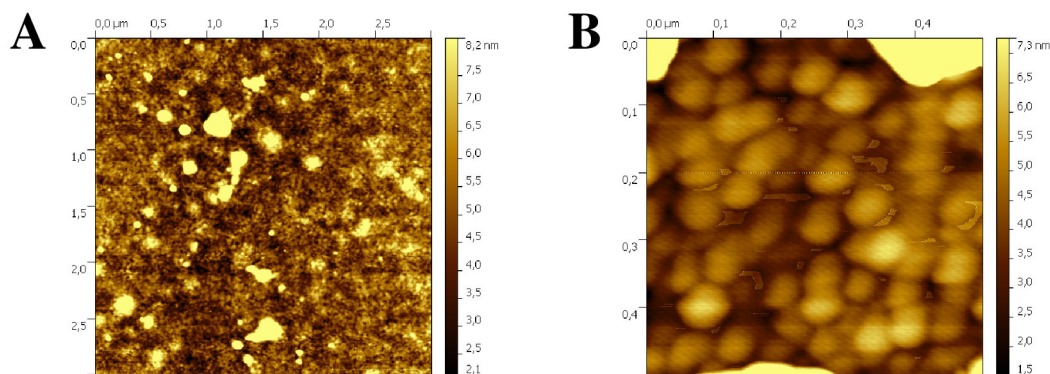
Abbildung 4.16 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mittels Sputtern beschichteten, offenporigen Substrats. Aufgrund der Leitfähigkeit der Goldschicht erscheint diese heller und kann gut vom Siliciumträger unterschieden werden (Abb. 4.16 A). Es zeigt sich, dass die Goldbeschichtung der dreidimensionalen Struktur folgt und die gesamte Porennenseite nahezu vollständig bedeckt ist. Nur die Bruchkante, welche nach der Beschichtung erzeugt wurde, ist nicht mit Gold bedeckt.



**Abbildung 4.16:** Elektronenmikroskopische Abbildung der durch Kathodenstrahlzerstäubung erzeugten Goldbeschichtung eines porösen Substrats. (A) Gebrochenes Substrat. Maßstab 300 nm. (B) Porennenseite. Maßstab 200 nm.

Abbildung 4.17 zeigt eine Analyse der Goldoberfläche mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM). Dabei wird die Oberfläche durch eine Sonde abgetastet, wodurch ihre Topographie anhand einer Farbskala sichtbar gemacht wird.<sup>[96]</sup> Höhere Strukturen sind hier heller dargestellt. In Abb. 4.17 A ist eine Fläche von  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$  abgebildet. Zu erkennen ist eine homogene Bedeckung der Oberfläche mit einer Höhenabweichung unterhalb von 10 nm. Zusätzlich sind einige zufällig verteilte Goldpartikel vorhanden, die in ihrer Größe stark variieren (20–200 nm). Die Detailansicht (Abb. 4.17 B) zeigt, dass der Großteil der Oberfläche mit sphärischen Goldaggregaten mit einem lateralen Durchmesser von 50–100 nm bedeckt ist, deren Höhe im Bereich unterhalb von 5 nm liegt. Im Vergleich zur Dicke der hier verwendeten Lipidmembranen von 3–5 nm<sup>[12]</sup> ist davon auszugehen,

das die Rauheit der Oberfläche ausreichend gering für einen guten Kontakt zur Membran ist.



**Abbildung 4.17:** Rasterkraftmikroskopische Abbildung der durch Kathodenstrahlzerstäubung erzeugten Goldbeschichtung eines Substrats. (A)  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$  (B)  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ .

### Hochvakuummetallverdampfung

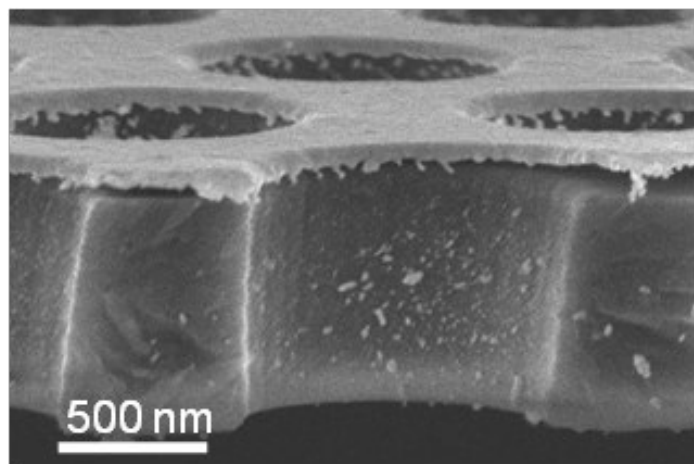
In Abbildung 4.18 ist die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Bruchs durch die poröse Fläche eines bedampften Substrats gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine flächendeckende Beschichtung nur auf der Oberseite erfolgte, die Innenseiten der Poren jedoch nur lückenhaft mit einzelnen Goldpartikeln belegt ist.

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.19 zeigen die Beschaffenheit der aufgedampften Goldschicht. Die Oberfläche ist homogen mit Gold bedeckt, jedoch sind eine Vielzahl von zufällig verteilten, größeren Aggregaten zu erkennen (Abb. 4.19 A). Es finden sich mehr Verunreinigungen als bei der Kathodenstrahlzerstäubung, jedoch erscheint die Beschichtung insgesamt etwas homogener. In der Detailansicht (Abb. 4.19 B) zeigt die Schicht ähnliche Eigenschaften wie die gesputterte mit Höhenunterschieden von maximal 7 nm. Die Oberflächenrauheit ist auch hier ausreichend gering für die Bindung einer Lipidmembran, mit dem Vorteil der selektiven Beschichtung der Substratoberseite.

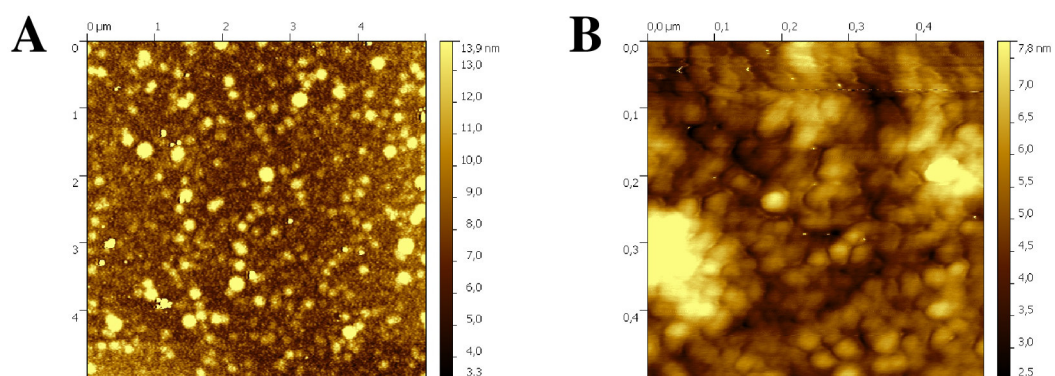


#### 4. Ergebnisse

---



*Abbildung 4.18: Elektronenmikroskopische Abbildung der durch Metallverdampfung erzeugten Goldbeschichtung eines porösen Substrats.*



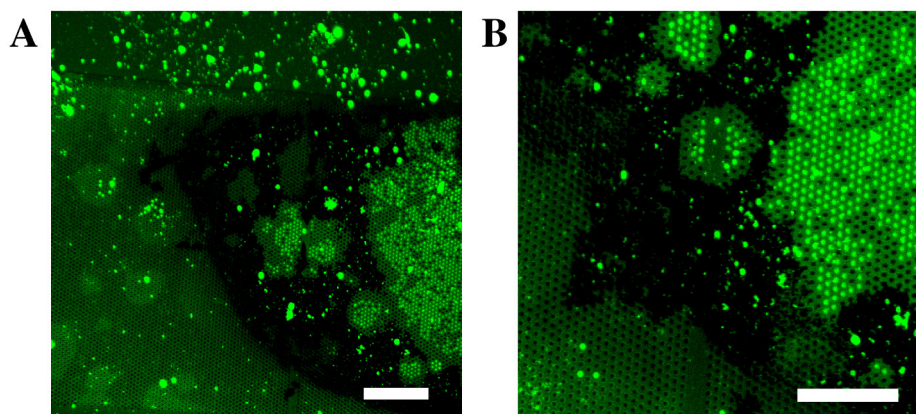
*Abbildung 4.19: Rasterkraftmikroskopische Abbildung der durch Metallverdampfung erzeugten Goldbeschichtung eines porösen Substrats. (A)  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  (B)  $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ .*

## 4.2.2 Funktionalisierungsstrategien für offene poröse Systeme

Allgemeines Ziel der Funktionalisierung ist es, selektiv eine möglichst hohe Affinität der Membranlipide zur Oberseite des Substrats, sowie eine geringe Affinität zur Poreninnenseite zu erhalten um eine reproduzierbare, stabile Ausbildung der Membran zu ermöglichen. Dazu wurden die verschiedenen Funktionalisierungsmethoden mit den verfügbaren Methoden zur Goldbeschichtung kombiniert. Es ergaben sich, neben Anderen, zwei Strategien die sich als besonders erfolgreich für die Membranpräparation erwiesen.

Durch die Zugänglichkeit des offenen porösen Systems von der Rückseite wurde mit Hilfe der Kathodenstrahlzerstäubung die Poreninnenseite mit Gold beschichtet. Dies führt dazu, dass nach der Aktivierung im Sauerstoffplasma die freiliegenden Porenstege stark, die Goldschicht auf der Poreninnenseite jedoch nur mäßig hydrophil sind. Hierdurch besitzt die aufgebrauchte Lipidmembran eine höhere Affinität zu den Porenstegen, sodass sie nach dem Aufplatzen des Riesenvesikels auf den Stegen adhäriert und die Poren überspannt. Abbildung 4.20 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines so behandelten Substrats nach der Zugabe der GUVs. Sowohl in Abb. 4.20 A als auch B ist am linken Bildrand ein Bereich zu erkennen, welcher am Rand des Substrats gelegen ist und bei der Beschichtung nicht durch das Gold erreicht werden konnte. Die grüne Fluoreszenz des lipidgebundenen Farbstoffs bedeckt hier die gesamte Oberfläche des Substrats. Die Poren erscheinen dabei dunkel und können somit nicht mit Membran bedeckt sein. Im rechten Teil der Abbildungen können eindeutig die Umrisse der einzelnen gespreiteten GUVs anhand der Fluoreszenz auf den Porenstegen erkannt werden. Ein Großteil der Poren in diesem Bereich zeigt eine intensive Fluoreszenz, sodass hier von einer Bedeckung durch eine Membran ausgegangen werden kann. Die porenüberspannende Membran erscheint dabei heller als die Stegbereiche, da sie keinen direkten Kontakt zur fluoreszenzlöschenden Oberfläche besitzt.

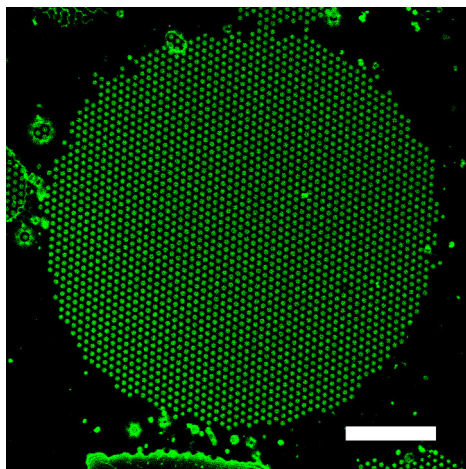
Die porösen Substrate wurden für diese Art der Funktionalisierung zunächst im Argonplasma (1 min) gereinigt und anschließend kopfüber im Rezipienten des



*Abbildung 4.20: Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen gespreiteter Membranen auf einem offenporigen Substrate, dessen Poren von der Rückseite mit Gold beschichtet wurden. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$  (A), 20  $\mu\text{m}$  (B).*

Sputtercoaters platziert. Um eine möglichst diffuse Verteilung der Goldatome in der Prozesskammer zu erreichen, wurde ein Reaktandgasdruck von 0.1 mbar und ein geringer Sputterstrom von 20 mA eingestellt. Es wurde eine Goldschicht von 150 nm Dicke aufgetragen. Da die Poreninnenseiten nicht optimal zugänglich sind, wird hier jedoch nur ein Bruchteil der gemessenen Schichtdicke erreicht. Zuletzt wurde die Substratoberseite im Sauerstoffplasma (30 s) aktiviert und möglichst schnell in Puffer überführt. Nach sofortiger Zugabe von GUVs (20  $\mu\text{L}$ ) wurde für 30 min inkubiert.

Bei der zweiten Methode wurde die Substratoberseite selektiv durch Hochvakuum-Metallverdampfung mit Gold beschichtet und durch Inkubation in einer Thiollösung funktionalisiert. Wie anhand der Abbildung 4.18 zu erkennen ist, kann bei Einsatz eines hydrophil terminierten Thiols auf dem Gold eine stark hydrophile Porenstegfläche erhalten werden. Die unbehandelte Substratoberfläche an den Poreninnenseiten wurde nicht hydrophilisiert, sodass ebenfalls die erforderliche Orthogonalität der Funktionalisierung erreicht wurde. Das Ergebnis des Spreitens von GUVs auf einem Substrat, das auf diese Weise behandelt wurde, ist in Abbildung 4.21 gezeigt.



**Abbildung 4.21:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines gespreiteten Riesenvesikels auf einem offenporigen Substrat, welches mit Gold bedampft und hydrophil funktionalisiert wurde. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

In diesem Fall ist ebenfalls die durch den gespreiteten GUV bedeckte Fläche zu erkennen. Es fällt jedoch auf, dass durch die Goldschicht die Fluoreszenz der Membran auf den Porenstegen vollständig gelöscht wird. Es kann deshalb nicht unterschieden werden, ob ein Bereich mit Membran bedeckt ist oder nicht. Membranüberspannte Poren hingegen zeigen eine intensive Fluoreszenz, sodass die überspannte Fläche anhand des charakteristischen hexagonalen Porenmuster erkennbar wird.

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Funktionalisierungsstrategie ist erkennbar, dass eine deutlich homogenere Bedeckung der Poren durch die Membran, mit nur wenigen Fehlstellen durch Reißen des freistehenden Membranbereichs, vorliegt. Dies lässt auf eine hohe Stabilität der gebildeten Membran schließen. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit diese Funktionalisierungsstrategie bevorzugt eingesetzt. Falls nicht anders angegeben erfolgte die Funktionalisierung der verwendeten Substrate standardmäßig nach folgendem Protokoll.

Zunächst wurden die Substrate im Argonplasma (1 min) gereinigt und in den Rezipienten des Sputtercoaters überführt. Hier wurden sie für 10 s mit Titan besputtert (0.05 mbar, 40 mA), wodurch sich die Haftung des anschließend aufgetragenen

Goldes verbessert. Die Substrate wurden in der Bedampfungsanlage senkrecht unterhalb der Verdampferquelle platziert und die Vakuumkammer bis zu einem Druck von  $1 \times 10^{-6}$  bar (3 h) evakuiert. Die Goldbeschichtung in einer Dicke von  $\approx 30$  nm erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0.5–1.5 nm/s (55–65 A). Nach dem Belüften wurden die Substrate in die frisch hergestellte Thiollösung (1 mM Thiol in *n*-Propanol, 3 mL) überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

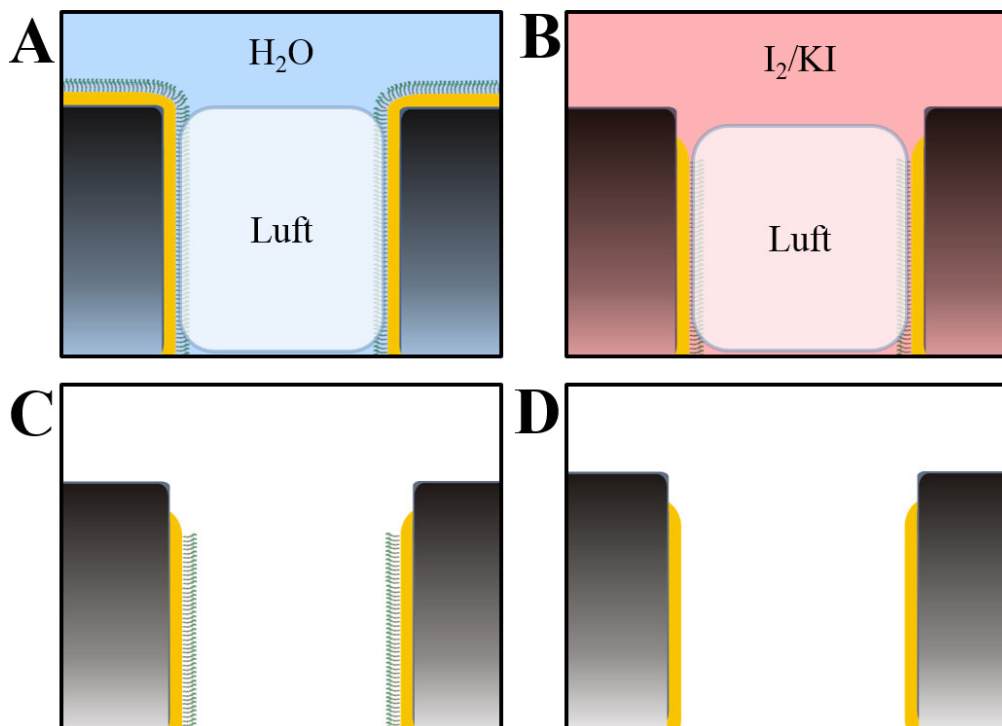
Für die Erzeugung porenüberspannender Membranen wurde ein Substrat aus der Thiollösung entnommen, mit Puffer (30 mL) gespült und möglichst schnell in eine mit Puffer (2.5 mL) gefüllte Messkammer eingesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Substrat stets mit Puffer benetzt war. Sofort im Anschluss wurden 20  $\mu$ L GUV-Lösung auf die Substratoberfläche aufgebracht und für 30 min inkubiert. Die Membranbildung konnte fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

### 4.2.3 Funktionalisierungsstrategien für geschlossenporige Systeme

Die zuletzt vorgestellte Funktionalisierungsstrategie für offene poröse Systeme lässt sich direkt auf die geschlossenen Substrate übertragen, da alle Arbeitsschritte von der Oberseite her erfolgen. Dies führt hier ebenfalls zu einer stabilen und reproduzierbaren Membranbildung.

Nachteil dieser Präparation bleibt jedoch die fluoreszenzlöschende Wirkung der Goldbeschichtung, durch die eine Detektion der Membran auf den Stegen nicht möglich ist. Um dies zu ändern wurde eine Strategie entwickelt, um die Goldbeschichtung selektiv von der Oberfläche der Porenstege zu entfernen. Eine schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

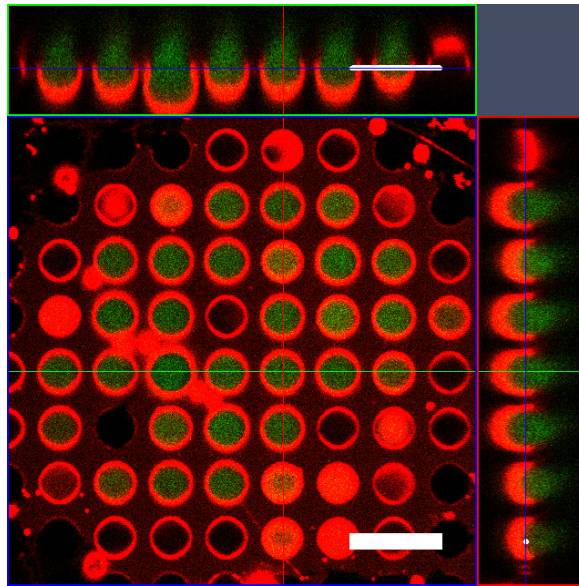
Das Substrat wurde zunächst im Argonplasma (1 min) gereinigt und mit Hilfe des Sputtercoaters mit Gold beschichtet (30 nm, 0.05 mbar, 20 mA). Anschließend wurde es in einer CPEO3-Lösung (1 mM CPEO3 in 3 mL *n*-Propanol) über Nacht bei 4°C inkubiert.



**Abbildung 4.22:** Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Funktionalisierung geschlossener Poren durch Ablösen der Goldschicht auf den Porenstegen. (A) Lufteinschluss in den Poren aufgrund der zuvor erzeugten hydrophoben Oberfläche. (B) Entfernen des Goldes auf den Porenstegen durch Iod/Kaliumiodid-Lösung. (C) Situation nach Spülen und Trocknen des Substrats. (D) Erhaltene Oberflächentopographie nach der abschließenden Aktivierung im Sauerstoffplasma.

Das funktionalisierte Substrat wurde aus der Lösung entnommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Beim Eintauchen in MilliQ-Wasser wurde aufgrund der stark hydrophoben Oberfläche das Wasser am Eindringen in die Poren gehindert und eine Luftblase in den Poren eingeschlossen (Abb. 4.22 A). Durch Zugabe von Iod/Kaliumiodid-Lösung (gesättigt) konnte das Gold gelöst werden. Dies erfolgte jedoch nur dort, wo die Substratoberfläche in Kontakt mit der wässrigen Lösung stand. Die Goldschicht innerhalb der Poren wurde durch die eingeschlossene Luft für eine begrenzte Zeit (etwa 2 min) geschützt (Abb. 4.22 B). Die Iod/Kaliumiodid-Lösung wurde für 90 s auf dem Substrat belassen und im Anschluss mit Wasser und Ethanol gespült. Das erhaltene Substrat (Abb. 4.22 C) wurde zuletzt im Sauerstoffplasma (1 min) aktiviert, sodass eine hydrophile Stegoberfläche erhalten

werden konnte. Durch das auf den Innenseiten der Poren verbliebene Gold ist diese bedeutend weniger hydrophil, sodass beim Spreiten von GUVs die Poren durch die Membran stabil überspannt werden konnten. Abbildung 4.23 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines nach dieser Methode präparierten Substrats auf dem GUVs mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red (1 mol%) gespreitet wurden.



**Abbildung 4.23:** Porenüberspannende Membran auf einem Substrat mit geschlossenen Poren. Oben und rechts ist ein Schnitt in Z-Richtung entlang der indizierten farbigen Linien gezeigt. Der lipidgebundene Farbstoff ist rot (Texas Red), durch die Membran eingeschlossener wasserlöslicher Farbstoff grün (Pyranin) dargestellt. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Vor dem Spreiten der GUVs wurde ein wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff (Pyranin, 20 mM) in die Messkammer gegeben und im Anschluss an die Membranbildung durch Spülen mit Puffer entfernt. Durch Aufnahme mehrerer Bilder entlang der Z-Achse (Z-Stapel) war es möglich einen Querschnitt der Poren zu visualisieren (Abb. 4.23, oberer und rechter Rand). Es zeigt sich, dass der lösliche Farbstoff unter der porenüberspannenden Membran (PSM) in den Poren eingeschlossen und fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden konnte. Dies ist die erste Voraussetzung für die Beobachtung des Vesikelinhalts nach der Fusion mit der PSM. Weiterhin fällt eine starke Auswölbung der PSMs über den Poren auf. Dieser Effekt konnte später, nach eingehenden Untersuchungen durch Gleisner *et al.*, auf einen Osmolaritäts-

unterschied zwischen Pore und dem umgebenden Puffer, hervorgerufen durch die Sucrose aus der GUV-Lösung, zurückgeführt werden.<sup>[89]</sup> Durch den osmotischen Druck in der Pore strömt Wasser entgegen der vorherrschenden Membranspannung ein und deformiert die PSM, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht wird.

### 4.2.4 Diffusionsverhalten von Lipiden und Proteinen in porenüberspannenden Membranen

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von Fusionsexperimenten auf porenüberspannenden Membranen ist die Mobilität der an der Fusion beteiligten Proteine in der Membran. Zum einen müssen für eine erfolgreiche Fusion das in den Vesikeln lokalisierte Synaptobrevin mit dem  $\Delta$ N-Akzeptorkomplex in der PSM in Kontakt kommen und zum anderen müssen für ein Fusionsereignis mehr als ein SNARE-Komplex ausgebildet werden.<sup>[97]</sup> Eine freie Diffusion der  $\Delta$ N-Komplexe, zu dem Ort an dem der Vesikel mit der PSM in Kontakt tritt, ist daher zwingend erforderlich. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine zur Bestimmung ihrer Mobilität, kann zusätzlich der Erfolg der Rekonstitution in die PSM direkt überprüft werden.

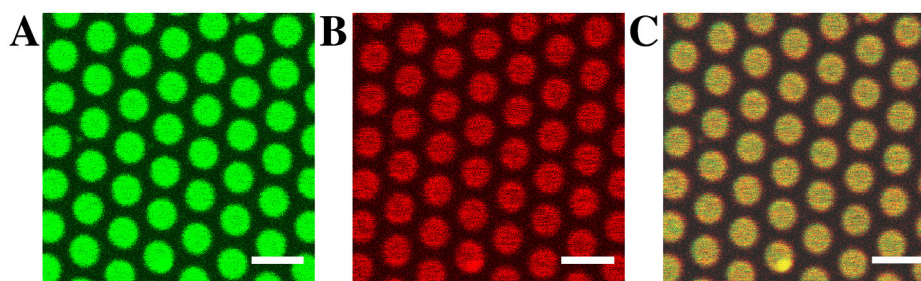
Da das für den  $\Delta$ N-Akzeptorkomplex verwendete SNAP25a nicht über die im biologischen System vorhandenen Palmitoylseitenketten, welche es an die Membran binden, verfügt, ist der Komplex ausschließlich durch die Transmembrandomäne des Syntaxins in der PSM verankert. Daher wurde für die Mobilitätsbestimmung zunächst ein fluoreszenzmarkiertes synthetisches Analogon der transmembranständigen  $\alpha$ -Helix (Atto647N-Syntaxin 1A-TMD, 0.0055 mol%, 1:18000 Peptid/Lipid-Verhältnis) eingesetzt.

Das Diffusionsverhalten von Lipiden und Proteinen in PSM wurde mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) in Kooperation mit Dragomir Milovanovic (Abteilung Jahn, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,



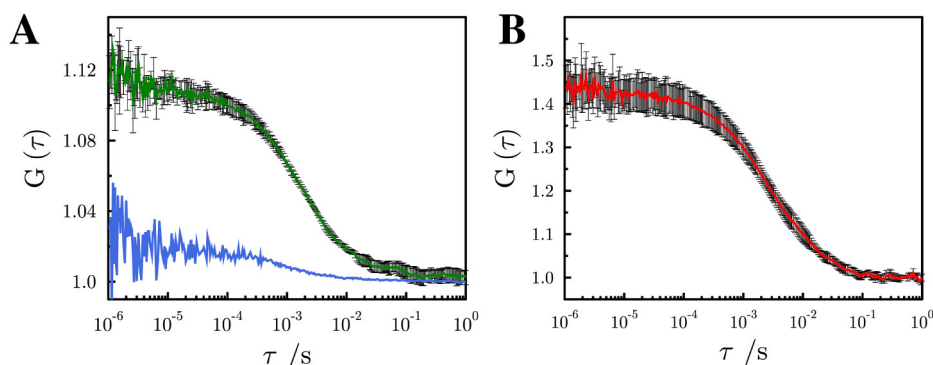
Göttingen) untersucht. Der theoretische Hintergrund, sowie die Durchführung der Messungen sind in Kapitel 3.6.2 dargestellt.

Abbildung 4.24 zeigt während der FCS-Messungen aufgenommene Bilder der PSM. Es ist zu erkennen, dass sowohl der lipidgebundene Fluoreszenzfarbstoff (Atto488-DPPE, 0.01 mol%, 1:10000 Farbstoff/Lipid-Verhältnis), als auch die markierte Transmembrandomäne des Syntaxins homogen in der Membran verteilt vorliegt. Dies belegt die erfolgreiche Inkorporation des Peptids mittels der verwendeten Methode.



**Abbildung 4.24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der rekonstituierten Transmembrandomäne von Syntaxin 1A in porenüberspannenden Membranen. Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale des lipidgebundenen Farbstoffs Atto488-DPPE (A, 0.01 mol%, grün), der mit Atto647N markierten synthetischen Transmembrandomäne von Syntaxin 1A (B, 0.0055 mol%, rot), sowie eine Überlagerung beider Signale (C). Maßstab: 3  $\mu\text{m}$ .

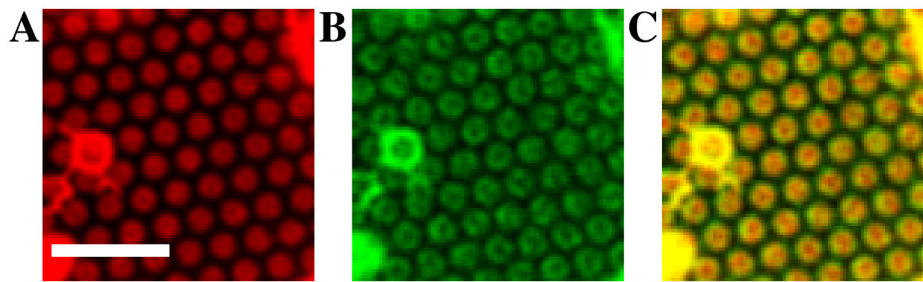
Die bei den Messungen erhaltenen Autokorrelationskurven nach Gleichung 3.2 (Kapitel 3.6.2, S. 56) sind in Abbildung 4.25 gezeigt. Die Anpassung von Gleichung 3.3 (Kapitel 3.6.2, 56) liefert für den lipidgebundenen Farbstoff Atto488-DPPE einen Diffusionskoeffizienten von  $7.7 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Abb. 4.25 A) und stimmt damit gut mit den in der Literatur angegebenen Koeffizienten für die Lipiddiffusion in GUVs,<sup>[98]</sup> sowie freistehenden Membranen<sup>[82]</sup> (*black lipid membranes*, BLMs) überein. Zusätzlich ist in Abb. 4.25 A eine Messung im Bereich der Porenstege gezeigt (blaue Kurve). Ihr Verlauf verdeutlicht, dass die Fluoreszenzintensität, aufgrund der Löschung durch das Gold auf der Stegoberfläche, zu gering für eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten war. Eine Anpassung von Gleichung 3.3 führt hier zu keinem sinnvollen Ergebnis.



**Abbildung 4.25:** Autokorrelationskurven der FCS-Messungen der Syntaxin 1A-Transmembrandomäne bei Anregungswellenlängen von 488 nm (A, Atto488-DPPE, grün) und 633 nm (B, Atto647N-Syntaxin 1A-TMD, rot). Die blaue Kurve in A repräsentiert eine Messung auf dem Stegbereich, welche aufgrund der starken Fluoreszenzlöschung nicht analysiert werden konnte.

Für die Transmembranhelix des Syntaxins wurde ein Diffusionskoeffizient von  $3.4 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ermittelt (Abb. 4.25 B). Dieser liegt etwas höher als der von Bacia *et al.* für die Diffusion von Syntaxin 1A in GUVs angegebene Koeffizient von  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .<sup>[71]</sup> Die leichte Erhöhung war jedoch durch die fehlenden cytosolischen Anteile des Syntaxins zu erwarten.

Zusätzlich wurden die FCS-Messungen für das vollständige Syntaxin 1A in Zusammenarbeit mit Raphael Hubrich wiederholt. Hierbei wurde eine Alexa488 markierte Variante von Syntaxin 1A mit einer Konzentration von 0.2 mol% (1:500 Protein/Lipid-Verhältnis) sowie der lipidgebundene Fluoreszenzfarbstoff KK114-DPPE in einer Konzentration von 0.01 mol% (1:10000 Farbstoff/Lipid-Verhältnis) verwendet. Die Proteinrekonstitution erfolgte nach der Methode, welche in Kapitel 3.3 eingehend vorgestellt wird. Die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 4.26) zeigen den Erfolg der Rekonstitution, wobei eine inhomogene Verteilung des Proteins auffällt. Zurückzuführen ist dies auf homotypische Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den SNARE-Bindungsmotiven der Syntaxinmoleküle, wodurch Cluster gebildet werden.<sup>[99,100]</sup> Da die Cluster aufgrund ihrer Größe bedeutend langsamer diffundieren, konnte dennoch ein Diffusionskoeffizient für das freie Syntaxin bestimmt werden.

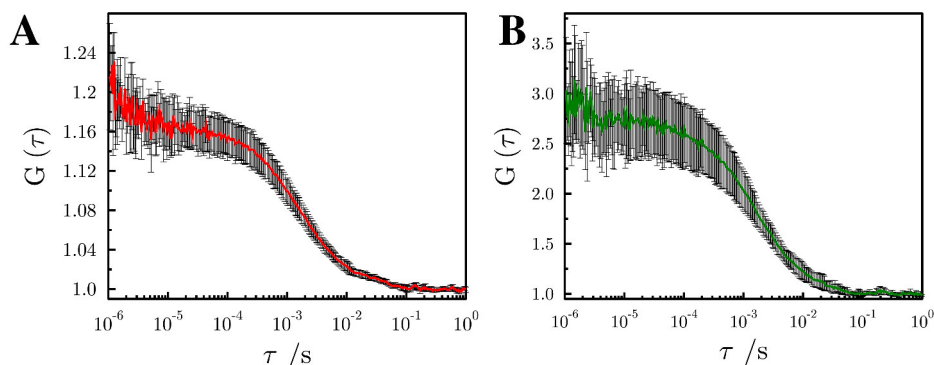


**Abbildung 4.26:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Syntaxin 1A in porenüberspannenden Membranen. Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale des lipidgebundenen Farbstoffs KK114-DPPE (A, 0.01 mol%, rot), des mit Atto488 markierten Syntaxins 1A (B, 0.2 mol%, grün), sowie eine Überlagerung beider Signale (C). Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ .

Die Autokorrelationskurven der FCS-Messungen sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Die Anpassung von Gleichung 3.3 (Kapitel 3.6.2, S. 56) ergibt einen Diffusionskoeffizienten von  $7.4 \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für die Lipiddiffusion (Abb. 4.27 A, KK114-DPPE, rot). Die Diffusionskoeffizienten für die unterschiedlich markierten Lipide liegen damit beide innerhalb der Fehlergrenzen. Es konnte somit kein Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs auf die Diffusion des Lipidankers in der Membran festgestellt werden.

Der Koeffizient für Atto488-Syntaxin 1A liegt bei  $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Abb. 4.27 B, grün) und stimmt damit sehr gut mit dem Wert von Bacia *et al.* überein.<sup>[71]</sup> Dies bestätigt, dass das Diffusionsverhalten von Lipiden und Proteinen mit dem in der Membran eines GUVs übereinstimmt. Dieses Ergebnis unterstreicht die gute Eignung der porenüberspannenden Membranen als Modellsystem für die Untersuchung der Membranfusion.

Wie oben beschrieben konnte anhand der FCS-Messungen, aufgrund der starken Fluoreszenzlöschung auf den Porenstegen, jedoch nicht geklärt werden, in wie weit die Proteine in der Lage sind diese zu überqueren. Hierzu wurden *fluorescence loss in photobleaching* (FLIP)-Messungen durchgeführt. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe in einem kleinen Bereich eines Membranpatches über eine längere Zeit durch starke Belichtung gebleicht. Fällt nun die Fluoreszenzintensität der gesamten Membran, kann von einem Austausch von gebleichten und nicht



**Abbildung 4.27:** Autokorrelationskurven der FCS-Messungen des Syntaxin 1A bei Anregungswellenlängen von 633 nm (A, KK114-DPPE, rot) und 488 nm (B, Atto488-Syntaxin 1A, grün).

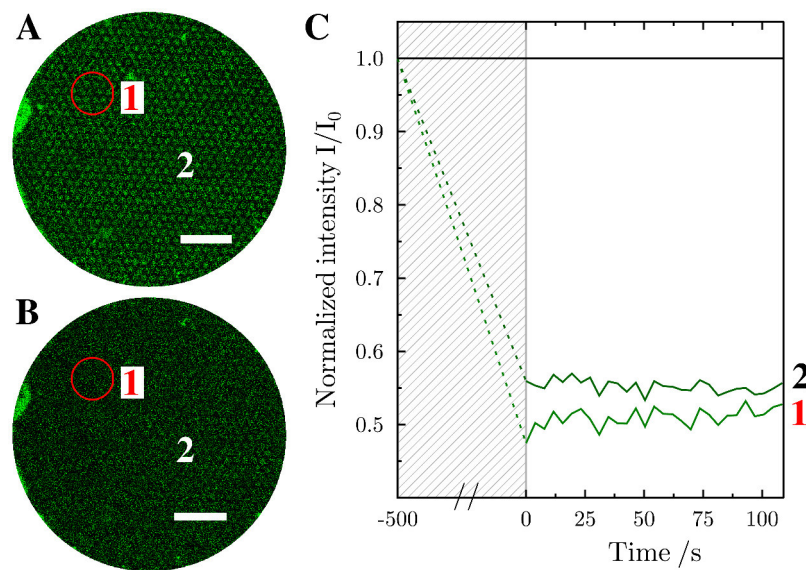
gebleichten Molekülen zwischen dem Bleichfleck und der umgebenden Membranfläche ausgegangen werden. Hierzu müssen die fluoreszenzmarkierten Moleküle die Porenstege überqueren.

Abbildung 4.28 und 4.29 zeigen das FLIP-Experiment für das fluoreszenzmarkierte Lipid Atto488-DPPE sowie für die Transmembrandomäne von Syntaxin 1A (Atto647N-Syntaxin 1A-TMD). Die porenüberspannende Membran wurde hierfür analog zu den FCS-Experimenten präpariert, mit Ausnahme einer höheren Peptidkonzentration (1:6000, Peptid/Lipid). Die Experimente wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserrastermikroskops (CLSM, vergl. Kapitel 3.6.1) durchgeführt. Das Bleichen der Farbstoffe erfolgte im markierten Bereich 1 durch gleichzeitiges Belichten mit Lasern der Wellenlängen 488 nm und 633 nm über eine Zeit von 500 s. Die Membran wurde vor dem Bleichen sowie im Anschluss für weitere 100 s abgebildet.

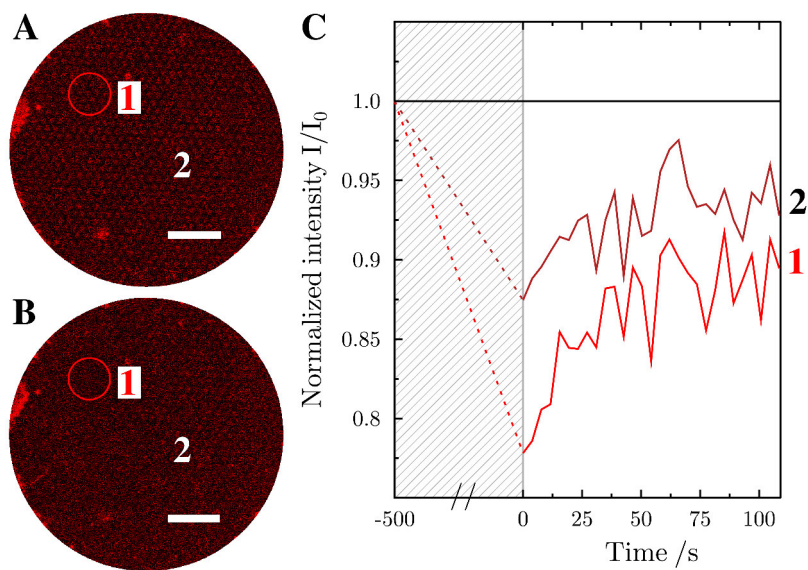
In Abbildung 4.28 und 4.29 ist jeweils ein Membranpatch vor (A) und nach (B) dem Bleichen gezeigt, sowie der normalisierte Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität innerhalb der Bereiche 1 (Bleichfleck) und 2 (gesamter Membranpatch) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die mittlere Intensität nach dem Bleichen sowohl im Bleichfleck, als auch im gesamten Membranbereich abgenommen hat. Dies ist im Fall des Lipids deutlich ausgeprägter (Abfall auf 0.53 der Ausgangsintensität) als für das Peptid (Abfall auf 0.93). Zurückzuführen ist dieses Verhalten auf die stark un-

#### 4. Ergebnisse

terschiedlichen Laserleistungen (Argonionenlaser 488 nm = 25 mW, Helium-Neon-Laser 633 nm = 5 mW), die geringere Ausgangsintensität des peptidgebundenen Farbstoffs, sowie die höhere Stabilität des roten Fluoreszenzfarbstoffs. Dennoch bestätigen die Experimente, dass sowohl der lipidgebundene Fluoreszenzfarbstoff als auch die Transmembrandomäne des Syntaxins in der Lage sind die Porenstege zu überqueren.



**Abbildung 4.28:** Fluoreszenzmikroskopische Abbildung der mit Atto488-DPPE dotierten poren-überspannenden Membran (Bereich 2) vor (A) und nach (B) dem Bleichen ( $t_{\text{bleich}} = 500$  s) von Bereich 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . (C) Mittlere Intensitätsverläufe in Bereich 1 und 2 normalisiert auf einen Referenzbereich ( $I_0(t)$ ) innerhalb eines anderen Membranpatches der vollständigen Abbildung.



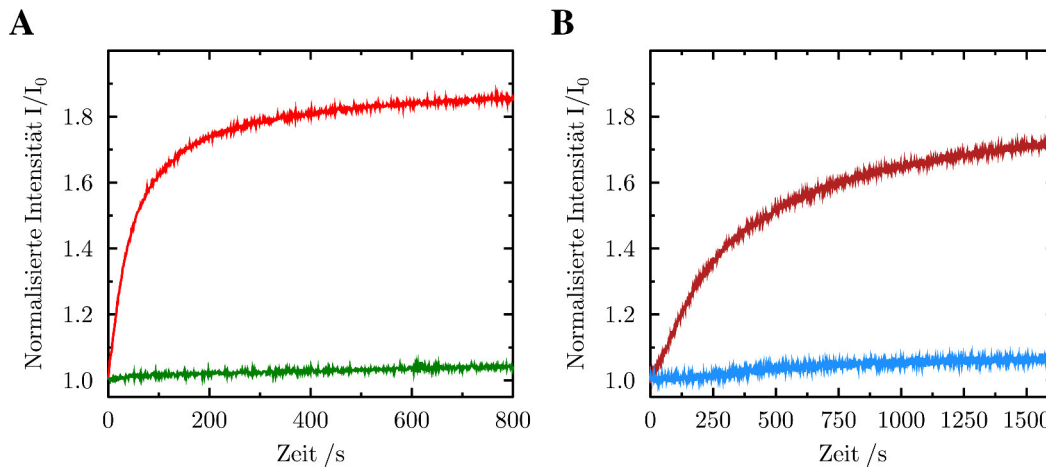
**Abbildung 4.29:** Fluoreszenzmikroskopische Abbildung der mit Atto647N-Syntaxin 1A-TMD dotierten porenüberspannenden Membran (Bereich 2) vor (A) und nach (B) dem Bleichen ( $t_{\text{bleich}} = 500$  s) von Bereich 1. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$ . (C) Mittlere Intensitätsverläufe in Bereich 1 und 2 normalisiert auf einen Referenzbereich ( $I_0(t)$ ) innerhalb eines anderen Membranpatches der vollständigen Abbildung.

### 4.3 Rekonstitution der SNARE-Proteine in große und riesige Vesikel

Der Nachweis für eine funktionelle Rekonstitution der SNARE-Proteine in Vesikel wurde mit Hilfe von Fusionsexperimenten in Lösung erbracht. Hierzu wurden zwei Vesikelpopulationen, wovon eine mit Oregon Green und die jeweils andere mit Texas Red dotiert waren, in einer Küvette zusammengegeben. Die Vermischung der Lipide, als Folge der Fusion, konnte anhand des FRET-Effekts zwischen Oregon Green (Donor) und Texas Red (Akzeptor) verfolgt werden (vergl. Kapitel 3.1.2, S. 20). Die Rekonstitution der SNARE-Proteine in die unterschiedlich großen Vesikel wurde in Kapitel 3.3 (S. 37) beschrieben. Die Vesikel, in die der  $\Delta$ N-Akzeptorkomplex eingebracht wurde, enthielten dabei den lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green, die Vesikel mit rekonstituiertem Synaptobrevin-2 den Farbstoff Texas Red. Die Durchführung der Fusionsexperimente in Lösung ist in Kapitel 3.1.5 (S. 26) dargestellt.

Abbildung 4.30 zeigt die Verläufe der Fluoreszenzintensität des FRET-Akzeptorfluorophors normiert auf die Ausgangsintensität nach der Zugabe der zweiten Vesikelpopulation ( $I_0 = I(t = 0)$ ). In Abb. 4.30 A ist ein Experiment mit den zunächst hergestellten SUVs gezeigt (rote Kurve). Die Akzeptorfluoreszenz steigt hierbei bereits innerhalb der ersten 100 s stark an und erreicht bis zum Ende der Messung das 1.85 fache des Ausgangswerts. Um zu ermitteln ob der beobachtete Anstieg auf die Aktivität der enthaltenen SNARE-Proteine zurückzuführen ist wurde ein Blindexperiment durchgeführt. Hierzu wurden die Vesikel mit dem  $\Delta$ N-Akzeptorkomplex vor der Messung mit der löslichen SNARE-Bindungssequenz von Synaptobrevin-2 (AS 1-96) inkubiert. Durch die Bindung an den Akzeptorkomplex, wird dieser für eine weitere Bindung von Synaptobrevin-2 aus der zweiten Vesikelpopulation blockiert. Der Anstieg der Texas Red Fluoreszenz konnte in diesem Experiment nahezu vollständig unterbunden werden (grüne Kurve). Dieses Ergebnis bestätigt,

dass die funktionelle Rekonstitution erfolgreich war, da eine Fusion der Vesikel nur durch die Aktivität der SNARE-Proteine möglich war.



**Abbildung 4.30:** Fluoreszenzspektroskopische Messung der Intensität der Akzeptorfluoreszenz (Texas Red) über die Zeit. (A) Fusion von SUVs mit rekonstituierten SNARE-Proteinen (rot). Blindexperiment mit blockiertem  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex (grün). (B) Fusion von GUVs, dotiert mit dem  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex, mit LUVs, dotiert mit Synaptobrevin-2 (dunkelrot). Blindexperiment mit blockiertem  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex (blau). Die Intensitätswerte wurden normiert auf  $I_0 = I(t = 0)$ .

In Abb. 4.30 B ist das Ergebnis eines Experiments mit GUVs und LUVs gezeigt, welche im Verlauf des Rekonstitutionsprotokolls aus proteinhaltigen SUVs hergestellt wurden. Auch hier ist ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz zu beobachten (dunkelrote Kurve). Der Anstieg verläuft jedoch deutlich langsamer. Das Blindexperiment zeigt, dass die Fusion durch die Blockierung des Akzeptorkomplexes vollständig verhindert werden konnte (blaue Kurve). Eine funktionelle Rekonstitution der SNARE-Proteine in die, für die anschließenden Fusionsexperimente auf porenüberspannenden Membranen benötigten, Vesikel konnte somit bestätigt werden.



### 4.4 Detektion SNARE-Protein vermittelter Membranfusion einzelner Vesikel auf porenüberspannenden Membranen

Die bis zu diesem Punkt erbrachten Ergebnisse schaffen die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Untersuchung SNARE-vermittelter Fusion auf porenüberspannenden Membranen. Es konnte gezeigt werden, dass die heterolog expremierten SNARE-Proteine (Kapitel 4.1) funktional in Vesikel unterschiedlicher Größe rekonstituiert werden konnten (Kapitel 4.3). Weiterhin wurden Funktionalisierungsstrategien für die zur Verfügung stehenden porösen Substrate entwickelt, die eine reproduzierbare Präparation porenüberspannender Membranen ermöglichen (Kapitel 4.2). Die Mobilität von Lipiden und Proteinen innerhalb der porenüberspannenden Membranen wurde anhand von FCS-Experimenten untersucht und eine Diffusion innerhalb der Poren, sowie über die Porenstege hinweg nachgewiesen (Kapitel 4.2.4).

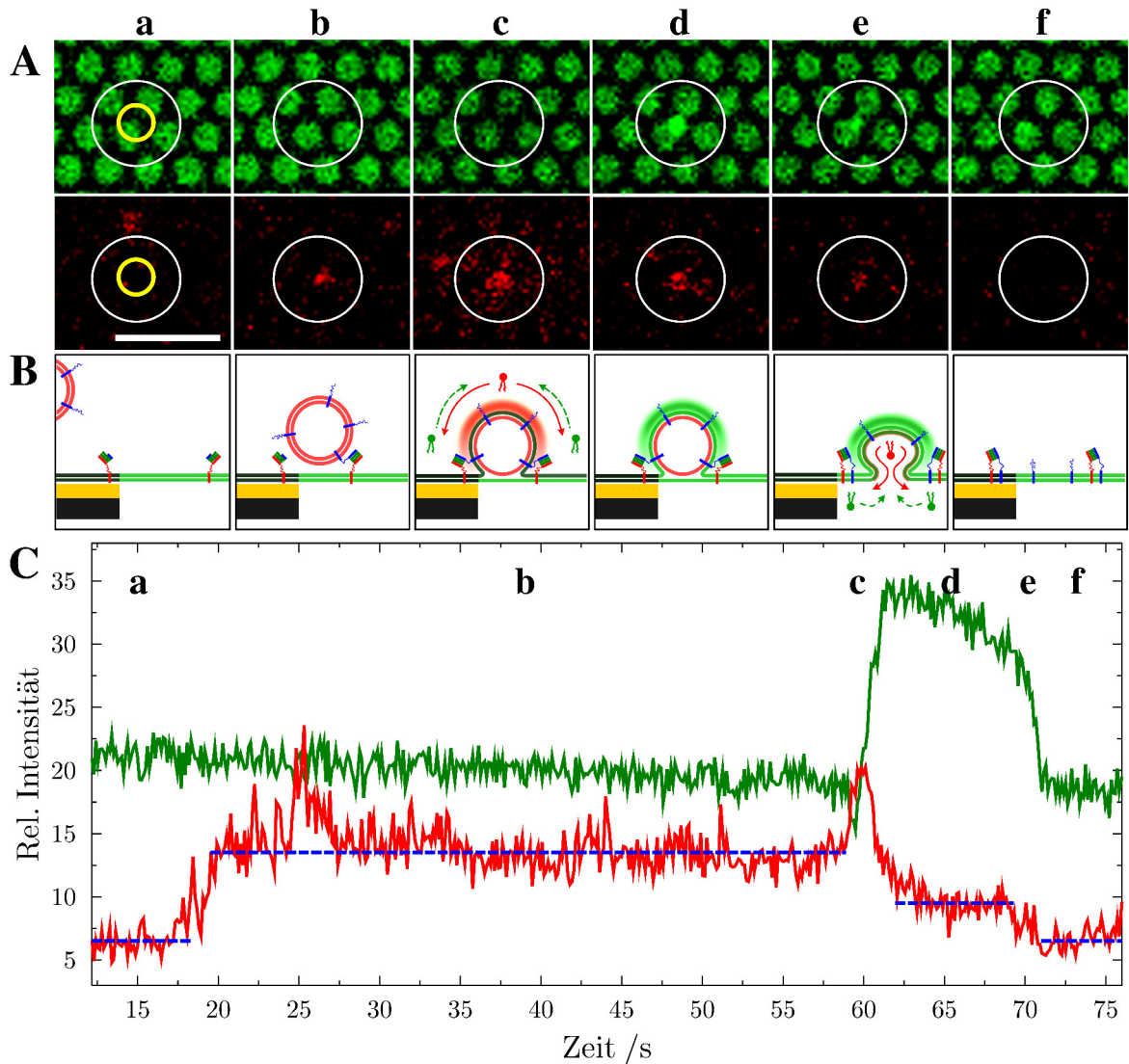
Für die Beobachtung einzelner Vesikelfusionsereignisse wurden porenüberspannende Membranen durch Spreiten von GUVs auf hydrophil funktionalisierten porösen Substraten erzeugt. Die Substrate besaßen eine offene poröse Struktur mit einem Porendurchmesser von  $1.2\ \mu\text{m}$  und wurden mit Hilfe der Hochvakuummetallverdampfung mit Gold beschichtet (Kapitel 4.2.2). Auf die Goldbeschichtung wurde eine hydrophile Funktionalisierung durch Chemisorption von 1-Mercaptohexan-6-ol aufgebracht. Die verwendeten GUVs (DOPC/POPE/POPS/Cholesterin, 5:2:1:2) waren mit Oregon Green (1 mol%) dotiert und enthielten den rekonstituierten  $\Delta\text{N}$ -Akzeptorkomplex in einem Protein zu Lipid Verhältnis von 1:1000 (Kapitel 3.3, S. 37).

Das Spreitergebnis wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die porenüberspannenden Membranbereiche (*Membran-Patches*) besaßen Durchmesser zwischen 10 und  $150\ \mu\text{m}$ , je nach Größe des gespreiteten Vesikels. Für die Aufnahme einer

Zeitreihe wurden Patches gewählt, welche größer als die beobachtete Fläche von  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  waren, sodass die gesamte Bildfläche mit Membran bedeckt war. Hierdurch wurde eine Detektion von Vesikeln, welche unspezifisch auf nicht mit Membran bedeckte Bereiche der Substratoberfläche adsorbierten, verhindert. Direkt vor dem Start der Aufnahme wurden Texas Red (1 mol%) dotierte LUVs ( $0.5 - 1 \mu\text{L}$ ) auf die Membran gegeben (vergl. Kapitel 3.7, S. 58). Die LUVs (DOPC/POPE/POPS/Cholesterin, 5:2:1:2) enthielten rekonstituiertes Synaptobrevin-2 in einem Protein zu Lipid Verhältnis von 1:1000 (Kapitel 3.3). Es wurden pro Zeitserie 2500 Bilder über einen Zeitraum von 306 s aufgenommen (Kapitel 3.6.1). Die Detektion erfolgte spektral getrennt im grünen (Oregon Green, porenüberspannende Membran) sowie roten (Texas Red, Vesikel) Kanal.

Während einer Zeitserie konnte beobachtet werden, wie die Vesikel frei über der Membranoberfläche diffundierten. Kamen Vesikel mit der Membran in Kontakt konnten sie an diese binden (*Docking*) und im weiteren Verlauf mit ihr fusionieren. In Abbildung 4.31 A ist eine Bildabfolge eines einzelnen Fusionsereignisses gezeigt, die alle charakteristischen Eigenschaften eines solchen Ereignisses beinhaltet. Zusätzlich sind die Intensitätsverläufe des grünen und roten Kanals über die Zeit dargestellt (Abb. 4.31 C). Diese wurden durch Integration der Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer kreisförmigen *region of interest* (ROI) um den Schwerpunkt des Vesikels erhalten (gelber Kreis in Abb. 4.31 A a). Die einzelnen Bilder in Abb. 4.31 A (a – f) wurden entsprechend der markanten Punkte im Intensitätsverlauf (4.31 C a – f) gewählt. Zuletzt sind in Abbildung 4.31 B die für die Zeitpunkte a – f postulierten Zwischenstufen der Fusion schematisch dargestellt. Die Membranen sind dabei entsprechend dem enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die Diffusion der Farbstoffe während der Fusion ist mit Hilfe von Pfeilen angedeutet.

Zum Zeitpunkt a ist der Vesikel noch nicht innerhalb der ROI und die Fluoreszenzintensitäten liegen auf einem konstanten Niveau, ihrer jeweils individuellen Basislinie. Der Vesikel diffundiert in die ROI und bindet an die Membran. Dies führt zu einem sprunghaften Anstieg der Intensität im roten Kanal auf ein hohes Niveau



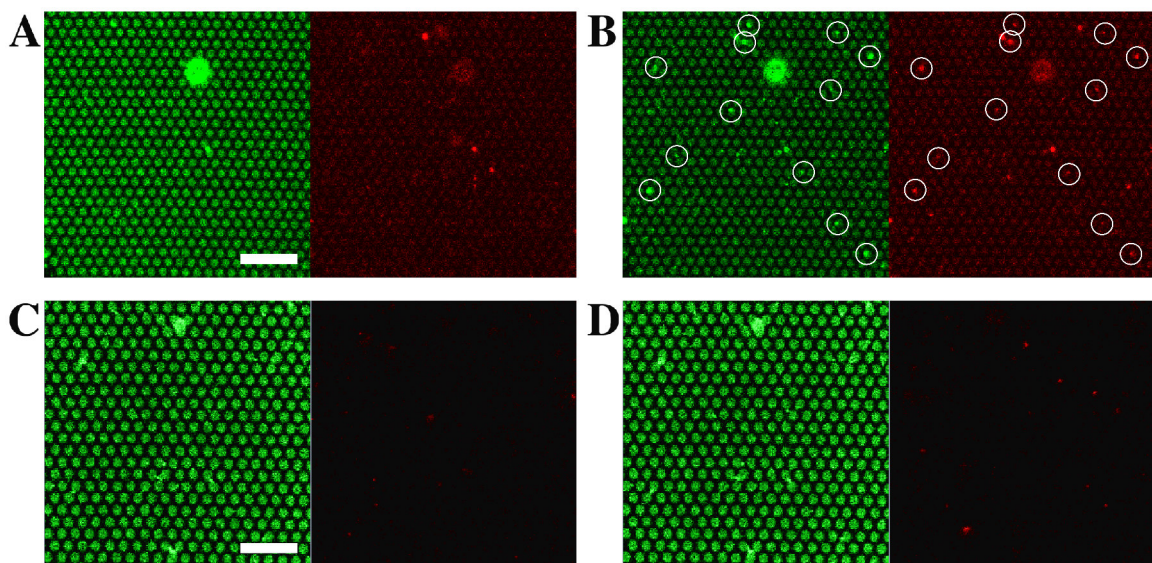
**Abbildung 4.31:** (A) Zeitliche Abfolge von Fluoreszenzbildern der Fusion eines einzelnen, Synaptobrevin-2 dotierten Vesikels mit einer porenüberspannenden Membran, welche den  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex enthielt. Dargestellt sind die Oregon Green Fluoreszenz der Membran (oben) sowie die Texas Red Fluoreszenz des Vesikels (unten). Die weißen Kreise markieren den Bereich in dem das Ereignis stattfindet, der gelbe Kreis in a entspricht der Fläche aus der die zeitlichen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten ausgelesen wurden die in (C) dargestellt sind. Maßstab = 5  $\mu\text{m}$ . (B) Schematische Darstellung der postulierten Fusionszwischenstufen zum Zeitpunkt der Bildaufnahme. Die Membranen wurden dem enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff entsprechend gefärbt. (C) Zeitlicher Verlauf der relativen Intensitäten der Oregon Green (grün) und Texas Red (rot) Fluoreszenz während des Fusionsereignisses. (a–f) Zeitpunkte der Bildaufnahme in (A). Die gestrichelten blauen Linien sollen die drei unterschiedlichen Intensitätsniveaus verdeutlichen.

(b). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Vermischung der Lipide auftritt, verbleibt die Intensität des grünen Kanals auf der Basislinie. Die Intensitäten blieben bis zum Einsetzen der Fusion konstant (gedockter Zustand). Zum Zeitpunkt der Fusion (c) verbinden sich die äußeren Lipidschichten der porenüberspannenden und der Vesikelmembran. Hierbei vermischen sich die Lipide, sodass es zu einem FRET zwischen Oregon Green und Texas Red kommen kann. Dies ist in den Intensitätsverläufen durch einen Anstieg der Intensität des roten und einen gleichzeitigen Abfall des grünen Kanals zu erkennen (Abb. 4.31 C c). In den Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4.31 A c kann ein leichtes Aufleuchten des Vesikels und eine leichte Verdunklung der umgebenden Poren erkannt werden. Der rote Fluoreszenzfarbstoff diffundiert dabei aus der äußeren Schicht der Vesikelmembran heraus und verteilt sich in der porenüberspannenden Membran, während der grüne Fluoreszenzfarbstoff in die äußere Lipidschicht des Vesikels hinein diffundiert (Abb. 4.31 B c). Durch den Verlust des roten Farbstoffs fällt die Intensität im roten Kanal nach einem kurzen Anstieg auf ein Niveau zwischen dem gedockten Zustand und der Basislinie ab. Der Eintrag des grünen Farbstoffs führt zu einem Anstieg der grünen Fluoreszenz innerhalb des ROIs (Abb. 4.31 C d). In den Fluoreszenzbildern ist zu erkennen, dass der Vesikel nun auch im grünen Kanal sichtbar ist (Abb. 4.31 A d). Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um eine Zwischenstufe der Fusion handelt in der die innere Lipidschicht des Vesikels noch intakt ist und nur die äußeren Lipidschichten der Membranen verbunden sind (hemifusionierter Zustand). Der Vesikel bleibt in diesem Zustand für eine Zeit stabil. Verbinden sich auch die inneren Lipidschichten kommt es zu einem vollständigen Verlust des roten Farbstoffs und die dreidimensionale Struktur des Vesikels geht in die planare, porenüberspannende Membran über, wodurch die Intensitäten in beiden Fluoreszenzkanälen wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehren (e – f).

Um die Abhängigkeit der beobachteten Ereignisse von der Funktionalität der enthaltenen SNARE-Proteine nachzuweisen wurden Blindexperimente durchgeführt. Zunächst wurde, analog zu den Vesikelfusionsexperimenten in Lösung (Kapitel

#### 4. Ergebnisse

4.3), der  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex durch Inkubation der GUVs (30 min) vor dem Spreiten mit der löslichen SNARE-Bindungssequenz von Synaptobrevin-2 (AS 1–96) blockiert. Das Ergebnis diese Experiments ist in Abbildung 4.32 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung ist die beobachtete Fläche eines Fusionsexperiments mit funktionellen SNARE-Proteinen vor (A) und nach (B) der Aufnahme der Zeitserie gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass zu Beginn nur wenige rote Vesikel auf der Oberfläche zu finden sind. Am Ende der Zeitserie sind viele Vesikel auf der Oberfläche gedockt, von denen einige auch Fluoreszenz im grünen Kanal aufweisen und sich somit in einem hemifusionierten Zustand befinden (weiße Kreise). Die Aufnahmen zu Beginn und am Ende des Blindexperiments weisen nahezu keinerlei Fluoreszenz im roten Kanal auf. Im Verlauf des Experiments diffundierten die Vesikel über die Oberfläche zeigten aber keine Interaktion mit der porenüberspannenden Membran. Es sind keine Veränderungen im grünen Fluoreszenzkanal zu erkennen.



**Abbildung 4.32:** Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen der beobachteten Membranfläche vor (A) und nach (B) der Durchführung eines Fusionsexperiments. Die weißen Kreise markieren Vesikel die sich im hemifusionierten Zustand befinden und somit ein beiden Fluoreszenzkanälen sichtbar sind. (C) und (D) zeigen Aufnahmen eines Experiments mit blockiertem  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex (siehe Text). Jeweils links ist die Fluoreszenz von Oregon Green und rechts die des Texas Red abgebildet. Maßstab = 7  $\mu\text{m}$  (Porendurchmesser A/B = 1.2  $\mu\text{m}$ , C/D = 2  $\mu\text{m}$ ).

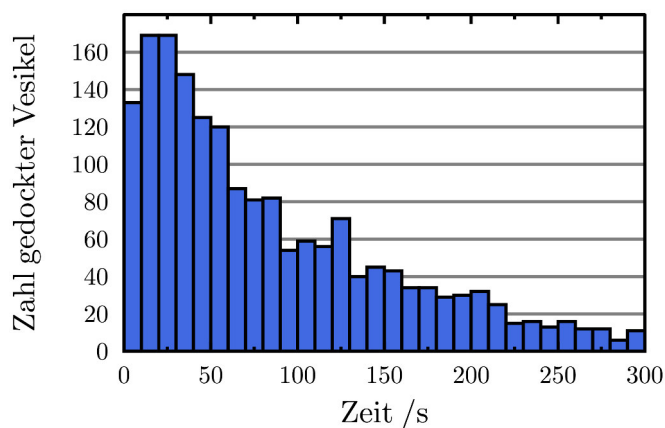
Experimente mit porenüberspannenden Membranen welche nur Syntaxin-1A (183–288) ohne SNAP25a und das Fragment von Synaptobrevin-2 (AS 49–96) enthielten zeigten das gleiche Verhalten. Die Vesikel mit dem enthaltenen Synaptobrevin-2 waren auch hier nicht in der Lage an die Membran zu binden. Dies bestätigt eindeutig, dass die hier beobachteten Ereignisse ausschließlich auf die Funktion der enthaltenen SNARE-Proteine, sowie die korrekte Ausbildung des SNARE-*coiled-coil*-Komplexes zurückzuführen ist.

#### 4.4.1 Durchführung der Experimente

Für die Anregung der Fluoreszenz wurde ausschließlich ein Laser der Wellenlänge 488 nm verwendet, was nahe dem Absorptionsmaximum von Oregon Green (501 nm) liegt. Die Fluoreszenz von Texas Red wurde nicht explizit angeregt, da der Försterresonanzenergietransfer (FRET) zwischen Oregon Green und Texas Red als Indikator für die Lipidvermischung bei der Fusion dienen sollte. Durch das breite Absorptionsspektrum von Texas Red (Abb. 3.4) wird jedoch dessen Fluoreszenz zu einem geringen Teil mit angeregt, wodurch die Vesikel auf der Membranoberfläche auch ohne den FRET sichtbar waren. Hierdurch ist die Ausprägung des FRET-Effekts zwar verringert, die Vesikel konnten jedoch auch ohne das Einbringen eines weiteren Fluoreszenzfarbstoffs in das System beobachtet werden. Eine explizite Anregung des Farbstoffs in den Vesikeln wurde getestet und führte erwartungsgemäß zu einer verbesserten Detektierbarkeit der Vesikel, durch die stärkere Anregung des enthaltenen Farbstoffs. Bei der Auswertung der beobachteten Ereignisse zeigte sich jedoch, dass der FRET gerade bei schnellen Fusionsereignissen oftmals das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen einer Fusion und einem reversiblen Dockingereignis darstellte, sodass die ausschließliche Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm beibehalten wurde.

Die Durchführung eines Fusionsexperiments erfolgte durch die direkte Zugabe der Vesikel auf die porenüberspannende Membran. Pro Experiment wurde eine Menge von 0.5–1  $\mu\text{L}$  der Vesikellösung mit einer Pipette auf den zuvor ausge-

wählten Bereich des Substrats gegeben. Durch die lokal begrenzte Zugabe war es möglich, auf einem Substrat mehrere Messungen auf verschiedenen porenüberspannenden Membranbereichen durchzuführen, ohne dass diese im Vorfeld mit Vesikeln kontaminiert wurden. Durch die freie Diffusion der Vesikel in der Lösung über dem Substrat verdünnte sich die Konzentration an Vesikel über die Dauer eines Experiments (306 s). Dies äußerte sich in einer abnehmenden Zahl von Vesikeln, die im Laufe der Zeit an die Oberfläche dockten. In Abbildung 4.33 sind die Dockingzeitpunkte aller detektierten Vesikel als Histogramm dargestellt.



**Abbildung 4.33:** Histogramm der Dockingzeitpunkte aller detektierten Vesikel über den Verlauf der Zeitserien.

In der Literatur wird für Fusionsexperimente auf festkörperunterstützten Membranen oder immobilisierten Vesikeln meist ein Flusszelle eingesetzt, wodurch die Vesikelkonzentration in der Lösung konstant gehalten wird.<sup>[52,60,101]</sup> Dies hat den Nachteil, dass auf jedem präparierten Substrat nur jeweils ein Experiment durchgeführt werden kann, da die gesamte Membranoberfläche mit Vesikeln gesättigt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierauf verzichtet, um möglichst viele Experimente auf einem porösen Substrat durchführen zu können. Die kinetische Auswertung des Fusionsprozesses wurde durch die abnehmende Vesikelkonzentration hingegen nicht beeinflusst, da die einzelnen Vesikel erst nach der Bindung an die Membran erfasst wurden. Es kann lediglich keine Aussage darüber getroffen werden, wie

groß der Anteil an Vesikeln, die an die Oberfläche docken, im Vergleich zu der vorherrschenden Vesikelkonzentration ist.

### 4.4.2 Auswirkung der Auswerteparameter auf die Detektion der Fusionsereignisse

Die Auswertung der aufgenommenen Zeitserien erfolgt im ersten Schritt mit einer von Prof. Dr. B. Geil entwickelten Software. Hierbei wurden die Vesikel nach Subtraktion eines Grenzwerts von der Fluoreszenzintensität des Texas Red Kanals durch einen Partikeltrackingalgorithmus detektiert. Der Grenzwert wurde für jede Zeitserie manuell angepasst, wobei ein pauschaler Grenzwert für alle Bilder einer Zeitserie verwendet wurde. Die Anpassung erfolgte durch die Eingabe eines Faktors zwischen 0 und 1 bezogen auf den Dynamikumumfang der detektierten Fluoreszenzintensitäten. Der Faktor wurde dabei so klein wie möglich gewählt, um möglichst viele Vesikel detektieren zu können. Bei einem zu geringen Grenzwert kam es jedoch zu einem exponentiellen Anstieg an Fehldetektionen durch das vorhandene Bildrauschen, sowie das leichte Übersprechen der Oregon Green Fluoreszenz in den Texas Red Kanal (*crosstalk*). Um den Einfluss des manuell gewählten Grenzwerts auf die gefundene Anzahl an Fusionsereignissen zu prüfen, wurde der Grenzwert für die Auswertung einer Beispielzeitserie variiert. Der Grenzwert wurde hierzu zunächst nach der normalen Vorgehensweise auf 0.35 bestimmt und im Anschluss die Auswertung mit einem höheren (0.4) und einem geringeren (0.3) Grenzwert wiederholt. Die Fluoreszenzintensitätsverläufe der detektierten Partikel wurden manuell auf Anzeichen einer Fusion hin überprüft. In Tabelle 4.7 ist das Ergebnis der Auswertung bei den verschiedenen Grenzwerten zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass sowohl ein zu niedrig, als auch ein zu hoch gewählter Grenzwert keinen negativen Einfluss auf die Anzahl der gefundenen Ereignisse hatte. Einzig die Rate an Fehldetektionen stieg bei einem zu gering gewählten Grenzwert erwartungsgemäß stark an. Dieses Ergebnis zeigt, dass die manuelle Einstellung



## 4. Ergebnisse

---

des Grenzwerts äußerst robust gegenüber kleineren Fehlern reagierte und sich nur geringfügig auf das erzielte Ergebnis ausgewirkt haben kann.

**Table 4.7:** Ergebnis der subjektiven Bewertung der Fluoreszenzverläufe aller detektierten Partikel bei unterschiedlich gewählten Intensitätsgrenzwerten.

Grenzwert	detektierte Partikel	gefundene Ereignisse	Fusion	Docking
niedrig	619	57	41	16
normal	375	51	42	9
hoch	325	58	39	19

Die durch die Subtraktion des Grenzwerts detektierten Vesikel wurde mit Hilfe eines *tracking*-Algorithmus bei ihrer Bewegung über die Substratoberfläche verfolgt. Aufgrund der hohen Anzahl an Vesikeln, die nur sehr kurz im Sichtfeld auftauchten und schnell wieder verschwanden, musste, um häufige Fehldetektionen zu vermeiden, eine Mindestlebenszeit der beobachteten Partikel im Sichtfeld definiert werden. Es wurde hierzu ein Wert von 25 Bildern ( $\approx 3$  s) empirisch festgelegt und für alle Zeitserien beibehalten. Hierdurch ist es möglich, dass Ereignisse, deren Fusionsprozess innerhalb dieser Zeit von Docking bis hin zur vollständigen Fusion bereits abgeschlossen war, nicht detektiert wurden. Da jedoch Ereignisse dieser Art auch manuell nicht erkannt werden konnten und auch die spätere kinetische Auswertung der detektierten Ereignisse nicht auf ein Vorhandensein sehr schneller Ereignisse hindeutete (mittlere Dockingzeit  $\approx 50$  s), kann das Auftreten einer größeren Zahl solcher Ereignisse ausgeschlossen werden.

### 4.4.3 Bestimmung der optimalen ROI-Größe

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Auswertung der Fluoreszenzdaten war der Radius der *region of interest* (ROI), welche um den Schwerpunkt jedes einzelnen Vesikel definiert wurde. Aus den ROIs wurden die Intensitäten des Oregon Green sowie des Texas Red Fluoreszenzkanals über den Verlauf der Zeitserie mittels Integration bestimmt. Die erhaltenen Intensitätsverläufe wurden im Anschluss visuell auf

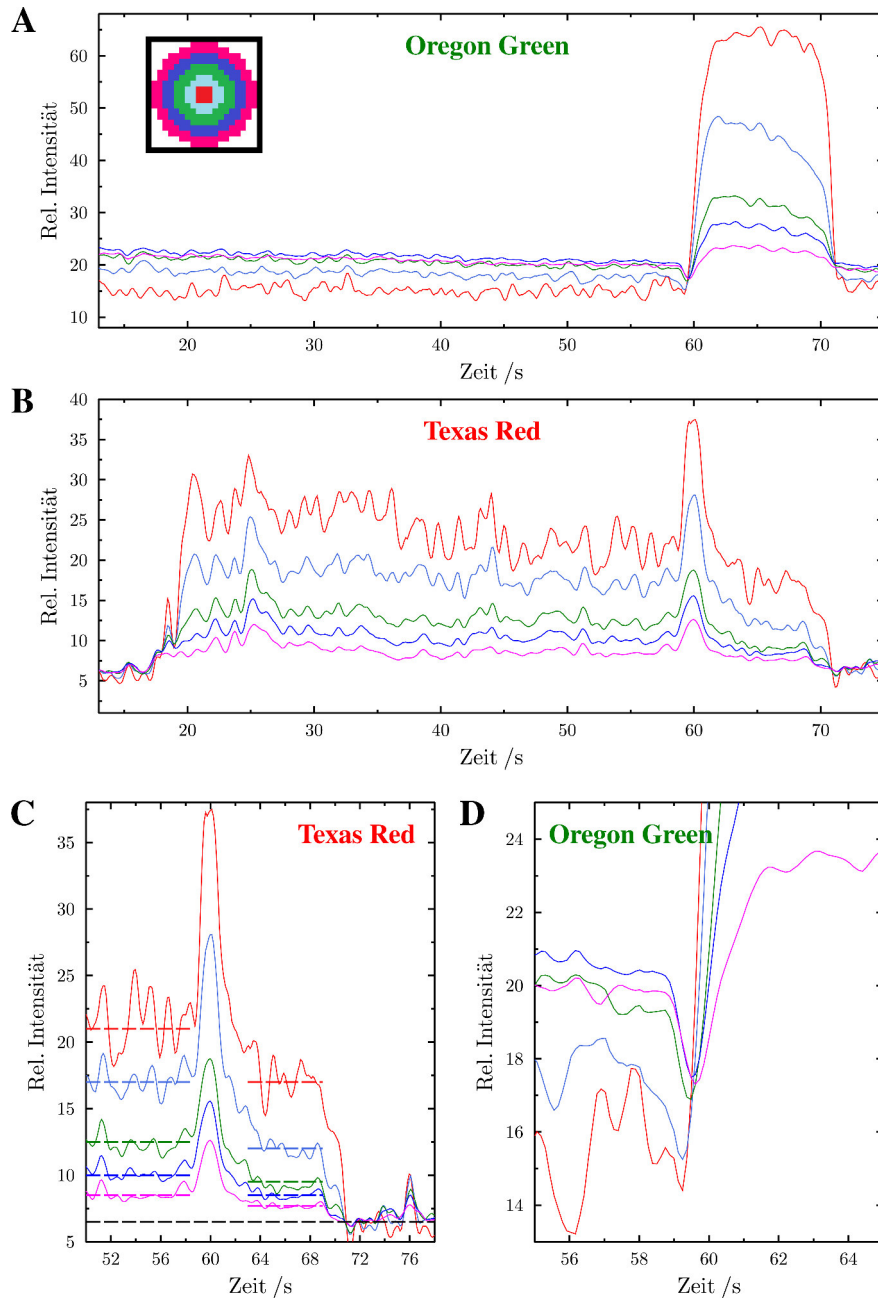
Anzeichen einer Fusion untersucht. In Abbildung 4.34 sind die Intensitätsverläufe eines Beispielerignisses bei verschiedenen ROI-Größen gezeigt. Es wurden dabei ROIs mit einem Radius von 1, 3, 5, 7 und 10 Pixeln um den Schwerpunkt des Vesikels verwendet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Intensitätsprofil des gedockten Vesikels im Texas Red Kanal sowie der Anstieg im Oregon Green Kanal, als Folge der Hemifusion, deutlich ausgeprägter ist, je kleiner die ROI gewählt wurde. Das Intensitätssignal des Vesikels stieg dabei überproportional im Vergleich zum Rauschpegel an, wodurch im Falle des kleinsten ROIs das höchste Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wurde. Die Unterscheidung der Intensitätsniveaus des Texas Red Kanals in den unterschiedlichen Phasen der Fusion (Docking, Hemifusion, vollständige Fusion) war hierbei das wichtigste Kriterium für die Interpretation der beobachteten Fusionsereignisse. In Abbildung 4.34C ist in diesem Zusammenhang eine vergrößerte Darstellung der Intensitätsverläufe im Texas Red Kanal gezeigt, in der die Niveaus der einzelnen Fusionszwischenstufen noch einmal verdeutlicht sind. Hier ist zu erkennen, dass bei einem kleinen ROI die Unterschiede zwischen den Niveaus am deutlichsten erkannt werden können. Gerade im Fall kleinerer Vesikel könnte ein zu groß gewählter ROI zu Fehlern bei der visuellen Begutachtung führen.

In Abbildung 4.34D ist ein vergrößerter Ausschnitt der Kurvenverläufe des Oregon Green Kanals dargestellt. Die genaue Betrachtung des Intensitätsverlaufs zum Zeitpunkt der Fusion zeigt, dass der FRET zwischen dem aus der Vesikelmembran austretenden Texas Red und dem in die äußere Lipidschicht des Vesikels einströmenden Oregon Green bei sehr kleinen ROIs nicht eindeutig detektiert werden kann. Erst bei größeren ROIs, bei welchen größere Teile der umgebenden porenüberspannenden Membran mit einbezogen werden, kann ein deutlicher Abfall der Intensität des grünen Kanals beobachtet werden.

Bei der Auswertung der Zeitserien musste somit zwischen einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis für das Intensitätsprofil der Vesikel und der Detektierbarkeit des FRET abgewogen werden. Da die Unterscheidung der Intensitätsniveaus des Texas

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.34:** Fluoreszenzintensität des Oregon Green (A) sowie des Texas Red Kanals (B) bei verschiedenen ROI-Größen. Die verwendeten ROIs (farbige Maske in A) entsprechen einem Radius von 1 (rot), 3 (hellblau), 5 (grün), 7 (blau) und 10 (magenta) Pixeln um den Schwerpunkt des Vesikel. Die Kurven wurden zur Verbesserung der Übersicht mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters (2 Iterationen) geglättet. (C + D) Vergrößerte Darstellung der Kurven aus A + B. (C) Auswirkung der ROI-Größe auf die Differenzierbarkeit der verschiedenen Intensitätsniveaus des Texas Red Kanals im Verlauf der Fusion. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Intensitätsniveaus des gedockten (50–58 s) und des hemifusionierten Zustands (63–69 s) im Bezug zum Basisniveau (schwarz) bei den verschiedenen ROI-Größen. (D) Auswirkung der ROI-Größe auf den Verlauf der Intensität des Oregon Green Kanals zum Zeitpunkt der Fusion.

Red Kanals jedoch meist ausschlaggebend bei der Interpretation der Ereignisse war, wurde letztendlich für die Auswertung aller Zeitserien eine eher kleine ROI mit einem Radius von 3 Pixeln um den Schwerpunkt des Vesikels gewählt. Dies entspricht einem Durchmesser von 936 nm, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch größere Vesikel sich stets vollständig innerhalb der ROI befanden. Bei der Auswertung konnte hierdurch jedoch nur bei sehr wenigen Ereignissen ein FRET-Effekt beobachtet werden (4 %).

In der Literatur wird für die Detektion einzelner Fusionsereignisse meist nur ein Farbstoff in der Vesikelmembran eingesetzt.<sup>[59,61,72,102]</sup> Dies ist möglich, da die Fusionsexperimente auf festkörperunterstützten Membranen durchgeführt werden, die durch das Spreiten von SUVs erzeugt werden. Hierdurch wird eine vollständige Bedeckung der Festkörperoberfläche mit einer kontinuierlichen Membran erreicht.<sup>[103]</sup> In dieser Arbeit wurden die porenüberspannenden Membranen durch das Spreiten von GUVs hergestellt, wodurch einzelne, voneinander isolierte Membran-Patches entstanden. Aus diesem Grund mussten die porenüberspannenden Membranen für die Lokalisierung fluoreszenzmarkiert sein. Auf festkörperunterstützten Membranen ist dies nicht erforderlich, sodass auf einen Farbstoff in der Membran verzichtet werden kann. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Einstrom des lipidgebundenen Fluoreszenzmarkers aus der porenüberspannenden Membran in die Vesikelmembran zusätzliche Informationen zur Interpretation der beobachteten Ereignisse liefert. Der FRET-Effekt spielte dabei eine eher untergeordnete Rolle, sodass eventuell auch auf ihn verzichtet werden könnte. Hierdurch wäre es möglich, spektral vollständig getrennte Farbstoffe zu verwenden und ihre Fluoreszenz individuell anzuregen. Dies würde zu einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis und damit zu einer verbesserten Auflösung der verschiedenen Phasen der Fusion besonders im Falle kleinerer Vesikel führen.

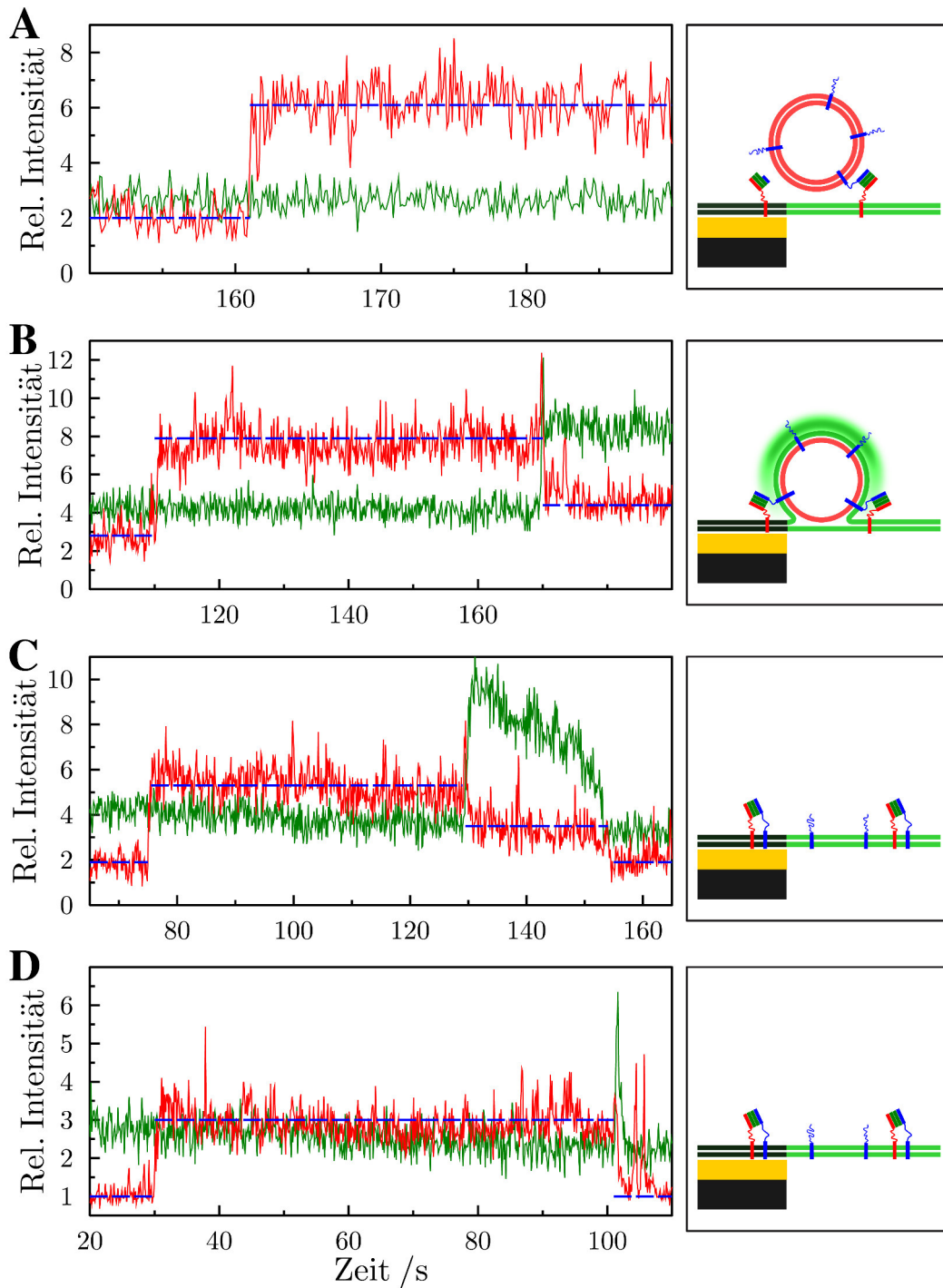
### 4.4.4 Klassifizierung der beobachteten Ereignisse

Im Verlauf der Experimente wurden insgesamt 48 Zeitserien aufgenommen und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte zunächst mit einem von Prof. Dr. Burkhard Geil entwickelten Programm, welches die Bewegungen der Vesikel über der porenüberspannenden Membran mit Hilfe eines *tracking*-Algorithmus verfolgte (Kapitel 3.7.2, S. 59). Um den Schwerpunkt jedes gedockten Vesikels wurde eine ROI mit einem Radius von 3 Pixeln (470 nm) definiert und die Fluoreszenzintensitäten des grünen (Oregon Green, porenüberspannende Membran) sowie des roten (Texas Red, Vesikel) Kanals innerhalb der ROI über die gesamte Zeitserie hinweg integriert. Die erhaltenen Intensitätsverläufe wurden mit einem von Dr. Ingo Mey programmierten Skripts einzeln, manuell auf Anzeichen einer Fusion hin überprüft.

Anhand der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Eigenschaften eines Fusionsereignisses im Intensitätsverlauf wurden verschiedene Szenarien für die Interaktionen der Vesikel mit der porenüberspannenden Membran unterschieden. Abbildung 4.35 A–D zeigt Beispielerläufe der Fluoreszenzintensitäten für die verschiedenen beobachteten Szenarien. Auf der rechten Seite ist dabei jeweils die Situation des jeweiligen Vesikels am Ende der Zeitserien schematisch dargestellt.

In (A) ist ein Intensitätsverlauf eines Vesikels gezeigt, welcher an die Membran bindet, jedoch keine weitere Reaktion mit ihr eingeht. Die rote Fluoreszenz steigt dabei sprunghaft an und verbleibt bis zum Ende der Messung auf diesem hohen Niveau. Es wurden auch Fälle beobachtet, in denen der Vesikel nach einiger Zeit den Kontakt zur Membran wieder verlor und den beobachteten Bereich verließ.

(B) zeigt den Intensitätsverlauf eines Vesikels, welcher zunächst an die Membran dockt, zu erkennen an dem sprunghaften Anstieg im roten Kanal, und im späteren Verlauf mit der Membran fusioniert. Die rote Fluoreszenz fällt dabei auf einen Wert ab, der über der Basislinie liegt. Gleichzeitig steigt die grüne Fluoreszenzintensität an. Dieses Verhalten wird als Vermischung der Lipide der äußeren Lipidschichten der gegenüberliegenden Membranen verstanden. Beide Intensitäten blieben im Anschluss bis zum Ende der Messung konstant. Da der Vesikel in seiner ursprünglichen



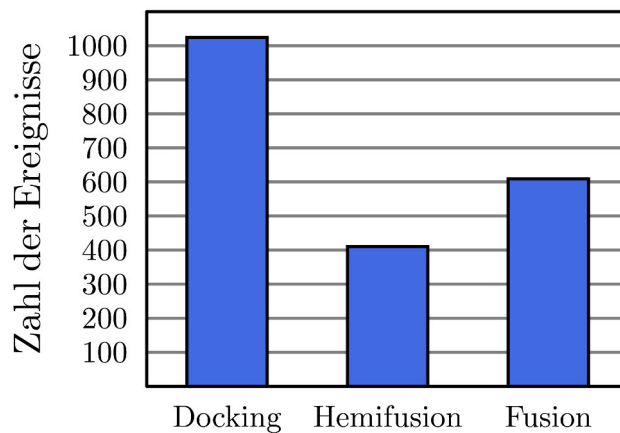
**Abbildung 4.35:** Fallunterscheidung der verschiedenen beobachteten Ereignisse. Jeweils auf der rechten Seite ist schematisch der postulierte Zustand am Ende der Zeitserie dargestellt. Abgebildet sind Beispielverläufe der Fluoreszenzintensitäten für (A) Docking, (B) Hemifusion, (C) vollständige Fusion und (D) einer schnellen Fusion. Die gestrichelten, blauen Linien sollen die auftretenden Intensitätsstufen im roten Kanal verdeutlichen.

Geometrie auf der Membran erhalten blieb, kann davon ausgegangen werden, dass keine Verbindung zwischen den inneren Lipidschichten bestand. Diese Art von Ereignissen wurde als Zwischenstufe der Fusion angesehen und als hemifusionierter Zustand interpretiert.

Teil (C) der Abbildung 4.35 zeigt ein Ereignis, welches ebenfalls eine Fusion mit der porenüberspannenden Membran eingeht. Der Vesikel dockte hier an die Membran und nach einer bestimmten Zeit kam es auch hier zur Vermischung der äußeren Membranschichten, zu erkennen an dem teilweisen Abfall der roten sowie dem Anstieg in der grünen Intensität. Im weiteren Verlauf fielen hier jedoch beide Kanäle auf ihr Basisniveau ab und der Vesikel wurde vollständig abgebaut. Es wird davon ausgegangen, dass sich in diesem Fall auch die inneren Lipidschichten verbunden haben und eine vollständige Fusion stattfand.

Neben dieser Art von vollständigen Fusionsereignissen wurden auch Fälle beobachtet, bei welchen kein hemifusionierter Zustand aufgelöst werden konnte und die Fluoreszenzintensität des roten Kanals ohne erkennbare Zwischenstufe direkt auf die Basislinie zurückkehrte (Abb. 4.35 D). Solche Ereignisse konnten von reversibel gedockten Vesikeln nur durch einen kurzen (1–2 Bilder) Anstieg oder Abfall (FRET) der Intensität des grünen Kanals unterschieden werden, welcher die Lipidvermischung nachweist. Es konnte dabei aufgrund der Zeitauflösung der Messungen nicht geklärt werden, ob ein hemifusionierter Zustand vorlag, oder die Fusion ohne Zwischenstufen erfolgte. Dieses Verhalten wurde als schnelle Fusion betrachtet.

Alle gefundenen Ereignisse wurden in diese vier Kategorien, Docking, Hemifusion, Fusion und schnelle Fusion, eingeordnet und statistisch erfasst. Insgesamt wurden auf diese Weise 2043 einzelne Ereignisse detektiert. Abbildung 4.36 zeigt ein Histogramm, in welchem die Anzahl an Einzelereignissen für die unterschiedenen Fälle aufgetragen ist. Es wurden 1024 Dockingereignisse (50 %), 410 Hemifusionen (20 %) und 609 vollständige Fusionen (30 %), von denen 160 schnelle Fusionen waren, bestimmt.



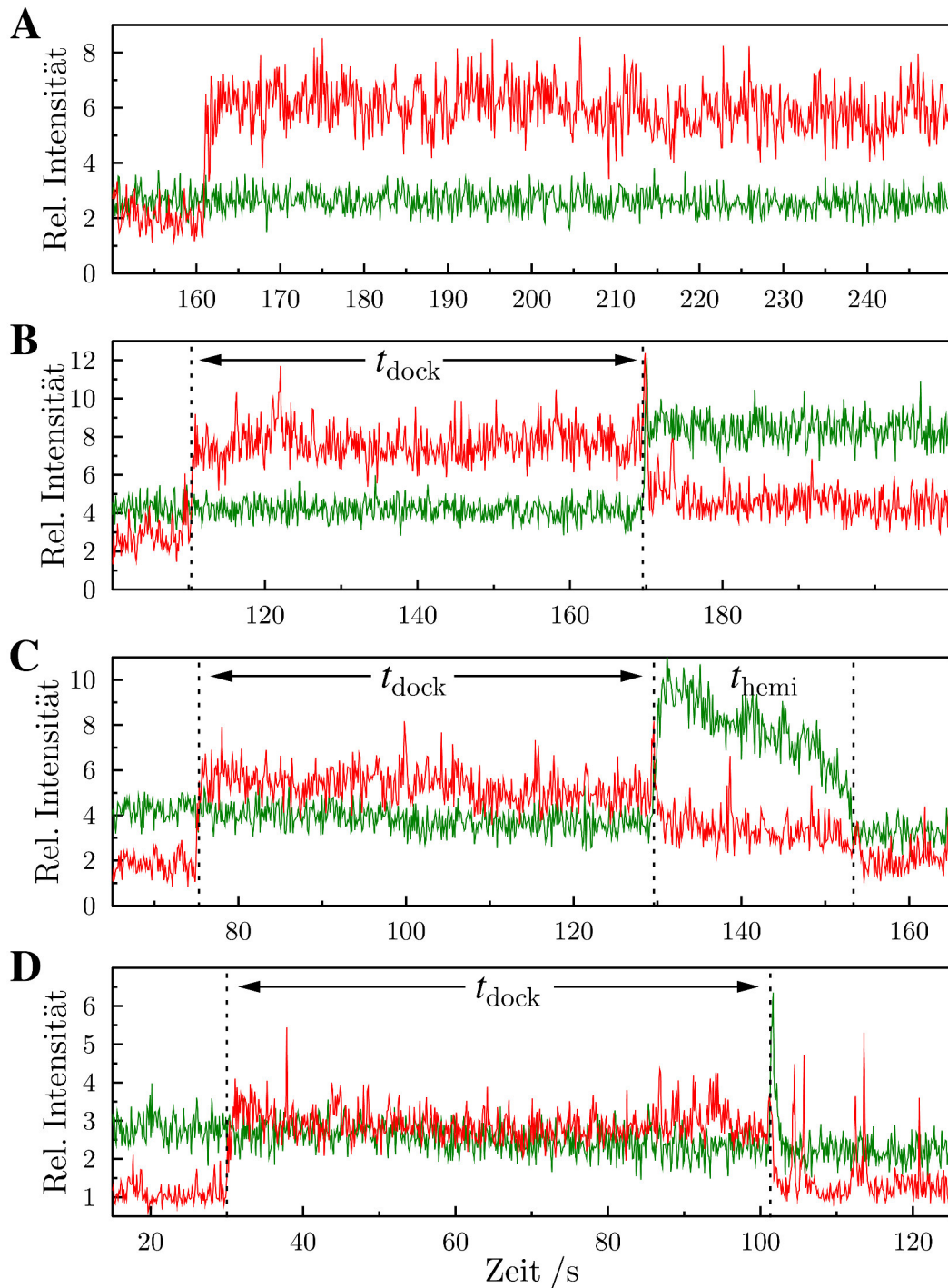
*Abbildung 4.36: Histogramm der Anzahl an detektierten Ereignissen für den Fall von Docking, Hemifusion und Fusion.*

#### 4.4.5 Kinetische Auswertung der beobachteten Fusionsprozesse

Um Informationen über die zugrundeliegende Kinetik der beobachteten Membranfusion zu erhalten, wurden die detektierten Ereignisse auf ihren zeitlichen Ablauf hin untersucht. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer von Dr. Ingo Mey programmierten Software. Es wurde zum einen die Zeit zwischen der Bindung eines Vesikels an die Membran bis zum Einsetzen der Lipidvermischung als Folge der Fusion erfasst. Dieses Zeitintervall wurde als Dockingzeit ( $t_{dock}$ ) bezeichnet. Zum Anderen wurde bei vollständigen Fusionsereignissen, mit zeitlich auflösbarem hemifusionierten Zustand, die Dauer dieses Zustandes ermittelt. In Abbildung 4.37 sind die bereits bekannten Intensitätsverläufe gezeigt, wobei die ausgewerteten Zeitintervalle durch vertikale, gepunktete Linien angedeutet sind.

Der bei der Auswertung der Zeitintervalle für die einzelnen Ereignisse befolgte Ablauf ist in Abbildung 4.38 als Flussdiagramm dargestellt. Für Dockingereignisse wurde nur der Startpunkt des Dockings erfasst. Bei einem Hemifusionsereignis wurden, wenn möglich, Start- und Endpunkt des Dockings (Dockingzeit) ana-





**Abbildung 4.37:** Graphische Darstellung der ausgewerteten Zeitintervalle der Fusionszwischenstufen anhand von Beispielverläufen. Es wurden die Dockingzeit  $t_{\text{dock}}$  sowie die Hemifusionszeit  $t_{\text{hemi}}$ , wie durch die senkrechten, gepunkteten Linien dargestellt, für die verschiedenen Ereignistypen (A Docking, B Hemifusion, C vollständige Fusion und D schnelle Fusion) bestimmt.

lysiert, wobei der Endpunkt des Dockings dem Fusionszeitpunkt entsprach. Für vollständige Fusionen wurde die Dockingzeit sowie die Dauer des hemifusionierten Zustands ermittelt. Für Vesikel, die bereits vor Beginn der Zeitserie an die Membran gedockt waren, wurde keine Dockingzeit ermittelt. Schnelle Fusionsereignisse, bei welchen kein hemifusionierter Zustand auflösbar war, wurden bei der kinetischen Auswertung mit einer Hemifusionszeit von  $t_{hemi} < 360$  ms berücksichtigt.

Da es sich bei porenüberspannenden Membranen um ein heterogenes System aus freistehenden Membranbereichen über den Poren sowie festkörperunterstützten Bereichen über den Porenstegen handelt, wurden die Fusionsereignisse für die jeweiligen Bereiche getrennt ausgewertet. Hierzu wurden die Vesikel anhand des für die Platzierung des ROI verwendeten Schwerpunkts lokalisiert. Mit Hilfe eines von Ole Schütte programmierten Skripts wurde die Position und die Fläche der Poren anhand ihrer geometrischen Anordnung bestimmt und eine Maske über dem beobachteten Bildausschnitt berechnet (Abb. 4.39 A). Anhand der bekannten Schwerpunkte wurde die Position jedes Ereignisses mit der Porenmaske verglichen und entschieden, ob es innerhalb oder außerhalb der Poren stattfand. In Abbildung 4.39 B ist ein exemplarisches Bild der über die gesamte Zeitserie gemittelten Fluoreszenzintensität im grünen Kanal gezeigt. Die einzelnen Poren sind durch die Mittelung der Intensitäten sehr deutlich zu erkennen. In dieses Bild wurden die Positionen aller detektierten Ereignisse als rote Punkte eingezeichnet.

Die Auswertung der Positionen ergab, dass 27 % aller Ereignisse auf den freistehenden Membranbereichen stattfanden. Da die Porenfläche insgesamt etwa 42 % der Gesamtfläche ausmacht, zeigt diese Ergebnis eine leichte Präferenz der Vesikel für ein Docking auf den festkörperunterstützten Bereichen. Insgesamt wurden 538 Ereignisse im Bereich der freistehenden Membranen lokalisiert (Abb. 4.40 D). Es wurden 284 Dockingereignisse (52.8 %), 111 Hemifusionen (20.6 %) sowie 143 vollständige Fusionen (26.6 %) ermittelt. Innerhalb der festkörperunterstützten Membranbereiche wurden 1491 Ereignisse gefunden (Abb. 4.40 A). 734 entsprachen

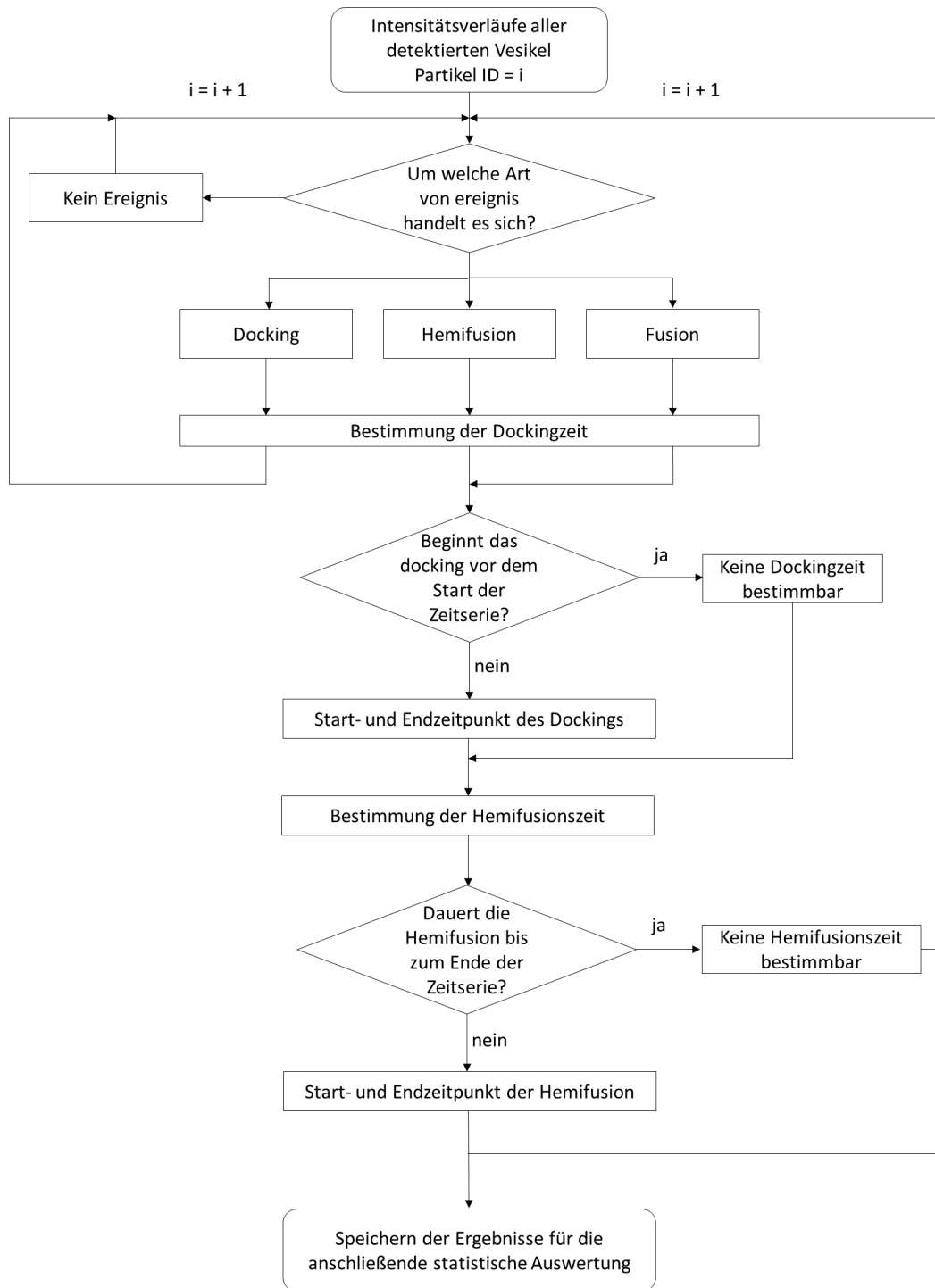
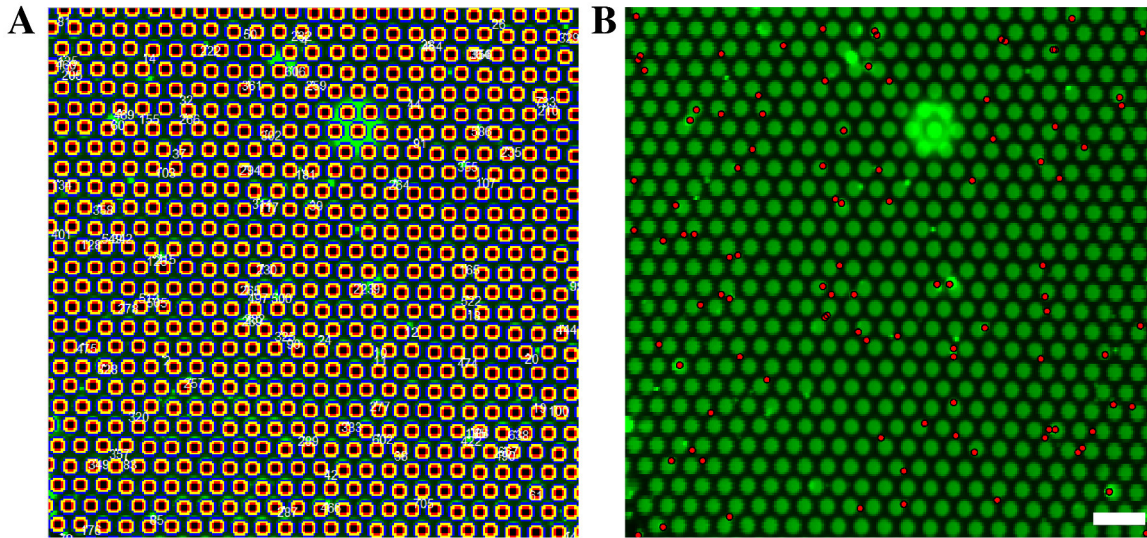


Abbildung 4.38: Flussdiagramm für die Auswertung der Dauer der Fusionszwischenstufen.



**Abbildung 4.39:** Positionsbestimmung der beobachteten Einzelereignisse. (A) Definition einer Porenmaske anhand geometrischer Betrachtungen zur Identifikation der freistehenden Membranbereiche. (B) Positionen der einzelnen Ereignisse (rote Punkte). Das Bild entspricht der gemittelten Fluoreszenzintensität des grünen Kanals über die gesamte Zeitserie. Maßstab: 5 µm.

Dockingereignissen (49.2 %), 292 verblieben im hemifusionierten Zustand (19.6 %) und 465 fusionierten vollständig (31.2 %).

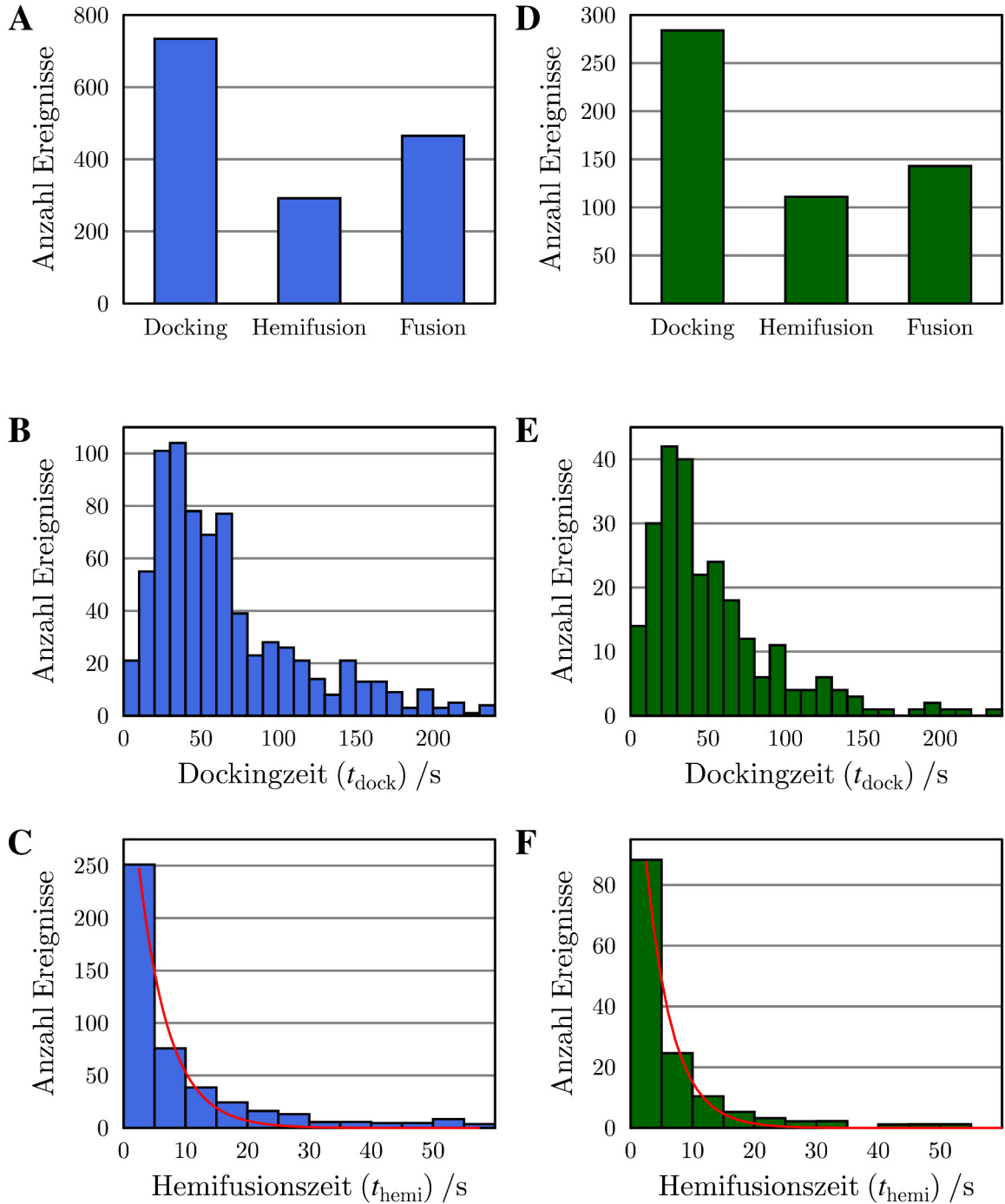
In Abbildung 4.40 B und E sind die bei der Auswertung ermittelten Dockingzeiten ( $t_{dock}$ ) als Histogramm mit einer Binbreite von 10 s dargestellt. In C und F ist die Dauer des hemifusionierten Zustands in einem Histogramm mit einer Binbreite von 5 s aufgetragen. Alle dargestellten Histogramme wurden statistisch korrigiert, um den Einfluss der begrenzten Messdauer auf die Anzahl an beobachteten Ereignissen mit sehr langer Docking- und/oder Hemifusionszeit zu kompensieren. Hierzu wurde folgende Funktion verwendet:

$$N(t) = n(t) \cdot \frac{T}{(T - t)}.$$

$n$  ist hierbei die Anzahl an beobachteten Ereignissen mit einer Lebensdauer von  $t$  und  $T$  die Dauer der Messung.

Beide Histogramme für die Dauer des hemifusionierten Zustands zeigen einen eindeutig monoexponentiellen Abfall. Dies spricht für einen einstufigen Mechanis-

#### 4. Ergebnisse



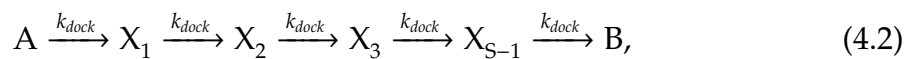
**Abbildung 4.40:** Statistische Analyse der detektierten Einzelereignisse im festkörperunterstützten Stegbereich (A–C) sowie dem freistehenden Bereich der porenüberspannenden Membran (D–F). (A, D) Anzahl an Ereignissen der unterschiedlichen Kategorien Docking, Hemifusion und vollständige Fusion. (B, E) Histogramm der erhaltenen Dockingzeiten ( $t_{dock}$ ). (C, F) Histogramm der ermittelten Dauer des hemifusionierten Zustands für vollständige Fusionen inklusive der schnellen Fusionsereignisse. Die rote Kurve entspricht der Anpassung von Gleichung 4.1 an die Daten.

mus zwischen Hemifusion und vollständiger Fusion. Um für diese Reaktion eine Zeitkonstante zu bestimmen, wurden die Histogramme mit folgender monoexponentiellen Funktion angepasst:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-k_{hemi}t}. \quad (4.1)$$

$N_0$  entspricht dabei der Gesamtzahl an vollständig fusionierenden Ereignissen. Für Ereignisse im Bereich der Porenstege wurde dabei eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_{hemi} = 0.21 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Im freistehenden Membranbereich wurde eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_{hemi} = 0.24 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  gefunden.

Die Histogramme der Dockingzeiten ähneln in ihrem Verlauf dem einer logarithmischen Normalverteilung. Dies weist auf einen mehrstufigen Prozess hin, welcher dem Übergang vom gedockten zum hemifusionierten Zustand zugrunde liegt. Um auch hierfür eine Geschwindigkeitskonstante bestimmen zu können, wurde ein allgemeines kinetisches Modell verwendet, welches von Floyd et al. für die Interpretation ihrer Experimente zur Detektion einzelner Membranfusionsereignisse von Inflenzaviren entwickelt wurde.<sup>[104]</sup> Das Modell beschreibt dabei eine Serie von  $S$  Einzelschritten ( $X_S$ ), mit einer einheitlichen Geschwindigkeitskonstante  $k_{dock}$  für jeden Einzelschritt:



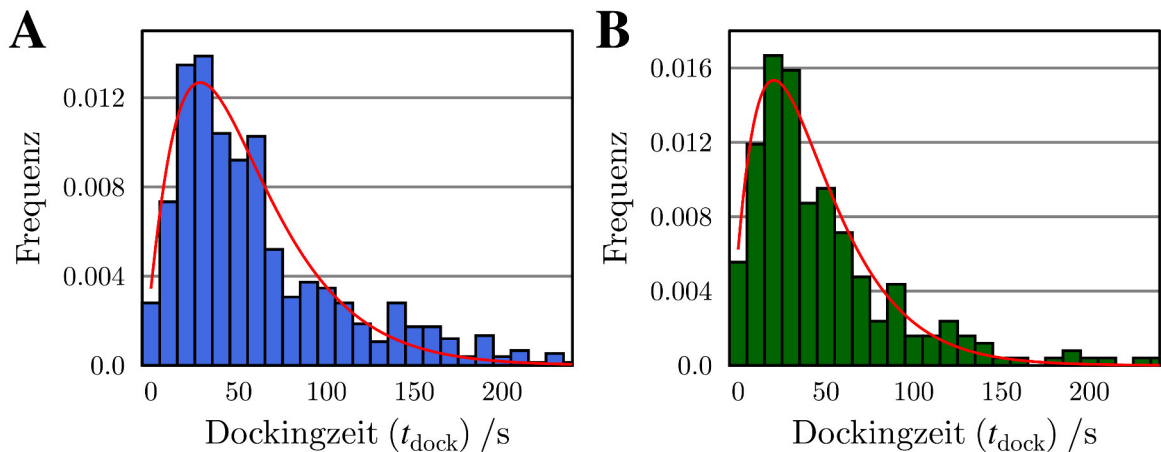
wobei  $A$  den Zeitpunkt des Dockings und  $B$  den Beginn der Lipidvermischung repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeitsdichte einer solchen Reaktionsabfolge entspricht einer Gammaverteilung:

$$P_B(t) = \frac{k_{dock}^S \cdot t^{S-1}}{\Gamma(S)} \cdot e^{-k_{dock}t}. \quad (4.3)$$

Abbildung 4.41 enthält die Anpassung von Gleichung 4.3 an die Wahrscheinlichkeitsdichte der erhaltenen Dockingzeiten für Ereignisse im Stegbereich (A) und

#### 4. Ergebnisse

auf freistehenden Membranen (B). Für die Stegbereiche wurde auf diese Weise eine Geschwindigkeitskonstante für den Übergang vom gedockten zum hemifusionierten Zustand von  $k_{dock} = 0.033 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Die Zahl  $S$  an Schritten, die erforderlich für eine erfolgreiche Fusion sind, betrug in diesem Fall  $1.9 \pm 0.2$ . Auf den freistehenden Membranbereichen wurde eine Geschwindigkeitskonstante von  $k_{dock} = 0.035 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$  mit  $S = 1.7 \pm 0.2$  ermittelt.



**Abbildung 4.41:** Kurvenanpassung von Gleichung 4.3 an die Wahrscheinlichkeitsdichte der gemessenen Dockingzeiten. (A) Dockingzeiten im festkörperunterstützten Membranbereich. (B) Dockingzeiten im freistehenden Membranbereich.

Die Ergebnisse der kinetischen Auswertung zeigen, dass ein Fusionsereignis auf dem festkörperunterstützten Membranbereich typischerweise 57.6 s vom Zeitpunkt des Dockings zum Einsetzen der Fusion benötigt und im Mittel 4.7 s im hemifusionierten Zustand verbleibt, bis die vollständige Fusion eintritt. Auf freistehenden Membranbereichen beträgt die typische Dockingzeit 48.6 s, während der hemifusionierte Zustand 4.2 s andauert.

# 5 Diskussion

## 5.1 Isolierung und Reinigung der SNARE-Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Proteine wurden durch heterologe Expression in *E. coli* erhalten. Die notwendigen Plasmide wurden von der Abteilung Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) zur Verfügung gestellt. Die Protokolle für die Isolierung der einzelnen Proteine wurden ebenfalls von unseren Kooperationspartnern entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Auswertung der SDS-PAGE-Analysen der erhaltenen Proteinlösungen wurde bereits in Kapitel 4.1 (ab S. 64) beschrieben. Durch Vergleich mit einem SDS-Gel aus der Literatur (Abb. 4.1) konnte bestätigt werden, dass die gesuchten Proteine in ausreichender Reinheit erhalten werden konnten.

Die Assemblierung des  $\Delta N$ -Akzeptorkomplexes erfolgte durch Inkubation von Syntaxin-1A (183–288) mit SNAP25a und dem Fragment von Synaptobrevin-2 (49–96) in detergenzhaltigem Puffer. Ohne das Fragment von Synaptobrevin-2 kann es hierbei zu einer Bildung eines 2:1-Komplexes zwischen Syntaxin-1A und SNAP25a kommen.<sup>[105]</sup> Eine Bindung von Synaptobrevin-2 an einen solchen 2:1-Komplex ist hierbei nicht mehr möglich, sodass die Fusion, durch die notwendige Verdrängung eines Syntaxins aus dem Komplex, stark verlangsamt ist.<sup>[33]</sup> Um die Bildung eines 2:1-Komplexes zu verhindern wurde von Pobbati et al. der  $\Delta N$ -Komplex durch die Bindung des Fragments von Synaptobrevin-2 entwickelt.<sup>[38]</sup> Die Fusion mit Hilfe des  $\Delta N$ -Komplexes konnte in der Folge bereits bei mehreren Studien zur Fusion



von Vesikeln in Lösung, sowie für Fusionsexperimente an festkörperunterstützten Membranen erfolgreich eingesetzt werden.<sup>[20,60,106,107]</sup>

In der Literatur finden sich zwei weitere Ansätze um einer Bildung eines 2:1-Komplexes vorzubeugen. Zum einen wird während der Rekonstitution der Proteine SNAP25 im Überschuss eingesetzt. Die Angaben in der Literatur reichen hier von einem 1.2-fachen<sup>[108]</sup> Überschuss bis zu einem fünffachen<sup>[50]</sup> Überschuss an SNAP25 im Vergleich zur Konzentration von Syntaxin. Zum anderen wird oftmals eine Coexpression von Syntaxin und SNAP25 durchgeführt, wobei einzig das SNAP25 einen His-Tag für die anschließende Isolierung mittels Metallionenaffinitätschromatographie trägt.<sup>[59,62,90,109]</sup> Es wird hierbei davon ausgegangen, dass die Expression in einem äquimolaren Verhältnis erfolgt und nahezu ausschließlich der dimere Komplex erhalten wird.

Letztendlich kann für keine der beschriebenen Methoden eine partielle Bildung von 2:1-Komplexen vollständig ausgeschlossen werden. Durch die Fixierung des dimeren Komplexes durch die Bindung des Fragments von Synaptobrevin-2 mit einem zusätzlichen Überschuss an SNAP25a während der Bildung des  $\Delta N$ -Komplexes, wie in dieser Arbeit, sollte die Formation des 2:1-Komplexes jedoch auf einem sehr niedrigen Niveau gehalten werden können.

Die Funktionalität der erhaltenen SNARE-Proteine konnte durch die erfolgreiche Durchführung von Vesikel-Vesikel Fusionsexperimenten in Lösung eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.3).

## **5.2 Erzeugung und Charakterisierung proteinhaltiger porenüberspannender Membranen**

### **5.2.1 Funktionalisierungsstrategien für poröse Systeme**

Für die Bildung einer stabilen, porenüberspannenden Membran wird auf Substraten, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden, eine Funktionalisierung benötigt,

die eine hohe Affinität der Lipidmembran zur Oberseite des Substrat sowie eine geringe Affinität zu den Poreninnenseiten gewährleistet. Ist die Oberfläche in allen Bereichen gleich beschaffen, folgt die Membran der dreidimensionalen Struktur und es wird eine homogene Bedeckung der gesamten Oberfläche erhalten. Dieses Verhalten kann in Abb. 4.20 auf Seite 88 jeweils am linken Rand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gut erkannt werden. Das Konzept einer orthogonalen Funktionalisierung mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften auf den Porenstegen im Vergleich zu den Innenseiten der Poren wurde durch Lazzara et al. bereits erfolgreich zur Präparation stabiler porenüberspannender Membranen auf porösen Aluminiumoxidsubstraten eingesetzt.<sup>[110,111]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Konzept auf poröse Siliziumsubstrate übertragen und jeweils zwei Funktionalisierungsstrategien für Substrate mit offenen und mit geschlossenen Poren entwickelt.

Bei der ersten Funktionalisierungsstrategie für poröse Systeme mit offen Poren, welche von der Ober- und der Unterseite zugänglich sind, wurde die Kathodenstrahlzerstäubung genutzt, um von der Unterseite her die Poreninnenseiten mit Gold zu bedecken. Die Stegbereiche zwischen den Poren blieben frei von Gold, so dass sie durch eine Behandlung mit Sauerstoffplasma anschließend hydrophilisiert werden konnten. Durch Sauerstoffplasma kann der Kontaktwinkel zu Wasser für die Siliziumnitridoberfläche des Substrats auf nahezu  $0^\circ$  gesenkt werden<sup>[112]</sup>, während für eine Goldoberfläche ein typischer Kontaktwinkel von bis zu  $66^\circ$  beobachtet wird.<sup>[113]</sup> Somit wird in Bereichen mit goldbedeckten Poreninnenseiten eine höhere Affinität der Membran zu den hydrophileren Stegen im Vergleich zum Poreninneren erreicht, wodurch beim Spreiten von riesigen Vesikeln (GUVs) die Poren von der Membran überspannt werden anstelle der dreidimensionalen Struktur zu folgen. Abbildung 4.20 (S. 4.20) zeigt das Spreitergebnis auf einem auf diese Weise funktionalisierten Substrat.

Die zweite Funktionalisierungsstrategie nutzt die Hochvakuummetallverdampfung um gezielt den Stegbereich des Substrats mit Gold zu bedecken, während die

Poreninnenseiten nahezu frei von Gold sind. Die Goldoberfläche wird im Anschluss durch Chemisorption von 6-Mercaptohexanol mit einer hydrophilen, selbstorganisierenden molekularen Monolage (*self assembled monolayer*, SAM) funktionalisiert. Der SAM auf dem Stegbereich besitzt einen Kontaktwinkel zu Wasser von etwa  $15-20^\circ$ <sup>[88]</sup>, während die unbehandelte Siliziumnitridoberfläche an den Poreninnenseiten einen Kontaktwinkel von etwa  $30^\circ$  aufweist.<sup>[113]</sup> Das Spreiten von GUVs führt hier zu sehr stabilen und homogenen porenüberspannenden Membranen, wie in Abbildung 4.21 gezeigt werden konnte. Diese Art der Funktionalisierung konnte bereits von Kocun *et al.* sowie Kuhlmann *et al.* erfolgreich für die Bildung porenüberspannender Membranen und deren anschließende rasterkraftspektroskopische Untersuchung eingesetzt werden.<sup>[87,88]</sup>

Im Falle der ersten Funktionalisierungsstrategie wiesen die gespreiteten Membranen einige unbedeckte Poren auf, was auf eine geringere Stabilität hindeutete. Die geringere Stabilität könnte hierbei auf eine hohe Membranspannung aufgrund des großen Hydrophilieunterschieds zwischen Stegbereich und Poreninneren hinweisen. Bei rasterkraftspektroskopischen Messungen auf gemischt funktionalisierten Substraten, bei welchen ein hydrophiles sowie ein hydrophobes Thiol auf Gold eingesetzt wurden, wurde durch Kuhlmann *et al.* gezeigt, dass bei einer erhöhten Membranspannung ihre Stabilität geringer wird und einzelne porenüberspannende Membranen in zunehmendem Maße reißen.<sup>[88]</sup> Dennoch bietet die Bedeckung der Poreninnenseiten mit Gold Vorteile, da zum einen der Präparationsaufwand geringer ist und zum anderen die Fluoreszenz der Membran auf den Porenstegen weniger gelöscht wird als auf goldbeschichteten Substraten.<sup>[114]</sup>

Die Funktionalisierungsstrategie der gezielten Beschichtung der Porenstege mit Gold durch die Hochvakuummetallverdampfung konnte in gleicher Weise auch auf porösen Substraten mit geschlossenen Poren angewendet werden. Hier wird die gleiche Topologie der Oberfläche erreicht, sodass auch hier porenüberspannenden Membranen durch GUV-Spreiten erzielt werden können.

Da die geschlossenen Poren nicht von der Rückseite her zugänglich sind, konnte eine Beschichtung der Poreninnenseiten mit Gold hier nur auf einem Umweg erreicht werden (siehe Kapitel 4.2.3). Hierzu wurde das Substrat zunächst mittels Kathodenstrahlzerstäubung flächendeckend mit Gold beschichtet und im Anschluss das Gold auf den Porenstegen mit Iod/Kaliumiodid-Lösung entfernt. Dies war jedoch nur durch eine vorherige hydrophobe Funktionalisierung der Goldoberfläche möglich, wodurch Luft im Poreninneren eingeschlossen werden konnte. Die Luftbläschen in den Poren schützte die Goldschicht, sodass sie im Inneren der Poren konserviert werden konnte.

Eine ähnlicher Ansatz wurde in der Literatur zur Erzeugung porenüberspannender Membranen mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels verwendet.<sup>[83,115]</sup> Hierbei wurden die Poren des Substrats zunächst mit Wasser gefüllt und im Anschluss mit einer Lipidlösung in organischem Lösungsmittel bedeckt um nach entfernen des Lösungsmittels eine porenüberspannende Membran zu erhalten. Das in den Poren eingeschlossene Wasser verhinderte das Eindringen des Lösungsmittels in die Poren.

Durch die Behandlung mit Sauerstoffplasma wurde die hydrophobe Funktionalisierung entfernt und das nun goldfreie Siliziumnitrid/-oxid im Stegbereich hydrophilisiert. Mit Hilfe dieser Methode konnten ebenfalls gute Spreitergebnisse erreicht werden, wobei ein wasserlöslicher Farbstoff unter der porenüberspannenden Membran detektiert werden konnte (Abb. 4.23, S. 92). Ein Vorteil dieser Methode ist auch hier die geringere Fluoreszenzlöschung im Vergleich zur Goldoberfläche.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusammen mit weiteren Mitgliedern der Abteilung verschiedene Funktionalisierungsstrategien für unterschiedliche poröse Systeme entwickelt werden. Als zuverlässigste Methode zur Erzeugung porenüberspannender Membranen ergab sich die gezielte Goldbeschichtung der Porenstege mittels Hochvakuummetallverdampfung mit einer anschließenden Funktionalisierung durch Chemisorption von 6-Mercaptohexanol. Für die Experimente zur SNARE-vermittelten Fusion wurde diese Methode für Substrate mit offenen Poren verwen-

det, um eine gute Reproduzierbarkeit bei der Entwicklung des Fusionsassays zu gewährleisten. Dennoch könnten die beschriebenen Funktionalisierungsstrategien in zukünftigen Arbeiten eingesetzt werden, um zusätzliche Informationen über die Fluoreszenz im Stegbereich zu erhalten. Weiterhin könnten die Fusionsexperimente für eine erfolgreiche Detektion der Ausschüttung des Vesikelinhalts auf Substrate mit geschlossenen Poren übertragen werden.

### **Diffusion von Lipiden und Proteinen in porenüberspannenden Membranen**

Zur Bestimmung der Mobilität der rekonstituierten SNARE-Proteine in porenüberspannenden Membranen wurden FCS-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde zum einen eine fluoreszenzmarkierte, synthetische Transmembrandomäne von Syntaxin-1A und zum anderen eine fluoreszenzmarkierte Variante des vollständigen Syntaxin-1A verwendet. Gleichzeitig wurde jeweils die Diffusion eines lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt. Aufgrund des fluoreszenzlöschenden Effekts der Goldschicht auf den Porenstegen bis zu einem Abstand von etwa 15 nm<sup>[87,114]</sup>, konnten die FCS-Messungen jedoch ausschließlich im freitragenden Bereich der Membran durchgeführt werden.

Für die Lipiddiffusion wurden Diffusionskoeffizienten von  $7.7 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Atto488-DPPE) sowie  $7.4 \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (KK114-DPPE) bestimmt, was sehr gut mit Werten aus der Literatur für die Lipiddiffusion in freistehenden Membranen übereinstimmt.<sup>[82,98,116]</sup> Zusätzlich zeigt dies, dass die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle an der Kopfgruppe keinen Einfluss auf die Mobilität des jeweiligen Lipids in der Membran hatten.

Für die markierten Varianten von Synataxin-1A wurde ein im Rahmen der Fehlerintervalle gleicher Diffusionskoeffizient von  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Transmembrandomäne) beziehungsweise  $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (vollständiges Syntaxin-1A) bestimmt. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem von Bacia *et al.* überein.<sup>[71]</sup> Dort wurde ein Diffusionskoeffizient mittels FCS von  $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für eine C-terminal mit Alexa 488 markierte Variante Syntaxin (AS 183-289C)<sup>[117]</sup> in GUVs bestimmt. Die Mobi-

lität von Syntaxin-1A innerhalb der porenüberspannenden Membranen ist somit vergleichbar mit der Mobilität in freistehenden Membranen.

Die während den FCS-Messungen aufgenommenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Transmembrandomäne von Syntaxin-1A homogen in der porenüberspannenden Membran verteilt war (Abb. 4.24, S. 94), während das vollständige Protein eine Cluster-Bildung vornehmlich am Rand der Poren aufwies (Abb. 4.26, S. 96). Dieses Verhalten ist auf homotypische Protein-Protein-Wechselwirkungen des Syntaxins zurückzuführen, welche zum größten Teil dem SNARE-Bindungsmotiv zugeschrieben werden.<sup>[99,118]</sup> Ob auch im Fall des  $\Delta$ N-Akzeptorkomplexes eine Cluster-Bildung stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Da jedoch durch die Bindung von SNAP25a und dem Fragment von Synaptobrevin (49–96) das SNARE-Motiv des Syntaxins nahezu vollständig abgeschirmt sein sollte und die Bindung eines zweiten Syntaxins hierdurch verhindert wird<sup>[38]</sup>, kann eine Cluster-Bildung des Akzeptorkomplexes aufgrund von homotypischen Protein-Protein-Wechselwirkungen prinzipiell ausgeschlossen werden. Zusätzlich wird in der Literatur eine Clusterbildung von Syntaxin in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung der Membran beschrieben.<sup>[119–122]</sup> Die Clusterbildung wurde in einer Arbeit von Murray *et al.* durch die Zugabe von Cholesterin in die Membran ausgelöst.<sup>[119]</sup> In Anwesenheit anionischer Lipide wie Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P(2)) konnten die Cluster, durch die elektrostatische Bindung der Lipide an den positiv geladenen Bereich von Syntaxin in der Nähe der Membran, jedoch nahezu vollständig aufgelöst werden. Die Membranen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fusionsexperimenten enthielten stets einen Anteil von 10 % PS, sodass eine Clusterbildung auch von dieser Seite keine Auswirkung auf die erzielten Ergebnisse haben sollte.

Aufgrund der fluoreszenzlöschenden Wirkung der Goldschicht auf den Porenstegen konnte die Mobilität der SNARE-Proteine in diesem Bereich nur indirekt bestimmt werden. Hierzu wurden *fluorescence loss in photobleaching* (FLIP)-

Experimente durchgeführt. Das Bleichen des lipidgekoppelten Fluorophors sowie des fluoreszenzmarkierten Proteins in einem kleinen Bereich der Membran führte dabei zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität des gesamten Membranpatches. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine in der Lage sind die Porenstege zu überqueren. Ein Diffusionskoeffizient konnte anhand dieser Messungen nicht erhalten werden. Die Lipiddiffusion in festkörperunterstützten Membranen zeigt jedoch eine Verlangsamung in Abhängigkeit des verwendeten Substrats.<sup>[123]</sup> Auf Mica wurden dabei Diffusionskoeffizienten zwischen 1 und  $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  in DOPC Membranen mit 30% Cholesterin ( $1.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) und ohne Cholesterin ( $4.2 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) bestimmt.<sup>[63]</sup> Für die Lipiddiffusion auf Glas wurde ein Koeffizient von  $\approx 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  beschrieben.<sup>[124,125]</sup> Erst die Einführung einer Polyethylenglycol-Schicht zwischen Substrat und Membran kann hierbei zu einer Erhöhung der Mobilität mit einem Diffusionskoeffizienten von  $5.94 \pm 0.81 \mu\text{m}^2/\text{s}$  führen.<sup>[64]</sup> Parallel wurde in diesem Fall auch die Mobilität von zwei verschiedenen Transmembranhelices bestimmt, bei welchen ein Diffusionskoeffizient von  $\approx 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ( $2.14 \pm 0.49$  und  $1.78 \pm 0.46 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) gemessen wurde. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Diffusion der Proteine im Stegbereich der porenüberspannenden Membranen verlangsamt ist.

Anhand der gezeigten Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass sich porenüberspannende Membranen in Bezug auf die Diffusion der enthaltenen Komponenten wie eine freistehende Membran verhalten und sie hierdurch sehr gut für die Untersuchung der SNARE-vermittelten Fusion geeignet sind. Hiermit besitzen sie einen Vorteil gegenüber festkörperunterstützten Membranen, welche je nach verwendetem Substrat eine eingeschränkte Mobilität aufweisen können. Die auf porenüberspannenden Membranen erzielten Ergebnisse sollten sich somit gut mit Messungen an Vesikeln oder anderen freistehenden Membransystemen vergleichen lassen.

## 5.3 Rekonstitution der SNARE-Proteine in große und riesige Vesikel

Um die verwendeten SNARE-Proteine in große und riesige Vesikel überführen zu können, mussten sie zunächst in kleine unilamellare Vesikel (SUVs) rekonstituiert werden. Da die Vesikelfusion in Lösung (Bulk-Fusions-Assay, Kapitel 3.1.5) eine häufig zur Untersuchung von Membranfusionen eingesetzte Methode darstellt, ist eine Vielzahl von Protokollen für eine Rekonstitution der SNARE-Proteine in SUVs in der Literatur beschrieben.<sup>[107,108,126]</sup> In dieser Arbeit wurde ein etabliertes Protokoll unserer Kooperationspartner verwendet und für die Weiterverwendung der Vesikel bei der Rekonstitution in größere Vesikel optimiert.

Der Erfolg der Rekonstitution wurde anhand von Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimenten in Lösung untersucht. Hierbei wurde die Lipidvermischung als Folge der Fusion durch den Försterresonanzenergietransfer (FRET) zwischen den verwendeten lipidgebundenen Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Durch ein Blindexperiment, bei welchem der  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex durch Zugabe der löslichen SNARE-Bindungssequenz von Synaptobrevin-2 blockiert wurde, konnte die Abhängigkeit der Fusion von der Aktivität der SNARE-Proteine nachgewiesen werden.

Der in Abbildung 4.30 A gezeigte Kurvenverlauf der Intensität der Akzeptorfluoreszenz (Texas Red) deckt sich dabei sehr gut mit den Kurvenverläufen vergleichbarer Experimente unserer Kooperationspartner.<sup>[20]</sup> In Verbindung mit dem eindeutigen Ergebnis des Blindexperiments, kann eine funktionelle Rekonstitution der SNARE-Proteine als gesichert gelten. Da die Vesikelfusionsexperimente in dieser Arbeit nur als Kontrolle für die angestrebte Rekonstitution verwendet wurden, wurde auf eine genaue Quantifizierung verzichtet.

Nachdem die Rekonstitution in kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUVs) bestätigt werden konnte, konnten diese Vesikel zur Erzeugung von großen (LUVs) und riesigen (GUVs) Vesikeln verwendet werden (Kapitel 3.3, S. 37). Bei der Entwicklung der Rekonstitutionsmethode wurde sich an zwei



Protokollen aus der Literatur orientiert.<sup>[71,90]</sup> Die bestehenden Protokolle wurden für die Verwendung der GUVs zur Erzeugung porenüberspannender Membranen angepasst. Auch hier konnte die Funktionalität der enthaltenen SNARE-Proteine in GUVs durch Fusionsexperimente in Lösung überprüft werden. Der erhaltene Verlauf der Fluoreszenzintensität zeigt auch hier eine SNARE-vermittelte Fusion der Vesikel (Abbildung 4.30 B, S. 101). Dabei ist eine deutlich langsamere Kinetik des Fusionsprozesses zu beobachten. Die charakteristische Fusionszeit bei der halben Höhe des maximalen Intensitätsanstiegs liegt für den Fall der Fusion von SUVs bei 44 s, wohingegen dieser Wert für die Fusion von GUVs mit LUVs erst nach 247 s erreicht wird. In Vergleichbaren Experimenten in der Literatur wurde für SUVs ein Wert von 30 s<sup>[38]</sup> und für die LUV-LUV-Fusion von 300 s<sup>[22]</sup> beschrieben. Dieses Verhalten wird auf die geringere Krümmung der Membran in großen Vesikeln zurückgeführt.<sup>[20,108]</sup> Die starke Krümmung in kleinen Vesikeln wird demnach während der Fusion abgebaut und erzeugt hierdurch einen signifikanten Energiebeitrag, welcher den Prozess beschleunigt.<sup>[127]</sup>

### **5.4 Detektion SNARE-Protein vermittelter Membranfusion einzelner Vesikel auf porenüberspannenden Membranen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Fusionsassay auf porenüberspannenden Membranen, basierend auf der Arbeit von Dr. I. Höfer, für die Untersuchung SNARE-vermittelter Membranfusion entwickelt werden. Hierzu wurden die verwendeten SNARE-Proteine zunächst in große (LUVs) und riesige (GUVs) Vesikel rekonstituiert und die erzeugten GUVs zur Präparation von porenüberspannenden Membranen eingesetzt. Es wurden hierdurch porenüberspannende Membranen erhalten, die den  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex enthielten und mit Oregon Green fluoreszenzmarkiert waren. Die Fusion von LUVs, die das Protein Synaptobrevin-2 sowie den

Fluoreszenzfarbstoff Texas Red enthielten, mit der porenüberspannenden Membran wurde mit Hilfe der konfokalen Laserrasterfluoreszenzmikroskopie detektiert.

##### 5.4.1 Interpretation der beobachteten Ereignisse

In Abbildung 4.31 (S. 104) ist ein exemplarisches Fusionsereignis gezeigt, welches über alle gefundenen Merkmale der Fusion eines Vesikels mit der porenüberspannenden Membran verfügt. Zusätzlich sind die postulierten Zwischenstufen der Fusion in Bezug zu den beobachteten Intensitätsverläufen der Fluoreszenz der enthaltenen lipidgebundenen Farbstoffe schematisch dargestellt. Dies bildet die Grundlage für die Interpretation der in dieser Arbeit detektierten Fusionsereignisse. Ein sprunghafter Anstieg im roten Fluoreszenzkanal (Texas Red, Vesikel) ohne Reaktion im grünen Kanal (Oregon Green, porenüberspannende Membran) wurde als *Docking*-Ereignis definiert. Ein Abfall auf ein mittleres Niveau des roten Kanals mit zeitgleichem Anstieg der grünen Fluoreszenz, durch den Einstrom des Farbstoffs aus der porenüberspannenden Membran in die äußere Lipidschicht des Vesikels, wurde als die Bildung eines hemifusionierten Zustands angesehen. Kehreten beide Intensitäten auf die Basislinie zurück, wurde dies als vollständige Fusion verstanden. Zusätzlich wurden Ereignisse beobachtet, bei welchen der hemifusionierte Zustand nicht auflösbar war. Solche Ereignisse wurden als schnelle Fusionen betrachtet. Diese Interpretation wurde in gleicher Weise in einer Arbeit von van Lengerich *et al.* beschrieben, bei welcher die Fusion einzelner Vesikel mit einer festkörperunterstützten Membran, vermittelt durch ein SNARE-mimetisches Fusionssystem, basierend auf lipidgebundenen, komplementären DNA-Sequenzen, untersucht wurde.<sup>[102]</sup> Auch hier wurden die Zwischenstufen der Fusion anhand der beobachteten Intensitätsniveaus des, in der Vesikelmembran lokalisierten, Fluoreszenzfarbstoffs definiert. Es wurden die gleichen Ereignistypen unterschieden, jedoch im überwiegenden Maße Hemifusions- (65 %) und Dockingereignisse (30 %) gefunden, was auf das verwendete Fusionssystem aus hybridisierenden DNA-Sequenzen zurückgeführt wurde.

Für die SNARE-vermittelte Fusion auf festkörperunterstützten Membranen wird in der Literatur eine vergleichbare Unterscheidung von Ereignissen anhand der beobachteten Intensitätsverläufe getroffen.<sup>[60,73,128]</sup> Hier unterscheiden sich die Verläufe jedoch aufgrund des verwendeten experimentellen Aufbaus. Die Detektion erfolgt hier mit einem internen Totalreflektionsfluoreszenzmikroskop (TIRF-Mikroskop). In diesem Fall wird die Fluoreszenz des in der Vesikelmembran lokalisierten Farbstoffs nur mit Hilfe des durch die totale interne Reflexion erzeugten evaneszenten Feldes angeregt, wodurch nur die Farbstoffmoleküle erreicht werden, welche sich in räumlicher Nähe ( $< 200$  nm) zur Substratoberfläche befinden. Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt dabei exponentiell mit dem Abstand zur reflektierenden Fläche ab. Das Docken eines Vesikels führt somit nur zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität in einem beobachteten Bereich, während bei der Verteilung des Vesikelfarbstoffs in der Membran ein besonders ausgeprägter, sprunghafter Anstieg beobachtet wird, der im Anschluss durch die radiale Diffusion der Farbstoffmoleküle exponentiell abfällt. Ein hemifusionierter Zustand, wie er bei den Fusionsereignissen auf porenüberspannenden Membranen beobachtet werden kann, wurde in den meisten Fällen nicht beschrieben. Eine Arbeit von Liu *et al.* zeigt jedoch, dass dies auch bei der Fusion auf festkörperunterstützten Membranen beobachtet werden kann.<sup>[73]</sup> Die Fusion der jeweils inneren Lipidschichten zeigt sich hier jedoch nur in einem zweiten, kleineren Anstieg in der abfallenden Flanke der Vesikelfarbstoffintensität und wird nicht, wie in dieser Arbeit, durch ein zusätzliches Intensitätsniveau definiert. Durch Wang *et al.* wurde die Detektion des hemifusionierten Zustands auf festkörperunterstützten Membranen erweitert, indem eine parallele Detektion der Ausschüttung eines im Vesikel eingeschlossenen, wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs durchgeführt wurde.<sup>[59]</sup> Die Existenz eines hemifusionierten Übergangszustands zeigt sich hier durch die Verzögerung zwischen dem Anstieg der Fluoreszenz des lipidgebundenen Farbstoffs (Lipidvermischung) und dem spektral getrennten Intensitätsanstieg des wasserlöslichen Farbstoffs (Ausschüttung des Vesikelinhalts).

Die anhand der Ergebnisse dieser Arbeit postulierten Phasen der Fusion werden somit durch die bereits in der Literatur beschriebenen Daten gestützt. Die Existenz des gedockten und eines intermediären Zustands, bei welchem die äußeren Lipidschichten vermischt sind, kann damit als gesichert angesehen werden. Durch den Einstrom des lipidgekoppelten Farbstoffs aus der porenüberspannenden Membran in die Vesikelmembran kann, im Vergleich zu anderen Modellsystemen, der intermediäre Zustand der Fusion besser aufgelöst werden. Da bei den hier vorgestellten Experimenten bisher noch kein Farbstoff in die Vesikel eingeschlossen war und ein offenes poröses System genutzt wurde, konnte noch kein direkter Beweis für eine kontrollierte Ausschüttung des Vesikelinhalts als Folge der Fusion erbracht werden. Durch die Verwendung von Substraten mit geschlossenen Poren könnte der Vesikelinhalt jedoch nach der Ausschüttung im Inneren der Poren detektiert werden. Durch Neubacher et al. konnte in diesem Zusammenhang bereits der Eintrag eines wasserlöslichen Farbstoffs durch die Permeabilisierung der porenüberspannenden Membran auf porösen Aluminiumoxidsubstraten gezeigt werden.<sup>[129]</sup> Das in dieser Arbeit vorgestellte Modellsystem ist somit für eine Untersuchung der Ausschüttung des Vesikelinhalts geeignet.

#### 5.4.2 Auswertung der beobachteten Ereignisse

Die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit beobachteten Ereignisse ergab einen Anteil von 50 % an Vesikeln welche ausschließlich dockten, 20 % die im hemifusionierten Zustand verblieben sowie 30 % die eine vollständige Fusion zeigten. In der Literatur lassen sich für vergleichbare Fusionsexperimente auf festkörperunterstützten Membranen nur in seltenen Fällen exakte Angaben zum prozentualen Anteil von Fusionsereignissen in Bezug auf die Gesamtzahl an gedockten Vesikeln finden, da in vielen Fällen eine kinetische Auswertung im Vordergrund stand. Den besten Vergleich liefert dabei eine Studie von Domanska *et al.*, die ebenfalls unter Verwendung des von der Abteilung Jahn zur Verfügung gestellten  $\Delta N$ -Fusionssystems durchgeführt wurde.<sup>[60]</sup> Hier wurde eine Fusionsrate von 43 % aller

beobachteten Ereignisse beschrieben, wobei nicht zwischen Hemifusion und vollständiger Fusion unterschieden wurde (oder detektiert werden konnte). In einem weiteren Fall konnte durch Fix *et al.* eine Rate von nur 0.35 % an Fusionsereignissen in Abwesenheit von Calciumionen innerhalb einer Messdauer von 50 s beobachtet werden.<sup>[130]</sup> Die Zugabe von Calciumionen führte zu einer Steigerung auf 14.7 %.

Dies zeigt, dass das hier vorgestellte System über eine vergleichsweise hohe Fusionsgenität verfügt. Zusätzlich konnten bei den beobachteten Ereignissen verschiedene Phasen der Fusion unterschieden und zeitlich aufgelöst untersucht werden.

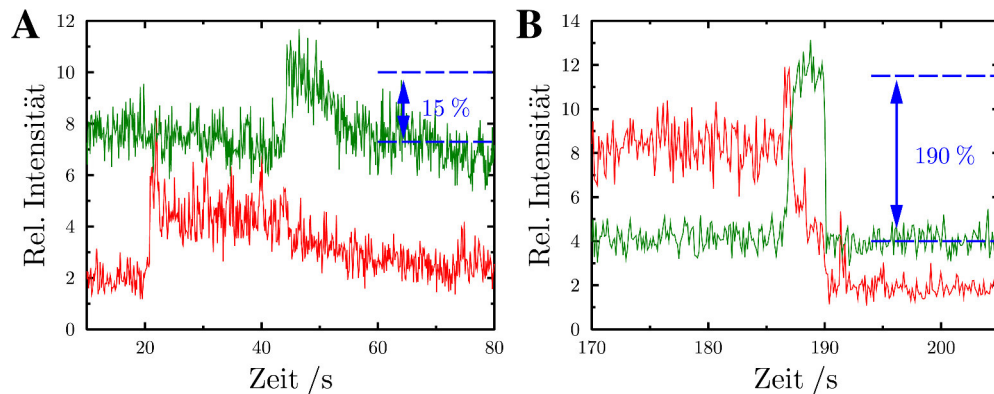
Die durchgeführten Blindexperimente, durch die Blockierung des Akzeptorkomplexes mit der löslichen SNARE-Bindungssequenz von Synaptobrevin-2 (1–96) sowie die Experimente in welchen sich ausschließlich Syntaxin-1A (183–288) in der porenüberspannenden Membran befand, zeigen dabei, dass die hier beobachteten Fusionsereignisse allein von der Aktivität der eingesetzten Proteine abhängig sind. Experimente auf festkörperunterstützten Membranen zeigten oft eine SNAP25-unabhängige Fusion, was ungewöhnlich ist, da im Normalfall nur die vollständige Fusionsmaschinerie in der Lage sein sollte die Fusion zu vermitteln.<sup>[62,131]</sup> Obwohl es sich in unserem Fall um eine teilweise festkörperunterstützte Membran handelt (Stegbereich), konnte ein solches Verhalten nicht beobachtet werden. Dies bestätigt die hohe Spezifität des hier vorgestellten Assays auf porenüberspannenden Membranen, wodurch er gut geeignet für mechanistische Studien des zugrunde liegenden Fusionsprozesses ist.

### **Einfluss des Substrats auf den Fusionsprozess**

Aufgrund der heterogenen Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Substrate, mit freistehenden Membranbereichen über den einzelnen Poren sowie den festkörperunterstützten Stegbereichen, wurde die Auswertung der Einzelereignisse für beide Bereiche getrennt betrachtet, um einen Einfluss des Substrats auf die Fusion zu prüfen. Hierzu wurden die Ereignisse anhand ihrer Schwerpunkte lokalisiert und über eine geometrisch berechnete Maske dem Poren- oder Stegbereich zugeordnet.

Hierbei zeigte sich, dass der Anstieg der Intensität des grünen Fluoreszenzkanals, durch den Einstrom des Farbstoffs aus der porenüberspannenden Membran in die äußere Lipidschicht des Vesikels, stark von der Position abhing. Zurückzuführen ist dies auf den fluoreszenzlöschenden Effekt der Goldschicht auf den Stegbereichen, wodurch die Gesamtintensität des grünen Kanals innerhalb des ROIs um einen Vesikel im Stegbereich stark verringert ist. Kommt es nun zu einem Einstrom von Oregon Green Farbstoffmolekülen in die Vesikelmembran, entfernen diese sich von der Goldoberfläche, sodass die Fluoreszenzlöschung aufgehoben wird. Der Fluoreszenzlöschende Effekt der Goldschicht besitzt eine Reichweite von etwa 15 nm.<sup>[87]</sup> Darüber hinaus kann bei Abständen von  $\approx 50$  nm von der Goldoberfläche sogar ein fluoreszenzverstärkender Effekt beobachtet werden.<sup>[114]</sup> Betrachtet man lediglich die Fläche der äußeren Lipidschicht eines durchschnittlich großen Vesikels von  $\approx 0.3 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zur Fläche beider Lipidschichten der porenüberspannenden Membran innerhalb der ROI ( $\approx 1.5 \mu\text{m}^2$ ) kann ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von etwa 20 % erwartet werden. In Abbildung 5.1 sind die Intensitätsverläufe eines Fusionsereignisses auf der Pore (A) sowie im Stegbereich (B) dargestellt. Innerhalb einer Pore zeigt sich ein Anstieg von  $\approx 15$  %, was gut mit dem Erwartungswert der rein geometrischen Betrachtung übereinstimmt. Auf dem Steg hingegen ist, durch die Löschung der Fluoreszenz in der porenüberspannenden Membran innerhalb der ROI, ein deutlich höherer Anstieg von  $\approx 190$  % sichtbar. Auf die Auswertung der beobachteten Ereignisse hatte dies jedoch keinen Einfluss, da der Anstieg der Intensität des Oregon Green Kanals bei der visuellen Begutachtung der Intensitätsverläufe nur qualitativ betrachtet wurde.

Von den insgesamt 2043 Ereignissen konnten 538 den freistehenden Membranbereichen über den Poren zugeordnet werden. Dies entspricht einem Anteil von 27 %. Der berechnete Anteil der Porenfläche an der Gesamtfläche beträgt 42 %. Es wurden somit nur etwa 64 % der für eine zufällige Verteilung der Ereignisse erwarteten Anzahl an Vesikeln auf der Porenfläche gefunden. Dies zeigt, dass eine leichte Präferenz für ein Docking auf den Porenstegen besteht. Ein Grund für



**Abbildung 5.1:** Verlauf der Fluoreszenzintensität des Texas Red (rot) sowie des Oregon Green Kanals (grün) bei einem vollständigen Fusionsereignis auf dem freitragenden, porenüberspannenden Membranbereich (A), sowie dem festkörperunterstützten Stegbereich (B).

diese Verhalten könnte eine Akkumulation des Akzeptorkomplexes im Bereich der Porenstege sein. In diesem Fall wäre eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Interaktion von Synaptobrevin-2 (Vesikel) mit dem  $\Delta N$ -Akzeptorkomplex, aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration, gegeben. Leider konnte ein solches Verhalten mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Syntaxin-1A durch den fluoreszenzlöschenden Effekt der Goldschicht nicht nachgewiesen werden. In der fluoreszenzmikroskopischen Abbildung, welche während der Mobilitätsmessungen aufgenommen wurde (Kapitel 4.2.4, Abb. 4.26, S. 96), zeigt sich jedoch eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität des fluoreszenzmarkierten Syntaxins am Rand der Poren. Dies könnte auf eine Akkumulation des Proteins im Stegbereich hindeuten. Überdies erfahren die Vesikel im Stegbereich durch die Nähe zum Substrat eine erhöhte van-der-Waals-Wechselwirkung, wodurch eine Anziehung auf die Oberfläche wirkt. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass die Vesikel im gedockten Zustand auf den Stegbereichen vollständig immobilisiert werden, während im Bereich der freistehenden Membran eine Diffusion der Vesikel in seltenen Fällen beobachtet werden kann. Erreicht der Vesikel den Rand der Pore besteht zudem eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der Vesikel dort adhärirt. Ein ähnliches Verhalten konnte für flüssig-geordnete Lipiddomänen von Dr. A. Orth in phasenseparierten, porenüberspannenden Membranen beobachtet werden.<sup>[93]</sup> Die flüssig-geordneten

Domänen konnten hierbei im freistehenden Bereich der Membran diffundieren, waren jedoch immobil, sobald sie Kontakt zum Porenrand besaßen. Dies wurde vorwiegend auf die Krümmung der Membran am Übergang zwischen Pore und Steg zurückgeführt. Die Krümmung entsteht durch die Adhäsion der Membran an die Funktionalisierung, sodass die Membran der Funktionalisierung, welche ein Stück weit über den Rand der Pore hinaus geht, folgt.<sup>[67,86,132]</sup>

Von den 538 Ereignissen im Bereich der Poren waren 284 (52.8 %) nur gedockt, 111 (20.6 %) erreichten den hemifusionierten Zustand und 143 (26.6 %) fusionierten vollständig. Auf den Stegen wurden 1491 Ereignisse detektiert, von denen 734 (49.2 %) Dockingereignisse, 292 (19.6 %) Hemifusionen und 465 (31.2 %) vollständige Fusionen waren. Ausgehend von diesem Ergebnis lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Bereichen der Membran erkennen. Dies ist überraschend, da für den freistehenden Membranbereich eine deutlich höhere Fusogenität vermutet wurde als für den festkörperunterstützten, da die erhöhte Vorspannung der freistehenden porenüberspannenden Membranen (1–3 mN/m) den Fusionsprozess prinzipiell erleichtern sollte, wie anhand von molekulardynamischen Simulationen gezeigt wurde.<sup>[133–135]</sup> Es scheint jedoch der Fall zu sein, dass das Verhalten der Membran in Bezug auf die Fusion in allen Membranbereichen sehr ähnlich ist, was sich bei der Betrachtung der Kinetik des Fusionsprozesses bestätigt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Mechanik der Membran vollständig von der Adhäsion an die funktionalisierte Oberfläche dominiert wird, welche auch ihre Vorspannung bestimmt.<sup>[88]</sup> Warum der Fusionsprozess auf den festkörperunterstützten Membranbereichen jedoch nicht von der Adhäsion gerade der unteren Lipidschicht, welche in direktem Kontakt zur Oberfläche steht, beeinflusst wird konnte nicht geklärt werden.

#### **Kinetische Auswertung des Fusionsprozesses**

Die Auswertung der Zeit zwischen Docking und dem Einsetzen der Fusion (Dockingzeit  $t_{dock}$ ) anhand des kinetischen Modells von Floyd *et al.* (Gleichung 4.3,



S. 123) ergab für Ereignisse auf den Poren sowie auf den Stegbereichen eine nahezu identische Geschwindigkeitskonstante der einzelnen Reaktionsschritte von  $k_{dock} = 0.035 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_{dock} = 0.033 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  mit einer erforderlichen Anzahl von  $1.7 \pm 0.2$  bzw.  $1.9 \pm 0.2$  Einzelschritten für eine Fusion. Dies entspricht einer mittleren Dockingzeit von  $58 \pm 25$  bzw.  $49 \pm 16$  s. Die Dockingzeiten liegen damit auf Pore- und Stegbereich innerhalb der Fehlerintervalle.

Vergleichbare Studien auf festkörperunterstützten Membranen erreichen Geschwindigkeitskonstanten, welche um einen Faktor von 1000 größer sind als die hier bestimmten.<sup>[60–62]</sup> Die Verzögerung zwischen Docking und Fusion beträgt dabei zwischen 5 und 50 ms. Die erste Studie dieser Art wurde von Fix et al. im Jahre 2004 veröffentlicht. Dort konnte nur eine relativ geringe Fusionsrate der Vesikel mit der Membran beobachtet werden, wie oben bereits beschrieben wurde. Der Großteil der detektierten Fusionsereignisse zeigten jedoch eine Dockingzeit zwischen 5 und 25 s, was im Vergleich zu dem in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnis einem Faktor von 2 entspricht. Die in den folgenden Jahren veröffentlichten Studien auf festkörperunterstützten Membranen verzeichneten eine schrittweise Reduktion der Dockingzeiten bis auf 1 – 5 ms im Jahr 2009.<sup>[59]</sup>

Die Geschwindigkeitskonstanten der Fusion, welche anhand von Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimenten in Lösung aus dem beobachteten Anstieg der Intensität im Fluoreszenzspektrometer bestimmbar sind, zeigen ein anderes Verhalten. Bei dieser Art von Experimenten werden mittlere Fusionszeiten gemessen, welche im Bereich von Minuten liegen.<sup>[20,107,136,137]</sup> Da hier das gesamte Ensemble der enthaltenen Vesikel, im Gegensatz zu einzelnen Fusionsereignissen auf planaren Membranen, beobachtet wird, sind die Fusionsraten jedoch zunächst nicht direkt vergleichbar. Um die Fusion der Vesikel in der Lösung auf der Ebene von Einzelereignissen untersuchen zu können, wurden von Cypionka *et al.* Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie (*fluorescence cross correlation spectroscopy*, FCCS)-Experimente durchgeführt.<sup>[106]</sup> Hierbei konnten gedockte und fusionierte Vesikelpaare in der Lösung unterschieden und so die Geschwindigkeitskonstanten des Dockings

und der Fusion separiert werden. Unter Verwendung der auch hier eingesetzten SNARE-Proteine, konnten sie damit zeigen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Vesikelfusionsexperimenten in Lösung nicht das Docken der einzelnen Vesikel, sondern deren Fusion ist. Die mittlere Dockingzeit wurde hierbei auf 800 s bestimmt, was einer Geschwindigkeitskonstanten von  $0.00125 \text{ s}^{-1}$  entspricht.

Fusionsexperimente auf Basis von auf einer passivierten Substratoberfläche immobilisierten SUVs, die mit SUVs aus der Lösung zur Fusion gebracht werden, zeigen ebenfalls eine deutlich langsamere Kinetik als auf festkörperunterstützten Membranen.<sup>[48,50,51]</sup> Kyoung *et al.* entwickelten auf dieser Grundlage ein Modellsystem, bei dem die Fusion, nach natürlichem Vorbild, durch eine sprunghafte Erhöhung der Calciumionenkonzentration ausgelöst werden konnte. Die Zugabe von Synaptobrevin-haltigen Vesikeln auf die, an der Substratoberfläche immobilisierten, Vesikel mit Syntaxin-1A und SNAP25 führte hierbei zu einer spontanen Fusion von etwa 20 % der beobachteten Vesikelpaare in einem Zeitraum von 500 s. Nach einer Wartezeit von 30 min zeigten weitere 20 % Hemifusion. Im Anschluss daran konnten durch die Zugabe von Calciumionen weitere 20 % der Vesikelpaare innerhalb eines Zeitfensters von 50 s zur Fusion gebracht werden. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Synaptotagmin und Complexin in das System verstärkt werden. Die Interaktion der Vesikel durch die enthaltenen SNARE-Proteine wurde hierbei als Ausgangspunkt für die durch Calciumionen ausgelöste Fusion verstanden (*priming*).<sup>[52]</sup> Dies könnte erklären, warum bei der in dieser Arbeit untersuchten Fusion auf porenüberspannenden Membranen 50 % der Vesikel nur docken und innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht fusionieren. Die leicht erhöhte Fusionsrate könnte dabei auf die Vorspannung der porenüberspannenden Membran zurückgeführt werden, welche in molekulardynamischen Simulationen eindeutig die Fusion begünstigte.<sup>[47]</sup> In diesen Kontext würden auch die Ergebnisse von Fix *et al.* passen, bei welchen nur eine sehr geringe Fusionsrate auf festkörperunterstützten Membranen bestimmt wurde.<sup>[130]</sup>

Ein Grund für den eklatanten Unterschied der Dockingzeiten zwischen den Experimenten auf festkörperunterstützten Membranen und den in dieser Arbeit verwendeten porenüberspannenden Membranen ist nur schwer auszumachen. Einer der Gründe scheint die Größe der eingesetzten Vesikel zu sein. In der Literatur werden ausschließlich kleine unilamellare Vesikel (SUVs) mit einem Durchmesser von etwa 50 nm verwendet, da diese nahezu der Größe natürlicher synaptischer Vesikel entsprechen. In dieser Arbeit wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) mit einem mittleren Durchmesser von 325 nm verwendet. Bereits die Vesikel-Vesikelfusionsexperimente in Kapitel 4.3 haben eine deutlich verlangsamte Kinetik im Falle großer Vesikel gezeigt. Eine Verlangsamung des Fusionsprozesses wurde bereits in der Literatur ausführlich diskutiert und wird der geringeren Membrankrümmung der großen Vesikel zugeschrieben.<sup>[20,127]</sup> Dieser Effekt würde den Unterschied zwischen den Dockingzeiten von Fix *et al.* (5–25 s) und den unseren sinnvoll erklären (Faktor 2). Betrachtet man hingegen die Geschwindigkeitskonstanten, welche anhand von Vesikelfusionsexperimenten in Lösung oder an immobilisierten Vesikeln bestimmt wurden, ist festzustellen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Fusionsereignisse auf porenüberspannenden Membranen eine leicht erhöhte Geschwindigkeit aufweisen. Dies könnte mit der Vorspannung der porenüberspannenden Membran hinreichend begründet werden. Die stark erhöhte Fusionsgeschwindigkeit von Vesikeln auf festkörperunterstützten Membranen scheint ein systembedingtes Phänomen zu sein. Eindeutige Gründe hierfür konnten nicht ermittelt werden und auch in der Literatur waren keine Hinweise erkennbar.

### **Benötigte Anzahl an Reaktionsschritten für ein Fusionsereignis**

Ein weiteres Ergebnis der kinetischen Auswertung der Dockingzeit ist die Anzahl an Reaktionsschritten, die nötig sind um die Fusion durchzuführen. Das verwendete kinetische Modell von Floyd *et al.* wurde entwickelt, um einen Hinweis auf die benötigte Anzahl an Fusionsproteinen bei der viralen Membranfusion zu erhalten. In Analogie hierzu könnte die Zahl der Reaktionsschritte in unserem Fall als die

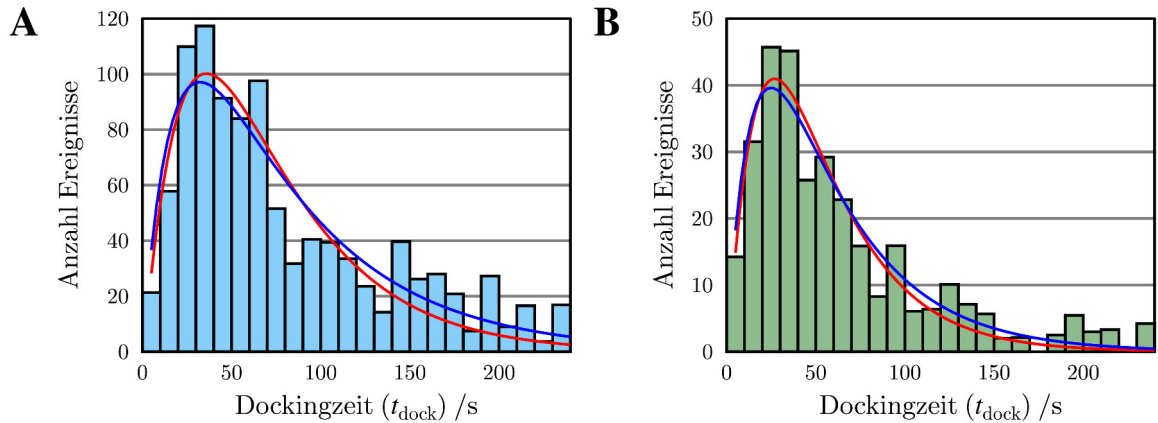
Anzahl der für die Fusion benötigten SNARE-Komplexe interpretiert werden. Die Zahl an Reaktionsschritten wurde für die Fusion auf Pore und Steg auf  $\approx 2$  ( $1.8 \pm 0.2$ ) bestimmt.

Ein ähnlicher Ansatz wurde von Domanska et al. für die SNARE-vermittelte Membranfusion gewählt. Sie entwickelten für Fusionsexperimente auf festkörperunterstützten Membranen ein kinetisches Modell in welchem eine parallele Aktivierung der zur Fusion führenden Reaktionsschritte angenommen wurde, um die Anzahl an benötigten SNARE-Komplexen für eine Fusion zu ermitteln. Zum Vergleich wurde auch für dieses Modell eine Kurvenanpassung an die in dieser Arbeit bestimmten Dockingzeiten nach folgender Formel vorgenommen:

$$N(t) = N_0 \left(1 - e^{-k_{dock}t}\right)^m. \quad (5.1)$$

$N$  ist hierbei die Anzahl an Ereignissen zum Zeitpunkt  $t$  von der Gesamtzahl  $N_0$ ,  $k_{dock}$  ist die Geschwindigkeitskonstante der einzelnen Reaktionsschritte  $m$ . Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 5.2 für den Stegbereich (A) sowie auf den Poren (B) dargestellt (rote Kurve). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich im Vergleich zum kinetischen Modell von Floyd *et al.* im Rahmen der Fehlerintervalle nicht ( $0.024 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$  Steg,  $0.018 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$  Pore). Es wird auch hier eine Anzahl an benötigten Reaktionsschritten von  $\approx 2$  ( $1.7 \pm 0.7$ ) erhalten (beide Fälle).

Die Zahl an SNARE-Komplexen, welche für eine erfolgreiche Fusion benötigt werden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Angaben liegen dabei für verschiedene Studien zwischen einem und 15 SNARE-Komplexen für die Fusion von SUVs.<sup>[60,61,138–140]</sup> Unsere Kooperationspartner Hernandez *et al.* konnten unter Verwendung des  $\Delta N$ -Fusionssystems zeigen, dass für eine effiziente Fusion von LUVs, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, eine Mindestanzahl von 20–30 SNARE-Komplexen benötigt wird.<sup>[97]</sup> Zusätzlich wird ein Kooperativitätseffekt diskutiert, bei dem sich die SNARE-Komplexe in einer ringförmigen



**Abbildung 5.2:** Kurvenanpassung von Gleichung 5.1 (rote Kurve) und 5.2 (blaue Kurve) an das Histogramm der Dockingzeiten auf dem festkörperunterstützten Stegbereich (A), sowie dem freitragenden, porenüberspannenden Membranbereich (B).

Struktur um die Kontaktfläche des Vesikels mit der Membran anordnen. Eine solche Anordnung wurde bereits in den neunziger Jahren postuliert.<sup>[33]</sup> Die hohe Zahl an SNARE-Komplexen scheint, im Gegensatz zu der hier anhand der kinetischen Modelle bestimmten Zahl von zwei, realistischer, da bei dem eingesetzten  $\Delta N$ -Fusionssystem eine große Menge der durch die Bildung des SNARE-Komplexes freigesetzten Energie für die Verdrängung des Fragments von Synaptobrevin-2 (49–96) aufgewendet werden muss ( $56–77 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).<sup>[20]</sup>

Die oben genannten kinetischen Modelle erscheinen eher ungeeignet für die Beschreibung der in dieser Arbeit beobachteten Prozesse, da zum einen die ermittelte Anzahl an SNARE-Komplexen mit zwei Komplexen pro Fusion sehr gering und zum anderen die beobachtete Dauer des Prozesses für die Assemblierung von nur zwei einzelnen SNARE-Komplexen deutlich zu lang ist. Aus diesem Grund wurde ein allgemeineres kinetisches Modell an den erhaltenen Dockingzeiten getestet. Hierfür wurden zwei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten angenommen:

$$N(t) = N_0 \cdot \frac{k_1}{(k_2 - k_1)} \cdot e^{-k_2 t} \cdot e^{(k_2 - k_1)t} - 1. \quad (5.2)$$

Das Ergebnis der Anpassung dieses Modells ist in Abbildung 5.2 gezeigt (blaue Kurve). Für den ersten Reaktionsschritt wurde eine Geschwindigkeitskonstante von  $0.016 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$  im Stegbereich und  $0.023 \pm 0.013 \text{ s}^{-1}$  im Bereich der Poren ermittelt, was einer mittleren Reaktionszeit von  $\approx 64$  bzw.  $44 \text{ s}$  entspricht. Der zweite Reaktionsschritt ist schneller mit einer Konstanten von  $0.05 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $0.06 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ , die eine Reaktionszeit von  $\approx 18$  und  $15 \text{ s}$  ergeben. Die erhobenen Daten können somit auch durch dieses Modell beschrieben werden. Dies zeigt, dass die beobachteten Prozesse in dem hier betrachteten Modellsystem in anderer Weise interpretiert werden sollten.

Die lange Dauer der Reaktionsschritte könnte hierbei durch den Ablauf verschiedener Prozesse begründet sein. Zunächst könnte es notwendig sein, dass, nach einer initialen Bindung des Vesikels durch die Interaktion einiger weniger SNARE-Proteine, weitere SNARE-Komplexe an der Bindungsstelle akquiriert werden müssen, bis eine ausreichende Anzahl für eine Fusion vorhanden ist. Dies könnte durch die verlangsamte Diffusion der Proteine auf den festkörperunterstützten Stegbereichen behindert sein. Zusätzlich wird die vollständige Ausbildung der SNARE-Komplexe durch die Verdrängung des Synaptobrevin-2-Fragments verzögert.

Eine aktuelle Studie von Baharat *et al.* konnte anhand von Cryo-Elektronenmikroskopie (*cryoEM*) zeigen, dass vor der Fusion verschiedene Stadien des Membrankontakts zwischen Vesikel und Zielmembran auftreten.<sup>[21]</sup> Sie untersuchten dabei die Fusion zwischen SUVs und GUVs, wobei sie zusätzlich zu den SNARE-Proteinen Synaptotagmin in den Vesikeln und Complexin einsetzten. Synaptotagmin fungierte dabei als Calciumsensor, während Complexin dazu diente, die Faltung des SNARE-Komplexes vorübergehend zu unterbinden, wie bereits an anderer Stelle gezeigt werden konnte.<sup>[90,141,142]</sup> Es wurden drei unterschiedliche Arten des Kontakts zwischen SUVs und GUVs beschrieben. Der normale Kontakt, bei welchem die Membranen nah beieinander, aber immer noch klar getrennt waren, der erweiterte Kontakt, bei dem die Membranen direkt aneinander lagen, sowie ein Stadium, bei dem die Zielmembran eine Verformung aufweist und in Richtung des

Vesikels leicht ausgestülpt ist. Während das prozentuale Auftreten der erstgenannten Kontaktarten auch nach längerer Inkubationszeit (60 min) gleich blieb, erhöhte sich der Anteil an Vesikelkontakten mit einer Verformung der Membran. Es wird dabei postuliert, dass durch die Verformung der Zielmembran eine Krümmung induziert wird, die im weiteren Verlauf eine Fusion ermöglicht.<sup>[47,127]</sup> Die Fusion der gebundenen Vesikel konnte durch die Zugabe von Calciumionen ausgelöst werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein *priming* der Vesikel an der Membran stattfindet, bei dem sie in einem metastabilen Stadium gehalten werden, wodurch im Anschluss eine schnelle Fusion, als Reaktion auf den sprunghaften Anstieg der Calciumionenkonzentration, ausgelöst werden kann.

Bezogen auf die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente könnte die für eine Fusion notwendige Verformung der porenüberspannenden Membran am Kontaktpunkt des Vesikels ein weiterer Schritt zur Schaffung der Voraussetzungen für eine Fusion sein. Dies ist durch die Vorspannung der Membran erschwert. Die lange Dauer zwischen Docking und Fusion könnte somit als Teil eines *priming*-Prozesses der Vesikel interpretiert werden, wodurch der sehr langsame, spontane Fusionsprozess erklärt werden könnte.

Durch die Integration weiterer, an der synaptischen Fusion beteiligter, Proteine in das System, wie Synaptotagmin und Complexin, könnte untersucht werden, ob die beobachtete spontane Fusion durch eine Regulation der SNARE-Proteine kontrolliert werden kann. Durch die Zugabe von Complexin sollte sich demnach die Dauer des gedockten Zustands verlängern lassen und die Fusion sich dann mit Hilfe des Calciumsensors Synaptotagmin durch einen Calciumionenpuls einleiten lassen.

### 5.4.3 Dauer des hemifusionierten Zustands

Für den hemifusionierten Zustand wurde ein einstufiger Mechanismus angenommen, für den eine Geschwindigkeitskonstante von  $\approx 0.23 \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde. Hierbei wurden sowohl Ereignisse, deren Dauer des hemifusionierten Zustands be-

stimbar war, als auch Ereignisse mit einer Hemifusionsdauer unterhalb der zeitlichen Auflösung ( $\approx 360$  ms, 3 Bilder) berücksichtigt (insgesamt 30 % aller Ereignisse). 20 % aller detektierten Ereignisse verblieben über die Beobachtungszeit hinaus im hemifusionierten Zustand.

Die Existenz eines hemifusionierten Zustands im Mechanismus der Membranfusion wurde bereits von mehreren Studien beschrieben.<sup>[20,48,73,102]</sup> Eine vergleichbar genaue kinetische Auswertung der Hemifusionszeit von einzelnen Vesikeln konnte jedoch nur in einer Arbeit von Liu *et al.* für die Fusion von SUVs mit festkörperunterstützten Membranen gefunden werden.<sup>[73]</sup> In dieser Studie wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) auf das Auftreten und die Dauer des hemifusionierten Zustands untersucht. Bei gleicher PE-Konzentration wie in dieser Arbeit (20 %) ermittelten Liu *et al.* unter Verwendung der selben Anpassungsfunktion eine Geschwindigkeitskonstante von  $1.1 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$  mit einem ähnlichen Anteil an unproduktiven Hemifusionsereignissen ( $\approx 25$  %). Die Dockingzeit vor dem Einsetzen der Fusion war dabei etwa  $1000 \times$  kürzer als die in dieser Arbeit bestimmten, während die Hemifusionszeit nur etwa  $5 \times$  kürzer war. Dies weist darauf hin, dass beide Reaktionsschritte unabhängig voneinander ablaufen. Eine Analyse der Dockingzeiten für die drei in dieser Arbeit beobachteten unterschiedlichen Fusions Szenarien der Vesikel (schnelle Fusion, verzögerte Fusion und Hemifusion) ergab, dass keinerlei Unterschiede in der Dockingzeit für die verschiedenen Fusionswege zu erkennen waren (Abbildung 5.3).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Prozess, welcher die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Fusion der proximalen Lipidschichten schafft, unabhängig von dem weiteren Fortgang der Fusion, sprich der Öffnung einer Fusionspore, abläuft. Die fünfmal höhere Geschwindigkeit des Übergangs von der Hemifusion zur vollständigen Fusion bei den Experimenten auf festkörperunterstützten Membranen kann durch die in dieser Arbeit verwendeten großen Vesikel (LUVs) und die damit einhergehende geringere Krümmung der Vesikelmembran erklärt werden.



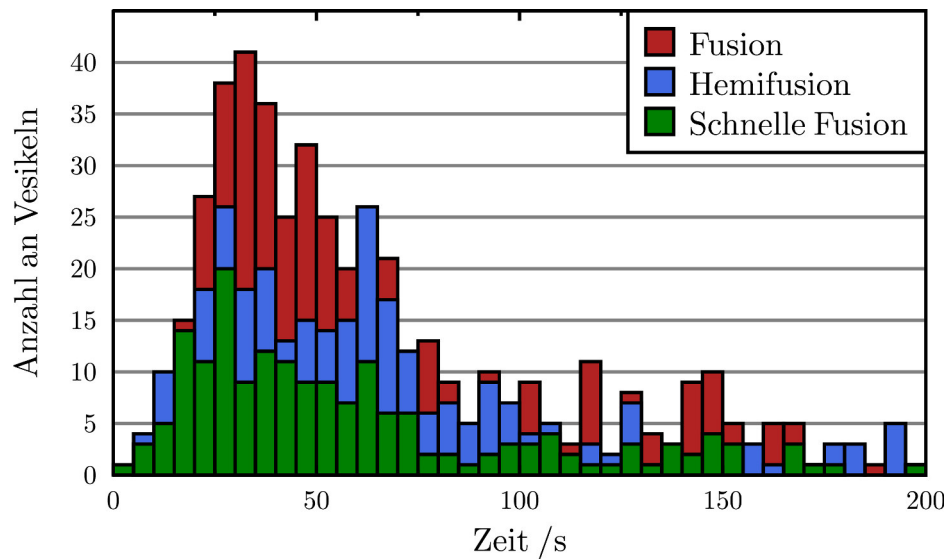


Abbildung 5.3: Vergleich der Dockingzeiten für die verschiedenen Fusionswege.

Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass der Mechanismus der Membranfusion über die Bildung eines hemifusionierten Zustands verläuft.<sup>[143–147]</sup> Die erste Stufe der Fusion ist dabei die Ausbildung eines initialen Fusions-*stalks*, bei welchem sich die proximalen Lipidschichten der Membranen vermischen. Der weitere Verlauf der Fusion *in vivo* ist jedoch weiterhin unklar. Hierzu werden zwei mögliche Mechanismen in Betracht gezogen. Die eine Möglichkeit ist die Öffnung einer Fusionspore im direkten Anschluss an die Bildung eines transienten Fusions-*stalks*. In einem zweiten möglichen Szenario kommt es zunächst zu einer Erweiterung des initialen *stalks*, sodass die distalen Lipidschichten sich zu einer Lipiddoppelschicht verbinden und ein sogenanntes Hemifusionsdiaphragma ausbilden.<sup>[147–151]</sup> Anhand von cryoEM-Aufnahmen konnte von Hernandez *et al.* die Bildung eines Hemifusionsdiaphragmas zumindest bei einem Teil der fusionierenden Vesikel *in vitro* beobachtet werden.<sup>[20]</sup> Dies war jedoch nur möglich bei Vesikeln, die über eine große Kontaktfläche miteinander verbunden waren und der Fusions-*stalk* somit stark aufgeweitet war. Aufgrund dieser Beobachtung wurde dieser Zustand als stabiles Nebenprodukt des Fusionsmechanismus betrachtet. Demnach würde die

Erweiterung des Fusions-stalks mit der Bildung eines Hemifusionsdiaphragmas eine Konkurrenzreaktion zur Öffnung einer Fusionspore darstellen.

Anhand von Elektronentomographie-Messungen konnte ein hemifusionierter Zustand mit einem Hemifusionsdiaphragma jedoch auch bei synaptischen Vesikeln an der präsynaptischen Membran *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>[152]</sup> Dies könnte bedeuten, dass es sich bei dieser Zwischenstufe der Fusion um das *priming* der Vesikel handelt. Es wird hierbei vermutet, dass die SNARE-vermittelte Fusion durch weitere Regulationsproteine im hemifusionierten Stadium konserviert wird, um eine abrupte Öffnung einer Fusionspore und die damit einhergehende Ausschüttung des Vesikelinhalts bei einer sprunghaften Erhöhung der Calciumionenkonzentration auszulösen.

Ob es sich bei der in dieser Arbeit beobachteten Hemifusion um ein *priming*-Schritt der Vesikel oder um eine Konkurrenzreaktion zur vollständigen Fusion handelt kann anhand der präsentierten Daten noch nicht geklärt werden. Die lange Lebensdauer des hemifusionierten Zustands bei einem Großteil der beobachteten Ereignisse, sowie die hohe Anzahl an unproduktiven Hemifusionsereignissen in unserem System, weisen jedoch darauf hin, dass es sich hierbei nicht um ein Nebenprodukt, sondern eine metastabile Zwischenstufe des Fusionsmechanismus handelt. Um an dieser Stelle einen erweiterten Einblick in den Mechanismus der SNARE-vermittelten Fusion zu erhalten, könnten dem System weitere regulatorische Proteine hinzugefügt werden.



## 6 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung eines Modellsystems für die SNARE-vermittelte Membranfusion auf Basis porenüberspannender Membranen. Ziel war es hierbei einzelne Vesikelfusionsereignisse mit der planaren porenüberspannenden Membran mittels konfokaler Laserrastermikroskopie zeitaufgelöst zu beobachten.

Hierzu wurden zunächst Protokolle für die hydrophile Funktionalisierung poröser Siliziumsubstrate entwickelt, wodurch eine reproduzierbare, lösungsmittelfreie Membranpräparation durch das Spreiten von riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) ermöglicht wurde. Es wurden jeweils zwei Funktionalisierungsstrategien für Substrate mit offenen und mit geschlossenen Poren entwickelt.

Die benötigten SNARE-Proteine wurden in *Escherichia coli* heterolog expremiert und konnten erfolgreich isoliert und in guter Reinheit erhalten werden. Die Funktionalität der Proteine konnte durch Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimente im Ensemble fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden.

Für die Entwicklung des Fusionsassays musste zunächst eine geeignete Methode für die Rekonstitution der SNARE-Proteine in porenüberspannende Membranen gefunden werden. Es wurde hierzu auf bekannte Protokolle für die Rekonstitution der Proteine in kleine unilamellare Vesikel (SUVs) mittels Detergenzentzug zurückgegriffen. Die erhaltenen SUVs wurden dann in einem weiteren Schritt in größere Vesikel überführt. Die erfolgreiche Rekonstitution der SNARE-Proteine in GUVs und große unilamellare Vesikel (LUVs) konnte durch Vesikel-Vesikel-Fusionsexperimente bestätigt werden. Die mittels Elektroformation erzeugten GUVs konnten im Folgenden erfolgreich zur Bildung porenüberspannender

Membranen auf hydrophil funktionalisierten porösen Substraten verwendet werden.

Die Mobilität von Syntaxin-1A in porenüberspannenden Membranen wurde mit Hilfe von FCS-Experimenten überprüft. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Mobilität von Syntaxin-1A in porenüberspannenden Membranen der in freistehenden Membranen entspricht. Dies unterstreicht die gute Eignung der porenüberspannenden Membranen als Modellsystem für die SNARE-vermittelte Fusion. Die Diffusion der Proteine auch über die Porenstege hinweg konnte durch FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*)-Experimente bewiesen werden.

Schlussendlich konnten im Rahmen dieser Arbeiten zum ersten mal die SNARE-vermittelte Fusion von LUVs mit der porenüberspannenden Membran anhand der Vermischung der Lipide beobachtet werden. Die porenüberspannende Membran war mit dem lipidgekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488, die Vesikelmembran mit Texas Red dotiert. Die Vermischung der Lipide führte zu charakteristischen Intensitätsverläufen der enthaltenen Fluoreszenzsonden, die eine Unterscheidung der Zwischenstufen des beobachteten Fusionsprozesses ermöglichten. Es konnte zwischen Docking, Hemifusion und vollständiger Fusion unterschieden werden. Zusätzlich konnten durch die Bestimmung der Verzögerung zwischen Docking und dem Einsetzen der Fusion, sowie der Dauer des hemifusionierten Zustands, Informationen über die Kinetik der Fusion auf porenüberspannenden Membranen erhalten werden. Die mittlere Dockingzeit bis zum Einsetzen der Fusion betrug hierbei etwa 50 s, die mittlere Dauer des hemifusionierten Zustands etwa 4 s. Insgesamt wurden über zweitausend Einzelereignisse untersucht.

Es konnte somit gezeigt werden, dass porenüberspannende Membranen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der SNARE-vermittelten Membranfusion darstellen. Aufgrund der niedrigen Geschwindigkeitskonstanten, sowohl des Übergangs von Docking zur Hemifusion, als auch von der Hemifusion zur vollständigen Fusion, bei dem gleichzeitig sehr hohen Detailgrad der Ergebnisse, bie-

---

ten die Fusionsexperimente auf porenüberspannenden Membranen herausragende Möglichkeiten den Fusionsmechanismus detailliert zu untersuchen. Besonders der Einsatz weiterer regulatorischer Proteine, sowie die Beobachtung der Ausschüttung des Vesikelinhalts unter Verwendung geschlossener Substrate, könnten das Potenzial des in dieser Arbeit entwickelten Fusionssystems weiter ausbauen.



# Literaturverzeichnis

- [1] Luckey, M. M. (2008) *Membrane Structural Biology* ed. Luckey, M. M. (Cambridge University Press).
- [2] Voet, D, Beck-Sickinger, A, Voet, J, & Pratt, C. W. (2010) *Lehrbuch der Biochemie* eds. Voet, D, Beck-Sickinger, A, Voet, J, & Pratt, C. W. (Wiley VCH).
- [3] Bonifacino, J. S & Glick, B. S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166.
- [4] Martens, S & McMahon, H. T. (2008) Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 543–556.
- [5] Chernomordik, L. V, Zimmerberg, J, & Kozlov, M. M. (2006) Membranes of the world unite! *J Cell Biol* **175**, 201–207.
- [6] Rand, R & Parsegian, V. (1989) Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **988**, 351–376.
- [7] Gawrisch, K, Ruston, D, Zimmerberg, J, Parsegian, V, Rand, R, & Fuller, N. (1992) Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophysical journal* **61**, 1213.
- [8] Wilschut, J, Duzgunes, N, Fraley, R, & Papahadjopoulos, D. (1980) Studies on the mechanism of membrane fusion: kinetics of calcium ion induced fusion of



- phosphatidylserine vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle contents. *Biochemistry* **19**, 6011–6021.
- [9] Düzgünes, N, Wilschut, J, Fraley, R, & Papahadjopoulos, D. (1981) Studies on the mechanism of membrane fusion. role of head-group composition in calcium-and magnesium-induced fusion of mixed phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **642**, 182–195.
- [10] Bentz, J, Duzgune, N, & Nir, S. (1983) Kinetics of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles: correlation between fusogenic capacities and binding affinities. *Biochemistry* **22**, 3320–3330.
- [11] Bentz, J, Duzgunes, N, & Nir, S. (1985) Temperature dependence of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine liposomes: evaluation of the kinetic rate constants. *Biochemistry* **24**, 1064–1072.
- [12] Aeffner, S, Reusch, T, Weinhausen, B, & Salditt, T. (2012) Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E1609–E1618.
- [13] Yang, L & Huang, H. W. (2003) A rhombohedral phase of lipid containing a membrane fusion intermediate structure. *Biophysical Journal*.
- [14] Otterstrom, J & van Oijen, A. M. (2013) Visualization of membrane fusion, one particle at a time. *Biochemistry* **52**, 1654–1668.
- [15] Israelachvili, J. N & Mitchell, D. J. (1975) A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **389**, 13–19.
- [16] Basáñez, G, Goñi, F. M, & Alonso, A. (1998) Effect of single chain lipids on phospholipase c-promoted vesicle fusion. a test for the stalk hypothesis of membrane fusion. *Biochemistry* **37**, 3901–3908.

- [17] Chernomordik, L, Kozlov, M, Melikyan, G, Abidor, I, Markin, V, & Chizmadzhev, Y. A. (1985) The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **812**, 643–655.
- [18] Smeijers, A, Markvoort, A, Pieterse, K, & Hilbers, P. (2006) A detailed look at vesicle fusion. *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 13212–13219.
- [19] Knecht, V & Marrink, S.-J. (2007) Molecular dynamics simulations of lipid vesicle fusion in atomic detail. *Biophysical journal* **92**, 4254–4261.
- [20] Hernandez, J. M, Stein, A, Behrmann, E, Riedel, D, Cypionka, A, Farsi, Z, Walla, P. J, Raunser, S, & Jahn, R. (2012) Membrane fusion intermediates via directional and full assembly of the snare complex. *Science* **336**, 1581–1584.
- [21] Bharat, T. A, Malsam, J, Hagen, W. J, Scheutzow, A, Söllner, T. H, & Briggs, J. A. (2014) Snare and regulatory proteins induce local membrane protrusions to prime docked vesicles for fast calcium-triggered fusion. *EMBO reports* **15**, 308–314.
- [22] Hernandez, J. M. (2011) Ph.D. thesis (Georg-August-Universität Göttingen).
- [23] Lu, X, Zhang, F, McNew, J. A, & Shin, Y.-K. (2005) Membrane fusion induced by neuronal snares transits through hemifusion. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 30538–30541.
- [24] Antonin, W, Fasshauer, D, Becker, S, Jahn, R, & Schneider, T. R. (2002) Crystal structure of the endosomal snare complex reveals common structural principles of all snares. *Nature Structural & Molecular Biology* **9**, 107–111.
- [25] Jahn, R & Südhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annual review of biochemistry* **68**, 863–911.
- [26] Wölfel, M & Schneggenburger, R. (2003) Presynaptic capacitance measurements and  $Ca^{2+}$  uncaging reveal submillisecond exocytosis kinetics and

- characterize the  $Ca^{2+}$  sensitivity of vesicle pool depletion at a fast CNS synapse. *The Journal of neuroscience* **23**, 7059–7068.
- [27] Jahn, R & Scheller, R. H. (2006) Snares—engines for membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**, 631–643.
- [28] Jahn, R & Fasshauer, D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207.
- [29] Malhotra, V, Orci, L, Glick, B. S, Block, M. R, & Rothman, J. E. (1988) Role of an n-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* **54**, 221–227.
- [30] Block, M. R, Glick, B. S, Wilcox, C. A, Wieland, F. T, & Rothman, J. E. (1988) Purification of an n-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proceedings of the national academy of sciences* **85**, 7852–7856.
- [31] Clary, D. O, Griff, I. C, & Rothman, J. E. (1990) Snaps, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**, 709–721.
- [32] Söllner, T, Whiteheart, S. W, Brunner, M, Erdjument-Bromage, H, Geromanos, S, Tempst, P, & Rothman, J. E. (1993) Snap receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* pp. 318–24.
- [33] Weber, T, Zemelman, B. V, McNew, J. A, Westermann, B, Gmachl, M, Parlati, F, Söllner, T. H, & Rothman, J. E. (1998) Snarepins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759–772.
- [34] Sutton, R. B, Fasshauer, D, Jahn, R, & Brunger, A. T. (1998) Crystal structure of a snare complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347–353.

- [35] Ernst, J. A & Brunger, A. T. (2003) High resolution structure, stability, and synaptotagmin binding of a truncated neuronal snare complex. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8630–8636.
- [36] Fasshauer, D, Sutton, R. B, Brunger, A. T, & Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: Snare proteins reclassified as q-and r-snares. *Proceedings of the national academy of sciences* **95**, 15781–15786.
- [37] Burkhardt, P. (2015) The origin and evolution of synaptic proteins—choanoflagellates lead the way. *The Journal of experimental biology* **218**, 506–514.
- [38] Pobbati, A. V, Stein, A, & Fasshauer, D. (2006) N-to c-terminal snare complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science* **313**, 673–676.
- [39] Stein, A, Weber, G, Wahl, M. C, & Jahn, R. (2009) Helical extension of the neuronal snare complex into the membrane. *Nature* **460**, 525–528.
- [40] Rigaud, J.-L & Lévy, D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol* **372**, 65–86.
- [41] Seddon, A. M, Curnow, P, & Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 105–117.
- [42] Lai, Y, Zhao, L, Bu, B, Lou, X, Li, D, Ji, B, Liu, J, Diao, J, & Shin, Y.-K. (2015) Lipid molecules influence early stages of yeast snare-mediated membrane fusion. *Physical Biology*.
- [43] Eastman, S. J, Hope, M. J, Wong, K. F, & Cullis, P. R. (1992) Influence of phospholipid asymmetry on fusion between large unilamellar vesicles. *Biochemistry* **31**, 4262–4268.
- [44] Wilschut, J, Scholma, J, Eastman, S. J, Hope, M. J, & Cullis, P. R. (1992) Calcium-induced fusion of phospholipid vesicles containing free fatty acids: modulation by transmembrane pH-gradients. *Biochemistry* **31**, 2629–2636.

- [45] Lentz, B. R, McIntyre, G. F, Parks, D. J, Yates, J. C, & Massenburg, D. (1992) Bilayer curvature and certain amphipaths promote poly (ethylene glycol)-induced fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles. *Biochemistry* **31**, 2643–2653.
- [46] Malinin, V. S, Frederik, P, & Lentz, B. R. (2002) Osmotic and curvature stress affect peg-induced fusion of lipid vesicles but not mixing of their lipids. *Biophysical journal* **82**, 2090–2100.
- [47] Shillcock, J. C & Lipowsky, R. (2005) Tension-induced fusion of bilayer membranes and vesicles. *Nature materials* **4**, 225–228.
- [48] Yoon, T.-Y, Okumus, B, Zhang, F, Shin, Y.-K, & Ha, T. (2006) Multiple intermediates in snare-induced membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 19731–19736.
- [49] Joo, C, McKinney, S. A, Nakamura, M, Rasnik, I, Myong, S, & Ha, T. (2006) Real-time observation of reca filament dynamics with single monomer resolution. *Cell* **126**, 515–527.
- [50] Diao, J, Cipriano, D. J, Zhao, M, Zhang, Y, Shah, S, Padolina, M. S, Pfuetzner, R. A, & Brunger, A. T. (2013) Complexin-1 enhances the on-rate of vesicle docking via simultaneous snare and membrane interactions. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 15274–15277.
- [51] Kyoung, M, Srivastava, A, Zhang, Y, Diao, J, Vrljic, M, Grob, P, Nogales, E, Chu, S, & Brunger, A. T. (2011) In vitro system capable of differentiating fast  $Ca^{2+}$ -triggered content mixing from lipid exchange for mechanistic studies of neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E304–E313.

- [52] Kyoung, M, Zhang, Y, Diao, J, Chu, S, & Brunger, A. T. (2013) Studying calcium-triggered vesicle fusion in a single vesicle-vesicle content and lipid-mixing system. *Nature protocols* **8**, 1–16.
- [53] Groffen, A. J, Martens, S, Arazola, R. D, Cornelisse, L. N, Lozovaya, N, de Jong, A. P, Goriounova, N. A, Habets, R. L, Takai, Y, Borst, J. G, et al. (2010) Doc2b is a high-affinity  $ca^{2+}$  sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science* **327**, 1614–1618.
- [54] Martens, S, Kozlov, M. M, & McMahon, H. T. (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* **316**, 1205–1208.
- [55] Hui, E, Johnson, C. P, Yao, J, Dunning, F. M, & Chapman, E. R. (2009) Synaptotagmin-mediated bending of the target membrane is a critical step in  $ca^{2+}$ -regulated fusion. *Cell* **138**, 709–721.
- [56] Janshoff, A & Steinem, C. (2006) Transport across artificial membranes—an analytical perspective. *Analytical and bioanalytical chemistry* **385**, 433–451.
- [57] Nagamatsu, S. (2006) TIRF microscopy analysis of the mechanism of insulin exocytosis. *Endocrine journal* **53**, 433–440.
- [58] Fish, K. N. (2009) Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Current protocols in cytometry* pp. 12–18.
- [59] Wang, T, Smith, E. A, Chapman, E. R, & Weisshaar, J. C. (2009) Lipid mixing and content release in single-vesicle, snare-driven fusion assay with 1–5 ms resolution. *Biophysical journal* **96**, 4122–4131.
- [60] Domanska, M. K, Kiessling, V, Stein, A, Fasshauer, D, & Tamm, L. K. (2009) Single vesicle millisecond fusion kinetics reveals number of snare complexes optimal for fast snare-mediated membrane fusion. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 32158–32166.

- [61] Karatekin, E, Di Giovanni, J, Iborra, C, Coleman, J, O'Shaughnessy, B, Seagar, M, & Rothman, J. E. (2010) A fast, single-vesicle fusion assay mimics physiological snare requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3517–3521.
- [62] Liu, T, Tucker, W. C, Bhalla, A, Chapman, E. R, & Weisshaar, J. C. (2005) Snare-driven, 25-millisecond vesicle fusion in vitro. *Biophysical journal* **89**, 2458–2472.
- [63] Benda, A, Benes, M, Marecek, V, Lhotsky, A, Hermens, W. T, & Hof, M. (2003) How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir*.
- [64] Roder, F, Waichman, S, Paterok, D, Schubert, R, Richter, C, Liedberg, B, & Piehler, J. (2011) Reconstitution of membrane proteins into polymer-supported membranes for probing diffusion and interactions by single molecule techniques. *Analytical Chemistry*.
- [65] Rawle, R. J, van Lengerich, B, Chung, M, Bendix, P. M, & Boxer, S. G. (2011) Vesicle fusion observed by content transfer across a tethered lipid bilayer. *Biophysical journal* **101**, L37–L39.
- [66] Höfer, I. (2011) Ph.D. thesis (Georg-August-University Göttingen).
- [67] Höfer, I & Steinem, C. (2011) A membrane fusion assay based on pore-spanning lipid bilayers. *Soft Matter* **7**, 1644–1647.
- [68] Benfenati, F, Greengard, P, Brunner, J, & Bähler, M. (1989) Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. *J Cell Biol* **108**, 1851–1862.
- [69] van den Bogaart, G, Meyenberg, K, Risselada, H. J, Amin, H, Willig, K. I, Hubrich, B. E, Dier, M, Hell, S. W, Grubmueller, H, Diederichsen, U, & Jahn,

- R. (2011) Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature* **479**, 552–555.
- [70] Christensen, S. M, Mortensen, M. W, & Stamou, D. G. (2011) Single vesicle assaying of snare-synaptotagmin-driven fusion reveals fast and slow modes of both docking and fusion and intrasample heterogeneity. *Biophys J* **100**, 957–967.
- [71] Bacia, K, Schuette, C. G, Kahya, N, Jahn, R, & Schwille, P. (2004) Snares prefer liquid-disordered over "raft"(liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J. Biol. Chem.* **279**, 37951–37955.
- [72] Domanska, M. K, Kiessling, V, & Tamm, L. K. (2010) Docking and fast fusion of synaptobrevin vesicles depends on the lipid compositions of the vesicle and the acceptor snare complex-containing target membrane. *Biophys. J.* **99**, 2936–2946.
- [73] Liu, T, Wang, T, Chapman, E. R, & Weisshaar, J. C. (2008) Productive hemifusion intermediates in fast vesicle fusion driven by neuronal snares. *Biophys. J.* **94**, 1303–1314.
- [74] Simonsson, L, Kurczyk, M. E, Trouillon, R, Hook, F, & Cans, A.-S. (2012) A functioning artificial secretory cell. *Sci Rep* **2**, 824.
- [75] Keller, R. (2008) Master's thesis (Georg-August-Universität Göttingen).
- [76] Singh, J & Whitten, J. E. (2008) Adsorption of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane on silicon oxide surfaces and adsorbate interaction with thermally deposited gold. *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 19088–19096.
- [77] Love, J. C, Estroff, L. A, Kriebel, J. K, Nuzzo, R. G, & Whitesides, G. M. (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical reviews* **105**, 1103–1170.



- [78] Singh Nalwa, H. (2002) *Handbook of Thin Films* ed. Singh Nalwa, H. (Elsevier Inc.).
- [79] Chapman, S & Cowling, T. G. (1970) *The Mathematical Theory of Non-uniform Gases* ed. Press, C. U. (Press Syndicate of the University of Cambridge).
- [80] Lee, Y. K, Lee, H, & Nam, J.-M. (2013) Lipid-nanostructure hybrids and their applications in nanobiotechnology. *NPG Asia Materials* **5**, e48.
- [81] Winterhalter, M. (2000) Black lipid membranes. *Current opinion in colloid & interface science* **5**, 250–255.
- [82] Weiß, K, Neef, A, Van, Q, Kramer, S, Gregor, I, & Enderlein, J. (2013) Quantifying the diffusion of membrane proteins and peptides in black lipid membranes with 2-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal* **105**, 455–462.
- [83] Frese, D, Steltenkamp, S, Schmitz, S, & Steinem, C. (2013) In situ generation of electrochemical gradients across pore-spanning membranes. *RSC Advances* **3**, 15752–15761.
- [84] Fuhrmans, M, Marelli, G, Smirnova, Y. G, & Müller, M. (2014) Mechanics of membrane fusion/pore formation. *Chemistry and physics of lipids*.
- [85] Yoo, J, Jackson, M. B, & Cui, Q. (2013) A comparison of coarse-grained and continuum models for membrane bending in lipid bilayer fusion pores. *Biophysical journal* **104**, 841–852.
- [86] Mey, I, Stephan, M, Schmitt, E. K, Müller, M. M, Ben Amar, M, Steinem, C, & Janshoff, A. (2009) Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 7031–7039.
- [87] Kocun, M, Lazzara, T. D, Steinem, C, & Janshoff, A. (2011) Preparation of solvent-free, pore-spanning lipid bilayers: modeling the low tension of plasma membranes. *Langmuir* **27**, 7672–7680.

- [88] Kuhlmann, J. W, Mey, I. P, & Steinem, C. (2014) Modulating the lateral tension of solvent-free pore-spanning membranes. *Langmuir* **30**, 8186–8192.
- [89] Gleisner, M, Mey, I, Barbot, M, Dreker, C, Meinecke, M, & Steinem, C. (2014) Driving a planar model system into the 3rd dimension: generation and control of curved pore-spanning membrane arrays. *Soft matter* **10**, 6228–6236.
- [90] Malsam, J, Parisotto, D, Bharat, T. A, Scheutzw, A, Krause, J. M, Briggs, J. A, & Söllner, T. H. (2012) Complexin arrests a pool of docked vesicles for fast  $Ca^{2+}$ -dependent release. *The EMBO journal* **31**, 3270–3281.
- [91] Greenspan, L et al. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **81**, 89–96.
- [92] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* **227**, 680–685.
- [93] Orth, A. (2012) Ph.D. thesis (Georg-August-University Göttingen).
- [94] Rieger, R, Röcker, C, & Nienhaus, G. U. (2005) Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory. *American journal of physics* **73**, 1129–1134.
- [95] Magde, D, Elson, E. L, & Webb, W. W. (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization. *Biopolymers* **13**, 29–61.
- [96] Wiesendanger, R. (2003) *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy - Methods and Applications* ed. Wiesendanger, R. (Cambridge University Press).
- [97] Hernandez, J. M, Kreutzberger, A. J, Kiessling, V, Tamm, L. K, & Jahn, R. (2014) Variable cooperativity in snare-mediated membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 12037–12042.
- [98] Przybylo, M, Sýkora, J, Humpolíc ková, J, Benda, A, Zan, A, & Hof, M. (2006) Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than

- in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir* **22**, 9096–9099.
- [99] Sieber, J. J, Willig, K. I, Heintzmann, R, Hell, S. W, & Lang, T. (2006) The snare motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophysical journal* **90**, 2843–2851.
- [100] Sieber, J. J, Willig, K. I, Kutzner, C, Gerding-Reimers, C, Harke, B, Donnert, G, Rammner, B, Eggeling, C, Hell, S. W, Grubmüller, H, et al. (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* **317**, 1072–1076.
- [101] Karatekin, E & Rothman, J. E. (2012) Fusion of single proteoliposomes with planar, cushioned bilayers in microfluidic flow cells. *Nature protocols* **7**, 903–920.
- [102] van Lengerich, B, Rawle, R. J, Bendix, P. M, & Boxer, S. G. (2013) Individual vesicle fusion events mediated by lipid-anchored dna. *Biophysical journal* **105**, 409–419.
- [103] Lin, W.-C, Yu, C.-H, Triffo, S, & Groves, J. T. (2010) Supported membrane formation, characterization, functionalization, and patterning for application in biological science and technology. *Current protocols in chemical biology* pp. 235–269.
- [104] Floyd, D. L, Ragains, J. R, Skehel, J. J, Harrison, S. C, & van Oijen, A. M. (2008) Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15382–15387.
- [105] Fasshauer, D, Otto, H, Eliason, W. K, Jahn, R, & Brünger, A. T. (1997) Structural changes are associated with soluble n-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* **272**, 28036–28041.

- [106] Cypionka, A, Stein, A, Hernandez, J. M, Hippchen, H, Jahn, R, & Walla, P. J. (2009) Discrimination between docking and fusion of liposomes reconstituted with neuronal snare-proteins using fcs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18575–18580.
- [107] Park, Y, Hernandez, J. M, van den Bogaart, G, Ahmed, S, Holt, M, Riedel, D, & Jahn, R. (2012) Controlling synaptotagmin activity by electrostatic screening. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 991–997.
- [108] Chen, X, Araç, D, Wang, T.-M, Gilpin, C. J, Zimmerberg, J, & Rizo, J. (2006) Snare-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicles. *Biophysical journal* **90**, 2062–2074.
- [109] Smith, E. A & Weisshaar, J. C. (2011) Docking, not fusion, as the rate-limiting step in a snare-driven vesicle fusion assay. *Biophys J* **100**, 2141–2150.
- [110] Lazzara, T. D, Carnarius, C, Kocun, M, Janshoff, A, & Steinem, C. (2011) Separating attoliter-sized compartments using fluid pore-spanning lipid bilayers. *ACS nano* **5**, 6935–6944.
- [111] Lazzara, T. D, Kliesch, T.-T, Janshoff, A, & Steinem, C. (2011) Orthogonal functionalization of nanoporous substrates: Control of 3d surface functionality. *ACS applied materials & interfaces* **3**, 1068–1076.
- [112] Gaddam, S, Kazi, H, Dong, B, Driver, M, & Kelber, J. (2015) Surface cleaning for enhanced adhesion to packaging surfaces: Effect of oxygen and ammonia plasma. *Journal of Vacuum Science & Technology A* **33**, 021301.
- [113] Arkles, B. (2006) Hydrophobicity, hydrophilicity and silanes. *Paint & Coatings Industry*.
- [114] Chi, Y. S, Byon, H. R, Lee, B. S, Kong, B, Choi, H. C, & Choi, I. S. (2008) Polymeric rulers: Distance-dependent emission behaviors of fluorophores

- on flat gold surfaces and bioassay platforms using plasmonic fluorescence enhancement. *Advanced Functional Materials* **18**, 3395–3402.
- [115] Watanabe, R, Soga, N, Fujita, D, Tabata, K. V, Yamauchi, L, Hyeon Kim, S, Asanuma, D, Kamiya, M, Urano, Y, Suga, H, & Noji, H. (2014) Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nat Commun* **5**, 4519.
- [116] Heinemann, F, Vogel, S. K, & Schwille, P. (2013) Lateral membrane diffusion modulated by a minimal actin cortex. *Biophys J* **104**, 1465–1475.
- [117] Schuette, C. G, Hatsuzawa, K, Margittai, M, Stein, A, Riedel, D, Küster, P, König, M, Seidel, C, & Jahn, R. (2004) Determinants of liposome fusion mediated by synaptic snare proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2858–2863.
- [118] Bar-On, D, Wolter, S, van de Linde, S, Heilemann, M, Nudelman, G, Nachliel, E, Gutman, M, Sauer, M, & Ashery, U. (2012) Super-resolution imaging reveals the internal architecture of nano-sized syntaxin clusters. *J Biol Chem* **287**, 27158–27167.
- [119] Murray, D. H & Tamm, L. K. (2009) Clustering of syntaxin-1a in model membranes is modulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and cholesterol. *Biochemistry* **48**, 4617–4625.
- [120] Murray, D. H & Tamm, L. K. (2011) Molecular mechanism of cholesterol- and polyphosphoinositide-mediated syntaxin clustering. *Biochemistry* **50**, 9014–9022.
- [121] Khuong, T. M, Habets, R. L. P, Kuenen, S, Witkowska, A, Kasproicz, J, Swerts, J, Jahn, R, van den Bogaart, G, & Verstreken, P. (2013) Synaptic pi(3,4,5)p3 is required for syntaxin1a clustering and neurotransmitter release. *Neuron* **77**, 1097–1108.

- [122] Predescu, S. A, Predescu, D. N, Shimizu, K, Klein, I. K, & Malik, A. B. (2005) Cholesterol-dependent syntaxin-4 and snap-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem* **280**, 37130–37138.
- [123] Macháň, R & Hof, M. (2010) Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* **1798**, 1377–1391.
- [124] Munro, J. C & Frank, C. W. (2004) In situ formation and characterization of poly(ethyleneglycol)-supported lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir*.
- [125] Sterling, S. M, Dawes, R, Allgeyer, E. S, Ashworth, S. L, & Neivandt, D. J. (2015) Comparison actin- and glass-supported phospholipid bilayer diffusion coefficients. *Biophys J* **108**, 1946–1953.
- [126] Kim, J.-Y, Choi, B.-K, Choi, M.-G, Kim, S, Lai, Y, Shin, Y.-K, & Lee, N. K. (2012) Solution single-vesicle assay reveals pip2-mediated sequential actions of synaptotagmin-1 on snares. *The EMBO journal* **31**, 2144–2155.
- [127] McMahon, H. T, Kozlov, M. M, & Martens, S. (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* **140**, 601–605.
- [128] Kiessling, V, Ahmed, S, Domanska, M. K, Holt, M. G, Jahn, R, & Tamm, L. K. (2013) Rapid fusion of synaptic vesicles with reconstituted target snare membranes. *Biophysical journal* **104**, 1950–1958.
- [129] Neubacher, H, Mey, I, Carnarius, C, Lazzara, T. D, & Steinem, C. (2014) Permeabilization assay for antimicrobial peptides based on pore-spanning lipid membranes on nanoporous alumina. *Langmuir* **30**, 4767–4774.
- [130] Fix, M, Melia, T. J, Jaiswal, J. K, Rappoport, J. Z, You, D, Söllner, T. H, Rothman, J. E, & Simon, S. M. (2004) Imaging single membrane fusion events mediated by snare proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7311–7316.

- [131] Bowen, M. E, Weninger, K, Brunger, A. T, & Chu, S. (2004) Single molecule observation of liposome-bilayer fusion thermally induced by soluble n-ethyl maleimide sensitive-factor attachment protein receptors (snares). *Biophysical journal* **87**, 3569–3584.
- [132] Böcker, M, Muschter, S, Schmitt, E. K, Steinem, C, & Schäffer, T. E. (2009) Imaging and patterning of pore-suspending membranes with scanning ion conductance microscopy. *Langmuir* **25**, 3022–3028.
- [133] Grafmüller, A, Shillcock, J, & Lipowsky, R. (2007) Pathway of membrane fusion with two tension-dependent energy barriers. *Physical review letters* **98**, 218101.
- [134] Gao, L, Lipowsky, R, & Shillcock, J. (2008) Tension-induced vesicle fusion: pathways and pore dynamics. *Soft Matter* **4**, 1208–1214.
- [135] Hed, G & Safran, S. A. (2003) Initiation and dynamics of hemifusion in lipid bilayers. *Biophys J* **85**, 381–389.
- [136] van den Bogaart, G, Thutupalli, S, Risselada, J. H, Meyenberg, K, Holt, M, Riedel, D, Diederichsen, U, Herminghaus, S, Grubmüller, H, & Jahn, R. (2011) Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of snare nucleation. *Nature structural & molecular biology* **18**, 805–812.
- [137] Parisotto, D, Malsam, J, Scheutzow, A, Krause, J. M, & Söllner, T. H. (2012) Snarepin assembly by munc18-1 requires previous vesicle docking by synaptotagmin 1. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31041–31049.
- [138] Shi, L, Shen, Q.-T, Kiel, A, Wang, J, Wang, H.-W, Melia, T. J, Rothman, J. E, & Pincet, F. (2012) Snare proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science* **335**, 1355–1359.

- [139] Sinha, R, Ahmed, S, Jahn, R, & Klingauf, J. (2011) Two synaptobrevin molecules are sufficient for vesicle fusion in central nervous system synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 14318–14323.
- [140] van den Bogaart, G, Holt, M. G, Bunt, G, Riedel, D, Wouters, F. S, & Jahn, R. (2010) One snare complex is sufficient for membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* **17**, 358–364.
- [141] Schaub, J. R, Lu, X, Doneske, B, Shin, Y.-K, & McNew, J. A. (2006) Hemifusion arrest by complexin is relieved by  $Ca^{2+}$ -synaptotagmin I. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 748–750.
- [142] Lai, Y, Diao, J, Cipriano, D. J, Zhang, Y, Pfuetzner, R. A, Padolina, M. S, & Brunger, A. T. (2014) Complexin inhibits spontaneous release and synchronizes  $Ca^{2+}$ -triggered synaptic vesicle fusion by distinct mechanisms. *Elife* **3**, e03756.
- [143] Risselada, H. J, Bubnis, G, & Grubmüller, H. (2014) Expansion of the fusion stalk and its implication for biological membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 11043–11048.
- [144] Lei, G & MacDonald, R. C. (2003) Lipid bilayer vesicle fusion: intermediates captured by high-speed microfluorescence spectroscopy. *Biophys J* **85**, 1585–1599.
- [145] Chernomordik, L. V & Kozlov, M. M. (2005) Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**, 375–382.
- [146] Kemble, G. W, Danieli, T, & White, J. M. (1994) Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* **76**, 383–391.
- [147] Nikolaus, J, Stöckl, M, Langosch, D, Volkmer, R, & Herrmann, A. (2010) Direct visualization of large and protein-free hemifusion diaphragms. *Biophys J* **98**, 1192–1199.



- [148] Chernomordik, L. V & Kozlov, M. M. (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* **15**, 675–683.
- [149] Tsai, H.-H. G, Chang, C.-M, & Lee, J.-B. (2014) Multi-step formation of a hemifusion diaphragm for vesicle fusion revealed by all-atom molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1529–1535.
- [150] Nishizawa, M & Nishizawa, K. (2013) Molecular dynamics simulation analysis of membrane defects and pore propensity of hemifusion diaphragms. *Biophys J* **104**, 1038–1048.
- [151] Warner, J. M & O’Shaughnessy, B. (2012) Evolution of the hemifused intermediate on the pathway to membrane fusion. *Biophys J* **103**, 689–701.
- [152] Zampighi, G, Zampighi, L, Fain, N, Lanzavecchia, S, Simon, S, & Wright, E. (2006) Conical electron tomography of a chemical synapse: vesicles docked to the active zone are hemi-fused. *Biophysical journal* **91**, 2910–2918.



# Anhang



---

## Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Argon	Linde (München)
Chloroform	VWR International (Darmstadt)
Ethanol	Fluka (Neu-Ulm)
Mucosol®	Merck (Darmstadt)
Parafilm	Pechiney Plastik Packaging (Chicago, USA)
Petrischalen	VWR International GmbH, Nürnberg
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPS	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Texas Red DHPE	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Oregon Green 488 DHPE	Invitrogen (Eugen, USA)
Ni-NTA-ATTO550	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
KCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Sucrose	Carl Roth (Karlsruhe)
ITO-Gläser	Präzisions Glas & Optik GmbH (Iserlohn)
Kupferband	Präzisions Glas & Optik GmbH (Iserlohn)
Polycarbonatmembran (Ø 1000 nm)	Avestin (Ontario, Kanada)
Eppendorf-Cups	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorfpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Porensubstrate (offen, 1.2 µm)	fluXXion (Eindhofen, Niederlande)
Titan-Target	Elektronen Optik Service GmbH (Dortmund)
Gold, 99.99%	Allgemeine Gold- und Silberscheideanstalt (Pforzheim)

---

## Geräte und Software

### Geräte

#### Fluoreszenzspektroskopie

JASCO FP 6500 JASCO (Easton, USA)

#### Fluoreszenzmikroskopie

Olympus BX51 Olympus (Tokio, Japan)

Objektiv LumPlan FLN 40x/0.80 W Olympus (Tokio, Japan)

LSM 710 Examiner Carl Zeiss GmbH (Jena)

#### UV/vis-Spektroskopie

Varian Cary Scan 50 Varian (Darmstadt)

Quarküvette Hellma (Mühlheim)

#### Elektroformation

Frequenzgenerator Aglient 333220A Aglient Technology (Santa Clara, USA)

#### Extrusion

Mikroliterspritze Hamilton (Bonaduz, Schweiz)

LiposoFast® Avestin (Ontario, Kanada)

#### Sonstige Geräte

Reinstwasseranlage MilliQ Gradient A10 Millipore (Eschborn)

Osmomat 030 Gonotec (Berlin)

Feinwaage CP225D Satorius (Göttingen)

pH-Meter Calimatic 766 Knick (Berlin)

Galaxy mini VWR International (Darmstadt)

MED 020 Modular High Vacuum Bal-Tec AG (Balzers, Liechtenstein)

Coating System

Sputter Coater 108auto Cressington (Watfort, USA)

Thickness Controller mtm 20 Cressington (Watfort, USA)

Ultraschallbad Sonorex RK 255 H Bandelin (Berlin)

Vakuumentrockenschrank Binder (Tuttlingen)

---

Plasma Cleaner PDC 32 G-2

Harrick (New York City, USA)

Schüttler Vortex Genie 2

Scientific Industries (Nidderau)

Concentrator 5301

Eppendorf (Hamburg)

## Software

Zen 2008 Carl Zeiss GmbH (Jena)

Zen 2011 Carl Zeiss GmbH (Jena)

ImageJ Open Source

Origin Pro 8.0 OriginLab Corporation (Northhampton, USA)

Matlab R2012b MathWorks®

## Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

### Symbole

$\lambda$	Wellenlänge
$k_B$	Boltzmannkonstante
$T$	Temperatur
$d$	Durchmesser
$p$	Druck
$g$	Erdbeschleunigung
$w$	Gewicht
$v$	Volumen
$M$	Molmasse
$t$	Zeit

---

$D$	Diffusionskoeffizient
$\tau_D$	charakteristische Diffusionszeit
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$I$	Intensität
$t_{dock}$	Dockingzeit
$t_{hemi}$	Hemifusionszeit
$N$	Anzahl
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$m$	Anzahl an Reaktionsschritten

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy)
AS	Aminosäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
Chol	Cholesterol
CLSM	konfokales Laserrastermikroskop (confocal laser scanning microscope)
DHPE	1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl.: fluorescence correlation spectroscopy)
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GUV	riesiger unilamellarer Vesikel (engl.: giant unilamellar vesicle)



---

His	Histidin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ITO	Indiumzinnoxid (engl.: indium tin oxide)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LUV	großer unilamellarer Vesikel (engl.: large unilamellar vesicle)
MH	6-Mercapto-1-hexanol
min	Minute
ms	Milisekunden
NSF	NEM-sensitive factor
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-l-serin
PSM	porenüberspannende Membran (engl.: pore-spanning membrane)
RT	Raumtemperatur
SNAP	soluble NSF-attachment protein
SNARE	SNAP receptor
SSM	festkörperunterstützte Membran (engl.: solid supported membrane)
TIRF	total internal reflection fluorescence
vgl.	vergleiche
vis	sichtbares Licht (engl.: visible)

---

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas im Rahmen des SFB 803. Ich bedanke mich für das Vertrauen ein für den Arbeitskreis so wichtiges Thema bearbeiten zu dürfen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tim Salditt für die bereitwillige Übernahme des Korreferats bedanken.

Ich danke Dr. Matthias Hernandez, Ursel Ries und Herrn Prof. Dr. Reinhard Jahn für die Bereitstellung der Plasmide und Proteine, sowie die Möglichkeit deren Isolierung aus erster Hand zu erlernen. Dragomir Milovanovic danke ich für die freundliche und kompetente Zusammenarbeit bei den FCS-Experimenten.

Prof. Dr. Burkhard Geil und Dr. Ingo Mey danke ich herzlich für die Entwicklung der Software zur Auswertung der einzelnen Fusionsereignisse.

Dank auch an meine Bachelor-Studentin Imke Fricke und meinen Master-Studenten Raphael Hubrich.

Vielen Dank auch an Martin Gleisner, Miriam Schwamborn, Jan Kuhlmann, Raphael Hubrich, Ole Schütte und Johannes Schumacher für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktive Kritik.

Ein herzliches Dankeschön geht an den gesamten Arbeitskreis. Ohne den Zusammenhalt, die Gespräche und die vielen schönen Stunden im Kaffeeraum oder der OC-Cafete wäre der Arbeitsalltag nur schwer auszuhalten gewesen.

Meinem Labornachbarn Jan danke ich für das offene Ohr und die Unterstützung in schweren Zeiten ...und die Bastelprojekte!

---

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich immer auffangen konnte und unterstützt hat. Ohne diesen Rückhalt hätte ich im Laufe der Doktorarbeit wahrscheinlich mehrfach das Handtuch geworfen. Es tut mir Leid, dass ich in dieser Zeit nicht mehr für euch da sein konnte.

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Lando Lantbert Gregor Schwenen

geboren am 03.11.1982 in Göttingen

Staatsangehörigkeit deutsch

## Promotion

seit 04.2011 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claudia Steinem am Institut für organische und biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Titel: "Üntersuchung einzelner SNARE-vermittelter Membranfusionsereignisse auf planaren porenüberspannenden Membranen"

## Studium

02.2011 Diplom im Studiengang Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen Note: 'Sehr Gut' (1.25)

04. – 11.2010 Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie der Georg-August-Universität Göttingen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claudia Steinem mit dem Titel: "*Rekonstitution und Bestimmung der lateralen Mobilität von Connexin 43 in porenüberspannenden Membranen*"  
Note: 'Sehr Gut' (1.3)

10.2003 Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen

## Schulbildung

08.2002 – 05.2003 Zivildienst an der Bettina-von-Arnim-Schule, Marburg

08.1993 – 06.2002 Abitur am Gymnasium Philippinum, Marburg

---

08.1989–07.1993 Grundschule Elnhausen, Marburg

## **Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit**

- Artikel            L.L.G. Schwenen, R. Hubrich, D. Milovanovic, B. Geil, J. Yang, A. Kros, R. Jahn, C. Steinem, „*Resolving single membrane fusion events on planar pore-spanning membranes*“, *Scientific Reports*, **2015**, 5:12006
- Vorträge            Awarded student talk, „*Pore spanning membranes as a model system for SNARE mediated membrane fusion*“, *Horizons in Molecular Biology*, Göttingen, 2014
- SFB Winterschool, „*SNARE-mediated fusion on pore-spanning membranes*“, Sonderforschungsbereich 803, 2014
- Poster             SFB Symposium, „*SNARE protein driven single vesicle fusion assay on pore spanning lipid bilayers*“, SFB 803, Göttingen, 2014
- European Biophysics Congress, „*SNARE mediated membrane fusion on pore-spanning membranes*“, Lissabon, 2013
- Annual meeting of the german biophysical society, „*Investigation of SNARE mediated membrane fusion on a single vesicle level*“, Göttingen, 2012

Göttingen , 5. Oktober 2015